

# **Verwendung hochauflösender Massenspektrometrie zur Suche neuer Lipid-Biomarker in biologischen Proben**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe - Universität

in Frankfurt am Main

von

Lisa Katharina Hahnefeld

aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2020

(D30)

Vom Fachbereich 14 der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: PD Dr. Nerea Ferreirós Bouzas

Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtke

Datum der Disputation:

“Their idea of finding a needle in a haystack seems to involve getting more hay.”

David Isenberg

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>13</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>16</b>
1.1 Biomarker.....	16
1.2 Lipide.....	17
1.2.1 Funktion und Bedeutung der Lipidklassen .....	18
1.2.1.1 Acyl-Fettsäuren .....	20
1.2.1.2 Glycerolipide.....	21
1.2.1.3 Glycerophospholipide .....	21
1.2.1.4 Sterollipide.....	23
1.2.1.5 Sphingolipide .....	23
1.2.1.6 Prenole.....	24
1.2.1.7 Polyketide.....	24
1.2.1.8 Saccharolipide.....	24
1.2.2 Lipid Identifizierung & Nomenklatur .....	24
1.3 Flüssigchromatographie .....	28
1.4 Massenspektrometrie .....	31
1.4.1 Ionenquellen.....	35
1.4.2 Massenanalytoren .....	36
1.4.3 Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer .....	38
1.4.4 LC-MS vs. Shotgun Lipidomics.....	42
1.5 Auswertung der Daten.....	43
1.5.1 Semi-targeted Auswertung .....	44
1.5.2 Untargeted Datenprozessierung .....	45
1.5.3 Normalisierung, Skalierung und Transformation .....	46
1.5.4 Umgang mit fehlenden Werten .....	49
1.5.5 Univariate Auswertung.....	50
1.5.5.1 <i>t</i> -Test bei unabhängigen Stichproben .....	52
1.5.5.2 <i>t</i> -Test bei abhängigen Stichproben .....	52
1.5.5.3 Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Test.....	52



1.5.5.4	Levene- oder Bartletts-Test .....	53
1.5.5.5	Welch-Test .....	53
1.5.5.6	Mann-Whitney-U- bzw. Wilcoxon-Test.....	53
1.5.5.7	ANOVA.....	53
1.5.5.8	Kruskal-Wallis-Test (H-Test).....	54
1.5.5.9	ANOVA mit Messwiederholungen.....	54
1.5.5.10	Friedman-Test .....	54
1.5.5.11	Bonferroni-Methode .....	54
1.5.5.12	False discovery rate .....	54
1.5.6	Multivariate Auswertung .....	55
1.5.6.1	Big Data .....	55
1.5.6.2	Hauptkomponentenanalyse .....	55
1.5.6.3	Partial least squares regression (PLS).....	56
1.5.6.4	Orthogonale PLS-DA (OPLS-DA) .....	56
1.6	Ziel der Arbeit .....	58
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>60</b>
2.1	Methodenentwicklung.....	60
2.1.1	Probenaufarbeitung .....	60
2.1.2	Chromatographie.....	62
2.1.3	Massenspektrometrie .....	64
2.1.4	Datenprozessierung und Auswertung .....	65
2.1.4.1	Normalisierung .....	66
2.1.4.2	Statistische Auswertung .....	67
2.2	Methodenüberprüfung .....	70
2.2.1	Matrixeffekt und Linearität .....	70
2.2.2	Verschleppung .....	72
2.2.3	Robustheit der Methode .....	72
2.2.4	Stabilität der Proben .....	73
2.3	Biologische Applikation.....	74
2.3.1	Präanalytik.....	76
2.3.2	Entzündungsmodelle in Mäusen.....	78
2.4	Reagenzien und Chemikalien .....	80
2.5	Geräte .....	84
2.5.1	Allgemeine Laborgeräte und –materialen .....	84
2.5.2	LC-MS-System .....	85
2.5.3	Software .....	85

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>86</b>
3.1	Methodenentwicklung .....	86
3.1.1	Probenaufarbeitung .....	86
3.1.2	Chromatographie .....	91
3.1.2.1	Säulenauswahl .....	91
3.1.2.2	Gradientenentwicklung .....	94
3.1.2.3	Injektion .....	98
3.1.2.4	Flussreduzierung .....	99
3.1.3	Massenspektrometrische Parameter .....	102
3.1.3.1	Lipididentifizierung .....	104
3.1.3.2	Massenkalibrierung .....	107
3.1.3.3	Datenabhängige vs. datenunabhängige MS/MS-Spektren .....	109
3.1.4	Datenprozessierung .....	111
3.1.4.1	Normalisierung .....	112
3.1.4.2	Statistische Auswertung .....	117
3.2	Methodenüberprüfung .....	126
3.2.1	Matrixeffekt und Linearität .....	126
3.2.1.1	Wiederfindung .....	127
3.2.1.2	Matrixeffekt und Prozesseffektivität .....	128
3.2.1.3	Linearität .....	128
3.2.2	Verschleppung und Blanksignale .....	131
3.2.3	Robustheit der Methode .....	131
3.2.4	Probenstabilität .....	134
3.3	Biologische Applikation .....	136
3.3.1	Präanalytik .....	138
3.3.2	Entzündungsmodelle in Mäusen .....	143
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>147</b>
4.1	Lipidprofil in den LPS/Zymosan-Entzündungsmodellen .....	147
4.2	Einfluss der Präanalytik und Probenvorbereitung .....	150
4.3	Optimierung der chromatographischen Trennung von Lipiden .....	154
4.3.1	Trennung von Isomeren und Isobaren durch RPLC .....	154
4.3.2	Verschleppung und Blanksignale .....	155
4.3.3	Kosten und Ressourcen in der LC-MS-Analytik .....	156
4.4	Hochauflösende Massenspektrometrie und untargeted Screening .....	157
4.5	Auswertung komplexer Datensätze .....	158
4.6	Relative Quantifizierung von Lipiden .....	160

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>162</b>
<b>6</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>Wissenschaftliche Kooperationen .....</b>	<b>165</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>166</b>
8.1	Abbildungen .....	166
8.2	R Skripte.....	171
8.2.1	Ersetzen von fehlenden Werten.....	171
8.2.2	Univariate Auswertung.....	177
8.2.3	Graphische Prüfung der Normalverteilung .....	190
8.3	Tabellen .....	194
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>274</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biomarker Kategorien.....	16
Abbildung 2: Multi- „omics“ Wissenschaften.....	18
Abbildung 3: Übersicht der wichtigsten Lipidklassen im Menschen.....	19
Abbildung 4: Strukturen verschiedener Lipidklassen.....	20
Abbildung 5: Isomerie von PC 36:2 und PE 39:2 sowie Selektivität verschiedener MS Methoden.....	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung der chromatographischen Trennung.....	30
Abbildung 7: Massenspektrum, MS/MS-Spektrum und Chromatogramm von PC 34:1.....	32
Abbildung 8: Schematische Darstellung von Kanalelektronenvervielfacher und Mikrokanalplatten-Detektoren.....	34
Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer ESI/APCI-Ionisationsquelle.....	36
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Flugbahn eines Ions in einem Quadrupol- Massenanalysator.....	37
Abbildung 11: Aufbau eines orthogonalen Flugzeitmassenanalysators.....	38
Abbildung 12: Aufbau eines TripleTOF 6600.....	39
Abbildung 13: QTOFMS Scan und MS/MS-Messung.....	40
Abbildung 14: Übersicht univariate Auswertung.....	52
Abbildung 15: Scores- und Loadings-Plots verschiedener multivariater Verfahren.....	57
Abbildung 16: Entwicklung einer LC-MS-Screening-Methode zur Bestimmung des Lipidprofils. ...	59
Abbildung 17: Schematischer Aufbau der Flussreduzierung vor der Quelle.....	64
Abbildung 18: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Stabilität des Lipidoms in humanem Vollblut und Plasma bei Raumtemperatur und in Eiswasser.....	77
Abbildung 19: LC-MS-Hintergrundsignale nach einer Festphasenextraktion.....	87
Abbildung 20: Einflüsse des Anteils der wässrigen Phase während der Extraktion.....	88
Abbildung 21: Einfluss des Extraktionsgefäß-Materials bei der Extraktion und beim Abdampfen.....	89
Abbildung 22: Einfluss der Inkubationszeit während der Extraktion von Humanplasma.....	90
Abbildung 23: Vergleich verschiedener Chromatographie-Säulen.....	93
Abbildung 24: Überblick 30-Minuten-Methode.....	95
Abbildung 25: Überblick 17-Minuten-Methode.....	95
Abbildung 26: Einfluss des Ammoniumformiat-Zusatzes im wässrigen Fließmittel auf die Ionisierung.....	96
Abbildung 27: Chromatographische Auftrennung von Isomeren und Isobaren.....	97
Abbildung 28: Einfluss des Aufnahmemediums und des Injektionsvolumens auf die Peakform. ...	99
Abbildung 29: Einfluss der Flussreduzierung auf unterschiedliche Lipidgruppen.....	100
Abbildung 30: Triglycerid-Signale in Abhängigkeit von der Flussrate und PEEK-Leitung.....	100

Abbildung 31: Einfluss der reduzierten Flussrate in der Quelle auf den Totalionenstrom. ....	101
Abbildung 32: Natriumformiat-Cluster der Arachidonsäure.....	106
Abbildung 33: Messfehler verschiedener Lipide im Messverlauf mit Autokalibrierung alle 20 Injektionen.....	108
Abbildung 34: Vergleich MS-Scan mit SWATH-Messung bei verschiedenen Fensterbreiten und Akkumulationszeiten. ....	109
Abbildung 35: IDA- und SWATH-Spektrum von SM 38:2 in Humanplasma und Verteilung der IDA-Spektren über den <i>m/z</i> und RT-Bereich. ....	111
Abbildung 36: Vergleich verschiedener Normalisierungen mittels RLA- und Volcano-Graphen...	113
Abbildung 37: Vergleich verschiedener Normalisierungen bei einzelnen Analyten. ....	114
Abbildung 38: Lineare Retentionszeitkorrektur. ....	116
Abbildung 39: Vergleich der Verteilung der Daten bei Einsatz verschiedener Imputationsverfahren.....	119
Abbildung 40: Beispiel für R Output bei der univariaten Auswertung.....	123
Abbildung 41: Verteilung der Konzentrationen von Glucosylceramid 18:1 in Humanplasma. ....	125
Abbildung 42: Suppression der Sterylester-Signale durch die Triglyceride.....	129
Abbildung 43: Relative Konzentration von Sterol und Sterylestern bei der Verdünnung von Humanplasma. ....	131
Abbildung 44: Kontrollkarte von PE 36:4 und SE 27:1/18:1.....	133
Abbildung 45: Stabilität der Lipide in humanem Plasma bei unterschiedlichen Lagerbedingungen. ....	135
Abbildung 46: Reproduzierbarkeit der Extraktion verschiedener Matrices.....	137
Abbildung 47: Einfluss der Präanalytik von Zellkulturproben auf Lipidkonzentrationen.....	138
Abbildung 48: Relative Änderung der Lipidlevel nach Inkubation von Vollblut und Plasma bei RTp und in Eiswasser. ....	140
Abbildung 49: Relative Peakfläche in NaF/Citrat-Plasma im Vergleich zu K <sub>3</sub> EDTA-Plasma. ....	142
Abbildung 50: Chemischer Hintergrund der Antikoagulanzen und deren Einfluss auf die Ionisierung. ....	142
Abbildung 51: Heatmap der Plasmalipide von LPS-, Zymosan- oder unbehandelten Mäusen. ...	144
Abbildung 52: Netzdiagramm der Ether-Lipide in mit LPS oder Zymosan behandelten Mauspfoten. ....	145
Abbildung 53: Änderungen im Lipidprofil nach Injektion von LPS oder Zymosan in Mauspfoten. ....	146
Abbildung 54: Vergleich verschiedener Fließmittelqualitäten. ....	166
Abbildung 55: Verschiedene Normalisierungsverfahren nach der Injektion von LPS/Zymosan in Mauspfoten.....	167
Abbildung 56: Übersicht verschiedener Lipidprofile Teil 1. ....	168
Abbildung 57: Übersicht verschiedener Lipidprofile Teil 2. ....	169

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 58: Übersicht verschiedener Lipidprofile Teil 3. ....	170
Abbildung 59: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Plasmalipide in mit Zymosan-, LPS- oder unbehandelten Mäusen (n=7 bis 8). ....	171

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Abkürzungen der Lipidklassen nach LIPID MAPS [9].	26
Tabelle 2:	Beispiele für isomere und isobare Überlappungen bei Lipiden.	28
Tabelle 3:	Methoden zur Normalisierung von LC-MS-Daten.	47
Tabelle 4:	Methoden zur Skalierung von LC-MS-Daten.	48
Tabelle 5:	Methoden zur Transformation von LC-MS-Daten.	49
Tabelle 6:	Protokolle der Festphasenextraktionen.	61
Tabelle 7:	Entwicklung der Chromatographie.	63
Tabelle 8:	Grenzen der massenspektrometrischen Parameter bei der Methodenentwicklung.	65
Tabelle 9:	Statistische Verfahren für die univariate Auswertung.	69
Tabelle 10:	Untersuchte biologische Matrices.	75
Tabelle 11:	Standardsubstanzen zur anfänglichen Methodenentwicklung.	80
Tabelle 12:	Arbeitslösung der internen Standards (150 µL pro Probe).	81
Tabelle 13:	Weitere Reagenzien und Chemikalien.	82
Tabelle 14:	Herstellung von Puffern und Lösungen.	83
Tabelle 15:	Verbrauchsmaterialien und Hersteller.	84
Tabelle 16:	Allgemeine Laborgeräte.	84
Tabelle 17:	LC-MS-System.	85
Tabelle 18:	Software.	85
Tabelle 19:	R-Pakete.	85
Tabelle 20:	Optimierte MS-Parameter.	103
Tabelle 21:	Übersicht in Humanplasma identifizierter Lipide und deren MS/MS-Fragmente.	105
Tabelle 22:	Theoretische $m/z$ der Analyten für die externe Kalibrierung über APCI.	107
Tabelle 23:	Vergleich verschiedener Imputationen für linkszensierte Daten.	117
Tabelle 24:	Vergleich der Auswertung der semi-targeted Daten des LPS/Zymosan-Plasmas mit R und MetaboAnalyst.	121
Tabelle 25:	Vergleich der ANOVA mit Messwiederholungen (rmANOVA) der untargeted Präanalytik-Daten mit MetaboAnalyst und R.	122
Tabelle 26:	Wiederfindung, Matrixfaktor und Prozesseffektivität.	127
Tabelle 27:	Übersicht der linearen Regression von mit Wasser verdünntem Humanplasma.	130
Tabelle 28:	Kurzzeitstabilität von Humanplasma und Vollblut bei RTp und in Kühlung.	139
Tabelle 29:	Bei der Entzündung durch LPS/Zymosan veränderte Lipidklassen und deren mögliche Bedeutung.	148
Tabelle 30:	Namen und Beiträge von Kollegen und Kooperationspartnern.	165
Tabelle 31:	Semi-quantitativ ausgewertete Analyten in Humanplasma.	194

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 32:	Liste der 440 in Humanplasma identifizierten Lipide.....	199
Tabelle 33:	Einfluss des Materials des Extraktionsgefäßes bei der Plasma-Extraktion. ....	205
Tabelle 34:	Einfluss der Inkubationszeit während der Plasmaextraktion. ....	210
Tabelle 35:	Verdünnungsintegrität (mit IS normalisiert).....	215
Tabelle 36:	Verdünnungsintegrität (ohne Normalisierung). ....	219
Tabelle 37:	Verschleppung nach Injektion von Humanplasma. ....	223
Tabelle 38:	Robustheit der Methode durch Vergleich der Peakflächen in den Kontrollproben (Kontrollkarte).....	228
Tabelle 39:	Stabilität extrahierter Plasmaproben auf dem Abdampfgerät.....	234
Tabelle 40:	Stabilität von rekonstituierten Lipidextrakten bei Raumtemperatur. ....	239
Tabelle 41:	Frier-Tau-Stabilität von Humanplasma. ....	244
Tabelle 42:	Stabilität von extrahiertem Humanplasma bei 6 °C auf dem Autosampler. ....	249
Tabelle 43:	Stabilität der trockenen Lipid-Extrakte bei -40 bzw. -80 °C.....	254
Tabelle 44:	Kurzzeitstabilität von humanem K <sub>3</sub> EDTA-Vollblut bei RTp und in Eiswasser. ....	259
Tabelle 45:	Kurzzeitstabilität von humanem NaF/Citrat-Vollblut bei RTp und in Eiswasser. ....	261
Tabelle 46:	Kurzzeitstabilität von humanem K <sub>3</sub> EDTA-Plasma bei RTp und in Eiswasser.....	263
Tabelle 47:	Kurzzeitstabilität von humanem NaF/Citrat-Plasma bei RTp und in Eiswasser.....	265
Tabelle 48:	Relative Peakfläche in Mausplasma nach Injektion von LPS bzw. Zymosan. ....	267
Tabelle 49:	Relative Peakflächen in Mauspfoten nach Injektion von LPS bzw. Zymosan.....	270



## Abkürzungsverzeichnis

2D-LC	Zwei-dimensionale Flüssigchromatographie
AA	Arachidonsäure (engl. arachidonic acid)
ACN	Acetonitril
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
AS	Ameisensäure (engl. formic acid)
BPC	Basispeak-Chromatogramm (engl. base peak chromatogram) (ähnlich dem TIC, nur die intensivsten Signale pro Spektrum werden betrachtet)
C18	Octadecyl- (C18H39)
C8	Octyl- (C8H17)
CAD	Kollisionsgas
CDS	Calibrant Delivery System
CE	Kollisionsenergie (engl. collision energy)
CE 18:2	Cholesterylester (z.B. mit Fettsäure 18:2)
Cer	Ceramid
CES	Verteilung der Kollisionsenergie (engl. collision energy spread)
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (engl. collision-induced dissociation)
cps	Signale pro Sekunde (engl. counts per second)
CUR	Schutzgas, „Vorhanggas“ (engl. curtain gas)
-d4	Vierfach deuteriert
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DC	Dünnschichtchromatographie
DDA	Datenabhängige Messung (engl. data-dependent acquisition)
DG	Diglycerid
DIA	Datenunabhängige Messung (engl. data independent acquisition)
DP	Entstörungspotential (engl. declustering potential)
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (engl. European Medicines Agency)
ESI	Elektrospray-Ionisation
FA	Fettsäure (engl. fatty acid)
FDA	Zulassungsbehörde der USA für Arznei- und Lebensmittel (engl. U.S. Food and Drug Administration)
FDR	Falscherkennungsrate (engl. false discovery rate)
FM	Fließmittel
FT-ICRMS	Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (engl. fourier-transform ion cyclotron resonance)
FWHM	Breite des Peaks auf halber Höhe (engl. full width half maximum)
GC	Gaschromatographie
GlcCer	Glucosylceramid
GS1	Zerstäubergas
GS2	Heizgas
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl. high-density lipoprotein)
HexCer	Hexosylceramid
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
HR-MRM	Überwachung von Mehrfachreaktionen mit hoher Massenauflösung (mehrere Fragmentionen gleichzeitig) (engl. high resolution multiple reaction monitoring)
IDA	Sciex Abkürzung für DDA (engl. information dependent acquisition)
IS	Interner Standard
ISP	Isopropanol
ISVF	Ionisationsspannung
K3EDTA	Trikalium-ethylendiamintetraessigsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

KEV	Kanalelektronenvervielfacher
kNN	k-Nächste Nachbarn-Algorithmus (engl. k-Nearest Neighbor)
LacCer	Lactosylceramid
LC	Flüssigchromatographie (engl. liquid chromatography)
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (engl. low-density lipoprotein)
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. liquid-liquid-extraction)
LLOQ	Bestimmungsgrenze (engl. lower limit of quantification); kleinster Kalibrierstandard in der Kalibriergeraden. Der LLOQ-Wert beschreibt die niedrigste Konzentration, die in einer Probe noch mit ausreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann.
LM	Lösungsmittel
LOD	Nachweisgrenze (engl. limit of detection)
logP-Wert	n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, logarithmisch
LPA, LPC, LPE, LPI, LPG	Lyso-Glycerophospholipide
LPS	Lipopolysaccharid
LPS 18:1	Lysophosphatidylserin 18:1
LSI	Lipidomics Standards Initiative
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl. matrix-assisted laser desorption/ionization)
MANOVA	multivariate Varianzanalyse
MCP	Mikrokanalplatten-Detektor (engl. multiple channel plate detector)
MeOH	Methanol
MG	Monoglycerid
MPR	Median Peak Korrektur (engl. median peak ratio)
MRM	Überwachung von Mehrfachreaktionen (engl. multiple reaction monitoring)
MS	Massenspektrometer
MS/MS bzw. MS <sup>2</sup>	Zwei gekoppelte Massenanalysatoren (Tandem- bzw. Hybrid-Massenspektrometrie)
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NaF/Citrat	Natriumfluorid/Citrat
NH <sub>4</sub> FA	Ammoniumformiat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance)
NP	Normalphase
NPLC	Normalphasenchromatographie
OPLS-DA	Orthogonale Projektion zu latenten Strukturen mit Diskriminantenanalyse
PA	Glycerophosphatidsäure, Phosphatidsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PC	Glycerophosphocholin, Phosphatidylcholin
PC O-	Plasmanyln-Phosphatidylcholin
PC P-	Plasmenyl-Phosphatidylcholin
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. principal component analysis)
PE	Glycerophosphoethanolamin, Phosphatidylethanolamin
PEEK	Polyetheretherketon
PG	Glycerophosphoglycerol, Phosphatidylglycerol
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI	Glycerophosphoinositol, Phosphatidylinositol
PLS	Projektion zu latenten Strukturen (engl. partial least squares regression bzw. projection to latent structures)
PP	Polypropylen-Reaktionsgefäße
PPAR	Peroxisome-Proliferator-aktivierte Rezeptor
ppb	Anteile pro Milliarden (engl. parts per billion)
ppm	Anteile pro Millionen (engl. parts per million)
PRM	Überwachung von Mehrfachreaktionen mit hoher Massenauflösung (mehrere Fragmentionen gleichzeitig, engl. parallel reaction monitoring)

---

PS	Glycerophosphoserin, Phosphatidylserin
psi	Pfund pro Quadratzoll (engl. pound-force per square inch), entspricht 6895 Pa bzw. 0,0689 bar
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäure (engl. polyunsaturated fatty acid)
Q	Quadrupol
Q <sup>2</sup>	Vorhersagefähigkeit
QC	Qualitätskontrolle (engl. quality control)
QqQ	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
QTOF bzw. QTOFMS	Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer
R <sup>2</sup>	Anpassungsgüte (engl. goodness of fit) bzw. Bestimmtheitsmaß
RE	Relativer Fehler (engl. relative error)
RLA	Engl. relative log abundance
RP	Umkehrphase (engl. reversed phase)
RPLC	Umkehrphasenchromatographie (engl. reversed phase chromatography)
RSD	Relative Standardabweichung (engl. relative standard deviation)
RT	Retentionszeit
RTp	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SE	Sterylester
SEM	Sekundärelektronenvervielfacher (engl. secondary electron multiplier)
SFC	Überkritische Flüssigkeitschromatographie (engl. supercritical fluid chromatography)
sn	Stereospezifische Nummerierung (Nomenklatur von Molekülen)
SPE	Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction)
SPM	Spezialisierte entzündungsauflösende Lipidmediatoren (engl. specialized pro-resolving lipid mediators)
ST	Sterol
SWATH	Engl. sequential-window-acquisition of all theoretical mass spectra
TEM	Temperatur Heizgas
TG	Triglycerid
Th	Thomson (Einheit des Masse-zu-Ladungs-Verhältnis)
TIC	Totalionenstrom (-Chromatogramm) (engl. total ion current)
TOF	Flugzeitmassenanalysator (engl. time-of-flight, TOF)
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. ultra high performance liquid chromatography)
ULOQ	Obere Quantifizierungsgrenze (engl. upper limit of quantification), höchster Kalibrierstandard
VIP Score	Wichtigkeit als Variable (engl. variable importance in projection)
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (engl. very low-density Lipoprotein)

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Biomarker

In der Medizin gewinnen Biomarker zunehmend an Bedeutung [1]. Biomarker sind objektiv messbare Merkmale, die als Indikator für physiologische und pathophysiologische Prozesse dienen können oder als Reaktion auf eine (therapeutische) Intervention verändert werden [2]. Sie werden unterteilt in molekulare, histologische bzw. zytologische und radiographische Biomarker sowie in physiologische Charakteristika, wie z.B. den Blutdruck. Die amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. U. S. Food- and Drug Administration, FDA) teilt die Biomarker gemäß ihrer Funktion weiter in sieben Kategorien ein (Abbildung 1) [3]. Sie können prognostischen, prädiktiven oder diagnostischen Zwecken dienen. Des Weiteren können Biomarker als Sicherheitsmerkmal zur Bestimmung der Toxizität (Safety), als Kenngröße für pharmakodynamische Studien (Response) oder zur Überwachung des Krankheitsverlaufs oder einer Therapie (Monitoring) verwendet werden. Die letzte Kategorie stellen die Risiko-Biomarker (Susceptibility/Risk) dar, die das Risiko eines Gesunden angeben, die entsprechende Krankheit oder Symptome zu entwickeln. Prognostische Biomarker, geben die Wahrscheinlichkeit einer Zustandsänderung bei Erkrankten an, während prädiktive Biomarker zur Identifizierung einzelner Individuen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit von negativen oder positiven Effekten durch eine Intervention herangezogen werden können. Demnach beziehen sich die prognostischen, diagnostischen und Risiko-Biomarker sowie teilweise das Monitoring auf eine Erkrankung, während die anderen Kategorien für die Beurteilung einer Behandlung herangezogen werden können. Die meisten Biomarker-Kategorien beziehen sich auf den aktuellen Zustand und werden durch die prognostischen, prädiktiven und Risiko-Biomarker ergänzt, die die Wahrscheinlichkeit für ein zukünftiges Eintreten von Ereignissen angeben.

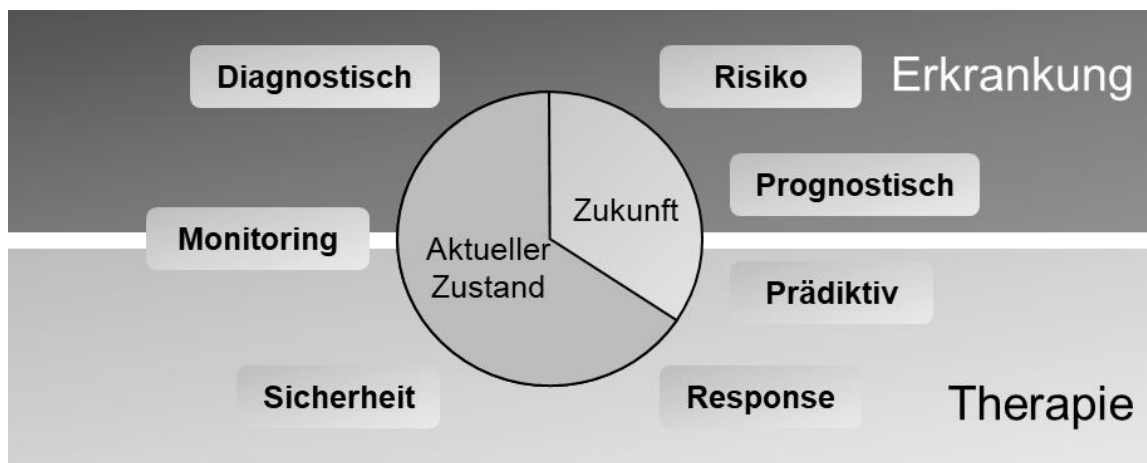


Abbildung 1: Biomarker Kategorien  
Einteilung der Biomarker in sieben Kategorien gemäß U.S. Food and Drug Administration (FDA) [2].

Wenn in klinischen Studien primäre Endpunkte wie die Mortalität oder die Hospitalisierungsrate nicht zur Verfügung stehen, können ersatzweise Surrogat-Endpunkte wie beispielsweise Biomarker verwendet werden. Biomarker können aus einem oder mehreren Merkmalen bestehen und sollten eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Detektion der Erkrankung (Sensitivität) und korrekt positive Ergebnisse (Selektivität) von jeweils  $\geq 90\%$  anstreben [4]. Außerdem sollte das Probenmaterial für Biomarker einfach zu erhalten sein und das mit der Entnahme des Biomarkers verbundene Risiko durch dessen Vorteile aufgewogen werden. Die Messmethode zur Bestimmung des Biomarkers muss validiert und der Biomarker anschließend qualifiziert werden [5]. Beispiele für klinisch verwendete Lipid-Biomarker sind freies und gebundenes Cholesterin für die Hypercholesterinämie sowie Triglyceride (TG) für die Hypertriglyceridämie als Teil des metabolischen Syndroms. Außerdem wird das 25-Hydroxyvitamin D als Biomarker des Vitamin D-Status verwendet, wobei die Zielwerte und deren Auswirkung kontrovers diskutiert werden [6, 7].

## 1.2 Lipide

Lipide bilden neben den Proteinen und Kohlenhydraten eine der drei Hauptgruppen biologischer Moleküle. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie in unpolaren Lösungsmitteln löslich sind [8]. Dabei können sie vorwiegend lipophile oder auch amphiphile Eigenschaften aufweisen. Amphiphile Lipide können in wässriger Umgebung Vesikel und uni- bzw. multilamellare Liposomen oder Membranen bilden [9]. Umgangssprachlich wird häufig von Fetten gesprochen, dabei bezieht man sich oft auf Triglyceride, eine Untergruppe der Lipide. Einige Lipide wie die Glycerophospho- und die Glycerolipide sind verseifbar, sprich durch eine alkalische Esterhydrolyse können grenzflächenaktive Salze der freigesetzten Fettsäuren gebildet werden [8]. Die Lipide sind ein Teil des Metaboloms, also die Produkte des zellulären Stoffwechsels [10]. Im Gegensatz zu den Genen, kann sich das Metabolom rasch verändern und hat dadurch eine größere Aussagekraft bezüglich der akuten Phänotypen, weswegen Metabolite vermehrt als potenzielle Biomarker untersucht werden [11, 12]. Um der Vielfältigkeit der Lipide und deren besonderen Anforderungen bei der Analyse Rechnung zu tragen, hat sich 2003 „Lipidomics“ als Teilgebiet der Metabolomics entwickelt und untersucht das Lipidprofil und dessen Stoffwechselwege (Abbildung 2) [13, 14]. Das am weitesten verbreitete Analyseverfahren im Bereich der Lipidomics ist die Massenspektrometrie mit oder ohne chromatographischer Trennung, seltener wird auch die Kernspinresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance, NMR), Dünnschichtchromatographie (DC) oder Gaschromatographie (GC) verwendet [15].

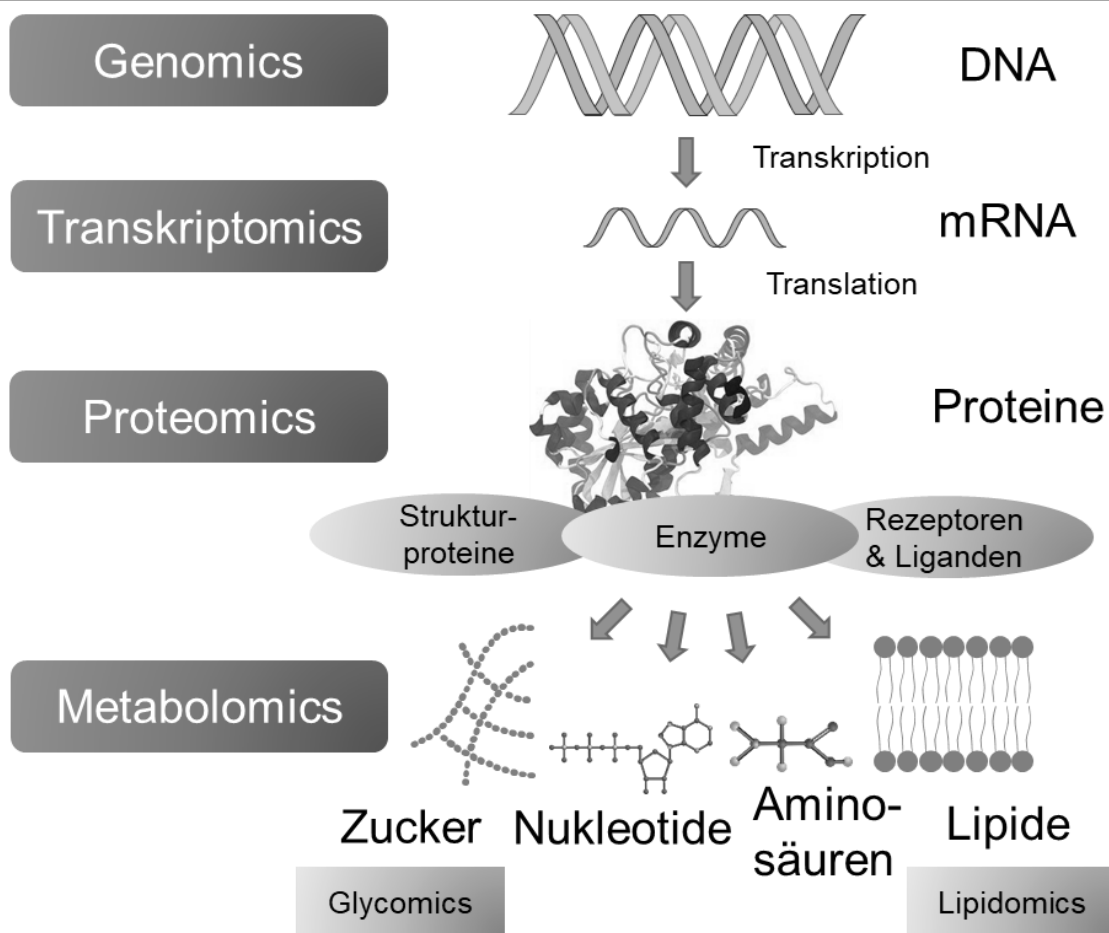


Abbildung 2: Multi- „omics“ Wissenschaften.

Als „-omics“ Wissenschaft bezeichnet man die Quantifizierung und Profilerstellung der jeweiligen Stoffwechselprodukte. Neben der als Proteomics bezeichneten Untersuchung der Gen-Produkte, der Proteine, können mittels Massenspektrometrie auch die daraus entstehenden Metaboliten, das Metabolom, untersucht werden. Bei Letzteren haben sich noch die Unterdisziplinen Glycomics und Lipidomics entwickelt. Modifiziert nach [16].

### 1.2.1 Funktion und Bedeutung der Lipidklassen

Die Lipide sind eine sehr heterogene Stoffgruppe. Sie werden gemäß der Klassifikation nach LIPID MAPS basierend auf ihren Grundbausteinen und hydrophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften in acht Kategorien mit weiteren Unterklassen eingeteilt [9, 17]. Dabei werden die Fettsäuren, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide und Saccharolipide sowie die Polyketide durch Kondensation von Ketoacylgruppen synthetisiert. Hingegen werden die Sterole und Prenole durch Kondensation von Isopren-Einheiten gebildet [9]. Abbildung 3 gibt eine Übersicht der für diese Arbeit relevanten Lipid-Kategorien und Unterklassen. Die Polyketide und Saccharolipide kommen im Menschen kaum vor [18].

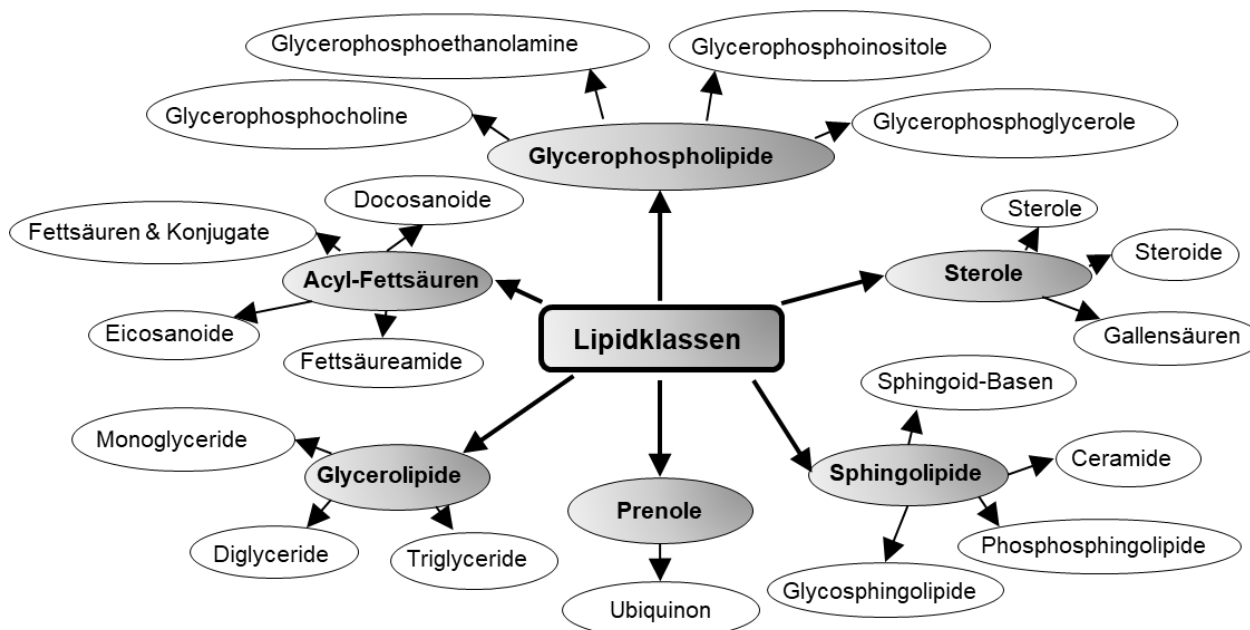


Abbildung 3: Übersicht der wichtigsten Lipidklassen im Menschen.

Durch ihre amphiphilen Eigenschaften können sich Lipide im wässrigen Milieu zu Doppelschichten anordnen, indem die hydrophilen Kopfgruppen nach außen und die Kohlenwasserstoffketten nach innen zeigen. In dieser Anordnung sind sie ein essenzieller Bestandteil biologischer Membranen und ermöglichen die Kompartimentierung eukaryoter Zellen. Des Weiteren stellen die Lipide in Form von Triglyceriden die Hauptspeicherform von Energie im Körper dar. Sie können in Adipozyten gelagert werden und besitzen einen hohen Energiegehalt, der bei Bedarf durch die  $\beta$ -Oxidation freigesetzt werden kann. Biologisch aktive Lipide werden als Lipidmediatoren bezeichnet und bilden über die Aktivierung verschiedener Rezeptoren, wie nukleärer oder G Protein-gekoppelter Rezeptoren, einen Grundbaustein der Signaltransduktion [19]. Beispiele sind die Eicosanoide, die Endocannabinoide, Sphingosin-1-phosphat sowie Phospholipide wie die Lysophosphatidsäuren und der plättchenaktivierende Faktor [20]. Ihre Rolle bei der Entstehung, Diagnose und Behandlung von Krebs sowie kardiovaskulären, neuronalen, entzündlichen, metabolischen und weiteren Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung [21-27]. Weitere Funktionen der Lipide werden nachfolgend anhand der Lipid-Kategorien näher erläutert. Abbildung 4 gibt einen Überblick über den Aufbau der Lipide. Die Nomenklatur wird in Abschnitt 1.2.2 erläutert.

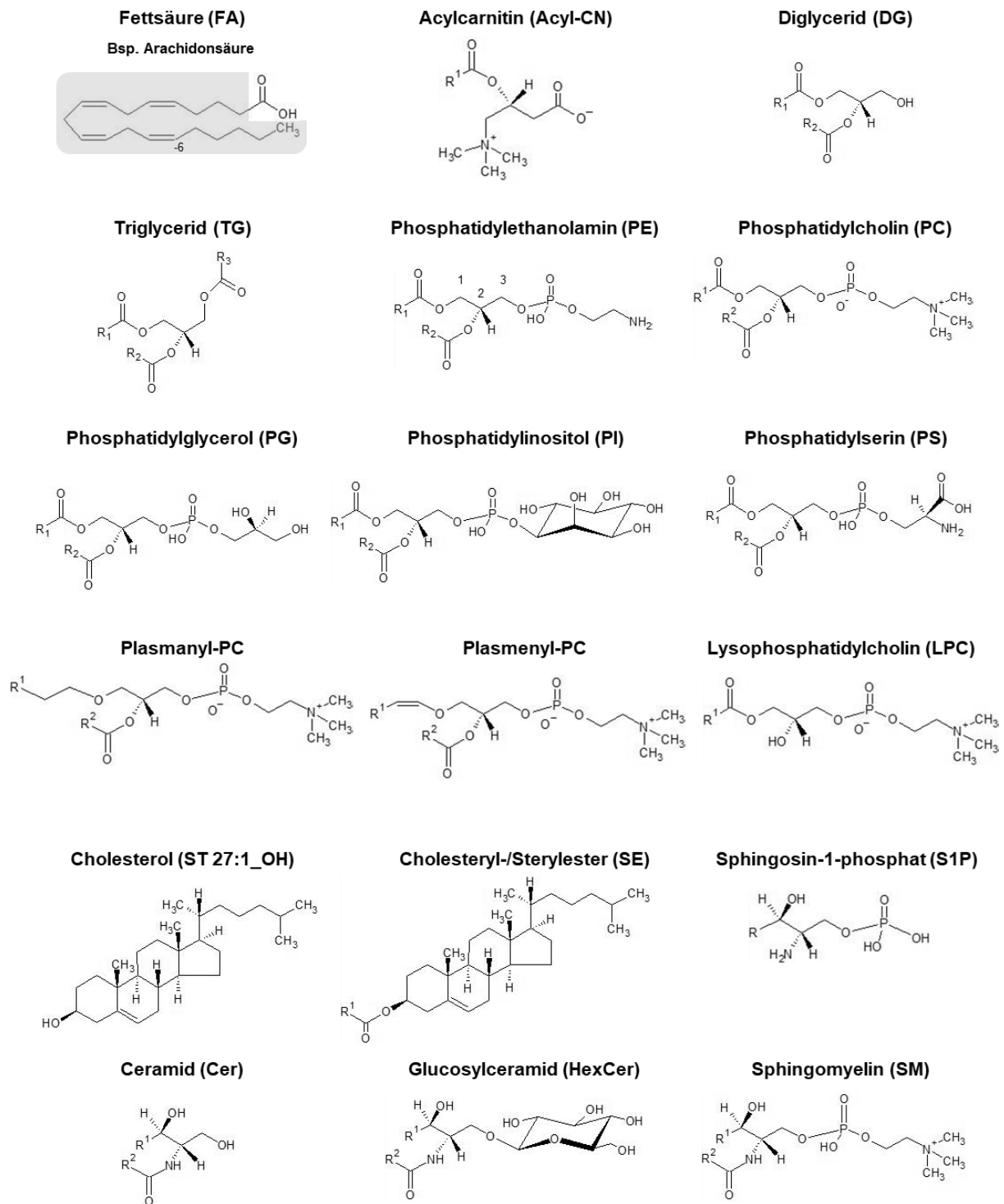


Abbildung 4: Strukturen verschiedener Lipidklassen.

Dargestellt sind die Grundstrukturen einiger Lipidklassen, die Reste (R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup>) sind Kohlenwasserstoffketten mit variabler Kettenlänge und Anzahl an Doppelbindungen (Beispiel graue Bereich der Arachidonsäure). Am Beispiel von PE ist die stereospezifische Nomenklatur eingezeichnet (sn-Nomenklatur, engl. stereospecific numbering). Modifiziert nach lipidmaps.org [9].

### 1.2.1.1 Acyl-Fettsäuren

Zu den Acyl-Fettsäuren zählen die Fettsäuren (engl. fatty acids, FA), deren Metabolite, die Fettsäureester wie die Wachse und Acylcarnitine sowie die Fettsäureamide [9]. Die FA stellen einen Hauptbestandteil der meisten Lipide dar. Sie können Verzweigungen der Kohlenwasserstoffketten,



unterschiedliche viele Doppelbindungen sowie diverse funktionelle Gruppen wie Hydroxy-, Cyano- oder Nitrogruppen aufweisen. Ursprünglich wurde angenommen, dass die FA immer eine gerade Anzahl Kohlenstoffatome besitzen. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass aus der Nahrung und durch terminale Decarboxylierung auch ungeradzahlige FA im Körper vorkommen können [28]. Von besonderem Interesse sind die mehrfach ungesättigten FA (engl. poly-unsaturated fatty acids, PUFA), die noch weiter in  $\omega$ -6-Fettsäuren wie die Arachidonsäure und Docosatetraensäure sowie  $\omega$ -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure eingeteilt werden, wobei der Abstand der Doppelbindung zum letzten C-Atom gezählt wird (Bsp.  $\omega$ -6 in Abbildung 4). Aus diesen können diverse Lipidmediatoren wie die Eicosanoide und die Docosanoide gebildet werden. Zu den Eicosanoiden, den Derivaten der Arachidonsäure, gehören u.a. die Prostanoiden, Lipoxine und Leukotriene, die sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken können, und deshalb im Rahmen entzündlicher Erkrankungen untersucht werden [29-32]. Die Docosanoide, wie die Resolvine D<sub>1-6</sub>, Neuroprotectine und Maresine, werden aus der Docosahexaensäure gebildet. Sie gehören zu den spezialisierten entzündungsauflösenden Lipidmediatoren (engl. specialized pro-resolving lipid mediators, SPM) [33]. Auch in der Gruppe der Fettsäureamide gibt es Lipidmediatoren wie das zu den Endocannabinoiden zählende Anandamid [34]. Acylcarnitine sind essenziell für den Transport und die Metabolisierung von FA in und aus Mitochondrien und demnach von Bedeutung für Herz und Muskeln, die besonders viele Mitochondrien aufweisen [35]. Ihre neuroprotektive Wirkung im Gehirn und ihre Rolle bei der Entwicklung der Insulinresistenz wird diskutiert [36-38].

### 1.2.1.2 Glycerolipide

Die Ester des Glycerols mit ein bis drei FA (Mono-, Di- bzw. Triglyceride) fasst man unter den Glycerolipiden zusammen. Triglyceride dienen v.a. als Energiespeicher und vermeiden zusätzlich die lipotoxische Wirkung überschüssiger freier FA, indem sie diese binden [39]. Sie kommen im Plasma innerhalb der Lipoproteine wie den Chylomikronen und Lipoproteinen sehr niedriger Dichte vor (engl. very low-density lipoprotein, VLDL). In den Zellen sind sie in Lipidtröpfchen zu finden [40]. Einige Glycerolipide agieren hauptsächlich als Lipidmediatoren. Die zu den Monoglyceriden zählenden Endocannabinoide, wie 1- und 2-Arachidonylglycerol sind an der Nozizeption, Neurogenese und synaptischen Plastizität sowie bei der Alterung des Gehirns beteiligt [41-43]. Diglyceride nehmen eine zentrale Position im Lipidstoffwechsel ein und dienen als Zwischenstufe bei der Synthese von Glycerolipiden und Glycerophospholipiden. Des Weiteren können Diglyceride als Signalmoleküle agieren und u.a. die Proteinkinase C aktivieren [44].

### 1.2.1.3 Glycerophospholipide

Die Glycerophospholipide sind amphiphil und bilden den Hauptbestandteil biologischer Membranen. Ihre Grundstruktur besteht aus einem Glycerol, das in der sn-1 und sn-2 Position mit FA und in der sn-3 Position mit einer Phosphatgruppe verestert ist. Die Einteilung der Phospholipide erfolgt anhand der an die Phosphatgruppe gebundenen funktionellen Gruppen, wie Cholin, Ethanolamin, Glycerol, Serin oder Inositol. Dabei stellen die Phosphatidylcholine (PC) und die Phosphatidylethanolamine

## Einleitung

---

(PE) mit rund 50 bzw. 25% den größten Anteil der Phospholipide [45]. Die PC und PE sind sehr heterogene Gruppen, da sie aus vielen verschiedenen FA sowie Fettalkoholen zusammengesetzt sind. Hingegen enthalten die Phosphatidylinositol (PI) meist FA 18:0 und 20:4 und die Phosphatidylserin (PS) FA 18:0 [46, 47]. Die PS sind fast ausschließlich auf der Innenseite der Membran angesiedelt und dort an der Signaltransduktion beteiligt, mit Ausnahme von Prozessen wie der Apoptose, bei der sie auf die Membranaußenseite wechseln [48]. Die PI und ihre phosphorylierten Formen können u.a. Proteine an der Membran rekrutieren und sind dadurch z.B. am vesikulären Transport und der Membranfusionen beteiligt [49]. Cardiolipine sind Phospholipid-Dimere, die ausschließlich in der Mitochondrienmembran vorkommen und an der Atmungskette beteiligt sind [50].

Eine für diese Arbeit besonders relevante Untergruppe der Glycerophospholipide sind die Ether-Spezies. Bei diesen, in den Peroxisomen gebildeten Lipiden, ist die Esterbindung in der sn-1 Position durch eine Etherbindung ersetzt. Im Falle der sogenannten Plasmalogen bzw. Plasmenyl-Spezies ist benachbart zu der Etherbindung noch eine Vinylgruppe (Abbildung 4, Absatz 1.2.2) [51]. Die Etherlipide haben im menschlichen Körper einen Anteil von rund 20% der Phospholipide und kommen mit verschiedenen Kopfgruppen wie bei den PI, PS und v.a. den PC und PE vor [52]. Das wohl bekannteste Ether-Lipid ist der plättchenaktivierende Faktor, der die Thrombozyten-Aggregation fördert [53]. Die Anreicherung von Plasmalogen in der Membran verringert durch eine dichtere Anordnung der Lipide die Membranfluidität [54]. Plasmalogen kommen vermehrt in Myelin vor und sind an der für die Differenzierung und Myelinisierung von Schwann-Zellen relevanten Signaltransduktion beteiligt [55]. Auch bei den cholesterolreichen Lipid Rafts in postsynaptischen Membranen tragen die Plasmalogen zur Stabilität bei [56, 57]. Am Beispiel von etherlipidreichen Modellmembranen konnte gezeigt werden, dass sie zur Ausbildung nicht-lamellarer Membranstrukturen beitragen und damit auch für die Ausschüttung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln benötigt werden [58, 59]. Des Weiteren kann die Enolether-Struktur der Plasmalogen durch hypohalogene Säuren oxidiert werden [60]. Letztere werden durch die Myeloperoxidase aktivierter neutrophiler Granulozyten gebildet [61]. Durch die Oxidation der Plasmalogen entstehen ungesättigte Lysophospholipide und  $\alpha$ -halogenierte Aldehyde, bei denen *in vitro* gezeigt werden konnte, dass sie weitere neutrophile Granulozyten rekrutieren können [62]. Zudem entstehen durch die Oxidation von Plasmalogen durch aktivierte Eosinophile bromierte Fettsäurealdehyde, die zur Chemotaxis phagozytierender Zellen beitragen können [63]. In Mausexperimenten konnte auch die Bedeutung der Etherlipide bei der Aktivierung und Entwicklung invarianter natürlicher Killerzellen gezeigt werden [64]. Die leichte Oxidierbarkeit der Enolether-Struktur konnte *in vitro* auch die ungesättigten Fettsäurereste in der Membran vor Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies schützen, wobei die antioxidativen Eigenschaften vorwiegend intramolekular zum Tragen kommen [65, 66]. Außerdem werden die Ether als Liganden des v.a. in Fettgewebe vorkommenden nukleären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) diskutiert und scheinen auch bei der Signaltransduktion des PPAR $\alpha$  beteiligt zu sein [67, 68]. Die

Übertragbarkeit der *in vitro* Daten auf *in vivo* Vorgänge ist eingeschränkt, da die Komplexität und Zusammensetzung der Membranen nicht abgebildet und die mögliche Zytotoxizität der entstehenden Reaktionsprodukte nicht beachtet werden [66]. Die Ether-Lipide werden auch als potenzielle, wenn auch wenig selektive Biomarker verschiedenster Erkrankungen diskutiert, wie z.B. Alzheimer, Parkinson, Schizophrenie, Bluthochdruck, Übergewicht, Lungen- und Lebererkrankungen, bei denen jeweils erniedrigte Konzentrationen im Serum oder Plasma gefunden wurden [52, 69-74]. Auch bei Kindern mit Typ-1-Diabetes konnte noch vor Auftreten der Autoantikörper gesenkte Ether-Lipid Konzentrationen gefunden werden [75]. Hingegen wurden bei Brustkrebs erhöhte Konzentrationen an Ether-LPC nachgewiesen [76]. Bisher ist meist noch unklar, ob die veränderten Level der Ether-Spezies Symptom oder Ursache der Erkrankungen sind [77].

### 1.2.1.4 Sterollipide

Zu den Sterollipiden zählen u.a. die Sterole, wie das Cholesterol, die in der Membran eukaryoter Zellen vorkommen [78]. Im menschlichen Körper werden sie in einer mehrstufigen Synthese unter Einbezug des Mevalonatweges aus Acetyl-CoA in der Leber gebildet [79]. Das Cholesterol beeinflusst die Membranfluidität, -permeabilität und integrale Membranproteine [80]. Zusammen mit den Sphingomyelinen und Ether-Phospholipiden ist Cholesterol auch in den Lipid Rafts der Membran angereichert. Diese Regionen besitzen eine höhere Ordnung und damit Rigidität und beinhalten die für die Signaltransduktion, Zellinteraktion und Endozytose benötigten Proteine [56]. Des Weiteren gehören zu den Sterollipiden die Sexualhormone (Steroide) wie Testosteron, Progesteron und Estradiol sowie das Hormon Vitamin D. Die Ester des Cholesterols bzw. anderer Sterole mit FA, die Sterylester (SE), dienen als Energiespeicher- und Transferform [81]. Sterylester kommen nicht in den Zellmembranen vor, sie sind Bestandteil des Kerns aller Lipoproteine im Blut sowie der Lipidtröpfchen in den Zellen [82]. Unter den Lipoproteinen im Blut sind v.a. Lipoproteine niedriger (engl. low-density lipoprotein, LDL) und hoher Dichte (engl. high-density lipoprotein, HDL) reich an SE [40]. Außerdem haben die Nebennieren einen hohen Gehalt an SE [81]. Den SE konnte bisher keine direkte biologische Aktivität nachgewiesen werden, aber als Bestandteil von LDL spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Pathogenese der Atherosklerose. Die SE in LDL können u.a. durch die 15-Lipoxygenase oxidiert werden [83, 84]. Die Akkumulation von (oxidiertem) LDL in Makrophagen führt zur Ausschüttung pro-entzündlicher Mediatoren sowie zur Bildung von Schaumzellen [85]. Des Weiteren wird eine Beteiligung der Lipoproteine am angeborenen Immunsystem und anderen metabolischen Störungen wie Adipositas sowie chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis, Lupus und rheumatoider Arthritis diskutiert [86, 87].

### 1.2.1.5 Sphingolipide

Die gemeinsamen Bausteine der Sphingolipide sind die Sphingoidbasen, wie Sphingosin und Sphinganin, an die bei den Ceramiden und Sphingomyelinen eine FA über eine Amidbindung verknüpft wird. An die Hydroxylfunktion der Sphingoidbase können diverse Kopfgruppen, wie Phosphat-, Phosphocholin- sowie einfache oder komplexe Zuckerreste, gebunden sein. Die

Sphingomyeline sind neben den Glycerophospholipiden und dem Cholesterol auch in der Membran vertreten. Außerdem sind einige Sphingolipide, wie z.B. die komplexen Glycosphingolipide, an der Signaltransduktion und Zellkommunikation beteiligt [88]. Von besonderem Interesse ist außerdem das Sphingosin-1-phosphat (S1P), das als Lipidmediator u.a. an der Apoptose, dem Zellwachstum, der Zellmigration, der Gefäßpermeabilität und der Angiogenese beteiligt ist [89-92]. Die Rolle des S1P bei verschiedenen Krankheiten wie Krebs, Atherosklerose und Diabetes ist Gegenstand aktueller Forschung [93]. Auch die Ceramide werden als potenzielle Biomarker u.a. für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Alzheimer, Parkinson und Multiple Sklerose untersucht [94-96].

### 1.2.1.6 Prenole

Ebenso wie die Sterole gehören die Prenole zu den aus Isopren-Einheiten aufgebauten Lipiden. Sie werden durch Kondensation mehrerer, auch Terpene genannter, Isopentyl- und Dimethylallylpyrophosphat Einheiten gebildet [97]. Zu diesen, auch als Isoprenoide bezeichneten Strukturen, zählen auch die fettlöslichen Vitamine A, E und K sowie Ubiquinon, die eine wichtige Rolle als Hormonvorstufe, Antioxidans oder als Kofaktoren bei der Blutgerinnung bzw. der Atmungskette einnehmen.

### 1.2.1.7 Polyketide

Die Polyketide sind strukturell sehr vielfältig und bilden häufig Ringsysteme. Sie werden durch Bakterien, Pilze sowie Pflanzen gebildet und kommen im Menschen endogen nicht vor [98]. Die Derivate der Polyketide, wie die Makrolid-Antibiotika, können antibiotisch, anti-parasitär und fungizid wirken [99].

### 1.2.1.8 Saccharolipide

Die Saccharolipide besitzen ein Zucker-Grundgerüst, an das über Ester- oder Amidbindungen FA gebunden sind. Das wohl bekannteste Saccharolipid, das Lipid A, ist ein Bestandteil von Lipopolysaccharid, einem Membranbaustein Gram-negativer Bakterien, der entscheidend für deren Erkennung durch das angeborene Immunsystem ist [100].

## 1.2.2 Lipid Identifizierung & Nomenklatur

Für Lipide sind eine Vielzahl unterschiedlicher Bezeichnungen und Abkürzungen im Umlauf. Das LIPID MAPS Konsortium hat sich deshalb bemüht, eine einheitliche Nomenklatur einzuführen (Tabelle 1). Demnach werden die Glycerophospholipide wie folgt abgekürzt: Neben der Kopfgruppe werden in Klammern die beiden Radyl-Seitenketten gemäß ihrer Position an der Glycerol-Gruppe angegeben, wobei die sn1-Position dem C1-Atom des Glycerols entspricht („Kopfgruppe(sn1/sn2)“, z.B. PC (16:0/18:0)) (siehe auch PE in Abbildung 4). Bei den Radyl-Gruppen kann es sich um Acyl-, Alkyl- oder Alkenyl-Substituenten handeln. Ohne weitere Angabe ist anzunehmen, dass es sich um Acyl-Seitenketten handelt und die Kopfgruppe in der sn3-Position liegt. Ist letzteres nicht der Fall,

erfolgt die Nomenklatur nach dem Prinzip „Kopfgruppe[S](sn3/sn2)“. Des Weiteren ist anzunehmen, dass das C2-Atom der Glycerol-Gruppe chiral ist, wobei Moleküle mit unbekannter Stereochemie mit „[U]“ gekennzeichnet werden. Wenn nur ein Acyl-Rest vorhanden und die Hydroxy-Funktion frei ist, spricht man von Lyso-Spezies oder auch Monoradyl-GP. Neben der LIPID MAPS Schreibweise, wie z.B. PC(16:0/0:0), werden die Lyso-Spezies in der Literatur häufig mit LPC oder Lyso-PC abgekürzt [101, 102]. Neben der typischen Esterbindung der Acyl-Reste können Alkyl- und Alkenyl-Seitenketten über Ether-Brücken gebunden sein. Dabei kennzeichnet man die Alkylether (Plasmanyl-Spezies) mit dem Präfix „O-“, z.B. PC(O-16:0/18:0) und die 1Z-Alkenylether (Plasmenyl-Spezies oder auch Plasmalogen) mit dem Präfix „P-“, z.B. PC(P-16:0/18:0). Alternativ zur LIPID MAPS Schreibweise werden die Plasmanyl-Spezies auch als PC(16:0e/18:0) und die Plasmenyl-Spezies als PC 16:0p/18:0 gekennzeichnet [18]. Bei ungesättigten FA wird die Position der Doppelbindung und die (*E*)-(*Z*)-Isomerie in Klammern angegeben, z.B. PC(18:2(9Z,12Z)/0:0).

Bei Ceramiden und Sphingomyelinen erfolgt die Bezeichnung nach dem Prinzip „Kopfgruppe (Sphingoidbase/FA)“, wobei der Buchstabe vor der Sphingoidbase die Anzahl an Hydroxy-Funktionen angibt (mono-, di- oder trihydroxy, „m“, „d“ oder „t“). Ein Ceramid mit der Base Sphingosin und einem Palmitinsäure-Rest wird demnach mit Cer(d18:1/16:0) abgekürzt. Die Dihydroceramide mit Sphinganin als Base werden als Cer(d18:0/16:0) abgekürzt. Wenn die Base eine zusätzliche Hydroxy-Gruppe enthält, wie bei den Phytoceramiden, werden diese mit Cer(t18:1/16:0) abgekürzt.

Die exakte Nomenklatur nach LIPID MAPS kann in vielen Fällen nicht angewandt werden, da eine Identifizierung der Isomere nicht möglich ist. Deswegen hat die Lipidomics Standards Initiative (LSI) eine neue Nomenklatur in Abhängigkeit der identifizierbaren Struktur-Details vorgeschlagen [101]. Wenn die Acyl-Seitenketten nicht bekannt sind, werden demnach nur die Summe der C-Atome und Doppelbindungen angegeben, z.B. PC 34:1. Bei identifizierten Acyl-Resten und unbekannter Position am Glycerol, z.B. durch eine MS/MS-Messung, werden die Seitenketten mit einem Unterstrich getrennt angegeben, z.B. PC 16:0\_18:1. Wenn Positionsisomere unterschieden werden können, z.B. durch eine chromatographische Trennung oder MS<sup>3</sup>, werden die sn1- und sn2-Positionen ähnlich der LIPID MAPS Nomenklatur als PC 16:0/18:1 angegeben. Die Position der Doppelbindungen, z.B. PC 16:0/18:1n-9 (n-9 entspricht der Anzahl C-Atome ausgehend vom Kettenende), kann u.a. mit Hilfe von Massenspektrometrie mit Ozon-induzierter Dissoziation bestimmt werden [103]. Die FA in der sn1-/sn2-Position sowie die Position und Geometrie der Doppelbindungen ((*E*)-(*Z*)-Isomerie) können u.a. durch Einsatz der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie mit verschiedenen Zusätzen (Ag<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>) bestimmt werden [104, 105].

## Einleitung

Tabelle 1: Abkürzungen der Lipidklassen nach LIPID MAPS [9].

Abkürzung	LIPID MAPS	System. Bezeichnung	Synonyme
<b>GL</b>	<b>Glycerolipide</b>		
MG	Monoacylglycerol	1-acyl-sn-glycerol	Monoglycerid
DG	Diacylglycerol	1,2-diacyl-sn-glycerol	Diglycerid
TG	Triacylglycerol	triacyl-sn-glycerol	Triglycerid
<b>GP</b>	<b>Glycerophospholipide</b>		
PA	Glycerophosphatidsäure	1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphat	Phosphatidsäure
PC	Glycerophosphocholin	1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholin	Phosphatidylcholin; Diacylphosphatidylcholin
PE	Glycerophosphoethanolamin	1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	Phosphatidylethanolamin; Diacylphosphatidyl-ethanolamine
PG	Glycerophosphoglycerol	1,2-diacyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol)	Phosphatidylglycerol; Diacylphosphatidylglycerol
PI	Glycerophosphoinositol	1,2-diacyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol)	Phosphatidylinositol; Diacylphosphatidylinositol
PS	Glycerophosphoserin	1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphoserin	Phosphatidylserin; Diacylphosphatidylserin
<b>SP</b>	<b>Sphingolipide</b>		
SPH	Sphingosin	Sphing-4-enin	
S1P	Sphingosin-1-phosphat	Sphing-4-enin-1-phosphat	
Cer	Ceramid	<i>N</i> -acyl-sphing-4-enin	
C1P	<i>N</i> -Acyl ceramidphosphat	<i>N</i> -(acyl)-sphing-4-enin-1-phosphat	
SM	Sphingomyelin	<i>N</i> -acyl-sphing-4-enine-1-phosphocholine	
GlcCer	Glucosylceramid	1-β-glucosyl-sphing-4-enine	
LacCer	Lactosylceramid	Galβ1-4Glcβ-Cer	
<b>ST</b>	<b>Sterole</b>		
ST	Cholesterol	Cholest-5-en-3β-ol	Cholesterin
CE	Cholesterylester	Cholest-5-en-3β-yl acylat	Cholesterinester
SE	Sterylester	-	Sterolester

Abbildung 5 zeigt am Beispiel von den Isomeren von PC 36:2 wie selektiv eine Identifikation mit der jeweiligen massenspektrometrischen Methode ist. Die angegebenen Zahlen entsprechen den in der LIPID MAPS Datenbank enthaltenen Isomeren [106]. Wenn man bedenkt, dass die Datenbank größtenteils nur die natürlichen, in verschiedenen Organismen vorkommenden Lipide und einige synthetische Standards enthält, ist theoretisch noch eine viel größere Anzahl an Isomeren möglich. Die Einführung in die Massenspektrometrie ist in Abschnitt 1.4 zu finden.

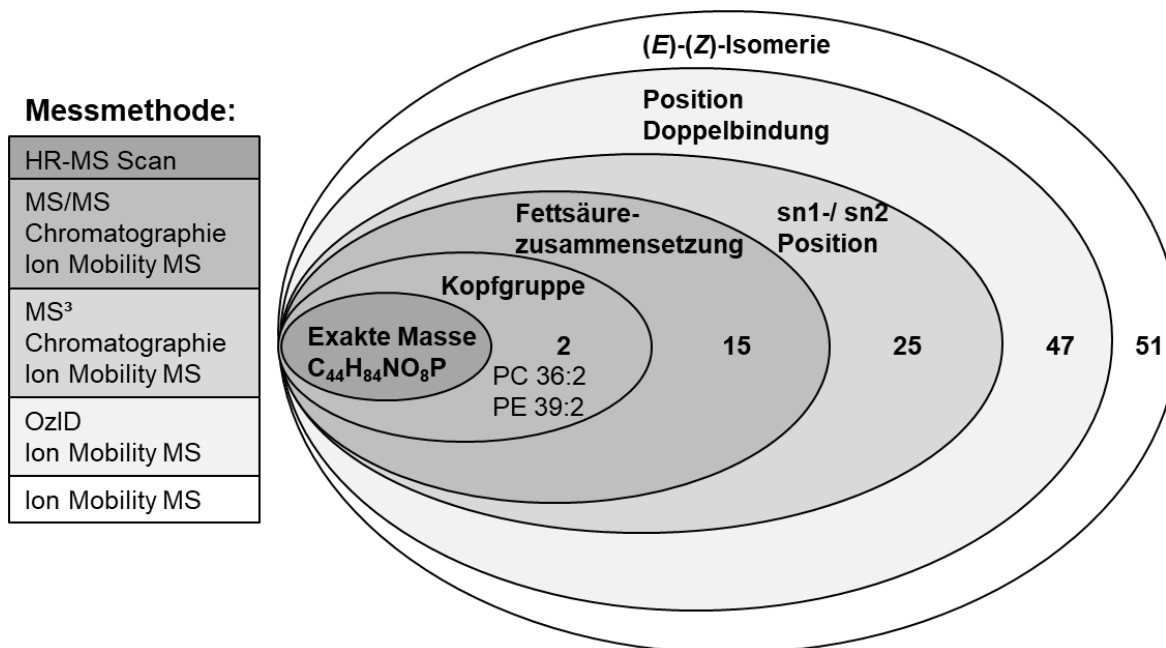


Abbildung 5: Isomerie von PC 36:2 und PE 39:2 sowie Selektivität verschiedener MS Methoden.

In Tabelle 2 sind Beispiele für Isomere mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen aufgeführt, die eine Identifizierung von MS-Signalen erschweren können. Isomere sind gleichzeitig auch isobare Substanzen, d.h. sie haben exakt die gleiche Masse. In der Massenspektrometrie spricht man auch von einer isobaren Überlappung, wenn die Substanzen zwar nicht die exakt gleiche Masse haben, aber mit der gegebenen Massenauflösung nicht getrennt werden können. Zudem können Lipide durch Fragmentierung komplexerer Lipide in der Ionenquelle entstehen, wobei das Ausmaß und die Art der Fragmentierung von der Art der Quelle und den eingestellten Quellenparametern abhängt [107].

Der Identifizierungsgrad kann in fünf Level aufgeteilt, wobei die Identifizierung genauer wird, je mehr Maßnahmen ergriffen werden [108]. Die erste Stufe ist die Identifizierung über die exakte Masse, danach folgt die Bestimmung der Summenformel. Die nächsten Level werden durch die Zuordnung zu Molekülklassen oder einzelnen Substanzen durch den Vergleich der Fragmentierungsmuster (MS/MS-Spektren) mit Datenbanken erreicht. Das höchste Bestimmtheitsmaß wird durch den Vergleich der Fragmentierung und der Retentionszeit (RT) mit einem Referenzstandard erreicht. Dennoch ist zu beachten, dass selbst mit der höchsten Identifizierungsstufe die Selektivität u. U. noch zu gering sein kann, wenn nicht auch die Störung von Isomeren in Betracht gezogen und durch Vergleich mit den jeweiligen Standard-Lösungen ausgeschlossen wird.

Mittel einem Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer kann die exakte Masse mit einem Fehler von ungefähr 5 – 20 ppm (engl. parts per million) bestimmt werden. Im Spektrum haben die Peaks dabei eine Breite von 50 – 150 ppm (siehe Abschnitt 1.4.3). Die Kopfgruppe und die Fettsäurezusammensetzung kann durch gleichzeitige Messung von MS/MS-Experimenten und einer chromatographischen Trennung bestimmt werden.

## Einleitung

Tabelle 2: Beispiele für isomere und isobare Überlappungen bei Lipiden.

Die Trennung der Analyten in der Massenspektrometrie erfolgt anhand des Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ). Hier aufgeführte  $m/z$ -Differenzen können mit einem QTOF-Massenspektrometer, das für diese Arbeit verwendet wurde, nicht getrennt detektiert werden. Die  $m/z$ -Differenz bei Isomeren beträgt Null. DB = Doppelbindung, FA = Fettsäure,  $\text{HCO}_2^-$  = Formiat,  $\text{H}_3\text{C}_2\text{O}_2^-$  = Acetat, M = relative Molekülmasse, O- = Plasmanyli-Spezies, X = Summe der Kohlenstoffatome, Y = Summe der Doppelbindungen. Modifiziert nach [109, 110].

Lipid-Klasse	Art der Überlappung	$\Delta m/z$	Beispiel
<b>Positiver &amp; negativer Ionisationsmodus</b>			
PC O - LPC	PC O = LPC	0	$[\text{PC O-26:1+H}]^+ = [\text{LPC 26:1+H}]^+$
Ungesättigte Lipide	$[\text{M+DB+}^{13}\text{C}_2] \approx [\text{M}]$	0,009	$[\text{PC 32:1+}^{13}\text{C}_2\text{+H}]^+ \approx [\text{PC 32:0+H}]^+$
Glycerolipide	$[\text{M}] \approx [\text{M+CH}_2\text{+O}]$	0,036	$[\text{PC 33:1+H}]^+ \approx [\text{PC O-34:1+H}]^+$
Sphingolipide	$[\text{M}] \approx [\text{M+CH}_2\text{-DB-OH}]$	0,036	$[\text{SM t42:2+H}]^+ \approx [\text{SM d43:1+H}]^+$
PI - PS	$[\text{PI}] \approx [\text{PS+6CH}_2\text{+5DB+}^{13}\text{C}]$	0,002	$[\text{PI 34:1-H}]^- \approx [\text{PS 40:6-H+}^{13}\text{C}]^-$
PC - SM	$[\text{PC+}^{13}\text{C}] \approx [\text{SM-H}_2\text{O +4CH}_2\text{-DB}]$	0,065	$[\text{PC 38:3+}^{13}\text{C+H}]^+ \approx [\text{SM d42:2+H}]^+$
<b>Positiver Ionisationsmodus</b>			
PC - PE	$\text{PC} = \text{PE} + 3\text{CH}_2$	0	$[\text{PC 32:0+H}]^+ = [\text{PE 35:0+H}]^+$
PE - PA	$[\text{PE+H}]^+ = [\text{PA+C}_2\text{H}_4\text{+DB+ NH}_4]^+$	0	$[\text{PE 34:1+H}]^+ = [\text{PA 36:2+NH}_4]^+$
PS - PG	$[\text{PS+H}]^+ = [\text{PG+2DB+ NH}_4]^+$	0	$[\text{PS 34:1+H}]^+ = [\text{PG 34:2+ NH}_4]^+$
Ungesättigte Lipide	$[\text{M+Na}]^+ \approx [\text{M+2CH}_2\text{+3DB+H}]^+$	0,002	$[\text{PC 34:1+Na}]^+ \approx [\text{PC 36:4+H}]^+$
PC - PS	$[\text{PC+H}]^+ \approx [\text{PS+DB+H}]^+$	0,073	$[\text{PC 32:0+H}]^+ \approx [\text{PS 32:1+H}]^+$
DG - CE	$[\text{CE X:Y+NH}_4]^+ \approx [\text{DG X+30:Y+ NH}_4]^+$	0,015	$[\text{CE 18:1+ NH}_4]^+ \approx [\text{DG 38:1+NH}_4]^+$
<b>Negativer Ionisationsmodus</b>			
PC - PS	$[\text{PC+ H}_3\text{C}_2\text{O}_2]^- = [\text{PS+4CH}_2\text{-DB-H}]^-$	0	$[\text{PC 32:1+H}_3\text{C}_2\text{O}_2]^- = [\text{PS 36:0-H}]^-$
Formiat-/ Acetat-Addukte	$[\text{X+CH}_2\text{+ HCO}_2]^- = [\text{X+ H}_3\text{C}_2\text{O}_2]^-$	0	$[\text{PC 34:1+HCO}_2]^- =$ $[\text{PC 33:1+H}_3\text{C}_2\text{O}_2]^-$
Ungesättigte Lipide	$[\text{M+}^{35}\text{Cl}]^- \approx [\text{M+DB+}^{37}\text{Cl}]^-$	0,019	$[\text{PC 34:1+}^{35}\text{Cl}]^- \approx [\text{PC 34:2+}^{37}\text{Cl}]^-$
<b>Fragment Ionen</b>			
FA Fragmente	$\text{FA X:Y} \approx \text{FA X+4:Y+6(-CO}_2)$	0,021	$[\text{FA 18:0-H}]^- \approx [\text{FA 22:6-HCO}_2]^-$
FA Fragmente	$\text{FA X:Y} \approx \text{FA X+3:Y-1(-CO}_2)$	0,073	$[\text{FA 20:4-H}]^- \approx [\text{FA 23:3-HCO}_2]^-$

## 1.3 Flüssigchromatographie

Die Chromatographie ist die Trennung von Stoffgemischen durch Retention, also unterschiedlich starkes Zurückhalten der Bestandteile auf einem Trägermaterial. Sie ermöglicht den qualitativen und quantitativen Nachweis der Einzelkomponenten. Sie umfasst im Allgemeinen eine stationäre Phase (Sorbentien oder Trennflüssigkeiten) und eine mobile Phase (Eluent bzw. Elutionsmittel), die nicht miteinander mischbar sind. Als Trennmechanismen kommen u.a. die Adsorption, die Verteilungschromatographie sowie die Größenausschlusschromatographie in Frage. Die Trennung durch Adsorption beruht auf einer unterschiedlich starken Bindung der Analyten an eine stationäre Phase, hingegen verteilen sich die Substanzgemische bei der Verteilungschromatographie zwischen zwei nicht mischbaren, flüssigen oder gasförmigen Phasen. Weitere Mechanismen sind der Ionenaustausch, die Affinitätschromatographie, welche auf spezifischen Wechselwirkungen



beruht, sowie die chirale Chromatographie, bei der unterschiedlich starke Wechselwirkungen von Diastereomeren mit dem enantiomerenreinen Säulenmaterial für die Trennung verwendet werden. Im Falle der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wird eine Trennsäule als stationäre Phase verwendet und das flüssige Elutionsmittel mit Hilfe von Pumpen durch die Säule gedrückt. Die Auftrennung erfolgt durch die unterschiedlich starke Adsorption der im Elutionsmittel gelösten Einzelkomponenten an die Oberfläche des Säulenmaterials. Dabei steigt die Menge an adsorbierter Substanz mit der Oberfläche und Konzentration und fällt mit steigender Temperatur. Die Art der Wechselwirkung zwischen der Substanz und der Oberfläche ist abhängig von dem gewählten Säulenmaterial. Als Grundlage für das Säulenmaterial werden stark poröse Stoffe mit großer spezifischer Oberfläche wie Kieselgel oder Aluminiumoxid verwendet. Diese können entweder als ein Stück (monolithische Säule) oder in Form von vielen kleinen Partikeln in der Säule vorliegen. Am Anfang und Ende der Säule verhindern Fritten das Austreten des Säulenmaterials und das Verstopfen der Säule durch Partikel. Die Trennleistung chromatographischer Säulen wird beeinflusst durch die Partikelgröße, die Partikelgrößenverteilung, die Porengröße, das Partikelmaterial sowie die Oberflächenbeschaffenheit. Als Kenngröße für die Trennleistung wurde, in Anlehnung an die Trennstufen bei der Destillation, die Anzahl theoretischer Böden eingeführt, wobei sich bei jedem Boden einmal das Verteilungsgleichgewicht einstellt [111]. Die Berechnung der Anzahl theoretischer Böden ist in Formel 1 dargestellt. Dabei führen kleinere und gleichmäßigere Partikel zu einer verbesserten Trennleistung und einem höheren Fließwiderstand. Um die erforderliche Fließgeschwindigkeit beizubehalten, ist daher ein erhöhter Druck durch die Pumpen erforderlich. Bei HPLC-Anlagen liegt das Drucklimit ungefähr bei 400 bar, bei Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie-Anlagen (UHPLC) kann der Druck auf bis zu 1300 bar ansteigen.

$$N = 5,54 * \left(\frac{t_R}{w_{0,5}}\right)^2$$

Formel 1: Berechnung der theoretischen Bodenanzahl.

N = theoretische Bodenanzahl,  $t_R$  = Retentionszeit,  $w_{0,5}$  = Peakbreite auf halber Höhe

Die Grundprinzipien der chromatographischen Trennung sind in Abbildung 6 dargestellt. Kenngrößen für die Beurteilung der Trenneffizienz sind die Streudiffusion, die Longitudinaldiffusion sowie der Stoffausgleich (siehe Formel 2) [112]. Die Streudiffusion, auch Eddy-Diffusion genannt, beschreibt die Ablenkung der Moleküle von der Flussrichtung durch das Säulenmaterial, während die Longitudinaldiffusion in bzw. entgegen der Flussrichtung verläuft. Der Stoffausgleich beschreibt die Geschwindigkeit, mit der sich die Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase bewegen und wird z.B. durch die Adsorptionsrate beeinflusst. Die Anzahl theoretischer Trennböden ist demnach substanzspezifisch.

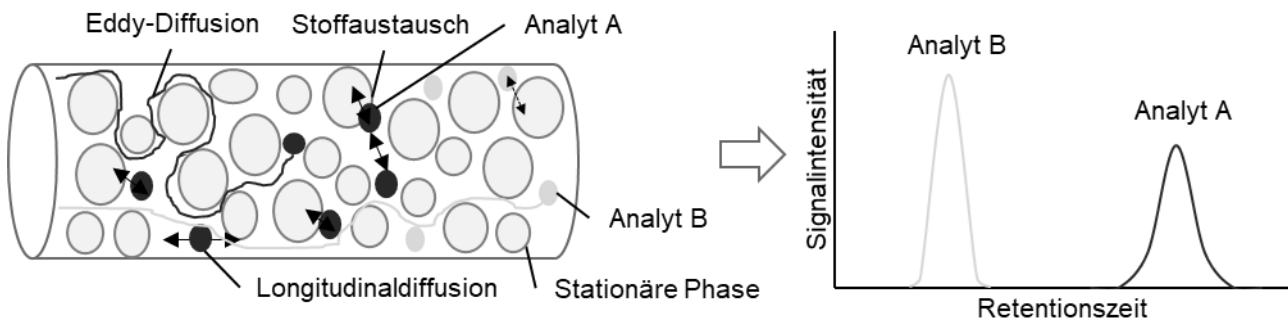


Abbildung 6: Schematische Darstellung der chromatographischen Trennung.

Die Analyten wechselwirken in unterschiedlichem Ausmaß mit der stationären Phase, sodass sie die Säule zu unterschiedlichen Zeitpunkten verlassen und getrennt detektiert werden können. In diesem Beispiel wechselwirkt der Analyt A stärker mit der stationären Phase, sodass er die Säule zu einem späteren Zeitpunkt verlässt. Modifiziert nach [113].

$$H = A + \frac{B}{v} + C * v$$

Formel 2: Van Deemter-Gleichung.

H = theoretische Trennbodenhöhe, A = Eddy-Diffusion, B/v = Longitudinaldiffusion, C\*v = Stoffausgleich

Das am häufigsten verwendete Säulenmaterial ist Kieselgel. Im Falle der Normalphasenchromatographie (NPLC) liegt die Kieselgeloberfläche unverändert vor, sodass es zu hydrophilen Wechselwirkungen zwischen den freien Silanol-Gruppen des Kieselgels und den polaren Gruppen der aufzutrennenden Substanzen kommt. Im Falle der Lipidanalytik werden die Lipide daher anhand der polaren Kopfgruppen getrennt [15]. Stark unpolare Lipide wie Triglyceride interagieren kaum bis gar nicht mit dem Säulenmaterial und werden folglich nicht getrennt [15]. Zudem werden für die NPLC wasserfreie mobile Phasen verwendet, was mit zusätzlichen Kosten verbunden ist, und die verwendeten Lösungsmittel sind häufig toxisch oder umweltschädlich [114]. Die freien Silanol-Gruppen des Kieselgels können derivatisiert werden, um die Trenneigenschaften zu verändern. So werden häufig Alkylchlorsilane verwendet, um die Oberfläche zu hydrophobisieren. Man spricht in diesem Fall von einer Umkehrphase (engl. reversed-phase, RP). Dabei werden in der Regel Octyl- oder Octadecanyl-Gruppen verwendet, sodass die Retention der Analyten auf der Säule nun vorwiegend auf hydrophoben Wechselwirkungen durch Van-der-Waals Kräfte zwischen dem Kohlenwasserstoffgerüst der Analyten und den Alkylresten beruht. Räumlich schwer erreichbare Silanol-gruppen können mit Octadecanyl-Gruppen nicht derivatisiert werden und führen infolgedessen zum Peak tailing. Das sogenannte „*endcapping*“ mit sterisch weniger anspruchsvollen Molekülen, z.B. mit Trimethylchlorsilanen, kann dem vorbeugen [115, 116]. Des Weiteren können die Silanol-Gruppen auch mit Cyanopropyl- und Aminopropylresten derivatisiert werden, um eine Mischung aus polaren und hydrophoben Wechselwirkungen zu erzeugen. Für die Verwendung eines solchen polaren Säulenmaterials mit hydrophoben Lösungsmitteln, wie man sie auch für die RP-Chromatographie verwenden würde, wurde im Jahre 1990 die Bezeichnung „*hydrophilic-interaction*“

*chromatography*“ (HILIC) eingeführt [117]. Die Auftrennung der Lipide erfolgt anhand der polaren Kopfgruppen und die Triglyceride interagieren auch in diesem Fall kaum mit dem Säulenmaterial [118]. Nachteile der HILIC sind die zeitaufwendige Konditionierung und Äquilibration der Säule sowie die verringerte Robustheit durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Matrixänderungen [119]. Es wird deshalb zur Vorbereitung der Säule empfohlen, vor jeder Analyse fünf bis zehn Proben mit der gleichen Matrix zu injizieren und in dem anschließenden Analysenlauf keine Leerinjektionen einzufügen [120]. Eine enantioselektive Auftrennung kann durch Derivatisierung mit chiralen Selektoren, wie Amylose oder Cyclodextrinen, erfolgen [121].

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Flüssigchromatographie sind die Elutionsmittel. Die dafür verwendeten Flüssigkeiten müssen sehr rein sein, damit sie keine Störsignale erzeugen. Die Elutionsmittel werden gemäß ihrer Polarität in die elutrope Reihe eingeordnet und somit anhand der Fähigkeit, Substanzen vom Säulenmaterial zu lösen, klassifiziert [111]. Bei der NPLC haben unpolare Lösungsmittel, wie z.B. Hexan, eine sehr geringe und Wasser die höchste Elutionskraft. Bei der RPLC hingegen steigt die Elutionskraft mit abnehmender Polarität der Lösungsmittel. Kommen mehrere Lösungsmittel hinsichtlich ihrer Elutionsstärke und Selektivität in Frage, sollte die Viskosität beachtet werden, da diese maßgeblich den Rückdruck bestimmt. Außerdem müssen die mobilen Phasen vor Verwendung entgast werden, da es andernfalls in den Pumpen, nach Druckentlastung in der Säule oder dem Detektor zur Bläschenbildung kommt. Die Entgasung kann durch Vakuum, Ultraschall oder ein Inertgas erfolgen [122]. Bei den meisten HPLC-Anlagen ist dafür eine Entgaser-Einheit eingebaut, die gelöste Gase durch Vakuum und eine gas-permeable Membran entfernt [122].

Zur Auftrennung der Substanzen wird in der Regel ein Gemisch verschiedener Elutionsmittel verwendet. Man spricht von einer isokratischen Trennung, falls die Elutionsmittel über die gesamte Laufzeit in einem konstanten Verhältnis zueinander vorliegen. Bei der Gradientenelution pumpen mehrere Pumpen jeweils ein Elutionsmittel, sodass das Mengenverhältnis der Elutionsmittel stufenlos angepasst werden kann. In diesem Fall kann die Elutionskraft während dem Lauf erhöht und die Retentionszeiten so verkürzt werden. Die chromatographisch aufgetrennten Analyten können anschließend mit verschiedenen Verfahren wie UV/VIS, Fluoreszenz oder Massenspektrometrie detektiert werden.

## 1.4 Massenspektrometrie

Mit einem Massenspektrometer (MS) können gasförmige, flüssige oder feste Proben ionisiert und ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) gemessen werden. Die Trennung der Ionen erfolgt aufgrund ihres unterschiedlichen Verhaltens in elektrischen bzw. magnetischen Feldern [123]. MS sind aus mehreren Komponenten aufgebaut: einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Die Ionenquelle überführt die Substanzen von dem Probeneinlass als Ionen in die Gasphase. Der

## Einleitung

Massenanalysator separiert anschließend die Ionen nach ihrem  $m/z$ -Wert. Der Detektor wandelt die eintreffenden Ionen in ein elektrisches Signal um. Außerdem wird das MS an ein Computersystem angeschlossen, das die gemessenen Daten aufzeichnet. Das Ergebnis der Messung wird in einem Spektrum angegeben, bei dem die Ionenintensität gegen das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgetragen wird. Wenn das MS an eine GC- oder LC-Anlage gekoppelt wird, können die Ergebnisse auch in einem Chromatogramm wiedergegeben werden. In diesem Fall wird die Ionenintensität eines  $m/z$ -Wertes gegen die Retentionszeit aufgetragen (Abbildung 7). Die Einheit des Masse-zu-Ladungs-Verhältnis kann entweder dimensionslos oder in Thomson (Th) angegeben werden [123]. Bei kleineren, einfach-geladenen Molekülen wird häufig direkt die Masse in Dalton (Da) angegeben.

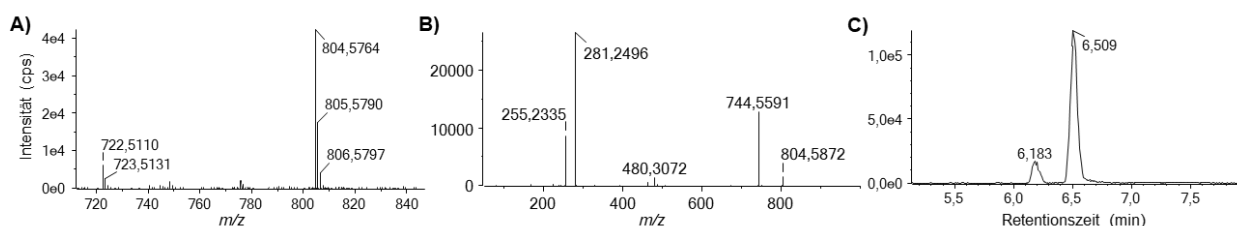


Abbildung 7: Massenspektrum, MS/MS-Spektrum und Chromatogramm von PC 34:1.

Spektren und Chromatogramm von Phosphatidylcholin 34:1 im negativen Ionisationsmodus (monoisotopische  $m/z$  804,5749). (A) Massenspektrum mit Isotopen, (B) MS/MS-Spektrum der Muttermasse 804,6, (C) Chromatogramm von  $804,5749 \pm 0,0035 m/z$ .

Eine wichtige Kenngröße der Massenspektrometrie ist die monoisotopische Masse, also die Masse bei der ausschließlich die häufigsten Isotope der Elemente des Moleküles vorkommen, z.B. nur  $^{12}\text{C}$ -Atome. Natürlich vorkommend handelt es sich bei 1% der Kohlenstoffatome um  $^{13}\text{C}$ -Atome, sodass im MS-Spektrum kohlenstoffhaltiger Verbindungen neben der monoisotopischen Masse weitere um  $+1/z$  verschobene Peaks detektiert werden. Auch Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel haben natürliche Isotope. Dadurch können aus der relativen Häufigkeit der Isotopen-Signale im MS-Spektrum, der Isotopenverteilung, Rückschlüsse auf die molekulare Zusammensetzung erfolgen. Sehr charakteristisch sind chlor- oder bromhaltige Verbindungen, da die Isotope  $^{35}\text{Cl}$  und  $^{37}\text{Cl}$  im Verhältnis von ca. 100/32 sowie  $^{79}\text{Br}$  und  $^{81}\text{Br}$  im Verhältnis von 100/97 vorkommen [124].

Die Massenauflösung eines MS berechnet sich aus der minimalen  $m/z$ -Differenz, die noch vollständig getrennt dargestellt werden kann. Je nach Massenanalysator liegt die Massenauflösung aktuell im Bereich von ungefähr 1.000 bis 2.700.000 (Formel 3) [125]. Quadrupole und Ionenfallen sind Beispiele für MS mit niedrigen Auflösungen [126]. Beispiele für hochauflösende MS mit einer Auflösung  $> 15.000$  sind Flugzeit-, Orbitrap- und Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICRMS) [126]. Eine hohe Massenauflösung korreliert häufig mit einer hohen Massengenauigkeit bzw. einem kleinen Massenfehler (Formel 4). Der Massenfehler liegt z.B. bei niedrig auflösenden Quadrupolen bei absolut  $\pm 0,5$  Da, während (sehr) hochauflösende Massenspektrometer eine relative Massengenauigkeit von 5 ppm bis 80 ppb (parts per billion)

erreichen können [125, 127]. Massenspektrometer können ausschließlich geladene Atome, Moleküle oder Ionencluster detektieren. Ungeladene Teilchen können lediglich als Neutralverlust (engl. neutral loss, NL) beobachtet werden, d.h. als Differenz zwischen zwei  $m/z$ -Werten desselben Moleküls infolge einer Fragmentierung.

$$\text{Massenauflösung} = \frac{m}{\Delta m}$$

Formel 3: Berechnung der Massenauflösung.

Die zu untersuchende Masse wird mit „m“ abgekürzt. Für „ $\Delta m$ “ gibt es zwei verschiedene Definitionen: Zum einen die kleinste noch trennbare Massendifferenz, bei der die Peaks entweder 10 oder 50% überlappen dürfen, und zum anderen die Breite des Peaks der Masse m auf halber Höhe (engl. full width half maximum, FWHM) [128].

$$\text{relative Massengenauigkeit} = \frac{m/z_{\text{experimentell}} - m/z_{\text{theoretisch}}}{m/z_{\text{theoretisch}}}$$

Formel 4: Berechnung der relativen Massengenauigkeit.

Die relative Massengenauigkeit wird auch als Massenfehler bezeichnet und i.d.R. in ppm angegeben. Nach [123].

Je nach Aggregatzustand der Probe können unterschiedliche Ionenquellen verwendet werden, so wird für die Gaschromatographie häufig die Elektronenstoßionisation verwendet [123]. Flüssige Proben können z.B. durch Elektrospray-Ionisation (ESI) oder chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) ionisiert werden [129, 130]. Für feste Proben kann die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (engl. matrix-assisted laser desorption/ionisation, MALDI) verwendet werden [131, 132]. Die Ionisierung kann unter Vakuum wie bei der Elektronenstoßionisation oder bei Atmosphärendruck wie bei ESI und APCI stattfinden. Hingegen werden die restlichen Komponenten wie der Massenanalysator und der Detektor immer unter Hochvakuum von ca.  $10^{-5}$  bis  $10^{-9}$  Torr betrieben, um die Kollision der Ionen mit Gasmolekülen aus der Luft zu vermeiden (siehe auch Abbildung 12) [123].

Für die Detektion der Ionen wird mit Ausnahme der Orbitrap- und FT-ICR-Technologien, die eine Bildstromdetektion verwenden, ein Sekundärelektronenvervielfacher (engl. secondary electron multiplier, SEM) verwendet [123]. Bei dem SEM werden durch das Auftreffen energiereicher Ionen Elektronen aus der Detektoroberfläche herausgelöst. Die so freigesetzten Elektronen werden durch die angelegte Spannung beschleunigt und setzen nach Aufprall wiederum weitere Elektronen frei. Durch wiederholtes Auftreffen der Elektronen auf der Detektoroberfläche wird das Signal verstärkt und der resultierende Strom kann gemessen werden. Ein Beispiel für einen SEM ist der Kanalelektronenvervielfacher (KEV), bei dem die Ionen in einer sich zuspitzenden, gebogenen Röhre aufgefangen werden. Bei Mikrokanalplatten (engl. micro channel plates, MCP), die häufig für TOF-Geräte verwendet werden, werden zahlreiche sehr kleine Elektronenvervielfacherröhren in einer runden Platte gebündelt (Abbildung 8). Mittels MCP-Detektoren können die Signale der

## Einleitung

eintreffenden Ionen zeitlich oder räumlich eingeordnet werden [123]. Die Stromverstärkung ist meist geringer als bei KEV [123]. Die verschiedenen SEM-Detektoren haben die Gemeinsamkeit, dass ihre Lebensdauer durch die Ladung, die ihre Oberfläche abgeben kann begrenzt ist [123].

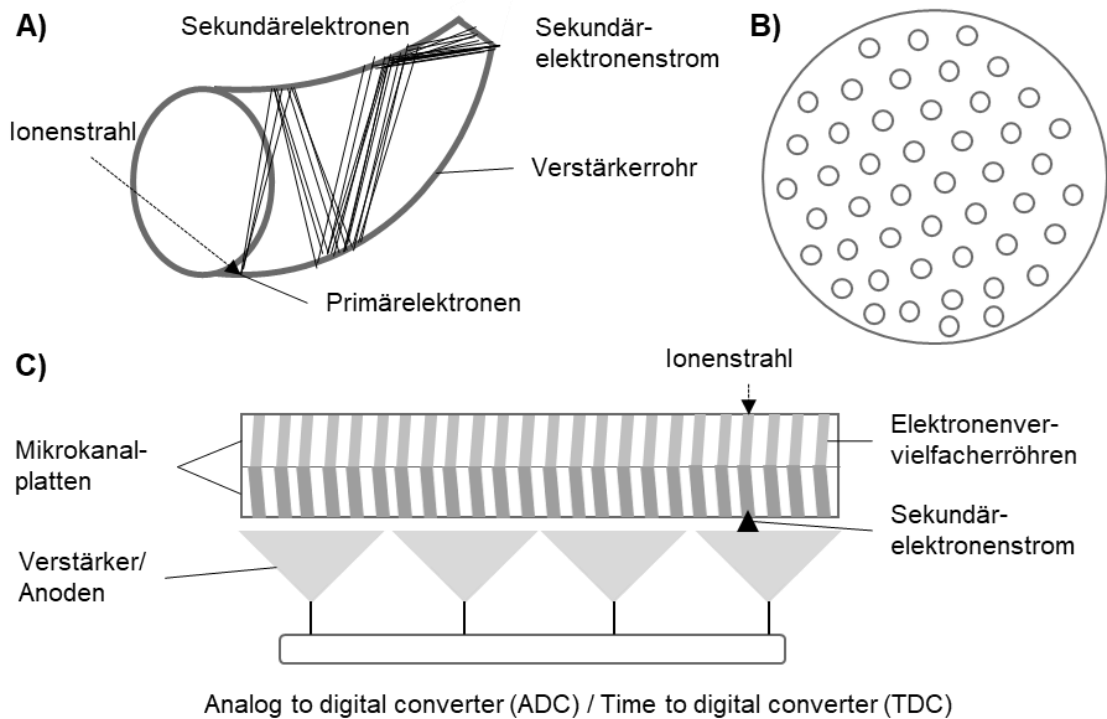


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Kanalelektronenvervielfacher und Mikrokanalplatten-Detektoren. In der Massenspektrometrie verwendete Detektoren: (A) Kanalelektronenvervielfacher, (B) Aufsicht auf einen Mikrokanalplatten-Detektor (MCP), (C) Seitenansicht eines MCP. Weitere Details sind im Text. Quelle Sciex, modifiziert nach [123, 133, 134].

### 1.4.1 Ionenquellen

Die Grundlagen der Elektrospray-Ionisation wurden durch Dole *et al.* im Jahre 1968 gelegt, als sie damit erstmals geladene Makromoleküle in die Gasphase überführten [135]. Die Technik wurde durch Yamashita und Fenn weiter erforscht und diese konnten auch den Übergang von Anionen und Kationen aus Salzlösungen in die Gasphase nachweisen [136]. Den Durchbruch der ESI-Technologie erreichten Fenn und Kollegen, indem sie die Möglichkeit aufzeigten, auch größere Makromoleküle wie Proteine und Peptide durch Mehrfachladung zu messen [129].

Durch das Anlegen einer Hochspannung an die Kapillare, kommt es zur Ladungstrennung innerhalb der Flüssigkeit und es bildet sich der sogenannte Taylor-Konus. Die Ansammlung gleicher Ladungen führt vermehrt zur Abstoßung durch Coulomb-Kräfte. Wenn die Coulomb-Abstoßung gleich der Oberflächenspannung ist, wird das Rayleigh-Limit erreicht [137]. Sobald dieses überschritten wird, kommt es zur sogenannten Coulomb-Explosion und damit zum Zerfall der Tröpfchen. Durch die angelegten Gase nimmt der Lösungsmittelanteil in den Tröpfchen weiter ab und es kommt zu weiteren Abstoßungsreaktionen und immer kleiner werdenden Tröpfchen. Für den weiteren Übergang der einzelnen Ionen aus den Tröpfchen in die Gasphase gibt es zwei Theorien. Zum einen wird angenommen, dass die Tröpfchen durch Zersetzung immer kleiner werden und irgendwann nur noch ein einzelnes Ion enthalten, das dann nach der Verdampfung des restlichen Lösungsmittels ebenfalls in die Gasphase übergeht [135, 138]. Diese Theorie wird v.a. für die Ionisierung von Makromolekülen angenommen [139]. Eine Überschreitung des Rayleigh-Limit zur Freisetzung einzelner Moleküle, die ein- oder zweifach geladen sind, ist unwahrscheinlich, da der Tröpfchen-Radius sehr klein sein müsste [140]. Immer kleiner werdende Tröpfchen würden deshalb zur Entstehung mehrwertiger Ionen führen [140]. Stattdessen wird bei kleinen Molekülen die direkte Abspaltung einfach geladener Ionen durch das elektrische Feld nach Erreichen einer kritischen Tröpfchengröße angenommen [140]. Die so gebildeten Ionen werden dann weiter in den Massenanalysator geleitet (Abbildung 9).

Eine weitere Ionenquelle für die Kopplung mit HPLC Anlagen ist die, von Hornig *et al.* entwickelte, chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) [130]. Bei diesem Verfahren wird die Analytlösung durch eine Kapillare mit einem Keramikheizer verdampft und anschließend wird der Lösungsmitteldampf ausgehend von Stickstoff- und Wassermolekülen durch eine nadelförmige Elektrode (Korona-Nadel) ionisiert [141]. Die ionisierten Lösungsmittelcluster übertragen dann die Ladung auf die Analyten [141]. Die Ionisation mittels APCI ist nicht so schonend wie ESI, sie führt zu einer leichten Fragmentierung und setzt die thermische Stabilität der Substanzen voraus. Dafür kann APCI auch bei Analyten mit wenigen funktionellen oder reaktiven Gruppen und hohen Flussraten eingesetzt werden [142]. Folglich gibt es einige Metaboliten, die nur mit APCI oder nur mit ESI ionisiert werden können. Viele Metaboliten können allerdings mit beiden Verfahren bestimmt werden. Für diese Arbeit wurde ESI zur Ionisierung der Proben verwendet, da bei ESI die Zahl detektierbarer Metaboliten insgesamt größer ist [143]. Die verwendete DuoSpray® Ionenquelle (Sciex, Darmstadt) ermöglicht die Verwendung beider

Ionisierungsarten ohne Umbau, APCI wurde deshalb zwischen den Messungen für die Kalibrierung verwendet.

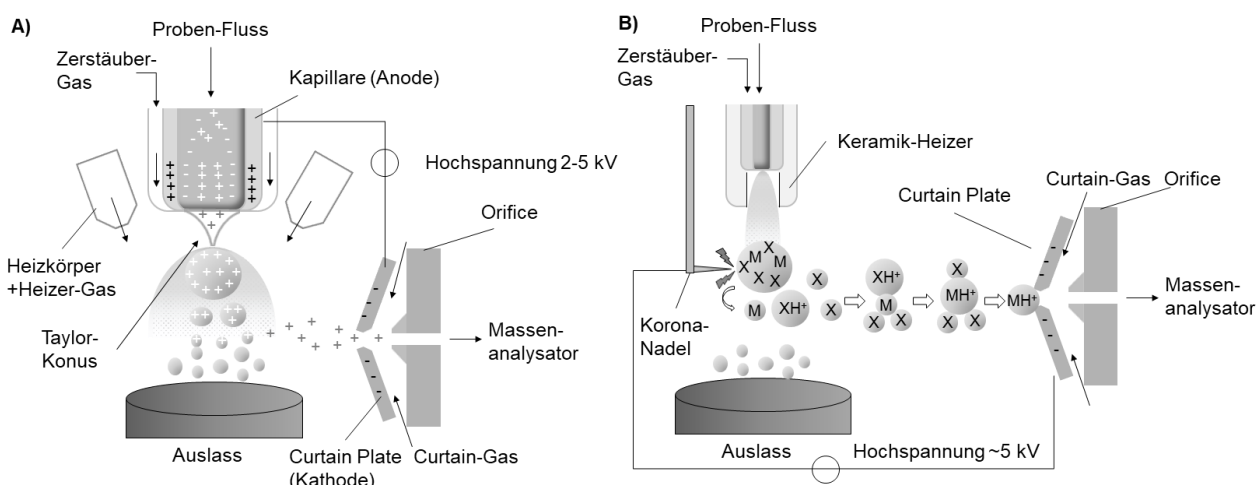


Abbildung 9: Schematischer Aufbau einer ESI/APCI-Ionisationsquelle.

Dargestellt ist der schematische Aufbau der Ionisationsquellen bei der Elektrospray-Ionisation (ESI, A) und der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI, B). Nähere Details zum Ionisationsmechanismus sind im Text beschrieben. Die Tröpfchenbildung und die Verdampfung des Lösungsmittels (LM) werden durch das Zerstäuber gas erleichtert. Bei höheren Flussraten wird zudem ein Heizgas für die LM-Verdampfung benötigt. Die orthogonale Ausrichtung der Kapillare zur Blende (Orifice) unterstützt die Abscheidung ungeladener Teilchen und größerer LM-Cluster, da durch die Trägheit nur feine Tröpfchen und Ionen umgelenkt werden [144]. Zudem wird die Kontamination des MS durch das Schutzgas (Curtain-Gas), das ungeladene Teilchen zurückwirft, weiter verringert. Bei der DuoSpray® Ionenquelle (Sciex, Darmstadt) wurde einer der beiden Heizkörper der ESI-Quelle durch einen Keramik-Heizer mit Korona-Nadel für APCI ersetzt. X = Lösungsmittelcluster, M = Analytmolekül. Modifiziert nach [145, 146].

### 1.4.2 Massenanalysatoren

Die für diese Arbeit relevanten Massenanalysatoren sind der Quadrupol- und der Flugzeitmassenanalysator. Ein Quadrupol (Q) besteht aus vier parallel angeordneten Stabelektroden, die innerhalb einer Ebene ein Quadrat bilden (Abbildung 10). Gegenüberliegende Elektroden sind gleich und benachbarte Elektroden gegensätzlich geladen, wobei die Ladung durch die anliegende Wechselspannung mit hoher Frequenz wechselt. Durch den raschen Wechsel aus Anziehung und Abstoßung der Ionen, bewegen sich diese kreisförmig zwischen den Stabelektroden. Die Potentialdifferenz zwischen dem Ein- und Ausgang des Quadrupols treibt die Ionen entlang der Elektroden voran. Zudem liegt eine Gleichspannung an, sodass sich nur einzelne Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse auf einer stabilen Kreisbahn bewegen. Die restlichen Ionen kollidieren mit den Quadrupol-Stäben. Das zu selektierende Masse-zu-Ladungs-Verhältnis kann über die Frequenz der Wechselspannung und das Verhältnis aus Gleich- und Wechselspannung ausgewählt werden [123]. Das Verhältnis von Gleich- und der hochfrequenten Wechselspannung muss dabei linear erhöht werden, um verschiedene Massen auf einer stabilen Bahn in Richtung des Detektors zu leiten [147]. Die Massenauflösung von Quadrupolen ist über den Massenbereich konstant und kann Peaks im



Abstand von einem Thompson auflösen, weswegen die Auflösung auch als „*unit resolution*“ oder Einheitsauflösung bezeichnet wird [148]. Wenn keine Massenselektion vorgenommen werden soll, z.B. im Q0 oder in einer Kollisionszelle (Q2), wird keine Gleichspannung, sondern nur die hochfrequente Wechselspannung angelegt.

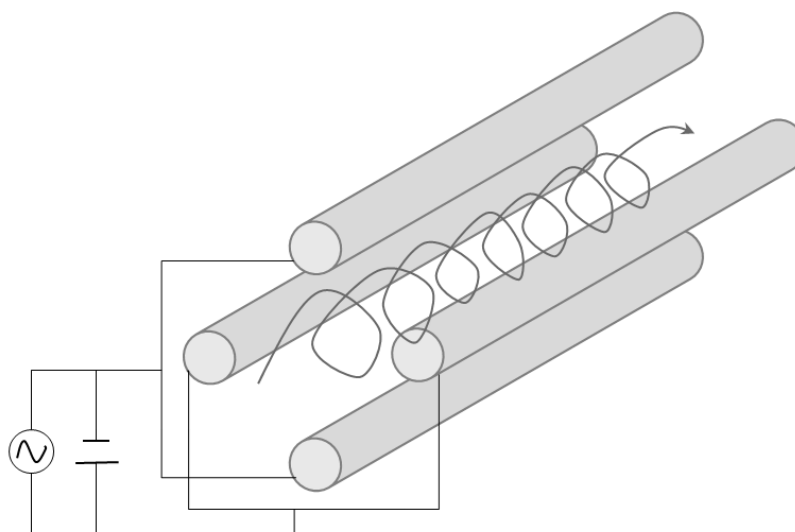


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Flugbahn eines Ions in einem Quadrupol-Massenanalysator. Weitere Informationen sind im Text. Modifiziert nach [123, 149].

Der Flugzeitmassenanalysator (engl. time-of-flight, TOF) misst die Zeit, die die Ionen zum Zurücklegen einer festgelegten Strecke benötigen. Die Ionen werden am Anfang einer Röhre in einem elektrischen Feld beschleunigt und fliegen anschließend entlang einer feldfreien Strecke zum Detektor. Alle Ionen nehmen idealerweise die gleiche kinetische Energie auf, wobei Ionen mit einer höheren Ladung oder einer geringen Masse stärker beschleunigt werden, d.h. sie erreichen den Detektor in einer kürzeren Zeit. Die Flugzeit ist proportional zur Wurzel des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses [123]. Für den Vergleich der Flugzeiten müssen die Ionen gleichzeitig beschleunigt werden. Es wird daher eine gepulste Ionenquelle, wie MALDI, benötigt oder die Ionen müssen aus einem kontinuierlichen Strom päckchenweise beschleunigt werden, wie z.B. bei einem orthogonalen Aufbau [123]. Bei einem orthogonalen TOF-Analysator wird eine pulsierende Spannung angelegt, die die Ionen senkrecht zur Flugrichtung in die Driftröhre beschleunigt (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu kann ein Quadrupol einen kontinuierlichen Ionenstrom weiterleiten. Die Vorteile der TOF-Analysatoren sind die geringe Aufnahmezeit pro Spektrum und die dadurch hohe Messfrequenz sowie der theoretisch unbegrenzte  $m/z$ -Bereich [123, 150]. Außerdem haben TOF-Analysatoren eine höhere Massenauflösung als Quadrupole [126]. Diese kann zusätzlich durch einen Reflektor verbessert werden, der die Ionen abbremst und in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt. Der Reflektor gleicht so Unterschiede in der kinetischen Energie aus, die z.B. durch unterschiedliche Startpositionen der Ionen im Beschleuniger entstehen [123]. Ionen mit einer höheren kinetischen Energie dringen tiefer in das elektrische Feld des Reflektors ein, sodass sie zeitgleich mit Ionen mit gleichem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis und einer niedrigeren kinetischen Energie am Detektor

## Einleitung

ankommen. Ein zweistufiger Reflektor kann die Auflösung weiter verbessern, indem er die Ionen zunächst durch ein hochenergetisches Feld und anschließend durch ein schwächeres Feld abbremst [123].

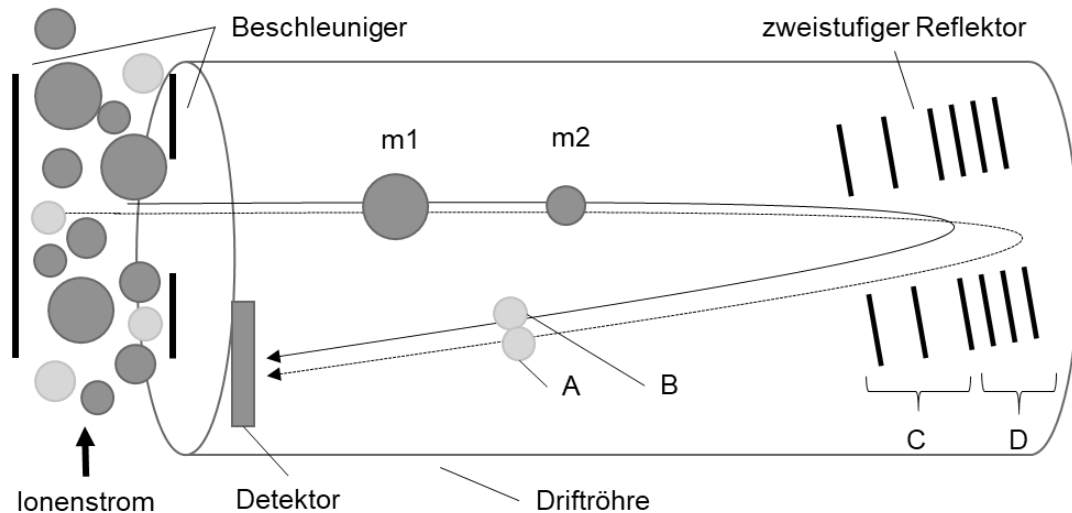


Abbildung 11: Aufbau eines orthogonalen Flugzeitmassenanalysators.

$m = m/z$  mit  $m_1 > m_2$ , A = Ion mit hoher kinetischer Energie, B = Ion mit niedriger kinetischer Energie, C = hochenergetisches Feld, D = niederenergetisches Feld. Modifiziert nach [123, 151].

### 1.4.3 Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer

Für diese Arbeit wurde ein Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (QTOF bzw. QTOFMS) verwendet. Bei diesem handelt es sich um ein Hybrid-Massenspektrometer, bestehend aus einem bzw. mehreren Quadrupolen sowie einem TOF-Massenspektrometer (Abbildung 12). Der Vorteil gegenüber reinen TOF-Analysatoren, ist die Möglichkeit, in MS/MS-Experimenten einzelne Massen zu isolieren und zu fragmentieren, um anschließend die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse der Fragmentionen zu bestimmen. Dabei werden die Mutterionen in der ersten Quadrupol-Einheit (Q1) von restlichen Ionen abgetrennt und weiter in die Kollisionszelle, i.d.R. eine weitere Quadrupol-Einheit (Q2), geleitet. In der Kollisionszelle werden die Ionen durch Anlegen einer Spannung und Kollision mit einem inerten Trägergas, z.B. Stickstoff, fragmentiert. Dies wird auch stoßinduzierte Fragmentierung genannt (engl. collision induced fragmentation, CID). Alle geladenen Fragmente werden dann mittels mehrerer Linsen fokussiert und am Anfang der orthogonal ausgerichteten TOF-Driftröhre gesammelt. Mit einer Frequenz von ungefähr 10–20 kHz werden die Ionen aus dem kontinuierlichen Ionenstrom mit einer Spannung von rund 15 kV beschleunigt und die Zeit bis zum Ankommen der einzelnen Fragmentionen am Detektor gemessen. Die Selektivität wird durch Messung der Fragmentionen deutlich erhöht, da die Fragmentierung Auskunft über die Struktur der Analyten gibt.

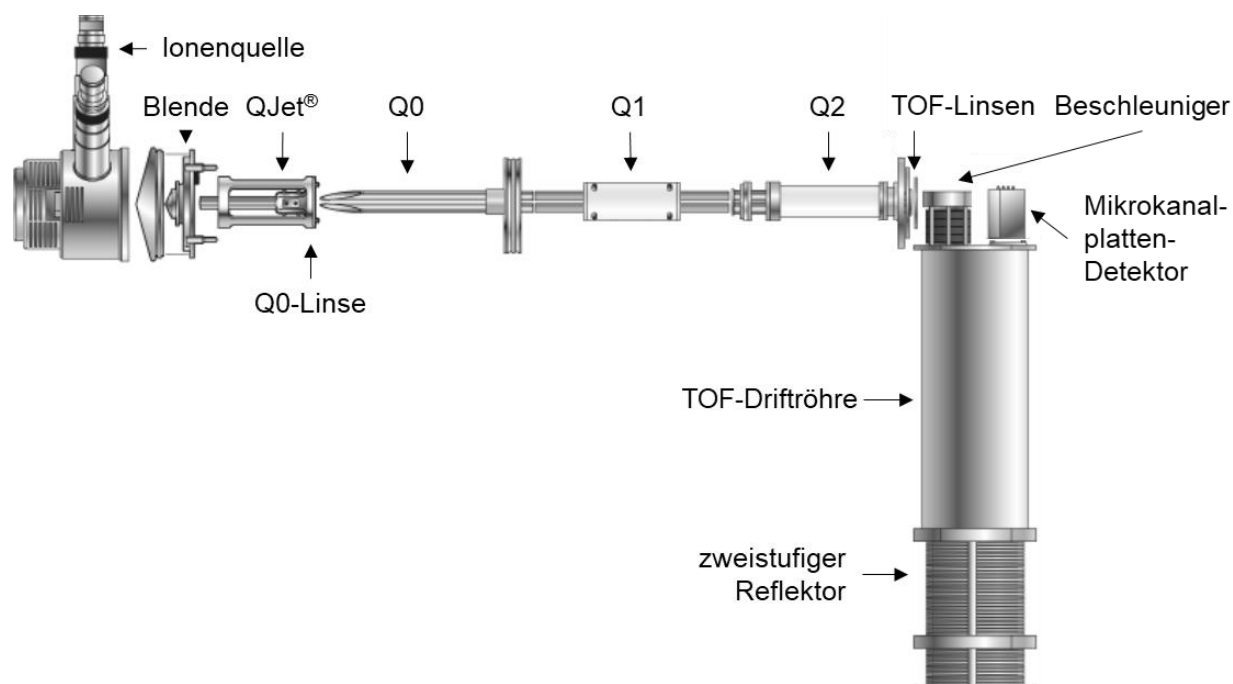


Abbildung 12: Aufbau eines TripleTOF 6600.

Abgebildet ist der Ionenpfad eines TripleTOF 6600 (Sciex, Darmstadt), mit dem die hier beschriebene Arbeit durchgeführt wurde. Die Ionenquelle befindet sich noch unter Atmosphärendruck. Ab dem QJet beginnt das Vorvakuum, Q1 und Q2 befinden sich im Hochvakuum ( $\sim 2\text{-}5 \cdot 10^{-5}$  Torr). In der TOF-Röhre ist der Druck nochmals geringer und liegt bei ca.  $2 \cdot 10^{-7}$  Torr. Q = Quadrupol, TOF = time-of-flight (Flugzeit). Quelle: Sciex, modifiziert nach [152].

Die Selektion einzelner Massen und die Messung der Fragmentionen bezeichnet man als *parallel reaction monitoring* (PRM) oder auch als *high resolution multiple reaction monitoring* (HR-MRM). Beim MRM mit Triple-Quadrupol-Massenspektrometern (QqQ) werden pro Analyten mindestens zwei Übergänge von der Muttermasse zu einzelnen Fragmentionen gemessen, um die Selektivität zu erhöhen. Im Gegensatz dazu werden im PRM alle Fragmente einer Muttermasse gleichzeitig gemessen, sodass pro Analyt ein Übergang ausreicht und die Selektivität höher ist. Die Empfindlichkeit des QTOFMS ist vergleichbar mit der eines TOFMS und geringer als bei QqQ, weswegen letztere für die Quantifizierung einzelner Substanzen bevorzugt eingesetzt werden. QTOFMS werden stattdessen, wie auch in diesem Fall, häufig für Screening-Methoden verwendet, bei denen alle Signale in einem bestimmten  $m/z$ -Bereich gleichzeitig analysiert werden sollen. Da in diesem Fall nicht alle Analyten einzeln im Q1 ausgewählt und fragmentiert werden können, muss die Selektivität der Methode durch eine hohe Massenauflösung und folglich einen geringen Massenfehler erreicht werden. TOF-Analysatoren haben bereits eine höhere Massenauflösung als QqQ. Bei QTOFMS ist die Massenauflösung durch die Fokussierung der Ionen mittels der Quadrupole nochmal auf 30.000 bis 60.000 erhöht [126]. Im Vergleich zu anderen hochauflösenden Massenspektrometern wie der Orbitrap oder FT-ICR ist die Scan-Rate des QTOF höher, mit rund 100–500 Hz statt 1–40 Hz [126, 153]. In Abbildung 13 werden die wichtigsten Messmodi schematisch dargestellt.

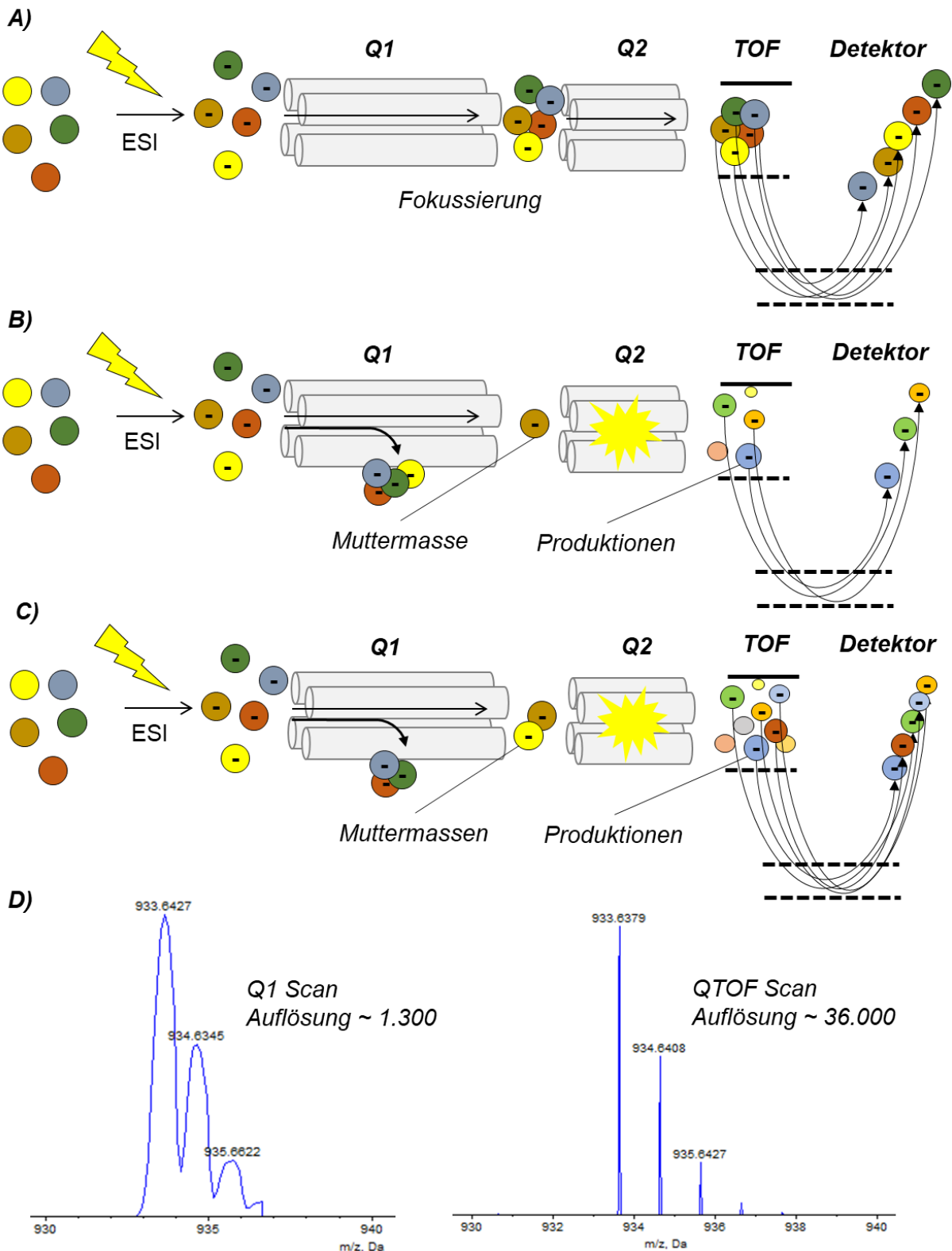


Abbildung 13: QTOFMS Scan und MS/MS-Messung.

Gezeigt werden die gängigsten Messmodi eines Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometers (QTOFMS). (A) QTOFMS-Scan: Die Ionen werden durch die Quadrupol-Einheiten fokussiert und anschließend über ihre Flugzeit detektiert. Alle Ionen können in einem Experiment bestimmt werden. (B) MS/MS-Messung: Im Q1 wird ein einzelnes Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) ausgewählt ( $\pm 0,5$  Da), im Q2 fragmentiert und anschließend alle Fragmentationen über ihre Flugzeit detektiert. Die Muttermasse kann vorher festgelegt werden (parallel reaction monitoring (PRM)) oder aus einem Scan ausgewählt werden (data-dependent acquisition). (C) Sequential-window-acquisition of all theoretical mass spectra (SWATH): MS/MS-Messung bei der im Q1 statt nur einer Muttermasse ein Massenfenster, z.B. von 25 Da selektiert wird. Die Massenfenster im Q1 decken insgesamt den kompletten Scanbereich ab. (D) Vergleich der Massenauflösung im Q1 und im QTOFMS Scan bei der theoretischen Masse von 933,6367 Da.

Zusätzlich zu dem Scan-Modus können in der gleichen Messung auch noch MS/MS-Spektren aufgenommen werden. Die Auswahl der Muttermassen kann entweder datenunabhängig erfolgen, ohne vorherige Selektion (engl. data-independent acquisition, DIA), oder datenabhängig (engl. data-dependent acquisition, DDA) durch Auswahl einzelner Massen. Die datenabhängige Selektion reserviert eine entsprechende Anzahl Kanäle pro Messzyklus für MS/MS-Experimente und wählt die zu diesem Zeitpunkt intensivsten Signale im MS Spektrum als Muttermasse mit einem Fenster von 1 Da aus. Die resultierenden MS/MS-Spektren sind i.d.R. sehr rein, aber bei fehlender chromatographischer Auftrennung der Analyten besteht die Möglichkeit, dass die Anzahl MS/MS-Kanäle nicht ausreicht und folglich nicht für alle Substanzen MS/MS-Spektren aufgenommen werden. Hingegen werden bei der datenunabhängigen Aufnahme von MS/MS-Spektren immer alle Analyten fragmentiert und den Muttermassen im MS-Scan zur gleichen Retentionszeit zugeordnet. Durch die Ähnlichkeit der Fragmentierungsmuster der Lipide, ist die Identifizierung u.U. nicht eindeutig, da mehrere Kopfgruppen Fragmente zur gleichen Zeit auftreten können. Sciex bietet für die TripleTOF-Geräte eine besondere Form der datenunabhängigen Messung an: „*Sequential-Window-Acquisition of all Theoretical Mass Spectra*“ (SWATH) [154, 155]. SWATH teilt den zu scannenden Massenbereich in mehrere feste oder variable Massenfenster auf, z.B. 25 Da, und nimmt ein MS/MS-Spektrum pro Fenster auf [156]. Dadurch werden insgesamt alle Analyten fragmentiert, aber die Anzahl möglicher Muttermassen ist reduziert, sodass die Zuordnung meistens eindeutig ist. In der Steuerungssoftware von Sciex Massenspektrometern wird die datenabhängige Aufnahme von MS/MS-Spektren als „*information dependent acquisition*“, kurz IDA, bezeichnet. Diese Bezeichnung wird im Weiteren anstelle von der Abkürzung DDA für datenabhängige Messungen verwendet und ist nicht zu verwechseln mit der datenunabhängigen Aufnahme (DIA).

Ein wichtiger Aspekt bei der hochauflösenden Massenspektrometrie ist die Stabilität der Massenkalisierung. QTOFMS müssen messtäglich kalibriert werden, da diese empfindlich gegenüber Änderungen der Umgebungsbedingungen, wie z.B. der Temperatur sind. Die Massengenauigkeit innerhalb eines Messlaufes kann mit Hilfe von externen oder internen Kalibrierungen stabilisiert werden. Beispiel für eine externe Kalibrierung ist die Autokalibrierung mittels Calibrant Delivery System (kurz CDS), bei der zwischen den Läufen eine Kalibrierlösung injiziert wird. Eine interne Kalibrierung, auch Lock-mass Kalibrierung genannt, kann mit Signalen aus den Proben bzw. Fließmitteln erreicht werden. Bei Sciex TripleTOF-Geräten wird automatisch eine interne Kalibrierung vorgenommen (Dynamic Background Calibration), wenn die Methode mindestens ein TOFMS-Scan Experiment enthält. Dabei werden die verwendeten Massen für jeden Lauf dynamisch ausgewählt [157]. Dadurch kann bei Messungen im Scan Modus das Intervall zwischen den externen Kalibrierungen größer gewählt werden. Ist hingegen kein Scan Experiment vorhanden, sollte auf Anraten des Herstellers mindestens einmal pro Stunde extern kalibriert werden, um die Massenstabilität zu gewährleisten.

### 1.4.4 LC-MS vs. Shotgun Lipidomics

Flüssige Lipidproben können auf unterschiedliche Weise in das MS geleitet werden. Eine Möglichkeit die „*shotgun lipidomics*“ wurde zuerst von Han und Gross beschrieben [158]. Der Begriff *shotgun lipidomics* beschreibt die direkte Infusion von Lipid-Extrakten in das Massenspektrometer ohne vorherige chromatographische Auftrennung, d.h. alle Lipide werden zeitgleich ionisiert und gemessen. Die resultierenden Spektren sind mitunter sehr komplex und setzen für eine sinnvolle Identifizierung eine hohe Massenauflösung und damit einen niedrigen Massenfehler voraus, sodass für diese Form der Messung v.a. Orbitrap-, FT-ICR- und TOF-Massenspektrometer eingesetzt werden [132]. Zusätzlich zu den Massenspektren werden häufig noch MS/MS-Experimente aufgenommen. Die Identifizierung der Lipide in den Shotgun-Daten kann entweder von der exakten Masse im MS-Experiment („*top-down*“) oder umgekehrt von den spezifischen Kopfgruppenfragmenten im MS/MS-Experiment ausgehen („*bottom-up*“) [132]. Die Vorteile des Shotgun-Lipidomics-Verfahrens sind die verkürzte Messdauer, da die chromatographische Auftrennung entfällt, und die Möglichkeit prinzipiell von allen in der Probe enthaltenen Substanzen ein MS/MS-Spektrum aufzunehmen.

Bei der Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (LC-MS) steht hingegen nur das kurze Zeitfenster der Elution der entsprechenden Substanz zur Verfügung. Dafür können mit LC-MS die Vertreter der Lipidklassen voneinander und von potenziell störender Matrix abgetrennt werden. In der Quelle konkurrieren die Substanzen um die Ionisierung und können sich gegenseitig supprimieren oder auch die Ionisierung anderer Substanzen verbessern, man spricht in diesen Fällen von negativen bzw. positiven Matrixeffekten [15, 159]. Deshalb ist es durch eine chromatographische Abtrennung störender Matrixbestandteile häufig möglich, die Signalintensität niedrig konzentrierter Analyten zu verbessern [15]. Außerdem können durch die chromatographische Auftrennung auch Isomere und Isobare voneinander getrennt werden (Vergleich Kapitel 1.2.2), sodass ein differenzierteres Bild der enthaltenen Lipide entsteht und eine exakte Identifizierung erfolgen kann [108]. Welche Isomere voneinander getrennt werden, ist von der Wahl der chromatographischen Säule abhängig. So können mit Umkehrphasenchromatographie meist Isomere mit unterschiedlichen Kopfgruppen und je nach Trennschärfe auch Isomere mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung getrennt werden. Mit NPLC- und HILIC-Methoden werden hingegen nur Isomere mit unterschiedlichen Kopfgruppen getrennt analysiert. Bei der zweidimensionalen Chromatographie (2D-LC) werden NPLC oder HILIC mit RPLC gekoppelt, sodass neben den polaren (Kopf-) Gruppen auch die Kettenlängen der Acylreste für die Auftrennung verwendet werden können. Ein großer Nachteil der 2D-LC ist die komplizierte Kopplung der Chromatographie, da die mobilen Phasen nicht miteinander kompatibel sind, sodass die Kopplung häufig *off-line* durch Fraktionierung durchgeführt wird [160]. Zudem sind die Laufzeiten sehr lang. Nie und Kollegen haben eine Methode mit *on-line* Kopplung entwickelt, die Laufzeit pro Polarität beträgt dennoch 120 min [161]. Mit einer geeigneten Kopplung sind auch kürzere Laufzeiten möglich, dabei sinkt meist die chromatographische Auflösung in der ersten Trenndimension [162]. Auch bei

der reinen NPLC oder RPLC, können sich die Laufzeiten sehr stark unterscheiden. Die Laufzeit der LC-Methode ergibt sich dabei aus den instrumentellen Voraussetzungen (HPLC oder UHPLC), den Anforderungen an die Trennung der Analyten, z.B. der zeitaufwendigeren Trennung von Isomeren, und der benötigten chromatographischen Peakbreite in Abhängigkeit von der Zykluszeit des MS. Die Laufzeiten reichen von 15 bis 90 Minuten [163-167]. Eine Alternative zur LC stellt die überkritische Flüssigkeitschromatographie (engl. supercritical fluid chromatography, SFC) dar. Bei dieser wird die mobile Phase, häufig Kohlenstoffdioxid, oberhalb des kritischen Drucks und der kritischen Temperatur verwendet, sodass die Stoffeigenschaften zwischen denen von gasförmigen und flüssigen Stoffen liegen [132]. Die SFC kann mit (U)-HPLC-Säulen durchgeführt werden und Lipide sowohl nach Kopfgruppe als auch nach Acylresten aufgetrennt werden. Der Vorteil der SFC liegt in den sehr kurzen Laufzeiten von teilweise nur 6 Minuten pro Polarität und der verbesserten Retention von unpolaren Lipiden [168]. Durch technische Schwierigkeiten, wie z.B. dem Ausfallen von Analyten nach der Dekompression des Kohlenstoffdioxids vor der Quelle, ist die Methodenentwicklung der SFC kompliziert [169, 170].

Für diese Arbeit wurde die Massenspektrometrie mit Umkehrphasenchromatographie kombiniert, um eine robuste Trennung von Isomeren und Isobaren bei reduzierter Ionensuppression zu erreichen.

## 1.5 Auswertung der Daten

Die heikelste Frage und wohl zeitintensivster Schritt bei Screening-Methoden mit hochauflösender Massenspektrometrie ist die Auswertung der Ergebnisse. Diese kann quantitativ, semi-quantitativ oder qualitativ erfolgen. Die Identifizierung bzw. die Detektierbarkeit einer Substanz in einer Probe ist eine qualitative Aussage. In biologischen Systemen werden ähnliche qualitative Lipid-Profile erwartet, deswegen werden für den Vergleich verschiedener Krankheitsbilder Unterschiede in den Lipid-Konzentrationen analysiert. Für eine absolute Quantifizierung werden Referenzsubstanzen benötigt, sodass die Konzentration in den Proben anhand einer Kalibriergeraden berechnen werden kann. Bei der semi-quantitativen Auswertung bzw. der relativen Quantifizierung werden die Ergebnisse, z.B. die chromatographischen Peakflächen, in Relation zu Kontrollproben oder internen Standards (IS) gesetzt. Durch eine relative Quantifizierung können Konzentrationen verglichen werden, jedoch kann die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Messzeitpunkten und Probenarten ohne absolutes Bezugssystem eingeschränkt sein. Bei der Datenauswertung wird weiter zwischen targeted, semi-targeted und untargeted bzw. non-targeted Methoden unterschieden. Bei targeted Methoden wird gezielt die Konzentration von einem oder mehreren vorher festgelegten Analyten untersucht. Semi-targeted und untargeted Methoden behandeln hingegen eine Vielzahl von Analyten durch den Scan eines breiten Massenbereiches, die Ergebnisse können qualitativ oder semi-quantitativ analysiert werden. Semi-targeted und untargeted Methoden unterscheiden sich in

der Auswertung, nicht in der Messung. Bei der semi-targeted Auswertung werden innerhalb des gescannten Massenbereiches gezielt Massen von bereits identifizierten Molekülen ausgewählt und deren relative Konzentration zwischen den Proben verglichen. Hingegen werden bei der untargeted Auswertung mit den unter Kapitel 1.5.5 und 1.5.6 dargestellten statistischen Verfahren erst biologisch veränderte Signale ausgewählt und diese im Anschluss identifiziert. Alternativ können zunächst möglichst viele Signale identifiziert und diese dann weiter ausgewertet werden. Aufgrund der Vielzahl an Isomeren und begrenzten MS/MS-Spektren in den Datenbanken, besteht eine hohe Gefahr von Fehlidentifikationen. Die Ergebnisse müssen deshalb auf Sinnhaftigkeit geprüft werden.

Die Entscheidung, ob eine targeted oder semi- bzw. untargeted Methode verwendet werden soll, muss bereits vor der Messung getroffen werden. Dabei ist die zu Grunde liegende biologische Fragestellung ausschlaggebend. Während man mit einer targeted Methode selektivere und häufig auch sensitivere Resultate erzielen kann, bieten Screening-Methoden mit einer semi- oder untargeted Auswertung ein umfassenderes Bild über das Lipidprofil. Daher können Screening Methoden auch häufig ergänzend zu targeted Methoden verwendet werden, um neben den interessanten Analyten auch potenzielle Vorstufen im Syntheseweg und den metabolischen Zustand abzubilden.

### 1.5.1 Semi-targeted Auswertung

Bei der semi-targeted Auswertung werden bereits bekannte Moleküle untersucht. Dafür wird die Spur der exakten Masse des Analyten mit einer geeigneten Toleranz extrahiert und die Peakfläche im Chromatogramm bei der ausgewählten Retentionszeit berechnet. Die Toleranz für die Masse richtet sich nach der Massengenauigkeit und dem Aufnahmemodus, also ob die Messung im Profil oder zentriert (engl. centroided) erfolgte. Bei zentrierten Daten wird nur das gewichtete Mittel der gemessenen Massen anstatt der gaußförmigen Peaks im Spektrum gespeichert. Dadurch sind die Dateien kleiner und die Peakbreite im Spektrum geht verloren. Folglich muss die Peakbreite bei zentrierten Spektren nicht mehr bei der Wahl der geeigneten Massentoleranz für die Peakintegration im Chromatogramm berücksichtigt werden. Über die von Sciex bereitgestellte Software (Analyst TF, MasterView etc.) kann nur im Profilmodus gemessen und ausgewertet werden. Lediglich die Software MarkerView zentriert die Spektren während der Auswertung [171]. Die Identität des Analyten wird durch Vergleich der gemessenen Masse im Spektrum mit der exakten Masse, durch Überprüfen der Isotopenverteilung sowie Abgleich der MS/MS-Fragmentierungsmuster bestätigt. Die Peakflächen im Chromatogramm können ggf. auf die Peakfläche von den dazugehörigen Standards oder andere Normale bezogen und für weitere Auswertungen wie den Vergleich zwischen Patientengruppen verwendet werden. Die Zahl der so auswertbaren Analyten wird theoretisch nur durch den Massenbereich des Scans limitiert. Aufgrund des zeitlichen Aufwands und der Notwendigkeit von MS/MS-Referenzspektren ist die Zahl der Analyten letztlich doch begrenzt. Der Vorteil der semi-targeted Auswertung liegt darin, dass die Peakintegration manuell überprüft wird



und so bessere Ergebnisse mit einer relativen Quantifizierung erzielt werden können. Außerdem können so auch Analyten, die in den untersuchten Proben-Gruppen nicht oder nur wenig verändert sind, mit in die biologische Auswertung einbezogen werden. Zudem steigt die statistische Power v.a. bei univariaten Tests, wenn weniger Variablen bzw. Analyten ausgewertet werden, sodass es sinnvoll sein kann, nur eine begrenzte Anzahl, ausreichend identifizierter und exakt integrierter, Analyten auszuwerten. Dabei ist eine semi-targeted Auswertung jederzeit, auch im Anschluss an eine untargeted Auswertung, möglich.

### 1.5.2 Untargeted Datenprozessierung

Bei der untargeted Datenprozessierung wird der komplette Datensatz unvoreingenommen analysiert. Die Rohdaten von hochauflösenden LC-MS-Messungen enthalten die folgenden drei Dimensionen: das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, die Retentionszeit und die Intensität. Um den kompletten Datensatz einfacher analysieren zu können, wird der  $m/z$ -Bereich zu kleineren Fenstern gleicher Größe zusammengefasst (engl. binning). Die Breite der Fenster sollte auf die Massengenauigkeit der auszuwertenden Daten abgestimmt werden, da bei zu schmalen Fenstern einzelne Analyten in zwei Signale unterteilt und bei zu großen Fenstern mehrere Signale zusammen gefasst werden könnten [172]. Diese Massenspuren werden dann nach lokalen Maxima, den Peaks, untersucht. Alternativ können die Daten mittels „*Region of interest*“ untersucht werden [173]. Hierbei werden die Daten komprimiert, indem mehrere benachbarte Punkte, deren Intensität in dem Massenbereich die Signal-Rausch Grenze überschreiten, zu den Peaks zusammengefasst werden. Im Gegensatz zum „*binning*“ geht hierbei die Information zu der Auflösung im MS-Spektrum nicht verloren, da die  $m/z$ -Werte aller Datenpunkte in dem Bereich gemittelt werden, wie beispielsweise bei dem *centWave*-Algorithmus der XCMS Software [174].

Nachdem für alle Proben jeweils eine Liste mit  $m/z$  zu RT-Werten und der jeweiligen Intensität erstellt wurde, werden diese Listen nun miteinander abgeglichen und mit einer vorher festgelegten  $m/z$ - und RT-Toleranz zusammengefasst (engl. alignment). Um Signale trotz chromatographischer Schwankungen korrekt zusammenzufassen, können ggf. vorher die RT korrigiert werden. Aus den Daten aller Proben wird so eine Peakliste mit  $m/z$ - und RT-Werten der detektierten Signale, den sogenannten „*aligned features*“, sowie der Intensität in den einzelnen Proben erstellt. Diese Peaklisten enthalten bei einem Lipid-Screening mehrere Tausend Signale pro Messmodus. Sie sind nicht mit Analyten gleich zu setzen, da Analyten auch mehrere Einträge in der Peakliste haben können, z.B. durch Isotope und verschiedene Addukte. Zudem werden einige Signale identifiziert, die ein zu kleines Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen und folglich nicht ausgewertet werden sollten. Wenn möglich, sollten Isotope und aus dem LC-System stammende sowie mit einer höheren Messunsicherheit behaftete Signale aus der Peakliste entfernt werden. Zur Bestimmung der Messunsicherheit werden i.d.R. gepoolte Qualitätskontrollproben über den Messlauf verteilt gemessen [15, 120]. Die übrig gebliebenen Signale können dann direkt oder nach einer Reduktion

auf potenziell interessante Signale identifiziert werden. Für die Identifizierung können die Masse, die Summenformel und die sich daraus ergebende Isotopenverteilung und ggf. auch MS/MS-Spektren mit Datenbanken abgeglichen werden [175-178].

### 1.5.3 Normalisierung, Skalierung und Transformation

Vor der statistischen Auswertung der Daten müssen diese vorbereitet werden, dabei können sie normalisiert, skaliert und transformiert werden. Die Normalisierung der Daten dient dazu, die ungewollte Varianz wie die Messabweichung oder kleinere Unterschiede bei der Probenvorbereitung auszugleichen, ohne dabei die biologische Varianz, also die natürlich in der Population vorkommenden, sowie die zu untersuchenden Unterschiede zu beeinflussen. Dabei kann die Normalisierung sowohl proben- als auch analytspezifisch erfolgen. Außerdem kann die Normalisierung auf den gemessenen Signalen der Analyten beruhen, wie z.B. dem Totalionenstrom, oder extern zugegebenen Substanzen wie isotope markierten Standards sowie separaten Verfahren, z.B. zur Bestimmung des Kreatinin- oder Proteingehaltes [179]. Letztere Verfahren werden v.a. eingesetzt, wenn bereits Konzentrationsunterschiede durch das Volumen bzw. die Masse der Proben erwartet werden, da diese nicht einheitlich vorgelegt werden können, z.B. bei Urin oder Gewebeproben. Solche Unterschiede können teilweise auch durch probenabhängige Normalisierungsverfahren wie den Totalionenstrom, aber nicht durch die Zugabe von Surrogaten während oder nach der Extraktion ausgeglichen werden. Neben den Abweichungen innerhalb einer Messung (Drifteffekte), kann die Normalisierung auch zum Ausgleich von Unterschieden zwischen verschiedenen Messungen z.B. durch Empfindlichkeitsverluste des Massenspektrometers, sogenannte Batch-Effekte, verwendet werden [180]. Eine Übersicht über verschiedene Verfahren zur Normalisierung sowie deren Vor- und Nachteile ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Methoden zur Normalisierung von LC-MS-Daten.

IS = interner Standard, QC = Qualitätskontrollprobe. Modifiziert und erweitert nach [181].

Methoden	Beschreibung	Vorteile	Nachteile
<b>Probenweise Normalisierung (ein Normalisierungsfaktor pro Probe)</b>			
<b>Total- ionenstrom</b>	Vergleich der Gesamtintensität der Probe mit einer Referenzprobe	Unterschiedliche Probenvolumina/-konzentrationen können ausgeglichen werden, universell anwendbar	Unterschiede zwischen den Analyten werden nicht betrachtet; empfindlich für Veränderungen großer Signale
<b>Median Peak/ Intensitäts- Korrektur</b>	Vergleich mehrerer Signale mit den Signalen in der Referenzprobe und anschließende Berechnung des Medians	Unterschiedliche Probenvolumina können ausgeglichen werden; robuster gegen Veränderungen großer Signale; universell anwendbar	Analytspezifische Unterschiede werden unzureichend ausgeglichen
<b>Summe der Surrogate/IS</b>	Vergleich mit der Summe der Surrogat-Signale	Unabhängig von abundanteren Signalen, verschiedene Substanzklassen möglich	Unterschiede zwischen den Analyten werden nicht betrachtet
<b>Analytweise Normalisierung (ein Faktor pro Analyt &amp; Probe)</b>			
<b>LOESS [180]</b>	engl. locally weighted scatter plot smoothing, Korrektur der Signale anhand benachbarter QC-Proben mittels nicht-linearer Regression	Analytspezifisch; Ausgleich von Drift- und Batcheffekten	Kompliziertere Durchführung; Messunsicherheit der QCs kann auf die Proben übertragen werden; kein Ausgleich von Extraktionsunterschieden
<b>Surrogate/IS</b>	Das Signal des Analyten wird relativ zu dem Signal eines Surrogats bzw. IS betrachtet	Bei einem äquivalenten isotoptenmarkierten Standard wird der bestmögliche Ausgleich von Extraktions- und Ionisierungsunterschieden erreicht	Meist kein äquivalenter IS vorhanden; bei untargeted Auswertungen schwierige Zuordnung

Bei der gleichzeitigen Auswertung mehrerer Analyten (multivariate Auswertung) ist meist eine Skalierung notwendig, da biologische Daten sehr heterogen sind und starke Konzentrationsunterschiede aufweisen, sodass abundantere Analyten die Auswertung dominieren würden. Durch die Skalierung werden die gemessenen Peakflächen auf einen analytspezifischen Faktor, z.B. die Standardabweichung (engl. standard deviation, SD) bezogen und damit die Konzentrationsunterschiede mehr oder weniger ausgeglichen. Im Lipidomics-Bereich werden dabei meist die Auto- oder Paretoskalierung bevorzugt (Tabelle 4) [171, 172]. Weiterhin setzen viele statistische Verfahren eine Normalverteilung der Daten sowie gleiche Varianzen voraus. Dies ist häufig nicht der Fall, sodass ggf. eine Transformation, also eine nichtlineare Konversion, angewandt

## Einleitung

---

werden muss (Tabelle 5). Die Verfahren zur Transformation ändern die Verteilung der Daten in unterschiedlichem Ausmaß und Richtung [182]. Deshalb ist für jeden Analyten zu entscheiden, mit welchem Verfahren die gewünschte Verteilung erreicht wird. Bei einer leicht rechtsschiefen Verteilung der Daten kann die Quadratwurzel-Transformation und bei stärker rechtsschiefen Daten die Log-Transformation angewandt werden [182]. Diese Transformationen reduzieren die Differenzen zwischen großen und kleinen Werten, ohne sie ganz aufzuheben, deswegen spricht man auch von einer Pseudo-Skalierung [181]. Ebenso kann auch eine Skalierung die Varianzen angleichen, da die Standardabweichung in Bezug zu dem Skalierungsfaktor gesetzt wird [181]. Zusammenfassend gleicht die Normalisierung Unterschiede zwischen den Proben aus, während die Skalierung und Transformation Unterschiede zwischen den Analyten ausgleichen [172].

Tabelle 4: Methoden zur Skalierung von LC-MS-Daten.  
SD = Standardabweichung. Modifiziert und erweitert nach [181].

<b>Methode</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>Autoskalierung (= Unit Variance Skalierung) [183]</b>	SD als Skalierungsfaktor; vergleicht Analyten basierend auf den Korrelationen anstatt der Kovarianz (da die SD anschließend Eins ist)	Gleichbehandlung von verschiedenen konzentrierten Analyten	Messfehler und Rauschen wird verstärkt; schwerer auswertbare Loadings-Plots bei PCA etc.
<b>Range Skalierung [184]</b>	Vergleicht Analyten basierend auf dem biologischen Bereich, also den kleinsten und größten Wert für diesen Analyten und setzt diese auf null bzw. eins	Gleichbehandlung von verschiedenen konzentrierten Analyten. Skalierung ist an den biologischen Bereich angepasst	Messfehler und Rauschen wird verstärkt; empfindlich für Ausreißer
<b>Pareto Skalierung [185]</b>	Wurzel der SD als Skalierungsfaktor; Größere rel. Änderungen werden stärker reduziert als kleinere, dadurch dominieren abundantere Analyten nicht mehr so stark; die Datenstruktur bleibt teilweise intakt	Näher an den ursprünglichen Daten als Autoskalierung, Rauschen wird weniger verstärkt	Bei sehr starken Konzentrationsunterscheiden dominieren immer noch die abundanteren Analyten sowie größere rel. Änderungen

Tabelle 5: Methoden zur Transformation von LC-MS-Daten.  
SD = Standardabweichung. Modifiziert und erweitert nach [181].

Methoden	Beschreibung	Vorteile	Nachteile
<b>Log-Transformation</b>	Nicht-lineare Konversion mittels Logarithmus	Reduziert Heteroskedastizität; Pseudo-Skalierung; macht multiplikative Modelle additiv	Bei kleinen Werten wird die SD stark vergrößert; Werte kleiner gleich Null sind problematisch
<b>Quadratwurzel-Transformation</b>	Nicht-lineare Konversion mittels Quadratwurzel	Reduziert Heteroskedastizität, Pseudo-Skalierung, keine Probleme mit kleinen Werten	Multiplikative Effekte werden nicht additiv
<b>Generalisierte Log-Transformation (glog) [186]</b>	Variation der log-Transformation, bei der die SD kontrolliert wird	Auch für Datensätze mit Werten zwischen Null und Eins geeignet; keine Inflation der SD bei kleinen Werten	Aufwendige Berechnung

#### 1.5.4 Umgang mit fehlenden Werten

Ein weiteres Problem bei der Auswertung von LC-MS-Daten sind fehlende Werte. Diese schränken die Anwendbarkeit statistischer Verfahren ein und können die Beurteilung biologischer Unterschiede beeinflussen. Unterschiedliche Ursachen können zum Fehlen von Messwerten führen. So können Fehler bei der Messung, z.B. durch ein Störsignal oder Luft im System, dazu führen, dass vereinzelt Messwerte ausbleiben. Daher empfiehlt es sich die Proben zu randomisieren, um systematischen Fehlern vorzubeugen. Viel häufiger fehlen jedoch Werte, aufgrund von Konzentrationen, die außerhalb des Messbereiches liegen. Bei quantitativen Methoden können die Werte außerhalb des Kalibrierbereiches, also unterhalb des kleinsten Standards (engl. lower limit of quantification, LLOQ) oder oberhalb des höchsten Standards (engl. upper limit of quantification, ULOQ) liegen, sodass eine höhere Messunsicherheit (z.B. Variationskoeffizient  $> 15$  bzw. 20%) bei diesen Werten angenommen wird [187]. Es ist relativ sicher, dass die fehlenden Werte kleiner bzw. größer sind als die vorhandenen Werte. Man spricht bei Werten kleiner LLOQ auch von linkszensierten und bei Werten größer ULOQ auch von rechtszensierten Daten. Bei untargeted Auswertungen gibt es in der Regel keine Kalibriergerade, deswegen resultieren fehlende Werte meist aus technischen Gründen, wie z.B. der Mindestkonzentration für auswertbare Signale (Detektionslimit, engl. limit of detection, LOD). Die obere Grenze wird meist durch das Detektorlimit bestimmt, ab dem nicht mehr alle ankommenden Ionen erfasst werden. Das Detektorlimit sollte nach Möglichkeit nicht überschritten werden, da eine starke Ionenlast das Gerät schnell verschmutzt und der Zusammenhang zwischen Signalintensität und Konzentration nicht mehr linear ist. Ein weiteres Problem ist das Vorkommen von Analytsignalen in extrahierten Leerproben, sogenannte Blanksignale. Diese können aus den Lösungsmitteln der Extraktion und den mobilen Phasen stammen oder durch Kontamination

entstehen. In diesem Fall können nur Signale ausgewertet werden, die sich deutlich von den Blanksignalen absetzen, z.B. doppelt so große Signale. Durch Subtraktion der Blanksignale fehlen weitere Werte. Wenn es in einem Messlauf keine Auffälligkeiten gegeben hat und man demnach zufällig fehlende Werte ausschließen kann, sind untargeted Daten meist linkszensiert, wobei die fehlenden Werte zwischen Null und dem kleinsten noch detektierten Wert liegen [188].

Für den Umgang mit diesen fehlenden Werten gibt es mehrere Möglichkeiten. Durch die Vielzahl an auswertbaren Analyten, könnten Analyten mit fehlenden Werten von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden. Dies macht v.a. Sinn, wenn zu viele Werte, z.B. mehr als 20%, für diesen Analyten fehlen und somit die Aussagekraft für die Gesamtpopulation gering ist. Wenn alle Analyten mit fehlenden Werten kategorisch ausgeschlossen werden, könnten Effekte bei diesen Analyten unentdeckt bleiben, deswegen kann es sinnvoll sein, die fehlenden Werte zu ersetzen. Wenn ausschließlich die vorhandenen Werte für die entsprechenden Analyten betrachtet werden, führt das zu einem systematischen Fehler [188, 189]. Deswegen werden fehlende Werte häufig durch kleine Werte, z.B. die Hälfte des LLOQ ersetzt, sodass der systematische Fehler reduziert bis hin zu überkompensiert wird [189]. Ein weiterer Nachteil des Ersetzens mit konstanten Werten wie LLOQ/2 ist ihr Einfluss bei der Berechnung von Varianz und Kovarianz, was wiederum darauf beruhende Auswertungen beeinträchtigen kann [190]. Das Ersetzen der Werte mittels statistischen Schätzverfahren, wie der Maximum-Likelihood- oder Bayesian-Methode, kann bessere Ergebnisse liefern, ist aber deutlich aufwendiger, sodass sie im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt wurden [190, 191]. Es ist zudem zu beachten, dass einige Verfahren zum Ersetzen von fehlenden Werten davon ausgehen, dass die fehlenden Werte innerhalb der Verteilung der vorhandenen Werte liegen. Dabei werden fehlende Werte durch Lageparameter wie den Median oder unter Annahme einer Normalverteilung der Daten ersetzt. Sofern möglich kann die Verwendung von den gemessenen Werten kleiner LLOQ und größerer LOD trotz der erhöhten Messunsicherheit bessere Ergebnisse als eine statistische Imputation liefern [190].

### 1.5.5 Univariate Auswertung

Die statistische Auswertung der LC-MS-Daten kann uni- oder multivariat erfolgen. Bei der univariaten Auswertung werden alle Variablen bzw. Analyten unabhängig voneinander betrachtet. Mögliche Interaktionen wie Korrelationen zwischen Analyten von dem gleichen Stoffwechselweg und Kovariablen wie Geschlecht, Ernährung und der Körpermasseindex werden zunächst nicht betrachtet [192]. Je mehr Analyten auf diese Art analysiert werden sollen, desto mehr Tests müssen durchgeführt werden. Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit für zufällig positive Testergebnisse zu und die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen steigt (Nullhypothese verworfen, obwohl sie richtig ist) [193]. Durch Korrekturverfahren für multiples Testen, z.B. Bonferroni-Methode, kann die Wahrscheinlichkeit von falsch positiven Ergebnissen gesenkt werden. In Abhängigkeit des gewählten Verfahren steigt dabei die Wahrscheinlichkeit von falsch negativen Ergebnissen

(Nullhypothese angenommen, obwohl sie falsch ist) [194]. Vorteile der univariaten Auswertung sind die einfache Interpretierbarkeit der Ergebnisse, und dass keine Skalierung der Daten vorgenommen werden muss, da durch die einzelne Betrachtung niedrig konzentrierte Analyten gleichbehandelt werden [192]. Für die Wahl eines geeigneten statistischen Tests muss zunächst die Datenstruktur überprüft werden. Die Anzahl der Gruppen, in die die Proben unterteilt werden können, sowie die Abhängigkeit der Proben untereinander lassen sich aus dem Aufbau des Versuches bzw. der Studie ableiten. Die Gruppen (Stichproben) können dabei z.B. verschiedene Krankheiten oder gesunde Probanden sein. Eine Abhängigkeit der Proben besteht immer dann, wenn mehrere Stichproben von dem gleichen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten oder vor und nach einer Behandlung genommen werden. Werden hingegen gesunde Probanden und Patienten miteinander verglichen, so besteht keine Abhängigkeit. Des Weiteren setzen viele Test, wie z.B. der  $t$ -Test, eine Normalverteilung der Werte innerhalb der Gruppen voraus. Testverfahren, die eine bestimmte Verteilung der Daten voraussetzen, bezeichnet man als parametrische Tests. Die Einhaltung der Normalverteilung kann mit Hilfe des Shapiro-Wilk oder des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft werden. Außerdem muss im Falle von unabhängigen Stichproben auch die Varianzgleichheit (Homoskedastizität) gewährleistet sein, diese kann mit Hilfe des Levene- oder Bartlett-Test überprüft werden. Wenn ein parametrisches Verfahren angewandt und die Annahmen des Testverfahrens verletzt werden, sinkt die statistische Aussagekraft. In diesem Fall kann das Testergebnis irreführend sein und die Wahrscheinlichkeit für falsch positive und falsch negative Ergebnisse steigt [195]. Dabei wird die statistische Aussagekraft von der Robustheit des Tests, der Anzahl Stichproben und dem Ausmaß der Abweichung von den Annahmen des Testverfahrens bestimmt [196]. Wenn die Voraussetzungen für die einfachen statistischen Tests nicht erfüllt werden, können nicht-parametrische Tests, wie der Wilcoxon-Test, verwendet werden, die keine feste Verteilung der Daten benötigen. Der Nachteil der nicht-parametrischen Tests ist die geringere Power, sodass unter Einhaltung der Voraussetzungen immer parametrische Tests bevorzugt werden sollten, um die größtmögliche statistische Aussagekraft zu erhalten [197]. Alternativ zu den nicht-parametrischen Tests können auch die Daten so verändert (transformiert) werden, dass sie anschließend normalverteilt sind [182]. Gängige Transformationen sind die Log- und Quadratwurzel-Transformation (siehe auch Absatz 1.5.3). Abbildung 14 zeigt eine Übersicht über einige statistische Verfahren und ihre Voraussetzungen. Diese werden nachfolgend kurz vorgestellt.

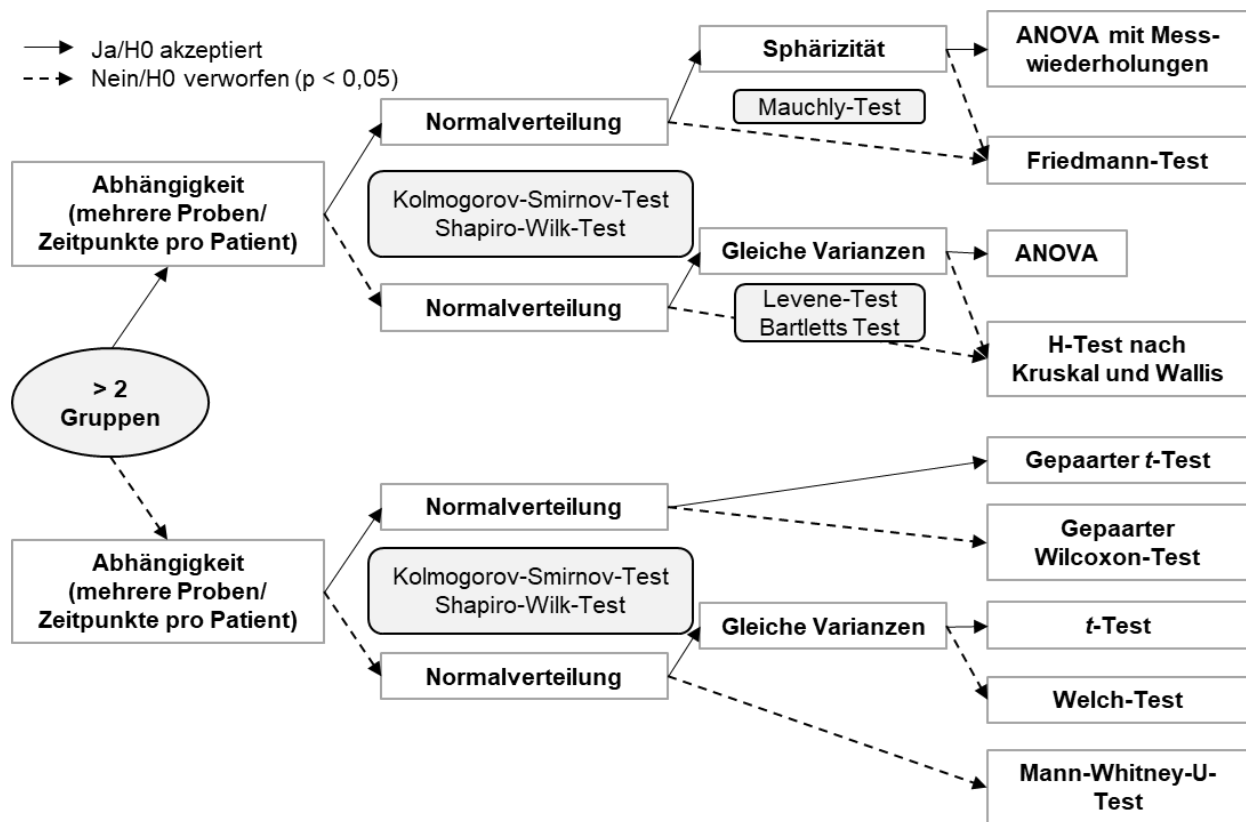


Abbildung 14: Übersicht univariate Auswertung.  
 Weitere Erläuterungen sind im Text. Modifiziert nach [198].

### 1.5.5.1 t-Test bei unabhängigen Stichproben

Der *t*-Test, auch Students *t*-Test oder Einstichproben-*t*-Test, überprüft, ob die Mittelwerte zweier Gruppen übereinstimmen, dabei setzt er eine Normalverteilung der untersuchten Variable in beiden Gruppen sowie ähnliche Varianzen beider Gruppen voraus [199]. Die Nullhypothese lautet in diesem Fall, dass die Mittelwerte der Gruppen übereinstimmen, d.h. bei einem signifikanten Ergebnis mit  $\alpha < 0,05$  ist von unterschiedlichen Mittelwerten der Gruppen auszugehen.

### 1.5.5.2 t-Test bei abhängigen Stichproben

Der gepaarte *t*-Test, oder auch Zweistichproben-*t*-Test, vergleicht die Mittelwerte von abhängigen Stichproben, z.B. ein Wert für die Patienten vor und nach der Behandlung. Die zu vergleichenden Gruppen und die Anzahl der erhobenen Messwerte müssen daher gleich groß sein und fehlende Werte sind in diesem Fall besonders kritisch (siehe auch Absatz 1.5.4). Zudem müssen die Differenzen zwischen den Paaren normalverteilt sein.

### 1.5.5.3 Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Test

Diese beiden Verfahren können verwendet werden, um die Übereinstimmung mit der Normalverteilung zu überprüfen. Bei beiden Tests ist die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, d.h. bei  $\alpha > 0,05$  wird eine Normalverteilung angenommen. Der Kolmogorov-Smirnov-Test ist mathematisch besser abgesichert, aber vor allem bei kleineren Stichproben ist die Power des Shapiro-Wilk-Tests größer, deswegen sollte dieser bevorzugt eingesetzt werden [200,



201]. Je größer die Stichproben werden, desto empfindlicher werden die beiden Tests für Ausreißer. Bei Datensätzen mit 1000 Fällen und mehr könnten deshalb die Annahme der Normalverteilung abgelehnt werden, obwohl sie bis auf wenige Ausreißer eingehalten wird. Eine graphische Betrachtung der Verteilungen, z.B. mittels eines Histogramms oder Q-Q-Graphen, ist deshalb vorzuziehen. Mit zunehmender Anzahl Analyten werden graphische Verfahren sehr zeitaufwendig, sodass bei non-targeted Auswertungen mit mehr als 1000 Signalen häufig trotzdem analytische Tests wie der Shapiro-Wilk-Test bevorzugt werden [200].

#### 1.5.5.4 Levene- oder Bartletts-Test

Die Tests von Levene und Bartlett können zum Vergleich der Varianzen einer oder mehrerer Gruppen verwendet werden [202]. Dabei geht man bei  $\alpha > 0,05$  davon aus, dass die Varianzen homogen bzw. vergleichbar sind (homoskedastisch). Dabei ist der Levene-Test robuster gegen Abweichungen von der Normalverteilung, bei unbekannter Verteilung sollte er deswegen bevorzugt werden. Bei bekannter Normalverteilung hat der Bartlett-Test hingegen eine größere Power [202].

#### 1.5.5.5 Welch-Test

Der Welch-Test ist eine Adaption des  $t$ -Tests, der die Gleichheit der Mittelwerte zweier Populationen überprüft. Im Gegensatz zum  $t$ -Test ist er robuster gegenüber ungleichen Varianzen und ungleichen Gruppengrößen [201].

#### 1.5.5.6 Mann-Whitney-U- bzw. Wilcoxon-Test

Der Mann-Whitney-U-Test, auch Wilcoxon-Rangsummen-Test bzw. Wilcoxon-Test genannt, überprüft das Übereinstimmen der zentralen Tendenzen von zwei Stichproben bzw. Gruppen [203]. Da er keine Normalverteilung, sondern lediglich eine Ordinalskalierung voraussetzt, ist er das nicht-parametrische Äquivalent zum  $t$ -Test. Der Wilcoxon-Test kann ungepaart oder gepaart durchgeführt werden, je nachdem, ob die Stichproben unabhängig oder abhängig voneinander sind. Bei  $\alpha > 0,05$  kann davon ausgegangen werden, dass sich die Stichproben unterscheiden.

#### 1.5.5.7 ANOVA

Die einfaktorielle Varianzanalyse (engl. analysis of variance, ANOVA) überprüft die Gleichheit der Varianz mehrerer unabhängiger Gruppen [204]. Es wird angenommen, dass die Gruppen unterschiedlich sind ( $\alpha < 0,05$ ), wenn die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Eine ANOVA mit nur zwei Gruppen entspricht einem  $t$ -Test. Sie unterliegt auch den gleichen Bedingungen (Normalverteilung der Gruppen und Varianzhomogenität). Das Ergebnis einer ANOVA sagt aus, ob es einen Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen gibt. Um näher zu spezifizieren, welche Gruppen sich unterscheiden, muss eine Post-hoc-Analyse z.B. nach Tukey durchgeführt werden. Alternativ können paarweise  $t$ -Tests verwendet werden, dabei ist zu beachten, dass das Signifikanzniveau für multiples Testen korrigiert werden muss.

### 1.5.5.8 Kruskal-Wallis-Test (H-Test)

Wenn bei unabhängigen Gruppen die Voraussetzungen für die ANOVA nicht erfüllt werden, kann der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der zentralen Tendenzen der Gruppen verwendet werden. Dabei handelt es sich um ein nicht-parametrisches Verfahren.

### 1.5.5.9 ANOVA mit Messwiederholungen

Bei mehreren voneinander abhängigen Gruppen bzw. Zeitpunkten kann eine ANOVA mit Messwiederholungen durchgeführt werden, um zu prüfen, ob sich die Mittelwerte unterscheiden. Dabei wird vorausgesetzt, dass die zu untersuchende Variable intervallskaliert und innerhalb jeder Gruppe normalverteilt ist. Eine weitere Voraussetzung ist die Sphärizität, d.h. die Varianzen der Differenzen aller Messpaare sind gleich. Die Sphärizität kann mittels des Mauchly-Tests überprüft werden. Ist das Ergebnis des Mauchly-Tests signifikant müssen die Freiheitsgrade bei der ANOVA mit Messwiederholungen reduziert werden, um die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse zu reduzieren. Alternativ kann die multivariate Varianzanalyse (MANOVA) verwendet werden, da diese unabhängig von der Sphärizität ist, aber u.U. auch mit einer verringerten Power einhergeht. Je größer die Abweichung von der Sphärizität und je größer die Stichproben, desto eher kommt eine MANOVA in Frage [205].

### 1.5.5.10 Friedman-Test

Der Friedman-Test, benannt nach Milton Friedman, ist die nicht-parametrische Alternative für die Varianzanalyse mit Messwiederholungen [206]. Er vergleicht analog zu dem Wilcoxon und Kruskal-Wallis-Test die zentralen Tendenzen der Stichproben.

### 1.5.5.11 Bonferroni-Methode

Je mehr statistische Tests man ausführt, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass man zufällig signifikante Ergebnisse erhält. Man spricht in diesem Fall von einer  $\alpha$ -Fehler-Kumulation. Diese kann z.B. durch Verwendung der Bonferroni-Methode, auch Bonferroni-Korrektur genannt, reduziert werden [201]. Bei dieser wird das Signifikanzniveau durch die Anzahl der durchgeführten Tests geteilt, und somit ein deutlich niedrigerer p-Wert für signifikante Ergebnisse benötigt. Alternativ kann der p-Wert mit der Anzahl durchgeführter Tests multipliziert und mit dem ursprünglichen Signifikanzniveau, z.B. 0,05, verglichen werden. Die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse (Fehler 1. Art) ist bei der Bonferroni-Methode sehr gering. Aus der geringen Wahrscheinlichkeit für Fehler 1. Art, resultiert eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Fehler 2. Art, d.h. dass Unterschiede zwischen den Gruppen u.U. übersehen werden [201].

### 1.5.5.12 False discovery rate

Die Falscherkennungsrate (engl. false discovery rate, FDR) nach Benjamini und Hochberg ist ein weiteres Verfahren zur Reduktion des  $\alpha$ -Fehlers beim multiplen Testen [207]. Bei diesem Verfahren wird der Anteil an falsch positiven Ergebnissen kontrolliert. Die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse ist mit dieser Methode größer als mit konservativen Verfahren, wie Bonferroni, dafür ist die Power größer.

## 1.5.6 Multivariate Auswertung

Multivariate statistische Verfahren betrachten mehrere bis alle Variablen gleichzeitig, sie können demnach auch Korrelationen zwischen Analyten aufdecken [208]. Mittels multivariater Verfahren können auch große Datensätzen mit mehr Analyten als Proben ausgewertet und die Unterschiede zwischen den Proben bzw. den Probengruppen sowie die Trennung relevanter Analyten dargestellt werden. Man unterscheidet zwischen überwachten und unüberwachten Verfahren (engl. supervised bzw. unsupervised). Unüberwachte Verfahren berücksichtigen nicht die Gruppenzugehörigkeit der Proben und fassen alle Daten zusammen [192]. Mit unüberwachten Verfahren können Untergruppen, Ausreißer sowie technische Variationen identifiziert werden [209]. Dagegen wird bei überwachten Verfahren die Gruppeneinteilung vorgegeben und der Fokus liegt auf den Unterschieden zwischen diesen Gruppen [192]. Mittels überwachter Verfahren können prädiktive Modelle erstellt werden, die die Einteilung unbekannter Proben in die vorgegebenen Gruppen ermöglichen [192]. Die so erstellten Modelle müssen validiert werden, um ein Over-Fitting zu vermeiden [210].

### 1.5.6.1 Big Data

Unter dem Schlagwort „*Big Data*“ werden Datensätze zusammengefasst, die entweder sehr umfangreich sind (engl. volume), einen vielfältigen Ursprung haben (engl. variety) oder extrem schnell generiert und bearbeitet werden (engl. velocity) [211, 212]. Der Umfang der Daten ist durch viele Beobachtungen, viele Variablen oder einer Kombination aus beidem gekennzeichnet. Die Größe der Datensätze kann im Bereich von Tera- bis Zetabytes liegen, sodass sie mit herkömmlichen Statistikprogrammen oder Datenbanken nicht mehr in angemessener Zeit ausgewertet werden können [211]. Obwohl einzelne Lipidomics-Datensätze noch nicht die Größe bzw. Komplexität von „*Big Data*“ erreichen, so werden in Kombination mit anderen „-omics“ sowie bildgebenden Verfahren zunehmend auch Lösungsansätze, wie maschinelles Lernen, zur Beantwortung medizinischer Fragestellungen in Betracht gezogen [213, 214].

### 1.5.6.2 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (engl. principal component analysis, PCA) ist ein unüberwachtes Verfahren, das die Variablen (Analyten) zu linear nicht korrelierten Variablen, den Hauptkomponenten, zusammenfasst [192]. Die erste Hauptkomponente beschreibt die maximal mögliche Varianz, die nächste Komponente ist unabhängig und orthogonal zur ersten Komponente. Jede weitere Komponente beschreibt einen kleineren Teil der Gesamtvarianz. Zusammen erklären die Komponenten 100% der Varianz. Durch die PCA können korrelierte Analyten zu unabhängigen Hauptkomponenten zusammengefasst und so die Dimensionalität der Daten reduziert und die Unterschiede vereinfacht dargestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Proben werden im Scores-Plot und die Analyten im Loadings-Plot dargestellt, dabei stellt jede Achse eine Hauptkomponente dar (Abbildung 15a).

### 1.5.6.3 Partial least squares regression (PLS)

Die PLS, auch „*projection to latent structures*“ genannt, ist ein überwacht multivariates Verfahren, das eine lineare Regression zwischen den beobachteten Variablen und den davon abhängigen Variablen erstellt [215]. Ähnlich der PCA fasst die PLS die Variablen bzw. Analyten zu einer geringeren Anzahl latenter Variablen zusammen. Die latenten Variablen der PLS maximieren die Kovarianz der Variablen mit den Daten, wohingegen bei der PCA die beschriebene Varianz maximiert wird [192]. Bei kategorischen zu beobachtenden Variablen, z.B. krank und gesund, kann eine Diskriminantenanalyse (PLS-DA) durchgeführt werden. Die latenten Variablen der PLS-DA werden optimiert, um die Gruppen zu trennen. PLS-Modelle sollten validiert werden, dabei sollten die von dem Modell erklärten Werte der Varianz (Anpassungsgüte, engl. goodness of fit,  $R^2$ ) sowie der Vorhersagefähigkeit ( $Q^2$ ) möglichst hoch sein. Die Werte für  $R^2$  und  $Q^2$  liegen zwischen Null und Eins, wobei als Faustregel  $Q^2$  größer als 0,5 sein sollte [216]. Die Genauigkeit eines Modells (engl. accuracy) gibt den Anteil richtig klassifizierter Proben eines Testsatzes an, z.B. durch Crossvalidierung. Bei einem Permutationstest werden mehrere Modelle mit einer zufälligen Gruppeneinteilung erstellt, dabei sollte das untersuchte PLS-Modell nicht Teil der Verteilung der permutierten Modelle sein ( $p < 0,05$ ) [217]. Die für die Trennung der Gruppen relevante Analyten können mittels des VIP-Scores (engl. variable importance in projection) identifiziert werden, der größer Eins sein sollte [216].

### 1.5.6.4 Orthogonale PLS-DA (OPLS-DA)

Die orthogonale PLS fasst die Variation der Daten in zwei Dimensionen zusammen. Eine Dimension beschreibt die Variation, die die Gruppen trennt (Variation zwischen den Gruppen), die andere orthogonal ausgerichtete trägt nicht zur Trennung bei (Variation innerhalb der Gruppen) [218]. Bei der Validierung der OPLS-DA werden  $R^2X$ ,  $R^2Y$  und  $Q^2$  je für die Gruppen trennende Dimension (P) und für die Orthogonale (O) berechnet. Die Werte für P sollten möglichst hoch sein, um eine klare Trennung zwischen den Gruppen ohne Over-Fitting zu erreichen. Bei der Orthogonalen weisen niedrige  $R^2X$ ,  $R^2Y$  und  $Q^2$  Werte, auf eine geringe Varianz innerhalb der Gruppen hin. Die OPLS-DA und PLS-DA ermöglichen eine vergleichbare Unterscheidung der Gruppen, die OPLS-DA ist dabei einfacher zu lesen [219]. Der Loadings-Plot der OPLS-DA wird aufgrund seiner Form auch S-Plot genannt.

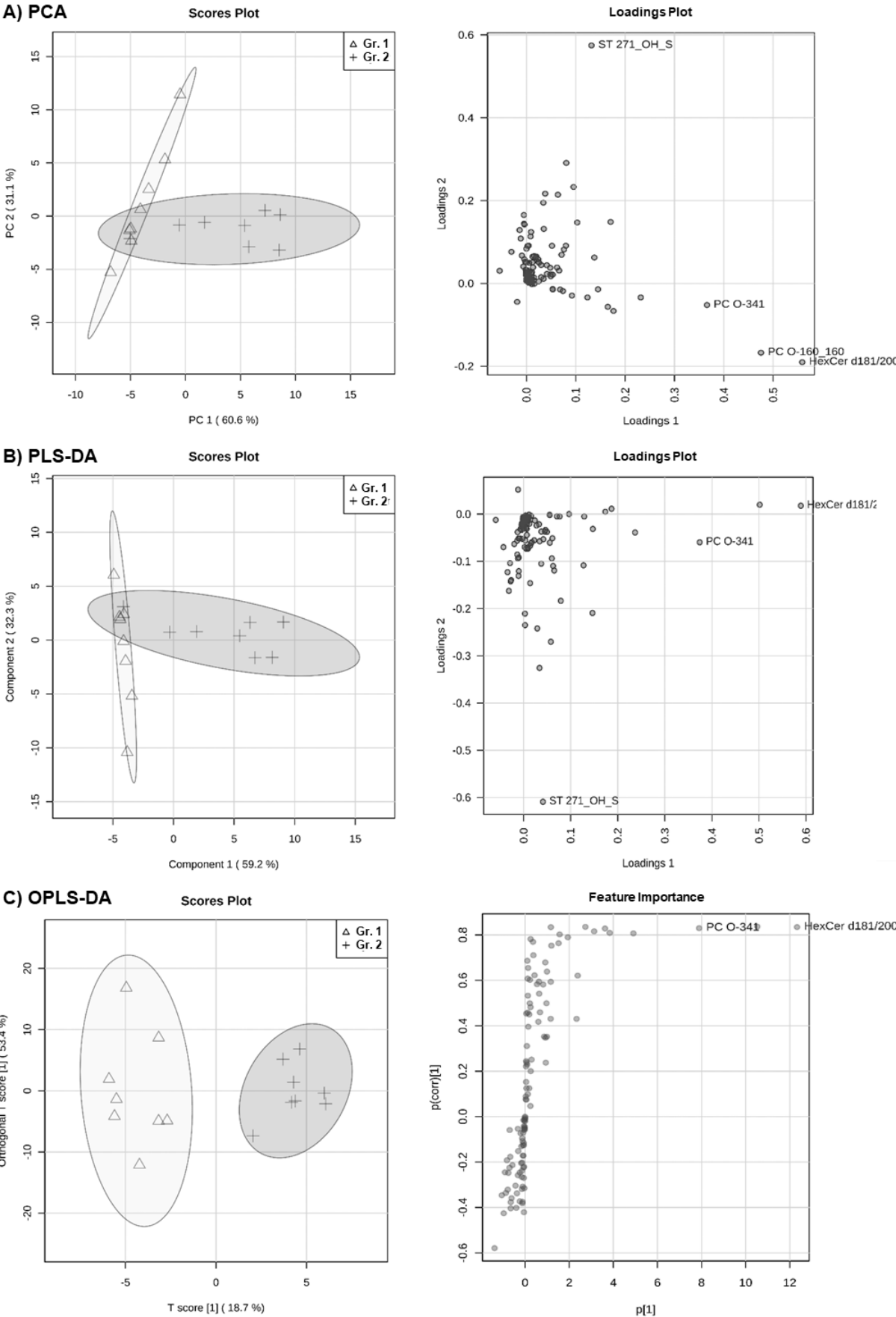


Abbildung 15: Scores- und Loadings-Plots verschiedener multivariater Verfahren. Für alle drei Verfahren wurden die gleichen Daten verwendet. Die Zahlen in Klammern in der Achsenbeschriftung geben die beschriebene Varianz an.

### 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Screening-Methode zur unvoreingenommenen Bestimmung des Lipidprofils in biologischen Matrices. Anhand des Lipidprofils können Unterschiede zwischen Erkrankungen analysiert und potenzielle neue Biomarker identifiziert werden. Dabei ermöglicht ein umfassendes Screening einen Einblick in den komplexen metabolischen Zustand des Körpers und in die von Krankheiten betroffenen Stoffwechselwege. Dadurch können neue Hypothesen in Bezug auf die Krankheitsgenese und -therapie generiert und in Kombination mit gezielten Untersuchungen bestätigt werden. Eine Screening-Methode muss für ein größtmögliches Analytspektrum sehr selektiv und sensitiv sein sowie einen semi-quantitativen Vergleich ermöglichen, damit biologische Unterschiede aufgedeckt werden können.

Konkret galt es, Unterschiede im Lipidprofil im Plasma und Gewebe von Mäusen mit einer akuten Entzündung aufzudecken. Die Stabilität der Lipide von Probenentnahme bis zum Zeitpunkt der Messung ist eine essenzielle Voraussetzung für eine erfolgreiche Lipidanalyse. Aus diesem Grund muss die Stabilität der Proben in jeder Messphase inklusive der Präanalytik durch geeignete Untersuchungen und Maßnahmen sichergestellt werden.

Zur Entwicklung der Screening-Methode stand die Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit einem hochauflösenden QTOFMS zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der komplette Arbeitsablauf der Screening-Methode vereinfacht und schneller werden, von einer geeigneten Probenaufarbeitung, über die chromatographischen und massenspektrometrischen Parameter bis hin zur Auswertung der Ergebnisse (Abbildung 16). Die Auswertung der Ergebnisse ist der heikelste und zeitintensivste Schritt bei der Entwicklung und Anwendung von Screening-Methoden, deswegen sollte der Arbeitsablauf weitestgehend automatisiert werden, um die Auswertung zu erleichtern. Die Auswertung beinhaltet z.B. die Auswahl verwendbarer Signale, die Identifikation von Molekülen und den statistischen Vergleich zwischen den Versuchsgruppen. Des Weiteren sollten die Robustheit und Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode sichergestellt und die Anwendbarkeit auf weitere biologische Matrices wie verschiedene Gewebetypen und Zellkulturproben geprüft werden.

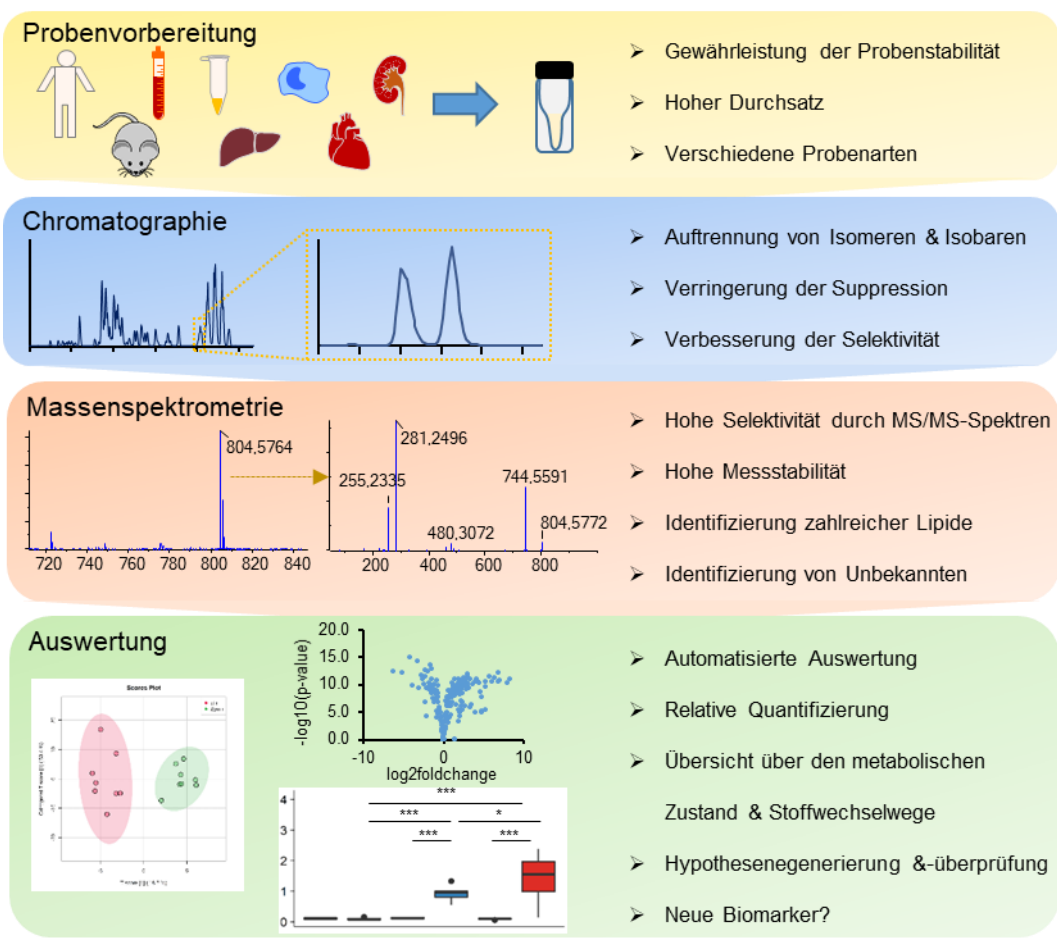


Abbildung 16: Entwicklung einer LC-MS-Screening-Methode zur Bestimmung des Lipidprofils.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung lässt sich in vier Abschnitte unterteilen, die Probenvorbereitung, Chromatographie, Massenspektrometrie und Auswertung. Die Aufarbeitung der Proben dient der Isolierung der gewünschten Analyten, in diesem Fall der Lipide, aus der biologischen Probenmatrix. Anschließend erfolgt eine chromatographische Auftrennung der Analyten, mit dem Ziel isobare Substanzen zu trennen und die konkurrierende Ionisierung zu reduzieren. Dadurch steigen die Selektivität der Methode und die Wahrscheinlichkeit, niedrig konzentrierte Analyten detektieren zu können. Als nächstes erfolgt die Detektion der Analyten mit Hilfe der Massenspektrometrie. Die Quellen- und MS-Parameter müssen angepasst werden, um stabile Signale mit maximaler Empfindlichkeit zu generieren. Zuletzt müssen die so generierten Daten aufgearbeitet und ausgewertet werden. Für die Entwicklung der Methode wurde zunächst mit einer verringerten Anzahl Analyten eine erste Test-Methode entwickelt, um damit Lipide in Plasmaproben zu identifizieren und eine Datenbank zu erstellen (Tabelle 11). Mit Hilfe der Datenbank wurde dann die Methode verfeinert und die Probenvorbereitung entwickelt. Für eine bessere Übersichtlichkeit wird im Nachfolgenden die Methodenentwicklung nicht in der Reihenfolge der tatsächlichen Entwicklung, sondern gemäß der Abfolge bei der Durchführung der Methode dargestellt.

#### 2.1.1 Probenaufarbeitung

Bei der Probenaufarbeitung werden die gewünschten Analyten, in diesem Fall die Lipide, möglichst vollständig und ohne zusätzliche Störsignale aus der Probe extrahiert. Als Testmatrix wurde humanes Plasma verwendet, da diese Matrix leicht zu gewinnen und als flüssige Probe einfach zu handhaben ist.

Es wurden Flüssig-Flüssig- (engl. liquid-liquid-extraction, LLE) und Festphasenextraktion (engl. solid-phase extraction, SPE) sowie Proteinfällung untersucht. Bei letzterer wurden zu 20 µL Plasma 150 µL Methanol gegeben und die Proben anschließend zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Bei der Festphasenextraktion wurden verschiedene Kartuschen und Protokolle getestet, mit dem Ziel die Phospholipide von den restlichen Bestandteilen zu trennen und so die Suppression zu vermindern. Die verwendeten Protokolle sind in Tabelle 6 kurz aufgeführt, die einzelnen Fraktionen nach Beladen, Waschen und Eluieren wurden getrennt gesammelt und zusammen mit flüssig-flüssig-extrahierten Proben auf darin enthaltene Lipide analysiert.



Tabelle 6: Protokolle der Festphasenextraktionen.

Die Fraktionen A–D wurden getrennt gesammelt, wobei nicht immer alle Fraktionen untersucht wurden. Mit Fraktion D sollten die Phospholipide (PC & SM) eluiert werden. ACN = Acetonitril, AS = Ameisensäure, MeOH = Methanol, MTBE = Methyl-*tert*-butylether. \*Adaptiert nach [220]. \*\*40 µL Plasma mit MTBE:MeOH:H<sub>2</sub>O (10:3:2,5; v/v/v) extrahiert (inkl. Reextraktion) und abgedampft. Die Zahlen in den Klammern geben die Menge an Sorbens pro Kartusche an. (n=3).

Schritt	Phree (30 mg)	Strata WCX (100 mg)	Oasis WCX (30 mg)
Trennprinzip	Phospholipid Entfernung	Schwacher Kationenaustausch	Schwacher Kationenaustausch, Umkehrphase
Konditionieren	-	1 mL MeOH	1 mL MeOH
Äquilibrieren	-	1 mL H <sub>2</sub> O	1 mL H <sub>2</sub> O
Beladen (A)	Überstand von 100 µL Plasma + 400 µL MeOH + 1% AS	Überstand von 100 µL Plasma + 400 µL MeOH	Überstand von 20 µL Plasma + 80 µL MeOH + 320 µL H <sub>2</sub> O
Waschen 1 (B)	-	300 µL H <sub>2</sub> O	300 µL H <sub>2</sub> O
Waschen 2 (C)	-	300 µL MeOH	2x 300 µL MeOH
Eluieren (D)	300 µL 10% NH <sub>4</sub> OH in MeOH	2 x 300 µL 2% AS in MeOH	2 x 300 µL 2% AS in MeOH
Abdampfen	nur A	B+C: ca. 20–60 min	B+C: ca. 20–60 min
Aufnehmen	A: 1000 µL MeOH D: Verdünnt mit 700 µL MeOH:H <sub>2</sub> O (5:2, v/v)	B+C: 100 µL MeOH:CHCl <sub>3</sub> D: verdünnt mit 400 µL MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1, v/v)	B+C: 30 µL MeOH:CHCl <sub>3</sub> (2:1, v/v); D: verdünnt mit 400 µL MeOH: H <sub>2</sub> O (1:1, v/v)

Schritt	Oasis MCX 1 (30 mg)	Oasis MCX 2 (30 mg)	M&N SA / PSA* (30 mg)
	Starker Kationenaustausch, Umkehrphase	Starker Kationenaustausch, Umkehrphase	Starker Kationenaustausch mit Benzensulfonsäure/ Propylsulfonsäure
Konditionieren	1 mL MeOH	1 mL MeOH	1 mL MeOH
Äquilibrieren	1 mL H <sub>2</sub> O	1 mL H <sub>2</sub> O	2x 400 µL ACN:0,5 M HCl (3:2, v/v)
Beladen (A)	Überstand von 20 µL Plasma + 80 µL MeOH + 320 µL 2% AS in H <sub>2</sub> O	Überstand von 20 µL Plasma + 80 µL MeOH + 400 µL 0,5% AS in H <sub>2</sub> O	LLE Extrakt** in 800 µL CHCl <sub>3</sub> :MeOH: H <sub>2</sub> O (20:9:1, v/v/v) aufgenommen
Waschen 1 (B)	300 µL 2% AS in H <sub>2</sub> O	300 µL 0,5% AS in H <sub>2</sub> O	-
Waschen 2 (C)	2x 300 µL MeOH	2x 300 µL 0,5% AS in MeOH	2x 400 µL CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (20:9:1, v/v/v)
Eluieren (D)	2 x 300 µL 5% NH <sub>4</sub> OH in MeOH	2 x 300 µL 5% NH <sub>4</sub> OH in MeOH	2x 400 µL 5% NH <sub>4</sub> OH in MeOH
Abdampfen	B+C: ca. 20–60 min	A-D: ca. 20–60 min	A, C+D: Ca. 10–20 min
Aufnehmen	B+C: 30 µL MeOH:CHCl <sub>3</sub> (2:1, v/v); D: verdünnt mit 400 µL MeOH: H <sub>2</sub> O (1:1, v/v)	A-C: 30 µL MeOH:CHCl <sub>3</sub> (2:1, v/v); D: 500 µL MeOH: H <sub>2</sub> O (3:2, v/v)	A, C+D: 30 µL MeOH:CHCl <sub>3</sub> (2:1, v/v)

Weiterhin wurden die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) und Methanol nach Folch [221] und Bligh und Dyer [222] sowie mit Methyl-*tert*-butylether (MTBE) nach Matyash getestet [223]. Bei der Extraktion mit Chloroform nach Folch wurden zu 40  $\mu\text{L}$  Plasma 300  $\mu\text{L}$  Methanol, 600  $\mu\text{L}$  Chloroform und 250  $\mu\text{L}$  Wasser gegeben. Die untere organische Phase wurde abgenommen und die obere Phase mit 400  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (85:14:1, v/v/v) reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen dann abgedampft. Bei der Extraktion nach Bligh und Dyer wurden zu 40  $\mu\text{L}$  Plasma 40  $\mu\text{L}$  Wasser und 300  $\mu\text{L}$  MeOH:CHCl<sub>3</sub> (2:1, v/v) gegeben und 1 min geschüttelt [222]. Anschließend wurden nochmal je 100  $\mu\text{L}$  Chloroform und 150 mM Ammoniumhydrogencarbonat dazu gegeben und für 60 min bei 6 °C geschüttelt. Die untere Phase wurde dann überführt und abgedampft.

Bei dem MTBE-Protokoll wurden verschiedene Variationen getestet, darunter Probenvolumina von 10 bis 40  $\mu\text{L}$ , wobei das Verhältnis Probe:MTBE:MeOH:H<sub>2</sub>O von 0,4:10:3:2,5 (v/v/v/v) beibehalten wurde. Die Robustheit der Extraktion gegen Veränderungen des wässrigen Anteils wurde durch Zugabe von 30 bzw. 80  $\mu\text{L}$  Wasser zu 20  $\mu\text{L}$  Plasma untersucht. Die wässrige Phase wurde testweise mit phosphatgepufferter Salzlösung und verschiedenen Konzentrationen an Ameisensäure und Ammoniumformiat ersetzt. Obendrein wurden verschiedene Gefäße für die LLE und das Abdampfen getestet, darunter 1,5 und 2 mL Polypropylen-Gefäße von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), 1,5 mL Reaktionsgefäße von Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich) und 1,5 mL Glasvials (Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe). In dem ursprünglichen Protokoll wurden die Proben nach der Zugabe der wässrigen Phase für eine Stunde bei Raumtemperatur (RTp) geschüttelt und nach Zugabe des Reextraktionsmittels weitere 10 min bei RTp gelagert [223]. Damit wird sichergestellt, dass die Lipide möglichst vollständig von den Proteinen gelöst werden und sich ein Gleichgewicht zwischen wässriger und organischer Phase einstellt. Da solche Lagerzeiten den Probendurchsatz stark limitieren, wurden verschiedene Inkubationszeiten von 1, 10 und 30 min getestet, dabei wurden die Proben in Eiswasser oder bei 6 °C auf einem Rotator gelagert und in regelmäßigen Abständen geschüttelt.

Für die Bestimmung des optimalen Rekonstitutionsmittels wurden je 40  $\mu\text{L}$  Plasma extrahiert und mit 160  $\mu\text{L}$  von MeOH:CHCl<sub>3</sub> (2:1, v/v), MeOH, ACN:ISP:H<sub>2</sub>O (4:6:1, v/v/v) oder ACN:ISP:H<sub>2</sub>O (4:6:2, v/v/v) aufgenommen und die resultierenden Peakflächen verglichen. Das Volumen des Aufnahmemediums im Vergleich zum extrahierten Probenvolumen wurde im Bereich von 8:1 bis 12:1 getestet.

### 2.1.2 Chromatographie

Die Entwicklung der chromatographischen Methode erfolgte zunächst mit einigen wenigen Analyten und wurde anschließend mit den aus Plasmaproben identifizierten Lipiden geprüft und weiter optimiert (Tabelle 11). Als Ausgangspunkt dienten verschiedene Säulen mit Umkehrphase sowie Wasser und Acetonitril mit je 0,1% Ameisensäure als mobile Phase A bzw. B. Die

Fließmittelzusammensetzung und der Gradient wurden anschließend weiter optimiert, um eine möglichst hohe chromatographische Auflösung bei einer geringen Laufzeit zu erreichen. Gleichzeitig wurde der Einfluss der ionischen Zusätze und der Fließmittelzusammensetzung auf die Ionisierung der Analyten betrachtet. Die Details zur Entwicklung der chromatographischen Methode werden in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Entwicklung der Chromatographie.

Parameter	Beschreibung
Säule	Poroshell 120 EC-C8 2,7 µm, 50x2,1 mm Kinetex 1,7 µm C8 100 Å, 100x2,1 mm Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 1,8 µm, 50x2,1 mm Zorbax Eclipse Plus C8 RRHD 1,8 µm, 50x2,1 mm
Mobile Phase A	Wasser mit verschiedenen ionischen Zusätzen
Mobile Phase B	Acetonitril, Aceton, Isopropanol und Methanol in verschiedenen Zusammensetzungen und mit unterschiedlichen ionischen Zusätzen
Ionische Zusätze	Essigsäure 0,1%; Ameisensäure 0,05; 0,1 & 0,15%; 1 mM Ammoniumacetat; Ammoniumformiat in Konzentrationen von 1, 5, 10, 20 und 50 mM
Säulentemperatur	40, 50 und 60 °C
Flussrate	300, 350, 400 und 500 µL/min
Gradient	10–100% organisch
Laufzeit	15–35 min
Injektionsvolumen	1–20 µL
Spülen der Injektionsnadel	Innerlich und äußerlich mit unterschiedlichen Zusammensetzungen von Wasser, Acetonitril, Isopropanol und Methanol
Aufnahmemedium	Test der Kompatibilität mit dem Startgradienten von Methanol, Ethanol, Isopropanol, Butanol, Wasser, Acetonitril, Aceton, Tetrahydrofuran, Chloroform und Dichlormethan in verschiedenen Verhältnissen

Bei einem hohen Probenaufkommen kommt es zu einer zusehenden Verschmutzung des Massenspektrometers sowie einer starken Abnutzung des Detektors. Dadurch ist die Lebensdauer eines Multi-Channel Plate Detektors relativ kurz, nur rund 18 Monate, und der QJet muss öfter gereinigt werden. Triple-Quadrupol Massenspektrometer können vor unnötiger Verschmutzung und Abnutzung geschützt werden, indem ein integriertes Ventil nur zu der Retentionszeit der interessanten Analyten den Fluss in das MS leitet. Diese Möglichkeit besteht bei einem TripleTOF6600 nicht, da mehrere Hintergrund-Signale zur Aufrechterhaltung der internen Massenkalisierung verwendet werden. Wenn diese im Zuge einer Ventil-Schaltung wegfallen, schlägt die Kalibrierung fehl und die Massengenauigkeit nimmt stark ab. Deshalb wurde nach einer alternativen Lösung zur Reduktion der Geräte-Verschmutzung gesucht. Spielmeyer *et al.* verwenden eine Reduzierung des HPLC-Flusses nach der Säule, damit weniger Matrix und Lösungsmittel ionisiert werden [224]. Eine solche Flussreduzierung wurde auch für diese Methode getestet. Dabei wurde ein T-Stück in der Leitung zwischen der Chromatographie-Säule und der Elektrode eingebaut, sodass eine Leitung weiter zur Quelle und eine in den Abfall führt. Die Reduzierung des Flusses erfolgt dabei passiv durch den unterschiedlichen Widerstand zwischen den beiden Leitungen und wird durch die Länge der Leitungen sowie deren Innendurchmesser bestimmt. Das T-Stück wurde testweise an verschiedenen Stellen eingebaut und unterschiedlich lange Polyetheretherketon-

## Materialien und Methoden

Leitungen (PEEK) verwendet. Abbildung 17 zeigt zwei mögliche Aufbauten. Das resultierende Flussverhältnis wurde experimentell durch Auffangen der Flüssigkeit aus der Abfall-Leitung in einem Messzylinder bestimmt.

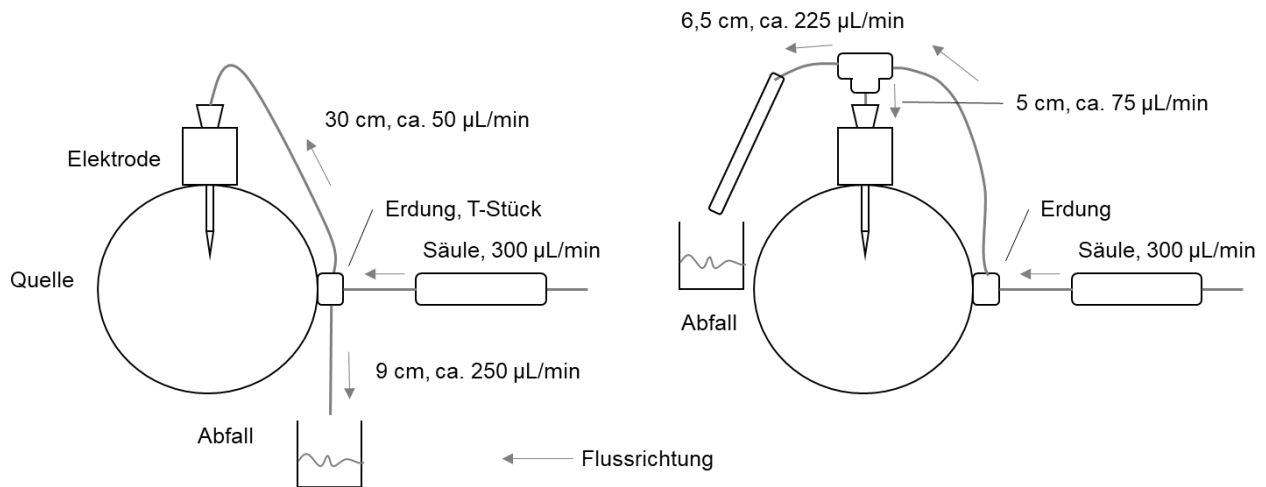


Abbildung 17: Schematischer Aufbau der Flussreduzierung vor der Quelle.

Links in der Abbildung sieht man einen Aufbau, bei dem das Erdungsstück zur Teilung des Flusses verwendet wird. Rechts in der Abbildung sieht man den Aufbau, bei dem die Leitungslänge mit niedrigem Fluss minimiert wurde, um die Adsorption am PEEK zu reduzieren. Bei dem rechten Aufbau kann optional noch eine Metallverbindung zwischen der Leitung zum Abfall und dem Erdungsstück ergänzt werden, um die Spannung abzuleiten.

### 2.1.3 Massenspektrometrie

Eine substanzspezifische Optimierung der massenspektrometrischen Parameter ist bei Screening Methoden wie dieser wenig sinnvoll, da die Auswertung aller Analyten im gleichen MS-Experiment erfolgt, sodass ein Kompromiss für alle Analyten getroffen werden muss. Der Massenbereich wurde zwischen 100 und 1500  $m/z$  untersucht. Die weiteren Parameter wurden mit den in Tabelle 11 aufgeführten Analyten und den Lipiden aus humanen Plasmaproben optimiert. Die Analytmischung wurde abgedampft, in Methanol aufgenommen und in Konzentrationen von 0,5 bis 1000 ng/mL injiziert. Plasmaproben wurden vorher mit Proteinfällung oder Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgereinigt, um einer Verschmutzung des MS vorzubeugen. Die Parameter-Überprüfung erfolgte i.d.R. gekoppelt mit der chromatographischen Trennung, um die Analyten zu separieren und die Stabilität des Elektrosprays im Zusammenhang mit der Fließmittelzusammensetzung zu analysieren. Die untersuchten Parameter und Einstellungen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Grenzen der massenspektrometrischen Parameter bei der Methodenentwicklung.

\*Anzahl und Breite der *m/z*-Fenster bei der SWATH-Messung. Zusätzlich wurde noch ein SWATH Versuch mit 10 Fenstern mit einer variablen Fensterbreite von 27-164 Da durchgeführt. Die Fensterbreite wurde an die Signale in Humanplasma angepasst (positiver Ionisationsmodus).

Parameter	DP [V]	TEM [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	CUR [psi]	ISVF [V]
Min	60	100	25	15	35	-3000/4000
Max	100	600	50	50	45	-4500/5500

MS-Scan	CE [V]	Accum. time [s]
Min	±5	100
Max	±10	250

MS/MS	CE [V]	Accum. time [s]	IDA-Kanäle	SWATH-Fenster*
Min	±10	30	5	14 * 54 Da
Max	±60	100	15	25 * 30 Da

Die Proben wurden über ESI ionisiert und die von Sciex empfohlenen *APCI Positive* und *Negative Calibration Solutions* für die Autokalibrierungen verwendet. Demnach sind verschiedene Lösungen für die Ionisationsmodi vorgesehen, bei einer Flussrate von 500 µL/min für 2 min. Da der Wechsel zwischen den Lösungen zeitaufwendig ist und jeweils rund 3 bis 5 mL Kalibrierlösung verbraucht, wurde versucht, die gleiche Lösung für beide Polaritäten zu verwenden. Dafür wurde die APCI Positive Calibration Solution in den Verhältnissen 2:1 bzw. 1:1 (v/v) mit 1 µg/mL Sulfinpyrazon in Acetonitril getestet. Das Intervall für die Autokalibrierungen wurde zwischen 5 bis 20 Injektionen getestet bei einer Laufzeit von 17 min.

#### 2.1.4 Datenprozessierung und Auswertung

Die Auswertung der Rohdaten und die Lipididentifikation erfolgte mit MasterView v1.1 (Sciex, Darmstadt) unter Verwendung der exakten Masse ±5 ppm, der Isotopenverteilung und Vergleich der MS/MS-Fragmentierungsmuster mit einer selbsterstellten Datenbank, die mit den Datenbanken von LIPID MAPS, METLIN und der Human Metabolome Database abgeglichen wurde [9, 176, 178]. Weiterhin wurden typische Kopfgruppenfragmente der Phospholipide zur Identifizierung verwendet [225]. Bei bereits identifizierten Lipiden wurden die Peakflächen mittels MultiQuant 3.0.2 integriert und über je einen internen Standard pro Lipidklasse normalisiert. Dabei wurde i.d.R. eine Toleranz für die Retentionszeit von ±10 s und ein Massenfenster von 10 mDa verwendet.

Für das Peak-Alignment und die Filterung der untargeted Daten wurde die MarkerView v1.2.1 Software mit einer Massen- und Retentionszeittoleranz von 10–20 ppm bzw. 0,15–0,30 min verwendet. Tabelle 18 enthält eine Übersicht über die verwendete Software und die Hersteller.

### 2.1.4.1 Normalisierung

Mit Hilfe der Normalisierung soll die unerwünschte Varianz der Messergebnisse unter Erhaltung der zu untersuchenden Unterschiede zwischen den Proben reduziert werden. Wie unter 1.5.3 beschrieben, gibt es zahlreiche Faktoren, die eine unerwünschte Varianz verursachen können. Deswegen muss die Wahl des geeigneten Normalisierungsverfahrens für jeden Datensatz einzeln betrachtet werden. Aufgrund der Vielzahl möglicher Normalisierungsverfahren wurden diese nicht im Detail untersucht. Stattdessen bezieht sich die untersuchte Fragestellung auf den Nutzen der internen Standards für die untargeted bzw. semi-targeted Auswertung, da diese Frage schon vor der Messung beantwortet werden muss.

Zu diesem Zweck wurden Testdaten ohne Normalisierung, mit dem *median peak ratio*, mit dem Mittelwert mehrerer internen Standards sowie analytweise mit einem IS pro Lipidklasse normalisiert. Dafür wurden die Daten des Präanalytik-Versuches und der mit LPS oder Zymosan behandelten Mauspfoten verwendet (Abschnitt 2.3). Die Durchführung der verschiedenen Normalisierungen wird nachfolgend erläutert. Grundlage für alle Verfahren, waren die mit MultiQuant berechneten Peakflächen von den semi-targeted ausgewerteten Analyten. Um Abweichungen durch fehlende Werte zu vermeiden, wurden Analyten mit mehr als 20% fehlenden Werten von der Auswertung ausgenommen. Es verblieben 206 Analyten bei den LPS/Zymosan- und 215 Analyten bei den Präanalytik-Proben. Der Vergleich der Normalisierungsverfahren erfolgte wie von De Livera *et al.* vorgeschlagen mittels RLA- (engl. relative log abundance) und Volcano-Graphen [226].

#### Median peak ratio

Das *median peak ratio* (MPR) wurde mit der MarkerView Software berechnet [171]. Dabei wird mit einer ausgewählten Referenzprobe, i.d.R. der ersten QC-Probe, eine Peakliste mit allen Peaks erstellt, die eine Peakfläche von mindestens 1% der Fläche des größten Signals aufweisen. Für jeden Peak in der Liste wird die Fläche in der Referenzprobe durch die Fläche in der Probe geteilt und anschließend der Median dieser Flächenverhältnisse berechnet. Wenn ein Peak in der untersuchten Probe nicht vorkommt, wird das Flächenverhältnis auf 1 gesetzt. So wurde ein Normalisierungsfaktor pro Probe erhalten und die Ergebnisse aller Analyten wurden mit diesem multipliziert.

#### Mittelwert mehrerer interner Standards

Der Normalisierungsfaktor anhand der internen Standards wurde ebenfalls mit MarkerView berechnet [171]. Bei diesem Verfahren wird für jeden IS der Mittelwert der Signale in allen Proben durch das Signal in der zu untersuchenden Probe geteilt. Für den Normalisierungsfaktor werden die Ergebnisse der verschiedenen IS gemittelt.

#### Ein interner Standard pro Lipidklasse

Bei der Normalisierung mit einem IS pro Lipidklasse wurden die Peakflächen der Analyten durch die Peakfläche des jeweiligen IS geteilt. Die Ergebnisse werden demnach als Flächenverhältnis

angegeben. Die Ergebnisse der Ether-LPE wurden auf die Flächen von LPE 18:1-d7 und die der Ether-PE auf PE 15:0/18:1-d7 bezogen, da PE O-18:0/18:1-d9 in den Proben nicht detektierbar war. Die Flächen der Mono- und Dihexosylceramide wurden auf die Signale von Lactosylceramid d18:1/17:0 bezogen. Für einige Analyten wie die sulfatierten Sterole und das Thyroxin gab es keine vergleichbaren IS, deswegen wurden sie mit dieser Normalisierung nicht ausgewertet. Die Lysophosphatidylserine waren in diesen Datensätzen nicht detektierbar, in anderen Auswertungen wurden sie relativ zu LPI 17:1 betrachtet. Alle anderen Lipidklassen verfügten über einen eigenen internen Standard (Tabelle 12).

### Normalisierung auf die Proteinmenge

Von den homogenisierten Mauspfoten wurden jeweils 1 mg Gewebe extrahiert (Abschnitt 2.3.2). Durch die unterschiedlich starke Schwellung der Pfote durch LPS bzw. Zymosan, sind die Gewebezusammensetzungen nicht unbedingt vergleichbar, deswegen wurde zusätzlich noch der Proteingehalt der Gewebekomponente durch Daniel Kratz bestimmt. Dafür wurde eine Kalibriergerade mit 0,1 bis 1,4 mg/mL bovinen Serumalbumin erstellt ( $R^2 > 0,995$ ). Von den Kalibrierstandards und den Gewebekomponenten wurden jeweils 10  $\mu$ L (0,5 mg Gewebe) mit 250  $\mu$ L Bradford-Reagenz für 3 min bei RTp gemischt [227]. Die Absorption wurde bei 595 nm an einem Infinite F200 Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Ergebnisse der Lipidomics Auswertung wurden dann pro ng Protein berechnet. Anschließend wurden die zuvor beschriebenen Normalisierungsverfahren nochmal auf die Ergebnisse relativ zur Proteinmenge angewandt, da die Normalisierung mittels des Proteingehaltes Abweichungen durch die Messmethode nicht ausgleichen kann.

### 2.1.4.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung von semi-targeted bzw. untargeted Daten ist aufgrund der großen Anzahl Analyten sehr komplex und dadurch zeit- und rechenaufwendig. Deswegen wurden in der Software „R“ Skripte entwickelt, mit denen sowohl semi-targeted als auch untargeted Datensätze halbautomatisch ausgewertet werden können, um einen ersten Überblick über die Daten zu gewinnen. Die dabei verwendeten R Bibliotheken sind in Tabelle 18 aufgeführt.

### Umgang mit fehlenden Werten

Einige Signale sind geringer als der LOD oder die Signale in den Blankproben, sodass sie nicht angegeben werden können. Fehlende Werte stören die weitere Auswertung, deswegen wurden verschiedene Verfahren zum Ersetzen der Werte getestet. Diese wurden an drei verschiedenen Datensätzen angewandt. Es wurden nur Analyten betrachtet, für die alle Werte vorhanden waren, anschließend wurden die kleinsten 5, 10, 15 oder 20% der Werte entfernt. Dadurch war es möglich, die ersetzten Werte mit den ursprünglichen richtigen Werten zu vergleichen. Der Testdatensatz 1 enthielt quantitative Ergebnisse von Lipidmediatoren in humanem Plasma. Die Testdatensätze 2

und 3 enthielten beide semi-quantitative Daten, wobei bei Datensatz 2 das Verhältnis der Peakfläche zur Fläche des internen Standards und bei 3 direkt die Peakfläche betrachtet wurde. Bei allen drei Datensätzen wurde jeweils nur eine geringe Anzahl von 10 bis 16 Analyten ausgewertet, da die Imputation von Daten bei hochdimensionalen Datensätzen mit vielen Variablen mit dem k-Nächste-Nachbarn-Algorithmus (engl. k-Nearest Neighbor, kurz kNN) oder dem Algorithmus des R Pakets „Amelia“ sehr rechenaufwändig und unter Umständen nicht anwendbar sind. Bei dem kNN-Algorithmus wurde die Anzahl Nachbarn zur Vereinfachung gleich der Quadratwurzel der Anzahl Proben pro Gruppe gesetzt. Prinzipiell sollte dieser Wert nicht zu gering gesetzt werden, da er sonst vom Rauschen der Daten beeinflusst wird und auch nicht zu groß, da er sonst nicht die lokalen Cluster findet und der Rechenaufwand steigt [228]. Die Abschätzung erfolgte anhand der gewichteten Mittelwerte und der euklidischen Distanz. Der Amelia-Algorithmus (benannt nach der amerikanischen Pilotin und Frauenrechtlerin Amelia Earhart, die 1937 über dem pazifischen Ozean verschwand) wurde ausgewählt, weil die Grenzen für die einzusetzenden Werte selbst gewählt werden können [229, 230]. Dadurch eignet sich dieser Algorithmus auch für linkszensierte Daten, als Grenzen wurden Null und der jeweils kleinste noch vorhandene Wert gesetzt. Weiterhin wurden die fehlenden Werte noch analytweise je durch Null, den jeweils kleinsten Wert (als Ersatz, wenn der LLOQ nicht bekannt ist), die Hälfte des kleinsten Wertes und den Median der verbliebenden Werte ersetzt. Als Marker für die Güte des Modells wurde die durchschnittliche relative Abweichung verwendet. Die Berechnung der relativen Abweichung erfolgte mit der Funktion „regr.eval()“ des R Pakets „DMwR“. Weitere R Pakete, die verwendet wurden, sind in Tabelle 18 dargestellt.

### Univariate Auswertung

Für univariate statistische Verfahren wurde ein R Skript entwickelt, mit dem eine automatisierte Auswertung möglich ist. Nachdem die Daten in ein passendes Format überführt wurden, muss noch festgelegt werden, ob die Daten abhängig sind, wie mit fehlenden Werten verfahren werden soll, sowie ob eine Log<sub>10</sub>-Transformation der Daten gewünscht ist (Details zum Format siehe 8.2.2). Die Quadratwurzel-Transformation wurde nicht implementiert, da sie im Lipidomics-Bereich selten eingesetzt wird. Als Kontrollgruppe wird die erste Gruppe in alphabetischer Reihenfolge verwendet. Mit dem Skript werden die Tests für alle Analyten angewendet und das Signifikanzniveau für die Anzahl der Analyten korrigiert. Weiterhin können die untargeted Daten aus MarkerView mit wenig Änderungen aus Excel importiert werden, dabei werden nicht benötigte Spalten entfernt und die Markierung der Peaks als Isotop verwendet, um diese für weitere Untersuchungen auszuschließen. Die detektierten Signale in Blankproben werden ausgeschlossen, da sie lediglich aus dem chromatographischen System und nicht aus der Probe stammen. Die Daten von den Doppel-Blank Proben werden dabei nicht ausgewertet, da diese im Falle einer Normalisierung mittels interner Standards zu hohe Grenzen setzen würden, weil sie keinen IS enthalten (geteilt durch Null). Außerdem können die Ergebnisse der Qualitätskontrollproben verwendet werden, um Analyten mit einer zu großen Variation der Peakflächen, z.B. durch ungenaue Integration, auszuschließen. Wenn



der Datensatz mehrere Untergruppen enthält, die einzeln ausgewertet werden sollen, werden die QC- und Blankkriterien für die Untergruppen separat angewendet. Der Code ist im Anhang unter 8.2.2 aufgeführt. Die durchgeführten Tests sind in Tabelle 9 dargestellt. Das entwickelte Skript wurde auf zwei Testdatensätze angewendet und die Ergebnisse mit MetaboAnalyst 4.0 verglichen [231]. Für den Vergleich der Auswertung von semi-targeted Daten wurden die mit LPS bzw. Zymosan behandelten Mäusen untersucht (siehe 2.3.2). Als zweiter Testsatz wurden die untargeted Daten des Präanalytik Versuches im negativen Ionisationsmodus verwendet (siehe 2.3.1). Zum Vergleich mit MetaboAnalyst wurde der Abschnitt des Skripts zum Entfernen von Isotopen und Abgleich mit den bereits in den Blankproben enthaltenen Signalen bereits ausgeführt, da diese Funktionalitäten dort nicht enthalten sind. Zur Vereinfachung wurden bei beiden Datensätzen Analyten bzw. Peaks ausgeschlossen, die fehlende Werte enthielten.

Tabelle 9: Statistische Verfahren für die univariate Auswertung.

Ziel / Parameter	Statistischer Test / Verfahren
Prüfung auf Normalverteilung	Shapiro-Wilk-Test
Varianzhomogenität	Levene-Test
Umgang mit fehlenden Werten	Entfernen von allen Analyten mit fehlenden Werten oder von Analyten mit > 20% fehlenden Werten; ggf. Ersetzen der restlichen fehlenden Werte mit der Hälfte des kleinsten Wertes noch vorhandenen Wertes
Transformation	Ggf. Log <sub>10</sub> -Transformation, wenn die Anzahl signifikanter Shapiro-Wilk-Tests dadurch mindestens um 34% verringert wird
Unabhängige Proben mit mind. 2 Gruppen	Welch-Test ( <i>t</i> -Test mit ungleicher Varianz), Wilcoxon-Test
Unabhängige Proben mit > 2 Gruppen	ANOVA, Kruskal-Wallis-Test
Abhängige Proben mit mind. 2 Gruppen	Gepaarter <i>t</i> -Test, gepaarter Wilcoxon-Test
Abhängige Proben mit > 2 Gruppen	ANOVA mit Messwiederholungen, Friedman-Test
$\alpha$ -Fehler-Korrektur	Bonferroni, Falscherkennungsrate (FDR)

### Analyse der Verteilung

Grundlage für eine detailliertere statistische Auswertung, ist die Überprüfung der Normalverteilung. Deshalb wurde ein R Skript entwickelt, das die Ergebnisse analytischer Tests, wie den Shapiro-Wilk- und den Levene-Test, sowie Histogramme und Q-Q-Graphen für eine visuelle Überprüfung der Verteilung analytweise zusammenfasst. Da die Verteilung aller Untergruppen geprüft werden muss, werden diese bzw. die Differenz zu einer Kontrollgruppe einzeln aufgeführt. Bei Abweichung von der Normalverteilung, kann die Verteilung durch eine Transformation angepasst werden, sodass auch die Verteilung für Log<sub>10</sub>-transformierte Daten dargestellt wird. Von dem Testdatensatz 1 für das Ersetzen fehlender Werte wurden die Daten von drei der fünf Gruppen ausgewertet.

### Multivariate Analyse

Für die multivariate Analyse wurden die PCA, PLS-DA und OPLS-DA in MetaboAnalyst 4.0 verwendet [231]. Dabei wurden bei Bedarf eine log-Transformation sowie eine Auto- bzw. Paretoskalierung eingesetzt. Vor dem Import der Rohdaten in MetaboAnalyst wurden sie entweder mit den internen Standards oder mit dem MPR normalisiert. Peaks, die durch MarkerView als Isotope erkannt wurden, deren Peakfläche nicht mindestens der doppelten Peakfläche in der extrahierten Blankprobe entsprach oder deren relative Standardabweichung (engl. relative standard deviation, RSD) in den QC-Proben größer 20% war, wurden vorher entfernt. Außerdem wurden Peaks, bei denen nicht mindestens für 80% der Proben ein Wert vorhanden war, ausgeschlossen. Die restlichen fehlenden Werte wurden durch die Hälfte des Minimums ersetzt. Weitere anwendungsspezifische Informationen werden im Abschnitt 2.3 aufgeführt.

## 2.2 Methodenüberprüfung

Für untargeted Methoden ohne Standardlösungen gibt es noch keine konkreten Vorgaben zur Methodenüberprüfung bzw. Validierung in der Literatur. Um dennoch sicherzustellen, dass die Unterschiede bei potenziellen Biomarkern auf echten biologischen Unterschieden beruhen und nicht auf Unterschiede bei der Probenlagerung oder auf die Messmethode zurückzuführen sind, wurden mehrere Parameter inklusive der Matrixeffekte und der Stabilität der Proben untersucht. Dafür wurden die im Anhang in Tabelle 31 angegebenen Analyten semi-quantitativ ausgewertet.

### 2.2.1 Matrixeffekt und Linearität

Die Bestimmung der (relativen) Wiederfindung und der Prozesseffektivität wurde an die FDA Vorgaben angelehnt [187]. Die Berechnung des Matrixfaktors wurde an die Richtlinie der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) angepasst [232]. Ohne Standardlösungen und Konzentrationsniveaus wurden die Parameter stattdessen für die chromatographische Peakfläche der internen Standards berechnet. Die IS wurden in beiden Ionisationsmodi ausgewertet, um die unterschiedlichen Matrixeffekte zu untersuchen.

### Wiederfindung

Die Wiederfindung ist ein Maß für die Effektivität der Extraktion. Sie beschreibt den Anteil der Analytmenge, der während der Probenvorbereitung erhalten bleibt und detektiert werden kann. Bei einer Wiederfindung von 60% gehen 40% des Analyten während der Probenvorbereitung verloren. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde Humanplasma aus sechs verschiedenen Quellen je einmal vor und einmal nach Extraktion mit IS-Lösung dotiert und die Peakfläche der IS verglichen. Die prä-Extraktion dotierten Proben wurden wie zuvor beschrieben mit 150 µL der 1:15 mit Methanol verdünnten IS-Lösung extrahiert (entspricht den sonst verwendeten IS-Konzentrationen). Bei den post-Extraktion dotierten Proben wurde während der Extraktion reines Methanol verwendet und

nach Vereinigung der organischen Phasen 10 µL IS-Lösung zugegeben. Zur Berechnung der Wiederfindung wurde die folgende Formel verwendet:

Formel 5: Berechnung der Wiederfindung

$$\text{Wiederfindung [\%]} = \frac{\text{Peakfläche (IS – Dotierung prä – Extraktion)}}{\text{Peakfläche (IS – Dotierung post – Extraktion)}} * 100$$

### Matrixfaktor

Der Matrixfaktor ist ein Maß für den Einfluss der weiteren Probenbestandteile auf die Ionisierung des untersuchten Analyten. Zur Berechnung des Matrixfaktors wurde die Fläche der IS in den post-Extraktion dotierten Proben, mit denen auch die Wiederfindung bestimmt wurde, durch den Mittelwert der Fläche in drei Lösemittel-Standards geteilt (Formel 6). Für die Herstellung der Lösemittel-Standards wurden je 10 µL der konzentrierteren IS-Lösung abgedampft und wie die Proben in 120 µL Methanol aufgenommen. Der Matrixfaktor wurde für jede der sechs Matrices gebildet und die relative Standardabweichung berechnet. Die RSD sollte kleiner 15% sein [232].

Formel 6: Berechnung des Matrixfaktors

$$\text{Matrixfaktor [\%]} = \frac{\text{Peakfläche (IS – Dotierung post – Extraktion)}}{\frac{\sum \text{Peakfläche (Lösemittel – Standards)}}{3}} * 100$$

### Prozesseffektivität

Die Prozesseffektivität fasst die Wiederfindung und den Matrixeffekt zusammen. Sie berechnet sich aus der Fläche der prä-Extraktion dotierten Proben geteilt durch den Mittelwert der Flächen in den Lösemittel-Standards. Es wurden dabei die gleichen Proben wie für die Bestimmung der Wiederfindung und des Matrixfaktors verwendet.

Formel 7: Berechnung der Prozesseffektivität

$$\text{Prozesseffektivität [\%]} = \frac{\text{Peakfläche (IS – Dotierung prä – Extraktion)}}{\frac{\sum \text{Peakfläche (Lösemittel – Standards)}}{3}} * 100$$

### Linearität

Allgemein wird in der Massenspektrometrie davon ausgegangen, dass sich die Änderung der Signalintensität innerhalb eines bestimmten Bereiches linear zu der Konzentrationsänderung verhält. Um die Linearität der Signalintensität der Analyten bei Verdünnung zu überprüfen, wurde humanes Plasma aus drei verschiedenen Poolproben mit Wasser jeweils so verdünnt, dass die relative Konzentration zur unverdünnten Probe 0,01; 0,04; 0,1; 0,2; 0,5 bzw. 1 beträgt (1 = unverdünnt). Die Proben wurden wie beschrieben extrahiert, dabei wurde für jeden Pool und für jede Verdünnung je

eine Probe mit und eine ohne internen Standard extrahiert. Bei den Proben ohne IS wurde dieser beim Aufnehmen der Probe hinzugegeben. Die Peakflächen der Verdünnungen wurden relativ zur Peakfläche der unverdünnten Probe mittels linearer Regression mit der Formel  $y = b + a \cdot x$  mit einer  $1/x$  Wichtung ausgewertet. Dabei wurden die Peakflächen der vor und nach Extraktion mit IS dotierten Proben je einmal ohne Normalisierung und einmal normalisiert zu der Peakfläche des jeweiligen IS betrachtet. Die Ergebnisse der Verdünnungen aus den drei Poolproben wurden jeweils gemittelt. Dabei wurden nur Analyten für die Auswertung betrachtet, bei denen für alle drei Verdünnungen mindestens 4 von 6 Werten vorhanden waren und die nicht durch Signale in den Blank Proben gestört wurden. Die lineare Regression wurde mit den R Basisfunktionen berechnet.

### 2.2.2 Verschleppung

Bei einer Verschleppung verbleibt ein Teil der Analytmenge im LC-MS-System und erscheint als Signal in der folgenden Probe. Zur Bestimmung der Verschleppung wurden extrahierte Humanplasma-Proben und anschließend jeweils extrahierte Lösungsmittelproben injiziert und die chromatographischen Peakflächen in der Lösungsmittelprobe durch die Fläche in der Plasmaprobe geteilt ( $n=3$ ). Außerdem wurde das Signal von extrahierten Lösungsmitteln ohne vorherige Plasmajektion mit den Peakflächen in Plasma verglichen (Blanksignal).

### 2.2.3 Robustheit der Methode

Die Robustheit einer Methode beschreibt die Unempfindlichkeit gegenüber Veränderungen bei der Probenvorbereitung, den chromatographischen und MS-Parametern sowie äußeren Einflüssen wie Raumtemperatur, Luftdruck und -feuchtigkeit. Methodenbezogene Einflussfaktoren können z.B. die Flussrate, Fließmittelzusammensetzung und Temperatur im Säulenofen sowie die Quellenspannungen und -temperatur sein. Da die Anzahl möglicher Einflussfaktoren sehr groß ist, ist eine einzelne Testung der Parameter zu aufwendig. Stattdessen wurde über den Verlauf eines Jahres eine Kontrollkarte erstellt und ausgewertet, um damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei natürlichen Schwankungen der Umgebungsbedingungen und Methodenparameter zu überprüfen. Dafür wurden Kontrollproben aus gepooltem  $K_3EDTA$ -Plasma aliquotiert und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Bei jeder Messung wurden zwei dieser Proben mitgemessen. Die Proben wurden auf Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und der Signalintensität im Rahmen einer semi-targeted Auswertung untersucht. Dabei wurden die Peakflächen entweder mit dem MPR (im Vergleich zur ersten Kontrollprobe) oder mit einem internen Standard pro Lipidklasse normalisiert. Die Auswertung der Kontrollkarte erfolgte anhand der Gesamt-RSD sowie der Anzahl Warnungen (Abweichung größer als die doppelte RSD) und Außer-Kontroll-Situationen (Abweichung eines Einzelwertes größer als die dreifache RSD) [233]. Gemäß Literatur ist das Plasma-Metabolom bei  $-80\text{ °C}$  für vier Jahre stabil, sodass die Stabilität der Lipide bei diesen Lagerbedingungen keinen Einfluss auf die

Ergebnisse haben sollte [234]. Außerdem wurde in einem Messlauf mit mehr als 200 Injektionen die Stabilität der Retentionszeit untersucht. Die Peakintegration erfolgte mit MultiQuant und die Retentionszeiten wurden mit MasterView ausgewertet (beide Sciex, Darmstadt). Des Weiteren wurden je sechs Aliquots des gleichen Plasmapools von zwei verschiedenen Personen extrahiert und gemessen, um anwenderspezifische Unterschiede zu analysieren.

### 2.2.4 Stabilität der Proben

Die Stabilität der Analyten zwischen der Probenentnahme und der Messung muss gewährleistet werden, um sicherzustellen, dass die Unterschiede zwischen den Proben auf den zu untersuchenden Faktor, z.B. eine Erkrankung, zurückzuführen sind. Für die Bestimmung der Probenstabilität wurden gepoolte Plasmaproben bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert und der Mittelwert der chromatographischen Peakflächen mehrerer Replikate mit der mittleren Fläche direkt verarbeiteter und gemessener Proben verglichen (n=5). In Anlehnung an die Vorgaben von der EMA und FDA wurde die Stabilität der Proben angenommen, wenn der relative Fehler kleiner gleich 15% war [187, 232]. Nachfolgend werden die untersuchten Lagerbedingungen und Zeitpunkte einzeln aufgeführt. Die Langzeitstabilität der Proben wurde nicht untersucht, da die Gerätestabilität über einen Zeitraum von mehreren Monaten nicht gewährleistet werden konnte und demnach bei einem semi-quantitativen Vergleich unklar wäre, ob Unterschiede auf Veränderungen in den Proben oder der Geräteleistung beruhen. Die Ergebnisse der Kontrollproben waren zu diesem Zeitpunkt noch ausstehend. Die IS standen zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht zur Verfügung. Bei den restlichen Untersuchungen erfolgte die Messung der Proben nach Möglichkeit am gleichen Tag und in randomisierter Reihenfolge, um Batch- und Drift-Effekte auszuschließen.

#### Kurzzeitstabilität

Die Kurzzeitstabilität der Proben wurde mit je fünf 20 µL Aliquots von gepoolten Plasmaproben untersucht. Diese wurden für 0,5, 1, 2 oder 4 h bei ca. 22 °C oder in einem Metallblock in Eiswasser gelagert und anschließend extrahiert. Außerdem wurde die Stabilität bereits extrahierter Proben bestimmt, indem diese mit Methanol aufgenommen und für 4 h bei RTp aufbewahrt wurden. Des Weiteren wurde im Rahmen einer klinischen Untersuchung die Stabilität von Vollblut- und Plasma-Proben verschiedener Probanden untersucht. Der Versuch wird im Abschnitt 2.3.1 näher erläutert.

#### Frier-Tau-Stabilität

Für die Bestimmung der Frier-Tau-Stabilität wurde eine gepoolte Plasmaprobe aufgetaut und auf mehrere 20 µL Aliquots verteilt. Diese wurden dann bis zu dreimal vollständig aufgetaut und bei -40°C eingefroren, dabei lagen zwischen jedem Frier-Tau-Zyklus mindestens 12 h unter Kühlung. Als Kontrolle wurde ein weiteres Aliquot des gleichen Plasmapools frisch aufgetaut und aliquotiert. Alle Proben wurden mindestens einmal eingefroren und insgesamt für die gleiche Zeit bei -40 °C gelagert. Die Extraktion und Messung der Proben erfolgten am gleichen Tag.

### Stabilität auf dem Abdampfgerät

Die Lipidstabilität ist bei höheren Temperaturen, z.B. bei 45 °C auf dem Abdampfgerät, unter Umständen beeinträchtigt. Um bei schwankenden Abdampfzeiten, die Stabilität der Proben zu gewährleisten, wurden je fünf Proben in Glasvials nach vollständiger Trocknung weiterhin für 5, 10 und 20 min auf dem Abdampfgerät gelagert. Der Versuch wurde gleichzeitig auch für Polypropylen-Gefäße durchgeführt, diese wurden für zusätzliche 5, 15 und 30 min auf dem Abdampfgerät gelagert. Die Zeit bis zur Trocknung betrug ca. 5 min in den Glasvials und 10 min in den Polypropylen-Gefäßen.

### Stabilität abgedampfter Proben

Um die Stabilität der Proben zwischen der Extraktion und der Messung sicherzustellen, wurden je fünf extrahierte und abgedampfte Proben im trockenen Zustand für 48, 120 und 144 h bei -40 °C bzw. für 72, 144 und 168 h bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden an verschiedenen Tagen extrahiert und zusammen mit frisch extrahierten Proben am gleichen Tag gemessen. Zusätzlich wurde die Stabilität im positiven und negativen Ionisationsmodus getrennt untersucht, um lange Lagerzeiten auf dem Autosampler zu vermeiden.

### Stabilität im Autosampler

Rekonstituierte Proben wurden für 24, 48 bzw. 72 h bei 6 °C im Autosampler gelagert, um die Stabilität der Proben während der Messung zu überprüfen und auch bei langen Messreihen zu gewährleisten.

## 2.3 Biologische Applikation

Die Anwendbarkeit der Methode wurde für verschiedene Matrices getestet, darunter flüssige Proben wie Human- oder Mausplasma sowie diverse murine Gewebe und Zellen (Tabelle 10). Dabei wurde die zuvor beschriebene LLE mit MTBE verwendet, um mehrere Replikate gepoolter Proben zu analysieren und damit die Reproduzierbarkeit der Extraktion zu bestimmen (LLE siehe Abschnitt 2.1.1). Im Falle der MCF-7-Brustkrebszellen wurde die komplette wässrige Phase durch Probe ersetzt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der relativen Ergebnisse bei Gewebeproben, wurden diese vor der Extraktion homogenisiert und auf eine einheitliche Gewebekonzentration eingestellt. Die Zerkleinerung erfolgte mit der Mixer Mill MM400, mit Ausnahme der Mauspfoten, die wegen des hohen Bindegewebeanteiles mit der Precellys zerkleinert wurden. Die Gewebekonzentrationen wurden an die Einwaagen angepasst, um ein ausgewogenes Verhältnis an fester Probe, Flüssigkeit und Zirkoniumdioxid-Kügelchen zu erreichen.

Übersicht Gewebehomogenisierung

1. Zu 10–20 mg Gewebe Wasser:Ethanol (75:25, v/v) geben, sodass die Gewebekonzentration 0,05 mg/μL beträgt.

Formel 8: Berechnung Volumen Extraktionsmittel für Gewebehomogenate

$$\text{Volumen Extraktionsmittel } [\mu\text{L}] = \frac{\text{Einwaage Gewebe } [\text{mg}]}{\text{Gewebekonzentration } \left[\frac{\text{mg}}{\mu\text{L}}\right]} - \text{Einwaage } [\text{mg}] * \text{Gewebedichte } \left(1 \frac{\text{mg}}{\mu\text{L}}\right)$$

2. 4–5 Zirkoniumdioxid-Kugeln zufügen.
3. A) In einer Schwingmühle (Mixer Mill MM 400, Retsch, Haan) mit mindestens 25 Hz für 2:50 min zerkleinern.  
B) Bei schwerer zu zerkleinernden Geweben, z.B. durch einen höheren Bindegewebsanteil, erfolgte die Zerkleinerung bei 6500 rpm (Herstellerangabe, Bewegung des Gerätes beschreibt eine 3-dimensionale Acht) für 2\*45 s unter Kühlung (< 10 °C) in der Precellys 24 (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich).
4. Gewebehomogenat entsprechend 1 mg Gewebe wie oben genannt extrahieren.

Tabelle 10: Untersuchte biologische Matrices.

Die Gewebehomogenate wurden mit Wasser oder mit Wasser/Ethanol (3:1, v/v) hergestellt. DRG = Dorsalwurzelganglien (engl. dorsal root ganglia), Konz. = Konzentration des Gewebehomogenates, LM = Lösungsmittel zur Homogenisierung, n = Anzahl Replikate. \*\*ACD: Puffer mit 66,6 mM Citronensäure-Monohydrat, 85 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat und 111 mM Glucose bei pH 4,5.

Spezies/ Ursprung	Matrix	n	Volumen [μL]	Konz. [mg/μL]/ *Zellzahl	LM	
Human	Plasma	6	20	-	-	
	Plasma	6	20	-	-	
	Herz	6	20	0,05	H <sub>2</sub> O	
	Leber	6	20	0,05	H <sub>2</sub> O	
	Niere	6	20	0,05	H <sub>2</sub> O	
	Milz	6	20	0,05	H <sub>2</sub> O	
	Hippocampus	6	20	0,05	H <sub>2</sub> O	
	Cortex	6	20	0,05	H <sub>2</sub> O	
	Maus	Rückenmark	6	40	0,025	H <sub>2</sub> O/EtOH
		DRG	6	40	0,025	H <sub>2</sub> O/EtOH
Pfote		8	20	0,05	H <sub>2</sub> O/EtOH	
Ischiasnerv		6	40	0,025	H <sub>2</sub> O/EtOH	
Lymphknoten		6	40	0,025	H <sub>2</sub> O/EtOH	
Tumor		6	40	0,025	H <sub>2</sub> O/EtOH	
Thrombozyten		5	20	*2*10 <sup>7</sup>	ACD**	
Zellkultur	MCF-7-Zellen	5	150	*5*10 <sup>5</sup>	PBS	

### 2.3.1 Präanalytik

Die Präanalytik ist für Biomarker-Studien von großer Relevanz. Präanalytik umfasst den Umgang mit den Proben sowie deren Lagerbedingungen zwischen Probennahme und Messung. Je nach Lagerbedingung, -zeit und Matrix besteht die Möglichkeit, dass die Analyten *ex vivo* gebildet, aus Zellen freigesetzt oder (nicht-) enzymatisch zersetzt werden. Da die analytischen Verfahren i.d.R. den *in vivo* Zustand abbilden sollen, müssen Veränderungen des Lipidprofils während und nach der Probenentnahme ausgeschlossen bzw. reproduzierbar werden. Aus diesem Grund wurde das Vollblut und Plasma von zehn gesunden Probanden nach erfolgter Einverständniserklärung für 20 min, 1, 2, 4 und 24 h bei Raumtemperatur oder in Eiswasser gelagert und die Ergebnisse mit direkt verarbeiteten Proben verglichen. Dafür wurde venöses Blut mit 9 und 2,7 mL K<sub>3</sub>EDTA- sowie 3,1 mL GlucoExact-Röhrchen entnommen (alle von Sarstedt, Nümbrecht). Die Abtrennung der Plasmafraktion erfolgte nach der entsprechenden Inkubation bei allen Proben durch 10 min Zentrifugation bei 2.000\*g und 4 °C. Die Vollblutproben wurden in den Entnahmeröhrchen inkubiert, nach Zentrifugation die Plasmafraktion entnommen und auf mehrere Aliquots für die Messung in verschiedenen Projekten aufgeteilt. Hingegen wurden die Plasmaproben direkt zentrifugiert, probandenweise gepoolt und auf mehrere 200 µL Aliquots in 1,5 mL Polypropylen-Röhrchen verteilt, die dann für die entsprechende Dauer gelagert wurden. Die fertigen Proben wurden probandenweise randomisiert und für ca. 4 h bei -20 °C zwischengelagert und anschließend bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Da die Proben neben dem Lipidomics-Screening auch noch gezielt auf andere Analytgruppen untersucht werden sollten, wurden die Proben nochmal im Kühlschrank aufgetaut und danach in Eiswasser aliquotiert. Für das Lipidomics-Screening wurden 20 µL Aliquots erstellt und wie zuvor beschrieben unter Zugabe von internen Standards extrahiert und analysiert. Weitere Details zum Versuchsaufbau sind in Abbildung 18 dargestellt.



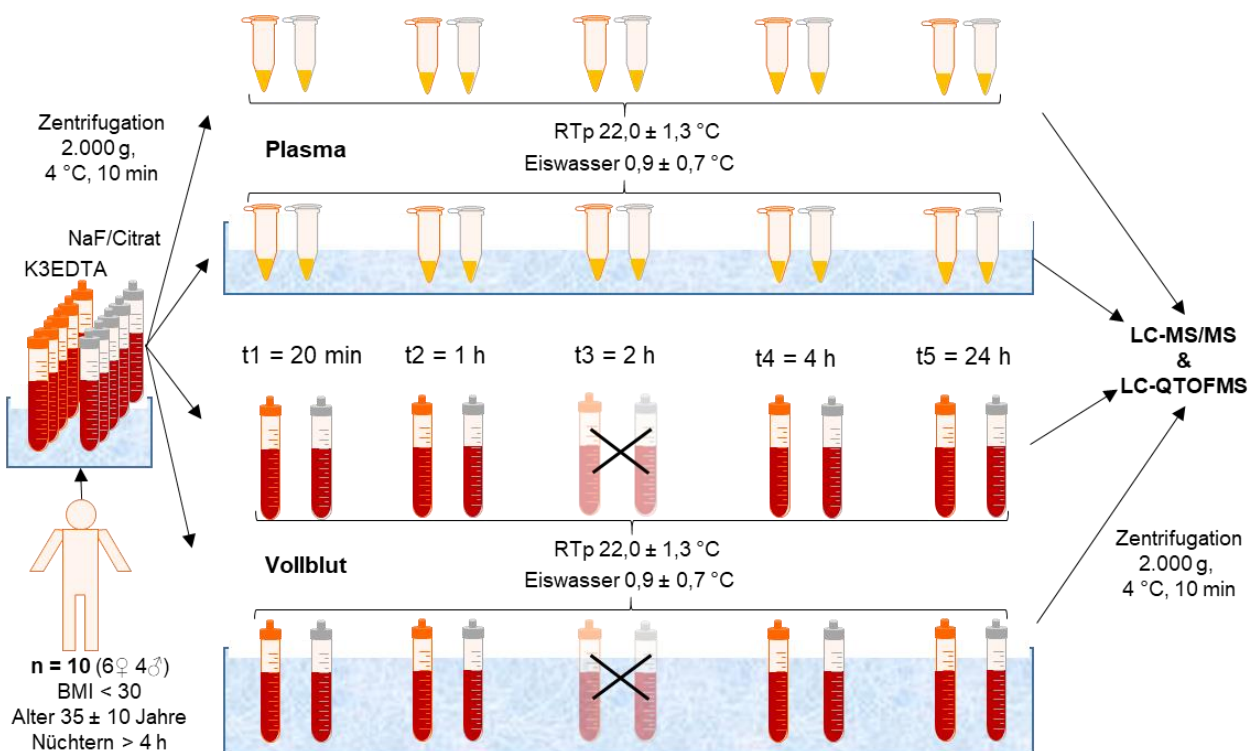


Abbildung 18: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Stabilität des Lipidoms in humanem Vollblut und Plasma bei Raumtemperatur und in Eiswasser.

Es wurden die Antikoagulanzen K<sub>3</sub>EDTA und Natriumfluorid/Citrat verwendet und das Experiment wurde probandenweise durchgeführt. Als Kontrolle wurden in Eiswasser gelagerte, direkt aufgearbeitete Proben verwendet. Die Zeit zwischen Blutentnahme und Einfrieren betrug ca. 25 min. Die Temperatur wurde tagesweise als minimaler und maximaler Wert erfasst. Die Lagerung für t<sub>5</sub> = 24 h erfolgte über Nacht im Kühlschrank (0–6 °C). Nach der angegebenen Lagerdauer wurden die Lipide extrahiert und die Proben mit verschiedenen LC-MS-Methoden gemessen.

Die Daten wurden untargeted mit MarkerView ausgewertet und auf das Signal aller internen Standards normalisiert. Anschließend wurden Signale, die als Isotop identifiziert werden konnten, deren Peakfläche bei mehr als 20% der Proben geringer als die Peakfläche in den Blank Proben waren, sowie Signale mit einer RSD > 20% in den QC-Proben, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Für die semi-targeted Auswertung erfolgte die Peakintegration mit MultiQuant, dabei wurden die Lipidklassen jeweils mit einem internen Standard normalisiert. Die chromatographischen Peakflächen der NaF/Citrat-Proben wurde mit 1,16 multipliziert, um die Verdünnung durch das flüssige Antikoagulans auszugleichen.

Die univariate Auswertung erfolgte mit R (siehe Abschnitt 2.1.4), dabei wurden Signale, die bei dem Friedman-Test einen FDR-korrigierten p-Wert kleiner als 0,05 hatten, mit MasterView identifiziert. Analyten mit mehr als 20% fehlenden Werten wurden entfernt, die restlichen fehlenden Werte wurden durch die Hälfte des Minimums ersetzt. Die Daten vom positiven und negativen Ionisationsmodus wurden gemeinsam ausgewertet. Um zu vermeiden, dass aufgrund der sehr großen Anzahl Tests mögliche Veränderungen übersehen werden, wurden auch noch die Signale mit einem p-Wert kleiner als 0,1 betrachtet. Identifizierte Lipide wurden wie zuvor beschrieben mit MultiQuant ausgewertet. Eine Post-hoc-Analyse des Friedman-Test ist in R nicht durchführbar,

deswegen wurden gepaarte t- und Wilcoxon-Tests verwendet, um die Unterschiede zwischen den Einzelgruppen näher zu untersuchen.

Außerdem wurde durch Daniel Kratz der Proteingehalt in den Kontrollproben mittels Bradford-Test bestimmt. Die Proben wurden 1:200 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt und anschließend 10 µL mit 250 µL Bradford-Reagenz für 5 min bei RTp vermengt. Die Standardkurve wurde mit 0,05–0,8 mg/mL bovinen Serumalbumin hergestellt ( $R^2 > 0,99$ ). Es wurden je drei K<sub>3</sub>EDTA- und NaF/Citrat-Röhrchen mit PBS gefüllt und die gemessenen Absorptionen (595 nm, Tecan Infinite F200 Pro, Männedorf, Schweiz) von den restlichen Werten subtrahiert, um unterschiedliche Empfindlichkeiten durch die Antikoagulanzen auszuschließen. Obendrein wurde der pH-Wert in gepooltem K<sub>3</sub>EDTA- und NaF/Citrat-Plasma mit einem HI 221 pH-Meter (Hanna Instruments, Vöhringen) bestimmt.

### 2.3.2 Entzündungsmodelle in Mäusen

Um eine akute Entzündung darzustellen, werden verschiedene Tiermodelle verwendet, meistens unter Einsatz von Nagetieren [235]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Vergleichbarkeit zwei dieser Modelle untereinander und zu gesunden Tieren auf dem Lipid-Level zu überprüfen. Untersucht wurden die Entzündungsmodelle durch Injektion von Lipopolysaccharid (LPS), ein bakterielles Endotoxin, oder Zymosan, ein Glykan aus Hefepilzen. Dazu wurde jeweils acht C57BL/6NRj Mäusen (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) entweder 10 µL LPS (0,1 mg/mL) oder Zymosan (3 mg/mL) in die rechte Hinterpfote injiziert. Zur Kontrolle wurden acht unbehandelte Tiere verwendet. Nach 5 h wurden die Mäuse mit Kohlenstoffdioxid terminal anästhesiert, 300 µL Blut entnommen und dabei mit 30 µL Citrat-Lösung (0,106 M) gemischt. Das Blut wurde in ein Gefäß mit 500 µL PBS mit 10% ACD-Puffer überführt und für 15 min bei 300\*g zentrifugiert. Von jeder Maus wurde das Blutplasma, die linke (contralateral) und die rechte (ipsilateral) Pfote entnommen und bis zur weiteren Probenaufarbeitung bei -80 °C eingefroren. Der Versuch entsprach den Richtlinien zur Haltung und Nutzung von Versuchstieren und wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt.

Der Tierversuch und die Gewebeentnahme wurden durch Dr. Sandra Pierre durchgeführt, die anschließende Probenaufarbeitung und Messung wurden eigenständig vorgenommen. Die Pfoten wurden in verstärkte 2 mL Gefäße für die Precellys 24 eingewogen und 5 Zirkoniumdioxid-Kugeln sowie Wasser:Ethanol (3:1, v/v) ergänzt, sodass die Gewebekonzentration bei 0,05 mg/µL lag. Die Homogenisierung erfolgte zweimal für 45 s bei 6.500 rpm (Herstellerangabe, Bewegung des Gerätes beschreibt eine 3-dimensionale Acht) und unter 10 °C. Von den Gewebekomogenaten und den Plasmaproben wurden jeweils 20 µL extrahiert. Für die Qualitätskontrollproben wurde das Plasma aller Mäuse sowie die Homogenate von 24 der 48 Proben gepoolt. Die Messung erfolgte im positiven und negativen Ionisationsmodus mit der hier beschriebenen Methode. Im negativen Modus kam es

zu einer Fehlinjektion bei der Plasmaprobe einer Kontrollmaus, weshalb diese Probe von der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurde.

Die Daten wurden untargeted ausgewertet und mit den Signalen aller in dem jeweiligen Messmodus detektierbaren internen Standards normalisiert. Wie unter 2.1.4.1 erwähnt, wurde auch der Proteingehalt in den Gewebehomogenaten bestimmt, da dieser aber in den entzündeten Pfoten erhöht war, konnte er nicht für die Normalisierung verwendet werden (siehe auch Absatz 3.1.4.1).

Die Auswertung der Datensätze der Plasmaproben und der Pfoten erfolgte getrennt. Mittels ANOVA ( $p$  FDR < 0,05) wurden signifikant veränderte Signale in den Proben ausgewählt, aus denen verschiedene Lipide identifiziert wurden. Diese wurden erneut in der MultiQuant Software (v3.0.2, Sciex, Darmstadt) integriert und mit einem IS pro Lipidklasse normalisiert. Die multivariate Auswertung erfolgte mit MetaboAnalyst und die univariate Analyse mit R.

## 2.4 Reagenzien und Chemikalien

In den nachfolgenden Tabellen werden die verwendeten Reagenzien und Lösungen sowie deren Herstellung erläutert.

Tabelle 11: Standardsubstanzen zur anfänglichen Methodenentwicklung.

Der negMix wurde für die Optimierung im negativen und der posMix für die Optimierung im positiven Ionisationsmodus verwendet. Her. = Hersteller, A = Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), C = Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA).

Analyt	Her.	[M-H] <sup>-</sup> [m/z]	[M+H] <sup>+</sup> [m/z]	Konzentration [ng/ mL]	
				posMix	negMix
PGD2	C	351,2177	353,2323	-	100
PGE2	C	351,2177	353,2323	-	100
LPA18:0	A	437,2673	439,2819	-	5000
LPA 18:1	A	435,2517	437,2663	-	500
LPA 20:0	A	465,2986	467,3132	-	10000
LPC 16:0	A	494,3252	496,3398	100	-
LPC 18:0	A	522,3565	524,3711	100	-
LPC 24:0	A	606,4504	608,4650	500	-
15S-Hydroxyeicosatetraensäure	C	319,2279	321,2425	-	100
Shingosin	A	298,2751	300,2897	100	-
Sphinganin	A	300,2908	302,3054	100	-
Sphingosin-1-phosphat	A	378,2415	380,2561	500	100
SM d18:1/16:0	A	701,5603	703,5749	2500	-
Cer d18:1/14:0	A	508,4735	510,4881	2500	-
Cer d18:1/8:0	A	564,5361	566,5507	5000	-
Cer d18:1/18:1	A	562,5205	564,5351	10000	-
Cer-1-phosphat d18:1/8:0	A	504,3459	506,3605	-	5000
Cer d18:1/24:0	A	648,6300	650,6446	10000	-
Cer d18:1/24:1	A	646,6144	648,6290	5000	-
Arachidonsäure	C	303,2329	305,2475	500	100
Docosahexaensäure	C	327,2329	329,2475	5000	-
Eicosapentaensäure	C	301,2173	303,2319	100	-
2-Arachidonylglycerol	C	377,2697	379,2843	100	-
N-Arachidonylethanolamid	C	346,2751	348,2897	100	-
Palmitoylethanolamid	C	298,2751	300,2897	100	-

Tabelle 12: Arbeitslösung der internen Standards (150 µL pro Probe).

Alle internen Standards wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) erworben. \*konnte in den Proben nicht detektiert werden.

Interner Standard	Negativer Modus		Positiver Modus		Konz. [ng/mL]
	Addukt	[m/z]	Addukt	[m/z]	
Arachidonsäure-d8	-H <sup>+</sup>	311,2832	-	-	8,33
CE 18:1-d7	-	-	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	675,6780	4650
Cer d18:1/16:0-d7	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	589,5531	+H <sup>+</sup>	545,5633	6,67
Cholesterol-d7	-	-	-OH	376,3955	1330
DG 15:0/18:1-d7	-	-	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	605,5844	157
LacCer d18:1/17:0	-	-	+H <sup>+</sup>	876,6407	53,3
LPC 18:1-d7	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	573,3892	+H <sup>+</sup>	529,3994	317
LPC O-16:0-d4	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	530,3754	+H <sup>+</sup>	486,3856	16,7
LPE 18:1-d7	-H <sup>+</sup>	485,3379	+H <sup>+</sup>	487,3524	6,67
LPG 17:1	-H <sup>+</sup>	495,2728	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	514,3140	31,7
LPI 17:1	-H <sup>+</sup>	583,2889	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	602,3300	14,2
PC 15:0/18:1-d7	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	797,6032	+H <sup>+</sup>	753,6134	2110
PC O-18:0/18:1-d9	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	825,6678	+H <sup>+</sup>	781,6780	104
PE 15:0/18:1-d7	-H <sup>+</sup>	709,5519	+H <sup>+</sup>	711,5664	66,7
PE O-18:0/18:1-d9*	-	-	-	-	0,933
PG 15:0/18:1-d7	-H <sup>+</sup>	740,5465	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	759,5876	63,3
PI 15:0/18:1-d7	-H <sup>+</sup>	828,5625	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	847,6036	113
PS 15:0/18:1-d7	-H <sup>+</sup>	753,5417	+H <sup>+</sup>	755,5563	261
SM d18:1/18:1-d9	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	782,6368	+H <sup>+</sup>	738,6470	393
TG 15:0/18:1-d7/15:0	-	-	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	829,7985	759

## Materialien und Methoden

Tabelle 13: Weitere Reagenzien und Chemikalien.

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
Aceton, HPLC grade	Carl-Roth, Karlsruhe
Acetonitril, LC-MS grade	Carl-Roth, Karlsruhe
Acetonitril, ULC-MS grade	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Ameisensäure > 98%	AppliChem, Darmstadt
Ameisensäure > 99,5%, LC-MS grade	Fisher Scientific, Schwerte
Ammoniak 25%	Merck, Darmstadt
Ammoniumformiat > 99,0%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumhydrogencarbonat > 99%	VWR, Darmstadt
APCI negative calibration solution	Sciex, Darmstadt
APCI positive calibration solution	Sciex, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (Heatshock Fraktion, ≥ 98%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform > 99,8%	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Citronensäure-Monohydrat, p.a.	VWR, Darmstadt
Dichlormethan > 99,9%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> frei)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Glucose (Dextran), p.a.	VWR, Darmstadt
Isopropanol, LC-MS grade	Carl-Roth, Karlsruhe
Isopropanol, ULC-MS grade	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Methanol, LC-MS grade	Carl-Roth, Karlsruhe
Methyl- <i>tert</i> -butylether (MTBE), LC-MS grade	Carl-Roth, Karlsruhe
Sulfinpyrazon 100%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetrahydrofuran (THF) > 99,9%	Carl-Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat-Dihydrat, p.a.	VWR, Darmstadt
Wasser + 0,1% Ameisensäure, ULC-MS grade	Biosolve, Valkenswaard, Niederlande
Wasser, LC-MS grade	Carl-Roth, Karlsruhe
Zymosan A	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 14: Herstellung von Puffern und Lösungen.

Lösung	Herstellung
0,1% Ameisensäure in Wasser + 1 mM Ammoniumformiat	Zu 1 L Wasser wurden 1 mL Ameisensäure und 1 mL 1 M Ammoniumformiat gegeben.
0,1% Ameisensäure in Wasser + 10 mM Ammoniumformiat	1 mL Ameisensäure und 10 mL 1 M Ammoniumformiat wurden in 1 L Wasser gelöst.
1 M Ammoniumformiat	15,789 g Ammoniumformiat wurden in 250 mL Wasser gelöst.
10% NH <sub>4</sub> OH in MeOH	Zu 920 µL Methanol wurden 80 µL 25% Ammoniak gegeben.
150 mM Ammoniumhydrogencarbonat	1,186 g Ammoniumhydrogencarbonat werden in 100 mL Wasser gelöst.
2% Ameisensäure in Methanol	2 mL Ameisensäure wurden zu 98 mL Methanol gegeben.
5% NH <sub>4</sub> OH in MeOH	Zu 920 µL Methanol wurden 40 µL 25% Ammoniak gegeben.
50 mM Ammoniumformiat	500 µL 1 M Ammoniumformiat wurden zu 9,5 mL Wasser gegeben.
ACD-Puffer (~pH 4,5)	In 1 L Wasser wurden 14 g Citronensäure-Monohydrat (final 66,6 mM), 25 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (final 85 mM) und 20 g Glucose (final 111 mM) gelöst.
Acetonitril: Isopropanol (2:3, v/v) + 0,1% Ameisensäure	Zu 600 mL Isopropanol wurden 400 mL Acetonitril und 1 mL Ameisensäure gegeben.
Acetonitril: Wasser (7:3, v/v)	Zu 700 mL Acetonitril wurden 300 mL Wasser gegeben.
MTBE:MeOH:Wasser (10:3:2,5, v/v, Lösungsmittel für Reextraktion)	60 mL MTBE, 18 mL Methanol und 15 mL Wasser wurden gemischt und anschließend die obere Phase entnommen und verwendet.
Sulfinpyrazon 1 µg/mL	Zu 100 µL 100 µg/mL Sulfinpyrazon wurden 9,9 mL Acetonitril gegeben.
Sulfinpyrazon 100 µg/mL	10 mg Sulfinpyrazon wurden in 100 mL Acetonitril gelöst.

## 2.5 Geräte

### 2.5.1 Allgemeine Laborgeräte und –materialien

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien und Hersteller.

Material	Hersteller
Chromabond PSA SPE-Kartusche 30 mg	Macherey-Nagel, Weilmünster
Chromabond SA SPE-Kartusche 30 mg	Macherey-Nagel, Weilmünster
Combitips (Multipette)	Eppendorf, Hamburg
Glaseinsatz 250 µL, klar	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe
Glasflasche, klar, 0,25–1L	SCHOTT AG, Mainz
Glasvial, klar, 1,5 mL	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe
Kinetex 1,7 µm C8 100 Å, 100x2,1 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
OASIS MCX SPE-Kartusche 30 mg	Waters, Eschborn
OASIS WCX SPE-Kartusche 30 mg	Waters, Eschborn
Phree SPE-Kartusche 30 mg	Phenomenex, Aschaffenburg
Pipetten 2–20 µL/20–200 µL/100–1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Poroshell 120 EC-C8 2,7 µm, 50x2,1 mm	Agilent, Waldbronn
Precellys-Kügelchen (Zirkoniumdioxid), > 2,8 mm	Merck, Darmstadt
Reagiergefäße (Safelock), klar, 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (Safelock), klar, 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße, klar, 1,5 mL	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Reagiergefäße, PP klar, 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubkappen, KG, 9 mm iD, Sil/PTFE 1,0 mm	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe
SecurityGuard ULTRA C18, 5 x 2,1 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
SecurityGuard ULTRA C8, 5 x 2,1 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
S-Monovette 2,7 mL, K3-EDTA 66 x 11 mm	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette 3,1 mL, GlucoExact 66 x 11 mm	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette 9 mL, K3-EDTA 92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Strata WCX SPE-Kartusche 100 mg	Phenomenex, Aschaffenburg
Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 1,8 µm, 50x2,1 mm	Agilent, Waldbronn
Zorbax Eclipse Plus C8 RRHD 1,8 µm, 50x2,1 mm	Agilent, Waldbronn

Tabelle 16: Allgemeine Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
Abdampfgerät, beheizbar	Liebisch, Bielefeld
Fluoreszenz-Mikroplattenleser Infinite F200 Pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
HI 221 pH-Meter	Hanna Instruments, Vöhringen, Deutschland
IKA Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Precellys 24	Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Schwingmühle MM400	Retsch, Düsseldorf
Semimikrowaage MSA125P	Sartorius, Göttingen
Ultraschallbad	VWR, Darmstadt
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge 15	Thermo Fisher Scientific, Dreieich



## 2.5.2 LC-MS-System

Tabelle 17: LC-MS-System.

Komponente	Hersteller
Calibrant Delivery System	Sciex, Darmstadt
DuoSpray Ionenquelle	Sciex, Darmstadt
Nexera X2, CBM-20A, Controller	Shimadzu, Duisburg
Nexera X2, CTO-30A Säulenofen	Shimadzu, Duisburg
Nexera X2, DGU-20A5R Degasser	Shimadzu, Duisburg
Nexera X2, LC-30AD Pumpe	Shimadzu, Duisburg
Nexera X2, SIL-30 AC Autosampler	Shimadzu, Duisburg
NGU22-LC/MS, Stickstoff-Generator	cmc Instruments, Eschborn
Probenschleife, 50 µL	Shimadzu, Duisburg
Sogevac SV65 BI FC Vor-Vakuumpumpe	Leybold, Köln
TripleTOF6600	Sciex, Darmstadt

## 2.5.3 Software

Tabelle 18: Software.

Software	Version	Entwickler	Einsatzgebiet
Analyst TF	1.71	Sciex, Darmstadt	Datenerfassung, Steuerung LC-MS
Excel	2013/2016	Microsoft Corp.	Statistische Auswertung
LibraryView	1.0.1	Sciex, Darmstadt	Datenbank mit MS/MS-Spektren
MarkerView	1.21	Sciex, Darmstadt	Peak Alignment
MasterView	1.1	Sciex, Darmstadt	Qualitative Auswertung
MetaboAnalyst	4.0	Xia Lab, McGill Universität, Quebec, Kanada	Statistische Auswertung
MultiQuant	3.0.2	Sciex, Darmstadt	Semi-quantitative Auswertung
PeakView	2.2	Sciex, Darmstadt	Qualitative Auswertung
R	3.6.1	R Development Core Team	Statistische Auswertung
RStudio	1.2.1335	RStudio Inc	Umgebung für R

Tabelle 19: R-Pakete.

Paket	Version
Amelia	1.7.5
caret	6.0-84
DMwR	0.4.1
dplyr	0.8.3
ggplot2	3.2.1
lattice	0.20-38
multcomp	1.4-10
nlme	3.1-140
NormalizeMets	0.25
openxlsx	4.1.01
rcompanion	2.3.7
reshape2	1.4.3
tidyr	0.8.3
xlsx	0.6.1

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Methodenentwicklung einschließlich Probenaufarbeitung, Chromatographie, Massenspektrometrie und Datenprozessierung dargestellt. Im Anschluss wird die LC-MS-Methode sowie die Stabilität der Proben während der Probenvorbereitung überprüft. Zuletzt wird die Anwendung der Methode zur Aufklärung biologischer Fragestellungen gezeigt.

#### 3.1 Methodenentwicklung

##### 3.1.1 Probenaufarbeitung

Für die Extraktion der Lipide aus Plasmaproben wurden die Flüssig-Flüssig-Extraktionen nach Folch, Bligh und Dyer sowie nach Matyash untersucht [221-223]. Dabei wurden keine qualitativen Unterschiede im Lipidprofil festgestellt. Gemäß Literatur sind die Extraktionsraten der drei Verfahren vergleichbar, wobei die Extraktionsrate der polaren Lipide wie den LPC mit der Folch-Methode geringfügig höher sind [236-238]. Dies konnte ohne Referenzstandards in den durchgeführten Experimenten nicht verifiziert werden. Die Extraktion mit MTBE nach Matyash erwies sich einfacher in der Handhabung, da die organische Phase einfacher vollständig entnommen werden konnte. Außerdem ist MTBE besser verträglich für die Umwelt und Gesundheit, deswegen wurde die LLE mit MTBE für weitere Untersuchungen verwendet [239]. Die Proteinfällung mit Methanol wurde ausgeschlossen, aufgrund der intensiveren Störsignale nach der Totzeit.

Neben der LLE wurden auch verschiedene Festphasenprotokolle ausprobiert. Im Gegensatz zur LLE können bei der SPE durch die Wahl verschiedener Sorbentien gezielt Analytgruppen anhand ihrer physikochemischen Eigenschaften angereichert oder abgetrennt werden. In diesem Fall hatte dies zum Ziel, die abundanten phosphocholinhaltigen Lipide abzureichern, da diese durch Ionensuppression die Detektion niedriger konzentrierterer Lipide, wie PS oder PG, beeinträchtigen können. Dafür wurden verschiedene Kartuschen mit Kationenaustausch-Eigenschaften wie die Strata WCX und die Oasis MCX getestet. Bei den Kartuschen, die neben ihrer Eigenschaft als Ionenaustauscher auch als Umkehrphase fungieren, wurde vor dem Beladen eine Proteinfällung durchgeführt. Erste Versuche mit unterschiedlichen Protokollen zeigten, dass die phosphocholinhaltigen Lipide weiter in allen Fraktionen vorkamen, mit Ausnahme der Phree Kartuschen, die sämtliche phosphathaltigen Lipide inklusive der PS, PG und S1P entfernten. Mit den MCX Kartuschen wurden die Signale der PC, PE und von S1P reduziert, daraus ergab sich allerdings kein Vorteil für die Detektionsgrenzen der PS oder PG.

In Anlehnung an das Protokoll von Johnson *et al.* wurde weiter versucht, die Konzentration phosphocholin-haltiger Lipide in bereits mit LLE extrahierten Plasmaproben mit Hilfe von Normalphasen-Kationenaustauscher-Kartuschen zu reduzieren [220]. Damit konnten diese erfolgreich abgereichert werden, jedoch wurde die Probenvorbereitung sehr zeitintensiv. Zudem sind durch die SPE zusätzliche Signale hinzugekommen (Abbildung 19). Solche zusätzlichen Signale

waren bei allen untersuchten Kartuschen und Fraktionen vorhanden, unterschieden sich jedoch qualitativ sowie quantitativ. Hingegen waren extrahierte Lösungsmittelproben nach der LLE vergleichbar mit reinen Lösungsmittelinjektionen. Die Blankensignale, bei denen es sich teilweise um Lipide, wie LPC 16:0 und 18:0 sowie TG, handelte, können die Auswertung erschweren. Die Lipide in den Blankproben wurden entweder aus den Kartuschen rausgelöst oder es handelte sich um bereits vorhandene Signale, deren Ionisierung durch Rückstände aus der SPE verstärkt wurde.

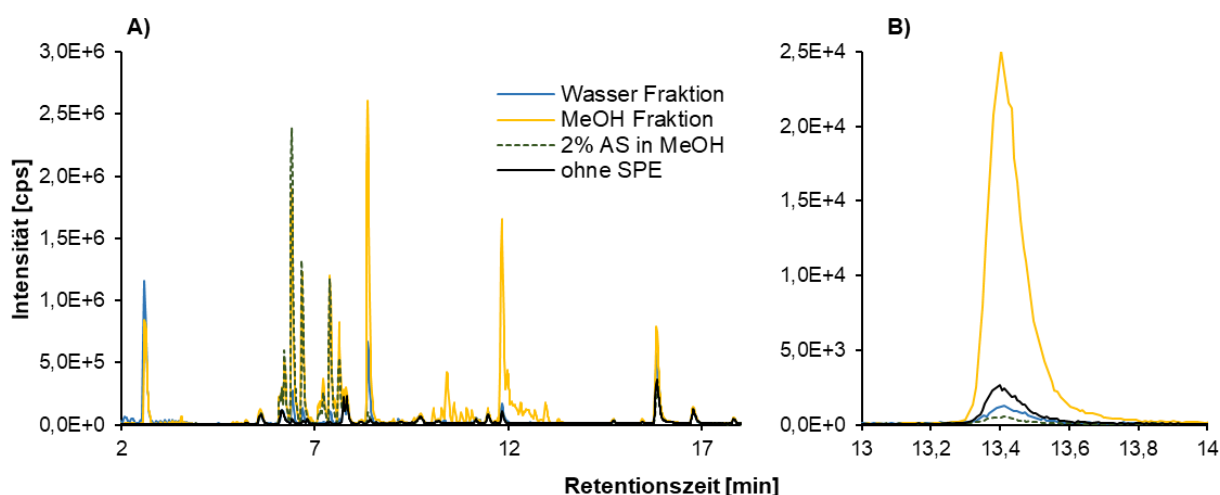


Abbildung 19: LC-MS-Hintergrundsignale nach einer Festphasenextraktion.

(A) Abgebildet ist das Basispeak-Chromatogramm (BPC) der verschiedenen Fraktionen einer Festphasenextraktion (SPE) von 100 µL einer Lösung mit 1 µg/mL Sphingomyelin (SM) 34:1 mit einer Strata WCX-Kartusche im Vergleich zur direkt abgedampften Probe (ohne SPE). Das Signal von SM 34:1 bei 13,4 min ist im BPC nicht erkennbar. (B) Extrahierte Ionenchromatogramm von SM 34:1 ( $m/z$  703,5749  $\pm$  0,0035). AS = Ameisensäure, MeOH = Methanol.

Letztlich wurde die LLE mit MTBE wie nachfolgend beschrieben weiter optimiert. Die Reproduzierbarkeit der LLE mit MTBE wurde durch die Reextraktion mit 200 µL MTBE:Methanol:H<sub>2</sub>O (10:3:2,5; v/v/v) verbessert, womit die mittlere RSD im Vergleich zu 10% ohne Reextraktion auf 4,7% gesenkt werden konnte. Die chromatographischen Peakflächen der LPC und LPE waren nach der Reextraktion 10 bis 20% größer. Bei der Extraktion im Verhältnis Probe:MTBE:Methanol:H<sub>2</sub>O von 0,4:10:3:2,5 (v/v/v/v) konnten 10 bis 40 µL Plasma reproduzierbar extrahiert werden. Des Weiteren wurde die Robustheit der Extraktion gegenüber Veränderungen der Lösemittelanteile durch Zugabe von 30 bzw. 80 µL Wasser zu 20 µL Plasma überprüft. Während nach der Zugabe von 30 µL Wasser nur geringe Änderungen sichtbar waren, nahm die Peakfläche der vergleichsweise hydrophilen Lipide, wie den LPI und den LPC mit einer Kohlenstoffkettenlänge von 14 bis 16, nach der Zugabe von 80 µL Wasser stark ab (Abbildung 20). Dieses Phänomen kann die Extraktionsraten in Zellpellet-Proben bei unvollständiger Trocknung beeinflussen. Aus diesem Grund wurde bei Zellproben der Überstand nicht mehr abgenommen, sondern die entsprechende Anzahl Zellen in 150 µL PBS vorgelegt und damit die wässrige Phase während der Extraktion ersetzt.

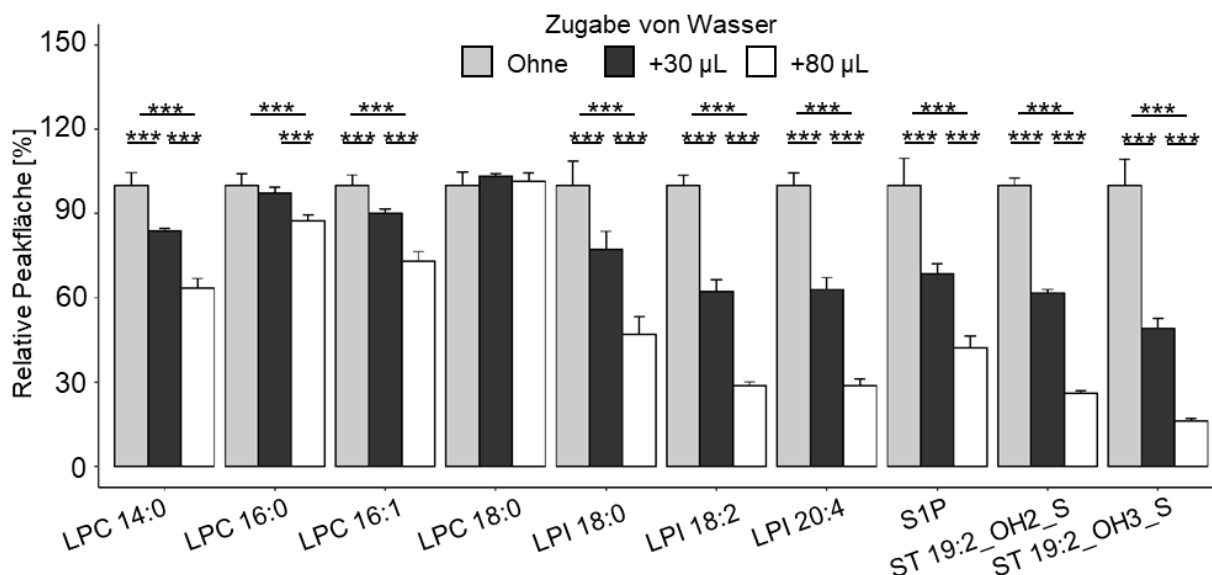


Abbildung 20: Einflüsse des Anteils der wässrigen Phase während der Extraktion.

Zu 20 µL Plasma wurden unterschiedliche Volumina an Wasser hinzugegeben und anschließend extrahiert. Dargestellt sind die relativen Unterschiede der chromatographischen Peakflächen im Vergleich zu den Proben ohne Wasserzugabe. (ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveau: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001, n=6).

Die wässrige Phase bei der Extraktion wurde durch 0,025–0,1% Ameisensäure sowie 50–100 mM Ammoniumformiat ersetzt, dabei wurden in drei unabhängigen Versuchsreihen mit je drei bis sechs Replikaten keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Lediglich die durchschnittliche RSD war bei den 50 mM Ammoniumformiat Proben um wenige Prozentpunkte besser, deswegen wurde diese weiterverwendet. Des Weiteren wurde die Verwendbarkeit von verschiedenen Probengefäßen, wie Glasvials und Polypropylen-Reaktionsgefäßen (PP), für die Extraktion und das Abdampfen analysiert. Bei der Extraktion in PP waren die Peakflächen gesättigter FA wie Palmitin- und Stearinsäure um 49 bzw. 77% erhöht (Abbildung 21). Auch einige Triglyceride wie TG 44:2, 46:3, 56:1 58:1 and 58:2 waren um ca. 15% erhöht (siehe Anhang Tabelle 33). Wenn die Proben anschließend auch noch in PP abgedampft wurden, stieg das Signal der Palmitin- und Stearinsäure weiter an. Zudem waren die Peakflächen einiger Ether-Spezies wie LPC O-16:1, LPE O-16:1, LPE O-18:1 and PE O-18:1\_18:1 verringert, wenn die Proben in PP abgedampft wurden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die PE und Ether-Spezies and dem Kunststoff haften und nicht ausreichend rückgelöst werden können. Bei den in PP extrahierten und in Glas abgedampften Proben stieg außerdem FA 20:4 um 11% an, andere FA zeigten hingegen nur geringe Änderungen. Als Kompromiss für die einfache Handhabung wurden deshalb für die weitere Extraktion PP und für das Abdampfen Glasvials verwendet. Dennoch sollte beachtet werden, dass nicht alle Reaktionsgefäße für die Lipidextraktion mit organischen Lösungsmitteln geeignet sind. So war bei Plasmaproben, die in Gefäßen der Firma Greiner Bio One (Kremsmünster, Österreich) extrahiert wurden, ein deutliches Störsignal erkennbar (siehe Abbildung 21 B).

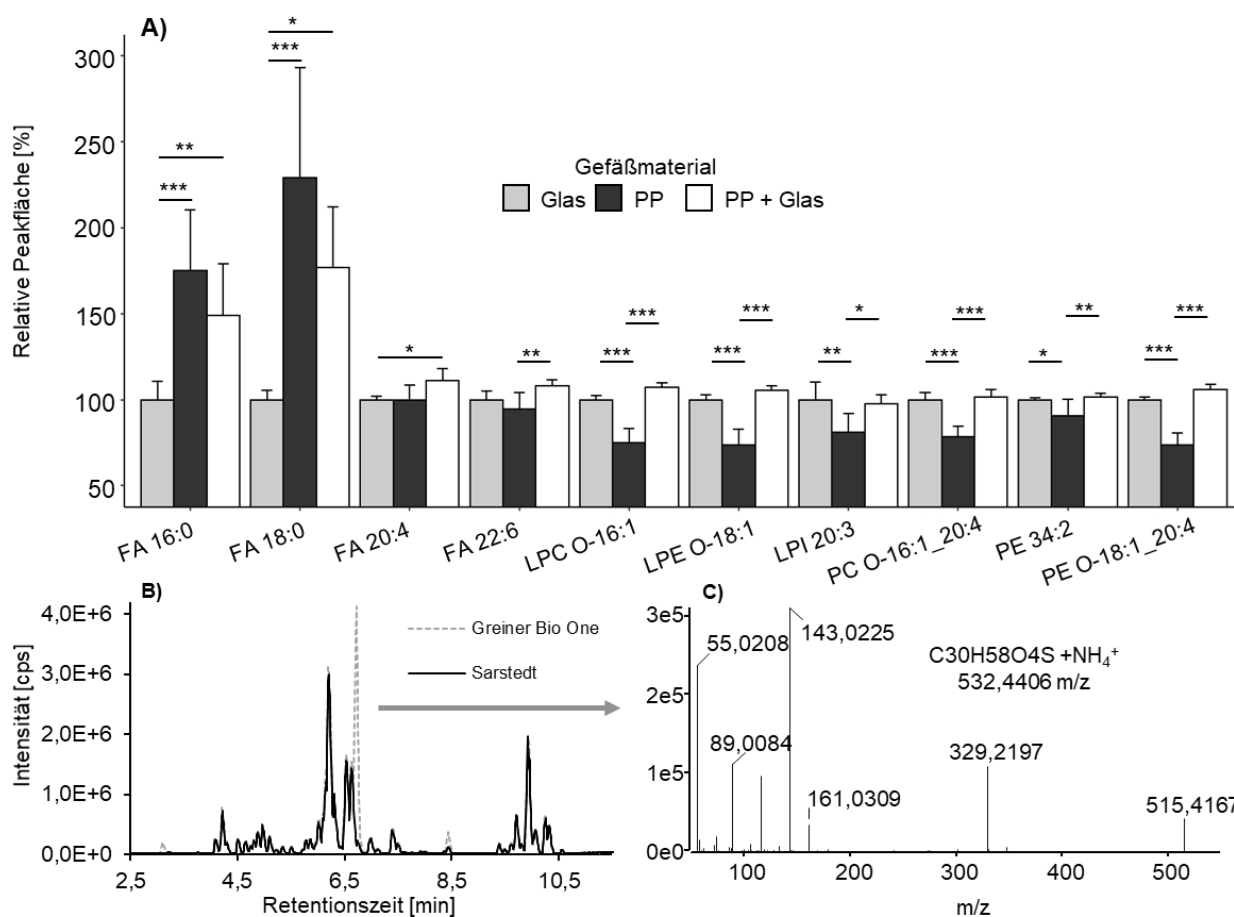


Abbildung 21: Einfluss des Extraktionsgefäß-Materials bei der Extraktion und beim Abdampfen.

(A) Die Proben wurden entweder in Glasvials oder PP extrahiert und abgedampft oder in PP extrahiert und in Glasvials abgedampft. Alle Peakflächen sind relativ zum Mittelwert der Flächen der in Glasvials extrahierten und abgedampften Proben. (ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveau: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n=6$ ). (B) Basispeak-Chromatogramm von Humanplasma, das in Sarstedt oder Greiner Bio One Reaktionsgefäßen extrahiert wurde ( $n=6$ ). (C) MS/MS-Spektrum von 532,4406  $m/z$  bei einer Retentionszeit von 6,7 min (Greiner Bio One Reaktionsgefäß). Bei dem Störsignal bei 6,7 min könnte es sich um Didodecylthiodipropionat handeln.

Die Untersuchung der Inkubationszeiten nach der Phasentrennung und der Reextraktion zeigte nur geringe Unterschiede. Lediglich die Peakfläche einiger Ether-LPE und -PE nahm mit zunehmender Inkubationszeit um bis zu 20% ab (siehe Abbildung 22 sowie Tabelle 34 im Anhang). Außerdem waren die Ergebnisse nach 1 min Inkubationszeit reproduzierbar. Demnach konnte die Annahme, dass die längeren Lagerzeiten zur Einstellung eines stabilen Gleichgewichtes bzw. zur vollständigen Lösung der Lipide benötigt werden, nicht bestätigt werden. Durch die Verwendung von leicht zu öffnenden PP und den verkürzten Inkubationszeiten, konnte der Probendurchsatz mehr als verdoppelt werden.

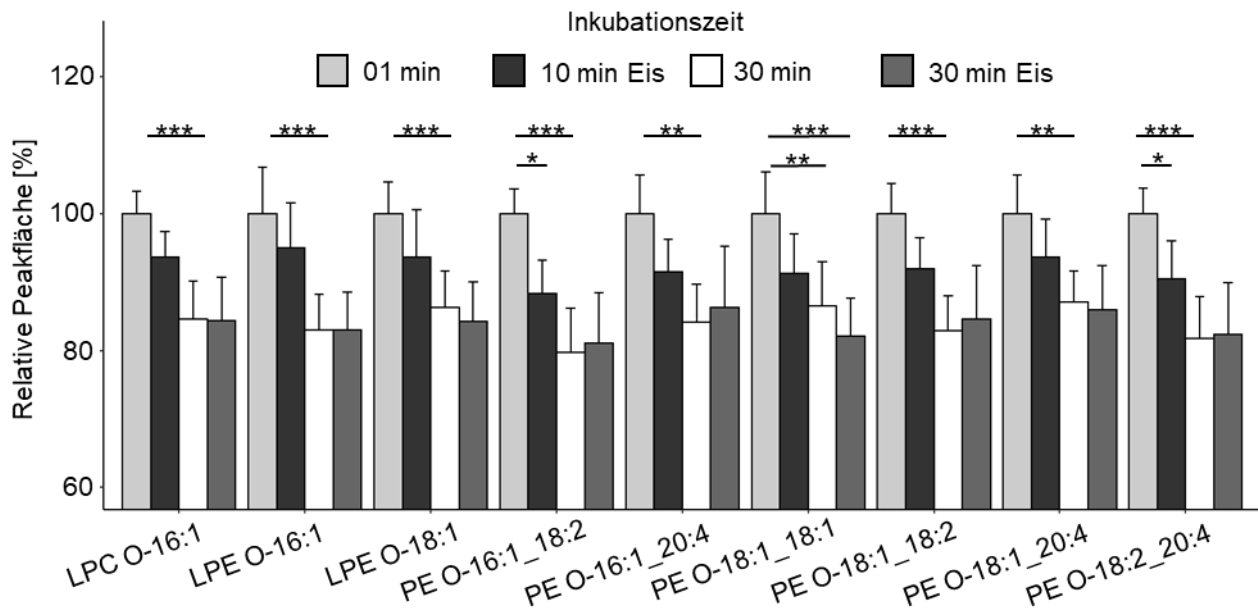


Abbildung 22: Einfluss der Inkubationszeit während der Extraktion von Humanplasma.

Nach Induktion der Phasentrennung und während der Reextraktion wurden die Proben für die angegebene Zeit in Eiswasser oder bei 6 °C auf einem Rotor gelagert. Angegeben werden die chromatographischen Peakflächen relativ zu den Flächen nach 1 min Inkubationszeit. Die Y-Achse wurde bei 60% geschnitten, um die Ablesbarkeit zu vereinfachen. Es werden nur die signifikanten Ergebnisse im Vergleich zu einer Minute Inkubationszeit angegeben. (ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveau: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001, n=6).

Für die Aufnahme der getrockneten Lipidextrakte wurden verschiedene Lösungsmittelgemische getestet. Dabei löste Methanol:Chloroform 2:1 (v/v) die Sterylester und Triglyceride am besten, die Peakflächen waren 20–30% größer als bei den anderen Lösungsmitteln. Mit Acetonitril: Isopropanol: Wasser 4:6:2 (v/v/v) waren die Peakflächen für die SE und TG um 30–50% verringert. Für eine optimale Löslichkeit der TG und SE müsste ein relativ apolares Lösungsmittelgemisch verwendet werden. Apolare Lösungsmittelgemische führten bei einem Injektionsvolumen von mehr als 5 µL zu einer Verschlechterung der chromatographischen Auflösung, sofern sie deutlich unpolarer als der Startgradient waren (siehe 3.1.2.3). Als Kompromiss für eine ausreichende Löslichkeit aller Lipide und ein flexibles Injektionsvolumen wurde deswegen reines Methanol zur Wiederaufnahme der extrahierten Proben verwendet. Bei späteren Versuchen wurde auch das Volumen an Aufnahme-medium erhöht, sodass eine vollständige Löslichkeit der neutralen Lipide angenommen werden kann.

Das zu extrahierende Probenvolumen kann flexibel gewählt werden, sofern die Volumenverhältnisse von Probe:MTBE:MeOH:H<sub>2</sub>O von 0,4:10:3:2,5 (v/v/v/v) beibehalten werden. Dabei kann die Aufnahme der Lipide in Glasvials mit 60 µL erfolgen. Es wird empfohlen mit Volumina von mindestens 100 µL aufzunehmen, da so eine komplette Benetzung der Gefäßinnenseite bei der Aufnahme gewährleistet werden kann.

## Übersicht Probenaufarbeitung

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Probenaufarbeitung nochmal zusammengefasst:

1. 20  $\mu\text{L}$  Probe (z.B. Plasma oder Gewebehomogenat) vorlegen.
2. 150  $\mu\text{L}$  Methanol bzw. 150  $\mu\text{L}$  interne Standards in Methanol zugeben.
3. 500  $\mu\text{L}$  MTBE zugeben.
4. 125  $\mu\text{L}$  50 mM Ammoniumformiat zugeben.
5. 1 min vortexen und für 5 min bei 20.000\*g zentrifugieren.
6. Obere Phase mit 200  $\mu\text{L}$  Pipette überführen.
7. Untere Phase mit 200  $\mu\text{L}$  MTBE:Methanol:Wasser (10:3:2,5, v/v/v) reextrahieren. Das Reextraktionsmittel ist auch zweiphasig und für diesen Schritt werden 200  $\mu\text{L}$  der oberen Phase verwendet.
8. 1 min vortexen und für 5 min bei 20.000\*g zentrifugieren.
9. Oberen Phasen vereinigen und mischen.
10. Vereinigten Phasen auf zwei Glasvials mit jeweils 290  $\mu\text{L}$  verteilen.
11. Bei 45 °C unter Stickstoff trocknen.
12. Ein Aliquot bei -20 bzw. -40 °C gelagert für die zeitnahe Messung, das andere bei -80°C.
13. Vor der Messung mit 120  $\mu\text{L}$  Methanol (5 s vortexen, 5 min schütteln lassen) aufnehmen.

Bei wässrigen Proben mit einem geringen Lipidgehalt, wie z.B. Zellüberstände, kann ggf. die wässrige Phase (50 mM Ammoniumformiat) komplett durch die Probe ersetzt werden. Auch bei Zellproben hat es sich als vorteilhaft erwiesen, diese in ca. 150  $\mu\text{L}$  PBS gelöst einzufrieren, anstatt den Überstand komplett abzunehmen. In diesem Fall wurde kein Ammoniumformiat mehr zugegeben.

### **3.1.2 Chromatographie**

Die extrahierten Proben enthalten zahlreiche Lipide darunter auch viele Isomere und Isobare, deren chromatographische Trennung wurde näher untersucht. Zunächst wurde der Einfluss des Säulenmaterials getestet.

#### 3.1.2.1 Säulenauswahl

Es wurde die Umkehrphasenchromatographie getestet, da diese eine Auftrennung nach Kohlenwasserstoff-Kettenlänge und Sättigungsgrad ermöglicht. Um eine optimale Trennleistung bei möglichst geringer Laufzeit zu erreichen, wurden verschiedene Säulen getestet. Diese sind nachfolgend aufgezählt.

## Ergebnisse

---

### Poroshell 120 EC-C8 2,7 $\mu\text{m}$ , 50x2,1 mm

Die Poroshell ist eine teilporöse Säule. Durch den kleineren longitudinalen Diffusionsweg bei größeren Partikeln und vergleichbarer Oberfläche, können teilporöse Säulen bei einem geringeren Rückdruck eine ähnliche Trennleistung wie eine UHPLC-Säule erreichen [240]. In der Praxis konnte dies leider nicht bestätigt werden, die chromatographischen Peaks waren breiter und die Retentionszeiten länger als bei den untersuchten Säulen mit einer Partikelgröße kleiner als 2  $\mu\text{m}$ .

### Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 1,8 $\mu\text{m}$ , 50x2,1 mm

Die vollporöse Zorbax C18 zeigte eine geeignete Trennleistung für die meisten Analyten. Es wurden verschiedene Temperaturen im Säulenofen von 40 bis 60 °C getestet, wobei mit 60 °C die kürzesten Retentionszeiten erreicht werden konnten. Diese Säulenart wurde für die 30-Minuten-Methode und die Identifizierung der zu erwartenden Lipide verwendet.

### Kinetex 1,7 $\mu\text{m}$ C8 100 Å, 100x2,1 mm

Da es sich um eine teilporöse Säule mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von weniger als 2  $\mu\text{m}$  handelt und sie länger ist, hat sie die größte Anzahl theoretischer Trennböden und damit die größte Trennleistung im Vergleich mit den anderen getesteten Säulen. Auch bei dieser Säule konnte die Trennleistung nicht überzeugen, die chromatographischen Peaks waren breiter und unvollständig getrennt im Vergleich mit der Zorbax C8. Das könnte daran liegen, dass mit dieser Methode vor allem die abundanten Lipide gemessen werden, sodass die Säule unter Umständen überladen war. D.h. bei der großen Anzahl an Molekülen konnten eventuell nicht alle gleichzeitig mit der Säule wechselwirken, sodass es zur Peakverbreiterung gekommen ist. Außerdem ist bei einer längeren Säule die Totzeit höher und einige Lipide vor allem die Phospholipide wurden nicht ausreichend von der Säule gelöst, sodass es zum Tailing kam. Um das Tailing und damit eine mögliche Verschleppung zu unterbinden, müsste die Säule länger oder mit höherem Fluss gespült werden. Zusammen mit der Totzeit, hätte sich dadurch die Analysenzeit deutlich verlängert. Ein erhöhter Fluss würde neben dem höheren Verbrauch an mobilen Phasen auch das Hintergrundsignal im MS stark erhöhen, sodass dies in diesem Fall nicht in Betracht gezogen wurde. Außerdem war der Druck durch die längere Säule mit ungefähr 530 bar deutlich größer als bei der Zorbax C8 mit ca. 260 bar (beide Werte während dem Äquilibrieren mit einem Fluss von 0,3 mL/min und 40 °C im Säulenofen). Dadurch kann die Chromatographie mit der Kinetex C8 nur auf HPLC-Systemen betrieben werden, die mehr als 600 bar aushalten.

### Zorbax Eclipse Plus C8 RRHD 1,8 $\mu\text{m}$ , 50x2,1 mm

Mit einer Temperatur im Säulenofen von 40 °C konnten mit dieser Säule ähnliche Retentionszeiten wie bei der Zorbax C18 bei 60 °C erreicht werden. Die beiden Säulen unterscheiden sich nur durch die Kettenlänge der Alkylreste, wobei das C8-Material eine schwächere Interaktion mit den Fettsäureresten der Lipide zeigt. Neben der Trennung der Lipide, spielt auch die Laufzeit eine Rolle und die Analyten müssen vollständig von der Säule gelöst werden, um eine Verschleppung in



nachfolgende Proben zu vermeiden. Die geringere Interaktion zwischen Säulenmaterial und Analyten hat sich in diesem Fall als vorteilhaft erwiesen. Nach der erneuten Optimierung der Fließmittelzusammensetzung und des Gradienten konnte mit der Zorbax C8 die Laufzeit von 30 auf 17 min verkürzt werden. Sie lieferte dadurch im Hinblick auf die Laufzeit und Trennleistung das beste Gesamtergebnis. Die Trennleistung der getesteten Säulen ist beispielhaft in Abbildung 23 aufgeführt.

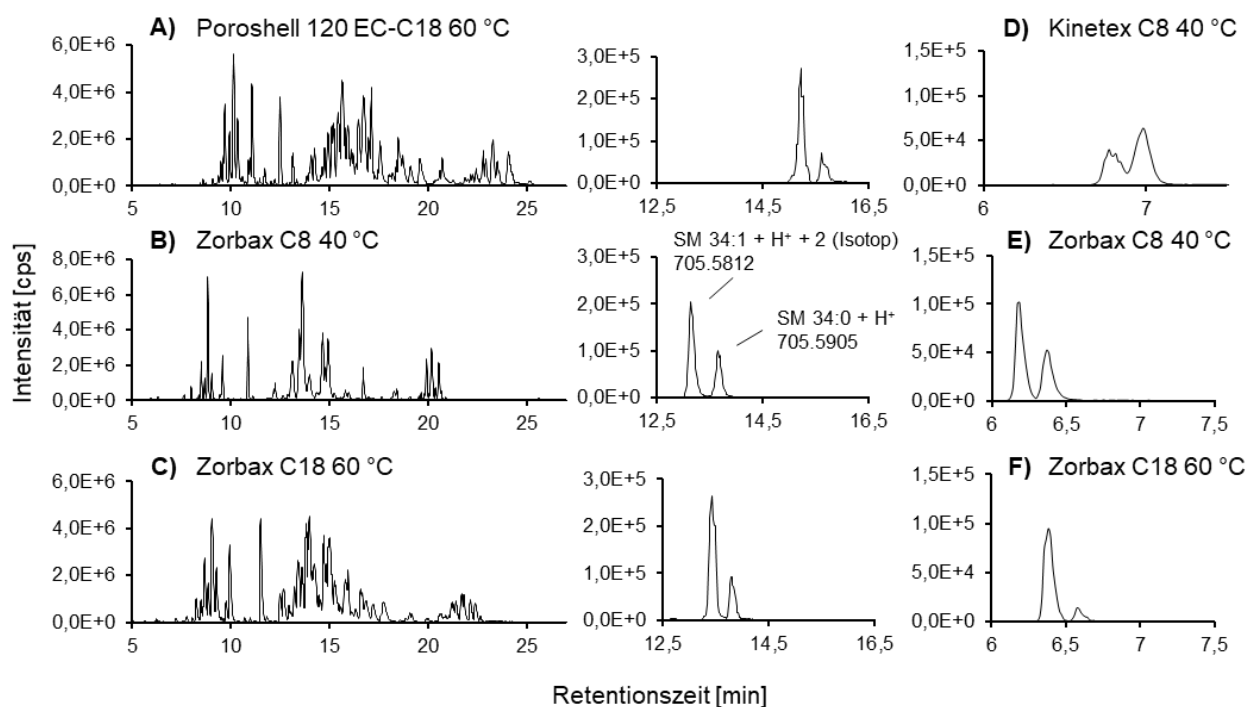


Abbildung 23: Vergleich verschiedener Chromatographie-Säulen.

Dargestellt sind beispielhaft die Basispeak-Chromatogramme sowie die extrahierten Ionenchromatogramme von Sphingomyelin 34:0 ( $m/z$  705,9505  $\pm$  0,0035) im positiven Ionisationsmodus. Gezeigt werden die Poroshell 120 EC-C8 2,7  $\mu$ m 50x2,1 mm bei 60 °C (A), die Zorbax Eclipse Plus RRHD C8 1,8  $\mu$ m 50x2,1 mm bei 40°C (B) und die Zorbax Eclipse Plus RRHD C18 1,8  $\mu$ m 50x2,1 mm bei 60°C (C) je mit dem gleichen 30 min Gradienten. Außerdem sind die extrahierten Ionenchromatogramme für einen 17 min Gradienten für die Kinetex 1,7  $\mu$ m C8 100x2,1 mm (D) und die Zorbax Eclipse Plus RRHD C8 1,8  $\mu$ m 50x2,1 mm (E) je bei 40°C sowie die Zorbax Eclipse Plus RRHD C18 1,8  $\mu$ m 50x2,1 mm bei 60°C (F) dargestellt. Die mobilen Phasen waren H<sub>2</sub>O + 0,1% FA + 1mM NH<sub>4</sub>FA und ACN/ISP 1:1 + 0,1% FA (A–C) sowie H<sub>2</sub>O + 0,1% FA + 10mM NH<sub>4</sub>FA und ACN/ISP 2:3 + 0,1% FA (D–F).

### 3.1.2.2 Gradientenentwicklung

Parallel zur Auswahl der Chromatographiesäule wurden verschiedene mobile Phasen und Gradienten untersucht. Die für diese Methode relevanten Analyten weisen mit einem log P von ungefähr 1 bei den Acylcarnitinen und Oxylipinen bis zu 35 bei einigen Triglyceriden ein sehr unterschiedliches Lösungsverhalten auf [241]. Demnach unterscheiden sich auch die Wechselwirkungen mit der Säule zwischen den Analytgruppen stark. Deshalb wurde ein binärer Gradient mit einer wässrigen und einer organischen mobilen Phase entwickelt. Als organische mobile Phase wurden verschiedene Lösungsmittel und -gemische getestet, darunter Acetonitril, Methanol:Wasser (95:5, v/v), Acetonitril:Aceton (95:5, v/v) sowie Acetonitril:Isopropanol (1:1 und 2:3, v/v). Eine Mischung aus Acetonitril und Isopropanol als mobile Phase B und Wasser als mobile Phase A zeigte die besten Ergebnisse. Für erste Testmessungen und die Identifizierung der verschiedenen Lipide wurde damit ein 30-minütiger Gradient entwickelt (Abbildung 24). Mit Hilfe des so erstellten Lipidprofils, konnte die Methode spezifischer auf die zu erwartenden Lipide angepasst werden. Anschließend wurde der Gradient optimiert und auf 17 min gekürzt (Abbildung 25).

Durch den Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an Puffer und Säure bzw. Base, kann die Ionisation und chromatographische Trennleistung verbessert werden. Es wurde Ameisensäure in Konzentrationen von 0,05 bis 0,15% sowie 0,1% Essigsäure getestet. Die gleichzeitige Verwendung von Ameisensäure und Essigsäure bzw. deren Salzen wurde vermieden, da dann sowohl Formiat- als auch Acetat-Addukte gebildet werden, was die spätere Auswertung erschwert. Bei der anfänglichen Methodenentwicklung mit den Testanalyten (siehe Tabelle 11) zeigte sich, dass bei 0,15% Ameisensäure die Ionisierung einiger Analyten im negativen Modus leicht abnimmt, z.B. bei LPA 18:0 und 18:1. Zudem nahm das Tailing der LPAs durch den höheren Säurezusatz zu. Ein Säurezusatz von 0,05% zeigte bei den getesteten Analyten keine Unterschiede bei der chromatographischen Trennleistung, aber die Signale waren bei Zusatz von 0,1% Ameisensäure geringfügig intensiver, sodass diese Konzentration weiterverwendet wurde.

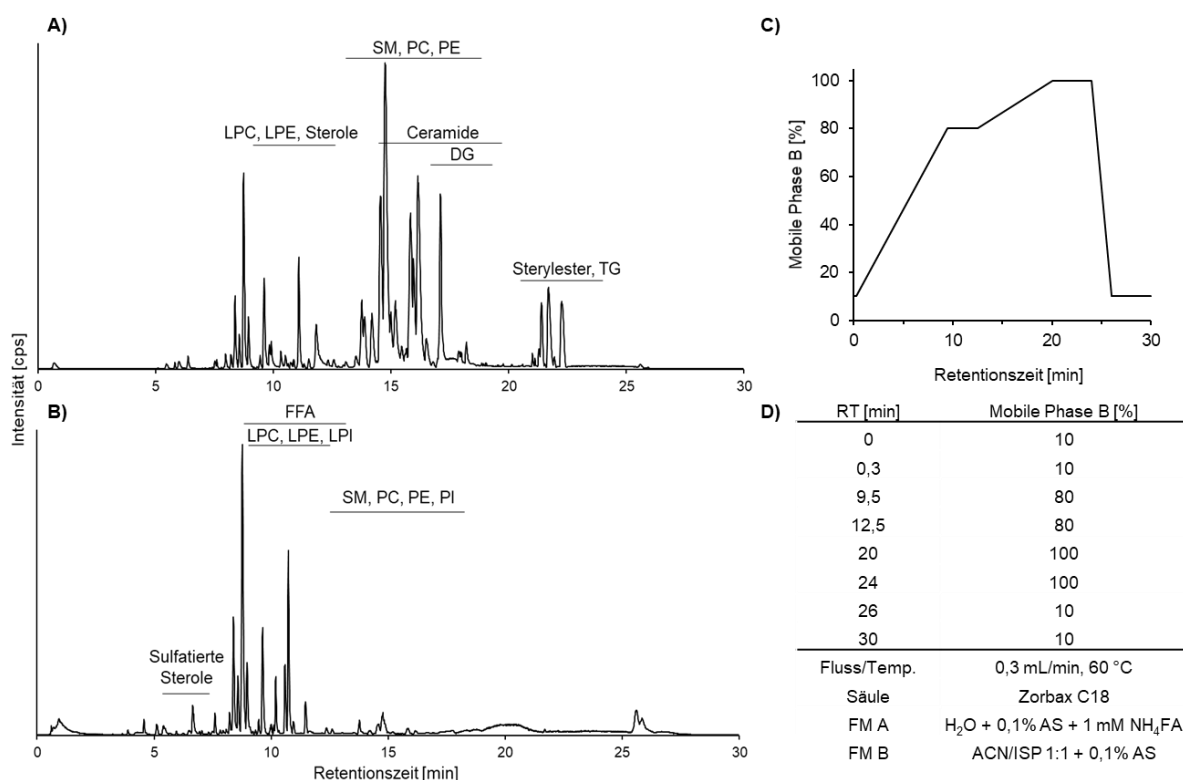


Abbildung 24: Überblick 30-Minuten-Methode.

Abgebildet sind die Basispeak-Chromatogramme (100 – 1000 *m/z*, Toleranz 10 mDa) von Humanplasma im positiven (A) und negativen Ionisationsmodus (B) sowie der dazugehörige Gradient mit den LC-Parametern (C, D). FM = Fließmittel, ISP = Isopropanol.

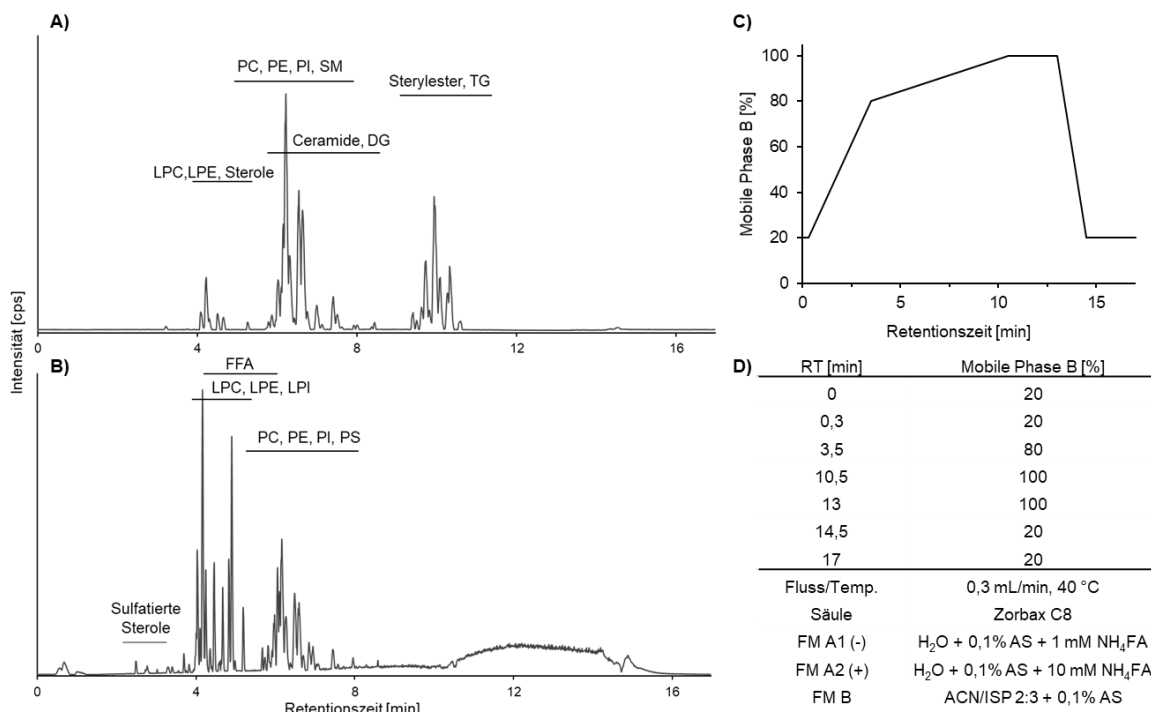


Abbildung 25: Überblick 17-Minuten-Methode.

Abgebildet sind die Basispeak-Chromatogramme (100 – 1000 *m/z*, Toleranz 10 mDa) von Humanplasma im positiven (A) und negativen Ionisationsmodus (B) sowie der dazugehörige Gradient mit den LC-Parametern (C, D). Der Fluss wurde im positiven Ionisationsmodus vor der Quelle 1:3 geteilt, sodass nur noch ca. 75  $\mu$ L/min in der Quelle ankamen. Fließmittel A1 wurde für den negativen und A2 für den positiven Ionisationsmodus verwendet.

## Ergebnisse

Als Puffer wurde Ammoniumformiat in Konzentrationen von 1 bis 50 mM sowie Ammoniumacetat untersucht. Der Puffer wurde nur zur wässrigen Phase gegeben, da die Löslichkeit von Ammoniumformiat im Fließmittel B zu gering war und es zur Kristallbildung kam. Bei den meisten im positiven Ionisationsmodus untersuchten Analytgruppen wie den Triglyceriden, Sterylestern und den Phospholipiden wurde die Ionisation durch Ammoniumformiat verbessert. Ebenso ionisieren die Diacylphospholipide im negativen Ionisationsmodus besser durch den Pufferzusatz. Die Signalintensität der freien Fettsäuren und der Lysophospholipide war hingegen bei Zusatz von nur 1 mM Ammoniumformiat besser (Abbildung 26).

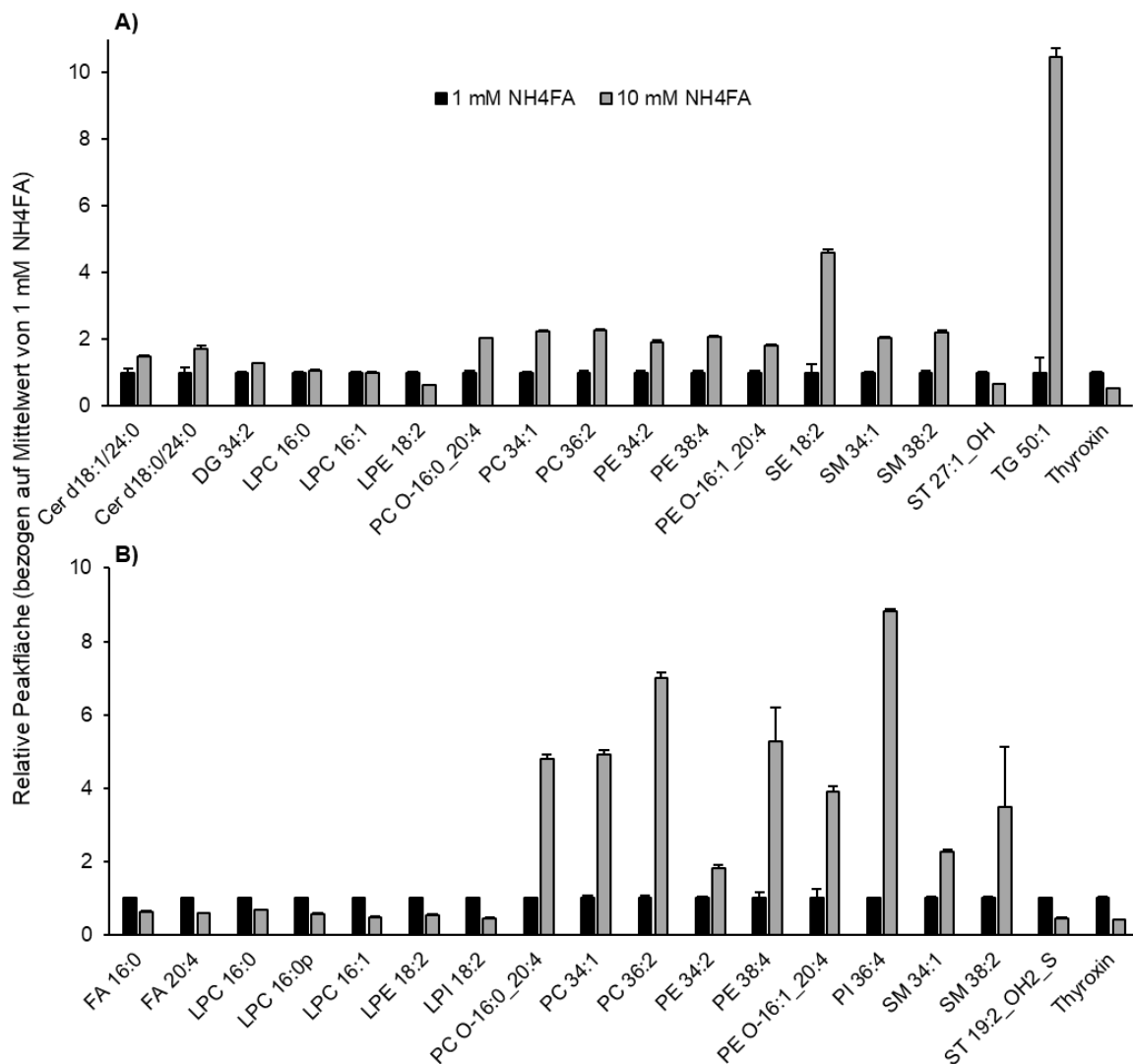


Abbildung 26: Einfluss des Ammoniumformiat-Zusatzes im wässrigen Fließmittel auf die Ionisierung. Die Abbildung zeigt die relativen Peakflächen mit 10 mM Ammoniumformiat (NH<sub>4</sub>FA) im Vergleich zu 1 mM NH<sub>4</sub>FA im wässrigen Fließmittel. Die Analyten innerhalb einer Lipidklasse verhalten sich ähnlich, nur bei den Triglyceriden variierte der Anstieg durch 10 mM NH<sub>4</sub>FA von ungefähr 4- bis 35-fach und bei den Phosphatidylinositolen variierte der Anstieg zwischen 4- bis 14-fach. Gezeigt werden die Analyten im positiven (A) und negativen Ionisationsmodus (B). Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben (n=6).

Als Kompromiss wurde deshalb für den negativen Ionisationsmodus Wasser mit 0,1% Ameisensäure und 1 mM Ammoniumformiat und für der positiven Ionisationsmodus Wasser mit 0,1% Ameisensäure und 10 mM Ammoniumformiat verwendet. Durch die Kombination der beiden Ionisationsmodi konnten ausreichende Empfindlichkeiten erreicht und ein breites Lipidprofil abgedeckt werden. Des Weiteren wurden Flussraten von 0,3 bis 0,5 mL/min getestet, dabei konnte mit einer Flussrate von 0,3 mL/min der beste Kompromiss aus Peaktrennung, Rückdruck und Laufzeit erreicht werden. Durch die gewählten chromatographischen Parameter konnten schließlich einige Isomere und Isobare getrennt werden, wie in Abbildung 27 beispielhaft dargestellt ist. Dadurch konnten mehr Lipide identifiziert werden und gleichzeitig wurde auch die Grad der Identifizierung erhöht [108].

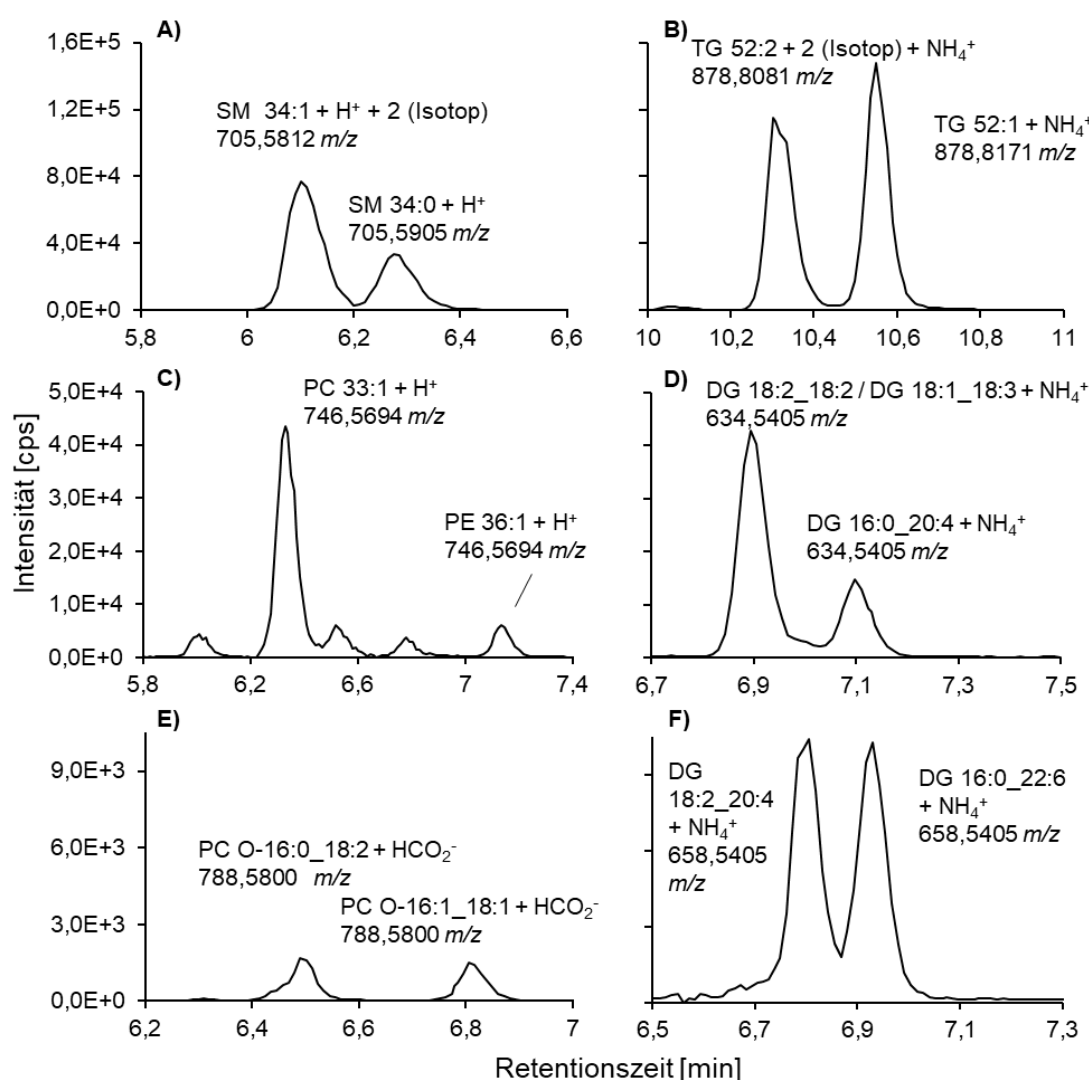


Abbildung 27: Chromatographische Auftrennung von Isomeren und Isobaren.

(A) + (B) Chromatographische Auftrennung der M+2 Isotope von SM 34:0 bzw. TG 52:1 mit einer zusätzlichen Doppelbindung in humanem Plasma im positiven Ionisationsmodus ( $m/z$  705,5905 bzw. 878,8171). (C) + (E) Die Auftrennung von Strukturisomeren in Humanplasma im positiven (C) und negativen Ionisationsmodus (E). (D) + (F) Trennung von Isomeren mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung in Glioblastomzellen (D, negativer Ionisationsmodus) und Mausleber (F, positiver Ionisationsmodus). Das Extraktionsfenster beträgt in allen Fällen  $\pm 0,0035 m/z$ .

### 3.1.2.3 Injektion

Ein weiterer Bestandteil der chromatographischen Methodenentwicklung ist die Wahl eines geeigneten Aufnahmemediums und des Injektionsvolumens. Wenn sich die Elutionskraft des Aufnahmemediums der Proben von der des Start-Gradienten unterscheidet, kann es zu einer Verschlechterung der Peakform durch sogenanntes Fronting kommen. Dabei stört das Injektionsmedium die Wechselwirkung zwischen den Analyten und dem Säulenmaterial, sodass ein Teil der Analytmenge zu früh eluiert. Je mehr injiziert wird, desto stärker ist das Fronting, deswegen wurden verschiedene Injektionsvolumina in Kombination mit mehreren Aufnahmemedien untersucht. In der Regel veränderte sich dabei lediglich die Peakform, im Falle einer Injektion von Methanol:Chloroform (2:1, v/v) konnten hingegen separate Peaks des gleichen Analyten beobachtet werden, wie es in Abbildung 28 am Beispiel der Prostaglandine E2 und D2 dargestellt ist. Außer bei einer Methanol-Chloroform-Mischung konnte lediglich bei einer Mischung aus Methanol und Dichlormethan das gleiche Phänomen beobachtet werden. Andere Aufnahmemedien wie Aceton oder Tetrahydrofuran führten lediglich zum erwarteten Fronting. Die zusätzlichen Peaks traten bei verschiedenen Zusammensetzungen von Methanol/Chloroform auf. Mit steigendem Chloroform-Anteil traten die zusätzlichen Peaks auch bei geringeren Injektionsvolumina auf. Die zusätzlichen Peaks traten unabhängig von der Injektionsgeschwindigkeit und bei unterschiedlichen Analyten auf. Bei einem geringen Injektionsvolumen von 2 µL traten nur bei Analyten mit einer geringen Retentionszeit wie den Prostaglandinen zusätzliche Peaks auf, während bei steigenden Injektionsvolumina auch später eluierende Lipide betroffen waren. Dieses Phänomen wurde bei der zuerst entwickelten 30-Minuten-Methode untersucht. Der Start-Gradient bestand aus Wasser:Acetonitril:Isopropanol (9:0,5:0,5, v/v/v) mit 0,1% Ameisensäure und 1 mM Ammoniumformiat. Da der Innendurchmesser der Kapillaren in UHPLC-Anlagen sehr gering ist, besteht die Möglichkeit, dass es zwischen dem Start-Gradienten und dem Chloroform bzw. Dichlormethan der Injektion zu einer Phasentrennung kommt und so der in der Chloroform-Phase gelöste Analytanteil früher eluiert. Bei einer Agilent 1200 HPLC-Anlage mit einer Hydro-RP Säule (4 µm, 150x2 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) konnte das Phänomen nicht beobachtet werden. Vermutlich mischten sich dort die Phasen wieder durch das größere Totvolumen. Um zusätzliche Peaks zu vermeiden, wurde reines Methanol als Aufnahmemedium verwendet. Für den späteren Gradienten wurde das maximal mögliche Injektionsvolumen untersucht, dabei konnten bis einschließlich 10 µL Methanol keine Verschlechterung der Peakformen beobachtet werden.

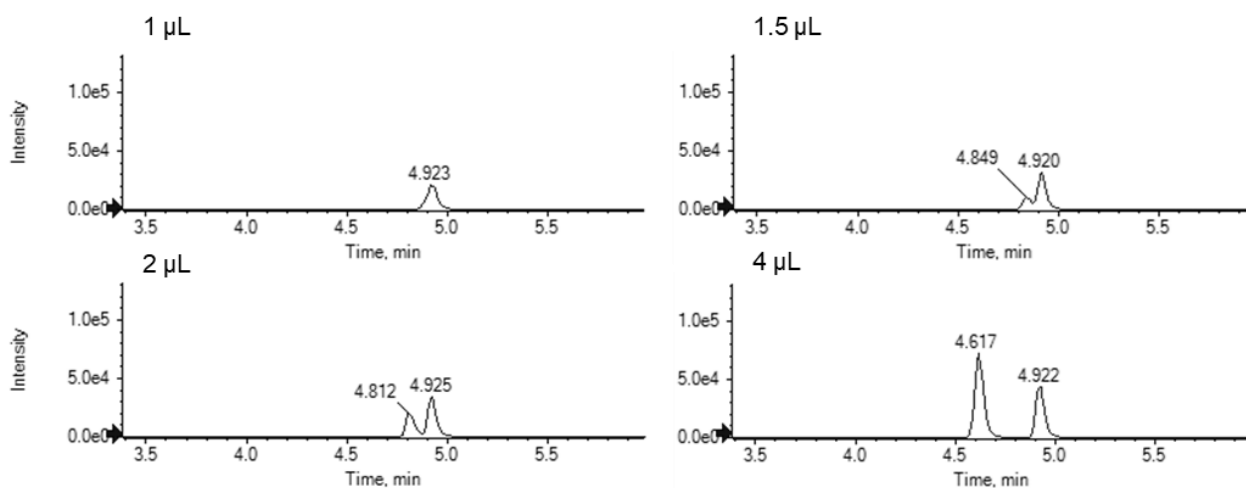


Abbildung 28: Einfluss des Aufnahmemediums und des Injektionsvolumens auf die Peakform.

Nach der Injektion von 500 ng/mL Prostaglandin E2, das mit Methanol/Chloroform (2:1, v/v) aufgenommen wurde, konnten mehrere PGE2 Peaks festgestellt werden. Diese traten in Abhängigkeit des Injektionsvolumens auf. Die Retentionszeit des zusätzlichen Peaks nahm ab, je größer das Injektionsvolumen war (extrahierte Ionenchromatogramm bei  $351,2177 \pm 0,0035$  m/z; 30 min Gradient).

Um eine Verschleppung der Analyten in die nachfolgenden Proben zu vermeiden, wurden verschiedene Spüllösungen und Spülmodi für die Injektionsnadel getestet. Zum Spülen der Nadel vor und nach Aufnahme der Probe, hat sich dabei eine Mischung aus Acetonitril und Wasser (70:30, v/v) bewährt. Das Spülen der Nadel von innen mit verschiedenen Lösungsmitteln hat dazu geführt, dass die Ausgangsbedingungen des Gradienten und dadurch auch die Retentionszeiten nicht stabil waren. Da das innere Spülen erst nach erfolgter Messung durchgeführt werden konnte, erhöhte sich die Analysenzeit pro Probe deutlich. Es wurde der direkte Injektionsmodus verwendet, dadurch war die Injektionsnadel ein Teil der Messlinie und wurde mit dem kompletten Gradienten durchgespült. Die Verschleppung war dadurch bereits sehr gering, deswegen wurde die Nadel nur äußerlich gespült.

#### 3.1.2.4 Flussreduzierung

Im Laufe der Zeit ist es immer wieder zu starken Signalabfällen durch Gerätekontamination gekommen, weshalb nach Möglichkeiten gesucht wurde, die Gerätebelastung und damit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über einen längeren Zeitraum zu verbessern. In anderen analytischen Gebieten mit stärker verunreinigten Proben, wie z.B. der Umweltanalytik, wird eine Flussteilung verwendet, um den Totalionenstrom zu reduzieren [224]. Durch die Flussteilung werden die höheren Flussraten, die für die chromatographische Trennleistung benötigt werden, nur teilweise in die Quelle weitergegeben und der Rest wird verworfen. Durch eine erneute Optimierung der Quellenparameter und eine Anpassung der Fließmittelzusammensetzung, konnte dennoch eine ausreichende Ionisierung der Analyten erreicht und damit die Empfindlichkeit erhalten werden. Die Signale der Sterylester konnte wie in Abbildung 29 gezeigt, durch die Flussreduzierung sogar

## Ergebnisse

verbessert werden. Dabei musste das PEEK-Stück zwischen dem T-Stück und der Quelle so kurz wie möglich gehalten werden, um einen Empfindlichkeitsverlust der TG zu vermeiden, vermutlich durch Adsorption an dem PEEK-Stück. Aus diesem Grund konnte das Erdungsstück der Quelle nicht als T-Stück verwendet werden (dafür ist eine 30 cm lange PEEK-Verbindung nötig). Es wurde ein T-Stück direkt oberhalb der Elektrode mit einem 5 cm langen Verbindungsstück zur Elektrode eingebaut. So konnte die benötigte Empfindlichkeit für TG und SE gewährleistet werden (Abbildung 30).

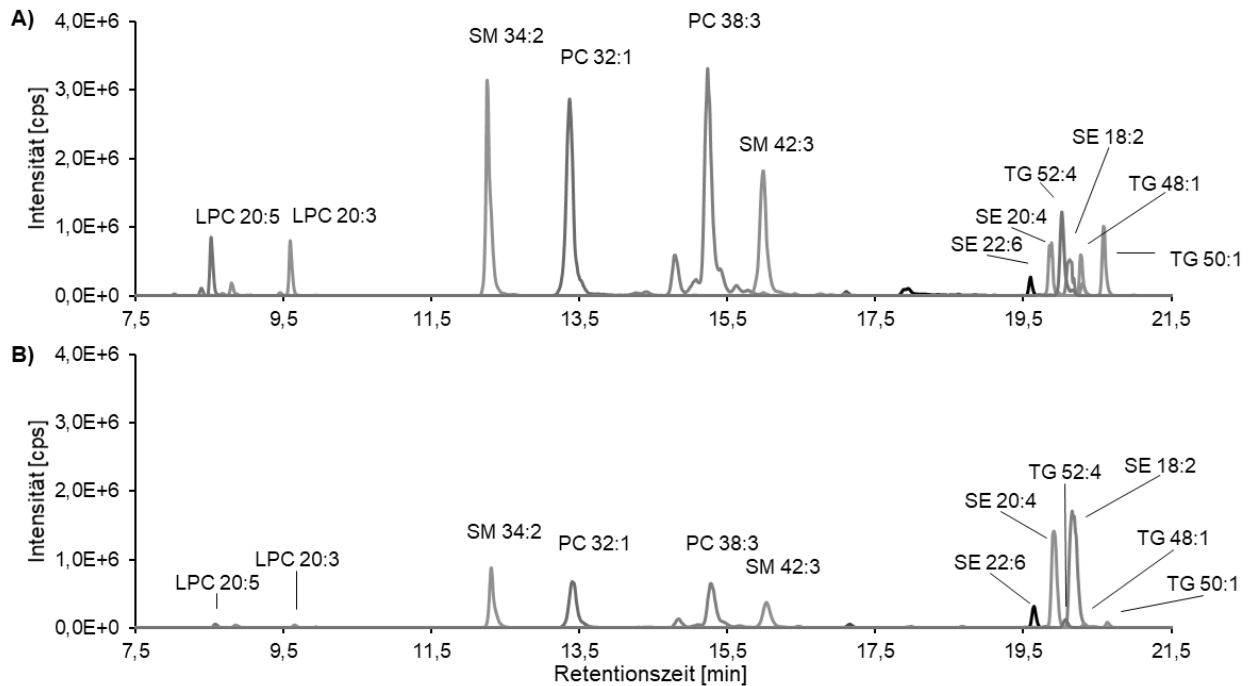


Abbildung 29: Einfluss der Flussreduzierung auf unterschiedliche Lipidgruppen.

(A) Ausschnitt des extrahierten Ionenchromatogramms im positiven Ionisationsmodus bei ungeteiltem Fluss (300 µL/min, GS1 + 2 jeweils 50 psi) und (B) bei geteiltem Fluss (ca. 75 µL/min Fluss in der Quelle, GS1 + 2 jeweils 30 psi).

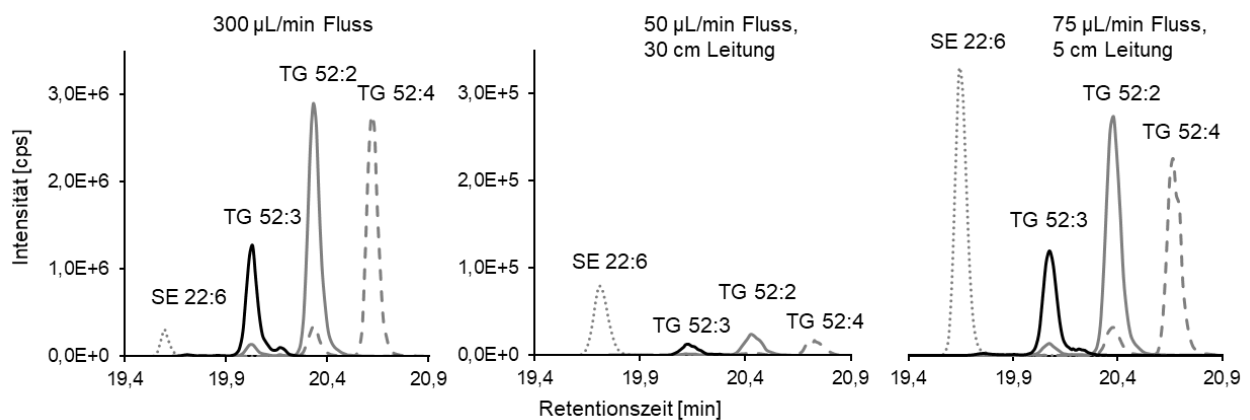


Abbildung 30: Triglycerid-Signale in Abhängigkeit von der Flussrate und PEEK-Leitung.

Ausschnitte der extrahierten Ionenchromatogramme von Triglyceriden (TG) und Sterylester 22:6 (SE) bei verschiedenen Flussteilungen (30-Minuten-Methode). Angeben sind die Flussraten, die in die Quelle geleitet werden. Die Leitungslänge entspricht der Länge der PEEK-Leitung nach dem T-Stück, welches den Fluss teilt. Der linke Graph zeigt die Signale bei ungeteiltem Fluss.



Mit der gezeigten Flussreduzierung im positiven Ionisationsmodus konnte erfolgreich der Totalionenstrom (TIC) und damit auch die Detektorabnutzung sowie die Verschmutzung des QJet reduziert werden (Abbildung 31). Die verringerte Verschmutzung wird u.a. an dem höheren Ionen-Transmissionskoeffizienten deutlich. Dieser beschreibt die Durchlässigkeit der Q0-Linse für die Ionen. Bei zu großen Signalen im TIC wird an der Q0-Linse eine Gegenspannung angelegt, um nur einen Teil der Ionen weiter in den Q0 zu leiten. Die Peakflächen der verschiedenen Analyten sind noch ausreichend für eine semi-quantitative Auswertung.

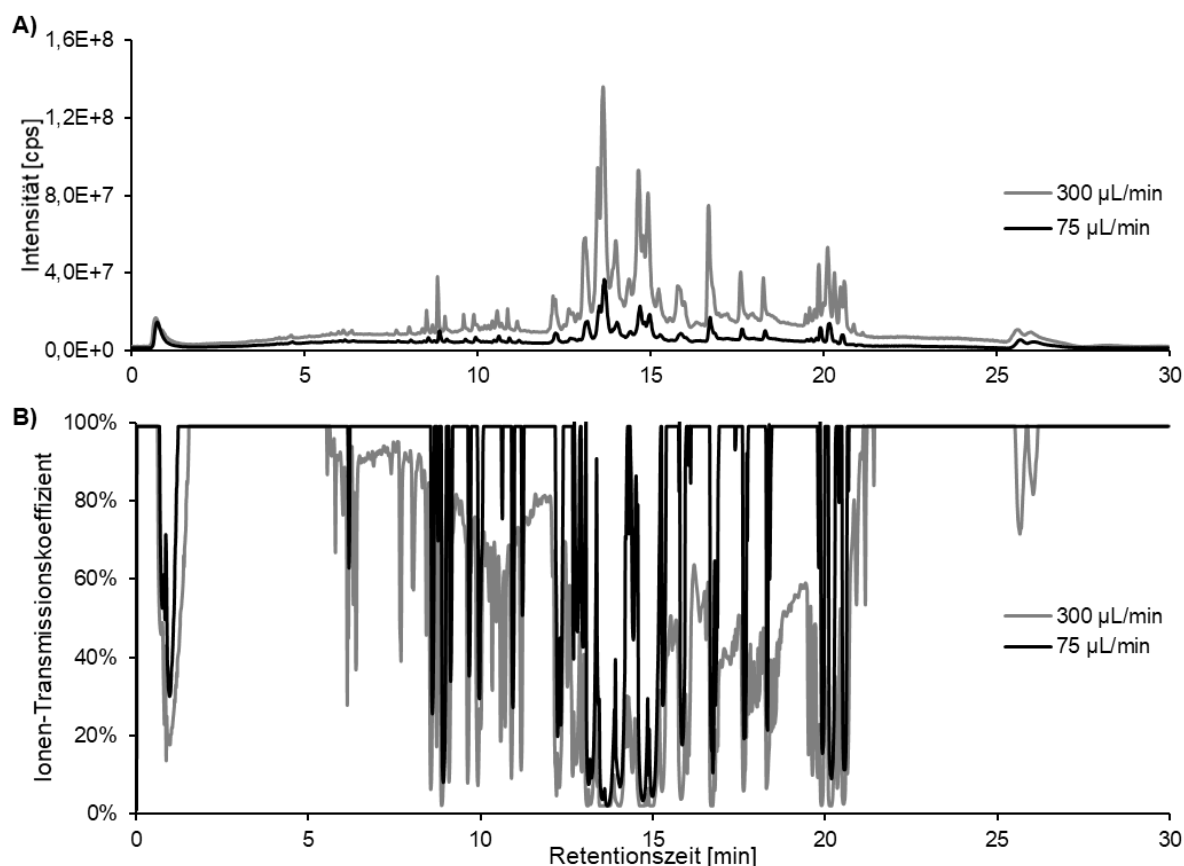


Abbildung 31: Einfluss der reduzierten Flussrate in der Quelle auf den Totalionenstrom.

Es wurde Humanplasma mit ungeteiltem HPLC-Fluss (300 µL/min) oder direkt vor der Quelle geteiltem Fluss (ca. 75 µL/min gehen in die Quelle, der Rest wird verworfen) im positiven Ionisationsmodus gemessen: (A) Totalionenstrom-Chromatogramm, (B) Ionen-Transmissionskoeffizienten.

Im negativen Ionisationsmodus konnte die Flussreduzierung nicht implementiert werden, da es u.a. zu einem extremen Signalabfall der Phospholipide gekommen ist und diese nicht mehr detektiert werden konnten. Das Elektrospray konnte im negativen Modus trotz verschiedener Gas- und Spannungseinstellungen nicht stabilisiert werden, was durch zackige Linien in den extrahierten Ionenchromatogrammen, vor allem bei kleinen Signalen, sichtbar wurde. Zudem ist der TIC im negativen Modus deutlich geringer, sodass hier auch von einer geringeren Detektorbelastung ausgegangen werden kann. Deswegen wurde im weiteren Verlauf die Flussreduzierung nur für den positiven Ionisationsmodus verwendet.

Des Weiteren wurde die Qualität der Fließmittel überprüft, da auch bei der Injektion von Blank-Proben der Totalionenstrom trotz Flussreduzierung zu hoch war. Da der positive Ionisationsmodus stärker betroffen war, wurden verschiedene Lösungsmittel in LC-MS- und ULC-MS-Qualität in diesem Modus mit einem Zusatz von 0,1% Ameisensäure mit der Spritzenpumpe bei 75  $\mu\text{L}/\text{min}$  injiziert. Dabei wurde die Intensität des TIC in einem Scanbereich von 100–2000  $m/z$  sowie die detektierbaren Massen verglichen. Damit konnten sowohl für Wasser als auch für Isopropanol keine Vorteile durch die deutlich teureren Lösungsmittel in ULC-MS Qualität festgestellt werden. Auch der Vergleich von Ameisensäuren mit einer Reinheit von 99–100% bzw. > 99,5% (LC-MS-Qualität), zeigte keine Unterschiede. Hingegen konnte mit Acetonitril in ULC-MS-Qualität das Hintergrundsignal deutlich reduziert werden ( $3,0 \cdot 10^6$  im Vergleich zu  $1,3 \cdot 10^7$ ), sodass dieses für weitere Messungen verwendet wurde. Der Vergleich der TIC der verschiedenen Lösungsmittel ist im Anhang dargestellt (Abbildung 54).

### 3.1.3 Massenspektrometrische Parameter

Nachdem die Chromatographie optimiert wurde, konnten im nächsten Schritt die massenspektrometrischen Parameter näher untersucht werden. Bei einer QTOF-Screening-Methode wird in der Regel keine analytspezifische Optimierung durchgeführt, da alle Analyten in dem gleichen MS-Experiment und dadurch mit den gleichen Parametern gemessen werden. Die letztlich ausgewählten Parameter sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die meisten Substanzen ließen sich in protonierter Form oder als Addukt im positiven Ionisierungsmodus messen. Eine Messung beider Polaritäten ist, aufgrund der unterschiedlichen Ionisierungseigenschaften der einzelnen Lipidklassen in den beiden Ionisierungsmodi, sinnvoll, um so möglichst niedrige Detektionsgrenzen zu gewährleisten. Lipide mit einer Säurefunktion, wie z.B. die Fettsäuren oder auch die Phospholipide werden leichter deprotoniert, während basisch reagierende Substanzen eher protoniert werden. Neutrale Lipide wie die Triglyceride und Sterylester konnten als Kation-Addukte (Ammonium- oder Natrium-Addukte) gemessen werden. Viele Lipide konnten in beiden Polaritäten gemessen werden. So wurde z.B. die permanente positive Ladung cholinhaltiger Lipide wie der Phosphatidylcholine durch ein Formiat- oder Acetat-Addukt ausgeglichen und die Substanz konnte durch Deprotonierung der Phosphatgruppe im negativen Modus ionisiert werden.

Tabelle 20: Optimierte MS-Parameter.

Parameter	Abkürzung	Negative Ionisierung	Positive Ionisierung
Akkumulationszeit MS-Scan	-	250 ms	250 ms
Akkumulationszeit MS/MS	-	50 ms	50 ms
Kollisionsgas (Q2)	CAD	4 psi	4 psi
Curtain Gas (Stickstoff)	CUR	40 psi	40 psi
Temperatur Heizgas	TEM	400 °C	400 °C
Ionisationsspannung	ISVF	-3500 V	4500 V
Zerstäubergas ESI	GS 1	50 psi	25 psi
Heizgas ESI/ Zerstäubergas APCI	GS 2	50 psi	25 psi
Massenbereich MS-Scan	-	100–1000 <i>m/z</i>	100–1000 <i>m/z</i>
Massenbereich MS/MS	-	50–1000 <i>m/z</i>	50–1000 <i>m/z</i>
Declustering Potential Scan	DP	-80 V	80 V
Declustering Potential MS/MS	DP	-80 V	80 V
Kollisionsenergie MS-Scan	CE	-5 V	5 V
Kollisionsenergien MS/MS	CE/CES	-60 – -20 V	20–60 V
Q1 Auflösung		unit	unit
MS/MS-Modus	-	high sensitivity	high sensitivity
Anzahl IDA Kanäle	-	6	6
Anzahl zusammengefasster Detektionsfenster	-	4	4
Zeitmenge vor dem Ionenimpuls	IRD	11 ms	11 ms
Dauer des Ionenimpulses	IRW	10 ms	10 ms

Die Akkumulationszeit beschreibt das Zeitfenster in dem ein TOFMS oder MS/MS-Messpunkt aufgenommen wird. Prinzipiell ist bei einem TripleTOF 6600 eine Akkumulationszeit von 100 ms ausreichend für die maximale Empfindlichkeit. Im negativen Ionisationsmodus konnte bei dieser Einstellung leider nicht die Signalstabilität gewährleistet werden, sodass die Akkumulationszeit für beide Modi auf 250 ms erhöht wurde. Für die MS/MS-Fragmentierung zusammen mit einer Spreizung der Kollisionsenergie, z.B. von 20 bis 60 V, ist eine Akkumulationszeit von mindestens 30 ms pro Experiment empfehlenswert. Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, wurde eine Akkumulationszeit von 50 ms für die MS/MS-Experimente gewählt. Die Kollisionsenergie für den Scan wurde so niedrig wie möglich gewählt, um eine Fragmentierung der Analyten zu vermeiden. Für die MS/MS-Messung wurden Kollisionsenergien im negativen Ionisationsmodus von -60 bis -20 V gewählt, um die Abspaltung der Fettsäuren und die Fragmentierung der Kopfgruppen vieler Lipidgruppen zu erreichen und dadurch die Strukturaufklärung zu erleichtern. Um mindestens zehn Messpunkte pro chromatographischem Peak bei einer minimalen Peakbreite von sechs Sekunden zu erhalten, konnten zusätzlich zum MS-Scan noch sechs MS/MS-Spektrum pro Zyklus aufgenommen werden. Die Gesamt-Zykluszeit betrug 600 ms. Als IDA Kriterien wurden ständig vorkommende Hintergrundsignale und bereits ausgewählte Ionen mit einer Toleranz von 20 mDa für fünf Sekunden ausgeschlossen, damit bei möglichst vielen koelutierenden Substanzen ein MS/MS-Spektrum aufgenommen wird. Bei den TOF-spezifischen Einstellungen, wie der Anzahl zusammengefasster Detektionsfenster, der Zeit bis zum Ionenimpuls sowie dessen Dauer, wurden die Herstellereinstellungen beibehalten, da Erhöhungen dieser Parameter zwar mit einer besseren

Empfindlichkeit aber auch mit einer schlechteren Auflösung einhergehen. Das Curtain-Gas wurde so hoch wie möglich gewählt, um die Gerätekontamination zu verringern. Curtain-Gas Werte größer 40 psi führten zu einem starken Signalabfall.

### 3.1.3.1 Lipididentifizierung

Mit der entwickelten Methode konnten 440 Lipide aus mehr als 15 Lipidklassen in Humanplasma identifiziert werden. Da nach der QC- und Blank-Bereinigung in der untargeted Auswertung im positiven und negativen Ionisationsmodus je ungefähr 1.500–1.700 Signale detektiert wurden, besteht Potenzial für die Identifizierung weiterer Lipide. In Tabelle 21 ist eine Übersicht über die identifizierten Lipide und die bei der jeweiligen Klasse beobachteten MS/MS-Fragmente dargestellt. Die Identifizierung erfolgte über die exakte Masse  $\pm 5$  ppm, die Isotopenverteilung sowie den Vergleich der Fragmentierungsmuster mit mehreren Datenbanken und der Literatur [9, 176, 178, 225]. Außerdem wurden die Retentionszeiten innerhalb der Lipidklassen verglichen, d.h. bei längeren Kohlenwasserstoffketten und höherem Sättigungsgrad wurden jeweils längere Retentionszeiten erwartet. Der Vorteil der Messung in beiden Polaritäten liegt neben der niedrigeren Detektionsgrenzen auch darin, dass sich aus den Ionisierungseigenschaften und MS/MS-Fragmentierungsmustern beider Polaritäten komplementäre Informationen zur Identifizierung ergeben. Im negativen Ionisationsmodus können aus dem MS/MS-Spektrum neben den Kopfgruppen-Fragmenten meist die enthaltenen Fettsäuren identifiziert werden, was die Strukturaufklärung erleichtert [225]. Ausnahmen sind Lipide, wie Ceramide, deren Fettsäure nicht über eine Esterbindung verknüpft ist, sowie Lipide, wie Triglyceride, die im negativen Modus nicht ionisieren. Bei der Fragmentierung neutraler Lipide, wie den Di- und Triglyceriden, die meistens als Ammonium-Addukt detektiert werden, werden u.a. die veresterten Fettsäuren zusammen mit Ammonium abgespalten und es entstehen Carbokationen. Die Fettsäurereste der DG und TG sind demnach am Neutralverlust im positiven Ionisationsmodus erkennbar. Eine Liste aller identifizierten Lipide mit Retentionszeiten und Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen befindet sich im Anhang in Tabelle 32. Mit der vorgestellten Screening-Methode kann durch Abdeckung vieler Lipidklassen eine umfassende Übersicht über den Lipidstoffwechsel gewonnen werden. Die Detektion zahlreicher Vertreter innerhalb der Lipidklassen ermöglicht es zudem Veränderungen in Untergruppen aufzudecken. Die Identifizierung der Lipide erfolgte aufgrund der beschriebenen Maßnahmen mit hoher Konfidenz.

Tabelle 21: Übersicht in Humanplasma identifizierter Lipide und deren MS/MS-Fragmente.

Für die Überprüfung dieser Methode wurden zur Vereinfachung nicht alle identifizierten Lipide (# Identifikation), sondern eine verringerte Anzahl (# Auswertung) betrachtet. Die Acylcarnitine und PG wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt identifiziert. Angegeben wird immer der empfindlichste Messmodus, bei vielen Analyten ist eine Messung in beiden Modi möglich. Die MS/MS-Fragmente, die für die jeweilige Lipidklasse typisch sind, werden in der Reihenfolge der relativen Intensität angegeben (bei CE  $40 \pm 20$  V), weitere Fragmente sind möglich. Mod. = Ionisationsmodus, NL = Neutralverlust, FA = Fettsäure ( $-H^+$ ), \*Fettsäuren fragmentieren unter diesen Bedingungen nicht, \*\*das Ringsystem der Sterole bildet zahlreiche Carbokationen, \*\*\*sulfatierte Sterole, die in eckigen Klammern angegebenen Fragmente haben eine geringe relative Intensität.

Lipidklasse	Abkürzung	# Ident	# Auswertung	Mod.	Fragmente (m/z)
Acylcarnitine	Acyl-CN	4	0	+	60,08; 85,03
Ceramide	Cer	16	7	+	264,27; 282,28; 252,27
Diglyceride	DG	27	9	+	NL FA+NH <sub>3</sub> ; NL 35,03
Fettsäuren*	FA	19	19	-	-
Hexosylceramide	hexCer	6	4	+	264,27; NL des Zuckers; 282,28; 252,27
Lysophosphatidyl- choline	LPC	31	24	+	184,07; 104,11; 125,00; 86,10
Lysophosphatidyl- ethanolamine	LPE	22	9	-	FA-H <sup>+</sup> ; 196,04; 140,01
Lysophosphatidyl- inositole	LPI	7	4	-	FA-H <sup>+</sup> ; 153,00; 241,01
Phosphatidylcholine	PC	92	35	+	184,07; 125,00; 86,10
Phosphatidyl- ethanolamine	PE	36	20	-	FA-H <sup>+</sup> ; 196,04; 140,01
Phosphatidyl- glycerole	PG	7	0	-	FA- H <sup>+</sup> ; [153,00]; [227,04]
Phosphatidylinositole	PI	19	12	-	FA-H <sup>+</sup> ; 241,01
Phosphatidylserine	PS	2	1	-	NL 87,03; FA-H <sup>+</sup>
Sphingomyeline	SM	32	27	+	184,07; 125,00; 86,10
Sterole	ST	4	4	+/-	Fingerprint**/96,96*** ; 79,96***
Sterylester	SE	17	11	+	369,35; Fingerprint**
Triglyceride	TG	97	38	+	NL FA+NH <sub>3</sub> ; NL 17,03
Sonstige	-	2	1	+/-	-
	<b>Summe</b>	<b>440</b>	<b>225</b>		

## Ergebnisse

Das Vorkommen zahlreicher Addukte der Analyten erschwert die Lipid-Identifizierung. Neben der protonierten bzw. deprotonierten Form der Analyten konnten Ammonium- und Formiat-Addukte beobachtet werden sowie Cluster mit mehreren Natriumformiat-Ionenpaaren (Abbildung 32). Das Vorkommen stabiler Natriumformiat-Cluster ist bekannt und wird gelegentlich auch für die Massenkalisierung verwendet [242]. Dennoch sollte die Adduktbildung berücksichtigt werden, um Fehlidentifikationen zu vermeiden. Die Addukte können durch die Massenverschiebung, die MS/MS-Spektren und über ihre Retentionszeit sowie die Peakbreite im Chromatogramm identifiziert werden.

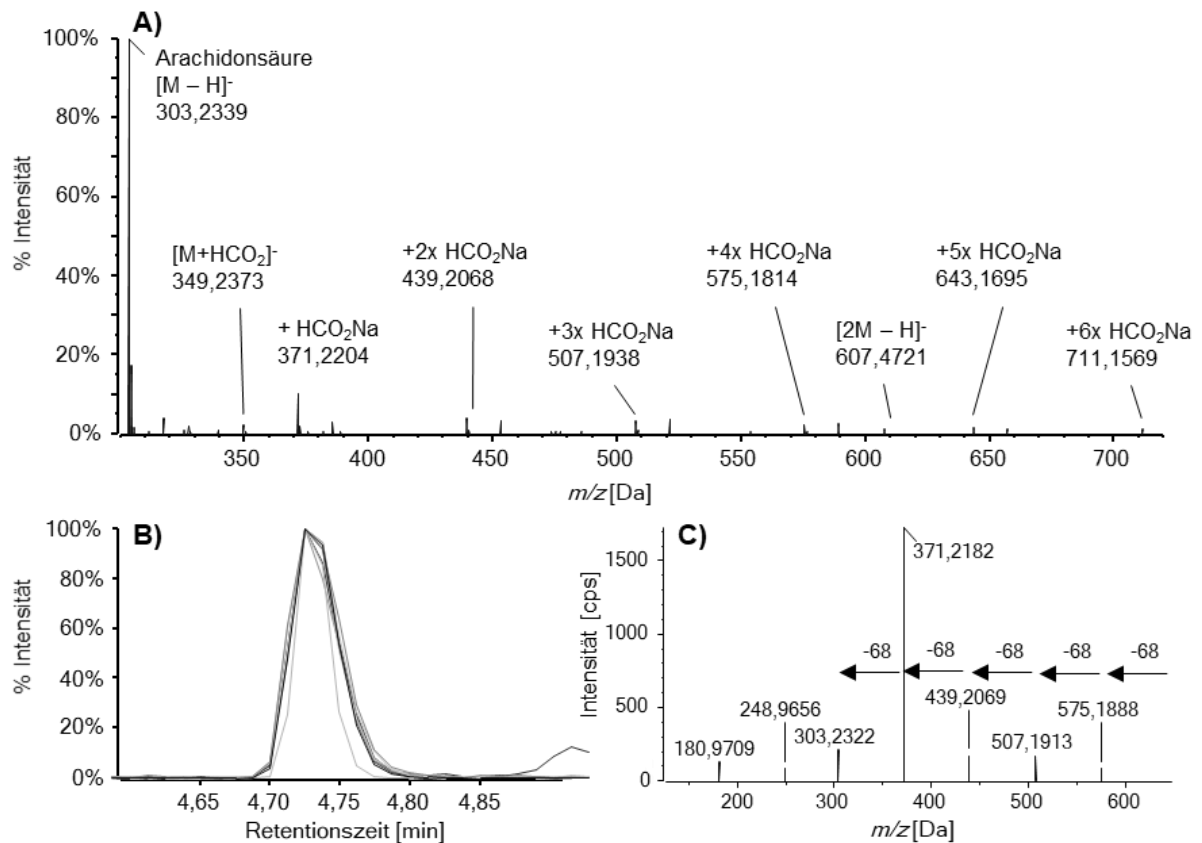


Abbildung 32: Natriumformiat-Cluster der Arachidonsäure.

(A) Nach Injektion einer methanolischen Lösung mit 500 ng/mL Arachidonsäure konnten mehrere Addukte der Arachidonsäure gemessen werden. Den mobilen Phasen wurde Ameisensäure, aber keine Natriumionen zugesetzt, diese kommen ubiquitär als Verunreinigung vor. Die in (A) bestimmten Massen zeigen das gleiche Retentionsverhalten im Chromatogramm (B), dabei wurden die Massenspektren zwecks einer besseren Vergleichbarkeit auf 100% gesetzt. (C) Im MS/MS-Spektrum des Addukts mit fünf Natriumformiat konnten mehrere Neutralverluste von Natriumformiat (67,988 Da) beobachtet werden (Muttermasse 643,2  $m/z$ ). Andere Fettsäuren und isotope markierte Standards wie Stearinsäure-d<sub>35</sub> zeigten ein ähnliches Ionisationsverhalten. Die Addukte konnten auch in Plasmaproben nachgewiesen werden, dort traten zudem noch Dimere unterschiedlicher Fettsäuren, die gleichzeitig eluieren, auf.

### 3.1.3.2 Massenkalibrierung

Eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung der Analyten ist die Aufrechterhaltung der Massengenauigkeit während der gesamten Laufzeit. Von Sciex wird die *APCI Positive Calibration Solution* für den positiven und die *APCI Negative Calibration Solution* für den negativen Ionisationsmodus empfohlen. Durch den Wechsel der Kalibrierlösung mussten bei Änderung des Ionisationsmodus die Kanäle des *Calibrant Delivery Systems* gespült werden. Die Spülung kann nicht automatisch erfolgen und verbraucht deutlich mehr Kalibrierlösung als die eigentliche Kalibrierung. Aus diesen Gründen wurde eine Mischung aus *APCI Positive Calibration Solution* und 1 µg/mL Sulfinpyrazon in Acetonitril (1:1, v/v) für den positiven und negativen Ionisationsmodus verwendet und somit ein unbeaufsichtigter Polaritätswechsel zwischen den Messungen unterstützt. Außerdem könnte mit dieser Mischung bei Bedarf ein größerer Massenbereich im negativen Modus abgedeckt werden. Die Kalibrierung im positiven MS/MS-Modus erfolgte mit Reserpin und im negativen MS/MS-Modus mit Sulfinpyrazon. Weiterhin konnte der Fluss für die Kalibrierlösung von 500 µL/min auf 200 µL/min reduziert werden, was bei gleichbleibender Qualität der Kalibrierung eine erhebliche Menge an Kalibrierlösung einspart. Die für die Kalibrierung verwendeten Analyten und Massen sind in Tabelle 22 gelistet. Bei vorhandenem TOFMS-Scan-Experiment kann das Intervall zwischen den Autokalibrierungen, aufgrund der internen Kalibrierung mit Hintergrund Signalen und ohne Einschränkung in der Massengenauigkeit, 20 Injektionen betragen. Dies konnte in drei unabhängigen Messungen bestätigt werden. Eine davon ist als Beispiel in Abbildung 33 dargestellt. Da die Stabilität der Massengenauigkeit für die korrekte Identifizierung der Analyten unentbehrlich ist, wurde für die Praxis die Autokalibrierung alle 10 bis 15 Injektionen durchgeführt.

Tabelle 22: Theoretische  $m/z$  der Analyten für die externe Kalibrierung über APCI.

<b>Analyt</b>	<b>TOF MS +</b>	<b>TOF MS -</b>
Aminoheptansäure	146,1176	-
Amino-dPEG 4-säure	266,1598	264,1453
Sulfinpyrazon-Fragment	-	277,0983
Clomipramin	315,1623	-
Amino-dPEG 6-säure	354,2122	352,1977
Sulfinpyrazon	-	403,1122
Amino-dPEG 8-säure	442,2647	440,2501
Reserpin	609,2807	-
Amino-dPEG 12-säure	618,3695	616,3550
Hexakis(2,2,3,3-tetrafluoropropoxy)phosphazen	922,0098	965,9996
Hexakis(1,1,5-octafluoroheptoxy)phosphazen	1521,9715	-

<b>Reserpin (TOF-MS/MS +)</b>		<b>Sulfinpyrazon (TOF-MS/MS -)</b>	
$C_{11}H_{12}NO^+$	174,0913	$C_6H_5O^-$	93,0344
$C_{10}H_{11}O_4^+$	195,0652	$C_6H_5OS^-$	125,0067
$C_{13}H_{18}NO_3^+$	236,1281	$C_{10}H_8NO^-$	158,0611
$C_{22}H_{25}N_2O_3^+$	365,1860	$C_{17}H_{13}N_2O_2^-$	277,0983
$C_{23}H_{29}N_2O_4^+$	397,2122	$C_{23}H_{20}N_2OS_3^-$	403,1122
$C_{23}H_{30}NO_8^+$	448,1966		
$C_{33}H_{40}N_2O_9^+$	609,2807		

## Ergebnisse

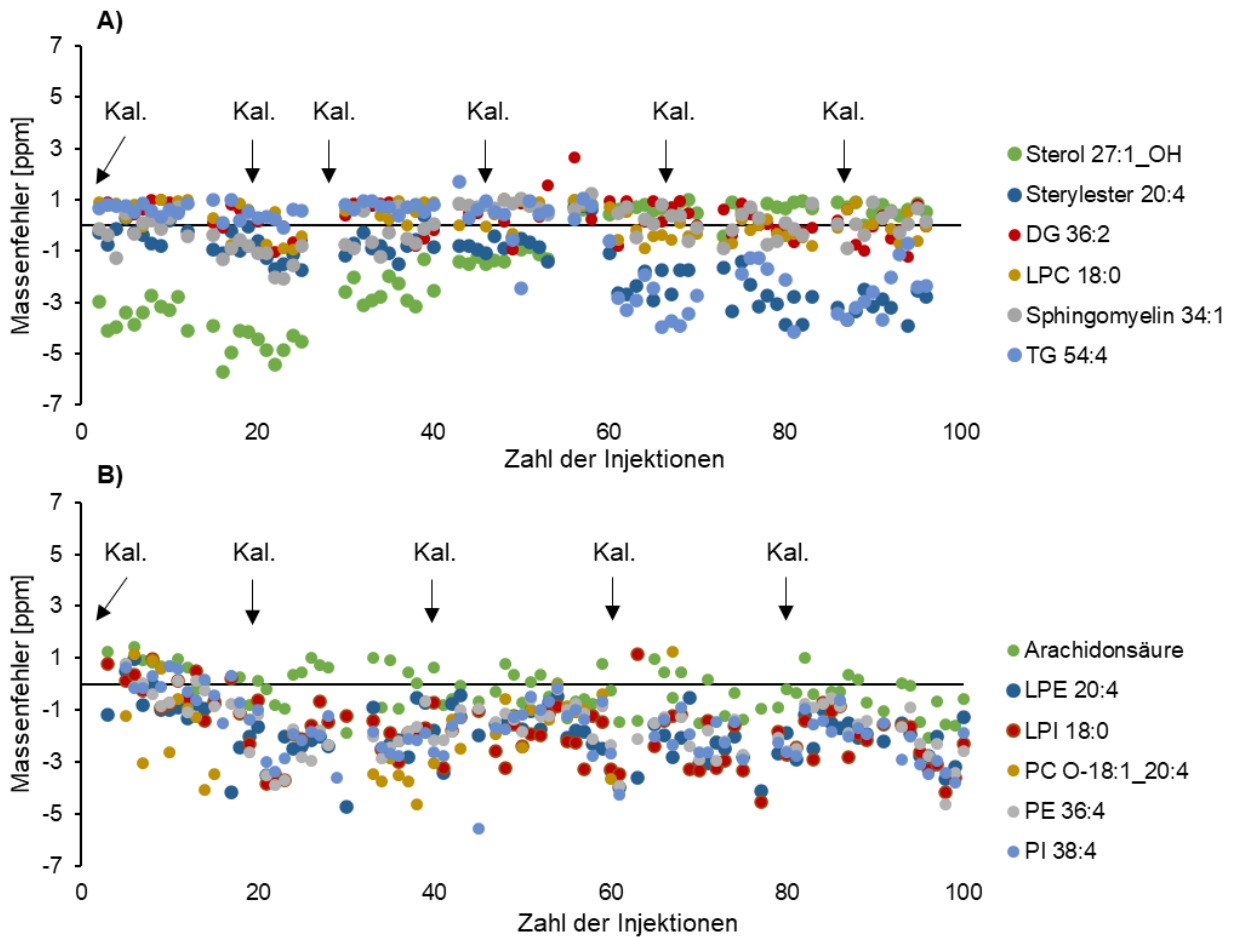


Abbildung 33: Messfehler verschiedener Lipide im Messverlauf mit Autokalibrierung alle 20 Injektionen. Bei den fehlenden Werten wurde reines Lösungsmittel injiziert. Es wurden hintereinander acht verschiedene Gewebetypen gemessen. Die Analyten TG 54:4 und PC O-18:1\_20:4 kamen nicht in allen Gewebetypen vor. Auch zwischen den Autokalibrierungen war der Massenfehler meistens < 5 ppm. (A) positiver Ionisationsmodus (Messung wurde nach 26 Injektionen kurzzeitig unterbrochen), (B) negativer Ionisationsmodus, Kal. = Autokalibrierung.



### 3.1.3.3 Datenabhängige vs. datenunabhängige MS/MS-Spektren

Für die Identifizierung werden MS/MS-Spektren für alle gemessenen Lipide benötigt. Die Spektren sollten möglichst rein und demnach selektiv sein. Zur Verfügung standen die datenabhängige Aufnahme von MS/MS-Spektren (IDA), die selektiv ist, aber u.U. nicht für alle Analyten ein Spektrum aufnimmt, sowie die datenunabhängige SWATH-Messung. Mit SWATH werden alle Analyten in einem Fenster von beispielsweise 25 Da fragmentiert und die MS/MS-Spektren können auch für den semi-quantitativen Vergleich herangezogen werden. Wenn die Massenübergänge spezifisch sind, wie z.B. bei den Ceramiden, konnte die Selektivität erhöht werden. Die phosphatidylcholinhaltigen Lipide hingegen teilen sich die meisten Fragmente, sodass die Selektivität im SWATH-Spektrum geringer war als im MS-Scan (siehe Abbildung 34).

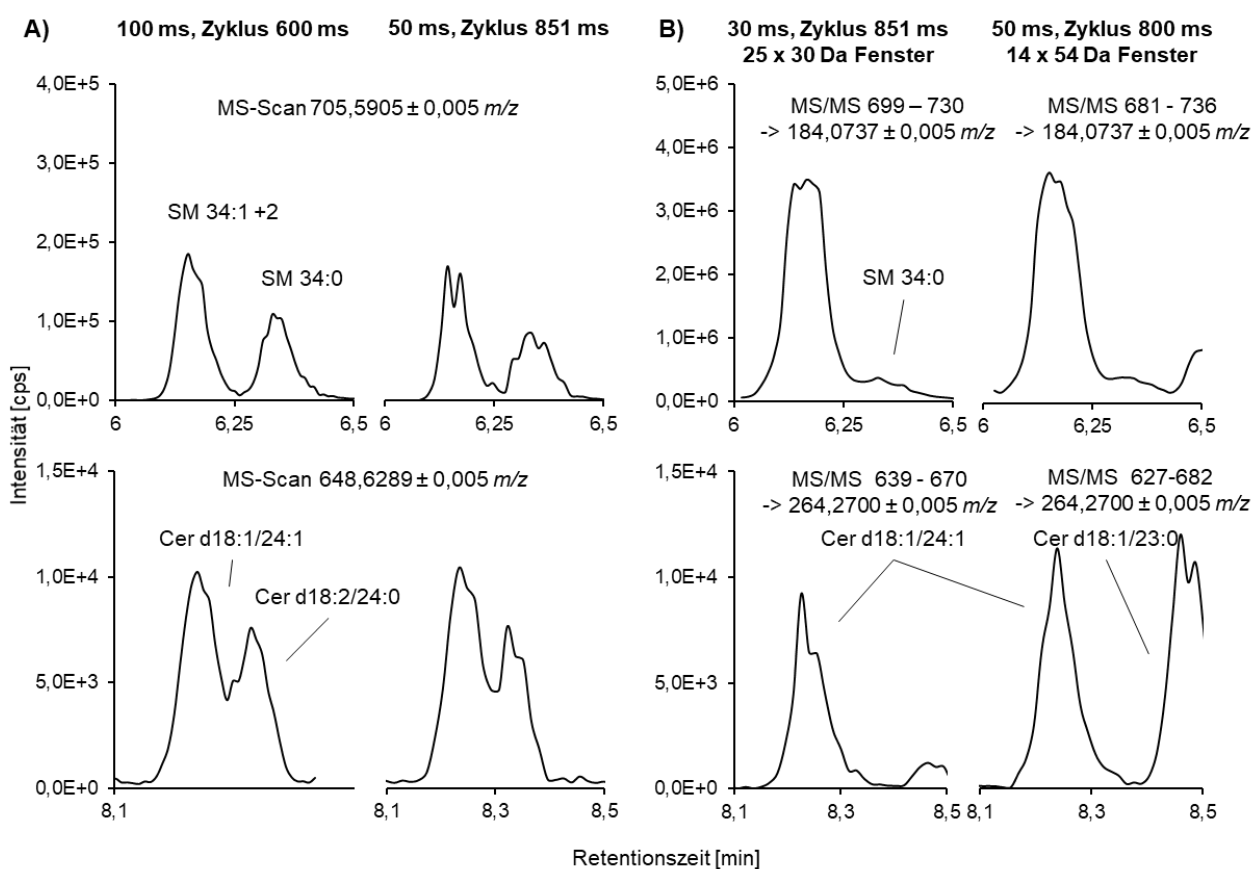


Abbildung 34: Vergleich MS-Scan mit SWATH-Messung bei verschiedenen Fensterbreiten und Akkumulationszeiten.

Die Unterschiede werden anhand der Beispiele von Sphingomyelin 34:0 und Ceramid d18:1/24:1 für den MS-Scan (A) und SWATH-MS/MS (B) gezeigt. Angegeben werden jeweils die Akkumulations- und die Gesamtzykluszeit (Scan + mehrere MS/MS Spektren) sowie die extrahierte Massenspur  $\pm 0,005 m/z$ . Bei den MS/MS-Messungen wird zusätzlich der im Q1 selektierte und gemeinsam fragmentierte Massenbereich angegeben. Die tatsächliche Breite der Massenfenster weicht leicht von der eingestellten Größe ab, damit sich die Fenster überschneiden. Durch eine höhere Akkumulationszeit waren die Signale stabiler und dadurch der Kurvenverlauf im Chromatogramm glatter. Da das 184  $m/z$  Fragment der Phosphocholin-Kopfgruppe bei mehreren Lipiden vorkommt, war die Selektivität bei einer SWATH-Messung sowohl mit 30 als auch mit 54 Da Fenstern zu gering, sodass der Peak von SM 34:0 im Untergrund verschwindet (die unterschiedlichen Y-Achsen sind zu beachten). Die Isomere Cer d18:1/24:1 und Cer d18:2/24:0 hingegen können durch SWATH und den spezifischen Übergang zur Sphingoidbase getrennt werden. Bei einem größeren Fenster von 54 Da werden mehr Moleküle gleichzeitig fragmentiert.

## Ergebnisse

---

In einem Massenfenster von 700 bis 730  $m/z$  konnten z.B. im positiven Ionisationsmodus u.a. SM 34:2, PC 30:2, SM 34:1, PC 30:1, SM 34:0, PC 30:0, PE 34:3, PE 34:2, PE 34:1, SM 35:1, PE O-18:1\_18:2, SM 36:2, PC 32:2 sowie deren Isomere und Isotope detektiert werden. Diese eluierten in der entwickelten Methode zwar in einem Retentionszeitbereich von ca. 5,4 bis 7,4 Minuten größtenteils getrennt voneinander, dennoch verdeutlicht das Beispiel wie kompliziert die Identifizierung einzelner Lipide mittels SWATH sein kann. Wenn mehrere Analyten im gleichen Massenfenster und zur gleichen Zeit kommen, ist die exakte Identifizierung erschwert bis unmöglich (siehe Abbildung 35). Die Fensterbreite hängt von der zur Verfügung stehenden Zykluszeit und den zu scannenden Massenbereich ab. Bei der Testmessung wurde der Massenbereich von 250 bis 1000  $m/z$  in 25 jeweils 30 Da breite Fenster aufgeteilt. Als Akkumulationszeit für den MS-Scan wurden 50 ms und für die MS/MS-Experimente je 30 ms angesetzt, die daraus resultierende Zykluszeit betrug 851 ms. Es war somit nicht möglich, bei einer minimalen Peakbreite von ca. 6 Sekunden die für eine semi-quantitative Auswertung benötigten 10 Messpunkte zu erhalten. Mit einem Massenfenster von 30 Da war sowohl die Selektivität zu gering als auch die Zykluszeit zu lang für die entwickelte Chromatographie. Auch mit 10 Fenstern mit einer variablen Breite von 27 bis 164 Da, ausgewählt anhand der Signale von Humanplasma im positiven Ionisationsmodus, und einer Akkumulationszeit von 50 ms war die Selektivität zu gering. Deswegen wurden datenabhängige MS/MS-Spektren mittels IDA gemessen. Bei einer Humanplasma-Probe im positiven Ionisationsmodus wurden ungefähr 3.000 IDA-Spektren getriggert (Abbildung 35 B). Dabei gab es mit einer Toleranz von 10 ppm und 6 Sekunden nur ca. 100–200 Überschneidungen, d.h. dass nur wenige Spektren doppelt aufgenommen wurden. Im negativen Ionisationsmodus wurden ca. 2.400 MS/MS-Spektren aufgenommen, von denen ca. 100 überlappten. Die Zahl der aufgenommenen MS/MS-Spektren variierte zwischen den Messungen, z.B. durch chromatographische Variationen oder unterschiedliche Intensitäten. Vergleicht man die Zahl der aufgenommenen IDA-Spektren mit den knapp 1.000–3.000 gefilterten, d.h. von Isotopen- und Blankpeaks bereinigten, Signalen der untargeted Auswertung (pro Polarität), so ist anzunehmen, dass mit den gewählten Einstellungen für die meisten Signale ein MS/MS-Spektrum aufgenommen wird. Für Signale mit einer Intensität unter 150 Signalen pro Sekunde (cps), wurde kein MS/MS-Spektrum aufgenommen, da in diesem Fall die Qualität der Spektren zu gering war.

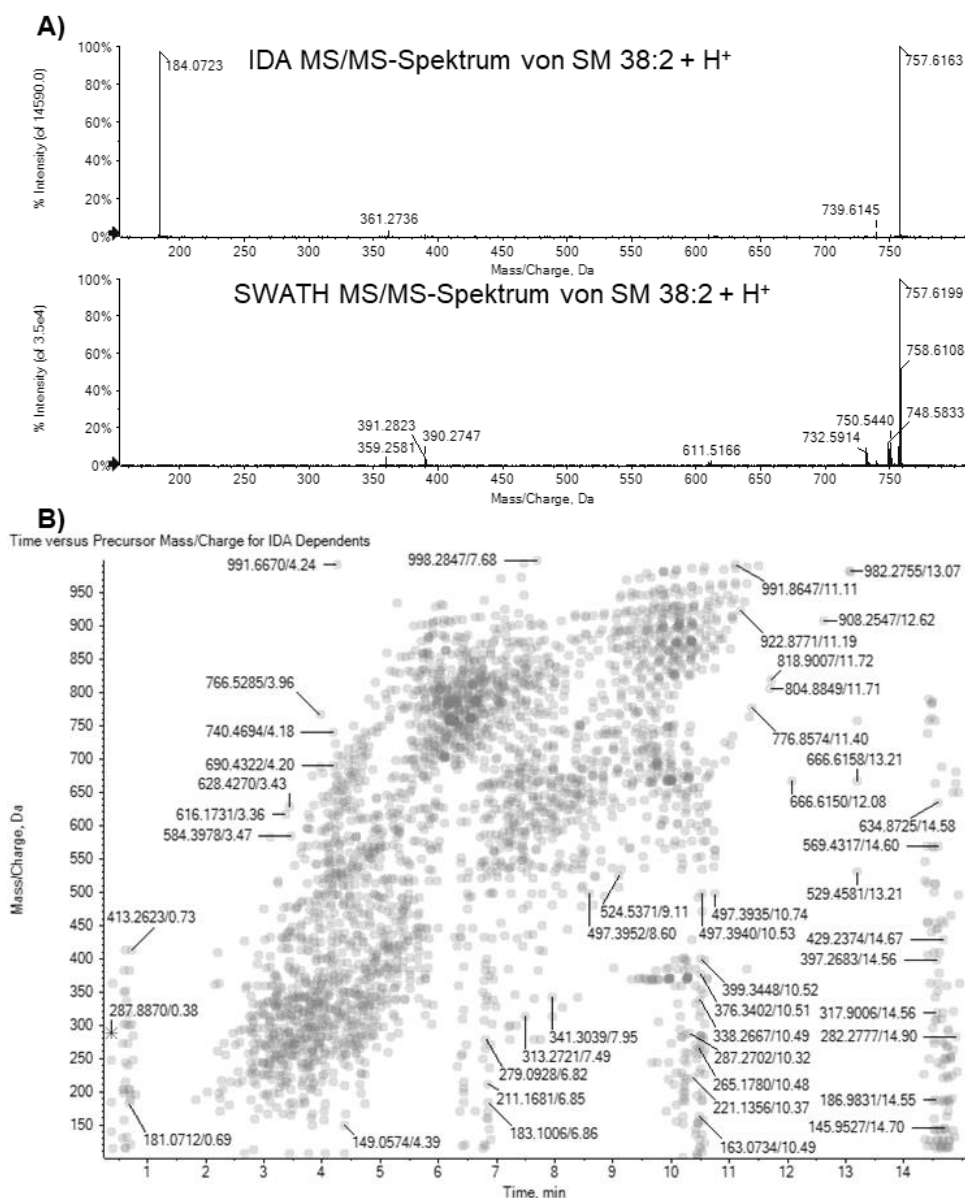


Abbildung 35: IDA- und SWATH-Spektrum von SM 38:2 in Humanplasma und Verteilung der IDA-Spektren über den  $m/z$  und RT-Bereich.

(A) Das mit information-dependent acquisition (IDA) aufgenommene Spektrum von Sphingomyelin 38:2 zeigt das typische Kopfgruppenfragment bei 184  $m/z$  sowie den Neutralverlust eines Wasser-Moleküls. Das SWATH-Spektrum von SM 38:2 hingegen enthält noch zahlreiche weitere Fragmente von den Isotopen von SM 38:2 und anderen Analyten in dem gleichen Massenfenster von 729–760  $m/z$ . Die für die Identifizierung benötigten Fragmente gehen hier relativ zu den anderen Signalen unter. (B) Zeigt die typische Verteilung der aufgenommenen IDA-Spektren bzgl. des Masse-zu-Ladungs-Verhältnis und der Retentionszeit im positiven Ionisationsmodus bei der Messung von Humanplasma. Dabei stellt jeder Punkt ein Spektrum dar und die Intensität nimmt zu, wenn mehrere Spektren in diesem Bereich liegen.

### 3.1.4 Datenprozessierung

Durch hochauflösende Massenspektrometrie erzeugte Daten sind sehr umfangreich und die Auswertung kann entsprechend zeitaufwendig sein. Es wurden Verfahren entwickelt, um die Auswertung im Vergleich zu den von Sciex bereitgestellten Möglichkeiten zu beschleunigen und zu erweitern. Zunächst wird die Vorbereitung der Daten und der Stellenwert der internen Standards bei der Normalisierung untersucht. Im Anschluss erfolgt die statistische Auswertung zur Aufdeckung von Unterschieden zwischen den Proben Gruppen.

### 3.1.4.1 Normalisierung

Es wurde untersucht, ob die Zugabe von internen Standards zu den Proben vor der Extraktion für die Normalisierung der Ergebnisse verbessert. Dabei wurden u.a. die in der MarkerView Software enthaltenen Berechnungen des MPR und des Skalierungsfaktors aus mehreren internen Standards (MW IS) verwendet (Erläuterung siehe 2.1.4.1). Des Weiteren wurden die Ergebnisse auf einen IS pro Lipidklasse bezogen. Dieses Verfahren kann nur bei bereits identifizierten Analyten und nicht im Rahmen einer untargeted Auswertung angewandt werden. Die Normalisierung mit Hilfe des Totalionenstroms oder einen einzigen IS wurden aufgrund ihrer Fehleranfälligkeit nicht in Betracht gezogen [171, 226].

Als erster Testdatensatz wurden die Daten des Präanalytik-Versuches verwendet. Dabei wurden für eine bessere Übersichtlichkeit nur die Gruppen der für 0 bzw. 24 h bei Raumtemperatur gelagerten  $K_3$ EDTA- und NaF/Citrat-Vollblutproben sowie die Qualitätskontroll-Proben (QC) genauer betrachtet (89 von 450 Proben, Abschnitt 2.3.1). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Normalisierung mit dem MPR als auch mit dem MW IS für die Auswertung von untargeted Daten angewandt werden können. Die RLA-Graphen zeigen bei diesen Methoden eine enge Streuung um den Null-Wert und deshalb geringe Abweichungen innerhalb der untersuchten Gruppen (Berechnung siehe Abbildung 36). Diese sind essenziell für aussagekräftige Ergebnisse bei dem Vergleich zwischen Gruppen. Die Abweichungen innerhalb der Probengruppen mit der MPR-Normalisierung waren noch etwas geringer im Vergleich zu beiden Normalisierungsmethoden mit den IS. Eine mögliche Erklärung dafür sind die unterschiedlichen Matrixeffekte in den Proben, die mit einem IS pro Lipidklasse nicht vollständig korrigiert werden können, während die Matrixeffekte innerhalb der QC-Proben vergleichbar sind. Außerdem können durch das Pipettieren der IS-Lösung Abweichungen entstehen, die als gering einzustufen sind. Im Gegensatz zu der MPR-Methode, konnte die IS-Normalisierung die Ausreißer aufgrund eines Injektionsfehler korrigieren (Abbildung 36 A).

Bei der Betrachtung der analytspezifischen Auswirkung der Normalisierungen, zeigte sich der Nachteil der Normalisierung aller Werte einer Probe mit nur einem Skalierungsfaktor. Die Proben mussten aufgrund ihrer großen Anzahl auf zwei Messläufe aufgeteilt werden. Die Ergebnisse gleicher QC-Proben können sich zwischen den Messläufen, z.B. durch eine veränderte Geräteempfindlichkeit, unterscheiden, man spricht von Batch-Effekten. Diese betreffen die Analyten in einem unterschiedlichen Ausmaß. Sowohl die MPR- als auch die MW IS-Korrektur konnten den bei TG 56:6 auftretenden Batch-Effekt in den QC-Proben verringern, dafür war die Varianz von dem nicht so stark betroffenen LPC 20:4 erhöht (Abbildung 37). Die Normalisierung mit einem IS pro Lipidklasse lieferte in diesem Fall bessere Ergebnisse, ist allerdings bei der untargeted Auswertung nicht anwendbar.

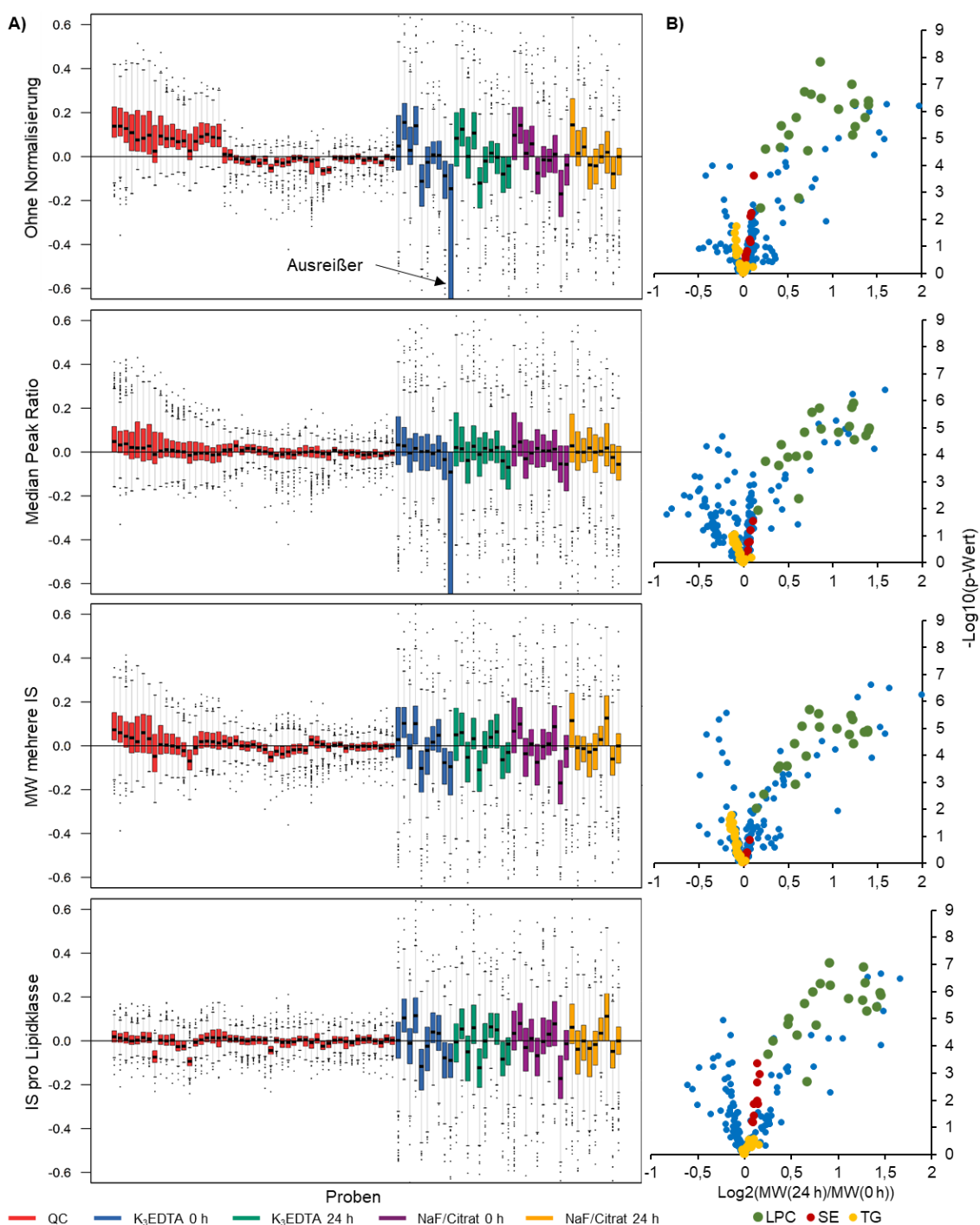


Abbildung 36: Vergleich verschiedener Normalisierungen mittels RLA- und Volcano-Graphen.

Es werden die Werte von 215 untersuchten Lipiden ohne Normalisierung, mit dem MPR, mit dem Mittelwert mehrerer IS und mit einem IS pro Lipidklasse normalisiert dargestellt. Bei dem RLA-Graphen (A) werden die Abweichungen innerhalb der Gruppen dargestellt. Dafür wurde für jeden Analyten vom  $\log_{10}$ -Wert der Peakflächen der Median innerhalb der Gruppe subtrahiert. Die Ergebnisse aller Analyten wurden dann probenweise in einem Boxplot aufgetragen und die verschiedenen Gruppen farblich hervorgehoben. Die Abweichungen innerhalb der Gruppen (v.a. der QC-Proben) sollten möglichst gering sein, das heißt die Werte sollten eng um Null streuen. Bei einer  $K_3EDTA$  0 h Probe wurde im negativen Ionisationsmodus zu wenig injiziert, deswegen sind die chromatographischen Peakflächen einiger Analyten deutlich verringert (Ausreißer). In den Volcano Graphen (B) wird die relative Änderung der Peakflächen gezeigt, nachdem  $K_3EDTA$ -Vollblut für 24 h bei RTp gelagert wurde. Die Lipidklassen LPC, SE und TG wurden farblich hervorgehoben, damit diese besser nachvollzogen werden können. Die LPC wurden ausgewählt, da sie eine starke Änderung zeigen. Die SE und TG wurden ausgewählt, weil sie Matrixeffekten unterliegen und sich gegenseitig supprimieren könnten. Die biologischen Unterschiede bleiben bei den dargestellten Normalisierungen erhalten. Möglicherweise kann durch einen IS pro Lipidklasse eine erhöhte Suppression der TG durch SE ausgeglichen werden. MW = Mittelwert.

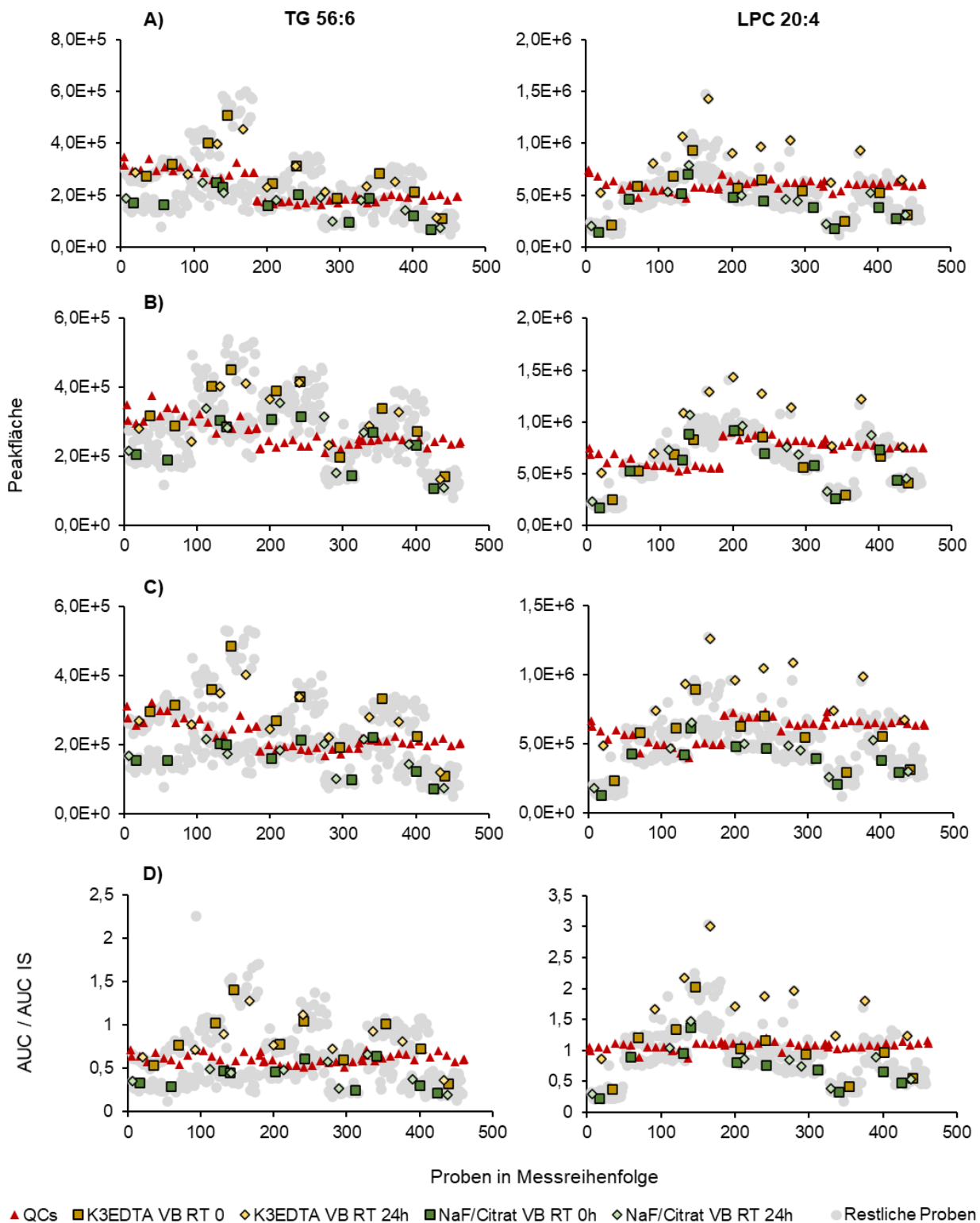


Abbildung 37: Vergleich verschiedener Normalisierungen bei einzelnen Analyten.

Gezeigt werden die chromatographischen Peakflächen der Analyten bzw. die Peakflächen in Relation zur Peakfläche des IS von TG 56:6 und LPC 20:4 über den Verlauf der Präanalytik-Messung. Die Daten werden ohne Normalisierung (A) oder mit einer Normalisierung mit dem MPR (B), den Mittelwert der internen Standard-Signale (C) oder der Verwendung eines IS pro Lipidklasse dargestellt. Die Proben wurden in zwei Messläufen analysiert. Die Ergebnisse der QC-Proben (▲) sollten möglichst ähnlich sein. Ohne Normalisierung zeigen die QC-Proben bei TG 56:6 einen deutlichen Batch Effekt (nach Injektion 188), während LPC 20:4 nicht so stark betroffen ist. Vier Probengruppen wurden hervorgehoben, um den Einfluss der Normalisierung auf biologische Unterschiede zu zeigen. Diese sollten trotz der Normalisierung erhalten bleiben.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Analyse der verschiedenen Normalisierungsverfahren bei der Analyse von Gewebeproben. Hierzu wurden 48 Mauspfoten-Proben sowie 8 QC-Proben aus dem Vergleich der Entzündungsmodelle durch Injektion von LPS oder Zymosan im Vergleich zu unbehandelten Mäusen untersucht (siehe Abschnitt 2.3.2). Auch in diesem Fall waren die Ergebnisse und die Varianz innerhalb der Gruppen nach der Normalisierung mit dem MPR, MW IS und einem IS pro Klasse vergleichbar. Eine Ausnahme stellt die Normalisierung zum Proteingehalt dar, denn bei dieser ist die Varianz innerhalb der Gruppen im RLA-Graphen deutlich gestiegen. Außerdem änderte sich durch die Normalisierung zum Proteingehalt die Aussage der Daten, nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ, wie am Beispiel der Mauspfoten, in die Zymosan injiziert wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe ersichtlich ist (Anhang Abbildung 55). Während bei den unkorrigierten oder mit den IS normalisierten Daten etwa gleichmäßig viele Lipide hoch- oder runterreguliert wurden, sind die Änderungen nach der Normalisierung mit dem Proteingehalt fast alle negativ. Dieser Effekt wurde durch die anschließende Normalisierung mit dem MPR umgekehrt. Die Normalisierung mit dem Proteingehalt auch in Kombination mit anderen Verfahren sollte deswegen für diesen Datensatz nicht angewandt werden.

Mit der MPR-Normalisierung können im Gegensatz zur IS-Korrektur auch Unterschiede im Probenvolumen korrigiert werden. Eine Kombination der MPR-Normalisierung mit anderen Verfahren, die unterschiedliche Probenmengen korrigieren, wie z.B. der Proteingehalt, sollten deshalb vermieden werden. Stattdessen kann die IS-Normalisierung verwendet werden, um die Variationen innerhalb einer Messung auszugleichen. Die Ergebnisse der Normalisierungen der Mauspfoten sind im Anhang unter Abbildung 55 aufgeführt.

Letztlich konnte gezeigt werden, dass die Normalisierungsverfahren mit MPR, MW IS und einem IS pro Lipidklasse ähnlich geeignet waren um die technische Varianz zu reduzieren und dabei die biologischen Unterschiede zu erhalten (Abbildung 36 B). Demnach müssen bei untargeted Messungen keine IS verwendet werden. Allerdings wird der Vergleich von Messläufen von verschiedenen Zeitpunkten durch die Verwendung eines IS pro Lipidklasse erleichtert, sodass der Zusatz von IS während der Extraktion sinnvoll sein kann (Abbildung 37). Das optimale Normalisierungsverfahren sollte für jeden Datensatz einzeln bestimmt werden. In diesen beiden Fällen wurden die untargeted Daten mit dem MW IS und die semi-targeted Daten mit einem IS pro Lipidklasse normalisiert.

## Ergebnisse

Die internen Standards können außerdem zur Korrektur schwankender Retentionszeiten verwendet werden. Für eine RT-Korrektur sind Konzentrationsunterschiede nicht relevant, deswegen kann sie auch mit anderen Analyten durchgeführt werden. Einzige Voraussetzung ist, dass die für die Korrektur verwendeten IS oder Analyten in allen Proben vorkommen und innerhalb der RT-Toleranz keine Isomere oder Isobare eluieren, die zur falschen Signal-Auswahl führen. Die verwendeten Signale sollten möglichst gleichmäßig über die gesamte Retentionszeit verteilt sein. In der MarkerView Software kann die RT-Korrektur linear erfolgen oder um einen konstanten Wert verschoben werden. Da meistens geringe Änderungen in den Gradienten die RT der verschiedenen Analytgruppen unterschiedlich betreffen, ist die lineare RT-Korrektur sinnvoller. Im Laufe dieser Arbeit waren die RT in den meisten Fällen sehr stabil, sodass keine RT-Korrektur notwendig war. Bei kleineren RT-Verschiebungen konnten die Unterschiede erfolgreich durch eine lineare RT-Korrektur ausgeglichen werden (Abbildung 38). Hingegen kam es durch den Wechsel baugleicher LC-Säulen zu Änderungen der Retentionszeiten einiger Lipidgruppen wie den PI und den PS, während die anderen Lipidklassen nicht betroffen waren. In diesem Fall funktionierte die RT-Korrektur für die untargeted Auswertung nicht, stattdessen musste mit einer größeren RT-Toleranz gearbeitet werden. Bei semi-targeted Analysen können die RT in Abhängigkeit von dem jeweiligen IS angepasst werden.

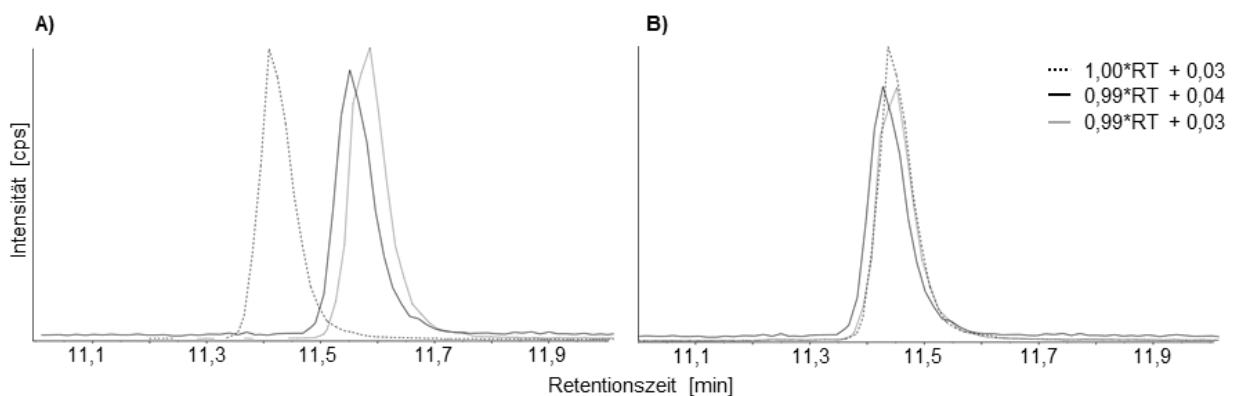


Abbildung 38: Lineare Retentionszeitkorrektur.

Vergleich von Messungen von verschiedenen Zeitpunkten mit linearer RT-Korrektur (extrahierte Ionenchromatogramm von FA 18:0,  $283,265 \pm 0,041$   $m/z$ ).



### 3.1.4.2 Statistische Auswertung

In der Software R wurden verschiedene Skripte entwickelt, die einige Bereiche der statistischen Auswertung beschleunigen. Die Funktionen dieser Skripte werden im Folgenden erläutert.

#### Umgang mit fehlenden Werten

Drei Testdatensätze zu fehlenden Werten wurden mit mehreren Imputationsverfahren ausgewertet mit dem Ziel das geeignetste Verfahren für fehlende Werte unterhalb des Detektionslimits zu identifizieren (R Skript siehe 8.2.1). Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse der Regressionsanalyse, bei der die ersetzten Werte mit den ursprünglichen Werten verglichen wurden (Details zu den Imputationsverfahren siehe Abschnitt 2.1.4.2).

Tabelle 23: Vergleich verschiedener Imputationen für linkszensierte Daten.

Testdatensätze: 1 = Konzentrationen (quantitativ), 2 = Flächenverhältnis zum IS (semi-quantitativ), 3 = chromatographische Peakflächen (semi-quantitativ). Bei den Datensätzen wurden die niedrigsten 5, 10, 15 oder 20% der Werte entfernt und anschließend mit verschiedenen Verfahren ersetzt. Minimum bzw. Min = kleinste verbleibende Wert, kNN = k-Nächste-Nachbarn-Algorithmus, Amelia = Amelia-Algorithmus (Details zu den Verfahren siehe 2.1.4.2).

Testdatensatz	fehlende Werte [%]	Durchschnittliche rel. Abweichung [%] bei Ersetzen mit					
		Null	Minimum	Min/2	Median	kNN	Amelia
1 16 Analyten 94 Proben 5 Gruppen	5	5,32	1,15	2,11	7,28	5,32	1,22
	10	10,64	2,25	4,25	12,66	10,82	2,63
	15	14,89	3,62	5,71	16,81	14,89	4,38
	20	20,15	5,75	7,39	21,49	20,33	6,32
2 10 Analyten 48 Proben 6 Gruppen	5	6,25	2,24	2,02	9,63	7,87	2,31
	10	10,42	3,57	3,63	13,32	10,24	3,11
	15	16,67	5,42	5,99	18,26	19,62	5,56
	20	20,83	7,14	7,44	21,40	24,61	7,98
3 15 Analyten 114 Proben 13 Gruppen	5	5,20	0,56	2,33	18,39	1,55	1,36
	10	10,53	1,97	4,30	37,55	6,80	3,21
	15	14,91	3,07	5,95	55,70	8,66	4,84
	20	20,18	5,10	7,59	73,81	16,62	7,26

Bei allen drei Testdatensätzen war die durchschnittliche relative Abweichung beim Ersetzen der fehlenden Werte mit dem kleinsten verbleibenden Wert am geringsten. Auch die Imputationen mit dem Amelia-Algorithmus und der Hälfte des kleinsten Wertes erzeugten geringe relative Abweichungen. Mit dem Amelia-Algorithmus werden in der Regel mehrere Datensätze erzeugt, die dann alle einzeln ausgewertet und am Ende zusammengeführt werden müssen. Zur Vereinfachung wurde nur einer der fünf erzeugten Datensätze ausgewertet. Die Imputationen mit dem kNN-Algorithmus und dem Median zeigten die höchsten Abweichungen, da diese Verfahren annehmen, dass die fehlenden Werte Teil der restlichen Verteilung sind. Sie überschätzen die Werte im Falle

## Ergebnisse

---

von linkszensierten Daten und sollten deshalb nur bei zufällig fehlenden Werten angewandt werden. Bei Testdatensatz 3 mit den Peakflächen im Chromatogramm (große Zahlen) lieferte der kNN-Algorithmus bessere Werte als bei den Datensätzen 1 und 2, dennoch war er auch bei Datensatz 3 den anderen Verfahren unterlegen. Je weniger Werte ersetzt werden mussten, desto geringer war die relative Abweichung, da für die Regression immer der ganze Datensatz verwendet wurde und vorhandene Werte demnach einen Fehler von 0 haben.

Auch die Verteilung der Werte ist für die weitere Auswertung von Bedeutung, deshalb wurden die verschiedenen Verfahren mittels Box-Whisker-Plots verglichen. Abbildung 39 zeigt pro Testdatensatz einen Beispielanalyten, bei dem 20% der Werte ersetzt wurden und für Datensatz 3 auch noch für 5% fehlende Werte. Wenn die fehlenden Werte überhaupt nicht ersetzt wurden, haben sich die Verteilungen deutlich verschoben und wichen stärker von der Normalverteilung ab, wie z.B. bei Ceramid d18:1/24:0 in Datensatz 1. Deshalb ist es nicht ratsam den Datensatz ohne Imputationen auszuwerten, insbesondere wenn mehrere Werte fehlen. Das Ersetzen mit dem kleinsten noch vorhandenen Wert bzw. der Hälfte davon zeigte niedrige relative Abweichungen, aber die Verteilung der Daten wich von der ursprünglichen Verteilung ab, v.a. wenn 20% der Werte durch das Minimum ersetzt wurden. Dieses Problem betrifft prinzipiell alle Verfahren, die fehlende Werte durch konstante Werte ersetzen. Das Ersetzens durch die Hälfte des Minimums hatte einen geringeren Einfluss auf die Verteilung der Daten, sodass letztlich dieses Verfahren in das Skript zur univariaten Auswertung der Daten implementiert wurde. Die mit dem Amelia-Algorithmus erstellten Datensätze ähnelten der ursprünglichen Verteilung, jedoch aufgrund des hohen Rechenaufwands, der stark begrenzten Anzahl Analyten sowie der Voraussetzung, dass die Analyten nicht korreliert sein dürfen, erwies sich dieser Algorithmus als ungeeignet.

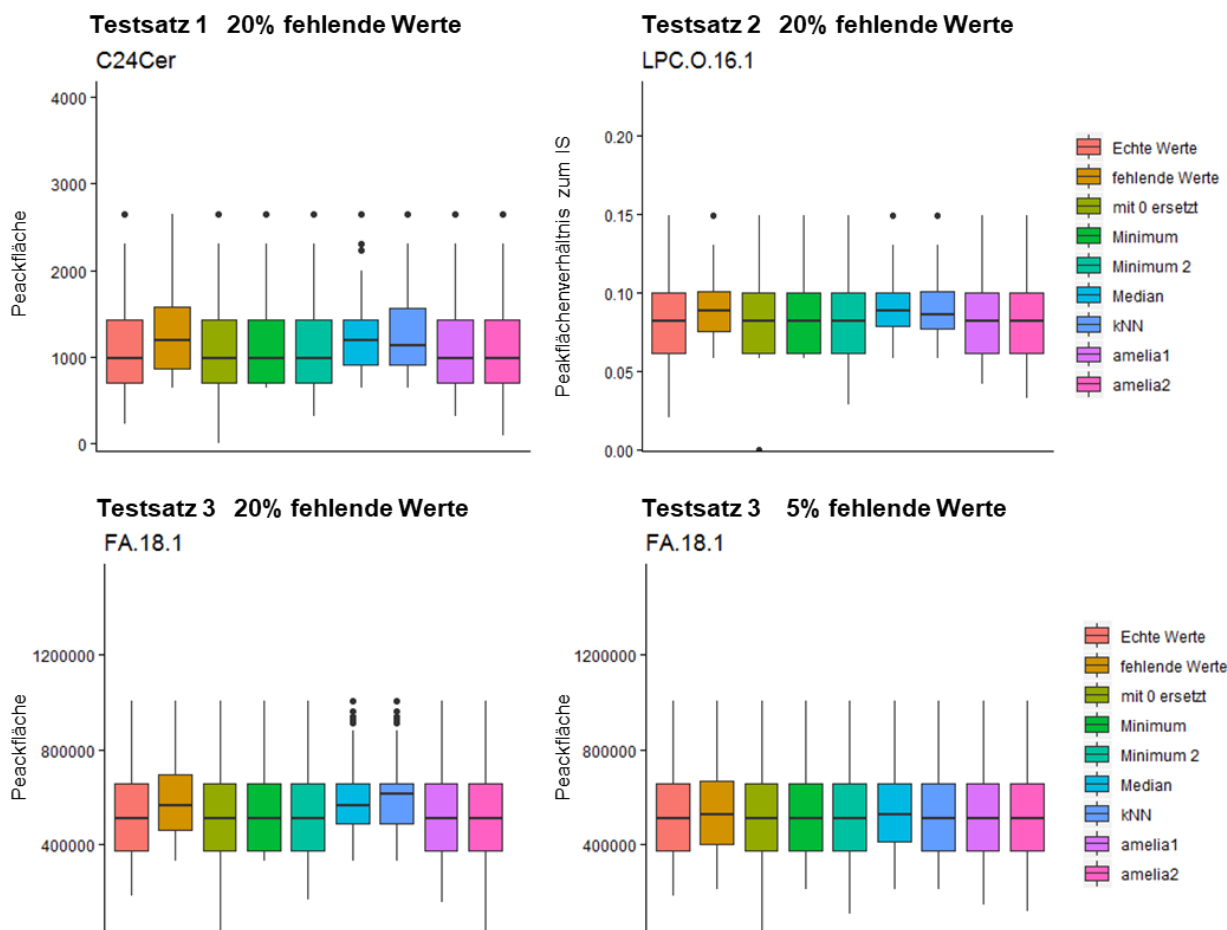


Abbildung 39: Vergleich der Verteilung der Daten bei Einsatz verschiedener Imputationsverfahren.

Die Verteilung der Daten wird mittels Box-Plots dargestellt. Die Box umfasst den Interquantil-Bereich, der horizontale Strich markiert den Median und die Whiskers entsprechen dem 1,5-fachen des Interquantil-Bereiches, jedoch minimal dem kleinsten und maximal dem größten vorhandenen Wert. Bei Werten außerhalb der Whiskers geht man von Ausreißern aus, diese werden als Punkt dargestellt.

### Univariate Auswertung

Für die analytische (univariate) Auswertung wurde ein R Skript entwickelt (Absatz 8.2.2), das sowohl semi-targeted als auch untargeted Daten auswerten kann. Das Skript wurde testweise mit zwei Datensätzen ausgeführt und die Ergebnisse der statistischen Tests mit MetaboAnalyst 4.0 abgeglichen [243].

Als ersten Testsatz wurden die semi-targeted Daten der mit LPS bzw. Zymosan behandelten Mäusen verwendet (siehe auch 2.3.2). Zur Vereinfachung wurde für die Auswertung in MetaboAnalyst nur der Teildatensatz mit den Plasmaproben verwendet (24 Proben + 6 QCs), während mit R automatisch der komplette Datensatz ausgewertet wurde (24 Plasma-, 48 Gewebep Proben + 14 QCs). Analyten mit einer RSD von mehr als 20% bei den QC-Proben wurden entfernt. Die Daten enthielten Flächenverhältnisse zum IS und wurden bereits mit den Signalen in der Blankprobe abgeglichen. Es handelte sich um unabhängige Proben, folglich wurden ANOVA, Kruskal-Wallis und ungepaarter  $t$ -Tests (ungleiche Varianzen) sowie Wilcoxon-Tests durchgeführt.

## Ergebnisse

---

Die erhaltenen p-Werte wurden jeweils nach der Bonferroni- und FDR-Methode angepasst. Dabei ist zu beachten, dass die Tests zum Vergleich von zwei Gruppen ( $t$ - und Wilcoxon-Test) verwendet wurden, um einzeln die Gruppen mit der Kontrollgruppe zu vergleichen. Die Tests wurden nicht paarweise durchgeführt und die p-Werte wurden nur für die Anzahl der Analyten, nicht für die erhöhte Testanzahl durch mehrere Gruppen angepasst. Die erhaltenen p-Werte sind demzufolge niedriger. Die automatisierte Berechnung und Ausgabe von paarweisen  $t$ -tests hat sich als schwierig herausgestellt, deswegen wurde diese Vereinfachung gewählt. Außerdem wird in R mit der  $t$ -Test Funktion standardmäßig angenommen, dass keine Varianzgleichheit besteht, d.h. bei den R Ergebnissen handelt es sich strenggenommen um die robusteren Welch-Tests anstelle von Students- $t$ -Tests. Praktisch konnte bei den Ergebnissen des Welch- und Students- $t$ -Test (Varianzgleichheit wird angenommen) keine Unterschiede bei den F- und p-Werten festgestellt werden. Bei der Auswertung in MetaboAnalyst wurde zunächst eine parametrische und nicht-parametrische ANOVA durchgeführt. Anschließend wurden die Zymosan Proben aus dem Datensatz entfernt, damit Welch- und Wilcoxon-Tests durchgeführt werden konnten. Bei MetaboAnalyst mussten die QC-Proben manuell entfernt werden, da diese u.U. noch für multivariate Auswertungen benötigt werden. Als Grenze für das Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 1 angenommen, da bei MetaboAnalyst nur signifikante Ergebnisse extrahiert werden können. Eine Anpassung der p-Werte kann in MetaboAnalyst nur mit der FDR erfolgen. Eine analytweise Überprüfung der Normalverteilung und Varianzgleichheit mittels analytischer Tests sowie eine graphische Darstellung der Einzelverteilungen ist mit MetaboAnalyst nicht möglich. Die Anzahl signifikanter Tests ( $p$  bzw.  $p^* < 0,05$ ) wird in Tabelle 24 verglichen.

Tabelle 24: Vergleich der Auswertung der semi-targeted Daten des LPS/Zymosan-Plasmas mit R und MetaboAnalyst.

Dargestellt wird die Anzahl an Analyten, die angegebenen Kriterien erfüllen. kA = keine Angabe, NA = nichtzutreffend (n=8).

	MetaboAnalyst		R Skript	
	ANOVA	Kruskal-Wallis	ANOVA	Kruskal-Wallis
Anzahl Analyten gesamt	230		230	
wegen >1% fehlender Werte entfernte Analyten	111		111	
wegen QC RSD > 20% entfernter Analyten	0		0	
Analyten ausgewertet	119		119	
<b>Test</b>	<b>ANOVA</b>	<b>Kruskal-Wallis</b>	<b>ANOVA</b>	<b>Kruskal-Wallis</b>
unkorrigierter p-Wert < 0.05	40	38	40	38
FDR korrigierter p-Wert < 0.05	31	18	31	18
Bonferroni korrigierter p-Wert < 0.05	kA	kA	0	0
unkorrigierter p-Wert < 0.05 & Shapiro+Levene > 0.05	kA	NA	36	NA
FDR p-Wert < 0.05 & Shapiro+Levene > 0.05	kA	NA	27	NA
Bonferroni p-Wert < 0.05 & Shapiro+Levene > 0.05	kA	NA	0	NA
<b>nur Vergleich von Kontrolle vs. LPS-Gruppe</b>				
<b>Test</b>	<b>t-test</b>	<b>Wilcoxon</b>	<b>t-test</b>	<b>Wilcoxon</b>
unkorrigierter p-Wert < 0.05	26	27	26	27
FDR korrigierter p-Wert < 0.05	0	0	0	0
Bonferroni korrigierter p-Wert < 0.05	kA	kA	0	0
unkorrigierter p-Wert < 0.05 & Shapiro+Levene > 0.05	kA	NA	23	NA
FDR p-Wert < 0.05 & Shapiro+Levene > 0.05	kA	NA	0	NA
Bonferroni p-Wert < 0.05 & Shapiro+Levene > 0.05	kA	NA	0	NA

Die berechneten F- und unkorrigierten p-Werte waren bei beiden Auswertungen bei den t- und Wilcoxon-Test sowie der ANOVA identisch, abgesehen davon, dass die Ergebnisse bei MetaboAnalyst auf die vierte Nachkommastelle gerundet wurden. Auch die Chi-Quadrat und unkorrigierten p-Werte bei dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test waren identisch. Die Ergebnisse des R Skripts wurden durch die MetaboAnalyst Auswertung bestätigt.

Als zweiter Datensatz wurde die untargeted Peakliste vom negativen Ionisationsmodus der Untersuchung der präanalytischen Stabilität von humanen K<sub>3</sub>EDTA-Plasma bei Raumtemperatur verwendet (60 Proben, siehe auch Abschnitt 2.3.1). Die ANOVA mit Messwiederholungen lieferte vergleichbare p- und t-Werte bei dem selbstentwickelten R Skript und MetaboAnalyst. In MetaboAnalyst wurden weniger Analyten ausgewertet, da das Entfernen von Analyten aufgrund von nahezu konstanten Werten anhand des Interquartil-Bereiches (engl. interquartile range, IQR) standardmäßig ausgewählt ist [244]. Dadurch wurden auch signifikant veränderte Analyten entfernt (Tabelle 25). Die Auswertung konnte nicht wiederholt werden, da das Problem erst zu einem späteren Zeitpunkt bemerkt wurde und zwischenzeitlich die MetaboAnalyst-Plattform inkompatibel

## Ergebnisse

angepasst wurde. Danach konnten keine Datensätze mit abhängigen Proben mehr eingelesen werden. Eine Auswertung abhängiger Proben mit MetaboAnalyst war zum Zeitpunkt der Untersuchung demnach nicht möglich und konnte nur mit dem selbst entwickelten R Skript erfolgen. Die Auswertung für den kompletten Präanalytik-Datensatz mit allen acht Untergruppen (positiver und negativer Ionisationsmodus, 400 Proben) dauerte in R 9 min, davon entfielen ungefähr 36 s auf das Einlesen des Datensatzes. Für den Vergleich mit MetaboAnalyst wurde nur der negative Ionisationsmodus betrachtet, hier dauerte die Auswertung 4,6 min (siehe Abbildung 40). Dabei wurde Rechenzeit gespart und Fehler vermieden, indem die Datensätze der Untergruppen vor Anwendung der statistischen Tests auf Vollständigkeit geprüft wurden, da bei der ANOVA mit Messwiederholungen alle Individuen für jeden Zeitpunkt einen Wert haben müssen. Die Namen der unvollständigen Teildatensätze, in diesem Fall bei RTp gelagertes NaF/Citrat-Vollblut, wurden am Ende ausgegeben. Die Auswertung mit MetaboAnalyst dauert deutlich länger, zumal der Datensatz nicht direkt aus MarkerView importiert werden kann, sondern vorher Isotope und Signale aus den Fließmitteln entfernt werden müssen. Der Nutzer muss selbstständig die gewünschten Testverfahren auswählen und die Ergebnisse einzeln herunterladen. Pro (Teil-)Datensatz werden in MetaboAnalyst rund 5–15 min benötigt. Die Auswertung mit dem selbst entwickelten Skript ist also mindestens 8-mal schneller.

Tabelle 25: Vergleich der ANOVA mit Messwiederholungen (rmANOVA) der untargeted Präanalytik-Daten mit MetaboAnalyst und R.

Dargestellt wird die Anzahl an Analyten, die angegebenen Kriterien erfüllen. Signale, die als Isotop identifiziert wurden oder die bereits in den Blankproben vorhanden waren, wurden mit dem R Skript entfernt. In MetaboAnalyst wurden 229 Analyten aufgrund der IQR-Kriterien entfernt. Die Auswertung des R Skripts erfolgte mit und ohne diese Analyten (913 zw. 684). kA = keine Angabe (n=10).

	MetaboAnalyst	R Skript	
Anzahl Signale gesamt	-	8.666	
Anzahl Signale (Blank und Isotopen korrigiert)	1430	1430	
wegen QC RSD > 20% entfernter Analyten	517	517	
Analyten mit rmANOVA ausgewertet	684	684	913
unkorrigierter p-Wert < 0.05	214	214	300
FDR korrigierter p-Wert < 0.05	177	177	245
Bonferroni korrigierter p-Wert < 0.05	117	117	161
unkorrigierter p-Wert < 0.05 & Shapiro > 0.05	kA	134	300
FDR p-Wert < 0.05 & Shapiro > 0.05	kA	118	165
Bonferroni p-Wert < 0.05 & Shapiro > 0.05	kA	76	109

```

      Index Eigenschaft      wert      Gruppe      Test      unkorrigiert bonferroni fdr
[1,] 1 Datum      2020 03 09      t1_0.3h      student-ttest1 118      0      0
[2,] 2 Dateipfad      C:/Users/lisa.hahnefeld/documents      t1_0.3h      Mann-whitney1 244      0      0
[3,] 3 Rohdaten      Präanalytik v4_untargeted Rohdaten_2019 05 24.xlsx      t2_1h      student-ttest2 127      0      0
[4,] 4 untargeted      TRUE      t2_1h      Mann-whitney2 199      0      0
[5,] 5 abhängige Proben      TRUE      t4_4h      student-ttest3 111      0      0
[6,] 6 Proben gesamt      440      t4_4h      Mann-whitney3 200      0      0
[7,] 7 Proben ausgewertet      50      t5_24h      student-ttest4 119      1      2
[8,] 8 Analyten gesamt      8666      t5_24h      Mann-whitney4 231      0      0
[9,] 9 Analyten ohne Isotope      6394      kontrollgruppe t0_0h
[10,] 10 analyten mit NA      64      rMANOVA
[11,] 11 fehlende werte gesamt      3528      friedman      181      2      4
[12,] 12 Analyten mit fehlenden werten gelöscht FALSE      156      1      1
[13,] 13 werte mit min/2 ersetzt      TRUE
[14,] 14 Anzahl blank-Proben      5
[15,] 15 > x blank      1
[16,] 16 Quantil      0.2
[17,] 17 Analyten < blank      3248
[18,] 18 Anzahl qc's      30
[19,] 19 QC Grenze      20
[20,] 20 Analyten RSD zu groß      1380
[21,] 21 Analyten ausgewertet      1702
[22,] 22 shapiro-test sig      752
[23,] 23 shapiro-test sig log10      505
[24,] 24 log Transformation      TRUE
[25,] 25 Anzahl Testgruppen      4
[26,] 26 t0_0h      10
[27,] 27 t1_0.3h      10
[28,] 28 t2_1h      10
[29,] 29 t4_4h      10
[30,] 30 t5_24h      10
> end_time = Sys.time()
> data_time = start_time
Time difference of 19.33294 secs
> end_time - start_time
Time difference of 4.576357 mins
> FehlerPaarung
[1] "ungleiche Probenanzahl gepaarter Gruppen bei: NaF+citrate_WB_RT"
> |

```

Abbildung 40: Beispiel für R Output bei der univariaten Auswertung.

Es wurden die untargeted Daten des Präanalytik--Versuches ausgewertet (negativer Ionisationsmodus). Die Dauer für die vollständige Auswertung betrug 4,6 min, davon entfielen ungefähr 19 s auf das Einlesen des Rohdatensatzes (Windows 10, CPU i7-8700, Arbeitsspeicher auf 6 GB begrenzt). Der Ausschnitt enthält die Übersichtstabelle des Teildatensatzes von in Eiswasser gelagertem NaF/Citrat-Vollblut.

Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse der  $t$ - und Wilcoxon-Tests der Einzelgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (automatisch alphabetisch erste Gruppe) von den Ergebnissen einer Post-hoc-Analyse der ANOVA abweichen, da das Signifikanzniveau zwar an die Anzahl der betrachteten Variablen, aber nicht an die Anzahl der Gruppen angepasst wird. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse erhöht ist. Die Post-hoc-Analyse wurde nicht in dem Skript implementiert, da diese in R für mehrere abhängige Gruppen nicht durchführbar ist. Außerdem wären die Ergebnisse sehr umfangreich und dadurch unübersichtlich. So ist z.B. der Vergleich aller Zeitpunkte einer Messreihe untereinander von geringerem Interesse, wenn die Stabilität im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt untersucht werden soll. Das Skript liefert die Ergebnisse der ANOVA zur Identifizierung signifikanter Veränderungen und des  $t$ -Tests als Hinweis, welche Gruppen verändert sind, was einen ausreichenden Überblick über die Daten und deren Zusammenhang bietet. Auch in MetaboAnalyst gibt es keine Post-hoc-Analysen bei nicht-parametrischen Verfahren und der ANOVA mit Messwiederholungen.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass das selbst entwickelte Skript eine schnelle univariate Auswertung ermöglicht und die Ergebnisse direkt in Form einer Excel-Datei pro Teildatensatz dokumentiert. Aufgrund der zügigen Berechnung muss der Anwender nicht vorher festlegen, ob parametrische oder nicht-parametrische Verfahren verwendet werden sollen, sondern kann anschließend entscheiden, welches Verfahren unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Shapiro-Wilk- und Levene-Tests besser geeignet ist. Wenn der Datensatz mehrere Gruppen enthält, werden zusätzlich zu dem  $t$ - bzw. Welch- und Wilcoxon-Test auch noch ANOVA und Kruskal-Wallis-Tests bzw. im Falle von abhängigen Stichproben ANOVA mit Messwiederholungen und Friedman-Tests durchgeführt.

### Analyse der Verteilung

Für die Wahl des richtigen statistischen Modells müssen die zugrundeliegenden Verteilungen und die Varianzgleichheit untersucht werden. Die analytischen Tests wie der Shapiro-Wilk-Test haben je nach Stichprobengröße unterschiedliche Vor- und Nachteile (siehe auch Absatz 1.5.5). Dementsprechend sollte man für eine detailliertere Analyse der Daten die Verteilung zusätzlich auch noch graphisch überprüfen. Für diese Doktorarbeit wurde in R ein Skript entwickelt, das pro Analyten je ein Histogramm und einen Q-Q-Graphen zur Überprüfung der Normalverteilung darstellt. Beide Graphen werden jeweils für die Gesamtheit und für die Gruppen angegeben, da je nach statistischem Modell sowohl die Gesamt- als auch die Einzel-Verteilungen der Gruppen relevant sein können. Zusätzlich werden noch der Shapiro-Wilk- und der Levene-Test berechnet, sowie die Anzahl der Werte und Proben pro Gruppe angegeben. Wenn die Normalverteilung nicht gegeben ist, können die Daten mit dem Logarithmus und seltener der Quadratwurzel transformiert werden. Damit der Effekt einer möglichen Transformation abgeschätzt werden kann, werden die gleichen Graphen auch nochmal mit den Log10-transformierten Daten angezeigt. Bei abhängigen Probengruppen, wie z.B. verschiedene Messpunkte einer Zeitreihe, ist die Verteilung der Differenzen zwischen Gruppen bzw. Zeitpunkten relevant. In diesem Fall werden die Verteilungen der Differenzen zur Kontrollgruppe anstelle der Einzelgruppen-Verteilungen angegeben. Das Skript wurde mit dem Testdatensatz sowohl mit abhängigen als auch unabhängigen Gruppen angewandt, ein Beispiel für die unabhängige Auswertung ist in Abbildung 41 dargestellt. Das Skript mitsamt Erläuterungen zur Anwendung ist im Anhang aufgeführt (Abschnitt 8.2.3).



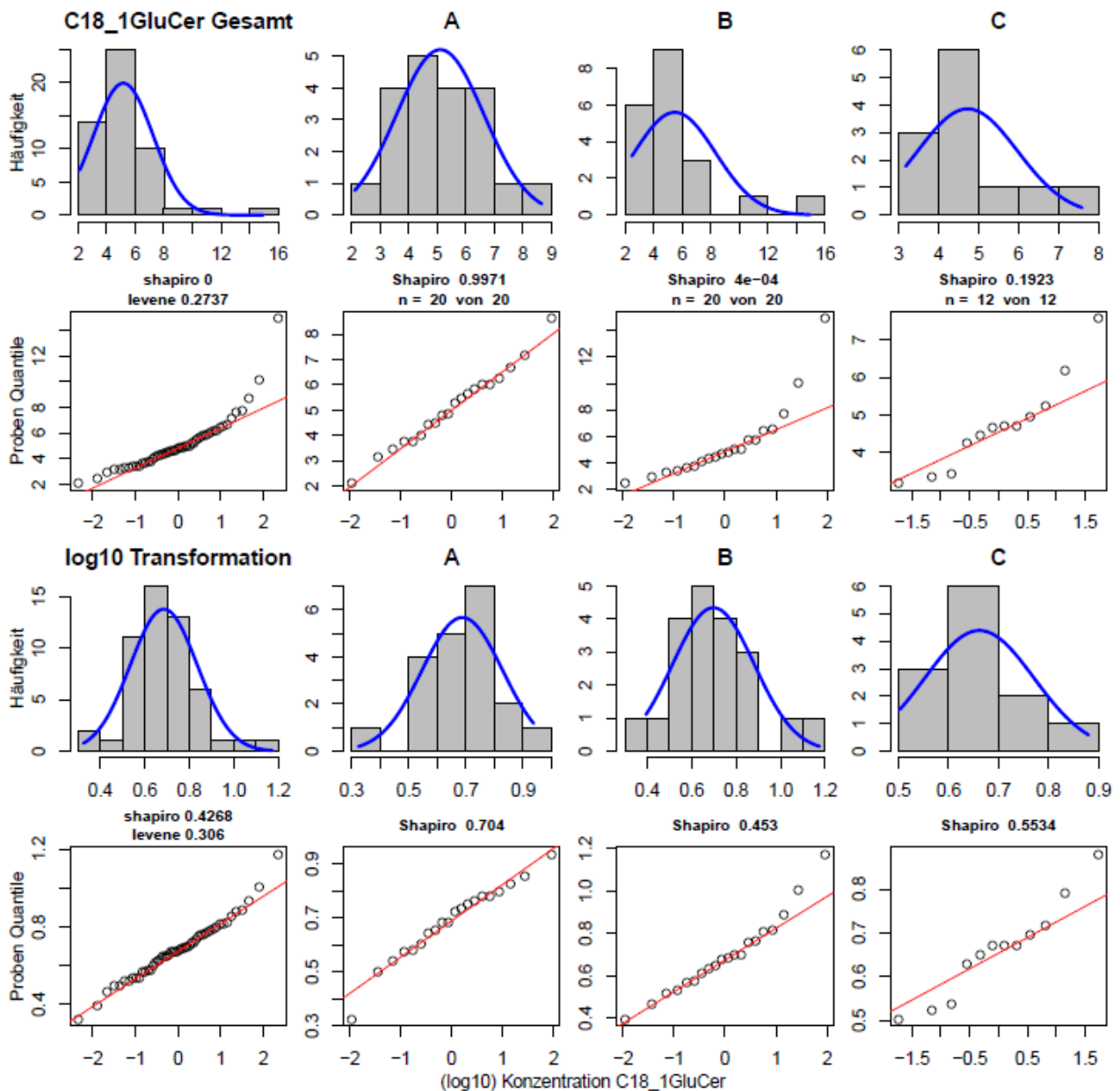


Abbildung 41: Verteilung der Konzentrationen von Glucosylceramid 18:1 in Humanplasma.

Dargestellt wird die Ausgabe des selbst erstellten R Skriptes zur Darstellung der Verteilung der Werte. Der Testdatensatz enthielt drei unabhängige Gruppen (A, B und C) mit je 20 bzw. 12 Proben. Für jede Gruppe und alle Proben zusammen gibt es jeweils ein Histogramm mit Normalverteilung und einen Q-Q-Graphen, sowie die p-Werte des Shapiro-Wilk- und Levene-Tests. Die Normalverteilung wird angenommen, wenn der Shapiro-Test  $> 0.05$  ist und die Verteilung der (Log10-transformierten) Konzentrationen im Histogramm einer Normalverteilung gleicht. Die Quantile der Proben im Q-Q-Graphen (Y-Achse) sollten für eine Normalverteilung möglichst mit den theoretischen Quantilen (X-Achse) übereinstimmen, sodass die Punkte auf einer Geraden liegen. Zum Vergleich werden die Graphen auch mit den Log10-transformierten Daten dargestellt, damit geprüft werden kann, ob die Normalverteilung durch Transformation der Daten erreicht werden kann.

### 3.2 Methodenüberprüfung

Eine Überprüfung der Methode ähnlich einer Validierung wird bei untargeted Methoden üblicherweise nicht durchgeführt, auch weil es keine konkreten Vorgaben oder Richtlinien gibt. Dennoch sollte die Qualität der Methode sichergestellt werden, um die Konfidenz semi-quantitativer Vergleiche zu erhöhen. Aus diesem Grund wurden bei der entwickelten Methode u.a. die Matrixeffekte, Linearität, Verschleppung und Reproduzierbarkeit sowie die Stabilität der Proben untersucht. Soweit möglich orientierte sich die Methodenüberprüfung an den Richtlinien der FDA und EMA zur Validierung quantitativer LC-MS-Methoden [187, 232].

#### 3.2.1 Matrixeffekt und Linearität

Im Falle von endogenen Analyten können die Matrixeffekte bzw. die Eignung einer analytfreien Ersatzmatrix durch die Standardaddition und die Parallelität untersucht werden, dafür werden Standardlösungen der jeweiligen Analyten benötigt. Außerdem könnte das Post-Column-Infusionsverfahren angewandt werden, bei dem im Anschluss an die chromatographische Säule die Analytlösung über die gesamte Laufzeit injiziert und die Veränderungen in der Signalintensität des Analyten untersucht werden [245]. Da es speziell bei untargeted Analysen nicht für jeden Analyten eine Referenzsubstanz gibt, wurde die Wiederfindung, der Matrixfaktor und die Prozesseffektivität stellvertretend für die internen Standards bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammengestellt. Die Wiederfindung ist der Anteil der Analytmenge, der während der Extraktion erhalten bleibt und analysiert werden kann. Sie sollte möglichst hoch sein, um niedrige Nachweisgrenzen zu erreichen. Bei gleichzeitiger Ionisation kann die Signalintensität der Analyten durch andere Probenbestandteile positiv oder negativ beeinflusst werden, sogenannte Matrixeffekte. Negative Matrixeffekte ( $<< 100\%$ ) können die Nachweisgrenze beeinträchtigen. Für den semi-quantitativen Vergleich ist es v.a. relevant, dass auf Matrixeffekten basierende Unterschiede zwischen den Gruppen ausgeschlossen werden. Dafür muss die Variabilität der Matrixeffekte zwischen Proben und demnach der Matrixfaktor gering sein. Die Wiederfindung des Analyten bei gleichzeitiger Abtrennung störender Matrixbestandteile wird anhand der Prozesseffektivität beurteilt. Die Prozesseffektivität sollte möglichst hoch sein. Es gibt keine Grenzen für Wiederfindung, Matrixeffekte und Prozesseffektivität, jedoch sollte die Nachweisgrenze für die zu untersuchende Fragestellung angemessen sein [187, 232, 246]. Der Matrixfaktor sollte bei validierten quantitativen Methoden  $< 15\%$  sein, dieses Ziel wurde auch im Rahmen dieser Methodenentwicklung angestrebt [232].

Tabelle 26: Wiederfindung, Matrixfaktor und Prozesseffektivität.

Nach Möglichkeit wurden die Parameter in beiden Ionisationsmodi untersucht. Die Suppression im negativen Ionisationsmodus war bei einigen Analyten stärker, möglicherweise da 5 µL statt nur 2 µL des Lipid-Extrakts injiziert wurden. Berechnung und Beschreibung der Parameter siehe Abschnitt 2.2.1 (n=6).

Interner Standard	Addukt-Typ	Wiederfindung [%]	RSD Matrixfaktor [%]	Matrixeffekt [%]	Prozesseffektivität [%]
AA-d8	-H <sup>+</sup>	95,87	12,16	107,31	101,50
Cer d18:1/16:0-d7	+H <sup>+</sup>	101,22	15,72	49,69	49,46
	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	95,22	9,72	93,60	88,44
DG 15:0/18:1-d7	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	98,46	4,54	88,00	86,51
Hex2Cer d18:1/17:0	+H <sup>+</sup>	92,05	7,97	50,29	46,44
	+H <sup>+</sup>	84,49	5,45	84,84	71,56
LPC 18:1-d7	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	84,48	5,46	75,67	63,86
	+H <sup>+</sup>	81,65	9,17	66,16	53,69
LPC O-16:0-d4	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	79,97	10,25	83,76	66,50
	-H <sup>+</sup>	101,20	10,43	52,51	52,75
LPE 18:1-d7	+H <sup>+</sup>	93,91	4,33	94,33	88,37
	-H <sup>+</sup>	73,77	9,55	84,00	61,49
LPG 17:1	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	83,83	31,01	26,99	21,21
	-H <sup>+</sup>	40,21	24,42	26,38	10,13
LPI 17:1	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	35,60	10,65	86,34	30,48
	+H <sup>+</sup>	98,52	8,03	55,20	54,45
PC 15:0/18:1-d7	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	97,55	17,25	32,95	32,33
	+H <sup>+</sup>	100,16	2,76	88,34	88,40
PC O-18:0/18:1-d9	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	102,84	7,25	78,02	80,20
	-H <sup>+</sup>	106,19	17,77	46,05	47,82
PE 15:0/18:1-d7	+H <sup>+</sup>	102,96	9,52	54,78	56,24
	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	108,03	19,91	146,09	156,43
PG 15:0/18:1-d7	-H <sup>+</sup>	98,89	10,41	71,94	70,44
	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	99,72	5,50	101,75	101,61
PI 15:0/18:1-d7	-H <sup>+</sup>	99,27	3,74	85,11	84,41
	+H <sup>+</sup>	101,23	16,79	67,59	67,61
PS 15:0/18:1-d7	-H <sup>+</sup>	103,63	7,610	75,16	77,55
	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	135,50	27,51	20,80	27,01
SE 27:1/18:1-d7	+H <sup>+</sup>	99,13	10,28	50,96	50,47
	+HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	99,92	11,85	16,93	16,98
SM d18:1/18:1-d9	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	94,67	6,44	15,84	14,97
	+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	102,47	11,40	43,55	44,61

### 3.2.1.1 Wiederfindung

Für viele der untersuchten IS konnte eine Wiederfindung nahe 100% gezeigt werden, was für eine erfolgreiche Extraktion der Analyten, z.B. PC, PE, PI und TG aus der Probe spricht. Die Wiederfindung von SE 27:1/18:1-d7 mit 135% ist auffällig, sie lag bei den untersuchten Plasmaproben zwischen 100 und 165%. SE 27:1/18:1-d7 sollte unter den gegebenen Bedingungen nicht gebildet werden und demnach nicht über 100% liegen. Die Abweichung konnte leider nicht erklärt werden, da eine Veresterung des Cholesterold7 mit der Ölsäure unwahrscheinlich ist und der starke Matrixeffekt der SE bei der Untersuchung vergleichbar sein sollte. Bei den hydrophileren Lipiden wie den Lysophospholipiden lag die Wiederfindung in etwa bei 80% und bei LPI 17:1 bei 35

bzw. 40%. Der größte Anteil ist mit großer Wahrscheinlichkeit bei der Extraktion in die wässrige Phase übergegangen. Dennoch konnten niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden, allerdings gäbe es bei diesen Analyten noch Potenzial, die Extraktion und damit die Sensitivität zu erhöhen. Die erhaltenen Wiederfindungen lieferten reproduzierbare Ergebnisse und ermöglichten die Detektion von über 400 Lipiden. Deswegen konnte das ursprüngliche MTBE-Protokoll zur Extraktion beibehalten werden.

### 3.2.1.2 Matrixeffekt und Prozesseffektivität

Die Untersuchung der Matrixeffekte zeigte, dass ein Teil der untersuchten IS durch die in Plasma enthaltenen Lipide supprimiert wird. Bei Cholesterold<sub>7</sub> wurde in den post-Extraktion dotierten Proben 16% der Fläche in den Lösungsmittelstandards erreicht. Die Signalintensität von PG 15:0/18:1-d<sub>7</sub> wurde hingegen in Anwesenheit des Plasma-Lipidoms verstärkt. Die Bewertung der Matrixfaktoren orientierte sich an den Vorgaben der EMA, nach der die RSD des IS normalisierten Matrixfaktors kleiner 15% sein soll, d.h. der Matrixeffekt muss entweder gering sein oder die verursachenden Matrixbestandteile eine geringe biologische Varianz aufweisen [232]. Bei 75% der untersuchten IS konnten die strikten Validierungsvorgaben mit einer RSD < 15% eingehalten werden. Bei den IS der LPI, PC und PE im negativen Ionisationsmodus sowie von den IS der Ceramide, PG, PS, LPG und SE im positiven Ionisationsmodus war ein Matrixeffekt erkennbar und die Grenze wurde leicht überschritten. Die Sterylester zeigen einen starken Matrixeffekt. Sie eluieren zeitgleich mit den Triglyceriden und werden scheinbar von diesen supprimiert. Die hohe RSD des Matrixfaktors der TG und SE könnte außerdem mit den in humanem Plasma stark schwankenden Konzentrationen zusammenhängen. Die Suppression durch die TG und SE konnte auch im negativen Ionisationsmodus beobachtet werden. Zu dieser Retentionszeit werden im negativen Modus keine Lipide detektiert, aber das Hintergrundsignal im Totalionenstrom war im Vergleich zu extrahierten Lösungsmitteln reduziert (siehe Abbildung 42 a). Die Prozesseffektivität wird sowohl durch die Wiederfindung als auch den Matrixeffekt beeinflusst. Durch die hohe Wiederfindung konnte für 84% der untersuchten Analyten eine Prozesseffektivität > 30% erreicht und somit eine sensitive Messung ermöglicht werden. Bei keinem Analyten war die Prozesseffektivität unter 10%.

### 3.2.1.3 Linearität

Der semi-quantitative Vergleich der Lipidlevel setzt voraus, dass das Verhältnis von der Signalintensität zur Konzentration linear ist. Aus diesem Grund wurde humanes Plasma mit Wasser verdünnt und anschließend eine lineare Regression durchgeführt. Zu einem früheren Zeitpunkt der Methodenentwicklung wurde dabei festgestellt, dass sich die Sterylester bei Verdünnung nicht linear verhalten (Abbildung 42 b). Es ist anzunehmen, dass bei höheren Konzentrationen die Ionisationsrate der Sterylester durch die koeludierenden Triglyceride verringert wird [165]. Zu diesem

Zeitpunkt wurden 20  $\mu\text{L}$  Plasma noch mit zweimal 60  $\mu\text{L}$  statt mit zweimal 120  $\mu\text{L}$  Methanol aufgenommen, dadurch waren die Proben konzentrierter und der Matrixeffekt stärker.

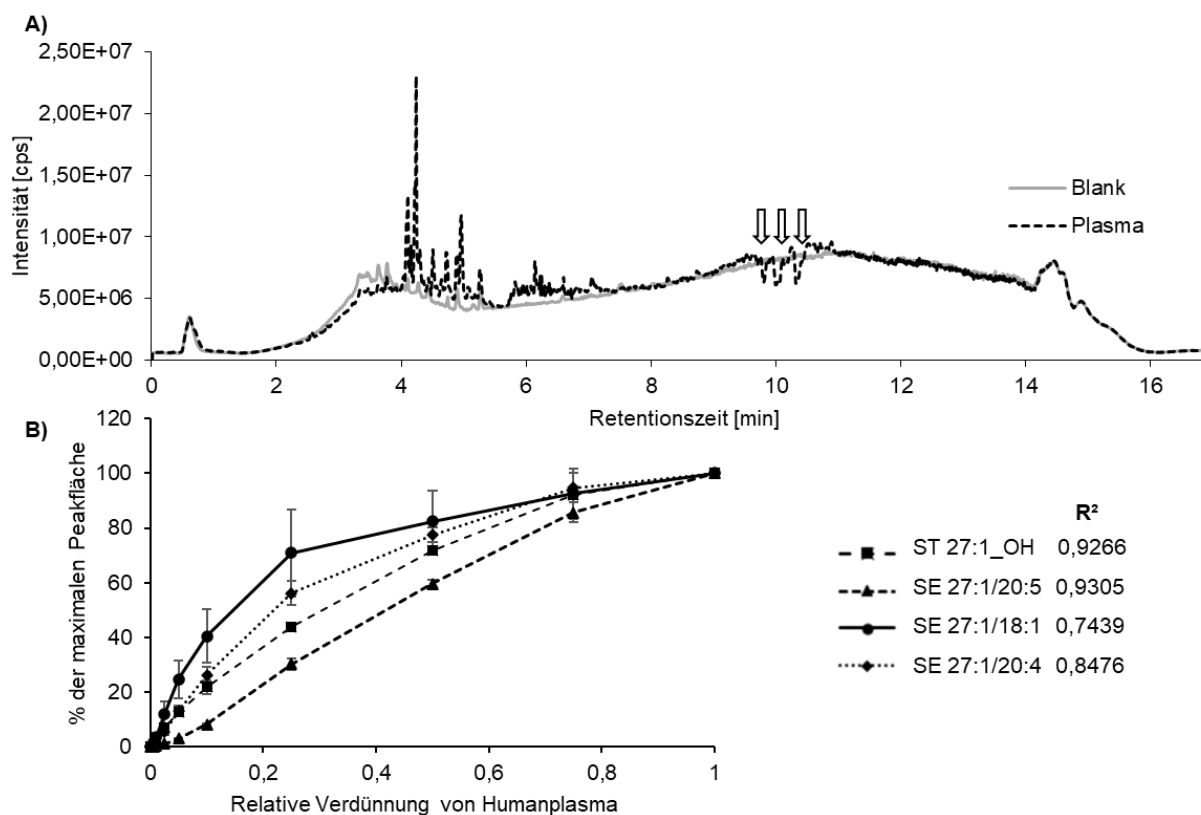


Abbildung 42: Suppression der Sterylester-Signale durch die Triglyceride.

(A) Suppression im Totalionenstrom-Chromatogramm im negativen Ionisationsmodus von Humanplasma im Vergleich zum Blank-Signal zur Retentionszeit von Triglyceriden (TG) und Sterylestern (SE). TG und SE sind im negativen Modus nicht detektierbar. (B) Nichtlineares Verhältnis der relativen Änderung der chromatographischen Peakfläche von verschiedenen SE aus vor der Extraktion mit Wasser verdünntem Humanplasma. 100% entspricht unverdünntem Plasma.  $R^2$  = Mittelwert der Bestimmtheitsmaße der linearen Regression ( $n=3$ ).

Die Untersuchung der Linearität wurde später mit dem endgültigen Extraktionsprotokoll mit internen Standards wiederholt. Die IS wurden dabei vor bzw. nach der Extraktion zugegeben, um zu untersuchen, ob die Wiederfindung der IS durch die Verdünnung beeinflusst wird. Die Details zur Auswertung können im Anhang in Tabelle 35 und Tabelle 36 gefunden werden. Es wurden bei den 169 ausgewerteten Analyten nur geringe Unterschiede zwischen den Proben gefunden, die vor bzw. nach Extraktion mit IS dotiert wurden, und diese betrafen sowohl die Auswertung ohne Normalisierung als auch die mit IS Normalisierung (Tabelle 27). Demnach kann angenommen werden, dass die Extraktionsrate der IS unabhängig von der Analytkonzentration war. Für fast alle Analyten konnte ein Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) größer 0,9 erreicht und dadurch ein lineares Verhältnis zwischen der Analytkonzentration und der Signalintensität angenommen werden. Bei drei SE waren auch in diesem Versuch die  $R^2$ -Werte kleiner 0,9, vermutlich wegen der zuvor beschriebenen Matrix-

## Ergebnisse

Effekte. Im Vergleich zum vorherigen Versuch wurden die Matrixeffekte durch ein größeres Volumen an Aufnahmemedium reduziert und bessere Bestimmtheitsmaße erreicht. Auch die Variationskoeffizienten der Steigung waren bei fast allen Analyten kleiner 15% und reproduzierbar. Weiterhin konnte durch die Normalisierung mit einem internen Standard pro Lipidklasse im Schnitt keine verbesserte Linearität gezeigt werden (Tabelle 27). Bei den SE konnte die Linearität durch die IS-Normalisierung verbessert werden, mit Ausnahme von SE 27:1/20:5 und 27:1/22:6 bei denen das Bestimmtheitsmaß sank (Abbildung 43). Dieses Phänomen könnte matrixbedingt sein. Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten der Lipidspezies einer Klasse bei der Umkehrphasenchromatographie, kann ein IS pro Lipidklasse die RT-abhängigen Matrixeffekte unzureichend kompensieren. Die Fettsäuren 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0 und 24:0 sowie die Triglyceride 48:0 und 50:0 wurden wegen einer hohen Intensität in den Blank Proben von der Auswertung ausgeschlossen. Sie zeigten außerdem keine Linearität, weswegen Verdünnungen der QC-Proben mit Wasser auch in der Literatur für den Ausschluss solcher Analyten aus den untargeted Auswertungen verwendet werden [120]. Insgesamt konnte mit der hier vorgestellten Methode eine ausreichende Linearität für den semi-quantitativen Vergleich gezeigt werden.

Tabelle 27: Übersicht der linearen Regression von mit Wasser verdünntem Humanplasma. Angegeben werden die gemittelten R<sup>2</sup>-Werte der linearen Regression (n=3) sowie die Anzahl der Analyten, die die angegebenen R<sup>2</sup>-Werte aufweisen.

Normalisierung	IS		ohne IS	
	postExtr	präExtr	postExtr	präExtr
<b>Dotierung</b>				
<b>Min</b>	0,9223	0,8934	0,8424	0,9009
<b>Max</b>	0,9969	0,998	0,9978	0,9985
<b>Mittelwert</b>	0,9734	0,9704	0,9818	0,9809
<b>Median</b>	0,9776	0,9773	0,9895	0,9857
<b>&lt; 0,9</b>	0	3	3	0
<b>0,9–0,95</b>	25	34	11	15
<b>0,95–0,99</b>	111	93	76	89
<b>0,99–0,995</b>	27	26	50	39
<b>≥ 0,995</b>	6	13	29	26
<b>Analyten mit R<sup>2</sup> &lt; 0,9</b>	-	DG 32:2, SE 27:1/20:5, SE 27:1/22:6	SE 27:1/16:1, SE 27:1/17:1, SE 27:1/18:2	-
<b>Analyten mit RSD der Steigung &gt; 15%</b>	Cer d18:0/24:0	DG 38:2	SE 27:1/17:1	TG 43:0

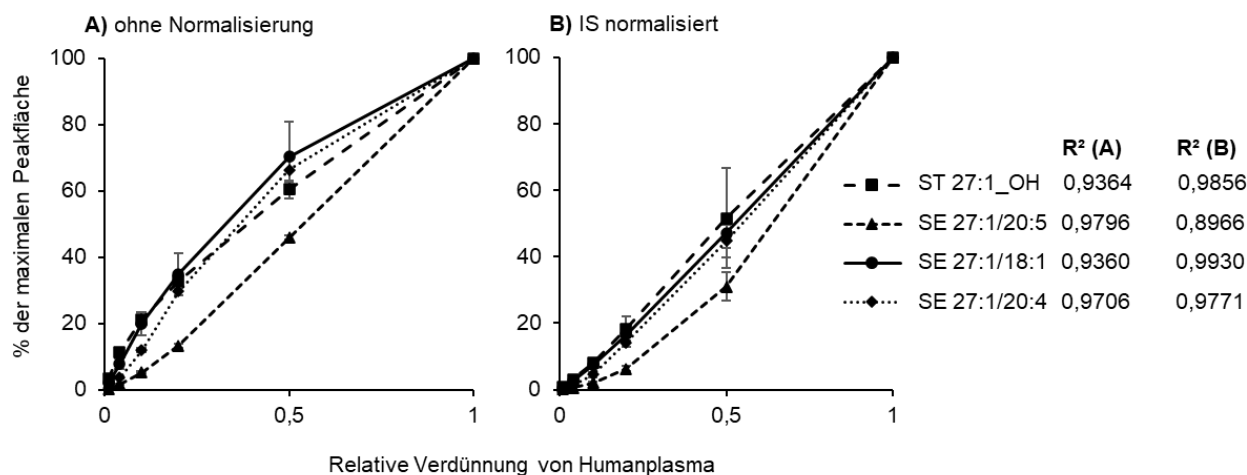


Abbildung 43: Relative Konzentration von Sterol und Sterylestern bei der Verdünnung von Humanplasma. Es wurde Plasma aus drei verschiedenen Quellen mit Wasser verdünnt, während bzw. vor der Extraktion wurden interne Standards zugegeben. Die Ergebnisse sind ohne Normalisierung (A) und zu ST 27:1\_OH-d7 bzw. SE 27:1/18:1-d7 normalisiert (B) dargestellt. R<sup>2</sup> = Mittelwerte der Bestimmtheitsmaße der linearen Regression ohne Normalisierung und mit IS Normalisierung (n=3).

### 3.2.2 Verschleppung und Blanksignale

Die Verschleppung wurde bestimmt durch den Vergleich der Peakflächen der Analyten in extrahierten Lösungsmittelproben nach Injektion von Plasmaproben mit den Peakflächen in Plasmaproben (n=3). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Verschleppung zwischen 0 und 0,52% liegt und somit vernachlässigbar ist (siehe Anhang Tabelle 37). Die größte Verschleppung konnte für die Phospholipide, v.a. die LPE, beobachtet werden.

Eine analytische Herausforderung stellten die Blanksignale für einzelne Analyten dar. Vor allem bei den freien Fettsäuren und bei gesättigten Di- und Triglyceriden, waren bereits in extrahiertem und reinem Lösungsmittel deutliche Signale sichtbar. Bei den Fettsäuren 15:0, 16:0 (Palmitin-) und 18:0 (Stearinsäure) betrug das Blankensignal teilweise mehr als 50% der Peakfläche in Plasmaproben. Die Monoglyceride, die Diglyceride 34:0 und 36:0 sowie die Triglyceride 52:0, 54:0, 56:0 und weitere wurden aus demselben Grund meist aus der Auswertung ausgeschlossen.

### 3.2.3 Robustheit der Methode

Die Robustheit einer Methode zeichnet sich durch die Stabilität der Messergebnisse trotz Veränderungen der Umgebungsbedingungen oder Geräte-Parameter aus. Sie kann z.B. durch die Messung gleicher Proben auf verschiedenen Geräten oder in verschiedenen Laboren untersucht werden. In diesem Fall stand nur diese eine Geräte-Kombination zur Verfügung, deshalb wurde stattdessen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über einen zeitlichen Verlauf und damit natürlich auftretenden Schwankungen, z.B. der Fließmittelzusammensetzung, ausgewertet. Die Stabilität der

Retentionszeiten innerhalb eines Messlaufs, konnte mit einer durchschnittlichen Standardabweichung von 0,01 min bei 225 Analyten bei mehr als 200 Injektionen gezeigt werden. Außerdem wurden über einen Zeitraum von ungefähr 10 Monaten je zwei Kontrollproben des gleichen Humanplasma-Pools gemessen. Der Vergleich der Retentionszeiten für 202 Analyten im positiven und 136 im negativen Ionisationsmodus für 46 Kontrollplasmen hat jeweils eine durchschnittliche SD von 0,04 min ergeben. Dabei wurden teilweise die gleichen Analyten im positiven und negativen Ionisationsmodus ausgewertet, da die Retentionszeiten durch das leicht veränderte Fließmittel A unterschiedlich sein können. Der Median der Abweichungen der Retentionszeiten im positiven und negativen Ionisationsmodus betrug 0,06 min und war somit kaum höher als die durchschnittliche SD. Eine Ausnahme stellen die PI dar, bei denen die Retentionszeiten aufgrund der unterschiedlichen Fließmittel A um ca. eine Minute abwichen.

Des Weiteren wurden die Kontrollproben auch für den Vergleich der, mit dem MPR oder einem IS pro Lipidklasse normalisierten, Peakflächen verwendet. Die IS wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Methode implementiert, sodass diese nur für 36 der 48 Kontrollproben eingesetzt wurden. Die Ergebnisse wurden pro Analyten in eine Kontrollkarte eingetragen [233]. Auf diese Weise wurde fortlaufend die Analyse von 15 Lipiden aus unterschiedlichen Klassen untersucht. Die Messwerte sollten gleichmäßig um den Mittelwert und innerhalb der Warngrenzen (doppelte SD) schwanken. Die Über- oder Unterschreitung der Warngrenze ist ein Warnsignal. Bei Über- oder Unterschreitung der dreifachen SD handelt es sich um Außer-Kontroll-Situationen. Wenn zwei von drei aufeinanderfolgenden Proben ein Warnsignal in die gleiche Richtung haben oder eine Außer-Kontroll-Situation vorliegt, sind die Ursachen zu analysieren und ggf. Maßnahmen zu ergreifen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse weiterhin zu gewährleisten. Des Weiteren wurde die RSD aller Kontrollproben untersucht. Nachdem die Kontrollproben aufgebraucht waren, wurden die Kontrollkarten für weitere Analyten untersucht. Insgesamt wurden 229 Analyten ausgewertet, detaillierte Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 38). Als Beispiel sind die Ergebnisse für PE 36:4 und SE 27:1/18:1 in Abbildung 44 dargestellt. Die Auswertung der Kontrollkarten aller Analyten ergab, dass bei der IS-Korrektur im Median zwei Warn- und keine Außer-Kontroll-Situationen auftraten, maximal waren es vier Warn- und zwei Außer-Kontroll-Situationen. Bei der MPR-Normalisierung waren es im Median ebenfalls zwei Warn- und keine Außer-Kontroll-Situationen und maximal fünf Warn- und drei Außer-Kontroll-Situationen. Statistisch werden in einer Kontrollkarte mit 48 Proben zwei Warnungen (entspricht 5% der Werte) erwartet [247]. Die Kontrollkarten der entwickelten Methode erfüllen demnach die Erwartungen und verdeutlichen die Reproduzierbarkeit der Methode. Der Median der RSD der MPR korrigierten Flächen betrug 19% (n=48) bzw. 18% (n=36), der der IS korrigierten Flächen 13% (n=36). Insgesamt war die RSD von 141 Analyten bei der MPR- und bei 161 Analyten bei der IS-Normalisierung kleiner als 20%. Auffällig war dabei, dass bei Analyten mit einer RSD > 20% meist innerhalb der Lipidklasse eine erhöhte RSD auftrat. Betroffen waren davon v.a. die Fettsäuren, die LPI, die Ether-PC, die Ether-PE, die PI und die TG. Im Falle der MPR korrigierten Flächen wichen auch die PE um mehr als 20% ab. Die



Ursachen für größere Abweichungen können vielfältig sein. Zum einen kann der interne Standard nicht ausreichen, um Matrixeffekte auszugleichen. Zum anderen könnte die Stabilität der Lipide bei der Lagerung und vor der Extraktion beeinträchtigt sein (siehe Stabilität der Proben 3.2.4). Auch Unterschiede beim Mischen des internen Standards sind möglich, der Beitrag zur gesamten Abweichung sollte gering sein. Im Falle der Normalisierung mit dem MPR, können die Abweichungen durch die unterschiedlichen Matrixeffekte entstehen. Pro Probe wird nur ein MPR für alle Analyten verwendet, die unterschiedlich auf Umgebungseinflüsse reagieren können.

Des Weiteren wurden je sechs Replikate des gleichen Humanplasmas von zwei verschiedenen Personen extrahiert. Dabei waren sowohl die Peakflächen als auch die Reproduzierbarkeit vergleichbar mit einem mittleren relativen Fehler von 3,8% und einer RSD von 6,5% bzw. 7,1%.

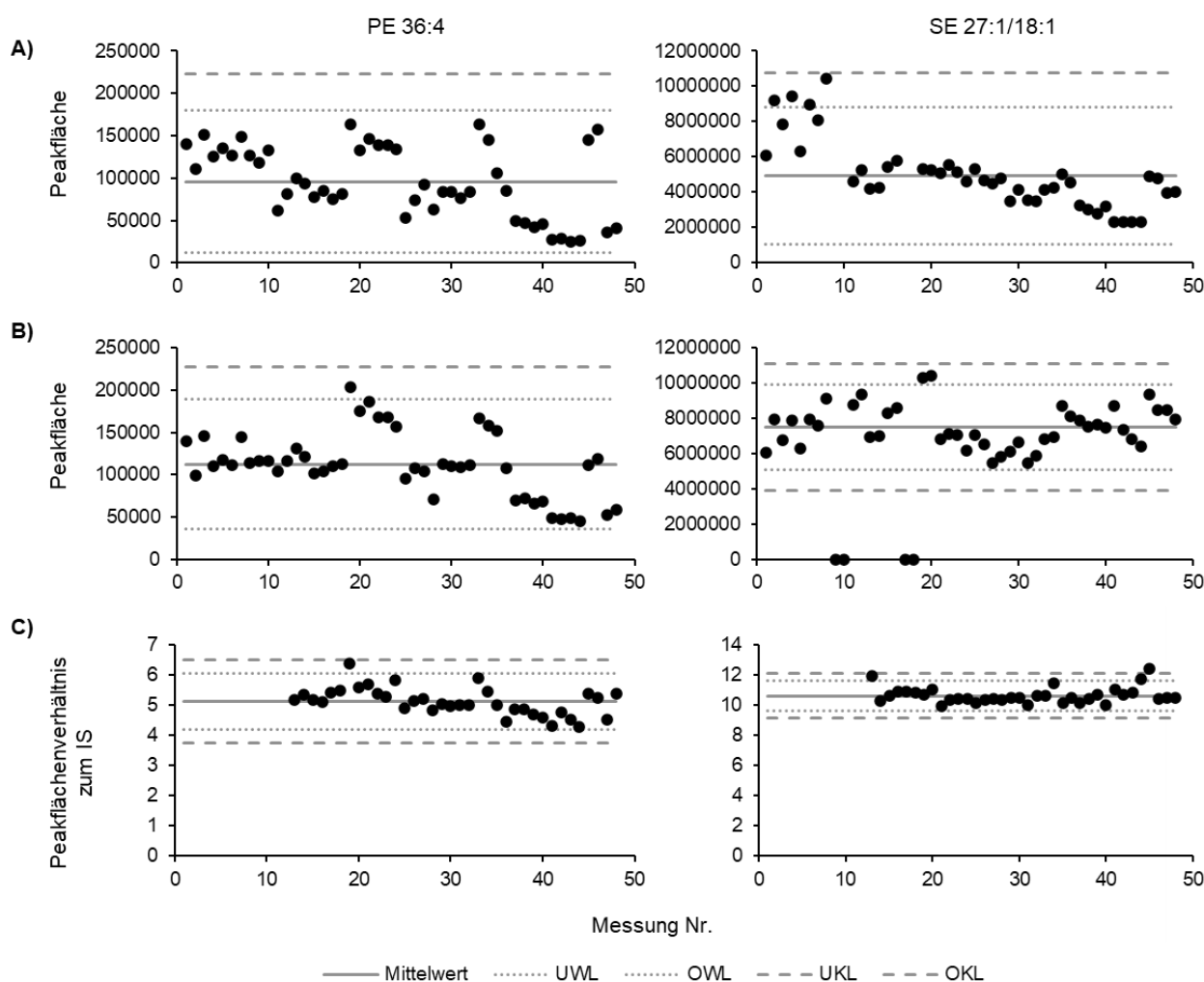


Abbildung 44: Kontrollkarte von PE 36:4 und SE 27:1/18:1.

Über einen Zeitraum von 10 Monaten wurden Kontrollproben gemessen, dabei unterliegen die Messwerte technisch bedingten Schwankungen. Gezeigt werden die Peakflächen ohne Normalisierung (A), normalisiert mit dem MPR (B) und normalisiert zu einem IS pro Lipidklasse (C). SE 27:1/18:1 war in vier Auswertungen nicht enthalten, sodass diese Werte fehlen. Die unteren Kontrollgrenzen bei PE 36:4 und SE 27:1/18:1 (A) und bei PE 36:4 (B) sind kleiner Null aufgrund der hohen SD. UWL = untere Warngrenze ( $2 \cdot SD$ ), OWL = obere Warngrenze ( $2 \cdot SD$ ), UKL = untere Kontrollgrenze ( $3 \cdot SD$ ), OKL = obere Kontrollgrenze ( $3 \cdot SD$ ).

### 3.2.4 Probenstabilität

Um systematische Fehler und erhöhte Varianzen durch die Probenvorbereitung zu vermeiden, wurde die Stabilität der Proben bei verschiedenen Lagerbedingungen überprüft. Die Stabilität der Proben vor der Extraktion wurde im Rahmen einer klinischen Studie untersucht, die Ergebnisse werden unter 3.3.1 näher erläutert. Zuvor wurde bereits die Stabilität der 225 Lipide in gepoolten Plasmaproben bei Raumtemperatur und in Eiswasser untersucht. Dabei wurden nach 2 h bei RTp ein Anstieg von mehreren LPC und Fettsäuren festgestellt. Nach 4 h waren ebenfalls einige Diglyceride erhöht. Bei den PC und TG hingegen konnte keine Abnahme festgestellt werden. Die gepoolten Plasmaproben waren stabil, wenn sie für bis zu 4 h in Eiswasser gelagert wurden. Wenn die Proben extrahiert und in Methanol aufgenommen wurden, waren sie für 4 h bei RTp bis auf einige Fettsäuren wie 14:0, 15:0, 16:1, 17:0 und 17:1, die um ca. 20–40% anstiegen, stabil (siehe Anhang Tabelle 40). Die enzymatische Aktivität in den biologischen Proben ist bei niedrigeren Temperaturen reduziert. Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln werden die Enzyme denaturiert und damit inaktiviert, was die verbesserte Stabilität unter diesen Lagerbedingungen erklären kann. Die Erhöhung der Konzentration einiger Fettsäuren in den Lipidextrakten scheint daher auch aus nicht-enzymatischen Reaktionen hervorzugehen. Einige Fettsäuren, darunter FA 14:0, 16:0, 16:1 und 18:0, stiegen nach einem Frier-Tau-Zyklus um 16–28% an. Nach zwei weiteren Zyklen war der weitere Anstieg nur gering (4–12%). Es besteht die Möglichkeit eines (enzymatischen) Lipidabbaus. Alternativ könnten die FA aus den Polypropylen-Gefäßen stammen. Bei den anderen Fettsäuren und den Lysophospholipiden konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Der Anstieg der FA 14:0, 16:0, 16:1 und 18:0 in den Lipidextrakten bei RTp und im Anschluss an Frier-Tau-Zyklen ist eher gering, sodass die Probenstabilität unter diesen Bedingungen nicht so stark beeinträchtigt ist. Unnötige Frier-Tau-Zyklen sollten dennoch vermieden werden und alle Proben einer Studie sollte die gleiche Zyklusanzahl durchlaufen.

Des Weiteren wurde die Stabilität der trockenen Lipidextrakte auf dem Abdampfgerät analysiert. Sowohl beim Abdampfen in Glas- als auch in Polypropylen-Gefäßen konnten nach der maximalen Lagerdauer von 20 bzw. 30 min auf dem Abdampfgerät keine Unterschiede festgestellt werden. Dadurch ist gewährleistet, dass geringere Abweichungen vom Zeitplan oder auch unterschiedliche Trocknungsgeschwindigkeiten die Messergebnisse nicht beeinträchtigen. Die trockenen Lipidextrakte waren ebenfalls für 144 h bei -40 °C und für 168 h bei -80 °C stabil, was in beiden Fällen der maximalen untersuchten Zeit entspricht. Nach der Rekonstitution wurden die Proben für bis zu 72 h bei 6 °C auf dem Autosampler gelagert, dabei konnte die Stabilität von 98% der Analyten gezeigt werden (siehe Anhang Tabelle 42). Ausgenommen sind die LPE 20:3, 20:4 und 22:6, bei denen der relative Fehler (engl. relative error, RE) nach 48 h zwischen 23 und 33% lag, deswegen kann für die LPE nur eine Stabilität von 24 h angenommen werden. Bei einer Lagerdauer von 24 h bei 6 °C waren alle untersuchten Lipide stabil.

Die untersuchten Lagerbedingungen sind in Abbildung 45 zusammengefasst. Die Langzeitstabilität von Humanplasma bei -80 °C wurde wie bereits erwähnt aufgrund der eingeschränkten

Vergleichbarkeit der chromatographischen Peakflächen über einen längeren Zeitraum nicht untersucht. Die internen Standards sowie die Ergebnisse der Kontrollkarte standen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Gemäß Literatur ist die Stabilität des Metaboloms bei -80 °C für mindestens vier Jahre gewährleistet [234].

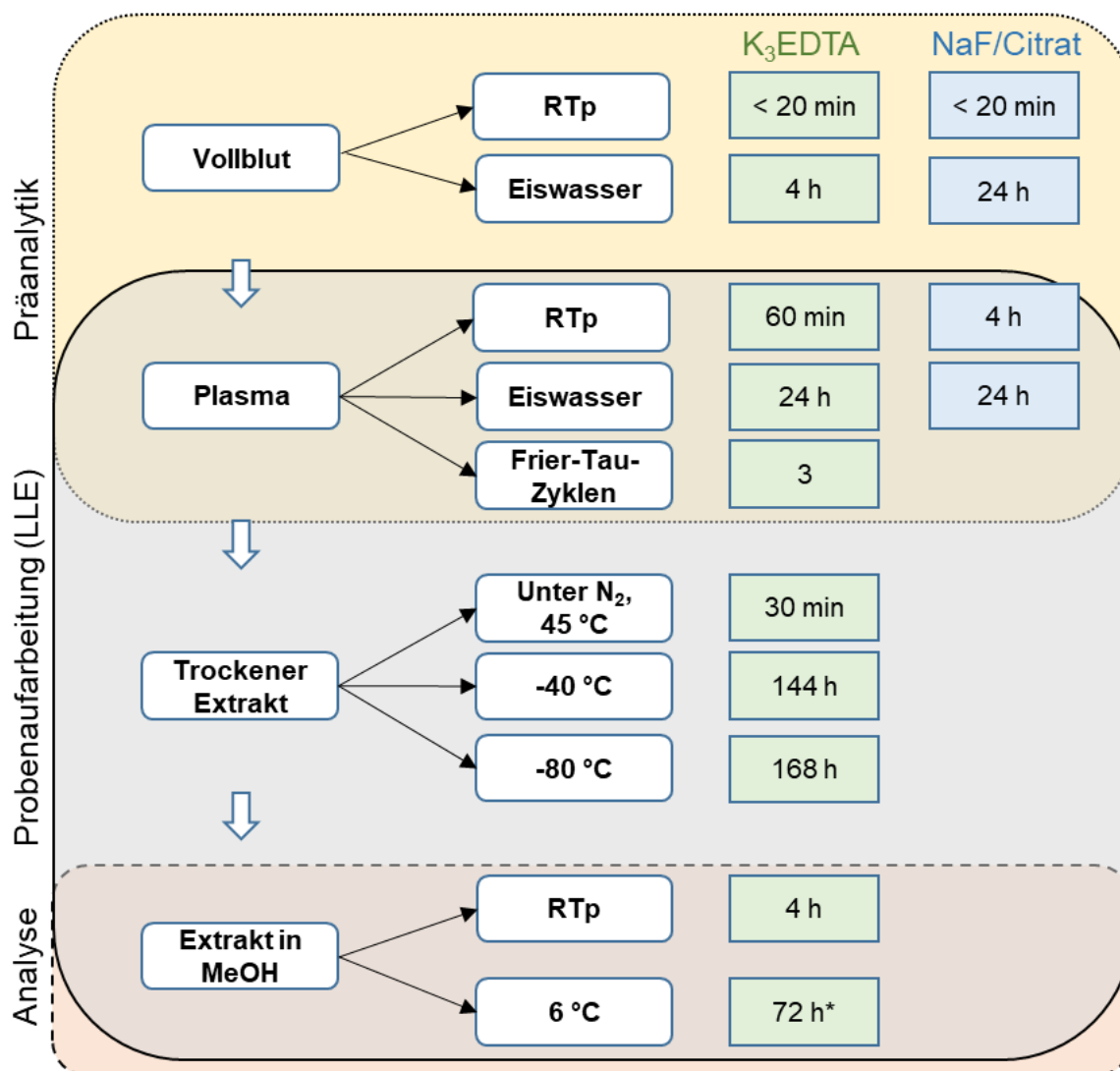


Abbildung 45: Stabilität der Lipide in humanem Plasma bei unterschiedlichen Lagerbedingungen. Die Auswertung erfolgte als relativer Fehler im Vergleich zu direkt verarbeiteten Proben, die Stabilität wurde angenommen, wenn der RE kleiner 15% war (n=5, 225 Analyten). Die Stabilität der Vollblut- und Plasmaproben stammt aus der Untersuchung der präanalytischen Stabilität (siehe Absatz 3.3.1 sowie im Anhang Tabelle 44 ff, n=10). \*LPE/PE nur für 24 h stabil.

### 3.3 Biologische Applikation

Neben Humanplasma wurde die Methode auch noch auf weitere biologische Matrices wie diverse Mausgewebe und Zellen angewendet. Die Lipidprofile der untersuchten Matrices unterschieden sich deutlich (siehe Anhang Abbildung 56 ff). Demnach ist die entwickelte und hier vorgestellte Methode für eine Vielzahl unterschiedlicher Lipid-Zusammensetzungen geeignet. Zudem konnte gezeigt werden, dass die mehrfache Extraktion gepoolter Proben reproduzierbar war. Bei elf der untersuchten Matrices lagen alle analysierten Lipide unter der im Lipidomics bzw. Metabolomics Bereich weithin akzeptierten Grenze von 20–30% (Abbildung 46) [120, 180]. Flüssige Proben wie Human- oder Mausplasma, Thrombozyten, aber auch einige Gewebetypen wie Herz, Niere, Leber, Milz, Ischiasnerv und DRGs zeigten dabei besonders reproduzierbare Ergebnisse. Bei diesen Matrices konnten für 88–95% der untersuchten Analyten eine RSD <10% erreicht werden. Mauspfoten hingegen zeigten eine höhere RSD, was mit der schwierigen Probenvorbereitung zusammenhängen könnte. Diese wurden bei einer hohen Frequenz unter Kühlung zerkleinert, dennoch ist durch Haut und Knochen keine homogene Mischung entstanden. Um diese Mischung aus zerkleinertem Gewebe pipettieren zu können, mussten sie erst zentrifugiert werden. Auch bei murinem Cortex, Hippocampus, Rückenmark und Lymphknoten zeigten einige Analyten eine höhere Abweichung im Vergleich zu Leber oder Niere, was auf eine niedrige Probenmenge oder die Matrixkomposition zurückzuführen sein könnte. Während der Entwicklung der Probenaufarbeitung wurde eine Mischung aus Wasser und Ethanol (3:1, v/v) optimiert, da anzunehmen ist, dass die Löslichkeit v.a. der neutralen Lipide in wässrigen Homogenaten unzureichend ist. Außerdem ist die Stabilität der Gewebekomponenten v.a. bei Raumtemperatur und nach dem Einfrieren nicht gewährleistet. So waren bei zwei Aliquots des Lymphknoten-Homogenats, die über Nacht bei -40 °C eingefroren waren, die Peakflächen der LPE und der freien Fettsäuren fast verdoppelt, während die Flächen der PE zurückgingen. Die Verarbeitung der Homogenate sollte daher möglichst zügig und in Eiswasser erfolgen. Vor größeren Studien sollte außerdem die präanalytische Stabilität gesichert werden.

Auch bei den MCF-7-Zellen gab es Konzentrationsschwankungen bei der Bestimmung der LPE, während die restlichen Lipide reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Die Proben wurden für rund 30 min im Kühlschrank aufgetaut. Bei Proben, die für die gleiche Zeit bei Raumtemperatur aufgetaut wurden, waren die freien Fettsäuren durchschnittlich um 108% und die Diglyceride um 61% erhöht, was auf eine Zersetzung der TG bei RTp hindeutet. Kritisch ist bei den Zellproben v.a. die Lagerung nachdem sie einmal eingefroren wurden und geplatzt sind. Bei der Inkubation der intakten Zellen in PBS in Eiswasser für 75 min konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Nach Lagerung intakter Zellen in der Zellkultur bei RTp für 75 min waren die Diglyceride durchschnittlich um 24% erhöht (Abbildung 47).

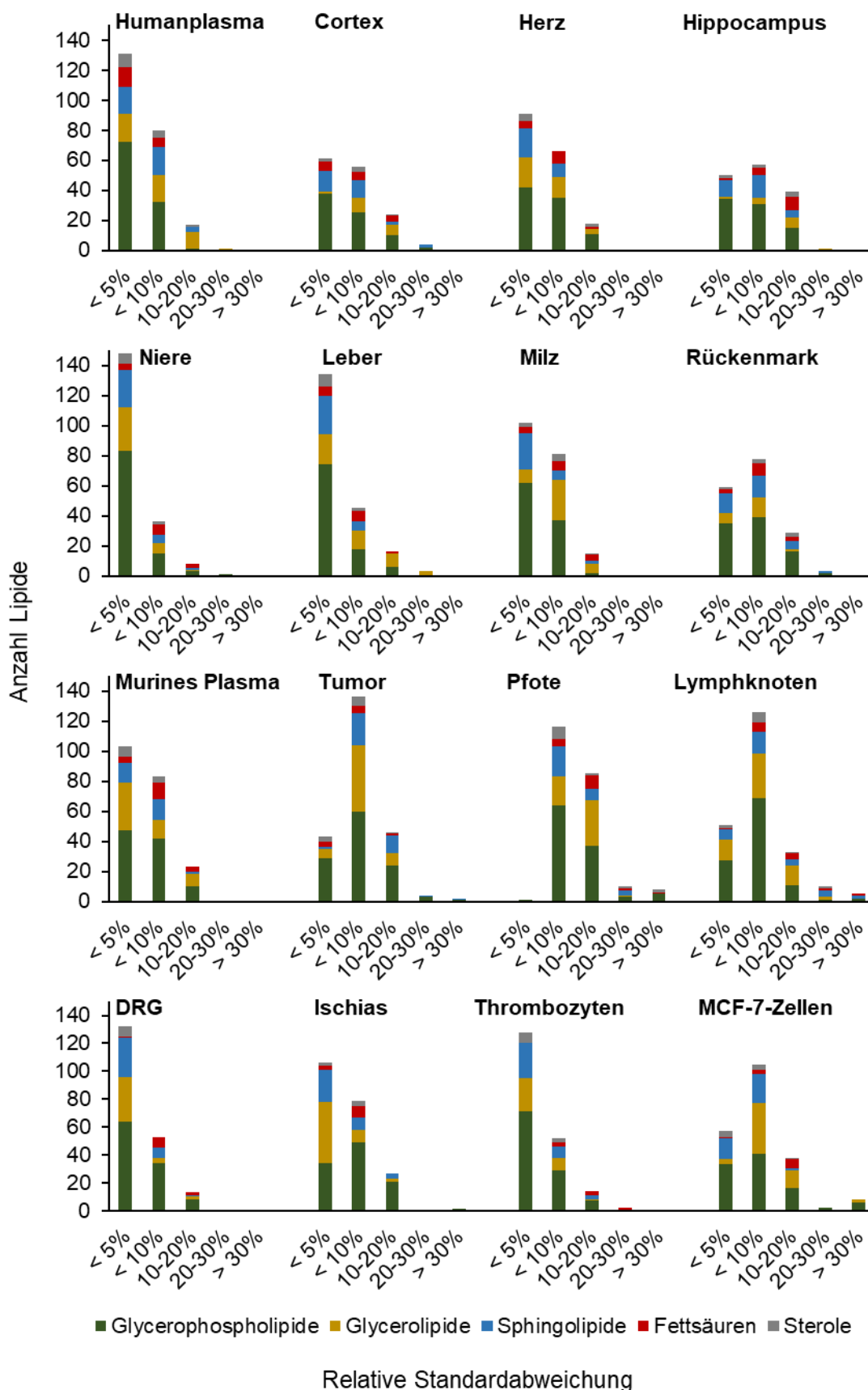


Abbildung 46: Reproduzierbarkeit der Extraktion verschiedener Matrices.

Für den Versuch wurden mehrere Replikate von gepoolten Proben extrahiert und die relative Standardabweichung der chromatographischen Peakflächen mehrerer Lipide verglichen. Untersucht wurden humanes und murines Plasma sowie mehrere murine Gewebearten und Zellen. Die Normalisierung der Peakflächen erfolgte mit dem MPR. Es konnten nicht in allen Matrices alle Lipide gefunden werden, daher weicht die Gesamtzahl der identifizierten Moleküle leicht ab. (n≥5).

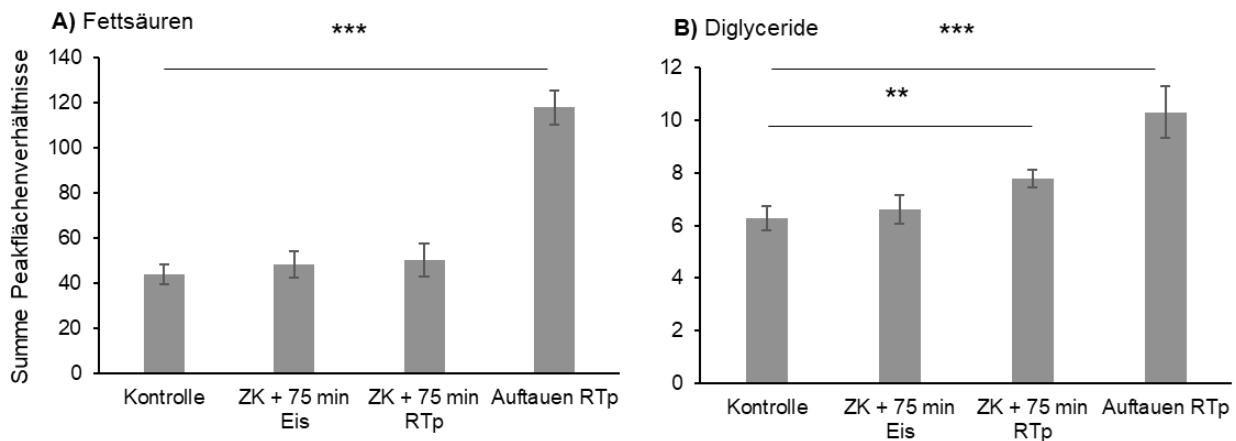


Abbildung 47: Einfluss der Präanalytik von Zellkulturproben auf Lipidkonzentrationen.

MCF-7-Zellen wurden gewaschen, gezählt, mit PBS zu 500.000 Zellen/150  $\mu$ L aufgenommen und auf mehrere 150  $\mu$ L Aliquots verteilt (Dauer ca. 60 min). Die Proben wurden anschließend direkt weggefroren (Kontrolle & Auftauen RTp) oder vorher in der Zellkultur (ZK) für 75 min auf Eis oder bei Raumtemperatur gelagert. Für die Lipidextraktion wurden die Proben für 30 min bei 0–6  $^{\circ}$ C oder bei RTp (Auftauen RTp) aufgetaut. Abgebildet ist die Summe der Peakflächenverhältnisse zum jeweiligen internen Standard für 9 Fettsäuren (A) bzw. 10 Diglyceride (B). Nur signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle sind eingezeichnet (ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveau: \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n=5).

### 3.3.1 Präanalytik

Des Weiteren wurde die entwickelte Methode angewendet, um die Stabilität der Lipide nach der Probennahme in humanen Blut- und Plasmaproben zu überprüfen. Die Stabilität der Analyten ist essenziell für die Identifizierung potenzieller neuer Biomarker. Die erhaltenen Daten wurden sowohl untargeted als auch semi-targeted ausgewertet, um zum einen die Ergebnisse unvoreingenommen zu betrachten und zum anderen das Verhalten von 233 bereits identifizierten Lipide zu beobachten. Die Datensätze zur Stabilität in den verschiedenen Blutentnahmeröhrchen ( $K_3$ EDTA oder NaF/Citrat) und bei den unterschiedlichen Lagerbedingungen von Plasma und Vollblut (RTp oder Eiswasser) wurden getrennt ausgewertet. Da die Daten vom negativen und positiven Ionisationsmodus gemeinsam ausgewertet wurden, blieben nach der Bereinigung mittels QC- und Blank-Kriterien noch mehr als 3.000 Signale übrig. Neben der Gefahr der falsch positiven Testergebnisse besteht auch die Möglichkeit, dass wichtige Unterschiede übersehen werden könnten, v.a. da unter den 3.000 Signalen immer noch Rauschen und viele Addukte der gleichen Analyten vorkommen. Deswegen wurden auch die Signale mit einem p-Wert kleiner 0,1 betrachtet. Von den so ausgewählten Signalen konnten insgesamt 89 verschiedene Lipide identifiziert werden, davon waren 80 bereits in der semi-quantitativen Auswertung enthalten. Lediglich die Gruppe der Acylcarnitine war nicht in der semi-targeted Auswertung vertreten. Signifikante Unterschiede konnten fast ausschließlich zwischen den direkt verarbeiteten Kontrollen und den 24 h gelagerten Proben entdeckt werden, was mit der sehr hohen Anzahl statistischer Tests zusammenhängen kann. Die Unterschiede nach 24 h sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Signifikante Ergebnisse bei früheren Zeitpunkten gab es lediglich bei den bei RTp gelagerten NaF/Citrat-Vollblutproben, die nach 1 h bzw. 4 h einen Anstieg einiger

Fettsäuren und Acylcarnitine zeigten, sowie bei den bei RTp gelagerten K<sub>3</sub>EDTA-Plasmaproben, die nach 2 h eine Erhöhung einiger LPC zeigten.

Tabelle 28: Kurzzeitstabilität von Humanplasma und Vollblut bei RTp und in Kühlung.

Die Proben wurden bis zu 24 h entweder bei Raumtemperatur oder in Eiswasser (0–4 h) bzw. im Kühlschrank (24 h, 0–6 °C) gelagert. Es wurden zwei verschiedene Antikoagulanzen verwendet. Die Auswertung erfolgte untargeted mittels Friedman-Test. Die Signale (*m/z* zu Retentionszeit) wurden zuvor Blank und QC bereinigt. Signale mit einem FDR korrigierten p-Wert kleiner 0,05 bzw. kleiner 0,1 wurden identifiziert und Lipidklassenweise angegeben. Die Zahlen geben die Anzahl Lipide in dieser Klasse und die Pfeile die Tendenz nach 24 h an. \*FA 18:2, 18:3, 18:4 und 22:6 waren erhöht, FA 20:4, 20:5 und 22:4 hingegen waren reduziert; Acyl-CN = Acylcarnitine, n.i. = Anzahl nicht identifizierter Signale mit  $p < 0,05$  bzw. 0,1, ID = Anzahl identifizierter Signale mit  $p < 0,05$  bzw. 0,1 (n=10).

Lagerung	Signale gesamt	FDR $p < 0,05$			FDR $0,05 \leq p < 0,1$					
		n.i.	ID	Lipidklassen	n.i.	ID	Lipidklassen			
K <sub>3</sub> EDTA	Vollblut	Eis	3182	6	1	1↑ Acyl-CN	23	1	1↑ LPC	
		RTp	3198	478	57	2↑ Acyl-CN, 6↑ DG, 1↑ FA, 18↑ LPC, 4↑ LPC O, 5↑ LPE, 1↑ LPE O, 2↑ LPG, 3↑ LPI, 2↑ PC O, 11↓ PC, 1↓ PE, 1↓ ST	154	14	1↑ LPG, 1↑ SE, 7↓ PC, 1↓ PE, 1↓ PI, 1↓ SM, 1↓ ST, 1↓ TG	
	Plasma	Eis	3210	1	0	-	3	0	-	
		RTp	3210	467	63	7↑ DG, 4↑/3↓* FA, 18↑ LPC, 4↑ LPC O, 4↑ LPE, 1↑ LPE O, 1↑ LPG, 3↑ LPI, 2↑ PC O, 12↓ PC, 1↓ PE, 1↓ ST, 3↓ TG	113	12	1↑ LPE, 1↑ LPG, 1↑ PC O, 5↓ PC, 3↓ PE, 1↓ SM	
	NaF/Citrat	Vollblut	Eis	3095	3	1	1↑ Acyl-CN	47	12	1↓ Cer, 1↓ DG, 1↓ PC, 3↓ PC, 2↓ PE, 2↓ SM, 1↓ ST, 1↓ TG
			RTp	3177	139	22	2↑ Acyl-CN, 2↑ FA, 11↑ LPC, 4↑ LPC O, 1↑ LPE O, 1↑ LPI	50	8	1↑ FA, 6↑ LPC, 1↑ LPE
Plasma		Eis	3100	0	0	-	0	0	-	
		RTp	3084	144	24	4↑ DG, 16↑ LPC, 3↑ LPC O, 1↑ LPE	33	8	1↑ DG, 1↑ FA, 2↑ LPC, 1↑ LPC O, 1↑ LPE, 1↑ LPE O, 1↓ PE	

Durch die Lagerung von K<sub>3</sub>EDTA-Vollblut und -Plasma für 24 h bei RTp sind die LPC, die LPE und die DG stark angestiegen. Auch die anderen Phospholipide wie die LPI und die LPG sowie die Ether-Spezies sind betroffen. Die relative Konzentration der PC, PE und TG nahm unter diesen Bedingungen ab. In Vollblut bei RTp stiegen außerdem die Peakflächen der Acylcarnitine auf das bis zu Vierfache an. Bei den NaF/Citrat-Proben konnten ähnliche Tendenzen beobachtet werden, jedoch war die Zahl der signifikanten Ergebnisse auf ungefähr ein Drittel reduziert und die relative Änderung deutlich geringer als bei den K<sub>3</sub>EDTA-Proben (Abbildung 48). Daraus folgt, dass die Kombination von Natriumfluorid und Citrat geeignet ist, um den Lipid-Abbau zu verlangsamen, aber nicht ganz aufzuhalten. Unterschiede zwischen den Antikoagulanzen zeigten sich bei den Ether-PC bei RTp, ihre Konzentrationen nahm in K<sub>3</sub>EDTA-Vollblut und -Plasma zu, während sie bei den

## Ergebnisse

NaF/Citrat-Proben stabil waren oder ähnlich der PC leicht zurückgingen. Die relativen Änderungen der Konzentrationen der Ether-PC waren bei beiden Antikoagulanzen kleiner als 25%. Die freien Fettsäuren, v.a. 20:4 und 20:5, nahmen bei RTp in K<sub>3</sub>EDTA-Plasma und in NaF/Citrat-Vollblut zu. In K<sub>3</sub>EDTA-Vollblut bei RTp nahmen die Fettsäuren 20:4, 20:5 und 22:4 hingegen ab, während die anderen Fettsäuren wie 18:2, 18:3, 18:4 und 22:6 unter diesen Bedingungen ebenfalls zunahmen. In NaF/Citrat-Plasma bei RTp waren die Fettsäuren stabil. Mehr Details zu den relativen Änderungen sind im Anhang in Tabelle 44ff aufgeführt.

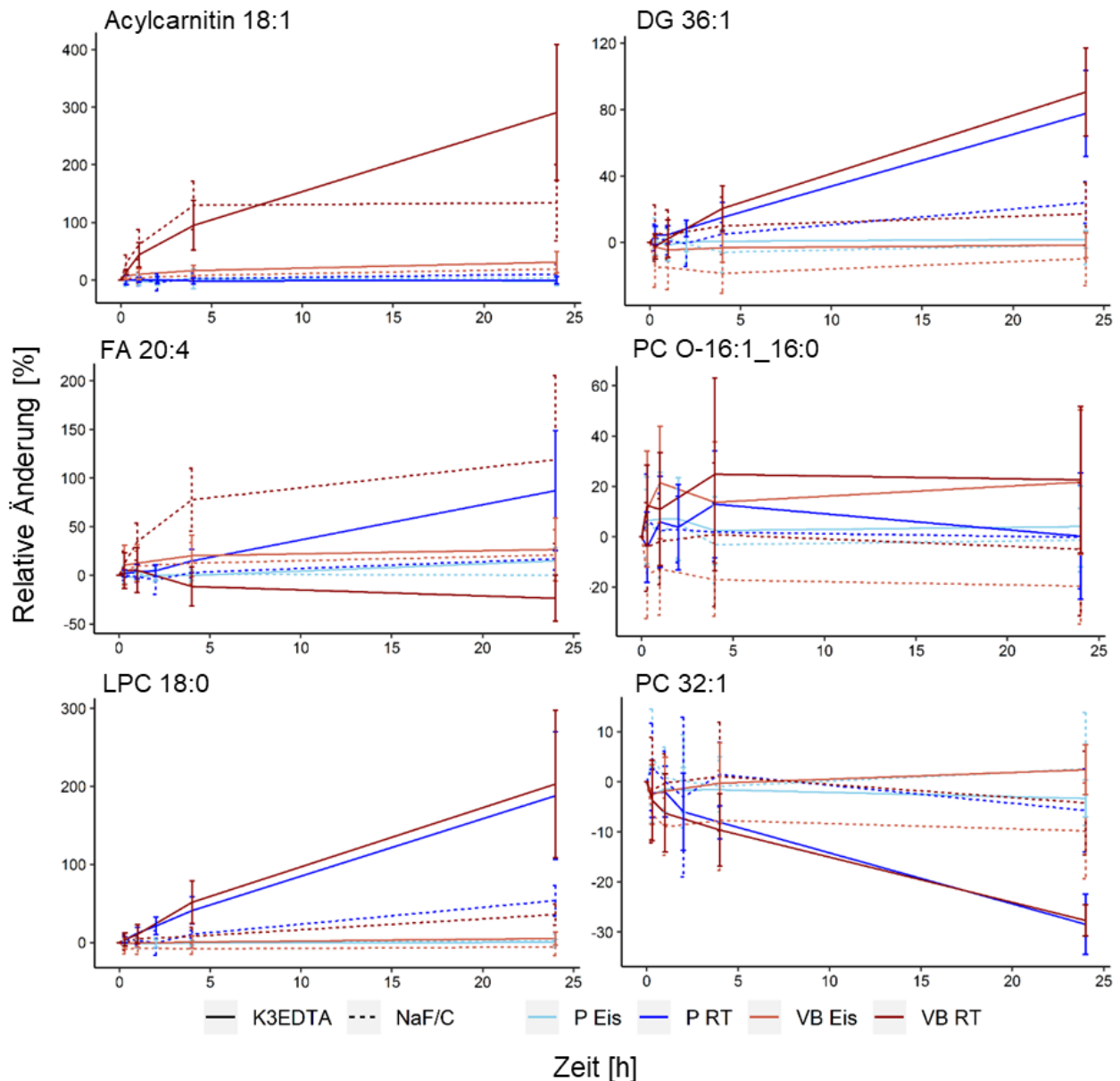


Abbildung 48: Relative Änderung der Lipidlevel nach Inkubation von Vollblut und Plasma bei RTp und in Eiswasser.

Angegeben sind der relative Fehler und Standardabweichung in Prozent im Vergleich zu direkt aufgearbeiteten Proben. Es wurden zwei verschiedene Antikoagulanzen verwendet (K<sub>3</sub>EDTA und NaF/Citrat). Gezeigt sind die Lipide mit den größten relativen Änderungen innerhalb der jeweiligen Lipidklasse. P = Plasma, VB = Vollblut (n=10).



Durch die Lagerung in Eiswasser (0–4 h) sowie über Nacht im Kühlschrank (24 h) konnte die Stabilität der Analyten in Vollblut und Plasma mit beiden Additiven verbessert werden. So ist nach 24 h im Kühlschrank kein signifikanter Unterschied bei den K<sub>3</sub>EDTA- und NaF/Citrat-Plasmaproben erkennbar. Bei den gekühlt gelagerten Vollblutproben ist lediglich Acylcarnitin 18:2 nach 24 h signifikant erhöht gewesen, nach 4 h in Eiswasser konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Proben können demnach bis zu 4 h in Eiswasser gelagert werden.

Beim Vergleich der Baseline-Level der Proben von beiden Antikoagulanzen wurde festgestellt, dass die relativen Konzentration vieler Lipidklassen in den NaF/Citrat-Proben verringert waren (siehe Abbildung 49). Eine veränderte Ionisierung durch das Antikoagulans bzw. die Gegenionen wäre denkbar [248]. Die Unterschiede konnten nicht durch interne Standards ausgeglichen werden, auch nicht bei Analyten mit einem eigenem isotopenmarkierten IS. Weiterhin konnte kein Unterschied in den Signalen von mit PBS gefüllten Blutentnahme-Röhrchen und keine Kalium-Addukte oder Unterschiede in der Intensität der Natrium-Addukte festgestellt werden (siehe Abbildung 50). Daraus folgt, dass die Gegenionen der Antikoagulanzen die Ionisierung nicht beeinflussen. Es waren v.a. die sehr schlecht wasserlöslichen Lipidklassen wie die TG verringert. Besser wasserlösliche Lipide, wie Lyso-Spezies und freie Fettsäuren, zeigten hingegen ähnliche Level wie in den K<sub>3</sub>EDTA-Proben. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Löslichkeit der Lipoproteine und den daran gebundenen Lipiden in den NaF/Citrat-Proben verringert war. Mittels Bradford-Test konnte eine um 11% verringerte Proteinkonzentration in den NaF/Citrat-Proben gezeigt werden. Die Löslichkeit der (Lipo-) Proteine könnte durch Aussalzung durch das antichaotrope Fluorid oder den durch Citrat verringerten pH-Wert (6,2 im Vergleich zu 7,6) beeinträchtigt gewesen sein [249-251].

Des Weiteren waren die Peakflächen einiger Analyten um 10–20% verringert bei NaF/Citrat-Vollblutproben, die mindestens 20 min in Eiswasser gelagert wurden im Vergleich zu direkt verarbeiteten NaF/Citrat-Proben. Betroffen waren v.a. die Ceramide, DG, TG und SE, nicht die polareren Lipide wie FA oder LPC. Bei längerer Lagerung der Vollblutproben in Eiswasser nahmen die Peakflächen nicht weiter ab. Es ist deshalb davon auszugehen, dass auch in diesem Fall die Löslichkeit verringert war. Möglicherweise hatten die direkt verarbeiteten Kontrollproben noch nicht die Temperatur des Eiswassers von ca. 0,5 °C angenommen, bevor das Plasma abgetrennt wurde. Bei den Plasmaproben war dieses Phänomen nicht zu beobachten.

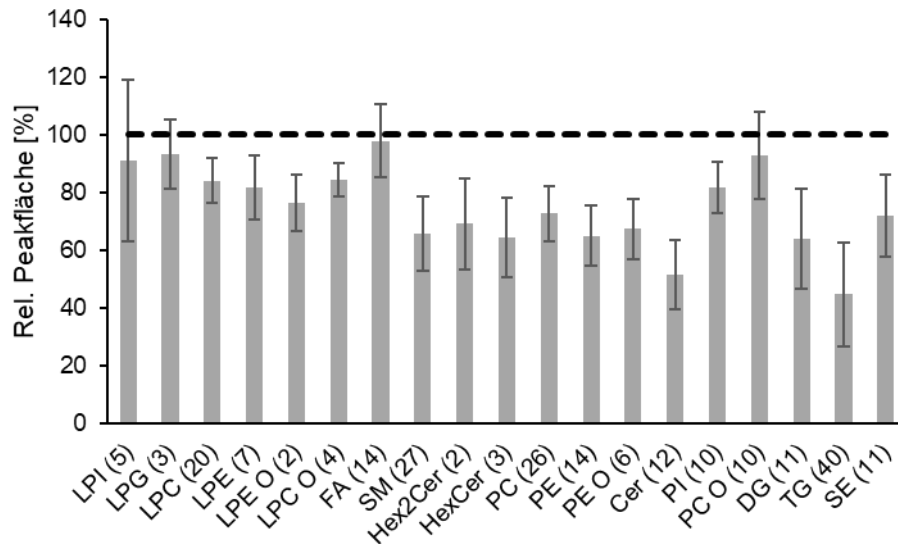


Abbildung 49: Relative Peakfläche in NaF/Citrat-Plasma im Vergleich zu K<sub>3</sub>EDTA-Plasma. Die Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardabweichung [%] der Quotienten der IS normalisierten Peakflächen von NaF/Citrat und K<sub>3</sub>EDTA der einzelnen Probanden angegeben (n=10). Dabei wurden die in Klammern angegebene Anzahl an Analyten einer Lipidklasse zusammengefasst. Die NaF/Citrat-Ergebnisse wurden mit 1,16 multipliziert, um die Verdünnung durch das flüssige Antikoagulans auszugleichen. „O“ = Ether-Spezies.

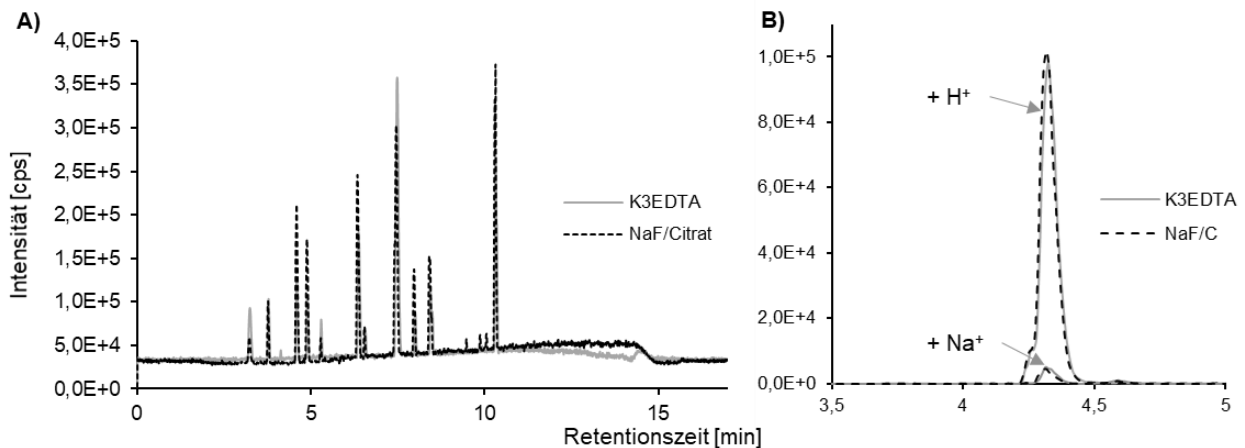


Abbildung 50: Chemischer Hintergrund der Antikoagulanzen und deren Einfluss auf die Ionisierung. (A) Basispeak-Chromatogramm von phosphatgepufferter Salzlösung in K<sub>3</sub>EDTA- bzw. NaF/Citrat-Blutentnahmesystemen. Es sind keine qualitativen Unterschiede erkennbar. Die Signale stammen vermutlich aus den mobilen Phasen oder dem chromatographischen System. (B) H<sup>+</sup> bzw. Natrium-Addukte von LPC 18:1-d7 in K<sub>3</sub>EDTA- bzw. NaF/Citrat-Plasmaproben. NaF/C = Natriumfluorid/Citrat.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Vollblutproben direkt in Eiswasser gelagert und innerhalb von 4 h weiterverarbeitet werden sollten, um die Stabilität der Analyten zu gewährleisten. Die prozessierten Plasmaproben können dann bis zu 1 h bei RTp gelagert werden. Da bei längerer Lagerung v.a. die LPC ansteigen, sollte die Prozessierung der Plasmaproben, z.B. beim Aliquotieren, in Eiswasser durchgeführt werden. Das verwendete Blutentnahmesystem sollte mitgeteilt werden, da die Lipidkonzentrationen davon beeinflusst werden. K<sub>3</sub>EDTA ist das Standard-Antikoagulans für

Lipidomics-Studien und sollte deshalb bevorzugt eingesetzt werden, um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu erhöhen [252, 253]. Wenn bei der Blutentnahme mit längeren Lagerzeiten zu rechnen ist oder eine durchgehende Kühlung nicht gewährleistet werden kann, sind NaF/Citrat-Blutentnahmesysteme zu bevorzugen, um die Stabilität zu verbessern. Wenn die Proben auch noch auf weitere Analytgruppen wie die Lysophosphatidsäuren oder die Endocannabinoide untersucht werden sollen, so ist deren geringere Stabilität zu beachten [251, 254, 255].

### 3.3.2 Entzündungsmodelle in Mäusen

Des Weiteren wurden die Unterschiede in den durch Injektion von LPS oder Zymosan induzierten Entzündungsmodellen in Mäusen untersucht. Die beiden Pathogene aktivieren über den Toll-like Rezeptor 4 (LPS) und Toll-like Rezeptor 2 (Zymosan) unterschiedliche Immunprozesse, die die beiden wichtigsten Immunantworten bei Infektionen darstellen. Die Injektion erfolgte in die rechte Pfote, wobei die linke Pfote sowie unbehandelte Mäuse als Kontrolle dienten. Fünf Stunden nach Injektion wurden den Mäusen beide Pfoten und Plasma entnommen und die Proben mit der hier vorgestellten Methode analysiert. Dieser Zeitpunkt repräsentiert den Höhepunkt der Entzündung, gemessen an der Ödementwicklung.

Die Datensätze wurden untargeted ausgewertet, dabei konnten in Plasma oder Pfoten 139 signifikant veränderte Lipide identifiziert werden (ANOVA mit FDR < 0,05). Die Lipidprofile in den Plasmaproben unterscheiden sich v.a. in dem Gehalt an Di- und Triglyceriden. Die behandelten Mäuse zeigten geringere DG- und TG-Plasmalevel. In den Zymosan Proben waren außerdem einige Fettsäuren (18:1, 20:2, 20:3 und 24:1) verringert (Abbildung 51). Bei den veränderten Lipiden handelt es sich nicht um entzündungsspezifische Marker. Wahrscheinlich beruht die Veränderung auf der vermehrten Verwendung der DG und TG zur aeroben Energiegewinnung durch  $\beta$ -Oxidation [256]. Mittels der Hauptkomponentenanalyse waren Unterschiede bei den Plasmaproben, v.a. zwischen Zymosan und der Kontrolle, erkennbar, dabei fand aufgrund der großen biologischen Varianz eine eindeutige Trennung nicht statt (Abbildung 51, Anhang Abbildung 59).

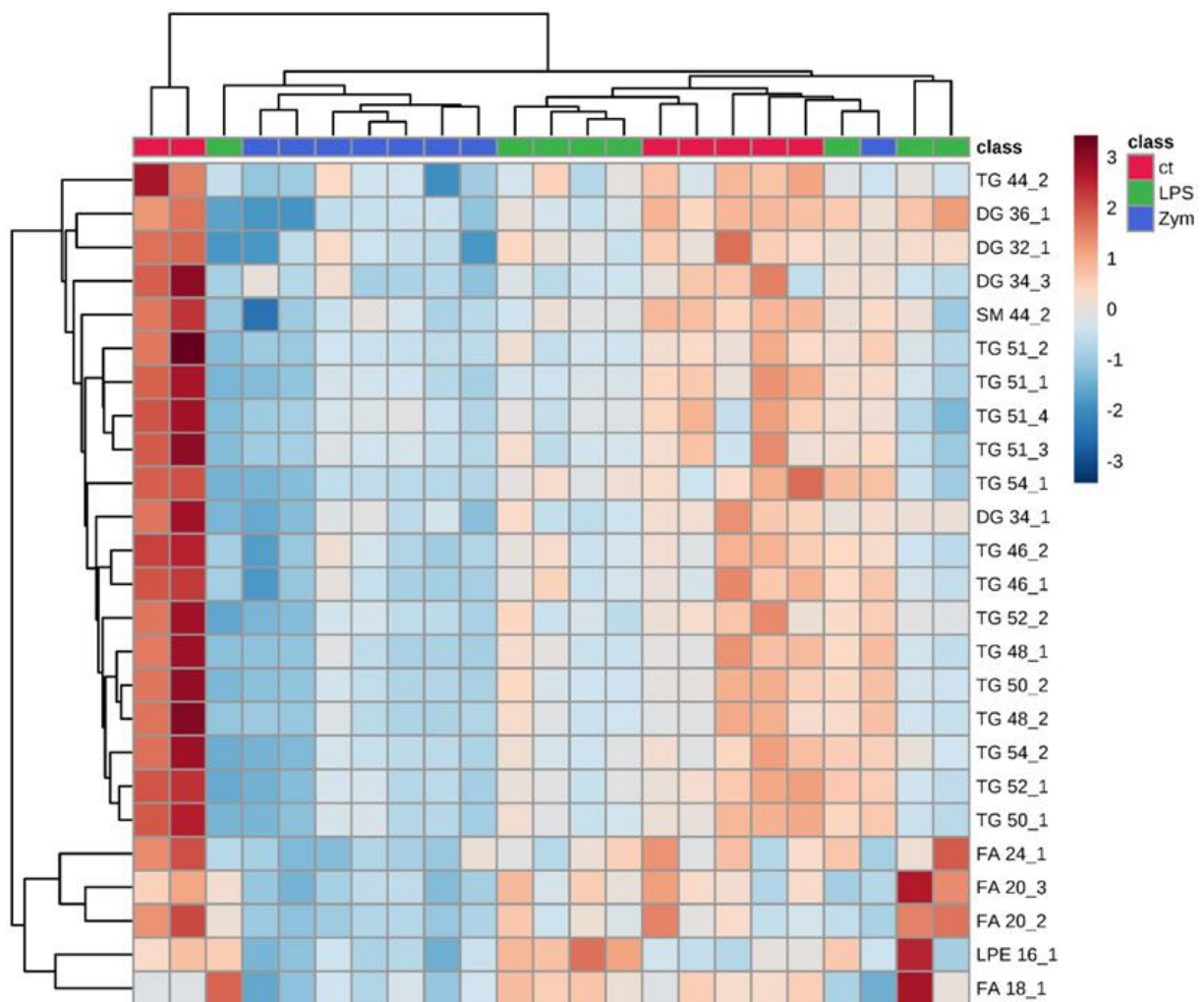


Abbildung 51: Heatmap der Plasmalipide von LPS-, Zymosan- oder unbehandelten Mäusen. Von 139 veränderten und identifizierten Lipiden wurden die 25 signifikantesten ausgewählt (ANOVA, FDR). Die Clusteranalyse erfolgte über die Mittelwerte mit der euklidischen Distanz. Die Analyten wurden autoskaliert für eine bessere Vergleichbarkeit. Die unterschiedlichen Behandlungsgruppen sind farbig markiert (Kontrolle = rot, LPS-Injektion = grün, Zymosan-Injektion = blau). (Z-Score, n=7 bis 8).

Die Lipidprofile in den behandelten Pfoten zeigten hingegen deutliche Unterschiede (Abbildung 53 A). Nach Injektion von LPS oder Zymosan waren einige Sterylester stark angestiegen, z.B. 16:1, 18:1, 18:2, 20:3, 20:4 und 22:6. Auch die Ether-Lipide, wie z.B. LPC O-16:0 und PC O-36:2 waren in den entzündeten Pfoten erhöht. Die einzelnen Ether-Spezies waren unterschiedlich stark betroffen, so war z.B. LPC O-16:1 um ca. 15 bzw. 50% bei den Zymosan- bzw. LPS-Proben erhöht, hingegen stieg das Level von PC O-18:1\_18:2 auf das 29- bzw. 17-fache an. Die LPC und PC mit einem Hexadecenyl-Rest (O-16:1) zeigten in den entzündeten Pfoten eine deutlich geringere Veränderung (Abbildung 52). Die Ether-Phosphatidylethanolamine zeigten auch Unterschiede: während einige um ca. 30–100% erhöht waren (LPE O-16:1, LPE O-20:3, PE O-16:1\_18:2), blieben andere wie PE O-18:1\_18:1 und PE O-18:1\_18:2 unverändert. Die Unterschiede im Lipidprofil zwischen der Entzündung durch LPS oder Zymosan scheinen eher quantitativ als qualitativ zu sein, da die Änderungen der Ether-Spezies im Vergleich zu unbehandelten Mäusen vergleichbar sind (Abbildung 52).

Auch die Acylcarnitine 16:0, 18:1 und 18:2 waren um 40 bis 160% erhöht (Abbildung 53). Einige LPC, LPI und PI waren ebenfalls erhöht in den Pfoten, in die LPS bzw. Zymosan injiziert wurde. Auffällig war zudem der Anstieg an Hydroxy-Hexosylceramid d18:1/20:0\_OH (HexCer d18:1/20:0\_OH) in dem entzündeten Gewebe. Die Konzentrationen von HexCer d18:1/20:0\_OH waren zudem signifikant höher in den Zymosan-Proben im Vergleich zu den LPS-Proben. Sterolsulfat hingegen war zwischen den Gruppen signifikant verändert, trug aber nicht zur Unterscheidung der behandelten Pfoten von der Kontrolle bei. In den Gewebehomogenaten konnte außerdem Prostaglandin E2 (PGE2) identifiziert werden. Die Identifizierung von PGE2 war allerdings nicht eindeutig, da die Isomere wie PGD2 mit der vorliegenden Methode chromatographisch nicht getrennt wurden und auch nicht über die aufgenommenen MS/MS-Spektren unterscheidbar sind. Wider Erwarten waren die Konzentrationen von PGE2/PGD2 in den entzündeten Pfoten verringert. Die Veränderungen im Lipidprofil konnten fast ausschließlich in den rechten Pfoten, in die LPS bzw. Zymosan injiziert wurde festgestellt werden. Die gegenüberliegenden Pfoten zeigten lediglich eine Erhöhung der Acylcarnitine, LPC- und LPI-Konzentrationen bei den mit LPS behandelten Tieren. Weitere Details zu den 139 signifikant veränderten Lipiden sind im Anhang aufgeführt (Tabelle 48 f).

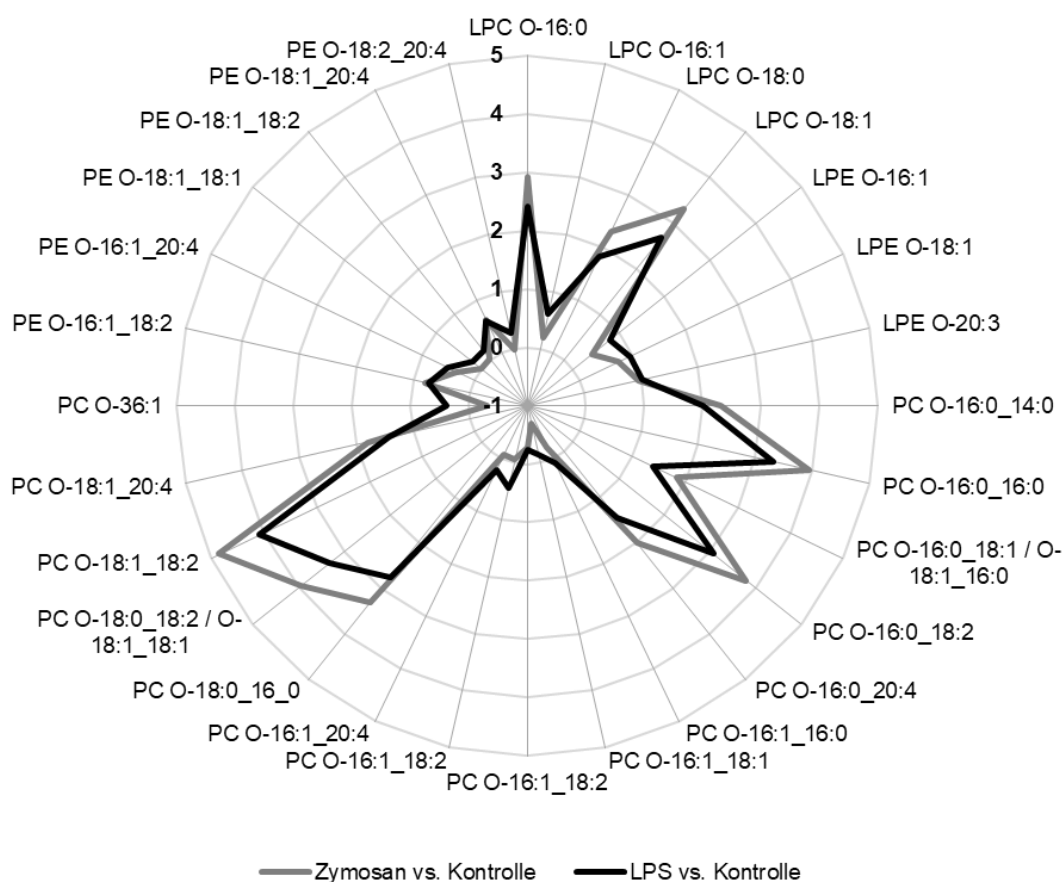


Abbildung 52: Netzdiagramm der Ether-Lipide in mit LPS oder Zymosan behandelten Mauspfoten. Dargestellt sind die log<sub>2</sub> fold change Werte mit LPS (schwarz) oder Zymosan (grau) behandelter Pfoten im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. PC O-36:1 konnte ohne MS/MS-Spektrum im negativen Ionisationsmodus nicht weiter identifiziert werden. (n=8).

# Ergebnisse

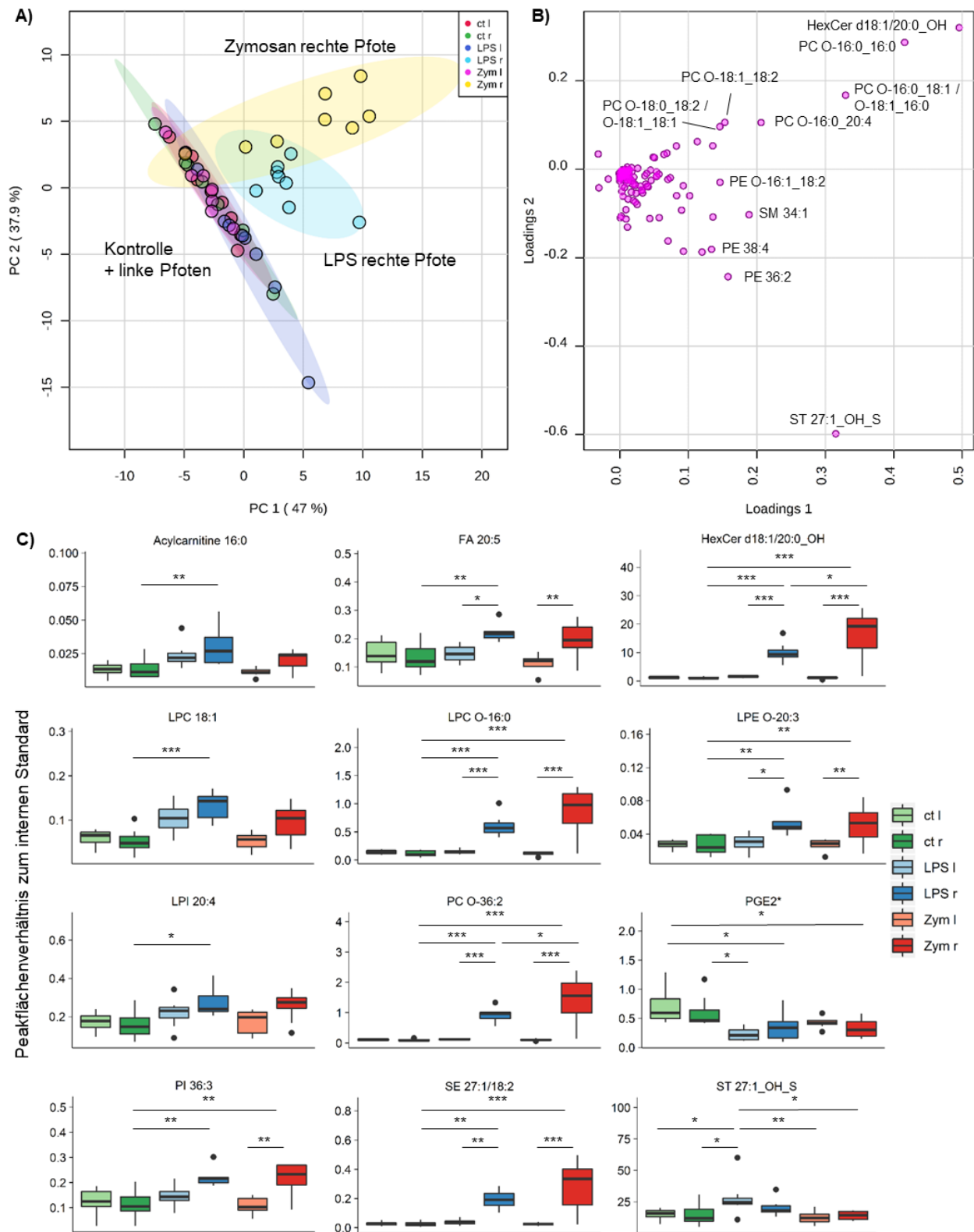


Abbildung 53: Änderungen im Lipidprofil nach Injektion von LPS oder Zymosan in Mauspfoten. Den Mäusen wurde Lipopolysaccharid (LPS) oder Zymosan (Zym) in die rechte Pfote (r) injiziert. Die linke Pfote (l) sowie unbehandelte Mäuse (Ct) dienten als Kontrolle. (A) Der Scores-Plot der Hauptkomponentenanalyse zeigt eine Trennung der mit LPS/Zymosan behandelten Pfoten und ein Cluster mit den unbehandelten Pfoten. Die 95% Konfidenzintervalle überlappen. Im dazugehörigen Loadings-Plot (B) sind die für die Trennung relevanten Analyten dargestellt. (C) Boxplot zum Vergleich einzelner Analyten. Es wurden die Analyten mit den signifikantesten Unterschieden ausgewählt, wobei pro Lipidklasse nur ein Vertreter gezeigt wird (ANOVA, FDR). Die Identifizierung von PGE2 ist aufgrund koeluerender Isomere nicht eindeutig. (ANOVA mit Tukeys Post-hoc-Test, Signifikanzniveau: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n=8).

## 4 Diskussion

Der Vorteil von Screening-Methoden gegenüber gezielten Methoden liegt in der Vielfalt an Analyten, die gleichzeitig erfasst werden. So ist ein umfangreicher Einblick in die beteiligten Stoffwechselwege möglich. Dabei wird für Screening-Methoden aufgrund ihrer Selektivität und Sensitivität bevorzugt die hochauflösende Massenspektrometrie in Kopplung mit einer chromatographischen Trennung eingesetzt [15]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Screening-Methode für Lipide unter Einsatz eines LC-QTOFMS-Systems entwickelt. Die Robustheit und Zuverlässigkeit der entwickelten Methode sowie die Anwendbarkeit auf viele Arten von biologischen Proben konnte gezeigt werden. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile der einzelnen Abschnitte des Arbeitsablaufes erläutert, angefangen bei der biologischen Applikation, da die Identifizierung potenzieller Biomarker im Zentrum der Methodenentwicklung stand.

### 4.1 Lipidprofil in den LPS/Zymosan-Entzündungsmodellen

Die entwickelte Methode wurde u.a. eingesetzt, um die Unterschiede im Lipidprofil nach Injektion von Lipopolysaccharid oder Zymosan im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zu untersuchen. Es wurden das Plasma sowie die behandelten und die gegenüberliegenden Pfoten 5 h nach Behandlung analysiert. Die Injektion von LPS bzw. Zymosan sind häufig verwendete Entzündungsmodelle [235]. In Vorversuchen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, zeigten die Tiere ein ähnliches Schmerzverhalten. Der Zeitpunkt 5 h nach Behandlung wurde ausgewählt, da bei diesem in den Vorversuchen die größten Unterschiede zwischen den Entzündungsmodellen mit LPS bzw. Zymosan festgestellt wurden. So waren die Ödeme nach Zymosan-Behandlung größer und die Durchflusszytometrie zeigte qualitative sowie quantitative Unterschiede der eingewanderten Immunzellen. Zudem wird nach 5 h, gemessen an der Ödemgröße, der Höhepunkt der Entzündung erreicht.

Die Analyse des Lipidprofils zeigte keine entzündungsspezifischen Marker im Plasma der behandelten Mäuse. Hingegen konnten deutliche Unterschiede bei den entzündeten Pfoten festgestellt werden. Die durch die Entzündung veränderten Lipidklassen und mögliche Hintergründe sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

## Diskussion

Tabelle 29: Bei der Entzündung durch LPS/Zymosan veränderte Lipidklassen und deren mögliche Bedeutung. Ø = keine Änderung, ↑ / ↓ = erhöhte / gesenkte Werte um X%, ↑ > 20%, ↑↑ > 100%, ↑↑↑ > 1000%.

Lipidklasse	Plasma	Pfote	Funktion/Bedeutung
TG	↓	Ø	TG dienen als Energiespeicher, möglicherweise werden vermehrt Fettsäuren oxidiert, um den erhöhten Energiebedarf zu decken [257].
DG	↓	Ø	Die Funktion der DG in Plasma wurde noch nicht untersucht. In Zellen können DG als Second Messenger agieren und haben eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel, indem sie zur Synthese der Phospholipide, TG und weiterer Second Messenger verwendet werden [44]. Es ist anzunehmen, dass die gesenkten DG Konzentrationen mit den TG zusammenhängen.
Acylcarnitine	Ø	↑-↑↑	Acylcarnitine sind an der Energiegewinnung durch β-Oxidation in den Mitochondrien beteiligt [35].
Ether-PC & Ether-LPC	Ø	↑ - ↑↑↑	Die Funktion der Ether-Lipide ist noch nicht vollständig geklärt. Neben ihrer Bedeutung als Membranbaustein in den Lipid-Raft-Bereichen und für die Signaltransduktion, wird vermutet, dass die Plasmalogen die Membran vor der Oxidation durch aktivierte neutrophile Granulozyten schützen kann [55, 56, 60]. <i>In vitro</i> Versuche zeigten, dass die Myeloperoxidase aktivierter neutrophiler Granulozyten hypohalogene Säuren bildet und damit Plasmalogen zu LPC und halogenierten Fettsäurealdehyden oxidiert [258]. Die halogenierten Fettsäurealdehyde können möglicherweise zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen beitragen [63]. In diesem Versuch konnten keine chlor- oder bromhaltigen Verbindungen in den Proben nachgewiesen und die Annahme daher nicht bestätigt werden. Es ist auffällig, dass nahezu alle Ether-PC und Ether-LPC in diesem Versuch stark erhöht waren (Ausnahme: Hexadecenylrest, wie z.B. LPC O-16:1).
Ether-PE & Ether-LPE	Ø	Ø - ↑	Ether-PE dienen u.a. als Speicher von Arachidon-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure zur Bildung von pro- bzw. anti-inflammatorischen Mediatoren [259].
Hydroxy-HexCer	Ø	↑↑↑	Bisher wurde in der Literatur nichts zur Funktion der Hydroxy-Ceramide im Kontext von Entzündungen beschrieben. In einigen Gewebetypen zeigten sie allerdings eine stärkere pro-apoptotische Wirkung als Ceramide [260]. Sphingolipide können sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken [261].
LPC	Ø	Ø - ↑↑	LPC können von apoptotischen Zellen freigesetzt werden [262]. Die Zahl apoptotischer Zellen sollte 5 h nach Injektion allerdings noch gering sein.
SE	Ø	↑↑-↑↑↑	Neben ihrer Funktion als Speicher und Transferform des Cholesterols und anderer Sterole, sind zu den SE keine spezifischen Biomarker-Funktionen bekannt [81]. SE kommen v.a. als Bestandteil von LDL und HDL im Blut und in Lipidtröpfchen in den Zellen vor [40]. Die Lipoproteine wiederum, werden als Bestandteil des angeborenen Immunsystems diskutiert. Sie können Bakterienendotoxine wie LPS komplexieren und damit neutralisieren [263]. Cholesterylesterreiche Lipoproteine wie LDL zeigten dabei eine stärkere Komplexierung des LPS [264]. Des Weiteren kann LDL, über die Bindung an Toll-like Rezeptoren, Makrophagen aktivieren und dadurch die Entzündungsreaktion verstärken [86].



Bisher gab es keine vergleichbaren Studien, die das Maus-Lipidom bei akuten Entzündungen 5 h nach Injektion von LPS oder Zymosan untersuchten. Wu *et al.* analysierten das Metabolom des Präfrontalkortexes von Mäusen 28 h nach LPS Behandlung mittels GC-MS und stellten dabei u.a. reduzierte Cholesterol- und gestiegene Arachidonsäure-Werte fest [265]. Sie injizierten die LPS-Lösung in das Peritoneum, um infolge einer systemischen Entzündung eine Depression bei den Mäusen auszulösen [265]. Eine weitere Studie fand hingegen bei durch Galactosamine und LPS induziertem akutem Leberversagen in Mäusen nach 6 h verringerte Level an Arachidonsäure und Cholesterol in der Leber [266]. In der hier dargestellten Untersuchung konnten keine Veränderungen der Arachidonsäure- oder Cholesterol-Konzentrationen festgestellt werden. Die Unterschiede in diesem Versuch waren größtenteils lokal begrenzt. Die unbehandelten Pfoten zeigten praktisch keinen Unterschied zur Kontrolle, sodass keine Anzeichen für eine systemische Entzündung festgestellt werden konnten. Vergleichbare Studien zur Entzündung in Mauspfoten gibt es nicht und es ist anzunehmen, dass die Veränderung des Lipidprofils je nach Gewebetyp und vor allem bei einer systemischen Entzündung unterschiedlich ausfällt.

Weitere Studien fokussierten sich auf Entzündungsmodelle in isolierten Zellen. In RAW264.7-Makrophagen bzw. humanen Monozyten wurden 30–180 min nach Zymosan-Behandlung reduzierte Level an PC und PI, die Arachidonsäure- (FA 20:4) enthalten, und einigen FA 20:4-haltigen PG festgestellt, während die PE unverändert blieben [267, 268]. Eine fünf stündige Vorbehandlung mit LPS änderte das Ausmaß der Reduktion, hatte aber keinen Einfluss auf die Art der betroffenen Lipide [267]. Eine weitere Studie ordnete den Ursprung der Arachidonsäure für die Synthese von Lipidmediatoren in humanen Monozyten ebenfalls den Phospholipiden zu, da die FA 20:4-haltigen TG unverändert blieben [269]. Im Gegensatz dazu wurde in den hier untersuchten, entzündeten Pfoten erhöhte PI-Konzentrationen gefunden und es konnte keine Reduktion anderer Diacyl-Phospholipide festgestellt werden (Abbildung 53). Die Analyse peritonealer Makrophagen 6 bzw. 18 h nach LPS-Injektion durch Posokhova *et al.* zeigte eine gesteigerte TG- und SE-Synthese, die 18 h nach Behandlung ihr Maximum erreichte [270]. Eine starke Erhöhung der SE-Konzentrationen konnte auch in dieser Arbeit in entzündeten Pfoten beobachtet werden. In einer weiteren Studie an Makrophagen konnten, wie auch hier gezeigt, keine Veränderung der Ether-PE bei der Reaktion auf Zymosan beobachtet werden [271]. Bei Vorbehandlung mit LPS allerdings waren die Ether-PE infolge der Zymosan-Behandlung verringert und die enthaltene Arachidonsäure erhöht [271]. Die beschriebenen Unterschiede zwischen der Literatur und den Daten aus diesem Versuch, können an dem zeitlichen Ablauf einer Entzündung liegen. Zu Beginn der akuten Entzündungsreaktion werden pro-inflammatorische Mediatoren freigesetzt und es kommt zur Ausbildung der Kardinalsymptome Rötung, Schwellung, Schmerz, Erwärmung und eingeschränkter Funktion [272, 273]. In der akuten Entzündungsphase wandern neutrophile Granulozyten in das betroffene Gewebe ein und setzen entzündungsauflösende Mediatoren frei [272]. Zeitlich verzögert wandern ebenfalls Monozyten bzw. Makrophagen ein und es kommt zur Entzündungsauflösung [272]. Die Untersuchungen aus der Literatur konzentrieren sich auf das Verhalten von Makrophagen und Monozyten und damit auf einen

späteren Zeitpunkt im Entzündungsablauf. Die aktuelle Studie untersucht wie bereits erwähnt den Höhepunkt der Entzündung, gemessen an der Ödemgröße.

Bei entzündlichen Erkrankungen im Menschen wurde, im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten, eine Erhöhung der Triglyceride und Senkung von HDL sowie gelegentlich auch von LDL im Plasma beschrieben [87]. Außerdem wurden verringerte Konzentrationen der Ether-Lipide im Plasma von Patienten gefunden, die Erkrankungen mit entzündlicher Komponente wie durch Atherosklerose bedingten Bluthochdruck, Adipositas und nicht-alkoholische Steatohepatitis hatten [72-74]. Die Bedeutung der Plasmalogen als Biomarker, z.B. für Krebs, wird aufgrund der geringen Selektivität und der teils widersprüchlichen Ergebnisse kontrovers diskutiert [77, 259]. Die Entzündung bei Bluthochdruck oder Adipositas ist chronisch, es ist daher von einem veränderten Lipidprofil im Vergleich zu der hier untersuchten akuten Entzündung auszugehen [274].

Mit der vorliegenden Arbeit wurde demnach zum ersten Mal eine Beteiligung der Ether-PC an der akuten Entzündung in einem Tiermodell nachgewiesen. In den entzündeten Pfoten kam es zu einem starken Anstieg von Lipid-Spezies, ohne entsprechenden Abfall anderer Lipide. Deswegen hängt der Anstieg der SE- und Ether-Lipide neben einer lokalen Bildung wahrscheinlich auch mit der gesteigerten Durchblutung, Schwellung sowie der Einwanderung von Immunzellen zusammen. Des Weiteren zeigte sich in der Hauptkomponentenanalyse des Lipidprofils eine Trennung der LPS- und Zymosan-Proben, sodass die Modelle trotz des ähnlichen Schmerzverhaltens u.U. nicht vergleichbar sind. Anhand der vorliegenden Daten scheinen die Unterschiede im Lipidprofil eher quantitativ als qualitativ zu sein. Um die Ergebnisse besser einordnen und ggf. bestätigen zu können, sollten deshalb weitere Versuche, wie z.B. die Untersuchung der zellulären Reaktion auf die Stimulation mit LPS bzw. Zymosan, oder eine exakte Quantifizierung der veränderten Lipide durchgeführt werden. Diese weiteren Untersuchungen der Entzündungsmodelle waren nicht Gegenstand dieser Arbeit.

## 4.2 Einfluss der Präanalytik und Probenvorbereitung

Die Untersuchung des Lipidprofils in entzündetem Gewebe zeigte auch die Bedeutung einer geeigneten Probenvorbereitung, um Artefakte durch die Präanalytik auszuschließen. So wurde in dem entzündeten Gewebe eine Erhöhung der Prostaglandine, v.a. von PGE<sub>2</sub>, erwartet [275]. Stattdessen wurde eine Senkung der Prostaglandine D<sub>2</sub> bzw. E<sub>2</sub> in den entzündeten Pfoten festgestellt und durch eine quantitative LC-MS/MS-Messung bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Prostaglandine werden *post mortem* im Gewebe gebildet [276]. Die Prostaglandin-Konzentrationen waren in den Pfoten-Homogenaten sowohl bei den Kontrollen als auch im entzündeten Gewebe sehr hoch. Trotz der möglichst schnellen Probenvorbereitung in Eiswasser, ist dadurch die Entstehung der Prostaglandine *ex vivo* nicht auszuschließen. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den gemessenen Prostaglandinen um Artefakte der Präanalytik handelt.

Die Probenvorbereitung von Gewebe ist herausfordernd. Während der gesamten Probennahme und -verarbeitung inklusive der Homogenisierung muss die Stabilität der Proben gewährleistet werden, sodass ein schnelles Vorgehen unabdingbar ist. Außerdem können Gewebe nicht so gleichmäßig vorgelegt werden wie flüssige Proben. Der Fehler bei der Einwaage ist groß bei kleinen Gewebestücken, die im Bereich der Mindesteinwaage oder sogar darunter liegen, z.B. Dorsalwurzelganglien. Bei der Gewebeentnahme ist Geschicklichkeit gefordert, um die Strukturen klar abzutrennen und schnell zu verarbeiten. Außerdem können durch das zu untersuchende Krankheitsmodell makroskopische Änderungen hervorgerufen werden, die eine vergleichbare Probennahme erschweren. Größere und kompartimentierte Gewebe wie die Nieren, können bei Zerkleinerung während der Entnahme zu variierenden Lipidprofilen führen, sodass das ganze Organ homogenisiert werden sollte.

Um die Vergleichbarkeit für die relative Quantifizierung zu verbessern, wurden für diese Arbeit Gewebehomogenate mittels Nassvermahlung hergestellt und jeweils das Äquivalent von 1 mg Gewebe untersucht. Weichere Gewebe wie Leber ließen sich gleichmäßiger zerkleinern und lieferten reproduzierbare Ergebnisse. Die Reproduzierbarkeit bei festeren Geweben, wie z.B. Mausepfoten, war dennoch ausreichend. Allerdings führte die Injektion von LPS und v.a. von Zymosan zu einer Schwellung der betroffenen Pfote (ipsilateral), sodass deren Masse teilweise doppelt so hoch war wie contralateral. Dadurch war die Gewebezusammensetzung verändert. Dies muss bei der Auswertung beachtet und alternative Normalisierungsverfahren in Betracht gezogen werden. Die Proteinkonzentration konnte in diesem Fall nicht zur Normalisierung verwendet werden, da sie in dem entzündeten Gewebe signifikant erhöht war. Im Rahmen einer Entzündung und der damit verbundenen erhöhten Gefäßpermeabilität, lagern sich Proteine aus dem Blut in dem betroffenen Gewebe ab [277, 278]. Für die untargeted Auswertung von entzündetem Gewebe bieten sich demnach die MPR- oder die MW IS-Korrektur an.

Das Haupteinsatzgebiet der entwickelten Methode waren humane Blutproben, deswegen wurde der Einfluss der Präanalytik auf die Ergebnisse in diesen Proben untersucht. Bei der Lagerung bei Raumtemperatur sowohl von Plasma als auch von Vollblut, kam es zum Abbau von Phospholipiden wie den PC und den PE sowie zum Abbau der Triglyceride. Dieser Abbau war bei den genannten Lipiden weniger deutlich zu erkennen als bei den Produkten des Abbaus, den DG, LPC, LPE und freien Fettsäuren, die deutlich anstiegen. Das lässt sich dadurch erklären, dass es deutlich mehr PC- und TG- als LPC- und DG-Spezies gibt und die PC und TG höher konzentriert vorliegen, sodass die prozentualen Änderungen der Konzentrationen der LPC und DG höher ausfallen. Da sowohl die Lagerung der Proben in Eiswasser als auch der Einsatz von NaF/Citrat als Antikoagulans, die Stabilität verbessern konnte, ist ein enzymatischer Lipidabbau anzunehmen. Die Konzentrationen der Acylcarnitine sind in Vollblut, nicht in Plasmaproben, angestiegen. Das deutet auf die Freisetzung aus den Blutzellen hin, ähnlich dem Sphingosin-1-phosphat [253, 279]. Die beobachtete Instabilität der K<sub>3</sub>EDTA-Proben bei RTp sowie die Stabilität in Eiswasser gelagerter Proben konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [234, 252, 280]. Die verbesserte Stabilität v.a. der

## Diskussion

---

Phospholipide in den NaF/Citrat-Proben könnte durch eine Hemmung von Phospholipasen erklärt werden, da Natriumfluorid verschiedenste Enzyme mit Phosphat-Bindungsstellen, wie die Enolase und Phosphatasen, sowie  $Mg^{2+}$ -bindende Enzyme hemmen kann [281-283]. Präanalytische Untersuchungen werden in den Richtlinien zur Methodvalidierung der FDA und EMA erwähnt, aber nicht genauer festgelegt [187, 232]. Während der Methodenentwicklung und in klinischen Studien wird die Präanalytik deshalb häufig nicht beachtet. Die in dieser Arbeit vorgestellten Erkenntnisse zeigen allerdings, dass die Probennahme und die Lagerbedingungen nach der Entnahme deutliche Veränderungen des Lipidprofils hervorrufen kann und so die Ergebnisse qualitativer und quantitativer Untersuchungen beeinträchtigt werden können, v.a. bei einer ungleichen Probennahme.

Die verwendete Flüssig-Flüssig-Extraktion konnte reproduzierbare Ergebnisse erzielen und viele Lipidklassen fast vollständig aus den Proben extrahieren. Allerdings ist die organische Phase der MTBE-Extraktion nach Matyash *et al.* sehr apolar, ebenso wie bei der Extraktion mit Methanol und Chloroform nach Folch sowie Bligh und Dyer [221-223]. MTBE hat einen logP-Wert von 0,9 und dadurch war die Wiederfindung der polaren Lipidklassen eingeschränkt, z.B. LPI und Acylcarnitine [284]. Dementsprechend konnten in diesen Gruppen nur die unpolarsten bzw. abundantesten Vertreter analysiert werden. Sollten diese Gruppen als potenzielle Biomarker identifiziert werden, kann die Extraktion durch Veränderung der relativen Lösungsmittelzusammensetzung oder durch polarere Lösungsmittel wie Ethylacetat verbessert werden [285]. Dabei ist davon auszugehen, dass auch die Löslichkeit von hydrophilen Matrixbestandteilen erhöht ist und die Messung dadurch gestört bzw. das Gerät verschmutzt werden könnte. In diesem Fall wurde die MTBE-Extraktion zugunsten der unpolaren Triglyceride und Sterylester beibehalten. Im Vergleich zur Extraktion mit Chloroform, mit einem logP von 1,97, sind die Extraktionsraten ähnlich bei besserer Verträglichkeit mit der Gesundheit und Umwelt [239, 286]. Zudem werden mit der MTBE-Extraktion die Proteine vollständiger gefällt, sodass die Chromatographiesäulen nicht so schnell verstopfen [287].

Eine Alternative zur LLE ist die Aufreinigung der Proben mittels SPE. Die SPE wird vornehmlich für gezieltere Analysen einiger Analyten oder zur Fraktionierung der Proben eingesetzt [15, 241]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die abundanteren PC und SM abzureichern, um die Nachweisgrenze für die in Plasma niedriger konzentrierten PI, PG und PS zu verbessern. Gemäß Literatur ist die LLE mit MTBE besser geeignet, um die Phospholipide zu entfernen, als diverse SPE-Kartuschen [288]. Da zu dem Zeitpunkt der Untersuchung noch keine geeigneten Standards bzw. interne Standards zur Verfügung standen, konnte die Wiederfindung der Verfahren nicht verglichen werden. Spätere Untersuchungen der Wiederfindung der MTBE-Extraktion zeigten, dass die Extraktionsraten der Phospholipide durch die Zugabe von Methanol hoch waren. Mit Hilfe verschiedener Kationenaustauscher-Kartuschen (SPE) konnte die Konzentration der PC und SM verringert werden. Die Suppressionseffekte konnten allerdings erst durch eine viel aufwendigere

Probenvorbereitung, mit LLE und SPE sowie anschließender Messung mehrerer Fraktionen, in ausreichendem Maße reduziert werden. Dieses Protokoll war für die Routine-Durchführung nicht praktikabel. Die LLE lieferte außerdem weniger Störsignale und deckte ein für Screening-Methoden geeignetes Lipidprofil ab. Für gezieltere Analysen einiger Analyten kann eine SPE dennoch sinnvoll sein.

Damit die Probenvorbereitung auch im Rahmen größerer klinischer Studien mit mehreren hundert bis tausenden Proben verwendet werden kann, muss sie in der Routine zügig durchführbar sein. Bei einigen Lipidextraktionen, wie der LLE mit MTBE, werden die Proben längere Zeit inkubiert, um die Lipide vollständig zu lösen [223]. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubationszeit ohne Einschränkung der Extraktionsraten auf nur eine Minute reduziert werden kann. Außerdem werden Glasgefäße für die LLE bevorzugt, da organische Lösungsmittel Bestandteile aus Kunststoffgefäßen herauslösen können. Glasgefäße sind für die Routine unseres Labors nicht praktikabel, da sie einzeln geschüttelt werden müssen und i.d.R. über einen Drehverschluss verfügen. Deswegen wurde die Extraktion in Polypropylen-Gefäßen untersucht. Bei Extraktion in PP wurden erhöhte Konzentrationen einiger Fettsäuren, z.B. 16:0 und 18:0, beobachtet. Die Stearinsäure (FA 18:0) stammt wahrscheinlich aus den PP, da Magnesiumstearat als Schmiermittel für die Kunststoffherstellung verwendet wird [289]. Das verwendete Stearat ist meistens nicht rein, deshalb können so auch andere Fettsäuren in die Probe gelangen [290]. Durch Verwendung eines frischen PP beim Abdampfen, könnte demnach noch mehr Stearin- und Palmitinsäure aufgenommen werden. Der Anstieg von 11% der FA 20:4 bei den in PP extrahierten und in Glas abgedampften Proben lässt sich damit nicht erklären. Diese Veränderung liefert einen Hinweis auf einen möglichen Lipid-Abbau und damit die Freisetzung von Fettsäuren. Der Anstieg anderer Fettsäuren war unter den untersuchten Bedingungen allerdings vernachlässigbar. Für die Extraktion wurden deshalb PP und für das Abdampfen Glasvials verwendet. In Kombination mit den verkürzten Inkubationszeiten konnte dadurch die Handhabung stark vereinfacht und der Probendurchsatz mehr als verdoppelt werden.

Nach erfolgter Extraktion war die Lipidstabilität deutlich erhöht, dennoch wurden nach Lagerung der Proben für 48 h bei 6 °C auf dem Autosampler erhöhte Konzentrationen der LPE gemessen. Eine Zersetzung der entsprechenden PE kann angenommen werden, auch wenn der RE bei diesen kleiner 15% war, weil mehrere PE pro LPE in Frage kommen und diese teilweise in höheren Konzentrationen vorliegen. Der LPE-Anstieg spiegelt demnach nur die Produktseite der Reaktion wider, deswegen kann er nicht oder nur unzureichend durch interne Standards ausgeglichen werden. Eine Zersetzung des PE 15:0/18:1-d7 zu LPE 18:1-d7 ist möglich, die Unterschiede werden damit wahrscheinlich nicht ausreichend ausgeglichen. Dies konnte nicht überprüft werden, da die IS zum Zeitpunkt dieser Untersuchung noch nicht zur Verfügung standen. Die eingeschränkte Stabilität wurde berücksichtigt und lange Lagerzeiten vermieden, sodass dadurch keine Beeinträchtigung der Messergebnisse erfolgte.

### 4.3 Optimierung der chromatographischen Trennung von Lipiden

#### 4.3.1 Trennung von Isomeren und Isobaren durch RPLC

Durch die chromatographische Trennung der Analyten nach der Kohlenstoffkettenlänge und Anzahl Doppelbindungen mittels RPLC konnte die Selektivität der Methode verbessert werden. So konnten einige Isomere, wie z.B. PC O-16:0\_18:2 und PC O-16:1\_18:1, getrennt analysiert werden, was für die Untersuchung des Lipidoms bei Entzündung entscheidend war. Durch die Trennung von Fettsäure-Isomeren der DG und TG ermöglicht die entwickelte Methode einen differenzierteren Einblick in das Lipidprofil. Der Sättigungsgrad der in TG enthaltenen Fettsäuren wird z.B. im Zusammenhang mit Krebs untersucht [291, 292]. Ein Vergleich der chromatographischen Trennung mit anderen untargeted Lipidomics Screening Methoden ist schwer durchführbar, da die chromatographische Auflösung in der Regel nicht dargestellt wird. Eine weitergehende Trennung von Fettsäure-Isomeren wurde nach aktuellem Stand der untargeted RPLC-Methoden nur mit sehr langen Laufzeiten erreicht [166]. Um die Fettsäurezusammensetzung weiter aufzuschlüsseln und die Position der Doppelbindungen zu bestimmen, hätten andere Techniken wie die Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie oder Ozon-induzierte Dissoziation verwendet werden müssen [103, 104]. Für die Aufschlüsselung der Fettsäurezusammensetzung mittels Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie werden besondere Modifier wie Silberionen benötigt [104]. Auch die Auswertung der Daten wäre dadurch noch komplexer geworden. Eine weitere Herausforderung an die chromatographische Trennung sind die Isomere des PGE<sub>2</sub>, die in dieser Arbeit nicht getrennt wurden. Die gemeinsame Detektion der Isomere kann allerdings vorteilhaft sein, da die einzelnen Isomere sehr niedrig konzentriert sind und somit meistens unterhalb der Detektionsgrenze liegen. Durch die gemeinsame Detektion sind Änderungen der Prostaglandine auch bei niedrigeren Konzentrationen erkennbar und können anschließend in gezielteren Analysen näher aufgeschlüsselt werden. Obwohl noch weiteres Potenzial in der Verfeinerung der chromatographischen Trennung liegt, können mit der entwickelten Screening-Methode Änderungen des Lipidstoffwechsels detektiert und anschließend durch gezielte Messungen quantifiziert werden.

Für die meisten Lipidklassen konnten gaußförmige Peaks erzielt werden, was die Integration der chromatographischen Flächen erleichtert und so die (relative) Quantifizierung verbessert. Lediglich die Phosphatidylserine und die LPA wiesen ein leichtes Tailing auf, wobei letztere in biologischen Proben unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode liegen. Diese Problematik besteht bei den meisten Umkehrphasenmethoden, da die sauren PS und PA bei den üblichen chromatographischen Bedingungen geladen vorliegen [293]. Bei den Zorbax C8 Säulen war das Ausmaß des Peaktailings chargenabhängig, möglicherweise durch variierende Anteile der freien Silanolgruppen. Außerdem konnten keine Signale für die Cardiolipine beobachtet werden, da diese vermeintlich nicht von der Säule gelöst werden konnten. Die genannten Probleme traten bei allen untersuchten Säulen auf. Als Lösung könnten ergänzend zur vorgestellten Methode, welche einen Großteil der Analyten zuverlässig detektieren konnte, gezieltere Methoden eingesetzt werden. Gezieltere Methoden

könnten, die für die Massenspektrometrie problematische, Phosphorsäure oder andere Trennmechanismen, wie HILIC einsetzen [294, 295]. Ein weiterer Vorteil der entwickelten Methode sind die zeitlich stabilen und matrixunabhängigen Retentionszeiten, von denen sowohl die semi-quantitative Auswertung als auch die Identifizierung der Lipide profitierten. RT-Verschiebungen von 0,1 min bei der Untersuchung verschiedener Matrices deuteten darauf hin, dass es sich um eine isomere oder isobare Substanz handelt. Dadurch konnten in der semi-quantitativen Auswertung enge Grenzen gesetzt und die Auswertung so beschleunigt und auf zahlreiche Probenarten angewandt werden. Die stabilen Retentionszeiten wurden durch die Entwicklung und Optimierung einer sehr robusten Chromatographie gewährleistet. Eine Alternative zur Umkehrphasenchromatographie wäre HILIC, bei der oft die Robustheit ein Handicap ist [119].

### 4.3.2 Verschleppung und Blanksignale

Bei der entwickelten chromatographischen Methode traten außerdem kaum Verschleppungen auf, sie lagen meist unter 1‰. Bei den LPE waren in der darauffolgenden Blank-Probe maximal 0,52% der ursprünglichen Fläche erkennbar. Im Fall von Screening-Methoden gibt es keinen festgelegten Kalibrationsbereich, daher gibt es auch keine zulässige Höchstgrenze für die Verschleppung. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass einige Analyten von sehr hoch konzentrierten Proben in die nächste Probe verschleppen. Bei der Messung von niedrig konzentrierten Proben, wie z.B. Zellüberständen, mit Plasma-QCs, kann ein Übertrag in die darauffolgende Probe die Ergebnisse beeinträchtigen. Um das zu verhindern, wurde nach der Messung einer QC-Probe einmal Methanol injiziert. Durch diese Maßnahme und in Kombination mit der sehr geringen Verschleppung ist das Risiko einer Beeinträchtigung der Ergebnisse durch Übertrag in darauffolgende Proben bei der entwickelten Methode gering. Aus diesem Grund wurden zugunsten der Laufzeit keine weiteren Maßnahmen zur Reduktion der Verschleppung vorgenommen.

Eine größere Herausforderung als die Verschleppung waren die Blanksignale. Diese können durch Verkeimung oder Algenbildung im LC-System entstanden oder als Verunreinigung in den mobilen Phasen enthalten gewesen sein. Wie zuvor bereits erwähnt, können die Fettsäuren auch aus den bei der Kunststoffherstellung verwendeten Schmiermitteln stammen. Die Blanksignale konnten nicht durch gründlicheres Spülen entfernt werden und auch bei Verwendung von hochreinen ULC-MS Lösungsmitteln waren sie sichtbar. Die Blankwerte schwankten bei verschiedenen Messtagen, sodass nicht bei allen Auswertungen die gleichen Analyten ausgeschlossen werden mussten. Die Blanksignale betrafen nur wenige Analyten, sodass die Möglichkeit Unterschiede im Lipidprofil festzustellen kaum beeinträchtigt war. Allerdings ist es wichtig und technisch einfach umzusetzen, die Signale aus dem LC-System von der untargeted Auswertung auszuschließen.

### 4.3.3 Kosten und Ressourcen in der LC-MS-Analytik

Die LC-MS-Analytik, insbesondere die hochauflösende Massenspektrometrie, ist mit hohen laufenden Kosten für die Wartung und Reparatur des Gerätes verbunden, z.B. beträgt die Haltbarkeit der MCP-Detektoren gemäß Hersteller nur ca. 18 Monate und ein Wechsel kostet mehr als 15.000 €. Aus diesem Grund wurde versucht, durch die Flussteilung sowie die Verwendung von Acetonitril in ULC-MS Qualität die Ionenlast zu reduzieren. Damit konnte die Robustheit des Gerätes deutlich verbessert und die Häufigkeit der Reinigung sowie Detektor- und Linsenoptimierung verringert werden. Auch eine verringerte Detektorabnutzung ist anzunehmen, kann allerdings erst nach einer längeren Zeit bestätigt werden.

Zudem wurde die chromatographische Laufzeit auf 17 min pro Ionisationsmodus gekürzt. Dadurch wurden nicht nur Ressourcen, wie die mobilen Phasen, effizienter eingesetzt, sondern auch die Größe der Rohdaten auf ungefähr die Hälfte reduziert und somit die Auswertung beschleunigt. Außerdem konnte so der Probendurchsatz deutlich gesteigert werden. Die hier vorgestellte Methode kann demnach auch für die Analyse größerer klinischer Studien angewandt werden. Die entwickelte Methode ist kürzer als viele andere Lipidomics-Methoden, ohne auf die Selektivität durch datenabhängige MS/MS-Spektren für jede Probe zu verzichten [164-167]. Trotz der gekürzten Retentionszeit konnten für die meisten IS geringe Matrixeffekte beobachtet werden. Eine Ausnahme stellen die TG und SE dar, die sich in Humanplasma gegenseitig supprimieren. Die Ionensuppression hätte möglicherweise durch eine stärkere chromatographische Trennung der einzelnen TG und SE reduziert werden können, dies wäre aber mit einer deutlich verlängerten Laufzeit verbunden [166]. In diesem Fall überwiegen die Vorteile der kurzen Laufzeit. Bei Probenarten mit geringeren TG- und SE-Konzentrationen, wie Zellpellets, war die Ionensuppression außerdem geringer. Im Vergleich zur Direktinfusion („*shotgun-lipidomics*“) ist die Ionensuppression bei LC-Methoden deutlich verringert, sodass die Detektion niedrig konzentrierter Lipide erleichtert wird [296].

Durch die hohe Zahl an Analyten, die eingeschränkte Verfügbarkeit und aus Kostengründen werden bei Screening-Methoden i.d.R. nur ein bis zwei interne Standards pro Lipidklasse verwendet [15]. Die chromatographische Auftrennung innerhalb der Lipidklassen beeinträchtigte u.U. die Normalisierung mittels IS, da so die Fließmittelzusammensetzung und die Suppression durch koeluiierende Substanzen unterschiedlich sein kann [241]. Auch bei HILIC-Methoden mit Koelution innerhalb der Lipidklassen ist die quantitative Aussagekraft dennoch beschränkt, da die Ionisierungseffizienz mit zunehmender Kohlenwasserstoff-Kettenlänge und Sättigungsgrad abnimmt [297]. Für eine exakte Quantifizierung müsste deshalb pro Analyten ein Referenzstandard sowie idealerweise ein isotopenmarkierter Standard verwendet werden.



#### 4.4 Hochauflösende Massenspektrometrie und untargeted Screening

Die Selektivität der entwickelten Methode wurde v.a. durch die Verwendung von hochauflösender Massenspektrometrie erreicht. Der eingesetzte TripleTOF 6600 ist ein QTOFMS mit einer Massenauflösung von 15.000 (bis ca. 100  $m/z$ ) bis 45.000 (ca. 2000  $m/z$ ). Damit konnte die Identifizierung der Analyten mit einer Auflösung von ca. 30.000 und einem Massenfehler kleiner 5 ppm erfolgen und mit MS/MS-Spektren bestätigt werden. Der TripleTOF 6600 zeichnet sich zudem durch eine hohe Empfindlichkeit aus, die vergleichbar ist mit der von Triple-Quadrupol-Massenspektrometern [241]. Durch Massenspektrometer mit einer höheren Massenauflösung, wie Orbitrap oder FT-ICR, kann ein Massenfehler kleiner 1 ppm erreicht werden. Ein kleinerer Massenfehler kann hilfreich sein, die chemische Zusammensetzung unbekannter Substanzen stärker einzuschränken, ist aber nicht Voraussetzung für eine erfolgreiche Identifizierung der Lipide, zumal auch bei Orbitrap-Geräten häufig nicht die maximale Massenauflösung verwendet wird, um Zykluszeit zu sparen [285, 298]. Ein entscheidender Vorteil der QTOF-Technologie ist die Unabhängigkeit der Massenauflösung von der Zykluszeit. Die Messrate von QTOF-Geräten liegt bei 100 bis 500 Hz und ist damit deutlich höher als bei Orbitrap-Geräten mit 20–40 Hz und nochmal deutlich höher als bei FT-ICRMS (ca. 1 Hz) [126]. Eine hohe Messrate ermöglicht auch bei kurzen Elutionszeiten durch UHPLC-Methoden neben dem MS-Scan noch die Aufnahme von MS/MS-Spektren. Die Messung von MS/MS-Spektren kann bei einem TripleTOF datenabhängig über IDA oder datenunabhängig über SWATH erfolgen. Dabei ist die Messung mit IDA selektiver, da nur Muttermassen in einem Bereich von einem  $m/z$  fragmentiert werden, u.U. werden aber nicht alle Substanzen fragmentiert [299]. Mit SWATH werden alle Substanzen fragmentiert und so geht die Zuordnung der MS/MS-Daten verloren [155]. Je breiter die Massenfenster sind, desto geringer ist die Selektivität und die Zykluszeit [299]. In den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war die Selektivität der SWATH-Spektren bei der gegebenen Zykluszeit und der damit möglichen Fensterbreite zu gering. Außerdem betrifft der Vorteil des geringeren MS/MS-Datenverlustes v.a. niedrig konzentrierte Analyten, bei denen kein IDA-Spektrum getriggert wird, da zu viele Substanzen koeluiieren. Gerade bei niedrig konzentrierten Analyten besteht allerdings die Gefahr, dass zu viele Störsignale im SWATH-Spektrum vorkommen. Mit den gewählten IDA-Kriterien konnten hingegen selektive MS/MS-Spektren für mehr als 3.000 LC-MS-Signale erhalten werden. Durch die komplementären Fragmentierungsmuster im positiven und negativen Ionisationsmodus und den Abgleich mit gängigen MS/MS-Datenbanken, konnten so 440 Lipide identifiziert werden [176-178]. Die MS/MS-Spektren bieten auch Hinweise für die Identifizierung noch unbekannter Metaboliten. Die Hinweise sind allerdings meistens nicht ausreichend für eine vollständige Charakterisierung der Molekülstruktur, sodass diese mittels Kernresonanzspektroskopie weiter untersucht werden könnten [300].

### 4.5 Auswertung komplexer Datensätze

Eine der größten Herausforderungen im Bereich der untargeted Methoden ist die Datenauswertung. Aufgrund der sehr hohen Analytizahl sind die Auswertungen hochkomplex und besonders heikel beim untargeted Lipidomics-Screening. Es stehen eine Vielzahl statistischer und maschinengestützter Verfahren zur Auswahl. Dabei kann das geeignetste Verfahren nicht vorhergesagt werden. Sowohl bei der Untersuchung des Lipidprofils bei Entzündung als auch in der Präanalytik, hat sich die parallele semi-targeted und untargeted Auswertung als vorteilhaft erwiesen, da für die Interpretation der Ergebnisse die Kombination aus veränderten und unveränderten Lipidspezies relevant war. So konnte z.B. ein unterschiedliches Ansprechen der Etherlipide mit einem Hexadecenyl-Rest im Vergleich zu den restlichen Etherlipiden auf eine LPS- bzw. Zymosan-Stimulation festgestellt werden.

Für die erste Prozessierung der untargeted Daten und die semi-targeted Auswertung konnten mit der Software von Sciex (MarkerView, MasterView und MultiQuant) akzeptable Ergebnisse erzielt werden. Die Möglichkeiten für die weitere statistische Auswertung sind allerdings sehr begrenzt. Mit MarkerView können *t*-Tests und eine PCA durchgeführt werden. Es gibt keine Möglichkeit eine  $\alpha$ -Fehler-Korrektur, nicht-parametrische Tests sowie univariate Tests für mehrere Gruppen durchzuführen. Zur Identifizierung für die Gruppentrennung relevanter Analyten kann eine PCA mit Diskriminantenanalyse durchgeführt werden. Allerdings hat dieses Verfahren die Einschränkung, dass es mehr Beobachtungen (Proben) als Variablen (Analyten bzw. Signale) geben muss, bei untargeted Auswertungen wird diese Anforderung fast nie erreicht [301]. Außerdem gibt es keine Möglichkeit zur Modell-Validierung, sodass dieses Verfahren statistisch unzureichend abgesichert ist. Die kommerzielle Software SIMCA (Umetrics, Malmö, Schweden) bietet verschiedenste Verfahren zur multivariaten Auswertung und zur Überprüfung der Modelle, unterstützt jedoch nicht eine univariate Auswertung. Für die univariate Auswertung gibt es eine ganze Reihe von kommerziellen Statistik-Programmen, z.B. GraphPad (GraphPad Software, San Diego, USA), die über verschiedenste univariate und teils auch multivariate Testverfahren verfügen und einen sogar bei der Auswahl des geeigneten Testverfahrens unterstützen. Diese sind vornehmlich für die Auswertung einiger weniger Analyten ausgelegt und haben bei mehreren Analyten eine entsprechend lange Rechenzeit, sodass sie für die untargeted Auswertung mit mehr als 3.000 Signalen i.d.R. ungeeignet sind. Deshalb wurde nach anderen Möglichkeiten für eine schnelle univariate Auswertung von Datensätzen mit vielen Analyten gesucht.

Eine umfangreiche Auswahl statistischer Verfahren und ausreichende Rechenkapazitäten für die Auswertung von Metabolomics- bzw. Lipidomics-Datensätzen bietet MetaboAnalyst [231]. Die untargeted Peaklisten aus der MarkerView Software müssen allerdings vorher umgeformt und Signale, die von Isotopen oder dem LC-System stammen, entfernt werden. Die Auswertung mit MetaboAnalyst ist servergestützt, sodass der Zugang während der kompletten Auswertung gewährleistet werden muss und der Datenschutz u.U. eingeschränkt ist. Aus diesen Gründen wurde

ein vorgefertigter Arbeitsablauf mit einem R Skript entwickelt, für den die Peaklisten aus MarkerView nahezu unverändert in Excel gespeichert und anschließend halbautomatisch ausgewertet werden können. Vorher sollte lediglich aus den  $m/z$  und RT Werten ein eindeutigerer Peakname erzeugt werden. Das Skript ermöglicht eine gleichzeitige Auswertung mit verschiedenen univariaten Testverfahren und fasst die Ergebnisse in einer Übersicht zusammen, sodass die Unterschiede zwischen den Gruppen schnell erfasst werden können. Vorteilhaft sind dabei v.a. die Möglichkeit mehrere Teildatensätze gleichzeitig auszuwerten sowie die automatische Dokumentation der Ergebnisse. Damit ist die Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse auch zu einem späteren Zeitpunkt gewährleistet, ohne zeitlichen Mehraufwand. Die Auswertung per R Skript ist zudem schneller als mit MetaboAnalyst und teilweise auch zuverlässiger, da voreingestellte Funktionen bei MetaboAnalyst die durchgeführte Testauswertung beeinträchtigt haben.

Des Weiteren wurden R Skripte entwickelt, mit denen fehlende Werte ersetzt und die Verteilung der Daten für die einzelnen Analyten untersucht werden können. Diese bieten eine schnelle graphische Darstellung als Vorbereitung für eine intensivere Datenauswertung. Eine Voraussetzung für die Datenauswertung ist die Wahl eines geeigneten Normalisierungsverfahrens, mit dem Messabweichungen reduziert werden und dabei biologische Unterschiede erhalten bleiben. Es konnte gezeigt werden, dass bei der entwickelten Methode die internen Standards nicht unbedingt für die Normalisierung der Daten benötigt werden. Zu Beginn dieser Arbeit ohne IS durchgeführte Studien haben dennoch vorkommende biologische Unterschiede aufgedeckt [302, 303]. Unterschiedliche Matrixeffekte, Gerätefehler oder die Änderung vieler abundanter Lipide lassen sich nicht vorhersagen, die Funktion einiger Normalisierungsverfahren kann dadurch allerdings beeinträchtigt werden [304]. Wenn viele v.a. der abundanteren Lipide zwischen den Gruppen verändert sind, kann z.B. die Normalisierung der restlichen Analyten mit dem MPR fehlschlagen, was bei den untersuchten Proben nicht der Fall war [304]. Zudem ist die Normalisierung mit dem MPR robuster gegen solche Änderungen als beispielsweise die Normalisierung mit dem Totalionenstrom [304]. Die Verwendung von IS ist vorteilhaft, denn sie können zur Überprüfung der Qualität der Normalisierung verwendet werden, da signifikante Unterschiede bei den IS Signalen auf systematische Abweichungen hinweisen [226]. Die IS tragen auch zur Qualität der Ergebnisse bei, indem sie den Vergleich bei verschiedenen Messzeitpunkten erleichtern und die Überprüfung der Messergebnisse im Rahmen einer Kontrollkarte ermöglichen [233]. Die Verwendung einiger weniger IS zur Normalisierung vieler Analyten (untargeted Auswertung) kann allerdings problematisch sein, falls Analyten sich bei der Ionisierung anders als der IS verhalten. Das Fehlerpotential konnte verringert werden, indem mehrere IS verwendet wurden [226]. Bei dieser Untersuchung wurden 19 IS aus unterschiedlichen Lipidklassen verwendet, die basierend auf dem SPLASH II Lipidomix Mix von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) ausgewählt und erweitert wurden. Dadurch sollte die Normalisierung mit dem MW IS stabil bleiben.

### 4.6 Relative Quantifizierung von Lipiden

Mit der entwickelten Methode konnten 440 Lipide aus über 15 Lipidklassen in humanem Plasma identifiziert und damit ein umfassendes Bild des Lipidoms erzeugt werden. Die Nachweisgrenze wurde dabei vorwiegend durch den begrenzten linearen dynamischen Bereich von ungefähr  $10^4$  bis  $10^5$  bei QTOF-Geräten bestimmt. Gemäß Literatur kommen die Lipide in humanen Blutproben in Konzentrationen von ungefähr 0,04 pmol/mL (PGE<sub>2</sub>) bis 0,8 µmol/mL (freies Cholesterol) vor [18]. Um eine Gerätekontamination zu vermeiden, musste die Methode an die abundanteren Lipide angepasst werden. Dadurch waren Analyten, wie die Prostaglandine, die physiologisch meistens im Bereich des LLOQ von quantitativen Methoden enthalten sind, nicht detektierbar. Dennoch können über die abundanteren Vorstufen, wie die Arachidonsäure, Hinweise auf Veränderungen der entsprechenden Stoffwechselwege erhalten werden. Die Metaboliten können anschließend mit targeted Methoden und angepassten Extraktionsmethoden quantifiziert werden. Die Anzahl und Art der detektierten Lipide war abhängig von der untersuchten Probenart, z.B. konnten in Zellproben deutlich mehr PS detektiert werden, da diese relativ zur Gesamtheit der Lipide in höheren Konzentrationen vorkamen. In den analysierten Mauspfoten waren die Prostaglandine so stark erhöht, dass deutliche Signale erkennbar waren. Die Methode wurde überwiegend mit Plasmaproben entwickelt, die einen relativ hohen Gesamt-Lipidgehalt haben. Ein Volumen von 20 µL Plasma war ausreichend für die entwickelte Applikation. Allerdings konnte die Konzentration aufgrund des Lipidgehalts und der Empfindlichkeit des MS-Gerätes deutlich reduziert werden, sodass nur 2 bzw. 5 µL der 1:12 verdünnten Probe injiziert wurden. Für Proben mit einem geringeren Lipidgehalt, z.B. Zellüberstände, bestehen mehrere Möglichkeiten, die aufzukonzentrieren. So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Probenvolumina möglich sind, sofern das Verhältnis von wässriger Phase zu MTBE und Methanol konstant bleibt, ggf. kann die komplette wässrige Phase durch Probe ersetzt werden. Auch das Volumen des Aufnahmemediums kann verringert und das Injektionsvolumen auf bis zu 10 µL erhöht werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die meisten Analyten bei Verdünnung linear verhalten und somit ein semi-quantitativer Vergleich der Proben möglich ist. Im Gegensatz zur Quantifizierung, können mit semi-quantitativen Methoden keine absoluten Unterschiede zwischen den Proben analysiert werden. Dennoch können Tendenzen, wie z.B. die Erhöhung eines Lipids oder einer Lipidklasse im Rahmen einer Erkrankung, erfasst werden. In vielen Fällen ist die relative Änderung der Lipidkonzentration bereits ausreichend, um Unterschiede bei Krankheiten festzustellen. Eine Einschränkung des semi-quantitativen Vergleichs ist allerdings, dass häufig Unterschiede in der Suppression und Ionisierungseffizienz unzureichend kompensiert werden [296]. Bei der entwickelten Methode wurde ein IS pro Lipidklasse eingesetzt, um die Effekte auszugleichen, für eine exaktere Quantifizierung mittels RPLC werden hingegen zwei oder mehr IS pro Lipidklasse empfohlen [241, 296]. Bei einem Lipidomics-Screening wären das mehr als 40 IS und mit entsprechend hohen Kosten und Aufwand verbunden. Unabhängig von der Anzahl der IS, ist eine

Bestätigung der Ergebnisse mit quantitativen Methoden sinnvoll. Bei diesen können im Rahmen einer Validierung potenzielle Störfaktoren, z.B. aus der Präanalytik, identifiziert und vermieden werden. Auch wenn eine Validierung der entwickelten Methode ohne Standardlösungen nicht möglich war, wurde die Qualität der Methode mit verschiedenen Verfahren überprüft. So konnte z.B. die Reproduzierbarkeit der Probenaufarbeitung gezeigt werden. Die Untersuchungen zur Wiederfindung, dem Matrixfaktor und der Prozesseffektivität geben Ausschluss über mögliche Störungen, wie die Suppression der TG und SE. Durch den Bezug auf die IS konnten außerdem Kontrollproben aus verschiedenen Messungen direkt miteinander verglichen und somit die Qualität der Methode über den zeitlichen Verlauf sichergestellt werden. Die angestrebte RSD von 20% bei den Kontrollproben konnte mit der entwickelten Methode für die meisten Analyten eingehalten werden. Die größere Unsicherheit könnte u.a. mit der, im Vergleich zu quantitativen Methoden, geringeren Anzahl an IS und der zuvor beschriebenen Problematik mit unterschiedlichen Matrixeffekten durch die chromatographische Trennung zusammenhängen. Auch die Instabilität einiger Analyten bei der Lagerung kann nicht ausgeschlossen werden. Dennoch können mit der entwickelten Methode Studien von verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden. Auf einen geeigneten Versuchsaufbau mit einer randomisierten Messreihenfolge von Kontroll- und Testgruppen innerhalb der Einzelläufe ist dabei zu achten.

Es konnte gezeigt werden, dass untargeted Screening-Methoden, wie der eigens entwickelten, ein sehr komplexes und unvoreingenommenes Bild des Lipidoms erzeugen. Damit können neue Hypothesen und Fragestellungen entwickelt werden, wie z.B. die Rolle der Ether-Lipide im Entzündungsprozess. Es können aber auch ergänzend zu gezielten Quantifizierungen komplementäre Daten erzeugt und somit bestehende Hypothesen in einem breiteren Kontext bestätigt werden. So konnte ein Zusammenhang mit erhöhten Ceramid- und Triglycerid-Konzentrationen bei Patienten mit Depressionen und bipolarer Störung gezeigt werden [302]. Lipidomics-Screening-Methoden leisten dementsprechend einen wichtigen Beitrag zur modernen medizinischen Forschung, bei der das Gesamtprofil der Patienten in den Vordergrund rückt, unterstützt durch komplementäre Daten aus dem Bereich der Metabolomics, Proteomics sowie klinischen Markern [305-307]. Mit der entwickelten Methode können potenzielle Biomarker identifiziert werden, wie z.B. die Ether-Lipide für entzündetes Gewebe. In weiteren umfangreichen Untersuchungen können so identifizierte Biomarker-Kandidaten qualifiziert und in der medizinischen Praxis implementiert werden [308].

# 5 Zusammenfassung

Die Aufdeckung krankheitsbedingter Unterschiede und die Identifizierung neuer Biomarker sind essenziell für Diagnose und Behandlung verschiedener Erkrankungen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Screening-Methode zur untargeted Untersuchung des Lipidoms in biologischen Proben entwickelt. Durch die Kombination aus Umkehrphasenchromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie mit datenabhängiger Aufnahme von MS/MS-Spektren konnten in Humanplasma 440 Lipide aus mehr als 15 Lipidklassen identifiziert werden. Die vorgestellte Methode ermöglicht damit einen umfassenden Einblick in den Lipid-Stoffwechsel. Durch die chromatographische Auftrennung von Isomeren und Isobaren in Kombination mit einer mehrstufigen Identifizierung, erfolgte die Identifizierung der Analyten mit hoher Selektivität.

Der Probendurchsatz wurde erhöht, um den Einsatz der Methode im Rahmen größerer klinischer Studien zu ermöglichen und vorhandener Ressourcen effizient einzusetzen. Dabei wurden die Inkubationszeiten während der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit MTBE:Methanol deutlich reduziert und die Handhabung vereinfacht bei gleichbleibend hoher Wiederfindung. Der hohe Probendurchsatz wird weiter unterstützt durch die kurze chromatographische Laufzeit von 17 min pro Ionisationsmodus. Der Arbeitsablauf zur univariaten Auswertung wurde außerdem durch Entwicklung von R Skripten vereinfacht und beschleunigt.

Die Qualität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind essenziell. Aus diesem Grund wurde die Qualität der entwickelten Methode, angelehnt an den strikten Vorgaben der FDA und EMA zur Validierung von quantitativen Methoden, sichergestellt, obwohl eine Methodenüberprüfung im Bereich von untargeted Methoden nicht verbreitet ist. Die Reproduzierbarkeit der relativen Lipidkonzentrationen konnte z.B. durch die Messung von Kontrollplasmaproben über einen Zeitraum von 10 Monaten gezeigt werden. Anhand einer Studie zur präanalytischen Stabilität humaner Blutproben konnte ein Protokoll zur Probennahme und -vorbereitung für weitere klinische Studien erarbeitet werden. Die Stabilität des Lipidoms in Vollblut und Plasma konnte durch den Einsatz von Natriumfluorid/Citrat als Antikoagulans verbessert werden. Es wurden 16 verschiedene Probenarten analysiert, darunter Plasmaproben, verschiedene Mausgewebe und Zellpellets.

Die entwickelte Methode wurde erfolgreich für die Untersuchung verschiedener Erkrankungen angewendet. So wurden u.a. Unterschiede im Lipidprofil von Patienten mit Colitis ulcerosa in verschiedenen Stadien analysiert. Des Weiteren konnten Patienten mit Depressionen oder bipolarer Störung anhand ihrer Plasmakonzentrationen an Ceramiden und Triglyceriden von gesunden Probanden unterschieden werden. Bei der Untersuchung des Lipidoms in Mauspfoten nach Induktion einer Entzündung durch LPS bzw. Zymosan-Injektion wurden die Ether-Phosphatidylcholine als potenzielle Entzündungsmarker identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wird demnach eine schnelle, reproduzierbare und vor allem selektive LC-MS-Screening-Methode vorgestellt, die Veränderungen des Lipidstoffwechsels aufdecken und potenzielle Biomarker identifizieren kann.

## 6 Publikationen

1. **L. Hahnefeld**, R. Gurke, D. Thomas, Y. Schreiber, S.M.G. Schafer, S. Trautmann, I.F. Snodgrass, D. Kratz, G. Geisslinger, N. Ferreiros, Implementation of lipidomics in clinical routine: Can fluoride/citrate blood sampling tubes improve preanalytical stability?, *Talanta* 209 (2020) 120593.
2. S. Bazarganipour, J. Hausmann, S. Oertel, K. El-Hindi, S. Brachtendorf, I. Blumenstein, A. Kubesch, K. Sprinzi, K. Birod, **L. Hahnefeld**, S. Trautmann, D. Thomas, E. Herrmann, G. Geisslinger, S. Schiffmann, S. Grösch, The Lipid Status in Patients with Ulcerative Colitis: Sphingolipids are Disease-Dependent Regulated, *Journal of Clinical Medicine* 8(7) (2019) 971.
3. N. Brunkhorst-Kanaan, K. Klatt-Schreiner, J. Hackel, K. Schroter, S. Trautmann, **L. Hahnefeld**, S. Wicker, A. Reif, D. Thomas, G. Geisslinger, S. Kittel-Schneider, I. Tegeder, Targeted lipidomics reveal derangement of ceramides in major depression and bipolar disorder, *Metabolism* 95 (2019) 65-76.
4. J. Cohnen, L. Kornstädt, **L. Hahnefeld**, N. Ferreiros, S. Pierre, U. Koehl, T. Deller, G. Geisslinger and K. Scholich, Tumors Provoke Inflammation and Perineural Microlesions at Adjacent Peripheral Nerves, *Cells* 9(320) (2020).
5. K. Klatt-Schreiner and L. Valek, Y. Kang, A. Khlebtovsky, S. Trautmann, **L. Hahnefeld**, Y. Schreiber, R. Gurke, D. Thomas, A. Wilken-Schmitz, S. Wicker, G. Auburger, G. Geisslinger, J. Lötsch, W. Pfeilschifter, R. Djaldetti, I. Tegeder, High glucosylceramides and anandamide deficiency contribute to sensory loss and pain in Parkinson's Disease, *Movement Disorders*, submitted 2020
6. V. Rimola, **L. Hahnefeld**, J. Zhao, C. Jiang, C. Angioni, Y. Schreiber, T. Osthues, S. Pierre, G. Geisslinger, R. Ji, K. Scholich and M. Sisignano, Lysophospholipids contribute to oxaliplatin-induced acute peripheral pain, *The Journal of Neuroscience*, submitted 2020
7. **L. Hahnefeld**, L. Gruber, N. Schoemel, C. Fischer, P. Mattjus, R. Gurke, M. Beretta, N. Ferreiros, G. Geisslinger, M. Wegner, Analysis of the lipid profile of breast cancer cells with differing estrogen receptor status, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, submitted 2020



## 7 Wissenschaftliche Kooperationen

Sofern nicht anderweitig durch Bezugnahme oder Anerkennung angegeben, wurde die vorgelegte Arbeit von mir selbst unter der Aufsicht meiner wissenschaftlichen Betreuerin, PD Dr. Nerea Ferreirós Bouzas, während meiner Promotion erstellt. Alle Beiträge von Kollegen werden in dieser Arbeit ausdrücklich erwähnt. Zur Anwendung der Methode auf verschiedene biologische Matrices wurden von Kollegen Proben bereitgestellt. Die Namen und Beiträge beteiligter Kollegen sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Auf jede aufgeführte Abbildung, Tabelle sowie Text bzw. Textpassage, die aus einer Publikation entnommen wurde, wird in der These explizit unter der Quellenangabe hingewiesen. Entnommene und veränderte Referenzen wurden mit dem Vermerk „modifiziert nach“ und der Angabe der Quelle versehen.

Tabelle 30: Namen und Beiträge von Kollegen und Kooperationspartnern.  
Die Zugehörigkeiten werden in der Fußnote angegeben.

<b>Name</b>	<b>Beitrag zu dieser Arbeit</b>
Prof. Dr. Klaus Scholich <sup>1,2</sup> Dr. Sandra Pierre <sup>1</sup>	Planung und Durchführung des tierexperimentellen Teils der Untersuchung der LPS/Zyosan-Entzündungsmodelle in Mäusen
Dr. Marthe-Susanna Wegner <sup>1</sup>	Bereitstellung der MCF-7-Zellproben und Untersuchung von deren Stabilität in der Zellkultur
Dr. Sandra Pierre <sup>1</sup> Dr. Christine Altmann <sup>1</sup> Jennifer Cohnen <sup>1</sup> Vittoria Rimola <sup>1</sup> Katja Schmitz <sup>1</sup>	Bereitstellung diverser biologischer Probenmaterialien (siehe Abschnitt 2.3)
Dr. Semra Etyemez <sup>3</sup> Sandra Trautmann <sup>1</sup>	Bereitstellung des Testdatensatzes 1 zur Überprüfung geeigneter Verfahren zum Ersetzen von Werten unterhalb des Detektionslimits
Daniel Kratz <sup>1</sup>	Proteinbestimmung mittels Bradford-Test
Carlo Angioni <sup>1</sup>	Quantifizierung der Prostaglandine in den Mauspfoten (Daten nicht gezeigt, aber in der Diskussion erwähnt)
Dr. Stephan M. G. Schäfer <sup>2</sup>	Blutentnahme für die Untersuchung der präanalytischen Stabilität der Lipide in Plasma und Vollblut

<sup>1</sup> Institut für klinische Pharmakologie, Goethe-Universität Frankfurt a. M.

<sup>2</sup> Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Projektgruppe für Translationale Medizin und Pharmakologie TMP, Frankfurt a.M.

<sup>3</sup> Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Universitätsklinikum Frankfurt a. M.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungen

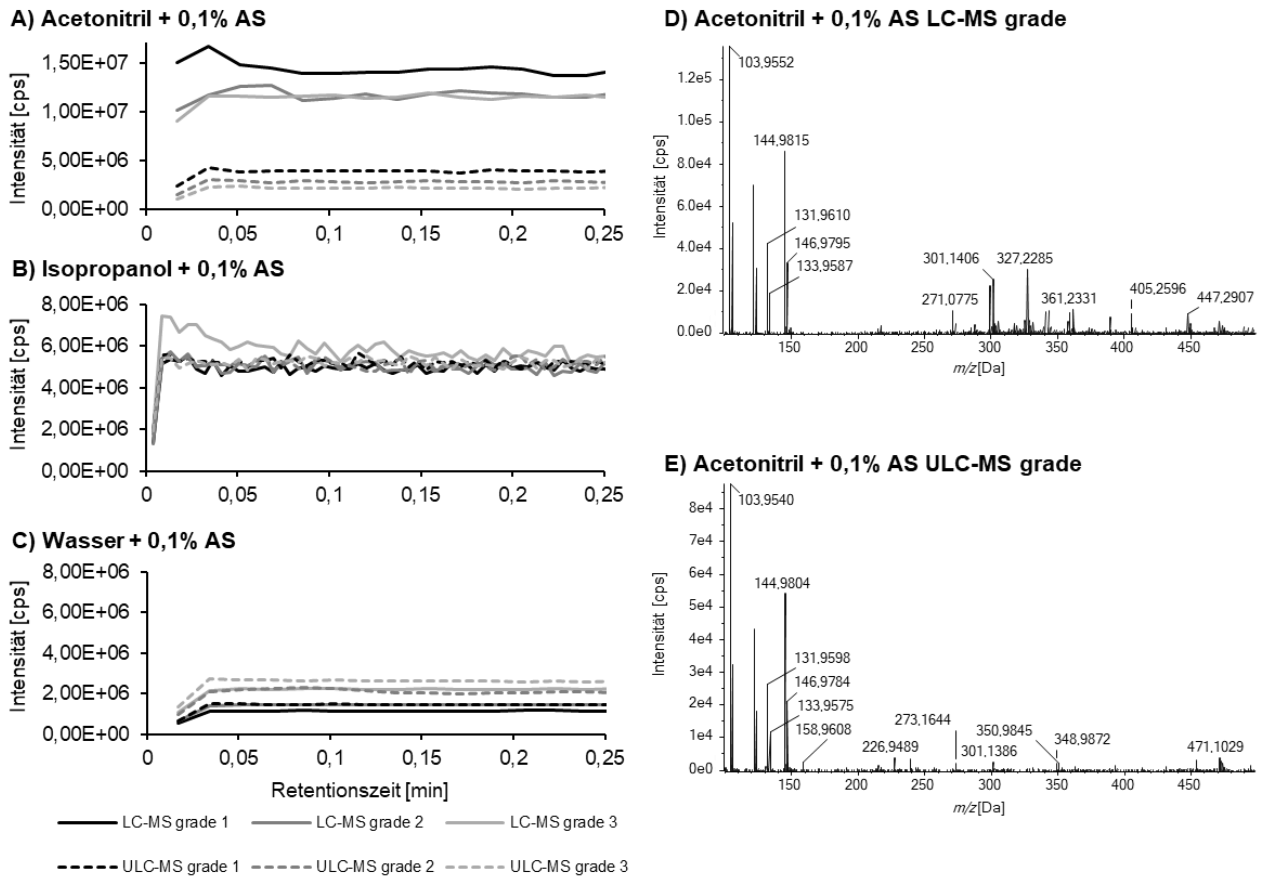


Abbildung 54: Vergleich verschiedener Fließmittelqualitäten.

Die LC-MS bzw. ULC-MS grade Lösungsmittel wurden mit 0,1% Ameisensäure (AS) versetzt und der Totalionenstrom im MS-Scan von 100–2000  $m/z$  verglichen (A–C). Die Akkumulationszeit betrug bei der Messung von ACN und Wasser 1000 ms und bei der Messung von Isopropanol 250 ms, daher ist die Kurvenglättung unterschiedlich. Bei Acetonitril waren im Gegensatz zu Isopropanol und Wasser deutliche Unterschiede durch die Fließmittelqualität erkennbar. Im MS-Spektrum waren im Bereich von 100–500  $m/z$  bei dem LC-MS grade Acetonitril zusätzliche Signale erkennbar und die Signalintensität war erhöht (D+E).

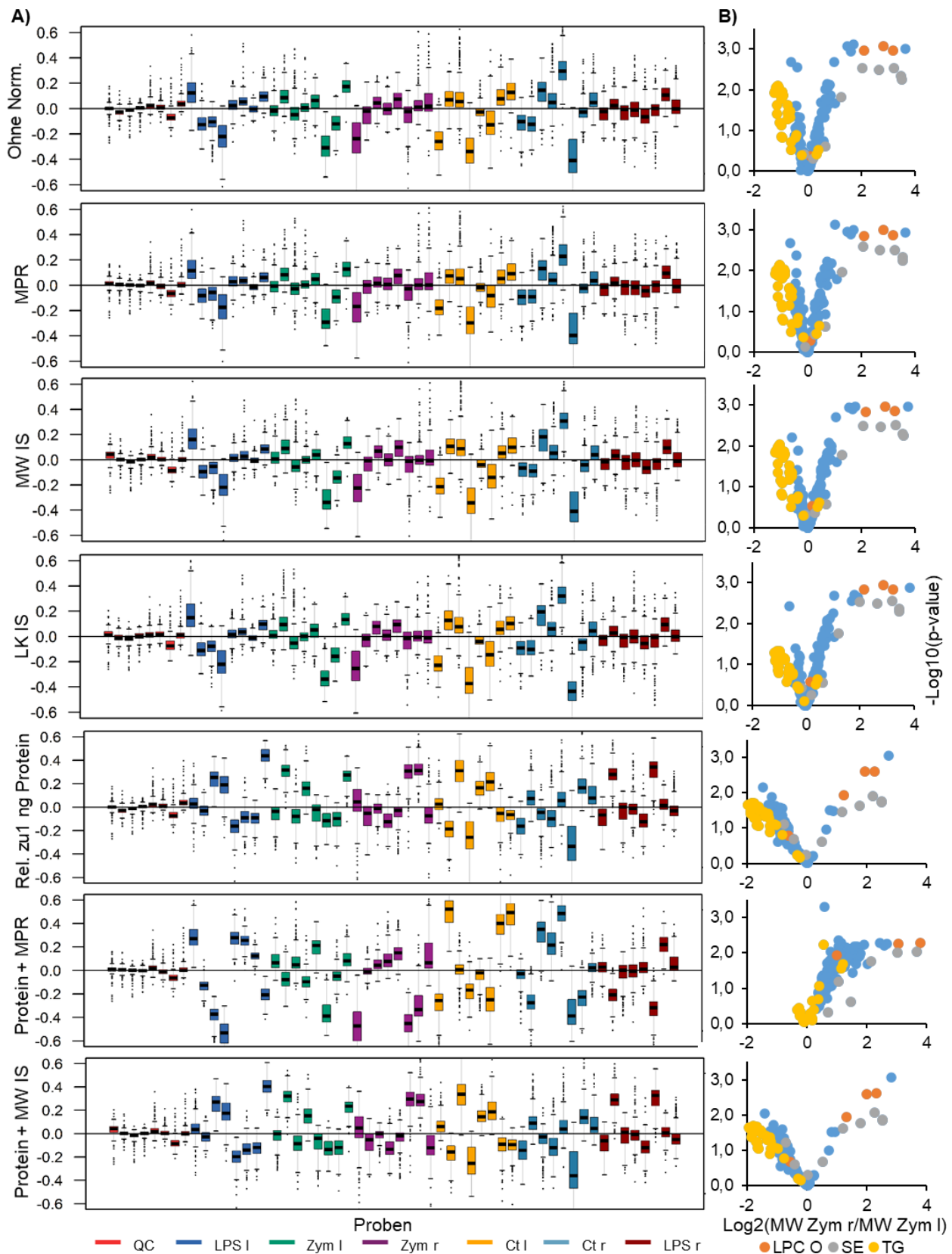


Abbildung 55: Verschiedene Normalisierungsverfahren nach der Injektion von LPS/Zymosan in Mauspfoten. Die Varianz innerhalb der Gruppen wird in den RLA-Graphen (A) und die Auswirkung der Normalisierung auf die Interpretation der Daten wird in den Volcano Graphen (B) dargestellt. Die Normalisierung erfolgte mit dem median peak ratio (MPR), mit dem Mittelwert mehrerer IS (MW IS), mit einem IS pro Lipidklasse, mit dem Proteingehalt sowie mit einer Kombination aus dem Proteingehalt und den anderen Verfahren. (B) zeigt den Unterschied zwischen den Pfoten mit Zymosan (r) und den anderen unbehandelten Pfoten (l). Für eine bessere Übersichtlichkeit sind einige Lipidklassen hervorgehoben (gepaarter  $t$ -Test,  $n=8$ ).

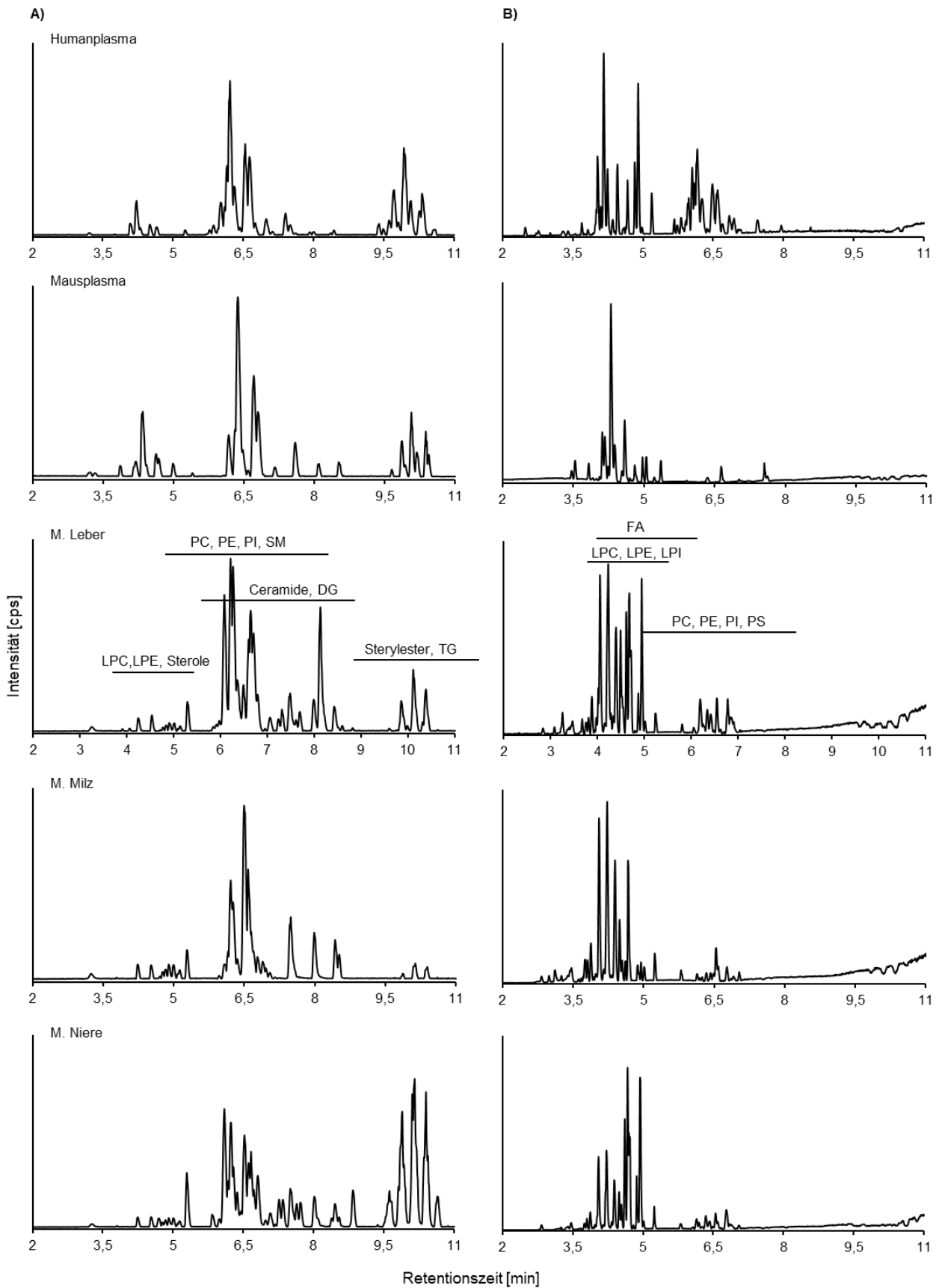


Abbildung 56: Übersicht verschiedener Lipidprofile Teil 1. Abgebildet sind die Basispeak-Chromatogramme (BPC) verschiedener Matrices im positiven (A) und negativen Ionisationsmodus (B) (100–1000  $m/z$ , Toleranz 10 mDa). Bei dem BPC der Leber sind zudem die Retentionszeiten der verschiedenen Lipidklassen eingezeichnet, die auch für die anderen Matrices gültig sind. M = Maus.

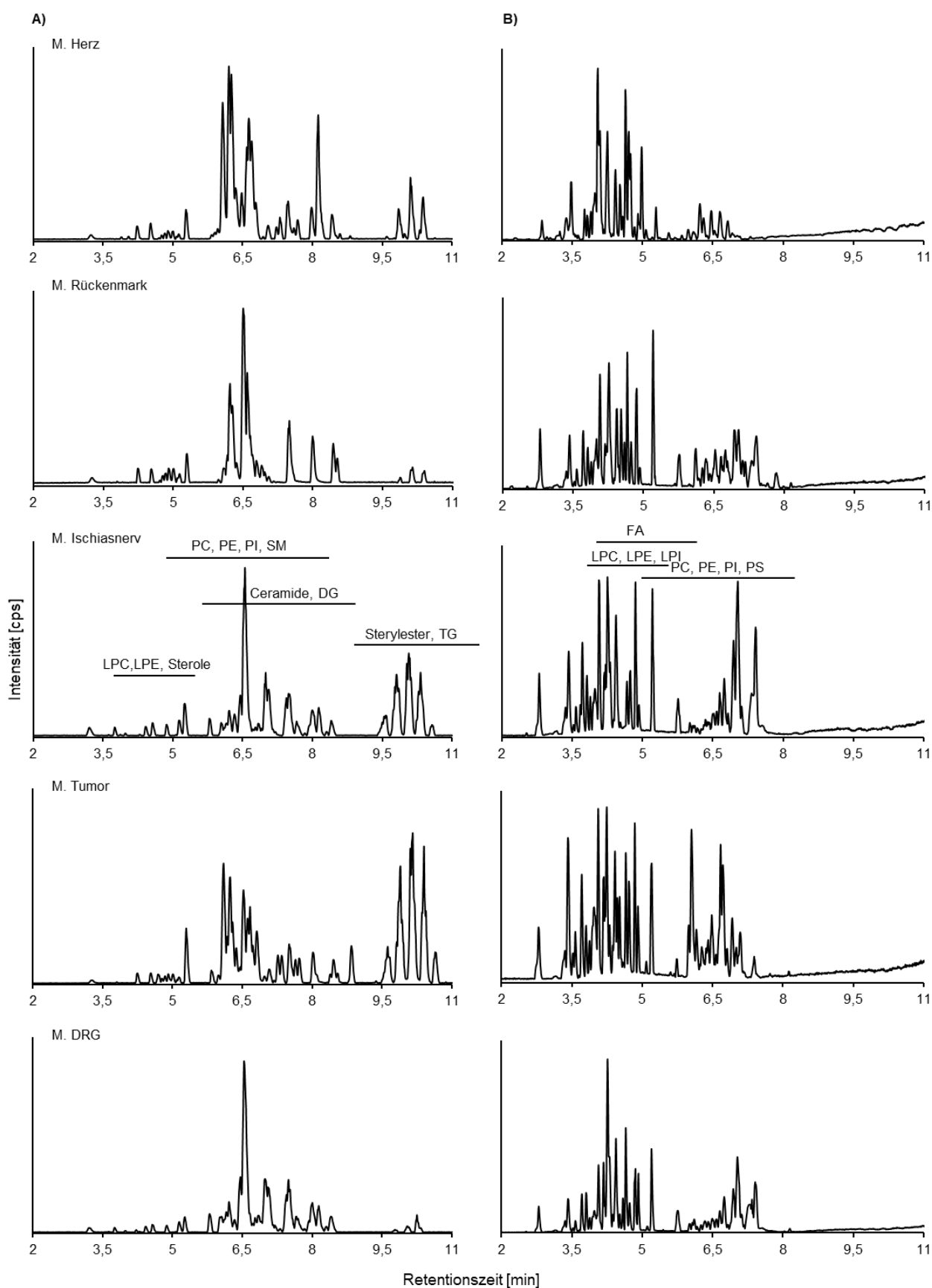


Abbildung 57: Übersicht verschiedener Lipidprofile Teil 2.

Abgebildet sind die Basispeak-Chromatogramme (BPC) verschiedener Matrices im positiven (A) und negativen Ionisationsmodus (B) (100–1000  $m/z$ , Toleranz 10 mDa). Bei dem BPC des Ischiasnerven sind zudem die Retentionszeiten der verschiedenen Lipidklassen eingezeichnet, die auch für die anderen Matrices gültig sind. M = Maus.

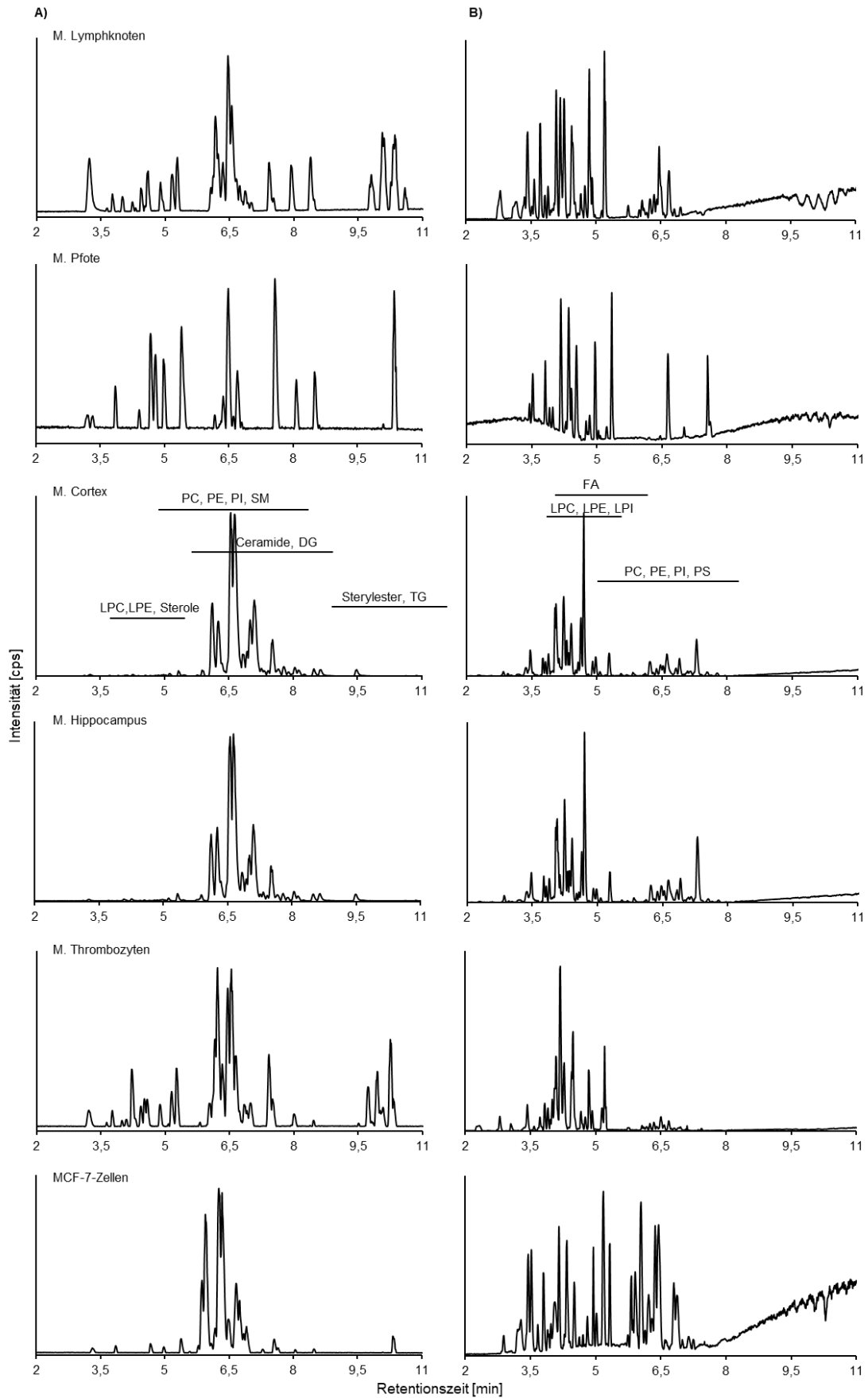


Abbildung 58: Übersicht verschiedener Lipidprofile Teil 3.

Abgebildet sind die Basispeak-Chromatogramme (BPC) verschiedener Matrices im positiven (A) und negativen Ionisationsmodus (B) (100–1000  $m/z$ , Toleranz 10 mDa). Bei dem BPC des Cortex sind zudem die Retentionszeiten der verschiedenen Lipidklassen eingezeichnet, die auch für die anderen Matrices gültig sind. M = Maus.

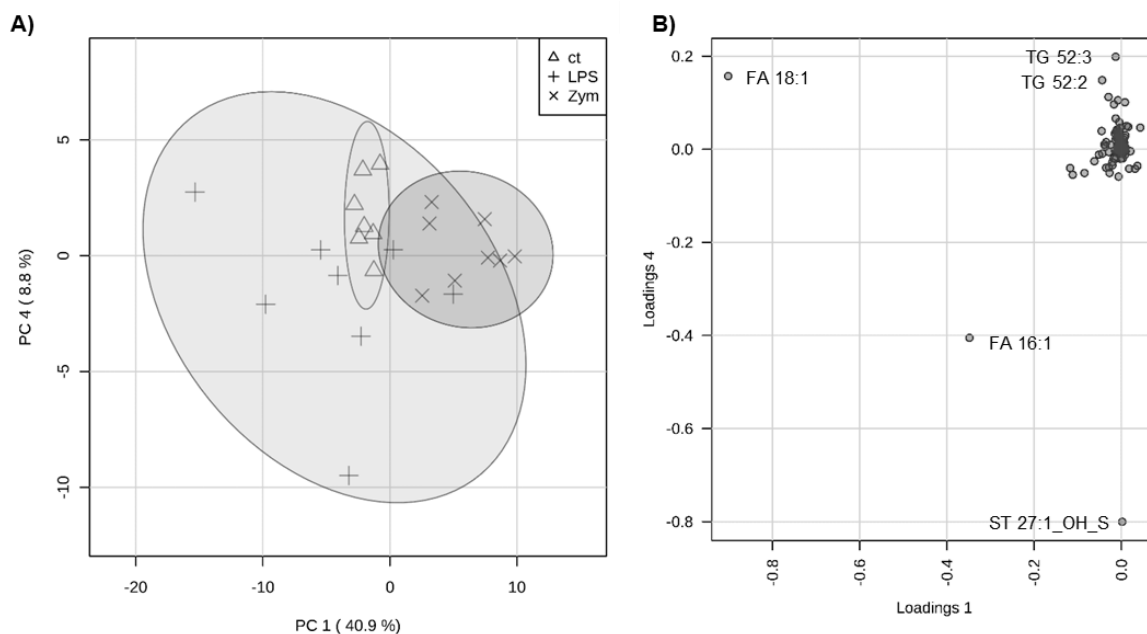


Abbildung 59: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Plasmalipide in mit Zymosan-, LPS- oder unbehandelten Mäusen (n=7 bis 8).

## 8.2 R Skripte

Nachfolgend ist der Quellcode der verwendeten Skripte für die Software R aufgeführt. Dieser kann in ein R Skript kopiert und ausgeführt werden. Dabei müssen einige Werte wie der Dateiname auf die jeweilige Auswertung angepasst werden. Mit „#“ gekennzeichnete Zeilen sind Kommentare und werden nicht ausgeführt. Die „libraries“ müssen vor der ersten Anwendung in R installiert werden (z.B. `install.packages(„dplyr“)`).

### 8.2.1 Ersetzen von fehlenden Werten

```
library(dplyr)
library(Amelia)
library(DMwR) # für kNN
library(caret) # für Korrelationen
library(reshape2)
library(gridExtra)
library(xlsx)
```

```
***** Ersetzen von fehlenden Werten bei linkszensierten Daten *****
# mit dem folgenden Skript können Datensätze auf fehlende Daten überprüft
# und ggf. mit verschiedenen Methoden ersetzt werden
# dabei wird davon ausgegangen, dass die Daten linkszensiert sind,
# d.h. dass alle fehlenden Werte kleiner sind als die vorhandenen Werte
# fehlende Werte sind z.B. kleiner als das lowest-limit of quantification oder kleiner als das Signal in einer extrahierten
# Leerprobe
# das folgende Skript ist nicht geeignet um zufällig fehlende Werte zu ersetzen (Ausnahme Median und kNN)
# für kNN sollten die Daten skaliert werden
# für amelia dürfen die Variablen bzw. Analyten nicht korreliert sein
# für amelia sollten nicht mehr als 20 Analyten gleichzeitig ersetzt werden, u.U. noch weniger
# der Datensatz darf nicht-numerische Spalten, wie z.B. Gruppenbezeichnungen enthalten
```

## Anhang

---

```
# bei allen Spalten, die Zahlen enthalten, werden fehlende Werte ersetzt -> sollten nur Analyten sein
# Die Proben sollten in den Zeilen und die Analyten in den Spalten stehen
# Die Gruppeneinteilung sollte in einer Spalte "Group" stehen

##### Daten einlesen #####
# Beispieldaten 1 Lipid Quantifizierung in humanem Plasma
dg = read.csv("Test LLOQ1 quant Semra.csv",sep=",",header = T)
Studie = "Testsatz 1"
dg= dg[-95,] # letzte Zeile sind die echten LLOQ Werte
dg[,1:8] = lapply(dg[,1:8],factor) # alle nicht Analytspalten als Faktor
dg= dg[,c(1:29)] # es dürfen nur wenige Variablen und keine starken Korrelationen in den Daten vorkommen

# Beispieldaten 2 Peakfläche zu IS Verhältnis einiger Lipide in Mauspfoten
dg = read.csv("Test LLOQ2 areaIS LPS paw.csv",sep=",",header = T)
Studie = "Testsatz 2"

# Beispieldaten 3 Peakfläche einiger Lipide in Mauspfoten
dg = read.csv("Test LLOQ3 Area Zellen.csv",sep=",",header = T)
Studie = "Testsatz 3"

##### Daten bearbeiten #####
Datum <- gsub("-", " ",as.character(Sys.Date()))
# nicht-numerische Spalten
non.num= colnames(Filter(is.factor,dg))
# numerischen Spalten (werden weiterverwendet)
dg.num = dg[,setdiff(colnames(dg),non.num)]
erklv = c(1:ncol(dg.num))
dg.lim = dg.num
lim = ""

##### Überprüfen auf fehlende Werte #####
# Überprüfen auf fehlende Werte
anyNA(dg)
cat("\ Der Datensatz hat ", length(colSums(is.na(dg))[(colSums(is.na(dg)) >0) == TRUE]),
    " Spalten mit fehlenden Werten.", sep = "")
names(colSums(is.na(dg))[(colSums(is.na(dg)) >0) == TRUE])

#überprüfen auf > 20% fehlende Werte
cat("\ Der Datensatz hat ", length(colSums(is.na(dg))[(colSums(is.na(dg)) >(0.2*nrow(dg))) == TRUE]),
    " Spalte(n) mit > 20% fehlenden Werten.", sep = "")
names(colSums(is.na(dg))[(colSums(is.na(dg)) >(0.2*nrow(dg))) == TRUE])

##### Testdaten generieren #####
# zum Testen der verschiedenen Methoden werden nur Analyten analysiert, bei denen alle Werte vorhanden sind
# diese werden dann durch einen höheres lowest limit of quantification künstlich linkszensiert
# die ersetzten Daten werden anschließend mit den echten Werten verglichen

# Spalten mit "echten" fehlenden Werten entfernen
dg.num = dg.num[,colSums(is.na(dg.num)) == 0]
# neue Spaltennummern
erklv = c(1:ncol(dg.num))

##### Korrelationen #####
# --> bei Amelia dürfen die Analyten nicht zu stark miteinander korrelieren
# betrachtet die Absolutwerte der Korrelationen bei paarweisen Vergleichen
# bei zwei Variablen mit hoher Korrelation wird der Mittelwert der absoluten Korrelation betrachtet jeder Variable betrachtet
# die Variable mit der größten mittleren Korrelation wird entfernt
```



```

CorrCut = 0.9 # Korrelationswert, ab dem Analyten entfernt werden
set.seed(1000)
korrelationen = cor (dg.num)
# problematisch mit fehlenden Werten
hc=findCorrelation(korrelationen,cutoff=CorrCut, verbose=FALSE,names=FALSE,exact=TRUE)
length(hc)
findCorrelation(korrelationen,cutoff=CorrCut, verbose=FALSE,names=TRUE,exact=TRUE)
hc = sort(hc)
hc = hc+1
dg.num <- dg.num[,-c(hc)]
erklv = c(1:ncol(dg.num))

# ggf. Korrelationsdaten abspeichern
#write.csv(korrelationen,paste(c(Studie,"_korr_", Datum,".csv"),collapse = ""))

# Beispieldaten 2 immer noch zu viele Analyten
#dg.num = dg.num[,1:10]
#erklv = c(1:ncol(dg.num))

# ***** Werte < Limit entfernen - nur bei Testdaten ausführen *****
# Variablen < Quantil entfernen (neue LLOQ)
# alternativ können die echten LLOQ Werte als Vektor eingesetzt werden
# z.B. wenn fehlende Werte zwischen LLOQ und LOD eingetragen wurden
lim = 0.2
LLOQ = sapply(dg.num,quantile,probs = lim,names=F)
dg.lim = dg.num

ks = 1
for(i in erklv){
  m.ind = as.data.frame(dg.num[,i] < LLOQ[i])
  dg.lim[,i] <- replace(dg.lim[,i],as.numeric(rownames(m.ind)[m.ind == TRUE]), NA)
  #Normalverteilung überprüfen
  if (shapiro.test(dg.num[,i])$p.value < 0.05)
    #Variablen, die durch Transformation normalverteilt werden, können mit ameli-Algorithmus transformiert werden
    {if (shapiro.test(log10(dg.num[,i]))$p.value > 0.05)
      {ks = c(ks, i)}
    }
}
ks = ks[-1]

# ***** Werte ersetzen *****

# ***** fehlende Werte bestimmen *****
m.ind = as.data.frame(is.na(dg.lim))
row.names(m.ind) = c(1:nrow(m.ind)) # Zeilennamen müssen Zahlen sein

# ***** Werte kleiner Limit mit 0 ersetzen *****
dg.null=dg.lim
for(i in erklv){
  dg.null[,i] <- replace(dg.null[,i],as.numeric(rownames(m.ind)[m.ind[,i] == TRUE]), 0)
}

# ***** Werte kleiner Limit mit kleinsten Wert ersetzen *****
dg.min=dg.lim
for(i in erklv){
  dg.min[,i] <- replace(dg.min[,i],as.numeric(rownames(m.ind)[m.ind[,i] == TRUE]), min(dg.min[,i],na.rm = T))
}

```

## Anhang

---

```
# ***** Werte kleiner Limit mit Median ersetzen *****
# cave sollte nicht bei linkszensierten Daten verwendet werden
dg.med=dg.lim
for(i in erklv){
  dg.med[,i] <- replace(dg.med[,i],as.numeric(rownames(m.ind)[m.ind[,i] == TRUE]), median(dg.med[,i],na.rm = T))
}

# ***** Werte kleiner Limit mit LLOQ/2 ersetzen *****
# bei bekanntem LLOQ
dg.half=dg.lim
for(i in erklv){
  dg.half[,i] <- replace(dg.half[,i],as.numeric(rownames(m.ind)[m.ind[,i] == TRUE]), LLOQ[i]/2)
}
# Hälfte des Minimums, bei unbekanntem LLOQ
dg.half=dg.lim
for(i in erklv){
  dg.half[,i] <- replace(dg.half[,i],as.numeric(rownames(m.ind)[m.ind[,i] == TRUE]), min(dg.half[,i],na.rm = T)/2)
}

# ***** Werte kleiner Limit mit k-Nearest Neighbor (kNN) vorhersagen *****
# Werte werden anhand des nächsten Wertes gemäß euclidischer Distanz vorhergesagt
# der komplette Datensatz kann direkt eingegeben werden, aber es sollten keine Werte bei den Gruppenzuordnungen
etc. fehlen
# der Vorteil der kNN Imputation im Gegensatz zu mean/ median/ mode etc. ist, dass die Werte nicht unbedingt zufällig
fehlen müssen
# k gibt die Anzahl verwendeter Nachbarn an, sollte kleiner sein als Proben pro Gruppe
# falls Fehler:"not sufficient complete cases for computing neighbors" angezeigt wird für k = ... verwenden
# -> nrow(dg.lim[setdiff(1:nrow(dg.lim),which(!complete.cases(dg.lim))),])

# knn benötigt Gruppeneinteilung
dg.knn=knnImputation(data.frame(dg.lim,dummy = dg$Group), k = sqrt(nrow(dg)/length(levels(dg$Group))), meth =
'weighAvg')
dg.knn = dg.knn[,-ncol(dg.knn)] # dummy Spalte entfernen

# ***** Werte ersetzen mit Amelia fit *****
# erzeugt m Datensätze bei denen die fehlenden Werte ersetzt wurden,
# wobei die Unterschiede zwischen den Imputationen eines Wertes
# (zwischen den Datensätzen) die Unsicherheit der fehlenden Daten widerspiegeln
# es werden z.B. 5 Datensätze erstellt,
# theoretisch müssten diese dann alle ausgewertet werden und die Ergebnisse dann zusammengefasst werden
# die Daten müssen multivariat normalverteilt sein und es darf keine Singularität vorliegen
# der Fehler: "error: inv_sympd(): matrix appears to be singular" bedeutet entweder:
# dass Variablen linear abhängig bzw. hoch-korreliert sind
# oder dass es mehr Variablen (Analyten) als vorhandene Werte gibt
# cave bei Auftreten dieses Fehlers dauert es u.U. sehr lange bis man weiterarbeiten kann (ca. 1000 Iterationen)

# Grenzen für Imputationen setzen (von 0 bis kleinsten vorhandenen Wert)
m.bound = as.matrix(data.frame(column=erklv,lower=c(0),upper=sapply(dg.lim,min, na.rm = T)))

#library(matrixcalc) # Daten für Amelia fit dürfen nicht singular sein -> Test
#is.singular.matrix(as.matrix(dg.lim[c(1:ncol(dg.lim)),]),tol=1e-08)

# Werte ersetzen
# Anzahl verwendeter Prozessorkerne 4
amelia_fit <- amelia(dg.lim, m=5, parallel = "multicore", bounds=m.bound, ncpus = 4, incheck = T)

# mit log-Transformation für nicht normalverteilte Variablen
#amelia_fit <- amelia(dg.lim, m=5, logs = ks, parallel = "multicore", bounds=m.bound, ncpus = 4)
```

```

# ***** Resultate vergleichen *****
# Vergleich der ersetzten Werte mit den ursprünglichen Werten (eingabe ist Vektor -> Spaltenweise)
# mae = mean absolute error
# mse = mean squared error
# rmse = root mean squared error
# mape = mean absolute percentage error --> relative error
# regr.eval("original data"[,i],"predicted data"[,i])

# mape für alle Analyten mit den verschiedenen Imputationen
#sum(abs(dg.num[,1]-dg.min[,1])/dg.num[,1])/nrow(dg.num) # Beispielrechnung für mape
result = setNames(data.frame(matrix(ncol = 6,nrow = ncol(dg.num)),
      row.names = colnames(dg.num),stringsAsFactors = F),
      c("min","median","min/2","kNN","amelia","null"))
for(i in c(1:nrow(result))){
  result[i,1] = regr.eval(dg.num[,i],dg.min[,i])[4]
  result[i,2] = regr.eval(dg.num[,i],dg.med[,i])[4]
  result[i,3] = regr.eval(dg.num[,i],dg.half[,i])[4]
  result[i,4] = regr.eval(dg.num[,i],dg.knn[,i])[4]
  result[i,5] = regr.eval(dg.num[,i],amelia_fit$imputations[[1]][,i])[4]
  result[i,6] = regr.eval(dg.num[,i],dg.null[,i])[4]
}

data.frame(Min = mean(result[,1]),Median = mean(result[,2]),min_2 = mean(result[,3]),
  kNN = mean(result[,4]),amelia = mean(result[,5]),
  Null = mean(result[,6]), row.names = c("mean relative error"))
Ergebnis = data.frame(Min = mean(result[,1]),Median = mean(result[,2]),LLOQ_2 = mean(result[,3]),
  kNN = mean(result[,4]),amelia = mean(result[,5]),
  Null = mean(result[,6]), row.names = c("mean relative error"))
write.csv(Ergebnis,paste(c(Studie,"_",lim*100,"%_", "Ergebnis LLOQ.csv"),collapse=""))

# ***** Graphischer Vergleich *****
# Höhe, Breite und Name der PDF
Breite = 5.7
Hoehe = 3.6
PDF = paste(c(Studie,"_",lim*100,"_Imputationen_",Datum, ".PDF"),collapse = "")

my_theme = theme(panel.grid.major = element_blank(), panel.grid.minor = element_blank(),
  panel.border = element_blank(), panel.background = element_blank(),
  axis.ticks.y = element_line(color='black', size = 0.25),
  axis.line = element_line(color='black', size = 0.25), axis.text = element_text(color = "black"),
  axis.text.x=element_blank(), axis.ticks.x=element_blank(),
  legend.position="right", legend.title = element_blank())

# erstellt PDF mit einer Seite pro Analyt
# Boxplots zum Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Imputationsverfahren
# Wenn es sich nicht um Testdaten handelt, sind die "Echten Werte" und die "fehlenden Werte" gleich
# Wenn nicht alle Imputationsverfahren ausgeführt wurden,
# müssen diese bei d.table und colnames(d.table) entfernt werden

pdf(file=PDF, width = Breite, height = Hoehe, onefile = T)
for(i in colnames(dg.num)){
  # Grenzen der Y-Achse
  ymin = min(dg.num[,i]) * 0.5
  ymax = max(dg.num[,i]) * 1.5

  #Werte der verschiedenen Verfahren für den jeweiligen Analyten zusammenfassen
  d.table = data.frame(dg.num[,i],dg.lim[,i], dg.null[,i], dg.min[,i], dg.half[,i], dg.med[,i], dg.knn[,i],
    amelia_fit$imputations[[1]][,i],amelia_fit$imputations[[2]][,i], rep(1,nrow(dg.num)))
  colnames(d.table)=c("Echte_Werte","fehlende_Werte","mit_0_ersetzt","Minimum","Minimum_2","Median","kNN",
    "amelia1","amelia2","Group")
  dm.table = melt(d.table, id.var="Group")
}

```

## Anhang

---

```
# "_" in den Namen ersetzen
dm.table$variable = as.factor(gsub("_", " ", dm.table$variable))
# Imputationsverfahren nach der vorherigen Reihenfolge sortieren
dm.table$variable = factor(dm.table$variable, levels = unique(dm.table$variable))

p1 <- ggplot(na.omit(dm.table), aes(x=variable, y=value)) + geom_boxplot(aes(fill=variable)) +
  my_theme + xlab("") + ylab("") + ggtitle(i) +
  coord_cartesian(ylim = c(ymin, ymax))
grid.arrange(p1, nrow = 1)
}
dev.off()

# ***** Daten speichern *****
# ergänzt wieder Gruppenbezeichnungen etc.
# Bezeichnung des jeweiligen Datensatzes ändern, je nachdem welche Imputation am erfolgreichsten war
dg.result = data.frame(dg[,non.num], dg.half)
write.csv(dg.result, file = paste(c(Studie, "_imput_", "LLOQ2"), ".csv"), collapse = "", row.names = T)

# Amelie fit
write.amelia(amelia_fit, separate=F, file.stem = paste(c(Studie, "imput", "LLOQ2"), collapse = "_"),
  extension = ".csv", format = "csv", impvar="imp", orig.data=T)

# Speichert alle Datensätze in eine Excel-Datei
# ggf. einzelne Datensätze streichen, falls sie nicht ausgeführt wurden
wbName = paste(c(Studie, "_missing value_", Datum, ".xlsx"), collapse = "")
#files = c("dg.num", "dg.lim", "dg.null", "dg.min", "dg.half", "dg.med", "dg.knn")
files = list(dg.num, dg.lim, dg.null, dg.min, dg.half, dg.med, dg.knn)
names(files) = c("dg.num", "dg.lim", "dg.null", "dg.min", "dg.half", "dg.med", "dg.knn")

for(i in c(1:length(names(files)))){
  write.xlsx(files[i], file = wbName, sheetName= names(files)[i], row.names=F, append=T, showNA=F)
}
write.xlsx(amelia_fit$imputations[[1]], file = wbName, sheetName= "amelia1", row.names=F, append=T, showNA=F)
write.xlsx(amelia_fit$imputations[[2]], file = wbName, sheetName= "amelia2", row.names=F, append=T, showNA=F)
gc()

# ***** RSession leeren *****
# löscht alles in "Global Environment"
setwd(Dateipfad_alt)
rm(list=ls(all = TRUE))
```

## 8.2.2 Univariate Auswertung

```

library(dplyr)
library(tidyr)
library(car)
library(openxlsx) # kann große Dateien lesen, aber nicht schreiben
# library(xlsx) # kann große Dateien schreiben, aber nicht lesen
Dateipfad_alt <- getwd()

##### mit diesem Skript können verschiedene Univariate Auswertungen vorgenommen werden
#####

# unter Daten anpassen, die gewünschten Grenzen und Dateipfad/-name auswählen
# Ergebnisse werden als .xlsx Datei in den gleichen Ordner geschrieben
# ganz am Ende vom Skript werden erstellte Variablen und Datensätze in R gelöscht und der Dateipfad zurückgesetzt

# cave: beim Einlesen der Daten darf je Spalte nur in der 1. Zeile Text stehen,
# sonst werden Zahlen in darauffolgenden Zeilen dieser Spalte als Text bzw. Faktor erkannt

# untargeted Auswertung (untargeted = T):
# Die Daten sollten folgendes Format haben (.xlsx Datei):
# aus Markerview die Tabelle kopieren und in Zelle "B1" einfügen
# 1. Spalte "Analyte" (z.B. als mz_RT_Index zusammengefasst)
# Spalte "Group" enthält die Isotopen
# die Spalten "Index", "m/z", "Ret. Time" und "Use" sind optional, sie werden nicht verwendet
# in den darauffolgenden Spalten kommen die Proben

# (semi-) Quantitative Auswertung (untargeted = F):
# Die Daten sollten folgendes Format haben (.xlsx Datei):
# 1. Spalte "Analyte" (Namen werden dann formatiert)
# in den darauffolgenden Spalten kommen die Proben mit den Werten

# in beiden Fällen weiteres Arbeitsblatt in dieser Mappe mit den Gruppenbezeichnungen:
# 1. Spalte Analyte
# 2. Spalte "Group" (Gruppenbezeichnung), für QC-Proben "QC", für Blank "Blank" und für Doppel-Blank "Double-Blank"
# die 1. Gruppe in alphabetischer Reihenfolge wird als Kontroll-Gruppe verwendet
# (ggf. "0_" vor den Gruppennamen der Kontrollgruppe schreiben)
# 3. Spalte ggf. "Subset", falls die Daten in Einzelauswertungen aufgeteilt werden soll
# 4. Spalte "Individuen" bei abhängigen Stichproben (damit die Paarvergleiche zugeordnet werden können)

#####
##### folgende Daten anpassen: #####
#####

#Rohdaten Pfad und Name Excel Arbeitsmappe
Dateipfad_neu <- "C:/Users/lisa.hahnefeld/Desktop"
Datei_Name <- "Test univariat R Skript_2019 08 06.xlsx"
Studie <- "Test" #Bestimmt Namen der Ausgabedatei

# sind die Proben abhängig (TRUE) oder unabhängig (FALSE)
Paarung = T
# ggf. log10 -transformation der Peakflächen/Konzentrationen
# FALSE-> niemals transformieren,
# TRUE -> transformieren, wenn signifikante Ergebnisse shapiro test bei untransformiert gegenüber log10 > Faktor 1.5
sind
logT = T

# Analyten mit fehlenden Werten werden gelöscht (T = TRUE, F = FALSE)
# Wenn die fehlenden Werte nicht gelöscht werden,
# werden alle Analyten mit > 20 % fehlenden Werten trotzdem gelöscht (Subsetweise)
rem.missing = T

```

## Anhang

```
# für Ersetzen der <LLOQ Werte mit verschiedenen Verfahren siehe Extra-Skript
# Wenn rem.missing = F, können die restlichen fehlenden Werte ggf. mit der Hälfte des minimalen Wertes ersetzt werden,
# bei FALSE werden die Werte nicht beachtet
rep.missing = T

# untargeted Auswertung, bei quantitativen oder semi-quant. Daten auf F (FALSE) setzen, bei untargeted = T (TRUE)
untargeted = T

# Tabellennummer (Reihenfolge innerhalb der Excel-Datei)
SheetNr <- 1
SheetGruppen <- 2 #Arbeitsblatt mit Gruppenbezeichnungen

# nur bei untargeted Daten
QCcut = 20 # max. RSD [%] der QCs, die die Analyten haben dürfen, auf 0 setzen um zu überspringen
BlankCut = 5 # Mittelwert od. Quantil der Proben muss > x Blank- Mittelwert sein, auf 0 setzen um zu überspringen
Quantil = 0.2 # Quantil für Blank-Vergleich verwenden (Bsp. 0.2 -> 80% der Werte müssen über Grenze liegen),
# Quantil = 0 setzen um zu Mittelwert zu verwenden

#####
##### Beginn der Datenanalyse #####
#####

options(java.parameters = "-Xmx6000m") # legt zur Verfügung stehenden Arbeitsspeicher in MB fest

##### Daten einlesen #####
start_time = Sys.time()
#Daten einlesen
library(openxlsx)
setwd(Dateipfad_neu)
Daten <- read.xlsx(Datei_Name, SheetNr, colNames=T,rowNames=T)
data_time = Sys.time()
Datum <- gsub("-", " ", as.character(Sys.Date()))

##### untargeted Daten analysieren (TRUE) #####
if(untargeted){
Gruppen <- read.xlsx(Datei_Name, SheetGruppen, colNames=T,rowNames=T)

c1 = which(names(Daten)=="Row")
c2 = which(names(Daten)=="Index")
c3 = which(names(Daten)=="m/z")
c4 = which(names(Daten)=="Ret..Time")
c5 = which(names(Daten)=="Group")
c6 = which(names(Daten)=="Use")
c7 = which(names(Daten)=="Peak.Name")

gAnalyten = nrow(Daten)

# Isotope entfernen
Daten$Group <- ifelse(is.na(Daten$Group), "unknown", Daten$Group)
Daten <- droplevels(subset(Daten, Group != "(Isotope)"))
oIsotope = nrow(Daten)
# überflüssige Spalten entfernen
Daten = Daten[,-(as.numeric(c(c1,c2,c3,c4,c5,c6,c7)))]
gProben = ncol(Daten)
# transponieren
Daten=as.data.frame(t(Daten))

# Mess-Polarität aus Probennamen entfernen
rownames(Daten) = gsub("neg_", "", rownames(Daten))
rownames(Daten) = gsub("pos_", "", rownames(Daten))
Daten = Daten[order(row.names(Daten)),]
```

```

# Probengruppen und Subset ergänzen
Gruppen = Gruppen[order(row.names(Gruppen)),]
Daten = cbind(Daten, Gruppen)
# Ende untargeted Datenumformung
}else{

##### (semi-) targeted Daten analysieren #####
Gruppen <- read.xlsx(Datei_Name, SheetGruppen, colNames=T,rowNames=T)

gProben = ncol(Daten)
gAnalyten = nrow(Daten)

# Analytnamen anpassen
rownames(Daten) = gsub("\\(", "", rownames(Daten))
rownames(Daten) = gsub(")", "", rownames(Daten))
rownames(Daten) = gsub(" ", "_", rownames(Daten))
rownames(Daten) = gsub("/", "_", rownames(Daten))
rownames(Daten) = gsub(":", ".", rownames(Daten))
rownames(Daten) = gsub("-", "", rownames(Daten))

# transponieren
Daten=as.data.frame(t(Daten))
Daten = Daten[order(row.names(Daten)),]

# Probengruppen und Subset ergänzen
Gruppen = Gruppen[order(row.names(Gruppen)),]
Daten = cbind(Daten, Gruppen)
} # Ende (untargeted)semi-) targeted Datenumformung

# Spaltenpositionen der Analyten (abhängig von Group und Subset oder ähnlichem)
cGroup = which(names(Daten)=="Group")
cSubset = which(names(Daten)=="Subset")
cIndv = which(names(Daten)=="Individuen")
nonA = c(cGroup,cSubset,cIndv)

##### Double Blank Werte entfernen#####
# wichtig bei IS normalisierten (untargeted) Daten, da sonst Blankgrenze viel zu hoch wäre
if(BlankCut > 0){
  Daten = droplevels(subset(Daten,Group != "DoubleBlank"))
}

##### Umgang mit fehlenden Werten Teil 1 #####
# 0 Werte mit NA ersetzen
Daten[Daten == 0] = NA

# Pruefung auf fehlende Werte
anyNA(Daten)
#colSums(is.na(Daten)) >0
cat("\ Der Datensatz hat ", length(colSums(is.na(Daten))[(colSums(is.na(Daten)) >0) == TRUE]),
    " Spalten mit fehlenden Werten.", sep = "")
names(colSums(is.na(Daten))[(colSums(is.na(Daten)) >0) == TRUE])
colnames(Daten[,colSums(is.na(Daten)) > 0])

#überprüfen auf > 20% fehlende Werte
cat("\ Der Datensatz hat ", length(colSums(is.na(Daten))[(colSums(is.na(Daten)) >(0.2*nrow(Daten))) == TRUE]),
    " Spalte(n) mit > 20% fehlenden Werten.", sep = "")
names(colSums(is.na(Daten))[(colSums(is.na(Daten)) >(0.2*nrow(Daten))) == TRUE])

##### Subset/ Subgroups festlegen #####
if(length(cSubset)){

```

## Anhang

```
Teile <- levels(as.factor(droplevels(subset(Daten, Subset != "Blank" & Subset != "QC" & Subset != "zero-
Blank"))[,cSubset]))
}else{
  Teile = 1
  Subgroup = 1 }

DatenAlt = Daten
FehlerPaarung = "ungleiche Probenanzahl gepaarter Gruppen bei:"
Studie.alt = Studie

#####
#####
##### Diesen Teil ggf. mit verschiedenen Subgroups etc. wiederholen #####
#####
#####

# um SubGroups einzeln zu analysieren einfach Skript nach Beginn der for-Schleife starten und Subgroup manuell fest-
legen
for (Subgroup in Teile){

  Daten = DatenAlt
  Studie = Studie.alt
  cGroup = which(names(Daten)== "Group")
  cSubset = which(names(Daten)== "Subset")
  cIndv = which(names(Daten)== "Individuen")
  nonA = c(cGroup,cSubset,cIndv)

  if(length(cSubset) > 0){
    Daten <- droplevels(subset(Daten, Subset == Subgroup | Subset == "Blank" | Subset == "QC"))
    Daten <- Daten[,-cSubset]
    cGroup = which(names(Daten)== "Group")
    cIndv = which(names(Daten)== "Individuen")
    nonA = c(cGroup,cIndv)
  }

  if(Paarung){
    Zw1 = droplevels(subset(Daten, Group != "Blank" & Group != "QC"))
    Zw2 = length(rownames(Zw1))/length(levels(as.factor(Zw1$Group)))
    if(all.equal(Zw2, as.integer(Zw2))==T){
      rm(Zw1,Zw2)
    }else{
      rm(Zw1,Zw2)
      # skip to next for if unequal sample number for paired tests
      FehlerPaarung = paste(FehlerPaarung,Subgroup,collapse=" "); next
    }
  }

##### Umgang mit fehlenden Werten Teil 2 #####
# Entfernen aller Variablen mit fehlenden Werten
if(rem.missing){
  AnalytenNA = length(colSums(is.na(Daten))[(colSums(is.na(Daten)) >0) == TRUE])
}else{
  AnalytenNA = length(colSums(is.na(Daten))[(colSums(is.na(Daten)) >(0.2*nrow(Daten))) == TRUE])
}
nNA = sum(is.na(Daten))

if(rem.missing){
  Daten = Daten[,colSums(is.na(Daten)) == 0]
  # Spaltenpositionen der Analyten (abhängig von Group und Subset oder ähnlichem)
  cGroup = which(names(Daten)== "Group")
  cIndv = which(names(Daten)== "Individuen")
  nonA = c(cGroup,cIndv)
}else{
```



```

#löschen der Daten mit > 20% fehlender Werte
Daten = Daten[,colSums(is.na(Daten)) <= (0.2*nrow(Daten))]
# Spaltenpositionen der Analyten (abhängig von Group und Subset oder ähnlichem)
cGroup = which(names(Daten)=="Group")
cIndv = which(names(Daten)=="Individuen")
nonA = c(cGroup,cIndv)
# ***** Werte kleiner Limit mit Hälfte des Minimums ersetzen *****
# fehlende Werte bestimmen
if(rep.missing){
m.ind = as.data.frame(is.na(Daten))
row.names(m.ind) = c(1:nrow(m.ind)) # Zeilennamen müssen Zahlen sein
# Werte ersetzen
for(i in c(1:ncol(Daten))[-nonA]){
  if(sum(is.na(Daten[,i]))> 0){
    Daten[,i] <- replace(Daten[,i],as.numeric(rownames(m.ind)[m.ind[,i] == TRUE]), min(Daten[,i],na.rm = T)/2)
  }
}
}

#***** Analyten mit < 2x Blank entfernen *****
if(untargeted & BlankCut > 0){
Blanks <- droplevels(subset(Daten, Group == "Blank"))
if(Quantil >0){
# Vergleich Quantil der Proben mit Mittelwert der Blanks
Blanks = rbind(Blanks[-nonA],apply(Blanks[-nonA],2,mean,na.rm=T),
  apply(droplevels(subset(Daten, Group != "Blank")[-nonA]),2,quantile, probs= c(Quantil), na.rm=T))
}else{
# Vergleich Mittelwert der Proben mit Mittelwert der Blanks
Blanks = rbind(Blanks[-nonA],apply(Blanks[-nonA],2,mean,na.rm=T),
  apply(droplevels(subset(Daten, Group != "Blank")[-nonA]),2,mean,na.rm=T))
}
}

# Variablen entfernen
a=t(Blanks[nrow(Blanks),]/Blanks[(nrow(Blanks) -1),] < BlankCut)
BlankOut = rownames(a)[a==TRUE & is.na(a) == F]
rownames(a) <- c(1:nrow(a))
BlankInd= as.vector(rownames(a)[a==TRUE & is.na(a) == F])
BlankInd= as.numeric(BlankInd)
nBlank = sum((Daten$Group == "Blank") == TRUE)
nBlankFail = length(BlankInd)
Daten <- Daten[,-c(BlankInd)]
Daten <- droplevels(subset(Daten, Group != "Blank"))

cGroup = which(names(Daten)=="Group")
cIndv = which(names(Daten)=="Individuen")
nonA = c(cGroup,cIndv)
}#Ende Blank-Vergleich

#***** Analyten mit QC RSD > x entfernen *****
if(QCcut > 0){

#RSD der QCs berechnen
CV <- function(x){
  (sd(x,na.rm=TRUE)/mean(x,na.rm=TRUE))*100
}
QCs <- droplevels(subset(Daten, Group == "QC"))
QCs = rbind(QCs[-nonA],apply(QCs[-nonA],2,CV))
a=t((QCs[nrow(QCs),] > QCcut))

#Falls Mittelwert der QCs vorher schon berechnet werden soll
#a=t((Daten[232,] > QCcut))
#a = as.matrix(a[-nonA,])

```

## Anhang

---

```
# Ausreißer bestimmen
QCout = rownames(a)[a==TRUE]
rownames(a) <- c(1:nrow(a))
QCind= as.vector(rownames(a)[a==TRUE])
QCind= as.numeric(QCind)

nQC = sum((Daten$Group == "QC") == TRUE)
nQCfail = length(QCind)
# Variablen entfernen
if(length(QCind) > 0){
  Daten <- Daten[,-(QCind)]
}
Daten <- droplevels(subset(Daten, Group != "QC"))

cGroup = which(names(Daten)=="Group")
cIndv = which(names(Daten)=="Individuen")
nonA = c(cGroup,cIndv)
}

#***** Gruppennamen auslesen *****
#Gruppennamen auslesen
GruppenNamen <- levels(as.factor(Daten$Group))
nGroups = as.data.frame(table(Daten$Group))
nGroups$Freq = as.factor(nGroups$Freq)

AnzahlTests <- nlevels(as.factor(Daten$Group)) - 1

#neue Dimensionen bestimmen
Analyten <- (ncol(Daten) - 1)
Probenanzahl <- nrow(Daten)

#***** Normalverteilung & Homoskedastizität überprüfen *****
# Shapiro-Wilk Test für alle Gruppen und Variablen -> wenn signifikant, nicht normalverteilt
# Test für untransformierte Werte sowie log10 und sqrt Transformation (sqrt nur bei unabhängigen Proben)
# Levene Test für Gleichheit der Varianzen (Homoskedastizität)

# bei t-test mit unabhängigen Stichproben müssen alle Gruppen normalverteilt und Gleichheit der Varianzen gegeben
sein
# bei t-test mit abhängigen Stichproben müssen die Differenzen der Zeitpunkte/Gruppen normalverteilt sein

if(Paarung){
#***** abhängige Stichproben
# Daten müssen sortiert werden, für richtige Paarzuordnung
Daten = Daten[order(Daten[,cIndv],Daten[,cGroup]),]
# Datensatz durch Gruppen/Zeitpunkt Differenzen ersetzen
data.diff = Daten
for(i in levels(as.factor(Daten[,cIndv]))){
  # Zeilen des jeweiligen Individuums
  row.s = which(data.diff[,cIndv] == i)
  # Zeilennummer und Zeile der Referenzprobe
  ref = which(data.diff[,cIndv] == i & data.diff[,cGroup] == GruppenNamen[1])
  ref.vector = as.numeric(data.diff[ref,-nonA])
  # berechne Differenzen
  data.diff[row.s,-nonA] = t(t(data.diff[row.s,-nonA]) - ref.vector)
}
# Differenzen nach log10 Transformation
diff.110 = Daten
diff.110[, -nonA] = log10(Daten[, -nonA])
for(i in levels(as.factor(Daten[,cIndv]))){
  # Zeilen des jeweiligen Individuums
  row.s = which(diff.110 [,cIndv] == i)
  # Zeilennummer und Zeile der Referenzprobe
  ref = which(diff.110[,cIndv] == i & diff.110[,cGroup] == GruppenNamen[1])
```

```

ref.vector = as.numeric(diff.l10[ref,-nonA])
# berechne Differenzen
diff.l10[row.s,-nonA] = t(t(diff.l10[row.s,-nonA]) - ref.vector)
}
# Kontrollgruppe entfernen
data.diff = droplevels(subset(data.diff,data.diff[,cGroup] != GruppenNamen[1]))
diff.l10 = droplevels(subset(diff.l10,diff.l10[,cGroup] != GruppenNamen[1]))
# leeres Dataframe erzeugen
norm = setNames(data.frame(matrix(ncol = AnzahlTests, nrow = 1)), paste("norm",GruppenNamen[-1],sep="_"))
log10 = setNames(data.frame(matrix(ncol = AnzahlTests, nrow = 1)), paste("log10",GruppenNamen[-1],sep="_"))
# Signifikanzniveau Werte einfügen
for(i in c(1:ncol(Daten))[-nonA]){
  norm = rbind(norm,tapply(data.diff[,i],data.diff[,cGroup],function(x) shapiro.test(x)$p.value))
  log10 = rbind(log10,tapply(diff.l10[,i],diff.l10[,cGroup],function(x) shapiro.test(x)$p.value))
}
norm_dis= cbind(norm,log10)
norm_dis=norm_dis[-1,]
rownames(norm_dis) = colnames(Daten[-nonA])
norm_dis= norm_dis[order(rownames(norm_dis)),]

# sapply Funktion benötigt mindestens zwei Spalten, schlägt fehl bei nur zwei Gruppen
if(AnzahlTests <= 1){
  norm = cbind(Zw = c(1:nrow(norm)), norm)
  log10 = cbind(Zw = c(1:nrow(log10)), log10)
  norm_dis = cbind(Zw = c(1:nrow(norm_dis)), norm_dis)
}
# nicht-parametrische Auswertung nötig (norm oder levene_pval signifikant -> TRUE)
norm_dis = cbind(norm_dis, non_param = rowSums(sapply(norm[-1,],`<`, e2 = 0.05)) > 0)

# zählt signifikante Ergebnisse bei mindestens einem Vergleich
nnorm = nrow(norm[rowSums(sapply(norm[-1,],`<`, e2 = 0.05)) > 0,])
nlog10 = nrow(log10[rowSums(sapply(log10[-1,],`<`, e2 = 0.05)) > 0,])
if(AnzahlTests <= 1){
  norm = norm[-1]
  log10 = log10[-1]
  norm_dis = norm_dis[-1]
}

}else{
  #***** unabhängige Stichproben
  # leeres Dataframe erzeugen
  norm = setNames(data.frame(matrix(ncol = AnzahlTests + 1, nrow = 1)), paste("norm",GruppenNamen,sep="_"))
  log10 = setNames(data.frame(matrix(ncol = AnzahlTests + 1, nrow = 1)), paste("log10",GruppenNamen,sep="_"))
  root = setNames(data.frame(matrix(ncol = AnzahlTests + 1, nrow = 1)), paste("root",GruppenNamen,sep="_"))
  levene_pval = c(1)
  # Signifikanzniveau Werte einfügen
  for(i in c(1:ncol(Daten))[-nonA]){
    norm = rbind(norm,tapply(Daten[,i],Daten[,cGroup],function(x) shapiro.test(x)$p.value))
    log10 = rbind(log10,tapply(log10(Daten[,i]),Daten[,cGroup],function(x) shapiro.test(x)$p.value))
    root = rbind(root,tapply(sqrt(Daten[,i]),Daten[,cGroup],function(x) shapiro.test(x)$p.value))
    levene_pval = rbind(levene_pval,leveneTest (Daten[,i],as.factor(Daten[,cGroup]))$Pr[1])
  }
  norm_dis= cbind(norm,log10,root,levene_pval)
  norm_dis=norm_dis[-1,]
  rownames(norm_dis) = colnames(Daten[-nonA])
  norm_dis= norm_dis[order(rownames(norm_dis)),]

  # nicht-parametrische Auswertung nötig (norm oder levene_pval signifikant -> TRUE)
  norm_dis = cbind(norm_dis, non_param = rowSums(sapply(cbind(norm[-1,],levene_pval[-1]),`<`, e2 = 0.05)) > 0)

  # zählt signifikante Ergebnisse bei mindestens einer Gruppe
  nnorm = nrow(norm[rowSums(sapply(norm[-1,],`<`, e2 = 0.05)) > 0,])
  nlog10 = nrow(log10[rowSums(sapply(log10[-1,],`<`, e2 = 0.05)) > 0,])

```

## Anhang

---

```
  nroot = nrow(root[rowSums(sapply(root[-1,],`<`, e2 = 0.05)) > 0,])
  lev = length(rownames(norm_dis[norm_dis$levne_pval < 0.05,]))
}

##### log Transformation #####
if(logT) {
  if(nnorm > 0){
    if(nlog10/nnorm < 0.66){
      Daten[, -nonA] <- log10(Daten[, -nonA])
      # Analyten für nicht-parametrische Auswertung anpassen
      if(Paarung){
        norm_dis$non_param = rowSums(sapply(log10[-1,],`<`, e2 = 0.05)) > 0
      } else {
        norm_dis$non_param = rowSums(sapply(cbind(log10[-1,], levne_pval[-1]),`<`, e2 = 0.05)) > 0
      }
      if(grepl("log", Studie) < 1){
        Studie = paste(c(Studie, "log"), collapse = "_")
      }
    }
  }

##### Daten umformen für weitere Tests #####
# Tabellen Überschrift generieren
a <- c("Control", paste("Test", 1:AnzahlTests, sep = ""))
a <- as.vector(arrange(as.data.frame(cbind(GruppenNamen, a)), GruppenNamen)$a)
ZwischenName <- c("variable", a)

# nicht numerische Spalten, außer der Spalte "Group" müssen entfernt werden
Tabelle = Daten[, c(colnames(Filter(is.numeric, Daten)), "Group")]

# Tabelle umformen
Tabelle <- gather(Tabelle, key=variable, value=value, -Group)
Tabelle <- group_by(Tabelle, Group, variable)
Tabelle <- summarise(Tabelle, value=list(value))
Tabelle <- spread(Tabelle, Group, value)
Tabelle <- group_by(Tabelle, variable)
colNamesAlt <- colnames(Tabelle)
colnames(Tabelle) <- ZwischenName

Tests <- ZwischenName[-1]
k = 1
meanTests = paste("mean", Tests, sep = "_")
sdTests = paste("sd", Tests, sep = "_")
for (i in Tests) {
  Tabelle <-
  Tabelle %>%
  mutate(!as.name(meanTests[k]) := mean(as.numeric(unlist(!as.name(i))), na.rm = TRUE)) %>%
  mutate(!as.name(sdTests[k]) := sd(as.numeric(unlist(!as.name(i))), na.rm = TRUE))
  k = k + 1
}

# Zeilen mit NA entfernen
which(is.na(Tabelle), arr.ind=TRUE)[, 1]
AnalytenNA = AnalytenNA + length(which(is.na(Tabelle), arr.ind=TRUE)[, 1])
Tabelle <- Tabelle[rowSums(is.na(Tabelle)) == 0, ]
Tabelle <- group_by(Tabelle, variable)
Analyten = nrow(Tabelle)

# Spaltenbezeichnungen festlegen
p_value = paste("p", c(1:AnzahlTests), sep = "")
t_value = paste("t", c(1:AnzahlTests), sep = "")
p_bonf = paste("p_bonf", c(1:AnzahlTests), sep = "")
p_fdr = paste("p_fdr", c(1:AnzahlTests), sep = "")
```

```

##### abhängige od. unabhängige Proben, parametrisch #####
# Tabelle umformen für Vergleich von zwei Gruppen (Gruppenamen ersetzen)
# student's T-Test (setzt Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen voraus (Shapiro und Levene Test je nicht signi-
fikant))
# in der Standardfunktion geht geht R von ungleichen Varianzen aus, d.h. unten berechnete Werte gehören zum Welch-
Test
# wenn die Varianzgleichheit sicher besteht, kann in der t.test Funktion "var.equal = T" gesetzt werden
# in den meisten Fällen liefern der Welch und t-Test die gleichen Ergebnisse
# Signifikanzniveau nach Bonferroni und Benjamini-Hochberg (False-Discovery Rate, FDR) angepasst

MyData.ts <- cbind(Tabelle, non_param = norm_dis$non_param)
k = 1
for (i in Tests[-1]) {
  MyData.ts <-
  MyData.ts %>%
  mutate(!as.name(t_value[k]) := t.test(unlist(Control),
                                         unlist(!as.name(i)), paired=Paarung, na.rm = T, var.equal = F)$statistic) %>%
  mutate(!as.name(p_value[k]) := t.test(unlist(Control),
                                         unlist(!as.name(i)), paired=Paarung, na.rm = T, var.equal = F)$p.value)
  n = which(names(MyData.ts) == p_value[k])
  x = data.frame(p.adjust(as.matrix(MyData.ts[,n]), "bonferroni"))
  colnames(x) = p_bonf[k]
  y = data.frame(p.adjust(as.matrix(MyData.ts[,n]), "fdr"))
  colnames(y) = p_fdr[k]
  MyData.ts = bind_cols(MyData.ts, x, y)
  rm(x, y)
  k = k + 1
}
MyData.ts <- MyData.ts[, - (2:(AnzahlTests+2))]

##### abhängige od. unabhängige Proben, nicht-parametrisch #####
#####
#Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (nicht-parametrisch) & Bonferroni Korrektur
#default für alternative = "two.sided" (Alternativhypothese)
#p-adjust nach Bonferroni und Benjamini-Hochberg (False-Discovery Rate, FDR)

MyData.mw <- Tabelle
k = 1
for (i in Tests[-1]) {
  MyData.mw <-
  MyData.mw %>%
  mutate(!as.name(t_value[k]) := wilcox.test(unlist(Control),
                                              unlist(!as.name(i)), paired=Paarung, na.rm = T)$statistic) %>%
  mutate(!as.name(p_value[k]) := wilcox.test(unlist(Control), unlist(!as.name(i)), paired=Paarung, na.rm = T)$p.value)
  n = which(names(MyData.mw) == p_value[k])
  x = data.frame(p.adjust(as.matrix(MyData.mw[,n]), "bonferroni"))
  colnames(x) = p_bonf[k]
  y = data.frame(p.adjust(as.matrix(MyData.mw[,n]), "fdr"))
  colnames(y) = p_fdr[k]
  MyData.mw = bind_cols(MyData.mw, x, y)
  rm(x, y)
  k = k + 1
}
MyData.mw <- MyData.mw[, - (2:(AnzahlTests+2))]

##### abhängige od. unabhängige Proben mit mehreren Gruppen #####
#####
# es wird getestet, ob es Unterschiede zwischen den Gruppen geht,
# aber nicht weiter aufgelöst, welche Gruppen sich genau unterscheiden
# für Unterschied zwischen Einzelgruppen dann t.test bzw. wilcoxon test Ergebnisse anschauen
# cave: bei t und wilcoxon Test Signifikanzniveau nur für die Anzahl der Analyten,
# nicht für die Anzahl der Gruppen/Tests korrigiert

```

## Anhang

---

```
if(length(Tests)>2){ # mehr als zwei Gruppen

if(Paarung){ # ***** mit Messwiederholungen *****
# leere Tabelle vorlegen
MyData.aov <- data.frame(Analyte = colnames(Daten)[-c(cIndv,cGroup)], non_param = norm_dis$non_param,
  aov.fstat = 1,aov.pv = 1, friedm.chi2 = 1, friedm.pv = 1)
# Tabelle analytweise füllen
k = 1
for(i in colnames(Daten)[-c(cIndv,cGroup)]){
#ANOVA mit Messwiederholungen (abhängige Proben, parametrisch)
ac = summary(aov(Daten[,i] ~ as.factor(Daten[,cGroup])+ Error(Daten[,cIndv]/as.factor(Daten[,cGroup]))))
#Friedman-Test (abhängige Proben, nicht-parametrisch)
fm = friedman.test(Daten[,i],Daten[,cGroup],Daten[,cIndv])
MyData.aov[k,3] = ac[[2]][[1]][1,4]
MyData.aov[k,4] = ac[[2]][[1]][1,5]
MyData.aov[k,5] = fm$statistic
MyData.aov[k,6] = fm$p.value
k = k + 1
}
# Signifanzniveaus angleichen nach bonferroni und FDR
MyData.aov = data.frame(MyData.aov,aov.pBonf = p.adjust(MyData.aov[,4],"bonferroni"),
  aov.pFDR = p.adjust(MyData.aov[,4],"fdr"),
  fm.pBonf = p.adjust(MyData.aov[,6],"bonferroni"),
  fm.pFDR = p.adjust(MyData.aov[,6],"fdr"))
}else{ # ***** ohne Messwiederholungen *****
# leere Tabelle vorlegen
MyData.aov <- data.frame(Analyte = colnames(Daten)[-c(cIndv,cGroup)], non_param = norm_dis$non_param,
  aov.fstat = 1,aov.pv = 1, kw.chi2 = 1, kw.pv = 1)
# Tabelle analytweise füllen
k = 1
for(i in colnames(Daten)[-cGroup]){
#ANOVA (unabhängige Proben, parametrisch)
ac = summary(aov(Daten[,i] ~ as.factor(Daten[,cGroup])))
#Kruskal-Wallis Test (unabhängige Proben, nicht-parametrisch)
kw = kruskal.test(Daten[,i] ~ as.factor(Daten[,cGroup]))
MyData.aov[k,3] = ac[[1]][1,4]
MyData.aov[k,4] = ac[[1]][1,5]
MyData.aov[k,5] = kw$statistic
MyData.aov[k,6] = kw$p.value
k = k + 1
}
# Signifanzniveaus angleichen nach bonferroni und FDR
MyData.aov = data.frame(MyData.aov,aov.pBonf = p.adjust(MyData.aov[,4],"bonferroni"),
  aov.pFDR = p.adjust(MyData.aov[,4],"fdr"),
  kw.pBonf = p.adjust(MyData.aov[,6],"bonferroni"),
  kw.pFDR = p.adjust(MyData.aov[,6],"fdr"))
}
} #Ende multi-Gruppen Vergleich

***** Anzahl signifikanter Ergebnisse *****
# zählt signifikante Ergebnisse, bei denen der (t-)Test angewendet werden darf
sig <- data.frame(unkorrigiert = c(sum(MyData.ts$p1 < 0.05 & MyData.ts$non_param == F), sum(MyData.mw$p1 <
0.05)))
sig <- cbind(sig, bonferroni = c(sum(MyData.ts$p_bonf1 < 0.05 & MyData.ts$non_param == F),
  sum(MyData.mw$p_bonf1 < 0.05)),
  fdr = c(sum(MyData.ts$p_fdr1 < 0.05 & MyData.ts$non_param == F), sum(MyData.mw$p_fdr1 < 0.05)))
k = 2
for (i in Tests[-(1:2)]) {
c1 <-
MyData.ts %>%
  filter(!as.name(p_value[k]) < 0.05 & non_param == F)
c2 <-
```

```

MyData.ts %>%
  filter(!as.name(p_bonf[k]) < 0.05 & non_param == F)
c3 <-
  MyData.ts %>%
  filter(!as.name(p_fdr[k]) < 0.05 & non_param == F)
c4 <-
  MyData.mw %>%
  filter(!as.name(p_value[k]) < 0.05)
c5 <-
  MyData.mw %>%
  filter(!as.name(p_bonf[k]) < 0.05)
c6 <-
  MyData.mw %>%
  filter(!as.name(p_fdr[k]) < 0.05)
sig = rbind(sig, c(nrow(c1),nrow(c2),nrow(c3)), c(nrow(c4),nrow(c5),nrow(c6)))
rm(c1,c2,c3,c4,c5,c6)
k = k + 1
}

sig <- sig[1:(2*AnzahlTests),]
sig <- cbind.data.frame(Gruppe = as.character(outer(c("",""),GruppenNamen[-1],paste, sep="")),
  Test=as.character(outer(c("student-ttest","Mann-Whitney"),1:AnzahlTests,paste,sep="")),sig, stringsAsFactors = F)
sig <- rbind.data.frame(sig, c("Kontrollgruppe",GruppenNamen[1],NA,NA,NA), stringsAsFactors = F)

if(length(Tests)>2){
  if(Paarung){
    sig <- rbind.data.frame(sig, c(NA,"rmANOVA",sum(MyData.aov[,4] < 0.05),
      nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,2] == F & MyData.aov[,7] < 0.05)), # ANOVA bonferroni
      nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,2] == F & MyData.aov[,8] < 0.05))), # ANOVA fdr
      c(NA,"friedman",sum(MyData.aov[,6] < 0.05), nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,9] < 0.05)),
      nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,10] < 0.05))), stringsAsFactors = F)
  }else{
    sig <- rbind.data.frame(sig, c(NA,"ANOVA",sum(MyData.aov[,4] < 0.05),
      nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,2] == F & MyData.aov[,7] < 0.05)), # ANOVA bonferroni
      nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,2] == F & MyData.aov[,8] < 0.05))), # ANOVA fdr
      c(NA,"Kruskal-Wallis",sum(MyData.aov[,6] < 0.05), nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,9] < 0.05)),
      nrow(filter(MyData.aov,MyData.aov[,10] < 0.05))), stringsAsFactors = F)
  }
}

##### Zurodnung Test - Gruppennamen überprüfen #####
colNameAlt.ts <- colnames(MyData.ts)
x <- as.vector(outer(c("mean","SD"),paste(GruppenNamen[1],"(Kontrolle)",sep=" "),paste, sep=" "))
y <- as.vector(outer(c("mean","SD"),GruppenNamen[-1],paste, sep=" "))
z <- as.vector(outer(c("t_value","p_value","p_bonferroni","p_fdr"),GruppenNamen[-1],paste, sep=" "))
colName.ts <- c("Analyte",x,y,"non_parametric",z)
colNameAlt.mw <- colnames(MyData.mw)
colName.mw <- c("Analyte",x,y,z)

colnames(MyData.ts) <- colName.ts
colnames(MyData.mw) <- colName.mw

##### Übersicht erstellen #####
nam.Variablen = c("Datum","Dateipfad_neu","Datei_Name","untargeted","Paarung","gProben","Probenanzahl",
  "gAnalyten",
  "oIsotope","AnalytenNA","nNA","rem.missing","rep.missing","nBlank","BlankCut","Quantil","nBlank-
  Fail",
  "nQC","QCcut","nQCfail","Analyten","nnorm","nlog10","nroot","lev","logT","AnzahlTests")
gText= c("Datum","Dateipfad","Rohdaten","untargeted","abhängige Proben","Proben gesamt","Proben ausgewertet",
  "Analyten gesamt","Analyten ohne Isotope","Analyten mit NA","fehlende Werte gesamt",
  "Analyten mit fehlenden Werten gelöscht","Werte mit min/2 ersetzt","Anzahl Blank-Proben",
  "> x Blank","Quantil","Analyten < Blank",

```

## Anhang

---

```
"Anzahl QCs","QC Grenze","Analyten RSD zu groß","Analyten ausgewertet",
"shapiro-test sig","shapiro-test sig log10","shapiro-test sig sqrt","levene-test sig","log Transformation",
"Anzahl Testgruppen")
k = 0
Text = Variablen = c()
for(i in nam.Variablen){
  k = k + 1
  if(exists(i) == T){
    Variablen= as.data.frame(c(Variablen,as.name(i)))
    Text = c(Text,gText[k])
  }
}
Variablen = t(Variablen)
overview = data.frame(Var1=Text,Freq=Variablen)
overview= rbind(overview,nGroups)
rownames(overview)=c(1:nrow(overview))
overview = cbind(c(1:nrow(overview)),overview)
colnames(overview)=c("Index","Eigenschaft","Wert")
sig = cbind(c(1:nrow(sig)),sig)
colnames(sig)=c("Index",colnames(sig)[-1])

overview = merge(overview,sig,all =T,sort=T)

#Übersicht anzeigen
cbind(c("alt","neu","Reihenfolge"),rbind(colNamesAlt[-1],as.vector(
  arrange(as.data.frame(
    cbind(GruppenNamen,a),GruppenNamen)$GruppenNamen),ZwischenName[-1]))
print(as.matrix(overview),na.print="",quote=F)

##### speichern der Ergebnisse als xlsx #####
detach(package:openxlsx)
library("xlsx") # schreiben von großen Dateien
gc()# Zwischenspeicher leeren
#if(Subgroup == "NaF+citrate_Plasma_IW"){
# Studie = "Präanalytik_untargeted neg+pos_NaF"
#}
wbName = paste(c(Studie,"_univariat_",Subgroup,"_",Datum,".xlsx"),collapse = "")
write.xlsx(overview, file = wbName, sheetName= "Übersicht",row.names=F,append=T,showNA=F)
gc()
write.xlsx(norm_dis, file = wbName, sheetName= "Normalverteilung",row.names=T,append=T,showNA=F)
gc()
if(length(Tests)>2){
write.xlsx(as.data.frame(MyData.aov), file = wbName, sheetName= "anova",append=T,showNA=F)
gc()
}
write.xlsx(as.data.frame(MyData.ts), file = wbName, sheetName= "stud_t-test",append=T,showNA=F)
gc()
write.xlsx(as.data.frame(MyData.mw), file = wbName, sheetName= "mann-whitney",append=T,showNA=F)
gc()
detach(package:xlsx)
library(openxlsx)

##### Zwischendaten leeren #####
rm(MyData.ts)
rm(MyData.mw)
rm(MyData.aov)
rm(AnzahlTests)
rm(a,ZwischenName,GruppenNamen,x,y,z)
rm(colName.ts,colName.mw,colNamesAlt,colNameAlt.ts,colNameAlt.mw)
rm(sig,overview)
rm(m.ind)

} #Ende der Subgroup for-Schleife
end_time = Sys.time()
```



```
data_time - start_time  
end_time - start_time  
FehlerPaarung
```

```
#***** RSession leeren *****  
setwd(Dateipfad_alt)  
rm(list=ls(all = TRUE ))  
Dateipfad_alt <- getwd()
```

### 8.2.3 Graphische Prüfung der Normalverteilung

```
library(rcompanion)
library(ggplot2)
library(car)
library(dplyr)
library(tidyr)
library(openxlsx) # kann große Dateien lesen, aber nicht schreiben

##### Graphen zur Übersicht der Normalverteilung der Daten #####
# mit diesem Skript werden die Verteilungen der Proben insgesamt und der Einzelgruppen graphisch aufgetragen
# Histogramme und Q-Q plots, sowie shapiro-wilk und levene-test

# Proben in Zeilen und Analyten in Spalten
# die 1. Gruppe in alphabetischer Reihenfolge wird als Kontroll-Gruppe verwendet
# (ggf. "0_" vor den Gruppennamen der Kontrollgruppe schreiben)
# Analyt-/ Probennamen sollten wie folgt bearbeitet werden:
# " " ersetzen durch "_" oder ""
# "/" durch "_"
# "(" durch ""
# ")" durch ""
# "-" durch ""
# ":" durch "."
# cave: es darf nur in der 1. Zeile Text stehen,
# sonst werden Zahlen in darauffolgenden Zeilen als Text bzw. Faktor erkannt (innerhalb dieser Spalte)
# ggf. Spalte "Subset", falls die Daten in Einzelauswertungen aufgeteilt werden soll
# der Name der Spalte mit den Gruppen kann unten festgelegt werden
# Spalten, die weder Gruppen, Subsets noch Analyten enthalten löschen (werden sonst mit geplottet)

*** Testdatensatz ***
Daten = read.csv("Test Verteilung.csv",sep=",",header = T, row.names = 1)

##### folgende Daten anpassen: #####
#####

#Rohdaten Pfad und Name Excel Arbeitsmappe
Dateipfad_neu <-
Datei_Name <-

SheetNr <- #Rohdaten Arbeitsblatt (Reihenfolge innerhalb der Excel Arbeitsmappe)
#Datensatz ggf. in mehrere Teilauswertungen aufspalten und jeweils nur eine Teilgruppe verwenden
# Teilauswertungen in Spalte "Subset" schreiben
Subgroup <- "Test1"
Studie <- "Test" #Bestimmt Namen der Ausgabedatei

# Spaltenname mit Gruppeneinteilung
Y = "Group"

# abhängige (TRUE) oder unabhängige (FALSE) Proben
# bei abhängigen Proben werden die Differenzen zur Kontrollgruppe (alph. 1. Gruppe) gebildet
Paarung = F
# bei gepaarten Proben Spalte mit Individuen (für Paarzuordnung)
cIndv = "Individuen"

#####
##### Beginn der Datenanalyse #####
#####

##### Daten einlesen #####
```

```

#Daten einlesen
Dateipfad_alt <- getwd()
setwd(Dateipfad_neu)
Daten <- read.xlsx(Datei_Name, SheetNr, colNames=T,rowNames=T)

Datum <- gsub("-", " ",as.character(Sys.Date()))

#ggf. nur Teil der Daten auswählen und die Spalte dann löschen
if(length(which(names(Daten)=="Subset"))){
  Daten = droplevels(subset(Daten, Subset == Subgroup))
  Daten = Daten[, -c(which(names(Daten)=="Subset"))]
}

# QC + Blank Proben ggf. entfernen
Daten = droplevels(subset(Daten, Group != "QC" & Group != "Blank" & Group != "DoubleBlank"))

# Gruppen müssen faktoriell sein
Daten[,Y]=factor(Daten[,Y])
Gruppen = levels(Daten[,Y])

#löschen der Daten mit > 20% fehlender Werte
Daten = Daten[,colSums(is.na(Daten)) <= (0.2*nrow(Daten))]

if(Paarung){
  # nicht numerische Spalten, außer der Spalte Y und cIndv sollten entfernt werden
  Daten[,cIndv] = as.factor(Daten[,cIndv])
  Daten = Daten[,c(Y,cIndv,colnames(Filter(is.numeric,Daten)))]
  erklv = setdiff(colnames(Daten),c(Y,cIndv))
}else{
  # nicht numerische Spalten, außer der Spalte Y sollten entfernt werden
  Daten = Daten[,c(Y,colnames(Filter(is.numeric,Daten)))]
  erklv = setdiff(colnames(Daten),Y)
}

##### Datenintegrität prüfen bei abhängigen Proben #####
if(Paarung){
  test = length(rownames(Daten))/length(levels(as.factor(Daten[,Y])))
  if(all.equal(test, as.integer(test))!=T){
    require(tcltk)
    tkmessageBox(title = "Error!", message = "Die Abhängigen Stichproben sind nicht gleich groß!",
      icon = "info", type = "ok")
  }
  rm(test)
}

##### log10 Transformation #####
l10.data = Daten
l10.data[,erklv] = log10(Daten[,erklv])

##### Berechnung der Differenzen bei abhängigen Proben #####
# Es wird jeweils nur die Differenz der Gruppe zur Kontrollgruppe gebildet
if(Paarung){
  for(i in levels(as.factor(Daten[,cIndv]))){
    # Zeilen des jeweiligen Individuums
    row.s = which(Daten[,cIndv] == i)
    # Zeilennummer und Zeile der Referenzprobe
    ref = which(Daten[,cIndv] == i & Daten[,Y] == Gruppen[1])
    ref.vector = as.numeric(Daten[ref,erklv])
    # berechne Differenzen
    Daten[row.s,erklv] = t(t(Daten[row.s,erklv]) - ref.vector)
    # für log10 transformierte Daten
    ref.vector = as.numeric(l10.data[ref,erklv])
    l10.data[row.s,erklv] = t(t(l10.data[row.s,erklv]) - ref.vector)
  }
}

```

```

}
# Kontrollgruppe entfernen
Kontrolle = paste(c("Diff zu ",Gruppen[1],"_"),collapse = "")
Daten=droplevels(subset(Daten,Daten[,Y] != Gruppen[1]))
l10.data=droplevels(subset(l10.data,l10.data[,Y] != Gruppen[1]))
Gruppen = levels(Daten[,Y])
}else{
  Kontrolle = ""
}
}

##### Format für Graphen #####
# Zeilen und Spalten (insgesamt)
g.row = 4 # pro Transformation je einmal Histogramm + Q-Q Plot
g.col = length(Gruppen) + 1 #eine Spalte pro Gruppe + eine Gesamt
PDFDis = paste(c(Studie,"_Normalverteilung_",Kontrolle,Datum, ".PDF"),collapse = "")
if(length(Subgroup)>0){
  PDFDis = paste(c(Studie,"_",Subgroup,"_Normalverteilung_",Kontrolle,Datum, ".PDF"),collapse = "")
}

##### Graphen erstellen #####
pdf(file=PDFDis)
par(mfrow=c(g.row,g.col),
    oma = c(1.5,1.5,1,0)+ 0.1, # Ränder um alles Plots zusammen (unten, links oben, rechts)
    mar = c(2,1.5,2,1)+ 0.1, # Ränder um jeden Plot (unten, links oben, rechts)
    mgp = c(2, 1, 0), # Achsenbeschriftung 2 Zeilen und Ticks 1 Zeile Abstand
    xpd = NA) # Inhalt darf äußeren Rand überschreiten
for(i in erklv){ # eine Seite pro Analyt
  # ***** Histogramm *****
  #Übersicht (alle Gruppen zusammen)
  plotNormalHistogram(Daten[,i], main= paste(c(i,"Gesamt"),collapse = " "), xlab="", ylab = "Häufigkeit")
  # Einzelgruppen
  for(g in Gruppen){
    plotNormalHistogram(Daten[Daten[,Y]==g,i], main = g, xlab="", ylab = "")
  }
  # ***** Q-Q Plot *****
  #Übersicht (alle Gruppen zusammen)
  Titel = paste(c("shapiro ",round(shapiro.test(Daten[,i])$p.value,4),"\\n","levene ",
    round(leveneTest (Daten[,i],Daten[,Y])$Pr[1,4]),collapse = ""))
  qqnorm(Daten[,i], main = Titel, cex.main = 0.9, xlab="", ylab="Proben Quantile")
  qqline(Daten[,i], col="red", xpd = F)
  # Einzelgruppen
  for(g in Gruppen){
    # Q-Q Plot
    qqnorm(Daten[Daten[,Y]==g,i], main = paste("Shapiro ",round(shapiro.test(Daten[Daten[,Y]==g,i])$p.value,4),"\\n",
      "n = ",length(which(Daten[Daten[,Y]==g,i]>0) == T)," von ",
      length(which(Daten[,Y]==g) == T),collapse = "")),
      cex.main = 0.9, xlab="", ylab = "")
    qqline(Daten[Daten[,Y]==g,i], col="red", xpd = F)
  }
  # ***** log10 transformierte Daten *****
  # ***** Histogramm *****
  #Übersicht (alle Gruppen zusammen)
  plotNormalHistogram(l10.data[,i], main= "log10 Transformation", xlab="", ylab = "Häufigkeit")

  for(g in Gruppen){
    #Histogramm
    plotNormalHistogram(l10.data[l10.data[,Y]==g,i], main = g, xlab="", ylab = "")
  }
  # ***** Q-Q Plot *****
  #Übersicht (alle Gruppen zusammen)
  Titel = paste(c("shapiro ",round(shapiro.test(l10.data[,i])$p.value,4),"\\n","levene ",
    round(leveneTest (l10.data[,i],l10.data[,Y])$Pr[1,4]),collapse = ""))
  qqnorm(l10.data[,i], main = Titel, cex.main = 0.9, xlab="", ylab = "Proben Quantile")

```

```
qqline(110.data[,i], col="red", xpd = F)
for(g in Gruppen){
  # Q-Q Plot
  qqnorm(110.data[110.data[,Y]==g,i],
    main = paste("Shapiro ",round(shapiro.test(110.data[110.data[,Y]==g,i])$p.value,4),collapse = ""),
    cex.main = 0.9, xlab="", ylab="")
  qqline(110.data[110.data[,Y]==g,i], col="red", xpd = F)
}
title(xlab = paste(c("(log10) Konzentration",i),collapse = " "),
# ylab = "Frequency / Sample Quantiles",
  outer = TRUE, line = 0)
}
dev.off

#***** RSession leeren *****
setwd(Dateipfad_alt)
rm(list=ls(all = TRUE ))
```

## 8.3 Tabellen

Tabelle 31: Semi-quantitativ ausgewertete Analyten in Humanplasma.

<b>Semi-quantitativ ausgewertete Analyten</b>					
<b>Analyt</b>	<b>Formel</b>	<b>Monoisotopische</b>		<b>m/z [Da]</b>	<b>RT [min]</b>
		<b>Masse [Da]</b>	<b>Addukt</b>		
Thyroxin	C15H11I4NO4	776,6867	-H	775,6794	2,7
<b>Sterole</b>					
ST 19:2_OH3_S	C19H28O6S	384,16066	-H	383,1534	1,9
ST 19:2_OH2_S	C19H28O5S	368,16575	-H	367,1585	2,5
ST 27:1_OH	C27H46O	386,3549	-OH	369,3516	5,8
ST 27:1_OH_S	C27H46O4S	466,3117	-H	465,3044	5
<b>Sterylester</b>					
SE 27:1/14:1	C41H70O2	594,5376	+NH <sub>4</sub>	612,5714	9,5
SE 27:1/16:1	C43H74O2	622,5689	+NH <sub>4</sub>	640,6027	9,9
SE 27:1/17:1	C44H76O2	636,5845	+NH <sub>4</sub>	654,6184	10,1
SE 27:1/18:1	C45H78O2	650,6002	+NH <sub>4</sub>	668,634	10,2
SE 27:1/18:2	C45H76O2	648,5845	+NH <sub>4</sub>	666,6184	9,9
SE 27:1/20:3	C47H78O2	674,6002	+NH <sub>4</sub>	692,634	10
SE 27:1/20:4	C47H76O2	672,5845	+NH <sub>4</sub>	690,6184	9,7
SE 27:1/20:5	C47H74O2	670,5689	+NH <sub>4</sub>	688,6027	9,4
SE 27:1/22:4	C49H80O2	700,6158	+NH <sub>4</sub>	718,6497	10
SE 27:1/22:6	C49H76O2	696,5845	+NH <sub>4</sub>	714,6184	9,5
SE 27:1/24:1	C51H90O2	734,6941	+NH <sub>4</sub>	752,7279	11,1
<b>Ceramide</b>					
Cer d18:1/16:0	C34H67NO3	537,5121	+H	538,5194	6,7
Cer d18:1/22:0	C40H79NO3	621,606	+H	622,6133	8,2
Cer d18:1/23:0	C41H81NO3	635,6217	+H	636,6289	8,4
Cer d18:1/24:0	C42H83NO3	649,6373	+H	650,6446	8,6
Cer d18:0/22:0	C40H81NO3	623,6217	+H	624,6289	8,3
Cer d18:0/24:0	C42H85NO3	651,653	+H	652,6602	8,8
Cer d18:2/22:0	C40H77NO3	619,5904	+H	620,5976	7,8
<b>Glycosylceramide</b>					
HexCer d18:1/16:0	C40H77NO8	699,5649	+H	700,5722	6,3
HexCer d18:1/24:0	C48H93NO8	811,6901	+H	812,6974	8,1
Hex2Cer d18:1/16:0	C46H87NO13	861,6177	+H	862,625	6,1
Hex2Cer d18:1/24:1	C54H101NO13	971,7273	+H	972,7346	7,4
<b>Diglyceride</b>					
DG 32:1	C35H66O5	566,491	+NH <sub>4</sub>	584,5249	7,1
DG 34:1	C37H70O5	594,5223	+NH <sub>4</sub>	612,5562	7,5
DG 34:2	C37H68O5	592,5067	+NH <sub>4</sub>	610,5405	7,1
DG 36:1	C39H74O5	622,5536	+NH <sub>4</sub>	640,5875	8
DG 36:2	C39H72O5	620,538	+NH <sub>4</sub>	638,5718	7,6
DG 36:3	C39H70O5	618,5223	+NH <sub>4</sub>	636,5562	7,2
DG 36:4	C39H68O5	616,5067	+NH <sub>4</sub>	634,5405	6,9
DG 38:5	C41H70O5	642,5223	+NH <sub>4</sub>	660,5562	7,2
DG 38:6	C41H68O5	640,5067	+NH <sub>4</sub>	658,5405	6,8
<b>freie Fettsäuren</b>					
FA 14:0	C14H28O2	228,2089	-H	227,2017	4,5
FA 15:0	C15H30O2	242,2246	-H	241,2173	4,7
FA 16:0	C16H32O2	256,2402	-H	255,233	4,8
FA 16:1	C16H30O2	254,2246	-H	253,2173	4,6
FA 17:0	C17H34O2	270,2559	-H	269,2486	5
FA 17:1	C17H32O2	268,2402	-H	267,233	4,8
FA 18:0	C18H36O2	284,2715	-H	283,2643	5,2
FA 18:1	C18H34O2	282,2559	-H	281,2486	4,9
FA 18:2	C18H32O2	280,2402	-H	279,233	4,7
FA 18:3	C18H30O2	278,2246	-H	277,2173	4,5
FA 18:4	C18H28O2	276,2089	-H	275,2017	4,3
FA 20:1	C20H38O2	310,2872	-H	309,2799	5,3
FA 20:2	C20H36O2	308,2715	-H	307,2643	5

**Semi-quantitativ ausgewertete Analyten**

Analyt	Formel	Monoisotopische			RT [min]
		Masse [Da]	Addukt	m/z [Da]	
FA 20:4	C20H32O2	304,2402	-H	303,233	4,7
FA 20:5	C20H30O2	302,2246	-H	301,2173	4,5
FA 22:4	C22H36O2	332,2715	-H	331,2643	4,9
FA 22:6	C22H32O2	328,2402	-H	327,233	4,6
FA 24:0	C24H48O2	368,3654	-H	367,3582	6,6
FA 24:1	C24H46O2	366,3498	-H	365,3425	6,1
<b>Lysophosphatidylcholine</b>					
LPC 14:0	C22H46NO7P	467,3012	+H	468,3085	3,9
LPC 15:0	C23H48NO7P	481,3168	+H	482,3241	4,1
LPC 16:0	C24H50NO7P	495,3325	+H	496,3398	4,2
LPC 16:1	C24H48NO7P	493,3168	+H	494,3241	4
LPC 17:0	C25H52NO7P	509,3481	+H	510,3554	4,4
LPC 18:0	C26H54NO7P	523,3638	+H	524,3711	4,5
LPC 18:1	C26H52NO7P	521,3481	+H	522,3554	4,3
LPC 18:2	C26H50NO7P	519,3325	+H	520,3398	4,1
LPC 18:3	C26H48NO7P	517,3168	+H	518,3241	3,9
LPC 20:0	C28H58NO7P	551,3951	+H	552,4024	4,7
LPC 20:1	C28H56NO7P	549,3794	+H	550,3867	4,6
LPC 20:2	C28H54NO7P	547,3638	+H	548,3711	4,4
LPC 20:3	C28H52NO7P	545,3481	+H	546,3554	4,2
LPC 20:4	C28H50NO7P	543,3325	+H	544,3398	4,1
LPC 20:5	C28H48NO7P	541,3168	+H	542,3241	3,9
LPC 22:0	C30H62NO7P	579,4264	+H	580,4337	5,1
LPC 22:4	C30H54NO7P	571,3638	+H	572,3711	4,3
LPC 22:5	C30H52NO7P	569,3481	+H	570,3554	4,1
LPC 22:6	C30H50NO7P	567,3325	+H	568,3398	4
LPC 24:0	C32H66NO7P	607,4577	+H	608,465	5,5
LPC O-16:0	C24H52NO6P	481,3532	+HCO <sub>2</sub>	526,3503	4,3
LPC O-16:1	C24H50NO6P	479,3376	+HCO <sub>2</sub>	524,3347	4,3
LPC O-18:0	C26H56NO6P	509,3845	+HCO <sub>2</sub>	554,3816	4,6
LPC O-18:1	C26H54NO6P	507,3689	+HCO <sub>2</sub>	552,366	4,4
<b>Lysophosphatidylethanolamine</b>					
LPE 16:0	C21H44NO7P	453,2855	-H	452,2783	4,2
LPE 18:0	C23H48NO7P	481,3168	-H	480,3096	4,5
LPE 18:1	C23H46NO7P	479,3012	-H	478,2939	4,3
LPE 18:2	C23H44NO7P	477,2855	-H	476,2783	4,1
LPE 20:3	C25H46NO7P	503,3012	-H	502,2939	4,2
LPE 20:4	C25H44NO7P	501,2855	-H	500,2783	4,1
LPE 22:6	C27H44NO7P	525,2855	-H	524,2783	4
LPE O-16:1	C21H44NO6P	437,2906	-H	436,2834	4,4
LPE O-18:1	C23H48NO6P	465,3219	-H	464,3147	4,7
<b>Lysophosphatidylinositole</b>					
LPI 18:0	C27H53O12P	600,3275	-H	599,3202	4,5
LPI 18:2	C27H49O12P	596,2962	-H	595,2889	4
LPI 20:3	C29H51O12P	622,3118	-H	621,3045	4,2
LPI 20:4	C29H49O12P	620,2962	-H	619,2889	4
<b>Alkyl- &amp; Alkenyl-phosphatidylcholine</b>					
PC O-16:0_16:0	C40H82NO7P	719,5829	+HCO <sub>2</sub>	764,58	6,7
PC O-16:0_18:2	C42H82NO7P	743,5829	+HCO <sub>2</sub>	788,58	6,4
PC O-16:0_20:4	C44H82NO7P	767,5829	+HCO <sub>2</sub>	812,58	6,4
PC O-16:1_16:0	C40H80NO7P	717,5672	+HCO <sub>2</sub>	762,5644	6,7
PC O-16:1_18:1	C42H82NO7P	743,5829	+HCO <sub>2</sub>	788,58	6,8
PC O-16:1_18:2	C42H80NO7P	741,5672	+HCO <sub>2</sub>	786,5644	6,4
PC O-16:1_20:4	C44H80NO7P	765,5672	+HCO <sub>2</sub>	810,5644	6,3
PC O-18:0_20:4	C46H86NO7P	795,6142	+HCO <sub>2</sub>	840,6113	6,9
PC O-18:1_20:4	C46H84NO7P	793,5985	+HCO <sub>2</sub>	838,5957	6,4
PC O-34:1	C42H84NO7P	745,5985	+HCO <sub>2</sub>	790,5957	6,8

## Semi-quantitativ ausgewertete Analyten

Analyt	Formel	Monoisotopische		m/z [Da]	RT [min]
		Masse [Da]	Addukt		
<b>Phosphatidylcholine</b>					
PC 30:0	C38H76NO8P	705,5309	+H	706,5381	6
PC 30:1	C38H74NO8P	703,5152	+H	704,5225	5,8
PC 30:2	C38H72NO8P	701,4996	+H	702,5068	5,4
PC 32:0	C40H80NO8P	733,5622	+H	734,5694	6,4
PC 32:1	C40H78NO8P	731,5465	+H	732,5538	6,1
PC 32:2	C40H76NO8P	729,5309	+H	730,5381	5,8
PC 33:2	C41H78NO8P	743,5465	+H	744,5538	6
PC 34:0	C42H84NO8P	761,5935	+H	762,6007	6,9
PC 34:1	C42H82NO8P	759,5778	+H	760,5851	6,5
PC 34:2	C42H80NO8P	757,5622	+H	758,5694	6,2
PC 34:3	C42H78NO8P	755,5465	+H	756,5538	5,9
PC 34:4	C42H76NO8P	753,5309	+H	754,5381	5,8
PC 34:5	C42H74NO8P	751,5152	+H	752,5225	5,5
PC 36:1	C44H86NO8P	787,6091	+H	788,6164	7
PC 36:2	C44H84NO8P	785,5935	+H	786,6007	6,6
PC 36:3	C44H82NO8P	783,5778	+H	784,5851	6,3
PC 36:4	C44H80NO8P	781,5622	+H	782,5694	6,1
PC 36:5	C44H78NO8P	779,5465	+H	780,5538	5,8
PC 38:2	C46H88NO8P	813,6248	+H	814,632	7
PC 38:3	C46H86NO8P	811,6091	+H	812,6164	6,7
PC 38:4	C46H84NO8P	809,5935	+H	810,6007	6,6
PC 38:6	C46H80NO8P	805,5622	+H	806,5694	6
PC 40:4	C48H88NO8P	837,6248	+H	838,632	6,9
PC 40:6	C48H84NO8P	833,5935	+H	834,6007	6,4
PC 40:7	C48H82NO8P	831,5778	+H	832,5851	6,1
<b>Phosphatidylethanolamine</b>					
PE 32:1	C37H72NO8P	689,4996	-H	688,4923	6,2
PE 34:1	C39H76NO8P	717,5309	-H	716,5236	6,7
PE 34:2	C39H74NO8P	715,5152	-H	714,5079	6,3
PE 34:3	C39H72NO8P	713,4996	-H	712,4923	6
PE 36:1	C41H80NO8P	745,5622	-H	744,5549	7,1
PE 36:2	C41H78NO8P	743,5465	-H	742,5392	6,8
PE 36:3	C41H76NO8P	741,5309	-H	740,5236	6,4
PE 36:4	C41H74NO8P	739,5152	-H	738,5079	6,3
PE 36:5	C41H72NO8P	737,4996	-H	736,4923	6
PE 38:4	C43H78NO8P	767,5465	-H	766,5392	6,7
PE 38:5	C43H76NO8P	765,5309	-H	764,5236	6,3
PE 38:6	C43H74NO8P	763,5152	-H	762,5079	6,1
PE 40:6	C45H78NO8P	791,5465	-H	790,5392	6,5
PE 40:7	C45H76NO8P	789,5309	-H	788,5236	6,2
PE O-16:1_18:2	C39H74NO7P	699,5203	-H	698,513	6,6
PE O-16:1_20:4	C43H78NO7P	751,5516	-H	750,5443	6,5
PE O-18:1_18:1	C41H80NO7P	729,5672	-H	728,56	7,4
PE O-18:1_18:2	C41H78NO7P	727,5516	-H	726,5443	7
PE O-18:1_20:4	C43H78NO7P	751,5516	-H	750,5443	7
PE O-18:2_20:4	C43H78NO7P	751,5516	-H	750,5443	6,6
<b>Phosphatidylinositole</b>					
PI 32:1	C41H77O13P	808,5102	-H	807,5029	6,4
PI 34:1	C43H81O13P	836,5415	-H	835,5342	6,9
PI 34:2	C43H79O13P	834,5258	-H	833,5186	6,5
PI 36:1	C45H85O13P	864,5728	-H	863,5655	7,5
PI 36:2	C45H83O13P	862,5571	-H	861,5499	7
PI 36:3	C45H81O13P	860,5415	-H	859,5342	6,7
PI 36:4	C45H79O13P	858,5258	-H	857,5186	6,5
PI 38:3	C47H85O13P	888,5728	-H	887,5655	7,2
PI 38:4	C47H83O13P	886,5571	-H	885,5499	6,9
PI 38:6	C47H79O13P	882,5258	-H	881,5186	6,3
PI 40:5	C49H85O13P	912,5728	-H	911,5655	6,9



## Semi-quantitativ ausgewertete Analyten

Analyt	Formel	Monoisotopische			RT [min]
		Masse [Da]	Addukt	m/z [Da]	
PI 40:6	C35H71N2O6P	646,505	-H	645,4977	6,8
<b>Phosphatidylserine</b>					
PS 36:1	C42H80NO10P	789,552	-H	788,5447	7,3
<b>Sphingomyeline</b>					
SM 30:1	C35H71N2O6P	646,505	+H	647,5123	5,4
SM 32:1	C37H75N2O6P	674,5363	+H	675,5436	5,7
SM 32:2	C37H73N2O6P	672,5206	+H	673,5279	5,4
SM 33:1	C38H77N2O6P	688,5519	+H	689,5592	5,9
SM 33:2	C38H75N2O6P	686,5363	+H	687,5436	5,6
SM 34:0	C39H81N2O6P	704,5832	+H	705,5905	6,3
SM 34:1	C39H79N2O6P	702,5676	+H	703,5749	6,1
SM 34:2	C39H77N2O6P	700,5519	+H	701,5592	5,8
SM 35:1	C40H81N2O6P	716,5832	+H	717,5905	6,3
SM 36:0	C41H85N2O6P	732,6145	+H	733,6218	6,7
SM 36:1	C41H83N2O6P	730,5989	+H	731,6062	6,5
SM 36:2	C41H81N2O6P	728,5832	+H	729,5905	6,2
SM 36:3	C41H79N2O6P	726,5676	+H	727,5749	5,9
SM 37:1	C42H85N2O6P	744,6145	+H	745,6218	6,8
SM 38:1	C43H87N2O6P	758,6302	+H	759,6375	7,1
SM 38:2	C43H85N2O6P	756,6145	+H	757,6218	6,6
SM 39:1	C44H89N2O6P	772,6458	+H	773,6531	7,3
SM 40:1	C45H91N2O6P	786,6615	+H	787,6688	7,5
SM 40:2	C45H89N2O6P	784,6458	+H	785,6531	7,1
SM 40:3	C45H87N2O6P	782,6302	+H	783,6375	6,7
SM 41:1	C46H93N2O6P	800,6771	+H	801,6844	7,7
SM 41:2	C46H91N2O6P	798,6615	+H	799,6688	7,4
SM 42:1	C47H95N2O6P	814,6928	+H	815,7001	8
SM 42:2	C47H93N2O6P	812,6771	+H	813,6844	7,5
SM 42:3	C47H91N2O6P	810,6615	+H	811,6688	7,1
SM 43:1	C48H97N2O6P	828,7084	+H	829,7157	8,2
SM 43:2	C48H95N2O6P	826,6928	+H	827,7001	7,7
<b>Triglyceride</b>					
TG 42:1	C45H84O6	720,6268	+NH <sub>4</sub>	738,6606	9,1
TG 42:2	C45H82O6	718,6111	+NH <sub>4</sub>	736,645	8,7
TG 44:0	C47H90O6	750,6737	+NH <sub>4</sub>	768,7076	9,7
TG 44:1	C47H88O6	748,6581	+NH <sub>4</sub>	766,6919	9,4
TG 44:2	C47H86O6	746,6424	+NH <sub>4</sub>	764,6763	9,1
TG 46:1	C49H92O6	776,6894	+NH <sub>4</sub>	794,7232	9,7
TG 46:2	C49H90O6	774,6737	+NH <sub>4</sub>	792,7076	9,4
TG 46:3	C49H88O6	772,6581	+NH <sub>4</sub>	790,6919	9,1
TG 48:1	C51H96O6	804,7207	+NH <sub>4</sub>	822,7545	10
TG 48:2	C51H94O6	802,705	+NH <sub>4</sub>	820,7389	9,7
TG 48:3	C51H92O6	800,6894	+NH <sub>4</sub>	818,7232	9,5
TG 48:4	C51H90O6	798,6737	+NH <sub>4</sub>	816,7076	9,2
TG 50:1	C53H100O6	832,752	+NH <sub>4</sub>	850,7858	10,3
TG 50:2	C53H98O6	830,7363	+NH <sub>4</sub>	848,7702	10
TG 50:3	C53H96O6	828,7207	+NH <sub>4</sub>	846,7545	9,8
TG 50:4	C53H94O6	826,705	+NH <sub>4</sub>	844,7389	9,5
TG 52:1	C55H104O6	860,7833	+NH <sub>4</sub>	878,8171	10,5
TG 52:2	C55H104O7	876,7782	+NH <sub>4</sub>	894,812	10,3
TG 52:3	C55H100O6	856,752	+NH <sub>4</sub>	874,7858	10,1
TG 52:4	C55H98O6	854,7363	+NH <sub>4</sub>	872,7702	9,8
TG 52:5	C55H96O6	852,7207	+NH <sub>4</sub>	870,7545	9,5
TG 54:1	C57H108O6	888,8146	+NH <sub>4</sub>	906,8484	10,8
TG 54:2	C57H106O6	886,7989	+NH <sub>4</sub>	904,8328	10,6
TG 54:3	C57H104O6	884,7833	+NH <sub>4</sub>	902,8171	10,3
TG 54:4	C57H102O6	882,7676	+NH <sub>4</sub>	900,8015	10,1
TG 54:5	C57H100O6	880,752	+NH <sub>4</sub>	898,7858	9,8
TG 54:6	C57H98O6	878,7363	+NH <sub>4</sub>	896,7702	9,7

**Semi-quantitativ ausgewertete Analyten**

<b>Analyt</b>	<b>Formel</b>	<b>Monoisotopische Masse [Da]</b>	<b>Addukt</b>	<b>m/z [Da]</b>	<b>RT [min]</b>
TG 56:1	C59H112O6	916,8459	+NH <sub>4</sub>	934,8797	11
TG 56:2	C59H110O6	914,8302	+NH <sub>4</sub>	932,8641	10,8
TG 56:3	C59H108O6	912,8146	+NH <sub>4</sub>	930,8484	10,6
TG 56:4	C59H106O6	910,7989	+NH <sub>4</sub>	928,8328	10,4
TG 56:5	C59H104O6	908,7833	+NH <sub>4</sub>	926,8171	10,2
TG 56:6	C59H102O6	906,7676	+NH <sub>4</sub>	924,8015	10
TG 58:1	C61H116O6	944,8772	+NH <sub>4</sub>	962,911	11,2
TG 58:2	C61H114O6	942,8615	+NH <sub>4</sub>	960,8954	11
TG 58:3	C61H112O6	940,8459	+NH <sub>4</sub>	958,8797	10,8
TG 58:4	C61H110O6	938,8302	+NH <sub>4</sub>	956,8641	10,6
TG 58:6	C61H106O6	934,7989	+NH <sub>4</sub>	952,8328	10,2

Tabelle 32: Liste der 440 in Humanplasma identifizierten Lipide.

Die Identifizierung erfolgte mittels exakter Masse ( $\pm 5$  ppm), der Isotopenverteilung und den MS/MS-Spektren. (n) = Messung im negativen Ionisationsmodus, # = Anzahl identifizierter Lipide pro Lipidklasse.

**Identifizierte Lipide in Humanplasma**

Analyt	Formel	m/z	RT	Analyt	Formel	m/z	RT
<b>Acylcarnitine</b>				<b>Addukt</b>	<b>+H<sup>+</sup></b>		<b># 4</b>
Acyl-CN 16:0	C23H45NO4	400,3421	4,07	Acyl-CN 18:1	C25H47NO4	426,3578	4,14
Acyl-CN 18:0	C25H49NO4	428,3734	4,34	Acyl-CN 18:2	C25H45NO4	424,3421	3,95
<b>Ceramide</b>				<b>Addukt</b>	<b>+H<sup>+</sup></b>		<b># 16</b>
Cer d18:0/16:0	C34H69NO3	540,5350	6,90	Cer d18:1/22:0	C40H79NO3	622,6133	8,21
Cer d18:0/22:0	C40H81NO3	624,6289	8,32	Cer d18:1/23:0	C41H81NO3	636,6289	8,44
Cer d18:0/24:0	C42H85NO3	652,6602	8,77	Cer d18:1/24:0	C42H83NO3	650,6446	8,66
Cer d18:0/24:1	C42H83NO3	650,6446	8,50	Cer d18:1/24:1	C42H81NO3	648,6289	8,20
Cer d18:1/16:0	C34H67NO3	538,5194	6,76	Cer d18:1/26:0	C44H87NO3	678,6759	9,08
Cer d18:1/18:0	C36H71NO3	566,5507	7,24	Cer d18:2/22:0	C40H77NO3	620,5976	7,82
Cer d18:1/20:0	C38H75NO3	594,5820	7,76	Cer d18:2/23:0	C41H79NO3	634,6133	8,06
Cer d18:1/21:0	C39H77NO3	608,5976	8,01	Cer d18:2/24:1	C42H79NO3	646,6133	7,83
<b>Diglyceride</b>				<b>Addukt</b>	<b>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>		<b># 27</b>
DG 30:1	C33H62O5	556,4936	6,67	DG 36:0	C39H76O5	642,6031	8,39
DG 31:0	C34H66O5	572,5249	7,23	DG 36:1	C39H74O5	640,5875	8,02
DG 31:1	C34H64O5	570,5092	6,91	DG 36:2	C39H72O5	638,5718	7,65
DG 32:0	C35H68O5	586,5405	7,48	DG 36:3	C39H70O5	636,5562	7,27
DG 32:1	C35H66O5	584,5249	7,11	DG 36:4	C39H68O5	634,5405	6,90
DG 32:2	C35H64O5	582,5092	6,74	DG 36:5	C39H66O5	632,5249	6,71
DG 33:0	C36H70O5	600,5562	7,70	DG 38:1	C41H78O5	668,6188	8,28
DG 33:1	C36H68O5	598,5405	7,33	DG 38:2	C41H76O5	666,6031	7,65
DG 34:0	C37H72O5	614,5718	7,94	DG 38:3	C41H74O5	664,5875	7,27
DG 34:1	C37H70O5	612,5562	7,57	DG 38:5	C41H70O5	660,5562	7,17
DG 34:2	C37H68O5	610,5405	7,19	DG 38:6	C41H68O5	658,5405	6,81
DG 34:3	C37H66O5	608,5249	6,86	DG 40:6	C43H72O5	686,5718	7,17
DG 35:1	C38H72O5	626,5718	7,77	DG 40:7	C43H70O5	684,5562	7,00
DG 35:2	C38H70O5	624,5562	7,42				
<b>Fettsäuren</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>		<b># 19</b>
FA 14:0	C14H28O2	227,2017	4,54	FA 18:4	C18H28O2	275,2017	4,34
FA 15:0	C15H30O2	241,2173	4,69	FA 20:1	C20H38O2	309,2799	5,25
FA 16:0	C16H32O2	255,2330	4,84	FA 20:2	C20H36O2	307,2643	4,97
FA 16:1	C16H30O2	253,2173	4,61	FA 20:4	C20H32O2	303,2330	4,65
FA 17:0	C17H34O2	269,2486	5,01	FA 20:5	C20H30O2	301,2173	4,47
FA 17:1	C17H32O2	267,2330	4,77	FA 22:4	C22H36O2	331,2643	4,86
FA 18:0	C18H36O2	283,2643	5,20	FA 22:6	C22H32O2	327,2330	4,59
FA 18:1	C18H34O2	281,2486	4,91	FA 24:0	C24H48O2	367,3582	6,63
FA 18:2	C18H32O2	279,2330	4,69	FA 24:1	C24H46O2	365,3425	6,12
FA 18:3	C18H30O2	277,2173	4,49				
<b>Glycosylceramide</b>				<b>Addukt</b>	<b>+H<sup>+</sup></b>		<b># 6</b>
Hex1Cer d18:1/24:0	C48H93NO8	812,6974	8,17	Hex2Cer d18:1/16:0	C46H87NO13	862,6250	6,11
Hex1Cer d18:1/24:1	C48H91NO8	810,6818	7,70	Hex2Cer d18:1/24:0	C54H103NO13	974,7502	7,92
Hex1Cer d18:2/24:0	C48H91NO8	810,6818	7,70	Hex2Cer d18:1/24:1	C54H101NO13	972,7346	7,45

## Identifizierte Lipide in Humanplasma

Analyt	Formel	m/z	RT	Analyt	Formel	m/z	RT
<b>Lysophosphatidylcholine</b>				<b>Addukt</b>	<b>+H<sup>+</sup>, +HCO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>		<b># 31</b>
LPC 14:0	C22H46NO7P	468,3085	3,92	LPC 20:1	C28H56NO7P	550,3867	4,58
LPC 15:0	C23H48NO7P	482,3241	4,08	LPC 20:2	C28H54NO7P	548,3711	4,37
LPC 16:0	C24H50NO7P	496,3398	4,23	LPC 20:3	C28H52NO7P	546,3554	4,21
LPC 16:1	C24H48NO7P	494,3241	4,02	LPC 20:4	C28H50NO7P	544,3398	4,09
LPC 17:0	C25H52NO7P	510,3554	4,37	LPC 20:5	C28H48NO7P	542,3241	3,90
LPC 18:0	C26H54NO7P	524,3711	4,53	LPC 22:0	C30H62NO7P	580,4337	5,11
LPC 18:1	C26H52NO7P	522,3554	4,32	LPC 22:4	C30H54NO7P	572,3711	4,30
LPC 18:2	C26H50NO7P	520,3398	4,11	LPC 22:5	C30H52NO7P	570,3554	4,13
LPC 18:3	C26H48NO7P	518,3241	3,93	LPC 22:6	C30H50NO7P	568,3398	4,04
LPC 19:0 (n)	C27H56NO7P	582,3766	4,61	LPC 24:0	C32H66NO7P	608,4650	5,50
LPC 19:1 (n)	C27H54NO7P	580,3609	4,40	LPC 24:1	C32H64NO7P	606,4493	5,13
LPC 20:0	C28H58NO7P	552,4024	4,81				
LPC O-16:0 (n)	C24H52NO6P	526,3503	4,32	LPC O-18:1 (n)	C26H54NO6P	552,3660	4,39
LPC O-16:1 (n)	C24H50NO6P	524,3347	4,32	LPC O-18:2	C26H52NO6P	506,3605	4,45
LPC O-17:1 (n)	C25H52NO6P	538,3503	4,43	LPC O-20:0 (n)	C28H58NO6P	580,3973	4,65
LPC O-18:0 (n)	C26H56NO6P	554,3816	4,61	LPC O-5:0 (n)	C13H30NO6P	372,1782	2,77
<b>Lysophosphatidylethanolamine</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>		<b># 22</b>
LPE 16:0	C21H44NO7P	452,2783	4,24	LPE 20:2	C25H48NO7P	504,3096	4,37
LPE 16:1	C21H42NO7P	450,2626	4,01	LPE 20:3	C25H46NO7P	502,2939	4,21
LPE 17:0	C22H46NO7P	466,2939	4,37	LPE 20:4	C25H44NO7P	500,2783	4,09
LPE 17:2	C22H42NO7P	462,2626	4,27	LPE 20:5	C25H42NO7P	498,2626	3,90
LPE 18:0	C23H48NO7P	480,3096	4,53	LPE 22:0	C27H56NO7P	536,3722	5,14
LPE 18:1	C23H46NO7P	478,2939	4,32	LPE 22:4	C27H48NO7P	528,3096	4,29
LPE 18:2	C23H44NO7P	476,2783	4,11	LPE 22:5	C27H46NO7P	526,2939	4,11
LPE 18:3	C23H42NO7P	474,2626	3,92	LPE 22:6	C27H44NO7P	524,2783	4,04
LPE 20:0	C25H52NO7P	508,3409	4,48	LPE 24:0	C29H60NO7P	564,4035	5,54
LPE 20:1	C25H50NO7P	506,3252	4,58				
LPE O-16:1	C21H44NO6P	436,2834	4,38	LPE O-20:1	C25H52NO6P	492,3460	4,97
LPE O-18:1	C23H48NO6P	464,3147	4,67				
<b>Lysophosphatidylglycerole</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>		<b># 4</b>
LPG 16:0	C22H45O9P	483,2729	4,30	LPG 18:1	C24H47O9P	509,2885	4,39
LPG 18:0	C24H49O9P	511,3042	4,65	LPG 18:2	C24H45O9P	507,2729	4,15
<b>Lysophosphatidylinositole</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>		<b># 7</b>
LPI 16:0	C25H49O12P	571,2889	4,21	LPI 18:2	C27H49O12P	595,2889	4,07
LPI 17:1	C26H49O12P	583,2889	4,13	LPI 20:3	C29H51O12P	621,3045	4,19
LPI 18:0	C27H53O12P	599,3202	4,56	LPI 20:4	C29H49O12P	619,2889	4,05
LPI 18:1	C27H51O12P	597,3045	4,31				
<b>Phosphatidylcholine</b>				<b>Addukt</b>	<b>+H<sup>+</sup>, +HCO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>		<b># 92</b>
PC 28:0	C36H72NO8P	678,5068	5,69	PC 36:4	C44H80NO8P	782,5694	6,17
PC 28:1	C36H70NO8P	676,4912	5,41	PC 36:4_OH	C44H80NO9P	798,5644	5,77
PC 29:0	C37H74NO8P	692,5225	5,85	PC 36:5	C44H78NO8P	780,5538	5,89
PC 30:0	C38H76NO8P	706,5381	6,07	PC 36:6	C44H76NO8P	778,5381	5,66
PC 30:1	C38H74NO8P	704,5225	5,78	PC 37:2	C45H86NO8P	800,6164	6,89
PC 30:2	C38H72NO8P	702,5068	5,48	PC 37:3	C45H84NO8P	798,6007	6,53
PC 31:0	C39H78NO8P	720,5538	6,26	PC 37:4	C45H82NO8P	796,5851	6,38

## Identifizierte Lipide in Humanplasma

Analyt	Formel	m/z	RT	Analyt	Formel	m/z	RT
PC 31:1	C39H76NO8P	718,5381	5,96	PC 37:6	C45H78NO8P	792,5538	5,85
PC 31:2	C39H74NO8P	716,5225	6,37	PC 38:1	C46H90NO8P	816,6477	7,46
PC 32:0	C40H80NO8P	734,5694	6,47	PC 38:2	C46H88NO8P	814,6320	7,07
PC 32:1	C40H78NO8P	732,5538	6,15	PC 38:3	C46H86NO8P	812,6164	6,78
PC 32:2	C40H76NO8P	730,5381	5,84	PC 38:4	C46H84NO8P	810,6007	6,61
PC 33:0	C41H82NO8P	748,5851	6,65	PC 38:5	C46H82NO8P	808,5851	6,29
PC 33:1	C41H80NO8P	746,5694	6,36	PC 38:6	C46H80NO8P	806,5694	6,04
PC 33:2	C41H78NO8P	744,5538	6,03	PC 38:7	C46H78NO8P	804,5538	5,76
PC 33:3	C41H76NO8P	742,5381	6,44	PC 39:3	C47H88NO8P	826,6320	7,00
PC 34:0	C42H84NO8P	762,6007	6,92	PC 39:4	C47H86NO8P	824,6164	6,82
PC 34:1	C42H82NO8P	760,5851	6,56	PC 39:5	C47H84NO8P	822,6007	6,37
PC 34:2	C42H80NO8P	758,5694	6,23	PC 39:6	C47H82NO8P	820,5851	6,22
PC 34:3	C42H78NO8P	756,5538	5,93	PC 40:1	C48H94NO8P	844,6790	7,95
PC 34:4	C42H76NO8P	754,5381	5,80	PC 40:2	C48H92NO8P	842,6633	7,60
PC 34:5	C42H74NO8P	752,5225	5,51	PC 40:4	C48H88NO8P	838,6320	6,90
PC 35:0	C43H86NO8P	776,6164	7,11	PC 40:6	C48H84NO8P	834,6007	6,45
PC 35:1	C43H84NO8P	774,6007	6,78	PC 40:7	C48H82NO8P	832,5851	6,11
PC 35:2	C43H82NO8P	772,5851	6,44	PC 42:4	C50H92NO8P	866,6633	7,53
PC 35:3	C43H80NO8P	770,5694	6,13	PC 42:5	C50H90NO8P	864,6477	6,92
PC 35:4	C43H78NO8P	768,5538	5,98	PC 42:6	C50H88NO8P	862,6320	6,71
PC 36:1	C44H86NO8P	788,6164	7,02	PC 42:7	C50H86NO8P	860,6164	6,49
PC 36:2	C44H84NO8P	786,6007	6,66	PC 42:8	C50H84NO8P	858,6007	6,15
PC 36:3	C44H82NO8P	784,5851	6,34	PC 42:9	C50H82NO8P	856,5851	5,86
PC O-16:0_16:0 (n)	C40H82NO7P	764,5800	6,74	PC O-34:0	C42H86NO7P	748,6215	7,27
PC O-16:0_18:2 (n)	C42H82NO7P	788,5800	6,46	PC O-34:1	C42H84NO7P	746,6058	6,88
PC O-16:0_20:4 (n)	C44H82NO7P	812,5800	6,42	PC O-36:1 (n)	C44H88NO7P	818,6270	7,65
PC O-16:1_16:0 (n)	C40H80NO7P	762,5644	6,69	PC O-36:6 (n)	C44H78NO7P	808,5487	6,04
PC O-16:1_18:1 (n)	C42H82NO7P	788,5800	6,46	PC O-38:6	C46H82NO7P	792,5902	6,41
PC O-16:1_18:2 (n)	C42H80NO7P	786,5644	6,43	PC O-38:7	C46H80NO7P	790,5745	6,25
PC O-16:1_20:4 (n)	C44H80NO7P	810,5644	6,35	PC O-39:1	C47H94NO7P	816,6841	7,52
PC O-18:0_20:4 (n)	C46H86NO7P	840,6113	6,87	PC O-40:5 (n)	C48H88NO7P	866,6270	6,90
PC O-18:1_18:1 (n)	C44H86NO7P	816,6113	6,92	PC O-40:6	C48H86NO7P	820,6215	6,75
PC O-18:1_18:2	C44H84NO7P	770,6058	6,61	PC O-40:7 (n)	C48H84NO7P	862,5957	6,33
PC O-18:1_20:4 (n)	C46H84NO7P	838,5957	6,47	PC O-42:3	C50H96NO7P	854,6997	7,93
PC O-30:0	C38H78NO7P	692,5589	6,37	PC O-42:4	C50H94NO7P	852,6841	7,87
PC O-30:1 (n)	C38H76NO7P	734,5331	6,26	PC O-42:5	C50H92NO7P	850,6684	7,39
PC O-31:0	C39H80NO7P	706,5745	6,12	PC O-42:6	C50H90NO7P	848,6528	7,00
PC O-31:1	C39H78NO7P	704,5589	5,80	PC O-42:7	C50H88NO7P	846,6371	6,79
PC O-33:0	C41H84NO7P	734,6058	6,51	PC O-44:5	C52H96NO7P	878,6997	7,85
<b>Phosphatidylethanolamine</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>		<b># 36</b>
PE 32:0	C37H74NO8P	690,5079	6,03	PE 37:4	C42H76NO8P	752,5236	6,47
PE 32:1	C37H72NO8P	688,4923	6,24	PE 38:2	C43H82NO8P	770,5705	7,17
PE 34:1	C39H76NO8P	716,5236	6,66	PE 38:4	C43H78NO8P	766,5392	6,70
PE 34:2	C39H74NO8P	714,5079	6,32	PE 38:5	C43H72NO8P	760,4923	5,77
PE 34:3	C39H72NO8P	712,4923	6,00	PE 38:5	C43H76NO8P	764,5236	6,36
PE 35:2	C40H76NO8P	728,5236	6,53	PE 38:6	C43H74NO8P	762,5079	6,12

## Identifizierte Lipide in Humanplasma

Analyt	Formel	m/z	RT	Analyt	Formel	m/z	RT
PE 36:1	C41H80NO8P	744,5549	7,12	PE 40:3	C45H84NO8P	796,5862	6,73
PE 36:2	C41H78NO8P	742,5392	6,75	PE 40:5	C45H80NO8P	792,5549	6,66
PE 36:3	C41H76NO8P	740,5236	6,40	PE 40:6	C45H78NO8P	790,5392	6,54
PE 36:4	C41H74NO8P	738,5079	6,26	PE 40:7	C45H76NO8P	788,5236	6,19
PE 36:5	C41H72NO8P	736,4923	5,96	PE 41:1	C46H90NO8P	814,6331	7,46
PE O-16:1_18:2	C39H74NO7P	698,5130	6,59	PE O-18:2_20:4	C43H76NO7P	748,5287	6,60
PE O-16:1_20:4	C41H74NO7P	722,5130	6,51	PE O-35:3	C40H76NO7P	712,5287	6,80
PE O-18:1_16:0	C39H78NO7P	702,5443	7,33	PE O-36:6	C41H72NO7P	720,4974	6,20
PE O-18:1_18:1	C41H80NO7P	728,5600	7,42	PE O-38:3	C43H82NO7P	754,5756	7,51
PE O-18:1_18:2	C41H78NO7P	726,5443	7,03	PE O-38:4	C43H80NO7P	752,5600	7,00
PE O-18:1_20:4	C43H78NO7P	750,5443	6,97	PE O-40:5	C45H82NO7P	778,5756	7,43
PE O-18:2_18:2	C41H76NO7P	724,5287	6,66	PE O-42:5	C47H86NO7P	806,6069	7,90
<b>Phosphatidylglycerole</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>	<b># 3</b>	
PG 34:1	C40H77O10P	747,5182	7,21	PG 36:4	C42H75O10P	769,5025	6,75
PG 36:1	C42H81O10P	775,5495	7,78				
<b>Phosphatidylinositole</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>	<b># 19</b>	
PI 32:0	C41H79O13P	809,5186	6,95	PI 36:3	C45H81O13P	859,5342	6,77
PI 32:1	C41H77O13P	807,5029	6,57	PI 36:4	C45H79O13P	857,5186	6,59
PI 33:1	C42H79O13P	821,5186	6,81	PI 36:5	C45H77O13P	855,5029	6,23
PI 34:0	C43H83O13P	837,5499	7,49	PI 37:4	C46H81O13P	871,5342	6,85
PI 34:1	C43H81O13P	835,5342	7,04	PI 38:4	C47H83O13P	885,5499	7,06
PI 34:2	C43H79O13P	833,5186	6,66	PI 38:5	C47H81O13P	883,5342	6,70
PI 35:1	C44H83O13P	849,5499	7,34	PI 38:6	C47H79O13P	881,5186	6,42
PI 35:2	C44H81O13P	847,5342	6,91	PI 40:5	C49H85O13P	911,5655	7,04
PI 36:1	C45H85O13P	863,5655	7,59	PI 40:6	C49H83O13P	909,5499	6,91
PI 36:2	C45H83O13P	861,5499	7,15				
<b>Phosphatidylserine</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>	<b># 2</b>	
PS 36:1	C42H80NO10P	788,5447	7,45	PS 36:2	C42H78NO10P	786,5291	7,03
<b>Sphingomyeline</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup></b>	<b># 32</b>	
SM 30:0	C35H73N2O6P	649,5279	5,54	SM 37:1	C42H85N2O6P	745,6218	6,83
SM 30:1	C35H71N2O6P	647,5123	5,37	SM 38:1	C43H87N2O6P	759,6375	7,11
SM 32:0	C37H77N2O6P	677,5592	5,90	SM 38:2	C43H85N2O6P	757,6218	6,67
SM 32:1	C37H75N2O6P	675,5436	5,76	SM 39:1	C44H89N2O6P	773,6531	7,35
SM 32:2	C37H73N2O6P	673,5279	5,43	SM 40:1	C45H91N2O6P	787,6688	7,53
SM 33:1	C38H77N2O6P	689,5592	5,94	SM 40:2	C45H89N2O6P	785,6531	7,15
SM 33:2	C38H75N2O6P	687,5436	5,61	SM 40:3	C45H87N2O6P	783,6375	6,71
SM 34:0	C39H81N2O6P	705,5905	6,31	SM 41:1	C46H93N2O6P	801,6844	7,78
SM 34:1	C39H79N2O6P	703,5749	6,13	SM 41:2	C46H91N2O6P	799,6688	7,39
SM 34:2	C39H77N2O6P	701,5592	5,81	SM 42:1	C47H95N2O6P	815,7001	8,02
SM 35:0	C40H83N2O6P	719,6062	6,74	SM 42:2	C47H93N2O6P	813,6844	7,52
SM 35:1	C40H81N2O6P	717,5905	6,35	SM 42:3	C47H91N2O6P	811,6688	7,15
SM 36:0	C41H85N2O6P	733,6218	6,75	SM 43:1	C48H97N2O6P	829,7157	8,21
SM 36:1	C41H83N2O6P	731,6062	6,57	SM 43:2	C48H95N2O6P	827,7001	7,71
SM 36:2	C41H81N2O6P	729,5905	6,22	SM 44:1	C49H99N2O6P	843,7314	8,51
SM 36:3	C41H79N2O6P	727,5749	5,92	SM 44:2	C49H97N2O6P	841,7157	7,99

## Identifizierte Lipide in Humanplasma

Analyt	Formel	m/z	RT	Analyt	Formel	m/z	RT
<b>Sterole</b>				<b>Addukt</b>	<b>-H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup></b>		<b># 4</b>
ST 19:2_OH2_S	C19H28O5S	367,1585	2,50	ST 27:1_OH	C27H46O	369,3516	5,80
ST 19:2_OH3_S	C19H28O6S	383,1534	1,90	ST 27:1_OH_S	C27H46O4S	465,3044	5,00
<b>Sterylester</b>				<b>Addukt</b>	<b>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>		<b># 17</b>
SE 27:1/14:0	C41H72O2	614,5871	9,89	SE 27:1/20:2	C47H80O2	694,6497	10,25
SE 27:1/15:0	C42H74O2	628,6027	10,08	SE 27:1/20:3	C47H78O2	692,6340	10,02
SE 27:1/16:2	C43H72O2	638,5871	9,59	SE 27:1/20:4	C47H76O2	690,6184	9,75
SE 27:1/17:0	C44H78O2	656,6340	10,41	SE 27:1/20:5	C47H74O2	688,6027	9,42
SE 27:1/17:1	C44H76O2	654,6184	10,13	SE 27:1/22:4	C49H80O2	718,6497	10,05
SE 27:1/18:1	C45H78O2	668,6340	10,29	SE 27:1/22:5	C49H78O2	716,6340	9,74
SE 27:1/18:2	C45H76O2	666,6184	9,96	SE 27:1/22:6	C49H76O2	714,6184	9,53
SE 27:1/18:3	C45H74O2	664,6027	9,65	SE 27:1/24:6	C51H80O2	742,6497	9,82
SE 27:1/20:1	C47H82O2	696,6653	10,57				
<b>Triglyceride</b>				<b>Addukt</b>	<b>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>		<b># 97</b>
TG 34:0	C37H70O6	628,5511	7,80	TG 53:2	C56H104O6	890,8171	10,47
TG 36:1	C39H72O6	654,5667	7,88	TG 53:3	C56H102O6	888,8015	10,23
TG 42:0	C45H86O6	740,6763	9,37	TG 53:4	C56H100O6	886,7858	9,99
TG 42:1	C45H84O6	738,6606	9,09	TG 53:5	C56H98O6	884,7702	9,76
TG 42:2	C45H82O6	736,6450	8,76	TG 54:0	C57H110O6	908,8641	11,05
TG 43:0	C46H88O6	754,6919	9,54	TG 54:1	C57H108O6	906,8484	10,82
TG 44:0	C47H90O6	768,7076	9,70	TG 54:2	C57H106O6	904,8328	10,61
TG 44:1	C47H88O6	766,6919	9,43	TG 54:3	C57H104O6	902,8171	10,38
TG 44:2	C47H86O6	764,6763	9,12	TG 54:4	C57H102O6	900,8015	10,14
TG 45:0	C48H92O6	782,7232	9,85	TG 54:5	C57H100O6	898,7858	9,87
TG 45:1	C48H90O6	780,7076	9,59	TG 54:6	C57H98O6	896,7702	9,59
TG 46:0	C49H94O6	796,7389	10,01	TG 54:7	C57H96O6	894,7545	9,47
TG 46:1	C49H92O6	794,7232	9,74	TG 55:0	C58H112O6	922,8797	11,17
TG 46:2	C49H90O6	792,7076	9,46	TG 55:1	C58H110O6	920,8641	10,96
TG 46:3	C49H88O6	790,6919	9,16	TG 55:2	C58H108O6	918,8484	10,72
TG 47:0	C50H96O6	810,7545	10,16	TG 55:3	C58H106O6	916,8328	10,49
TG 47:1	C50H94O6	808,7389	9,89	TG 55:4	C58H104O6	914,8171	10,26
TG 47:2	C50H92O6	806,7232	9,62	TG 55:5	C58H102O6	912,8015	10,10
TG 48:0	C51H98O6	824,7702	10,29	TG 55:6	C58H100O6	910,7858	9,86
TG 48:1	C51H96O6	822,7545	10,04	TG 56:0	C59H114O6	936,8954	11,27
TG 48:2	C51H94O6	820,7389	9,77	TG 56:1	C59H112O6	934,8797	11,07
TG 48:3	C51H92O6	818,7232	9,49	TG 56:2	C59H110O6	932,8641	10,84
TG 48:4	C51H90O6	816,7076	9,21	TG 56:3	C59H108O6	930,8484	10,62
TG 49:0	C52H100O6	838,7858	10,43	TG 56:4	C59H106O6	928,8328	10,41
TG 49:1	C52H98O6	836,7702	10,19	TG 56:5	C59H104O6	926,8171	10,21
TG 49:2	C52H96O6	834,7545	9,91	TG 56:6	C59H102O6	924,8015	10,02
TG 49:3	C52H94O6	832,7389	9,65	TG 56:7	C59H100O6	922,7858	9,79
TG 49:4	C52H92O6	830,7232	9,41	TG 56:8	C59H98O6	920,7702	9,55
TG 50:0	C53H102O6	852,8015	10,56	TG 56:9	C59H96O6	918,7545	9,29
TG 50:1	C53H100O6	850,7858	10,32	TG 57:1	C60H114O6	948,8954	11,19
TG 50:2	C53H98O6	848,7702	10,07	TG 57:2	C60H112O6	946,8797	10,59
TG 50:3	C53H96O6	846,7545	9,80	TG 58:1	C61H116O6	962,9110	11,29

## Anhang

### Identifizierte Lipide in Humanplasma

Analyt	Formel	m/z	RT	Analyt	Formel	m/z	RT
TG 50:4	C53H94O6	844,7389	9,54	TG 58:10	C61H98O6	944,7702	9,37
TG 50:5	C53H92O6	842,7232	9,34	TG 58:11	C61H96O6	942,7545	9,11
TG 51:0	C54H104O6	866,8171	10,67	TG 58:2	C61H114O6	960,8954	11,07
TG 51:1	C54H102O6	864,8015	10,45	TG 58:3	C61H112O6	958,8797	10,86
TG 51:2	C54H100O6	862,7858	10,21	TG 58:4	C61H110O6	956,8641	10,64
TG 51:3	C54H98O6	860,7702	9,95	TG 58:5	C61H108O6	954,8484	10,44
TG 51:4	C54H96O6	858,7545	9,68	TG 58:6	C61H106O6	952,8328	10,22
TG 52:0	C55H106O6	880,8328	10,80	TG 58:7	C61H104O6	950,8171	10,00
TG 52:1	C55H104O6	878,8171	10,58	TG 58:8	C61H102O6	948,8015	9,86
TG 52:2	C55H102O6	876,8015	10,35	TG 58:9	C61H100O6	946,7858	9,61
TG 52:3	C55H100O6	874,7858	10,10	TG 59:3	C62H114O6	972,8954	10,97
TG 52:4	C55H98O6	872,7702	9,83	TG 60:10	C63H102O6	972,8015	9,65
TG 52:5	C55H96O6	870,7545	9,58	TG 60:12	C63H98O6	968,7702	9,22
TG 52:6	C55H94O6	868,7389	9,37	TG 60:2	C63H118O6	988,9267	11,30
TG 52:7	C55H92O6	866,7232	9,14	TG 60:3	C63H116O6	986,9110	10,61
TG 53:0	C56H108O6	894,8484	10,70	TG 60:4	C63H114O6	984,8954	10,87
TG 53:1	C56H106O6	892,8328	10,70				
<b>Sonstige</b>				<b>Addukt</b>	<b>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, -H<sup>+</sup></b>		<b># 2</b>
Ubiquinone-10	C59H90O4	863,6912	9,39	Thyroxin	C15H11I4NO4	775,6794	2,70



Tabelle 33: Einfluss des Materials des Extraktionsgefäßes bei der Plasma-Extraktion.

Die Extraktion und das Abdampfen in 1,5 mL Polypropylen-Reaktionsgefäße wurden mit der Extraktion in PP und Abdampfen in Glasvials verglichen. Zur Kontrolle wurde in Glasvials extrahiert und abgedampft (n=10). Werte > 15% sind fett markiert. PP = Polypropylen-Reaktionsgefäß.

Analyt	Einfluss des Materials des Extraktionsgefäßes				
	Glasvial RSD [%]	PP + Glasvial		PP	
		RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
Cer d18:1/16:0	9,29	10,76	8,86	7,51	3,46
Cer d18:0/22:0	5,99	7,09	6,75	7,62	7,11
Cer d18:0/24:0	13,93	14,52	11,04	12,7	<b>17,78</b>
Cer d18:1/22:0	5,43	9,88	6,3	8,19	8,74
Cer d18:1/23:0	5,94	11,36	5,05	6,29	6,66
Cer d18:1/24:0	5,28	10,43	3,59	9,97	9,22
Cer d18:2/22:0	7,41	11,8	5,97	6,98	4,42
DG 32:1	6,65	13,16	6,4	13,09	6,49
DG 34:1	4,18	5,77	3,57	1,54	7,07
DG 34:2	5,51	8,99	5,18	3,28	7,16
DG 36:1	5,65	4,66	4,1	1,71	6,03
DG 36:2	5,13	8,12	4,7	1,77	7,25
DG 36:3	7,29	8,94	5,11	-0,42	8,82
DG 36:4	4,79	10,86	3,81	-2,69	8,77
DG 38:5	8,56	5,73	9,55	-1,1	5,1
DG 38:6	8,81	7,06	8,64	-2,41	4,47
FA 14:0	12,21	<b>15,68</b>	<b>17</b>	<b>23,14</b>	9,32
FA 15:0	<b>16,24</b>	<b>27,12</b>	<b>21,85</b>	<b>54,78</b>	13,28
FA 16:0	10,52	<b>48,94</b>	<b>20,19</b>	<b>75,18</b>	<b>20,21</b>
FA 16:1	14,86	9,7	9,02	9,35	8,81
FA 17:0	<b>16,62</b>	<b>15,53</b>	10,4	<b>36,51</b>	9,54
FA 17:1	8,22	13,45	12,92	<b>34,58</b>	13,27
FA 18:0	5,4	<b>76,89</b>	<b>19,9</b>	<b>129,2</b>	<b>27,85</b>
FA 18:1	7,24	7,58	10,47	9,19	13,05
FA 18:2	10,43	13,74	<b>21,21</b>	7,45	<b>19,56</b>
FA 18:3	2,83	1,43	6,64	-5,73	14,12
FA 18:4	14,54	<b>20,53</b>	14,53	<b>76,65</b>	13,72
FA 20:1	7,89	<b>18,17</b>	7,94	<b>24,34</b>	11,01
FA 20:2	10,19	<b>15,32</b>	8,28	10,87	7,19
FA 20:4	2,19	11,28	6,16	-0,36	9,13
FA 20:5	6,53	0,94	7,73	-2,43	<b>15,67</b>
FA 22:4	9,08	<b>17,52</b>	9,52	6,92	14,87
FA 22:6	4,9	7,95	3,51	-5,41	10,3
FA 24:1	10,36	<b>17,9</b>	7,19	<b>16,89</b>	8,6
Hex2Cer d18:1/16:0	7,44	6,27	5,61	<b>23,75</b>	8,63
Hex2Cer d18:1/24:1	7,95	8,71	5,49	-0,5	7,93
HexCer d18:1/16:0	9,21	4,18	7,07	0,98	6,54
HexCer d18:1/24:0	7,21	8,83	6,16	6,74	7,39
LPC 14:0	9,6	0,43	3,14	3,77	6,8
LPC 15:0	8,44	3,69	2,78	3,45	6,11
LPC 16:0	6,89	5,12	2,1	5,87	7,03
LPC 16:1	8,09	4,25	3,67	2	6,23
LPC 17:0	8,83	6,25	3,39	5,57	7,35
LPC 18:0	5,92	6,24	2,81	6,92	7,55
LPC 18:1	7,27	5,93	3,26	2,08	7,15
LPC 18:2	7,33	4,31	2,99	1,31	7,34

Einfluss des Materials des Extraktionsgefäßes

Analyt	Glacial	PP + Glacial		PP	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
LPC 18:3	8,49	5,75	4,2	1,62	6,63
LPC 20:0	7,91	10,28	5,44	5,46	11,3
LPC 20:1	6,79	7,26	7,56	4,92	6,35
LPC 20:2	7,72	6,42	2,91	1,79	8,94
LPC 20:3	6,89	7,65	4,09	2,43	11,47
LPC 20:4	7	4,37	3,13	1,57	7,22
LPC 20:5	7,96	3,04	3,85	-1,57	5,48
LPC 22:0	11,34	13,02	5,4	4,18	7,48
LPC 22:4	4,18	7,69	5,88	8,2	7,31
LPC 22:5	6,04	7,39	5,69	-4,91	7,63
LPC 22:6	6,4	5,97	4,15	-2,02	6,1
LPC 24:0	11,28	5,48	8,9	7,52	11,75
LPC O-16:0	2,89	6,32	2,6	-1,29	8,2
LPC O-16:1	2,32	7,37	2,2	<b>-24,96</b>	11,17
LPC O-18:0	3,19	8,25	3,82	3,03	6,34
LPC O-18:1	3,68	5,91	3,72	-6,03	10,14
LPE 16:0	3,95	4,59	2,75	-6,02	10,86
LPE 18:0	2,88	6,96	2,77	-6,52	12,06
LPE 18:1	3,43	6,23	2,72	-8,35	11,29
LPE 18:2	3,47	5,03	3,41	-7,96	10,2
LPE 20:3	10,29	2,53	8,94	-4,72	13,75
LPE 20:4	3,92	1,08	6,04	-1,8	11,97
LPE 22:6	2,54	2,37	3,66	-6,27	10,94
LPE O-16:1	4,59	5,65	3,3	<b>-28,63</b>	12,9
LPE O-18:1	3,01	5,54	2,6	<b>-26,1</b>	12,02
LPI 18:0	6,8	2,84	5,21	0,7	12,17
LPI 18:2	13,13	-8,53	5,47	0,78	12,33
LPI 20:3	10,45	-2,36	5,47	<b>-18,77</b>	13,36
LPI 20:4	9,27	-6,29	3,7	<b>-15,9</b>	8,66
PC 30:0	6,75	7,1	4,36	9,79	5,54
PC 30:1	6,96	9,1	4,12	0,67	6,04
PC 30:2	11,76	<b>17,97</b>	7,66	3,71	6,28
PC 32:0	6,25	6,03	3,29	10,37	5,85
PC 32:1	4,57	5,49	3,58	4,33	3,94
PC 32:2	6,45	7,03	3,03	-2,53	5,58
PC 33:2	6,85	8,46	3,81	4,11	6,08
PC 34:0	6	8,35	3,91	8,93	6,09
PC 34:1	4,26	4,69	2,57	3,71	3,78
PC 34:2	4,33	4,45	2,32	3,24	3,88
PC 34:3	5,5	6,15	2,71	-0,47	6,17
PC 34:4	6,09	9,05	3,45	-6,79	6,08
PC 34:5	6,5	6,32	4,56	-7,39	6,81
PC 36:1	4,78	6,12	2,98	3,39	5,43
PC 36:2	4,51	4,8	2,67	1,85	4,47
PC 36:3	4,92	6,37	3,01	0,49	4,85
PC 36:4	3,94	4,34	2,78	0,01	3,59
PC 36:5	4,1	7,49	3,97	-3,93	6,49
PC 38:2	5,61	6,19	3,55	-0,27	5,32
PC 38:3	6,51	4,49	6,35	-0,35	4,55
PC 38:4	4,01	4,32	3,33	-2,66	3,28

Einfluss des Materials des Extraktionsgefäßes

Analyt	Glavial	PP + Glavial		PP	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
PC 38:6	4,08	7,3	3,63	-3,27	6,01
PC 40:4	10,26	14,16	6,45	2,06	7,87
PC 40:6	5,38	7,5	3,63	-4,44	6,32
PC 40:7	4,5	6,75	5,02	-7,1	3,29
PC O-16:0_16:0	5,03	5,29	4,72	9,44	6,53
PC O-16:0_18:2	6,56	2,54	1,74	-2,68	6,15
PC O-16:0_20:4	4,49	-1,12	2,87	-8,38	8,14
PC O-16:1_16:0	8,21	6,95	2,82	<b>-19,3</b>	5,93
PC O-16:1_18:1	7,82	0,44	4,43	<b>-18,27</b>	10,08
PC O-16:1_18:2	4,52	2,26	2,12	<b>-22,65</b>	12,11
PC O-16:1_20:4	3,97	1,71	4	<b>-21,48</b>	7,65
PC O-18:0_20:4	8,23	-0,17	5,29	-4,9	7,85
PC O-18:1_20:4	3,81	0,66	3,72	-9,87	7,63
PC O-34:1	5,2	2,63	4,49	1,93	5,06
PE 32:1	7,09	2,77	7,67	-11,19	<b>17,49</b>
PE 34:1	3,3	1,89	3,14	-7,36	9,65
PE 34:2	1,1	1,75	1,81	-9,25	10,34
PE 34:3	7,36	6,79	4,22	-6,76	<b>16,43</b>
PE 36:1	1,67	3,96	2,24	-10,39	9,32
PE 36:2	2,5	4,72	2,68	-6,45	7,85
PE 36:3	4,25	4,74	2,36	-10,68	11,08
PE 36:4	3,34	7,07	3,51	-10,37	11,32
PE 36:5	5,64	3,14	6,57	-14,48	8,97
PE 38:4	5,39	4,61	3,35	-11,74	9,46
PE 38:5	3,06	0,94	2,29	<b>-15,51</b>	6,83
PE 38:6	4,01	10,57	3,53	-11,65	<b>15,53</b>
PE 40:6	3,82	8,75	3,72	-11,99	<b>15,67</b>
PE 40:7	2,49	13,09	5,82	-11,29	14,13
PE O-16:1_18:2	3,44	11	3,82	<b>-22,16</b>	<b>15,36</b>
PE O-16:1_20:4	4,45	11,36	2,98	<b>-21,81</b>	<b>15,04</b>
PE O-18:1_18:1	3,78	8,31	4,54	<b>-27,14</b>	9,82
PE O-18:1_18:2	2,16	5,73	0,96	<b>-25,02</b>	9,56
PE O-18:1_20:4	1,73	5,96	2,86	<b>-26,15</b>	9,46
PE O-18:2_20:4	2,41	12,17	1,64	<b>-21,93</b>	14,42
PI 32:1	3,57	4,59	3,94	1,94	7,15
PI 34:1	2,26	5,61	3,84	2,41	6,45
PI 34:2	3,97	6,65	2,33	4,96	9,56
PI 36:1	3,34	8,9	6,53	-1,2	6,98
PI 36:2	5,87	10,8	5,3	4,39	6,09
PI 36:3	3,85	1,76	5,45	-1,17	7,96
PI 36:4	4,05	8,18	3,64	-1,21	8,48
PI 38:3	3,09	6,05	3,99	-2,76	5,91
PI 38:4	3,1	10,24	3,97	-3,18	8,67
PI 38:6	3,69	9,79	9,33	0,82	10,51
PI 40:5	5,77	7,85	4,52	-9,43	9,67
PI 40:6	8,46	5,55	3,29	-4,64	8,26
PS 36:1	6,91	0,45	5,82	-11,56	5,6
SE 27:1/14:1	<b>16,27</b>	9,89	4,84	5,38	10,47
SE 27:1/16:1	10,17	5,17	6,12	4,43	3,64
SE 27:1/17:1	12,34	7,24	7,69	4,86	5,61

Einfluss des Materials des Extraktionsgefäßes

Analyt	Glavial	PP + Glavial		PP	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
SE 27:1/18:1	10,51	3,09	3,66	3,86	7,48
SE 27:1/18:2	10,12	4,41	3,34	6,11	5,03
SE 27:1/20:3	9,25	5,57	4,34	2,45	6,96
SE 27:1/20:4	9,14	5,77	3,77	6,07	5,68
SE 27:1/20:5	11,22	11,57	3,44	9,45	7,28
SE 27:1/22:4	5,32	2,32	7,25	-0,31	9,1
SE 27:1/22:6	10,34	10,61	3,64	8,23	6,93
SE 27:1/24:1	13,88	<b>17,8</b>	12,51	14,8	2,42
SM 30:1	6,14	9,12	4,93	7,71	7,02
SM 32:1	5,58	10,21	3,2	3,05	6,95
SM 32:2	5,96	7,05	4,26	3,02	6,56
SM 33:1	7,32	7,9	4,2	8,5	5,68
SM 33:2	7,53	6,96	5,97	2,12	8,33
SM 34:0	7,77	6,17	5,39	4,52	6,36
SM 34:1	4,88	5,85	2,32	8,29	4,42
SM 34:2	4,81	8,58	2,03	-4,05	6,72
SM 35:1	6,83	8,27	3,97	9,78	4,1
SM 36:0	6,83	6,88	4,38	7,88	6,95
SM 36:1	5,16	5,16	3,55	6,6	4,61
SM 36:2	4,22	5,57	5,22	2,48	4,06
SM 36:3	9,32	8,43	5,42	-7,92	6,82
SM 37:1	5,68	6,89	5,88	2,23	6,81
SM 38:1	5,6	6,54	3,46	7,85	6,26
SM 38:2	6,27	5,52	5,25	3,2	5,63
SM 39:1	5,74	6,48	3,31	8,02	7,38
SM 40:1	5,25	6,06	4,09	7,41	7,69
SM 40:2	5,17	7,12	3,36	4,1	6,74
SM 40:3	6,27	5,79	4,35	0,15	6,72
SM 41:1	6,38	7,88	3,29	9	7,97
SM 41:2	5,95	7,39	4,08	2,43	6,29
SM 42:1	5,65	6,5	3,08	9,25	7,48
SM 42:2	5,12	6,21	3,71	3,89	7,71
SM 42:3	4,92	7,54	3,88	1,29	6,26
SM 43:1	6,33	7,09	3,93	8,33	7,73
SM 43:2	6,19	6,82	4,36	2,91	7,65
ST 19:2_OH2_S	10,64	-4,89	3,61	-4,44	6,27
ST 19:2_OH3_S	<b>25,74</b>	<b>-22,38</b>	5,95	<b>-20,97</b>	8,49
ST 27:1_OH	3,82	6,19	1,54	-6,48	6,57
ST 27:1_OH_S	3,71	10,33	3,74	11,4	8,02
TG 42:1	7,57	13,31	7,55	14,24	9,51
TG 42:2	7,27	11,01	5,61	10,41	8,96
TG 44:0	14,21	<b>15,22</b>	4,94	14,21	6,16
TG 44:1	7,63	12,26	4,2	12,26	7,7
TG 44:2	7,87	<b>15,34</b>	6,14	14,91	8,81
TG 46:1	7,86	9,49	4,3	8,76	7,24
TG 46:2	8,01	13,67	4,69	11,98	7,9
TG 46:3	7,75	<b>15,19</b>	5,89	13,11	10,02
TG 48:1	10,27	5,48	1,66	9,59	5,47
TG 48:2	9,11	7,85	3,45	7,27	6,85
TG 48:3	7,88	10,98	4,99	10,36	8,5

Einfluss des Materials des Extraktionsgefäßes

Analyt	Glavial	PP + Glavial		PP	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
TG 48:4	8,28	11,58	6,08	10,35	8,51
TG 50:1	12,84	7,85	3,66	6,82	5,45
TG 50:2	8,17	4,82	1,98	6,93	5,16
TG 50:3	8,76	6,58	2,49	6,75	7,12
TG 50:4	7,61	10,05	4,61	8,14	7,91
TG 52:1	<b>18,16</b>	11,07	4,13	11,85	5,75
TG 52:2	7,2	5,29	2,33	6,56	5,49
TG 52:3	6,83	4,27	1,82	5,96	5,46
TG 52:4	8,44	6,93	2,23	7,04	7,09
TG 52:5	8,11	9,11	4,15	5,94	8,42
TG 54:1	<b>25,72</b>	14,07	7,32	13,94	8,92
TG 54:2	9,65	6,88	3,04	10,13	7,92
TG 54:3	7,71	5,96	3,31	5,22	5,99
TG 54:4	7,66	6,09	2,57	4,56	6,48
TG 54:5	8,81	6,71	2,57	7,37	8,22
TG 54:6	7,74	8,76	3,35	4,92	7,69
TG 56:1	<b>25,98</b>	<b>18,69</b>	12,35	<b>18,75</b>	10,98
TG 56:2	14,4	10,83	6,75	14,06	7,33
TG 56:3	9,8	12,63	5,11	<b>15,18</b>	7,31
TG 56:4	12,16	7,13	5,15	6,03	7,82
TG 56:5	7,12	7,38	3,45	4,56	8,35
TG 56:6	9,38	5,43	3,17	1,65	6,29
TG 58:1	<b>26,59</b>	<b>17,38</b>	<b>17,21</b>	<b>15,51</b>	<b>15,95</b>
TG 58:2	<b>16,64</b>	<b>17,57</b>	9,09	<b>19,92</b>	7,65
TG 58:3	13,84	9,69	8,47	11,02	8,64
TG 58:4	14,7	8,43	11,58	11,6	7,36
TG 58:6	13,03	7,99	6,6	5,14	11,63
Thyroxin	3,36	4,56	3,45	-10,71	5,97

Tabelle 34: Einfluss der Inkubationszeit während der Plasmaextraktion.

Vergleich der Inkubation von einer Minute Vortexen (Kontrolle), 10 oder 30 Minuten in Eiswasser und 30 Minuten bei 6 °C. Die Inkubationszeiten wurden jeweils nach Zugabe von MTBE, nach Zugabe der wässrigen Phase und während der Reextraktion angewendet. Angabe der Ergebnisse als relative Standardabweichung und relativer Fehler der chromatographischen Peakflächen (n=6). Werte > 15% sind fett markiert.

	Einfluss der Inkubationszeit auf die Lipidextraktion						
	1 min RSD [%]	10 min auf Eis RE [%] RSD [%]		30 min auf Eis RE [%] RSD [%]		30 min bei 6 °C RE [%] RSD [%]	
Cer d18:1/16:0	5,29	-0,13	4,81	-2,09	7,75	-11,13	12,09
Cer d18:0/22:0	6,63	-2,98	9,88	-0,57	9,96	-10,75	11,47
Cer d18:0/24:0	12,01	4,22	4,58	5,85	<b>16,5</b>	2,33	<b>18,67</b>
Cer d18:1/22:0	2,92	2,79	6,01	0,27	11,01	-7,77	12,82
Cer d18:1/23:0	3,22	0,05	7,9	0,93	9,33	-8,16	13,33
Cer d18:1/24:0	4,81	0,95	7,84	1,28	10,14	-9,51	12,38
Cer d18:2/22:0	12,57	-1,76	9,3	-5,54	10,87	-14,22	14,86
DG 32:1	4,53	-0,7	5,82	-1,33	4,06	-5,74	9,53
DG 34:1	4,11	-0,26	4,66	-0,4	6,46	-7,36	9,53
DG 34:2	4,68	-0,33	4,79	-1,56	8,17	-8,98	10,67
DG 36:1	6,35	0,46	4,43	1,94	9,13	-7,6	10,39
DG 36:2	3,27	1,51	5,82	2,13	10,01	-7,4	9,04
DG 36:3	4,76	-0,05	5,66	-1,26	8,82	-10,48	12,15
DG 36:4	6,32	0,36	6,2	-2,39	7,47	-9,55	12,18
DG 38:5	3,81	-0,76	4,71	-1,81	6,71	-10,15	11,61
DG 38:6	9,46	3,02	4,29	-7,07	9,57	-8,72	14,47
FA 14:0	2,29	-8,62	5,9	-12,42	5,32	-13,51	6,39
FA 15:0	<b>17,17</b>	<b>-18,69</b>	5,42	-9,35	7,65	-2,52	14,53
FA 16:0	3,85	-4,21	6,96	-3,88	4,96	-3,75	4,82
FA 16:1	3,66	-6,86	6,27	-9,23	6,67	-10,08	2,27
FA 17:0	<b>16,87</b>	<b>-18,48</b>	5,02	-14,37	8,79	-14,62	9,56
FA 17:1	<b>20,32</b>	-14,69	8,79	-13,47	10,05	<b>-17,48</b>	7,43
FA 18:0	5,04	-1,96	8,17	-0,31	6,83	-4,87	8,34
FA 18:1	2,57	-4,83	3,63	-5,85	3,48	-5,83	5,35
FA 18:2	3,54	-5,83	6,76	-6,55	5,31	-7,45	5,75
FA 18:3	4,98	-5,32	4,89	-7,77	6,12	-11,05	3,96
FA 18:4	3,16	-4,9	5,05	-10,66	9,84	-12,39	4,1
FA 20:1	6,27	-5,61	4,43	-4,04	9,51	-12	4,16
FA 20:2	7,43	-8,32	3,2	-8,34	5,79	-10,88	4,4
FA 20:4	1,99	-7,77	4,7	-7,62	5,5	-9,96	4,96
FA 20:5	4,17	-5,58	4,43	-5,98	6,16	-8,34	5,28
FA 22:4	3,36	-6,91	3,92	-8,64	5,92	-12,6	5,81
FA 22:6	2,24	-5,76	4,35	-7,07	5,24	-9,85	4,51
FA 24:0	<b>22,44</b>	<b>-34,79</b>	7,66	<b>-17,02</b>	<b>26,25</b>	-3,52	<b>32,59</b>
FA 24:1	9,86	-6,3	7,47	-2,1	6,79	-5,08	8,91
Hex2Cer d18:1/16:0	6,53	1,98	2,56	2,96	6,89	-5,24	8,46
Hex2Cer d18:1/24:1	10,03	8,04	12,88	1,29	<b>15,95</b>	-3,36	<b>20,98</b>
HexCer d18:1/16:0	8,43	7,57	2,86	10,4	12,23	1,81	5,52
HexCer d18:1/24:0	4,43	2,14	3,8	0,11	8,4	-8,32	11,42
LPC 14:0	6,94	9,75	5,96	4,6	7,05	-7,07	<b>17,06</b>
LPC 15:0	4,29	5,94	5,08	-1,42	9,49	-12,24	14,85
LPC 16:0	3,25	3,53	4,13	-0,44	7,83	-8,9	12,03
LPC 16:1	4,34	6,12	7,17	0,47	9,16	-10,5	<b>15,72</b>
LPC 17:0	3,64	3,5	6,48	-2,26	9,71	-11,94	<b>15,12</b>
LPC 18:0	3,28	1,95	4,08	-2,07	7,18	-9,74	12,66

Einfluss der Inkubationszeit auf die Lipidextraktion

	1 min	10 min auf Eis		30 min auf Eis		30 min bei 6 °C	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
LPC 18:1	3,48	2,99	4,26	-1,68	7,52	-10,05	12,59
LPC 18:2	3,1	3,37	5,25	-0,77	7,13	-9,29	13,71
LPC 18:3	8,77	6,71	7,2	0,7	8,83	-8,34	<b>18,87</b>
LPC 20:0	6,26	0,86	6,99	-0,25	8,67	-10,21	14,49
LPC 20:1	4,02	0,08	5,46	-3,08	7,92	-11,96	12,92
LPC 20:2	5,16	4,39	4,03	-1,39	13,39	-13,32	14,99
LPC 20:3	3,64	2,5	4,92	0,75	8,73	-6,5	14,9
LPC 20:4	3,78	3,38	4,54	0,24	8,6	-8,51	12,93
LPC 20:5	4,37	2,79	5,79	2	8,32	-5,71	<b>15,73</b>
LPC 22:0	8,72	-0,92	6,21	-1,9	8,64	<b>-16,18</b>	7,41
LPC 22:4	4,46	6,34	7,97	4,87	12,05	-4,6	12,51
LPC 22:5	8,93	-1,62	8,91	-2,75	8,18	-7,68	13,75
LPC 22:6	3,09	3,17	6,21	-1,09	9,15	-10,17	14,81
LPC 24:0	5	-2,36	4,02	-4,71	10,54	-11,24	13,36
LPC O-16:0	4,73	-2,54	4,49	-7,89	6,06	-11,94	4,53
LPC O-16:1	3,31	-6,32	3,99	<b>-15,56</b>	7,45	<b>-15,4</b>	6,58
LPC O-18:0	5,86	-4,61	6,36	-2,9	4,29	-1,85	8,82
LPC O-18:1	3,85	-3,1	4,98	-9,16	5,6	-11,63	4,62
LPE 16:0	4,96	-2,21	2,38	-8,5	5,81	-10,44	6,31
LPE 18:0	3,05	-5,35	4,24	-10,57	6,2	-12,62	5,78
LPE 18:1	4,52	-4,26	4,86	-10,28	6,74	-12,11	5,28
LPE 18:2	3,9	-3,1	3,8	-10,14	6,24	-12,23	4,9
LPE 20:3	7,56	-4,68	8,66	-4,39	5,77	-9,08	9,7
LPE 20:4	4,57	-1,75	3,3	1,14	7,14	-2,84	8,07
LPE 22:6	5,01	-6,52	6,83	-9	8,79	-11	8,22
LPE O-16:1	6,79	-5,02	7	<b>-16,97</b>	6,62	<b>-17,02</b>	6,27
LPE O-18:1	4,64	-6,33	7,43	<b>-15,75</b>	6,93	-13,74	6,22
LPI 18:0	6,29	4,73	2,83	-0,73	9,69	-8,56	6,97
LPI 18:2	9,3	<b>15,25</b>	8,68	2,94	12,91	-6,14	4,15
LPI 20:3	12,13	13,79	8,44	2,52	<b>16,49</b>	-3,4	13,89
LPI 20:4	5,39	14,37	9,11	3,47	13,24	-8,25	12,36
PC 30:0	3,06	1,67	3,08	-1,44	5,5	-4,43	8,68
PC 30:1	2,86	-1,5	3,56	-3,09	6,17	-7,67	8,99
PC 30:2	2,46	1,04	6,71	0,11	11,75	-8,63	13,73
PC 32:0	4,04	1,02	4	-0,1	4,72	-5,05	7,85
PC 32:1	2,74	0,53	3,12	-1,44	5,6	-4,46	6,25
PC 32:2	2,55	-1,23	3,51	-2,39	5,8	-7,93	7,84
PC 33:2	2,62	2,24	3,57	-1,95	6,36	-5,25	7,91
PC 34:0	2,75	0,64	4,53	-0,96	7,27	-7,84	8,97
PC 34:1	1,45	-0,07	2,55	-0,25	4,18	-5,13	6,07
PC 34:2	2,43	-0,08	2,48	-0,66	3,79	-4,48	5,75
PC 34:3	3,27	1,22	3,02	-1,12	6	-9,12	10,01
PC 34:4	3,16	-1,42	3,63	-3,27	5,53	-8,19	8,41
PC 34:5	3,42	-0,92	5,8	-2,33	10,11	-13,42	13,29
PC 36:1	2,24	0,43	3,09	-1,39	6,17	-7,32	9,03
PC 36:2	2,27	0,31	2,57	0,1	4,44	-5,5	6,21
PC 36:3	2,17	0,37	2,91	-0,8	4,18	-5,54	6,52
PC 36:4	2,25	-1,18	1,56	-1,67	4,52	-5,19	5,72
PC 36:5	2,84	0,1	3,88	-1,82	5,68	-7,26	8,97
PC 38:2	2,26	-0,73	3,56	-2,61	6,23	-8,45	8,78

Einfluss der Inkubationszeit auf die Lipidextraktion

	1 min	10 min auf Eis		30 min auf Eis		30 min bei 6 °C	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
PC 38:3	2,69	0,53	3,4	-1,04	6,07	-7,18	8,32
PC 38:4	2,19	0,96	2,72	0,33	3,76	-3,85	4,7
PC 38:6	2,23	0,22	3,46	-1,73	5,46	-6,54	7,89
PC 40:4	2,92	0,53	4,73	-1,94	7,07	-8,41	9,54
PC 40:6	4,61	0,1	3,67	-1,01	5,06	-6,72	8,53
PC 40:7	3,45	-0,83	3,37	-4,53	6,44	-7,16	9,67
PC O-16:0_16:0	1,91	-4,09	4,66	-2,37	4,51	-3,06	1,87
PC O-16:0_18:2	2,59	-5,16	5,74	-6,13	2,85	-4,47	3,64
PC O-16:0_20:4	3,34	-1,28	5,01	-1,94	4,56	-1,81	2,36
PC O-16:1_16:0	4,31	-2,82	6,35	-7,44	4,61	-3,91	3,5
PC O-16:1_18:1	5,33	-2,97	4,92	-5,17	2,88	-5,98	4
PC O-16:1_18:2	3,84	-3,44	3,64	-5,73	3,45	-6,64	2,08
PC O-16:1_20:4	4,84	-3,44	3,25	-6,15	3,26	-6	3,88
PC O-18:0_20:4	5,12	-4,4	5,99	-1,97	5,21	-5,87	4,5
PC O-18:1_20:4	3,09	-3,17	5,87	-2,98	4,19	-2,48	4,4
PC O-34:1	4,71	-3,69	2,53	-1,77	2,97	-3,44	4,12
PE 32:1	3,72	-7,67	4,09	-12,07	7,49	-13,57	5,23
PE 34:1	2,07	-3,72	4,49	-7,95	3,63	-8,13	4,21
PE 34:2	4,66	-6,04	3,68	-10,75	7,3	-12,2	4,24
PE 34:3	10,22	-4,13	9,53	-12,2	6,48	-12,88	8,84
PE 36:1	5,06	-7,11	5,71	-10,8	6,47	-12,12	5,01
PE 36:2	3,91	-3,11	2,45	-4,83	3,91	-5,41	3,7
PE 36:3	4,14	-4,27	4,58	-11,06	6,84	-11,61	4,08
PE 36:4	5,39	-6,77	5,42	-11,83	10,07	<b>-15,65</b>	7,1
PE 36:5	3,83	-7,98	7,5	-14,47	7,06	<b>-15,96</b>	6,54
PE 38:4	3,87	-0,79	2,3	-3,66	3,33	-3,39	3,2
PE 38:5	4,99	-3,58	4,33	-10,92	7,02	-10,57	7,5
PE 38:6	6,57	-5,97	8,69	-10,05	11,17	-11,82	8,08
PE 40:6	4	-7,18	5,08	-10,56	9,56	-13,74	6,6
PE 40:7	5	-8,6	5,62	<b>-15,02</b>	9,05	<b>-17,27</b>	3,98
PE O-16:1_18:2	3,67	-11,63	5,42	<b>-18,86</b>	9	<b>-20,27</b>	8,17
PE O-16:1_20:4	5,7	-8,46	5,12	-13,67	10,32	<b>-15,89</b>	6,61
PE O-18:1_18:1	6,14	-8,66	6,28	<b>-17,92</b>	6,8	-13,5	7,53
PE O-18:1_18:2	4,45	-8,08	4,96	<b>-15,39</b>	9,19	<b>-17,09</b>	6,15
PE O-18:1_20:4	5,72	-6,35	5,95	-14,02	7,45	-12,91	5,23
PE O-18:2_20:4	3,78	-9,52	6,15	<b>-17,59</b>	9,16	<b>-18,17</b>	7,39
PI 32:1	4,54	-2,39	3,72	-3,9	6,6	-8,16	5,15
PI 34:1	4,83	-2,36	2,37	-1,7	3,84	-4,56	3,03
PI 34:2	3,03	-1,92	3,37	-3,39	5,75	-6,92	3,7
PI 36:1	5,47	-5,7	4,91	-4,09	9,64	-8,79	5,26
PI 36:2	4,89	-4,2	3,25	-4,95	6,2	-7,87	4,69
PI 36:3	4,26	-6,15	6,08	-4,43	5,51	-9,72	4,71
PI 36:4	3,99	-1,8	4,8	-4,82	5,7	-8,31	5,37
PI 38:3	4,5	-4,06	3,65	-6,19	6,58	-8,88	4,65
PI 38:4	6,09	-2,87	4,52	-2,19	6,01	-4,48	3,4
PI 38:6	2,77	-7,03	6,11	-8,81	11,1	-14,53	5,86
PI 40:5	5,17	-3,79	6,99	-7,61	8,29	-12,64	10,28
PI 40:6	3,4	-3,38	5,66	-6,27	3,69	-7,34	3,82
PS 36:1	13,27	-2,48	8,51	-7,59	5,66	-6,83	7,19
SE 27:1/14:1	4,19	2,43	6,52	0,05	4,33	-1,6	6,59



Einfluss der Inkubationszeit auf die Lipidextraktion

	1 min	10 min auf Eis		30 min auf Eis		30 min bei 6 °C	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
SE 27:1/16:1	2,37	0,34	4,05	2,13	6,39	-2,02	4,63
SE 27:1/17:1	2,43	-1,66	4,73	-0,22	7,25	-5,51	5,1
SE 27:1/18:1	4,5	0,02	3,87	1,12	7,05	-3,39	5,77
SE 27:1/18:2	2,75	-0,61	2,51	-0,36	5,07	-4,57	6,18
SE 27:1/20:3	3,73	-0,87	2,64	-1,14	4,39	-4,89	6,42
SE 27:1/20:4	2,47	-0,44	2,22	0,57	5,51	-3,7	5,24
SE 27:1/20:5	1,96	0,56	4,43	0,35	7,77	-4,93	7,5
SE 27:1/22:4	3,03	-0,47	12,89	-1,55	8,77	-3,25	<b>15,37</b>
SE 27:1/22:6	1,98	-0,16	3,49	-0,53	6,62	-5,34	7,33
SE 27:1/24:1	8,01	3,1	7,36	7,4	<b>15,91</b>	3,79	9,8
SM 30:1	2,13	0,18	5,04	-4,31	7,44	-11,21	13,65
SM 32:1	2,93	-1,03	4,34	-3,31	6,69	-8,58	9,47
SM 32:2	3,26	-0,25	5,66	-1,61	8,48	-11,38	13,56
SM 33:1	3,01	0,87	5	-1,73	7,19	-6,64	8,51
SM 33:2	4,19	1,93	3,67	3,66	9,1	-11,22	11,86
SM 34:0	5,56	1,08	6,51	2,5	7,43	-4,26	10,68
SM 34:1	2,58	0,58	2,35	-0,6	4,69	-5,43	6,91
SM 34:2	3,02	-0,87	3,61	-2,78	4,66	-7,35	7,51
SM 35:1	1,61	0,55	5,42	-3,9	3,15	-8,27	8,74
SM 36:0	6,88	5,56	6,15	3,84	7,9	-5,79	14,19
SM 36:1	2,53	-0,26	2,7	-0,71	4,9	-5,64	7,65
SM 36:2	3,61	0,44	2,12	-1,67	6,05	-3,94	8,16
SM 36:3	7,63	2,86	7,36	-4,41	11,35	-5,77	11,61
SM 37:1	5,2	-1,76	8,16	-1,59	5,58	-9,66	12,24
SM 38:1	1,77	0,73	4,47	-1,25	6,8	-8,22	8,97
SM 38:2	2,33	-0,16	3,65	-0,4	5,37	-6,49	8,9
SM 39:1	2,54	-0,33	5,3	-0,75	7,29	-9,65	10,44
SM 40:1	2,83	0,09	5,17	0,12	7,77	-6,99	7,73
SM 40:2	2,06	0,52	4,72	-1,07	7,09	-8,23	9,83
SM 40:3	3,98	1,82	2,89	0,54	8,56	-5,71	9,95
SM 41:1	1,89	0,61	4,8	0,56	8,41	-8,24	9,31
SM 41:2	1,88	-0,02	5,53	-0,26	7,47	-8,41	9,35
SM 42:1	1,25	-0,6	4,18	0,18	8,21	-8,66	9,62
SM 42:2	2,48	0,17	4,39	-0,44	7,25	-7,53	8,16
SM 42:3	2,41	0,39	4,57	-1,26	7,09	-8,45	9,8
SM 43:1	6,8	2,33	8,79	2,32	11,45	-6,44	13,47
SM 43:2	4,42	2,51	6,62	3,49	11,18	-5,74	8,84
ST 19:2_OH2_S	5,45	<b>18,38</b>	4,13	7,73	10,21	0,23	10,14
ST 19:2_OH3_S	10,12	<b>40,47</b>	12,08	<b>15,57</b>	<b>16,24</b>	3,61	10,57
ST 27:1_OH	2,48	-4,79	3,42	-3,9	2,59	-8,7	6,7
ST 27:1_OH_S	9,08	-7,56	4,09	-7,81	5,84	-8,3	3,14
TG 42:1	6,13	2,65	3,89	6,35	10,55	-2,26	10,95
TG 42:2	6,94	-4,52	4,24	0,31	9,86	-6,95	9,68
TG 44:0	3,32	-0,42	3,91	2,44	8,29	-3,54	6,04
TG 44:1	2,44	-1,51	4,76	-0,04	8,39	-6,47	9,91
TG 44:2	5,22	-0,29	4,62	4,99	11,81	-5,02	10,73
TG 46:1	2,54	1,36	2,79	2,4	8,82	-4,26	7,21
TG 46:2	2,03	-1,45	3,81	-0,08	7,43	-7,29	9,26
TG 46:3	2,84	1,94	3,07	4,45	10,51	-5,2	10,29
TG 48:1	2,53	-0,14	2,79	-0,49	5,6	-4,23	6,44

Einfluss der Inkubationszeit auf die Lipidextraktion

	1 min	10 min auf Eis		30 min auf Eis		30 min bei 6 °C	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
TG 48:2	2,55	0,9	1,87	1,67	7,58	-4,65	6,71
TG 48:3	2,89	-0,97	3,36	-0,06	7,42	-7,16	9,24
TG 48:4	2,91	2,6	4,08	3,87	10,85	-5,79	9,93
TG 50:1	2,52	0,55	1,47	0,15	8,52	-3,82	6,93
TG 50:2	2,07	1,22	2,58	0,32	6,15	-3,98	6,9
TG 50:3	2,73	1,09	2,23	0,7	6,64	-5,13	6,66
TG 50:4	3,19	0,22	3,41	0,46	8,01	-6,37	8,84
TG 52:1	2,68	2,06	3,72	1,49	9,52	-4,63	8,35
TG 52:2	1,86	0,82	1,72	0,28	7,15	-5,2	6,54
TG 52:3	2,09	0,92	2,76	0,24	6,27	-4,01	7,46
TG 52:4	2,57	0,47	3,11	-0,5	6,39	-5,83	7,21
TG 52:5	3,13	0,71	3,7	0,72	7,65	-5,87	8,35
TG 54:1	2,82	3,82	6,38	2,88	12,96	-5,26	11,93
TG 54:2	2,78	1,61	4,03	0,75	9,5	-5,26	8,67
TG 54:3	1,76	0,43	2,34	0,79	8,14	-4,56	6,97
TG 54:4	3,11	-0,01	4,1	-0,47	7,48	-3,99	7,03
TG 54:5	4,65	3,27	5,81	-0,57	6,59	-3,2	7,26
TG 54:6	7,58	3,6	4,31	5,47	6,8	-3,7	8,27
TG 56:1	5,2	-7,5	3,02	-2,12	11,22	-3,25	13,74
TG 56:2	4,26	3,71	6,73	2,27	11	-6,73	12,44
TG 56:3	2,77	1,99	5,25	0,92	11,16	-6,25	10,7
TG 56:4	4,41	3,88	7,74	2,72	6,31	0,1	7,71
TG 56:5	3,68	2,72	4,83	-2	7,7	-5,71	9,7
TG 56:6	4,72	-2,66	5,65	-0,96	2,75	-5,83	8,02
TG 58:1	7,49	-0,8	11,07	2,27	<b>19,44</b>	0,1	<b>17,02</b>
TG 58:2	3,72	-3,55	6,76	-1,44	11,42	-9,15	<b>19,59</b>
TG 58:3	4,74	6,18	2,87	-1,11	<b>16,99</b>	-7,66	13,54
TG 58:6	3,91	-1,19	5,97	-3,04	10,74	-12,75	12,13
Thyroxin	4,21	-4,53	4,1	-7,14	10,6	-10,85	4,66

Tabelle 35: Verdünnungsintegrität (mit IS normalisiert).

Für die Verdünnungsintegrität wurde humanes Plasma mit Wasser so verdünnt, dass die relative Konzentration zur unverdünnten Probe 0,01; 0,04; 0,1; 0,2; 0,5 bzw. 1 (= unverdünnt) beträgt. Die Peakflächen von drei verschiedenen Verdünnungen wurden jeweils relativ zur Peakfläche in der unverdünnten Probe angegeben (in %). Die Ergebnisse der linearen Regression wurden gemittelt. Es wurden nur Analyten mit in die Auswertung genommen, bei denen für alle drei Geraden mind. 4 von 6 Werten vorhanden waren. Es wurden je drei Verdünnungen ausgewertet, bei denen der interne Standard vor bzw. nach der Extraktion zugegeben wurde. Die Peakflächen wurden zur Peakfläche des jeweiligen internen Standards normalisiert. postExtr = nach Extraktion mit IS dotiert, präExtr = vor Extraktion mit IS dotiert, b = Y-Achsenabschnitt, a = Steigung, R<sup>2</sup>= Korrelationsfaktor, Wichtung = 1/x.

Verdünnungsintegrität mit IS normalisiert	IS postExtr			IS präExtr		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
Cer d18:0/24:0	7,167	91,2	0,9577	6,244	82,0	0,9398
Cer d18:1/22:0	-2,010	93,4	0,9734	-2,662	93,2	0,9703
Cer d18:1/23:0	-1,275	93,1	0,9768	-0,542	87,4	0,961
Cer d18:1/24:0	-0,513	89,4	0,9704	-0,882	85,5	0,9447
Cer d18:1/24:1	-3,005	95,2	0,9766	-3,732	93,2	0,9622
DG 32:1	10,545	96,2	0,9528	12,119	93,3	0,9319
DG 32:2	13,994	98,6	0,9532	10,293	100,2	0,8934
DG 34:1	1,714	97,3	0,9954	2,232	94,8	0,9918
DG 34:2	-1,021	100,7	0,9969	-0,794	99,0	0,9961
DG 36:1	5,326	94,7	0,9922	5,717	91,4	0,9928
DG 36:2	-0,045	95,1	0,9915	0,549	92,2	0,9878
DG 36:3	-0,578	93,9	0,9866	-0,113	92,2	0,9867
DG 38:2	13,196	85,6	0,9895	24,792	66,8	0,9174
FA 16:1	8,470	98,7	0,9438	9,253	87,3	0,978
FA 17:1	10,933	98,1	0,9227	15,784	92,1	0,9392
FA 18:1	1,107	99,9	0,9938	1,808	98,2	0,9859
FA 18:2	-0,057	97,6	0,9904	0,331	95,3	0,9901
FA 18:3	-0,413	102,6	0,994	0,400	100,7	0,9965
FA 20:1	2,933	100,5	0,9838	3,880	100,4	0,9934
FA 20:2	2,722	98,4	0,9886	4,309	95,0	0,9744
FA 20:4	0,052	98,6	0,9954	0,346	96,1	0,996
FA 20:5	-0,454	103,2	0,995	0,031	102,4	0,9958
FA 22:4	-0,037	97,9	0,9886	0,593	98,2	0,9935
FA 22:6	-0,717	98,1	0,9944	-0,217	96,3	0,9954
FA 24:1	13,164	102,5	0,9252	14,549	104,0	0,9193
Hex2Cer d18:1/16:0	1,065	99,6	0,9931	2,499	99,8	0,99
LPC 14:0	-1,852	97,4	0,9935	-2,014	94,6	0,9843
LPC 15:0	1,903	92,8	0,9882	3,828	84,0	0,9118
LPC 16:0	-1,166	93,9	0,9837	-1,171	91,7	0,9771
LPC 16:1	-2,579	97,8	0,9905	-2,978	95,0	0,9822
LPC 17:0	-2,182	97,2	0,9905	-1,333	91,8	0,9792
LPC 18:0	-1,126	92,8	0,9764	-1,166	89,4	0,9656
LPC 18:1	-1,295	93,3	0,9776	-1,256	89,3	0,9637
LPC 18:2	-1,313	92,7	0,9775	-1,262	90,4	0,9692
LPC 18:3	-2,694	98,3	0,9918	-2,799	95,9	0,9869
LPC 20:3	-2,653	99,3	0,9944	-2,712	96,1	0,9882
LPC 20:4	-0,763	99,7	0,9922	-0,537	95,9	0,9913
LPC 20:5	-2,378	97,7	0,992	-3,187	97,6	0,9892
LPC 22:4	0,665	100,1	0,9863	0,964	99,0	0,9789
LPC 22:5	-1,395	99,3	0,9953	-1,798	97,2	0,9936
LPC 22:6	-1,865	96,5	0,9895	-0,727	92,6	0,9817
LPC O-16:0	-0,145	97,8	0,9945	-0,255	96,1	0,9935
LPC O-16:1	-3,915	102,3	0,9853	-2,697	95,6	0,982
LPC O-18:0	3,960	94,3	0,9897	2,756	96,7	0,9953
LPC O-18:1	-1,579	100,6	0,9951	-1,283	97,2	0,9941

Anhang

Verdünnungsintegrität mit IS normalisiert	IS postExtr			IS präExtr		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
LPE 16:0	-0,012	95,9	0,9899	0,310	96,4	0,9949
LPE 18:0	0,433	94,8	0,9859	0,867	94,5	0,9915
LPE 18:1	-0,052	95,8	0,9905	0,255	97,4	0,9971
LPE 18:2	-0,237	97,6	0,9934	-0,054	98,9	0,998
LPE 20:3	3,125	103,4	0,9744	2,882	107,5	0,9773
LPE 20:4	1,831	105,6	0,9766	2,037	111,9	0,9657
LPE 22:6	0,573	101,9	0,9895	0,808	106,0	0,9897
LPE O-16:1	9,999	84,1	0,9771	2,948	92,6	0,9906
LPE O-18:1	8,112	83,5	0,9378	3,138	91,6	0,9785
LPI 18:0	7,387	86,9	0,9843	6,111	102,2	0,9699
LPI 20:4	-2,226	98,1	0,9882	-0,306	102,6	0,9948
PC 30:0	-0,937	88,1	0,9619	-0,937	86,7	0,9564
PC 30:1	-1,064	91,0	0,975	-1,856	87,3	0,9494
PC 32:0	-1,096	88,8	0,963	-1,094	87,6	0,9578
PC 32:1	-0,861	96,0	0,9904	-0,814	91,4	0,9814
PC 32:2	-1,455	88,4	0,955	-1,408	87,0	0,9487
PC 33:2	-1,140	88,0	0,9592	-1,159	86,8	0,955
PC 34:0	-1,086	86,3	0,9497	-1,120	84,8	0,9408
PC 34:1	-0,989	94,8	0,9891	-0,883	95,3	0,9922
PC 34:2	-0,875	96,8	0,9946	-0,753	94,6	0,992
PC 34:3	-1,077	86,4	0,9475	-1,061	85,0	0,9389
PC 34:4	-3,369	92,7	0,9637	-1,573	86,3	0,9395
PC 36:1	-1,413	87,6	0,9525	-1,398	86,2	0,9461
PC 36:2	-1,082	95,0	0,989	-1,045	93,1	0,9848
PC 36:3	-1,380	91,3	0,9711	-1,316	89,1	0,9633
PC 36:4	-1,168	95,9	0,9896	-1,036	94,3	0,9889
PC 36:5	-1,612	87,1	0,945	-1,578	84,9	0,9317
PC 38:2	-1,442	87,0	0,951	-1,332	85,5	0,9423
PC 38:3	-1,455	88,5	0,9573	-1,430	86,9	0,9499
PC 38:4	-1,159	95,3	0,9888	-1,044	95,0	0,989
PC 38:6	-1,587	86,9	0,9463	-1,529	85,3	0,9389
PC 38:7	-5,017	94,8	0,9615	-5,338	93,1	0,9519
PC 40:4	-3,256	89,4	0,9466	-3,310	89,2	0,9488
PC 40:6	-1,588	87,1	0,9452	-1,507	85,7	0,94
PC 40:7	-3,213	92,7	0,9671	-1,471	86,6	0,9464
PC O-16:0_16:0	1,459	105,0	0,9871	8,942	99,1	0,9696
PC O-16:0_18:2	0,584	106,0	0,984	10,723	100,2	0,9593
PC O-16:0_20:4	-0,397	106,1	0,9838	8,587	101,9	0,9608
PC O-16:1_18:2	-0,767	104,1	0,99	3,984	102,2	0,987
PC O-16:1_20:4	-1,057	103,5	0,9907	4,722	100,2	0,9898
PC O-18:1_20:4	2,794	104,1	0,9787	10,308	99,6	0,9454
PE 34:1	-1,741	100,8	0,9838	1,054	96,9	0,9973
PE 34:2	-2,953	100,2	0,9829	-0,936	99,5	0,9974
PE 36:2	-1,633	97,8	0,9741	-0,132	96,9	0,9933
PE 36:3	-3,162	101,2	0,9824	-0,595	98,7	0,9979
PE 36:4	-4,333	100,0	0,9803	-1,211	94,0	0,9852
PE 38:4	-1,609	97,4	0,976	-0,022	96,1	0,994
PE 38:5	-3,269	102,4	0,9811	-0,887	100,0	0,9961
PE 38:6	-4,469	92,1	0,9414	-2,453	86,6	0,9341
PE 40:6	-6,708	100,4	0,9747	-2,182	90,7	0,9646
PE O-16:1_18:2	-6,013	97,9	0,9624	-3,693	94,3	0,9691
PE O-16:1_20:4	-5,868	94,6	0,9492	-3,712	89,0	0,9404
PE O-18:1_18:2	-7,841	105,9	0,977	-4,331	99,6	0,9885
PE O-18:1_20:4	-6,371	103,1	0,975	-3,679	98,4	0,986

Verdünnungsintegrität mit IS normalisiert	IS postExtr			IS präExtr		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
PI 34:1	-2,414	97,9	0,9902	-1,309	93,6	0,9787
PI 34:2	0,469	99,8	0,991	0,149	97,2	0,9934
PI 36:2	-2,324	97,2	0,9886	-0,596	91,6	0,9778
PI 36:4	1,510	98,5	0,9935	1,529	97,3	0,9952
PI 38:4	-1,855	94,4	0,9795	-0,449	89,0	0,9667
SE 27:1/16:1	-0,168	100,5	0,9884	-0,307	95,8	0,9912
SE 27:1/17:1	0,202	102,3	0,9836	-2,470	96,4	0,9868
SE 27:1/18:1	-0,667	96,6	0,9929	-0,719	96,6	0,993
SE 27:1/18:2	-0,629	99,8	0,9936	-0,684	96,8	0,9924
SE 27:1/20:3	-0,868	98,8	0,9885	-0,821	97,1	0,9901
SE 27:1/20:4	-1,454	96,6	0,9696	-1,441	93,9	0,9771
SE 27:1/20:5	-1,746	85,9	0,9223	-1,742	81,4	0,8966
SE 27:1/22:6	-1,666	87,6	0,9347	-1,686	81,2	0,8981
SM 30:1	-3,175	93,8	0,9732	-3,008	93,8	0,9758
SM 32:1	-1,531	87,9	0,9486	-1,510	87,7	0,9487
SM 32:2	-3,362	93,7	0,9712	-3,343	93,9	0,9747
SM 33:1	-1,204	86,7	0,9494	-1,175	87,1	0,9529
SM 34:0	-0,766	92,8	0,9809	-0,833	93,0	0,9811
SM 34:1	-1,128	92,8	0,9791	-1,029	92,4	0,9812
SM 34:2	-1,591	88,8	0,9515	-1,587	90,1	0,958
SM 35:1	-0,884	90,8	0,9749	-0,880	91,3	0,9797
SM 36:1	-0,818	96,1	0,99	-0,731	95,3	0,9908
SM 36:2	-0,808	96,4	0,9899	-0,630	94,7	0,9926
SM 37:1	-2,857	96,0	0,9837	-3,107	94,9	0,9817
SM 38:1	-1,182	87,0	0,9531	-1,118	87,0	0,9542
SM 38:2	-1,048	92,9	0,981	-0,980	93,5	0,982
SM 39:1	-1,132	86,9	0,952	-1,043	87,1	0,9567
SM 40:1	-1,239	85,4	0,9413	-1,191	85,3	0,9428
SM 40:2	-1,412	85,3	0,9372	-1,347	86,0	0,9435
SM 40:3	-3,078	96,1	0,982	-3,006	96,6	0,9858
SM 41:1	-1,220	85,7	0,9441	-1,193	85,4	0,9435
SM 41:2	-1,306	86,4	0,948	-1,256	86,5	0,9512
SM 42:1	-1,336	84,1	0,9294	-1,330	84,3	0,9321
SM 42:2	-1,442	84,7	0,9313	-1,379	84,7	0,9351
SM 42:3	-1,487	85,3	0,9356	-1,434	85,5	0,9388
SM 43:2	-2,592	90,5	0,9603	-3,484	94,2	0,9748
ST 27:1_OH	-0,466	102,9	0,9891	-0,501	99,9	0,9856
TG 42:1	-0,062	87,2	0,9545	2,064	85,3	0,9599
TG 42:2	-0,899	89,6	0,9591	0,944	89,5	0,9693
TG 43:0	15,041	81,8	0,9685	21,766	73,8	0,9598
TG 44:0	3,359	87,7	0,9718	6,025	85,5	0,9793
TG 44:1	-0,193	86,6	0,9499	1,235	85,3	0,9534
TG 44:2	-1,210	87,8	0,9504	0,735	87,6	0,9634
TG 46:0	8,265	95,3	0,9925	10,964	90,7	0,9921
TG 46:1	0,238	90,5	0,9722	1,106	89,3	0,9756
TG 46:2	-0,367	87,0	0,9478	0,477	84,5	0,9425
TG 46:3	-1,608	89,6	0,9562	0,068	88,6	0,9659
TG 48:1	0,058	94,9	0,9877	0,145	92,4	0,9837
TG 48:2	-0,440	91,8	0,9734	-0,408	91,6	0,9775
TG 48:3	-2,074	89,4	0,9512	-1,497	86,9	0,9451
TG 48:4	-4,194	95,0	0,9665	-3,047	93,6	0,9745
TG 50:1	-0,384	94,2	0,9896	-0,393	91,5	0,9825
TG 50:2	-0,854	94,7	0,9851	-0,880	95,3	0,9871
TG 50:3	-1,198	93,1	0,9714	-1,236	92,3	0,9752

## Anhang

Verdünnungsintegrität mit IS normalisiert	IS postExtr			IS präExtr		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
TG 50:4	-2,419	90,0	0,9524	-2,092	87,6	0,9462
TG 52:1	-0,978	88,9	0,9639	-0,844	85,2	0,9427
TG 52:2	-0,962	96,4	0,9889	-0,935	95,4	0,989
TG 52:3	-1,136	96,1	0,9858	-1,135	95,9	0,9877
TG 52:4	-1,341	94,5	0,973	-1,349	91,3	0,9692
TG 52:5	-2,556	90,0	0,9522	-4,185	92,9	0,9624
TG 54:1	0,075	89,9	0,9737	1,767	85,7	0,9617
TG 54:2	-1,166	89,2	0,9579	-0,671	87,2	0,9551
TG 54:3	-1,023	95,2	0,9849	-0,678	94,6	0,9868
TG 54:4	-1,145	94,3	0,981	-0,917	93,9	0,9827
TG 54:5	-1,253	94,7	0,9758	-0,964	91,9	0,9759
TG 54:6	-2,358	91,5	0,9601	-1,010	88,7	0,9608
TG 56:2	-1,645	92,2	0,9692	0,739	87,3	0,9628
TG 56:3	-1,822	92,9	0,9691	-0,396	90,0	0,9717
TG 56:4	-2,281	97,9	0,9921	-2,480	98,4	0,9922
TG 56:6	-1,217	93,8	0,9808	-1,106	93,6	0,9808
<b>Mittelwert</b>			0,9734			0,9704
<b>Median</b>			0,9776			0,9773

Tabelle 36: Verdünnungsintegrität (ohne Normalisierung).

Für die Verdünnungsintegrität wurde humanes Plasma mit Wasser so verdünnt, dass die relative Konzentration zur unverdünnten Probe 0,01; 0,04; 0,1; 0,2; 0,5 bzw. 1 (= unverdünnt) beträgt. Die chromatographischen Peakflächen von drei verschiedenen Verdünnungen wurden jeweils relativ zur Peakfläche in der unverdünnten Probe angegeben (in %). Die Ergebnisse der linearen Regression wurden gemittelt. Es wurden nur Analyten mit in die Auswertung genommen, bei denen für alle drei Geraden mind. 4 von 6 Werten vorhanden waren. Es wurden je drei Verdünnungen ausgewertet, bei denen der interne Standard vor bzw. nach der Extraktion zugegeben wurde. Die Peakflächen wurden nicht normalisiert. postExtr = nach Extraktion mit IS dotiert, präExtr = vor Extraktion mit IS dotiert, b = Y-Achsenabschnitt, a = Steigung, R<sup>2</sup> = Korrelationsfaktor, Wichtung = 1/x.

Verdünnungsintegrität ohne Normalisierung	Post-Extraktion			Prä-Extraktion		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
Cer d18:0/24:0	8,608	97,3	0,9682	8,096	88,3	0,9741
Cer d18:1/22:0	-1,177	97,0	0,9921	-1,945	99,0	0,9943
Cer d18:1/23:0	-0,721	97,7	0,9945	-0,317	94,2	0,991
Cer d18:1/24:0	-0,314	94,6	0,9905	-0,711	91,6	0,9822
Cer d18:1/24:1	-2,410	99,3	0,9932	-2,886	97,9	0,9922
DG 32:1	9,672	97,1	0,9686	9,988	96,5	0,9423
DG 32:2	13,060	99,5	0,9557	8,038	104,0	0,9009
DG 34:1	1,476	97,4	0,9965	1,681	95,1	0,9926
DG 34:2	-1,188	100,6	0,9978	-1,202	99,1	0,9968
DG 36:1	4,796	95,2	0,9937	4,456	93,2	0,9953
DG 36:2	-0,154	94,9	0,9911	0,214	92,2	0,9869
DG 36:3	-0,649	93,7	0,9858	-0,350	92,0	0,9853
DG 38:2	12,422	86,8	0,9922	21,137	73,7	0,9702
FA 16:1	6,852	97,5	0,9501	6,373	86,2	0,9746
FA 17:1	9,121	96,8	0,9385	11,029	91,6	0,9782
FA 18:1	0,644	97,8	0,9895	0,836	93,6	0,9816
FA 18:2	-0,340	95,6	0,9829	-0,250	90,9	0,9761
FA 18:3	-0,760	100,1	0,992	-0,190	95,4	0,9919
FA 20:1	2,349	98,3	0,9836	2,368	96,0	0,9943
FA 20:2	1,813	96,9	0,9884	2,169	92,5	0,9805
FA 20:4	-0,228	96,2	0,9905	-0,226	91,5	0,9824
FA 20:5	-0,764	100,8	0,9939	-0,480	96,9	0,9939
FA 22:4	-0,498	96,0	0,9849	-0,442	94,2	0,9883
FA 22:6	-0,910	95,8	0,9889	-0,648	91,5	0,9818
FA 24:1	10,899	101,6	0,9559	9,786	102,1	0,9599
Hex2Cer d18:1/16:0	0,448	99,6	0,9977	0,203	98,8	0,9929
LPC 14:0	-1,425	99,7	0,9973	-1,751	97,3	0,9932
LPC 15:0	2,229	95,9	0,9946	3,747	88,1	0,9489
LPC 16:0	-1,077	96,9	0,9905	-1,129	94,9	0,9873
LPC 16:1	-2,085	99,7	0,995	-2,645	97,2	0,9921
LPC 17:0	-1,643	99,1	0,9954	-1,104	94,6	0,9889
LPC 18:0	-1,050	95,6	0,9843	-1,133	92,3	0,9785
LPC 18:1	-1,223	96,1	0,9851	-1,229	92,2	0,9766
LPC 18:2	-1,245	95,6	0,9856	-1,228	93,4	0,9809
LPC 18:3	-2,216	100,3	0,9954	-2,453	98,4	0,9948
LPC 20:3	-2,193	101,5	0,9973	-2,338	98,5	0,9957
LPC 20:4	-0,654	103,2	0,9934	-0,449	99,8	0,9928
LPC 20:5	-1,848	99,6	0,9961	-2,603	99,7	0,9957
LPC 22:4	1,959	101,1	0,9839	2,093	101,4	0,9657
LPC 22:5	-0,761	101,2	0,9972	-1,324	99,7	0,9973
LPC 22:6	-1,474	98,7	0,9946	-0,674	95,8	0,9912
LPC O-16:0	-0,052	99,6	0,9952	-0,241	96,9	0,995
LPC O-16:1	-3,621	103,6	0,9832	-2,646	96,2	0,9837
LPC O-18:0	4,228	96,1	0,99	2,781	97,6	0,9963
LPC O-18:1	-1,276	101,9	0,9947	-1,275	97,9	0,9955

Anhang

Verdünnungsintegrität ohne Normalisierung	Post-Extraktion			Prä-Extraktion		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
LPE 16:0	0,002	96,2	0,9875	-0,137	92,2	0,9809
LPE 18:0	0,456	95,0	0,9833	0,301	90,7	0,9748
LPE 18:1	-0,032	96,0	0,9885	-0,178	93,1	0,9835
LPE 18:2	-0,211	97,8	0,9915	-0,423	94,4	0,9864
LPE 20:3	3,125	103,6	0,9724	1,637	102,7	0,9909
LPE 20:4	1,895	105,7	0,976	1,251	105,7	0,9819
LPE 22:6	0,609	102,0	0,9884	0,273	100,8	0,9907
LPE O-16:1	10,094	84,2	0,974	1,683	90,6	0,9657
LPE O-18:1	8,204	83,5	0,9349	2,069	89,1	0,9551
LPI 18:0	7,014	91,2	0,9939	3,655	96,6	0,9869
LPI 20:4	-2,217	101,0	0,995	-1,738	98,4	0,9886
PC 30:0	-0,346	97,7	0,9951	-0,528	95,3	0,9933
PC 30:1	0,263	99,9	0,9951	-1,270	94,8	0,989
PC 32:0	-0,595	98,6	0,9942	-0,735	96,3	0,9922
PC 32:1	-0,216	108,5	0,9887	-0,326	101,6	0,9984
PC 32:2	-1,152	98,1	0,9877	-1,178	95,5	0,984
PC 33:2	-0,661	97,5	0,993	-0,839	95,3	0,9918
PC 34:0	-0,592	95,2	0,9902	-0,793	92,7	0,9846
PC 34:1	-0,414	107,1	0,9919	-0,399	106,7	0,9934
PC 34:2	-0,233	109,7	0,9878	-0,231	105,9	0,9942
PC 34:3	-0,572	95,4	0,9869	-0,680	92,7	0,9809
PC 34:4	-2,514	100,6	0,9897	-1,407	94,4	0,9775
PC 36:1	-1,088	97,0	0,9881	-1,167	94,4	0,9852
PC 36:2	-0,559	107,4	0,9917	-0,640	103,7	0,9971
PC 36:3	-1,034	102,0	0,9927	-1,040	98,2	0,9923
PC 36:4	-0,691	108,4	0,9894	-0,625	105,5	0,9945
PC 36:5	-1,404	96,2	0,9818	-1,423	92,5	0,973
PC 38:2	-1,141	96,3	0,9892	-1,077	93,5	0,9836
PC 38:3	-1,161	98,2	0,9894	-1,205	95,4	0,9859
PC 38:4	-0,680	107,8	0,9902	-0,641	106,3	0,9933
PC 38:6	-1,360	96,1	0,9848	-1,342	93,1	0,98
PC 38:7	-2,969	99,7	0,9881	-3,910	97,6	0,9857
PC 40:4	-2,365	96,2	0,9848	-2,548	95,5	0,9859
PC 40:6	-1,367	96,2	0,9823	-1,322	93,7	0,9798
PC 40:7	-2,291	100,6	0,9931	-1,269	94,9	0,9834
PC O-16:0_16:0	5,211	112,4	0,9402	4,459	108,3	0,9636
PC O-16:0_18:2	3,808	114,1	0,9288	5,573	110,9	0,9454
PC O-16:0_20:4	2,349	114,7	0,932	3,609	112,8	0,9462
PC O-16:1_18:2	4,651	106,7	0,9453	1,395	108,7	0,966
PC O-16:1_20:4	4,650	104,9	0,9529	1,969	107,2	0,9659
PC O-18:1_20:4	7,933	109,2	0,9174	5,640	109,4	0,9385
PE 34:1	4,478	98,9	0,9777	3,696	96,4	0,9815
PE 34:2	-0,009	103,6	0,988	1,088	99,7	0,9866
PE 36:2	-0,260	104,9	0,9822	0,548	100,2	0,9888
PE 36:3	0,653	103,1	0,9762	1,507	98,9	0,983
PE 36:4	-1,291	102,1	0,9876	-0,176	95,7	0,9826
PE 38:4	-0,238	104,5	0,9802	0,671	99,6	0,987
PE 38:5	2,100	101,4	0,9775	1,210	100,2	0,9835
PE 38:6	-3,109	95,1	0,9688	-1,483	87,0	0,9414
PE 40:6	-2,191	98,5	0,9858	-0,697	90,8	0,9639
PE O-16:1_18:2	-2,641	98,1	0,9751	-2,181	94,4	0,9609
PE O-16:1_20:4	-3,919	96,5	0,9724	-2,806	89,5	0,9452
PE O-18:1_18:2	-3,970	105,5	0,9786	-2,935	100,4	0,9763
PE O-18:1_20:4	-3,150	104,3	0,98	-2,123	98,8	0,9701



Verdünnungsintegrität ohne Normalisierung	Post-Extraktion			Prä-Extraktion		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
PI 34:1	-0,141	102,2	0,9969	0,181	99,6	0,9939
PI 34:2	5,848	99,9	0,9812	3,081	102,0	0,9892
PI 36:2	-0,840	102,8	0,9969	-0,060	99,9	0,9948
PI 36:4	6,196	100,3	0,9798	4,901	102,1	0,9806
PI 38:4	-1,235	101,7	0,9938	-0,118	97,3	0,9889
SE 27:1/16:1	4,001	124,9	0,892	3,195	118,0	0,9274
SE 27:1/17:1	8,520	119,0	0,8424	4,401	107,3	0,9554
SE 27:1/18:1	2,333	120,5	0,9139	2,011	120,5	0,936
SE 27:1/18:2	2,529	125,5	0,8941	2,023	120,6	0,9258
SE 27:1/20:3	1,789	123,0	0,9252	1,656	120,9	0,9366
SE 27:1/20:4	-0,011	119,2	0,9555	-0,240	115,4	0,9706
SE 27:1/20:5	-1,065	99,8	0,9877	-1,219	93,9	0,9796
SE 27:1/22:6	-0,832	102,4	0,9912	-1,080	93,8	0,9833
SM 30:1	-1,573	99,2	0,9964	-1,976	96,9	0,9928
SM 32:1	-1,294	96,0	0,9809	-1,380	92,5	0,9735
SM 32:2	-1,859	99,2	0,9948	-2,413	97,1	0,9921
SM 33:1	-0,817	94,5	0,9869	-0,966	91,8	0,9792
SM 34:0	-0,167	102,4	0,9967	-0,512	98,8	0,9949
SM 34:1	-0,679	102,5	0,9953	-0,771	98,2	0,9964
SM 34:2	-1,397	97,0	0,9811	-1,458	95,2	0,9783
SM 35:1	-0,352	100,1	0,9968	-0,587	96,9	0,9964
SM 36:1	-0,209	107,0	0,9909	-0,400	101,8	0,9978
SM 36:2	-0,198	107,5	0,9903	-0,274	101,2	0,9985
SM 37:1	-1,094	102,1	0,9969	-2,095	98,3	0,9963
SM 38:1	-0,777	94,9	0,9892	-0,895	91,8	0,9808
SM 38:2	-0,582	102,7	0,9963	-0,701	99,4	0,9956
SM 39:1	-0,711	94,6	0,9888	-0,801	92,0	0,9831
SM 40:1	-0,870	92,9	0,9816	-0,987	89,8	0,9717
SM 40:2	-1,127	92,6	0,9774	-1,176	90,5	0,9715
SM 40:3	-1,400	102,3	0,9945	-1,975	100,2	0,997
SM 41:1	-0,840	93,4	0,9836	-0,993	89,9	0,9727
SM 41:2	-0,973	94,1	0,9858	-1,056	91,2	0,9785
SM 42:1	-1,018	91,1	0,9731	-1,167	88,4	0,9622
SM 42:2	-1,181	91,9	0,9729	-1,218	89,0	0,9649
SM 42:3	-1,250	92,6	0,9757	-1,289	89,8	0,967
SM 43:2	-1,322	96,4	0,9884	-2,594	97,5	0,992
ST 27:1_OH	3,979	111,8	0,9296	3,790	111,6	0,9364
TG 42:1	1,683	94,3	0,9935	5,000	88,3	0,9861
TG 42:2	1,207	95,8	0,9941	4,222	92,1	0,9941
TG 43:0	29,417	76,3	0,9631	38,284	59,6	0,912
TG 44:0	7,976	92,9	0,9942	11,695	86,1	0,9852
TG 44:1	1,449	93,6	0,9904	3,603	88,9	0,9824
TG 44:2	0,666	93,6	0,9911	3,186	90,9	0,9907
TG 46:0	17,100	101,3	0,9153	19,773	89,8	0,9421
TG 46:1	2,288	98,7	0,9942	3,407	94,2	0,9916
TG 46:2	1,121	94,0	0,9885	2,260	88,2	0,975
TG 46:3	-0,055	96,2	0,9929	2,002	92,8	0,9914
TG 48:1	1,951	105,2	0,9902	1,663	98,9	0,9958
TG 48:2	1,015	101,0	0,995	0,728	98,1	0,9946
TG 48:3	-0,877	96,1	0,9897	-0,496	91,6	0,9784
TG 48:4	-1,487	98,7	0,9928	-1,272	96,8	0,9938
TG 50:1	1,087	105,2	0,9875	0,667	98,3	0,9947
TG 50:2	0,230	105,6	0,9932	-0,139	103,0	0,996
TG 50:3	-0,398	103,1	0,993	-0,725	99,3	0,9941

## Anhang

Verdünnungsintegrität ohne Normalisierung	Post-Extraktion			Prä-Extraktion		
	b	a	R <sup>2</sup>	b	a	R <sup>2</sup>
TG 50:4	-1,523	97,2	0,9905	-1,547	92,8	0,9799
TG 52:1	-0,033	97,9	0,9954	-0,061	90,6	0,9732
TG 52:2	0,031	108,0	0,9897	-0,264	103,3	0,9969
TG 52:3	-0,283	107,6	0,9906	-0,586	103,9	0,9955
TG 52:4	-0,658	105,0	0,9898	-0,921	98,1	0,9907
TG 52:5	-1,781	97,3	0,9902	-3,070	96,6	0,9866
TG 54:1	1,950	98,4	0,9973	4,535	89,3	0,984
TG 54:2	-0,363	97,8	0,9939	0,265	92,6	0,9842
TG 54:3	-0,091	106,2	0,9942	0,161	102,0	0,9985
TG 54:4	-0,320	105,0	0,9956	-0,214	101,2	0,997
TG 54:5	-0,506	105,1	0,9931	-0,283	98,6	0,9959
TG 54:6	-1,405	99,1	0,9937	-0,346	94,7	0,9882
TG 56:2	-0,089	99,8	0,9962	3,303	90,7	0,987
TG 56:3	-0,440	100,9	0,9957	0,668	96,0	0,9938
TG 56:4	0,088	105,4	0,991	-0,204	102,2	0,9957
TG 56:6	-0,459	104,5	0,9965	-0,569	101,0	0,9972
<b>Mittelwert</b>			0,9818			0,9809
<b>Median</b>			0,9895			0,9857

Tabelle 37: Verschleppung nach Injektion von Humanplasma.

Bestimmt wurde die Verschleppung in extrahierten Lösungsmittelproben nach Injektion von Humanplasma im Vergleich zur chromatographischen Peakfläche in Humanplasma. Des Weiteren wurde das Signal von extrahierten Lösungsmitteln ohne vorherige Plasmainjektion mit den Peakflächen in Plasma verglichen (Blanksignal). Bei einigen Analyten wie den Fettsäuren konnte die Verschleppung aufgrund der großen Blanksignale nicht ausgewertet werden. Das betrifft v.a. die gesättigten FA, zur besseren Übersichtlichkeit wurden auch die anderen FA dort mit aufgeführt. 0 = Verschleppung < Detektionslimit, - = kein Wert vorhanden, (n=3).

Analyt	Ø Verschleppung [%]	SD [%]	Ø Blanksignal	SD Blank [%]
Cer d18:1/16:0	0	0	0	0
Cer d18:1/22:0	0	0	0,8	1,12
Cer d18:1/23:0	0	0	1,94	2,74
Cer d18:1/24:0	0	0	0	0
Cer d18:2/22:0	0	0	0	0
DG 32:1	0	0	0	0
DG 34:1	0	0	0	0
DG 34:2	0	0	0	0
DG 36:1	0	0	0	0
DG 36:2	0	0	0	0
DG 36:3	0	0	0	0
DG 36:4	0	0	0	0
DG 38:6	0	0	0	0
Hex2Cer d18:1/16:0	0	0	0	0
Hex2Cer d18:1/24:1	0	0	0	0
HexCer d18:1/16:0	0	0	0	0
HexCer d18:1/24:0	0	0	0	0
LPC 14:0	0	0	0	0
LPC 15:0	0	0	0	0
LPC 16:0	0,03	0,01	0	0
LPC 16:1	0	0	0,56	0,79
LPC 17:0	0	0	0	0
LPC 18:0	0,02	0,04	0	0
LPC 18:1	0,01	0,02	0	0
LPC 18:2	0,08	0,07	0,01	0,01
LPC 18:3	0	-	0	-
LPC 20:0	0	0	0	0
LPC 20:1	0	0	0	0
LPC 20:2	0	0	0	0
LPC 20:3	0	0	0	0
LPC 20:4	0	0	0	0
LPC 20:5	0	0	0	0
LPC 22:0	0	-	0	-
LPC 22:4	0	-	0	-
LPC 22:5	0	-	0	-
LPC 22:6	0	0	0	0
LPC 24:0	0	-	0	-
LPC O-16:0	0	0	0	0
LPC O-16:1	0	0	0	0
LPC O-18:0	0	0	0	0
LPC O-18:1	0	0	0	0
LPE 16:0	0	0	0,49	0,69
LPE 18:0	0,14	0,24	0	0
LPE 18:1	0,32	0,56	0,48	0,67
LPE 18:2	0,07	0,13	0,22	0,3
LPE 20:3	0	0	0	0
LPE 20:4	0,28	0,25	0,07	0,09

## Anhang

Analyt	Ø Verschleppung [%]	SD [%]	Ø Blanksignal	SD Blank [%]
LPE 22:6	0,14	0,24	0	0
LPE O-16:1	0	0	0	0
LPE O-18:1	0,52	0,89	1,92	2,71
LPI 18:0	0	0	2,62	3,71
LPI 18:2	0	-	0	-
LPI 20:3	0	-	0	-
LPI 20:4	0	0	1,35	1,9
PC 30:0	0	0	0	0
PC 30:1	0	0	0	0
PC 30:2	0	-	0	-
PC 32:0	0,01	0,02	0	0
PC 32:1	0,02	0,04	0	0
PC 32:2	0	0	0	0
PC 33:2	0	0	0	0
PC 34:0	0	0	0	0
PC 34:1	0,02	0,02	0	0
PC 34:2	0,06	0,02	0	0
PC 34:3	0,02	0,01	0	0
PC 34:4	0	0	0	0
PC 34:5	0	0	0	0
PC 36:1	0,01	0,01	0	0
PC 36:2	0,03	0,01	0	0
PC 36:3	0,01	0,01	0	0
PC 36:4	0,03	0,01	0	0
PC 36:5	0,01	0,01	0	0
PC 38:2	0	0	0	0
PC 38:3	0,01	0,01	0	0
PC 38:4	0,03	0,01	0	0
PC 38:6	0,02	0,01	0	0
PC 40:4	0	0	0	0
PC 40:6	0,02	0,01	0	0
PC 40:7	0,03	0,06	0,16	0,01
PC O-16:0_16:0	0	0	0	0
PC O-16:0_18:2	0	0	0	0
PC O-16:0_20:4	0	0	0	0
PC O-16:1_16:0	0	0	0	0
PC O-16:1_18:1	0	0	0	0
PC O-16:1_18:2	0	0	0	0
PC O-16:1_20:4	0	0	0	0
PC O-18:0_20:4	0	0	0	0
PC O-18:1_20:4	0	0	0	0
PC O-34:1	0	0	0	0
PE 32:1	0	-	0	-
PE 34:1	0	0	9,02	12,75
PE 34:2	0	0	0	0
PE 36:2	0	0	1,73	2,44
PE 36:3	0	0	0	0
PE 36:4	0	0	0	0
PE 36:5	0	0	0	0
PE 38:4	0,24	0,41	0	0
PE 38:5	0	0	0	0
PE 38:6	0	0	0	0
PE 40:6	0	0	0	0
PE O-16:1_18:2	0	0	0	0
PE O-16:1_20:4	0,09	0,16	0	0

Analyt	Ø Verschleppung [%]	SD [%]	Ø Blanksignal	SD Blank [%]
PE O-18:1_18:1	0	0	0	0
PE O-18:1_18:2	0	0	0	0
PE O-18:1_20:4	0,16	0,27	0	0
PE O-18:2_20:4	0	0	0	0
PI 32:1	0	0	0	0
PI 34:1	0	0	0	0
PI 34:2	0	0	0	0
PI 36:1	0	0	0	0
PI 36:2	0	0	0	0
PI 36:3	0	0	0	0
PI 36:4	0	0	0	0
PI 38:3	0	-	0	-
PI 38:4	0,19	0,2	0	0
PI 38:6	0	-	0	-
PI 40:6	0	-	0	-
SE 27:1/14:1	0	0	0	0
SE 27:1/16:1	0	0	0	0
SE 27:1/17:1	0	0	0	0
SE 27:1/18:1	0	0	0	0
SE 27:1/18:2	0	0,01	0	0
SE 27:1/20:3	0	0	0,01	0,01
SE 27:1/20:4	0	0	0	0
SE 27:1/20:5	0	0	0	0
SE 27:1/22:4	0	0	0	0
SE 27:1/22:6	0	0	0,11	0,15
SE 27:1/24:1	0	-	0	-
SM 30:1	0	0	0	0
SM 32:1	0,01	0,01	0,02	0,02
SM 32:2	0	0	0,74	1,04
SM 33:1	0	0	0	0
SM 33:2	0	0	0	0
SM 34:0	0	0	0	0
SM 34:1	0,02	0,01	0,01	0,01
SM 34:2	0	0,01	0,03	0,04
SM 35:1	0	0	0	0
SM 36:1	0,01	0,02	0	0
SM 36:2	0	0	0	0
SM 36:3	0	0	0,48	0,67
SM 37:1	0	0	0	0
SM 38:1	0,01	0,02	0	0
SM 38:2	0	0	0	0
SM 39:1	0	0	0	0
SM 40:1	0,02	0,01	0	0
SM 40:2	0	0,01	0	0
SM 40:3	0	0	0,1	0,13
SM 41:1	0	0	0	0
SM 41:2	0	0	0	0
SM 42:1	0	0	0	0
SM 42:2	0,01	0,01	0	0
SM 42:3	0,01	0,01	0	0
SM 43:1	0	0	0	0
SM 43:2	0	0	0,13	0,18
ST 19:2_OH2_S	0	0	0,19	0,27
ST 19:2_OH3_S	0	-	0	-
ST 27:1_OH	0	0	0	0

## Anhang

Analyt	Ø Verschleppung [%]	SD [%]	Ø Blanksignal	SD Blank [%]
ST 27:1_OH_S	0,21	0,17	2,55	2,42
TG 42:1	0	0	1,78	2,52
TG 42:2	0	0	0	0
TG 44:1	0,2	0,34	0	0
TG 44:2	0	0	0	0
TG 46:1	0,29	0,5	1,95	2,65
TG 46:2	0,14	0,25	1,06	1,5
TG 46:3	0	0	0	0
TG 48:1	0,12	0,15	0,76	0,92
TG 48:2	0,05	0,08	0,44	0,52
TG 48:3	0	0	0,32	0,37
TG 48:4	0	0	1,01	1,42
TG 50:1	0,04	0,07	0,26	0,25
TG 50:2	0,01	0,02	0,19	0,02
TG 50:3	0	0	0,14	0,04
TG 50:4	0	0	0	0
TG 52:1	0	0	0,12	0,04
TG 52:2	0,01	0,01	0,06	0,01
TG 52:3	0,01	0,01	0,09	0,08
TG 52:4	0,01	0,02	0,1	0,11
TG 52:5	0	0	0,1	0,01
TG 54:1	0	0	0,74	1,04
TG 54:2	0	0	0,08	0,11
TG 54:3	0,04	0,04	0,15	0,06
TG 54:4	0,01	0,02	0,13	0,1
TG 54:5	0,02	0,03	0,03	0,01
TG 54:6	0	0	0	0
TG 56:1	0	0	0	0
TG 56:2	0	0	0	0
TG 56:3	0	0	0	0
TG 56:4	0	0	0	0
TG 56:5	0	0	0	0
TG 56:6	0	0	0	0
TG 58:1	0	-	0	-
TG 58:2	0	0	0	0
TG 58:3	0	0	0	0
TG 58:4	0	0	0	0
TG 58:6	0	-	0	-
Thyroxin	0	0	0	0
<b>Mittelwert</b>	0,020	0,031	0,180	0,259
<b>Median</b>	0	0	0	0
<b>Werte &gt; 1%</b>	0	0	11	14
<b>Maximaler Wert</b>	0,52	0,89	9,02	12,75
<b>Analyten bzw. Analytklassen mit hohen Blanksignalen</b>				
DG 38:5	2,16	3,75	2,22	3,13
FA 14:0	10,97	3,33	<b>38,52</b>	<b>21,26</b>
FA 15:0	8,78	15,21	<b>76,23</b>	<b>21,95</b>
FA 16:0	4,44	4,31	<b>65,17</b>	<b>47,35</b>
FA 16:1	3,4	5,89	<b>26,41</b>	4,82
FA 17:0	5,76	9,98	<b>61,1</b>	<b>26,72</b>
FA 17:1	4,95	8,57	<b>42,18</b>	6,78
FA 18:0	6,09	5,01	<b>87,69</b>	<b>44,92</b>
FA 18:1	2,21	3,02	9,48	11,22
FA 18:2	0,31	0,34	1,05	0,96

Analyt	Ø Verschleppung [%]	SD [%]	Ø Blanksignal	SD Blank [%]
FA 18:3	0	0	3,84	0,45
FA 18:4	0	0	0	-
FA 20:1	2,05	3,55	7,49	10,59
FA 20:2	0	-	0	-
FA 20:4	0,15	0,25	0,05	0,07
FA 20:5	0,23	0,4	5,62	7,94
FA 22:4	0	0	0	0
FA 22:6	0,04	0,08	0	0
FA 24:0	<b>26,27</b>	-	<b>254,74</b>	-
FA 24:1	0	-	0	-
TG 44:0	5,82	4,31	0,3	0,42

## Anhang

Tabelle 38: Robustheit der Methode durch Vergleich der Peakflächen in den Kontrollproben (Kontrollkarte). Über einen Zeitraum von ca. 10 Monaten wurden Kontrollproben gemessen und ausgewertet (n=48). Die so erhaltenen Peakflächen wurden entweder mit einem internen Standard pro Lipidklasse oder mit dem MPR korrigiert. Angegeben wird die relative Standardabweichung, die Anzahl Ergebnisse für diesen Analyten, sowie die Anzahl der Warnungen ( $> 2 \cdot SD$ ) und der Außer-Kontroll-Situationen ( $> 3 \cdot SD$ ). Es waren nicht alle Analyten in allen Auswertungen enthalten und für manche Analyten gab es keinen IS. Die IS wurden erst später für die Kontrollproben eingesetzt (n=36, ca. 6 Monate). Es werden nur Analyten mit  $\geq 20$  Werten (MPR) angegeben. Total = Anzahl Messwerte, Warn. = Anzahl Warnungen, AK = Anzahl Außer-Kontroll- Situationen.

	<b>Kontrollkarte</b>							
	RSD [%]	Korrektur mit IS			RSD [%]	Korrektur mit median peak ratio		
		Total	Warn.	AK		Total	Warn.	AK
<b>Cer d18:0/22:0</b>	13,08	34	1	0	15,97	46	4	0
<b>Cer d18:0/24:0</b>	27,86	34	0	0	34,12	46	0	0
<b>Cer d18:0/24:1</b>	13,97	36	1	0	12,44	36	1	0
<b>Cer d18:1/16:0</b>	11,19	36	0	0	19,12	48	2	1
<b>Cer d18:1/18:0</b>	18,53	36	1	1	20,57	48	2	1
<b>Cer d18:1/22:0</b>	11,76	36	1	0	19,54	48	4	0
<b>Cer d18:1/22:1</b>	14,85	34	1	0	18,35	38	2	0
<b>Cer d18:1/23:0</b>	10,83	36	1	0	18,87	48	4	0
<b>Cer d18:1/24:0</b>	13,75	36	0	0	24,11	48	4	0
<b>Cer d18:1/24:1</b>	12,72	36	1	0	29,68	48	3	1
<b>Cer d18:2/22:0</b>	14,29	34	1	0	17,44	44	2	0
<b>DG 32:1</b>	20,99	30	1	0	19,54	42	2	0
<b>DG 32:2</b>	27,08	24	0	0	25,38	30	2	1
<b>DG 34:1</b>	13,83	36	1	0	18,02	48	2	0
<b>DG 34:2</b>	10,43	36	1	0	18,94	48	2	0
<b>DG 34:3</b>	21,00	26	1	0	29,17	43	2	1
<b>DG 36:1</b>	13,13	36	1	0	19,58	48	2	0
<b>DG 36:2</b>	7,89	36	2	1	14,61	48	0	0
<b>DG 36:3</b>	9,66	36	3	0	15,82	48	0	0
<b>DG 36:4</b>	8,36	32	2	0	20,00	46	1	0
<b>DG 38:5</b>	19,23	32	1	0	26,78	46	2	2
<b>DG 38:6</b>	9,72	32	2	0	17,23	46	0	0
<b>FA 14:0</b>	17,79	18	1	0	41,21	34	1	0
<b>FA 16:1</b>	15,98	30	2	0	34,93	42	0	0
<b>FA 17:0</b>	28,51	11	0	0	50,51	22	1	0
<b>FA 17:1</b>	17,68	20	0	0	24,10	26	1	0
<b>FA 18:1</b>	13,33	36	2	0	25,45	48	2	0
<b>FA 18:2</b>	13,38	36	2	0	26,20	48	2	0
<b>FA 18:3</b>	10,58	36	1	0	23,39	48	2	0
<b>FA 20:1</b>	19,24	36	1	0	28,18	48	4	0
<b>FA 20:2</b>	18,69	34	1	0	24,64	46	3	0
<b>FA 20:4</b>	7,52	36	1	0	15,58	48	1	0
<b>FA 20:5</b>	12,05	34	1	0	18,73	45	3	0
<b>FA 22:4</b>	7,55	36	1	1	16,77	48	3	0
<b>FA 22:6</b>	6,96	36	2	0	14,99	48	3	0
<b>FA 24:1</b>	28,18	34	3	1	25,04	46	3	0
<b>Hex2Cer d18:1/16:0</b>	11,90	24	1	0	9,45	34	2	0
<b>Hex2Cer d18:1/24:1</b>	16,19	26	1	0	15,55	36	2	0



	Kontrollkarte							
	RSD [%]	Korrektur mit IS			Korrektur mit median peak ratio			
		Total	Warn.	AK	RSD [%]	Total	Warn.	AK
HexCer d18:1/16:0	15,77	34	2	0	23,59	46	3	0
HexCer d18:1/24:0	13,84	36	0	0	26,22	48	4	3
HexCer d18:1/24:1	16,07	32	1	0	22,02	44	4	0
LPC 14:0	10,67	36	4	0	19,58	48	2	1
LPC 15:0	10,62	36	4	0	17,90	48	3	1
LPC 16:0	8,57	36	3	1	16,90	48	2	1
LPC 16:1	10,53	36	4	0	19,27	48	3	1
LPC 17:0	8,37	36	4	0	17,30	48	3	1
LPC 18:0	8,40	36	4	1	17,65	48	3	1
LPC 18:1	7,87	36	4	0	17,02	48	3	1
LPC 18:2	8,95	36	4	0	18,27	48	3	1
LPC 18:3	12,46	22	1	0	22,17	34	2	1
LPC 20:0	7,45	34	4	0	20,94	48	3	0
LPC 20:1	6,90	36	2	0	15,79	48	2	1
LPC 20:2	23,17	28	3	0	20,74	42	2	1
LPC 20:3	6,96	32	1	0	17,42	46	1	0
LPC 20:4	8,41	34	3	0	17,91	46	3	1
LPC 20:5	10,51	18	2	0	18,84	30	1	1
LPC 22:0	12,16	30	2	0	17,73	44	3	0
LPC 22:4	9,42	26	2	0	20,19	40	2	2
LPC 22:5	7,38	32	2	0	18,67	44	2	1
LPC 22:6	10,00	34	2	0	19,81	46	3	1
LPC 24:0	8,16	36	3	0	14,79	48	1	1
LPC O-16:0	4,70	36	1	0	12,41	48	4	0
LPC O-16:1	8,62	36	2	0	14,39	48	2	1
LPC O-18:0	9,78	36	0	0	18,05	48	2	0
LPC O-18:1	7,63	36	2	0	15,09	48	2	0
LPE 16:0	6,97	36	1	0	13,57	48	3	1
LPE 18:0	7,85	36	2	1	13,27	48	3	0
LPE 18:1	7,63	36	2	0	13,16	48	2	1
LPE 18:2	6,73	34	2	1	12,36	46	3	1
LPE 20:3	17,39	34	1	0	21,25	46	3	1
LPE 20:4	15,89	36	2	0	20,36	48	5	1
LPE 22:6	13,26	36	1	1	15,75	48	3	0
LPE O-16:1	9,64	36	1	0	15,59	48	2	1
LPE O-18:1	9,26	36	2	0	14,49	48	3	1
LPG 16:0	13,07	28	1	0	33,49	32	2	0
LPG 18:1	14,78	34	2	0	13,89	38	3	0
LPG 18:2	13,93	32	3	0	17,74	36	1	1
LPI 16:0	22,94	36	1	0	23,74	40	3	0
LPI 18:0	25,00	36	1	0	16,64	48	2	1
LPI 18:2	19,79	30	1	0	13,97	42	3	0
LPI 20:3	34,17	26	1	0	28,42	38	2	0
LPI 20:4	22,96	36	0	0	13,73	48	5	1
PC 30:0	4,07	36	1	0	9,77	48	2	1

	<b>Kontrollkarte</b>							
	RSD [%]	Korrektur mit IS			Korrektur mit median peak ratio			
		Total	Warn.	AK	RSD [%]	Total	Warn.	AK
PC 30:1	6,25	36	2	0	14,88	48	3	2
PC 30:2	15,00	26	1	0	18,57	34	1	0
PC 32:0	4,08	36	2	0	9,42	48	3	1
PC 32:1	4,43	36	2	0	11,98	48	3	1
PC 32:2	6,55	36	2	0	11,45	48	3	1
PC 33:2	4,44	36	2	0	9,16	48	3	1
PC 34:0	8,47	36	4	0	8,76	48	3	0
PC 34:1	2,48	36	2	0	12,04	48	3	1
PC 34:2	4,22	36	2	0	12,77	48	3	1
PC 34:3	4,80	36	1	0	10,13	48	2	1
PC 34:4	5,31	36	2	0	14,28	48	3	1
PC 34:5	13,76	24	0	0	16,48	36	1	0
PC 36:1	7,66	36	2	0	8,39	48	4	0
PC 36:2	3,42	36	2	0	10,64	48	3	1
PC 36:3	3,25	34	1	1	11,03	46	3	1
PC 36:4	4,31	36	2	0	12,71	48	3	1
PC 36:5	5,57	36	1	0	10,15	48	1	1
PC 38:2	9,87	36	4	0	7,53	48	2	0
PC 38:3	8,15	34	2	0	10,12	44	3	1
PC 38:4	3,86	36	2	0	13,02	48	3	1
PC 38:6	3,74	36	1	0	14,94	48	2	1
PC 38:7	6,92	36	1	0	9,32	38	2	1
PC 40:4	10,43	32	2	0	9,79	44	1	0
PC 40:6	5,47	36	3	0	8,63	48	4	0
PC 40:7	3,87	36	1	0	10,52	48	3	1
PC O-16:0_16:0	41,57	32	1	0	60,67	44	1	0
PC O-16:0_18:2	37,28	32	1	0	67,34	44	1	0
PC O-16:0_20:4	33,71	32	0	0	71,46	44	2	0
PC O-16:1_16:0	40,53	32	1	0	62,21	42	2	0
PC O-16:1_18:1	33,95	28	0	0	67,59	40	2	0
PC O-16:1_18:2	42,68	24	0	0	64,94	36	2	0
PC O-16:1_20:4	35,51	30	0	0	72,67	44	2	0
PC O-18:0_20:4	21,56	26	0	0	85,41	40	2	0
PC O-18:1_20:4	30,09	32	0	0	77,52	44	1	0
PC O-34:1	33,10	36	1	0	74,78	48	2	0
PE 32:1	33,06	35	2	1	35,77	46	1	1
PE 34:1	8,54	36	2	0	32,95	48	0	0
PE 34:2	6,87	36	1	1	32,18	48	0	0
PE 34:3	15,83	34	1	0	27,41	46	2	0
PE 36:1	14,91	36	2	0	40,61	48	2	0
PE 36:2	11,10	36	3	0	40,21	48	1	0
PE 36:3	7,46	36	2	0	34,30	48	0	0
PE 36:4	9,00	36	1	0	34,12	48	1	0
PE 36:5	7,52	36	3	0	33,70	48	0	0
PE 38:4	12,35	36	2	0	39,77	48	0	0

	Kontrollkarte							
	RSD [%]	Korrektur mit IS			Korrektur mit median peak ratio			
		Total	Warn.	AK	RSD [%]	Total	Warn.	AK
PE 38:5	9,05	36	3	0	36,36	48	0	0
PE 38:6	10,54	36	1	0	34,27	48	2	0
PE 40:6	13,46	36	2	0	38,00	48	1	0
PE 40:7	13,08	36	1	0	37,02	48	2	0
PE O-16:1_18:2	8,95	36	1	0	31,57	48	0	0
PE O-16:1_20:4	9,35	36	0	0	34,28	48	2	0
PE O-18:1_18:1	38,63	36	2	2	55,11	48	2	1
PE O-18:1_18:2	24,05	36	2	1	42,94	48	1	0
PE O-18:1_20:4	19,54	34	1	0	42,66	46	1	0
PE O-18:2_20:4	13,73	32	1	0	34,07	44	2	0
PG 34:1	24,21	25	1	0	41,94	27	1	0
PI 32:1	27,23	24	1	0	37,16	32	2	0
PI 34:1	14,93	29	2	0	57,44	41	1	0
PI 34:2	20,83	36	1	0	49,69	48	4	0
PI 36:1	43,97	34	2	0	85,13	46	3	0
PI 36:2	25,76	36	2	2	72,95	48	4	0
PI 36:3	32,33	30	2	0	53,33	44	2	0
PI 36:4	26,53	36	1	0	51,26	48	2	0
PI 38:3	28,87	22	0	0	90,10	34	1	0
PI 38:4	37,96	36	2	1	79,16	48	4	0
PI 38:6	21,88	36	2	0	47,32	48	1	0
PI 40:6	55,81	34	0	0	72,37	46	0	0
SE 27:1/14:1	10,66	20	1	0	16,88	32	2	0
SE 27:1/16:1	13,39	32	1	0	18,93	42	2	0
SE 27:1/17:1	17,17	32	1	0	20,03	44	2	0
SE 27:1/18:1	4,72	36	3	1	16,07	44	2	0
SE 27:1/18:2	10,01	36	2	0	13,96	48	1	0
SE 27:1/20:3	14,65	36	0	0	12,11	48	1	0
SE 27:1/20:4	13,18	36	0	0	10,39	48	1	0
SE 27:1/20:5	26,84	22	0	0	26,36	36	2	0
SE 27:1/22:4	16,70	30	1	0	13,39	42	2	0
SE 27:1/22:6	17,93	36	0	0	17,57	48	2	0
SE 27:1/24:1	45,00	30	2	0	35,96	40	1	0
SM 30:1	7,37	26	1	0	10,50	38	2	0
SM 32:1	10,71	36	3	0	23,16	48	3	1
SM 32:2	7,39	26	0	0	10,15	40	2	0
SM 33:1	9,05	36	2	0	8,36	48	3	0
SM 33:2	18,31	18	2	0	18,21	28	1	0
SM 34:0	7,41	36	2	0	11,82	48	2	0
SM 34:1	6,18	36	3	1	8,26	48	3	1
SM 34:2	7,26	36	2	0	14,48	48	2	1
SM 35:1	5,04	32	2	1	9,56	44	2	1
SM 36:0	12,89	30	1	0	15,86	42	1	0
SM 36:1	5,41	36	2	1	9,16	48	2	1
SM 36:2	5,24	36	2	1	11,06	48	2	1

	Kontrollkarte							
	RSD [%]	Korrektur mit IS			Korrektur mit median peak ratio			
		Total	Warn.	AK	RSD [%]	Total	Warn.	AK
SM 36:3	35,75	22	2	0	27,04	32	2	2
SM 37:1	10,43	36	3	0	5,11	46	3	0
SM 38:1	12,59	36	4	0	8,22	48	2	0
SM 38:2	6,42	36	1	0	8,59	48	3	1
SM 39:1	10,61	34	2	0	6,89	46	1	1
SM 40:1	13,91	36	4	0	9,07	48	5	0
SM 40:2	13,33	36	4	0	8,56	48	3	0
SM 40:3	9,97	32	2	0	8,69	46	3	0
SM 41:1	14,89	36	3	0	9,40	48	4	1
SM 41:2	12,08	36	4	0	7,13	48	2	0
SM 42:1	15,21	36	3	0	10,43	48	3	0
SM 42:2	14,17	36	4	0	8,71	48	4	0
SM 42:3	14,05	36	4	0	8,85	48	3	0
SM 43:1	12,59	36	2	0	12,01	48	4	0
SM 43:2	16,86	36	2	0	16,20	48	1	0
ST 19:2_OH2_S	-	0	0	0	13,24	36	2	0
ST 27:1_OH	4,74	36	0	0	33,48	48	1	0
ST 27:1_OH_S	-	0	0	0	14,64	48	3	0
TG 42:1	83,88	26	3	0	54,20	34	2	1
TG 42:2	62,89	28	3	0	35,77	38	2	0
TG 44:1	72,38	26	3	0	41,15	35	3	0
TG 44:2	59,97	28	3	0	44,84	38	3	0
TG 46:1	33,50	30	3	0	18,43	39	3	0
TG 46:2	44,21	30	3	0	28,45	40	2	0
TG 46:3	44,16	28	3	0	37,05	38	1	0
TG 48:1	17,93	30	1	0	19,25	42	2	0
TG 48:2	13,59	30	0	0	15,88	42	1	0
TG 48:3	19,39	30	0	0	24,20	44	0	0
TG 48:4	23,62	26	0	0	32,41	40	2	0
TG 50:1	14,10	34	2	0	18,26	46	0	0
TG 50:2	13,26	34	1	1	15,80	46	1	0
TG 50:3	10,55	32	2	0	14,41	46	0	0
TG 50:4	13,56	32	1	0	19,07	46	0	0
TG 52:1	23,02	36	0	0	31,99	48	0	0
TG 52:2	12,84	36	2	1	17,10	48	1	0
TG 52:3	12,31	36	2	1	14,32	48	1	0
TG 52:4	9,17	34	2	0	14,09	48	0	0
TG 52:5	13,37	30	1	0	19,74	44	0	0
TG 54:1	26,00	34	0	0	33,90	46	0	0
TG 54:2	22,53	36	0	0	31,30	48	0	0
TG 54:3	13,53	36	2	1	19,62	48	1	0
TG 54:4	12,81	36	1	1	16,26	48	1	0
TG 54:5	9,19	34	2	0	15,74	48	1	0
TG 54:6	12,87	34	2	0	19,45	48	0	0
TG 56:1	30,62	32	1	0	39,87	44	0	0

	<b>Kontrollkarte</b>							
		<u>Korrektur mit IS</u>			<u>Korrektur mit median peak ratio</u>			
	RSD [%]	Total	Warn.	AK	RSD [%]	Total	Warn.	AK
<b>TG 56:2</b>	25,48	34	0	0	34,90	46	0	0
<b>TG 56:3</b>	22,41	36	0	0	32,16	48	0	0
<b>TG 56:4</b>	14,54	34	2	0	23,12	48	2	0
<b>TG 56:5</b>	17,70	28	1	1	23,85	42	1	0
<b>TG 56:6</b>	14,85	32	0	0	22,96	46	1	0
<b>TG 58:1</b>	32,02	30	2	0	43,56	42	1	0
<b>TG 58:2</b>	29,23	32	0	0	39,70	44	0	0
<b>TG 58:3</b>	26,07	34	0	0	35,13	46	0	0
<b>TG 58:4</b>	20,97	32	0	0	30,74	46	0	0
<b>TG 58:6</b>	16,67	32	2	0	24,35	46	2	0
<b>Thyroxin</b>	-	0	0	0	21,65	28	1	1
<b>Mittelwert</b>	<b>16,45</b>				<b>24,98</b>			
<b>Median</b>	<b>13,22</b>				<b>18,93</b>			

## Anhang

Tabelle 39: Stabilität extrahierter Plasmaproben auf dem Abdampfgerät.

Die Proben wurden in PP extrahiert und anschließend entweder in Glasvials oder in PP bei 45 °C unter N<sub>2</sub>-Strom abgedampft. Nach vollständiger Trocknung (5 min in Glasvials und 10 min in PP) wurden die Proben für die angegebene Zeit weiter auf dem Abdampfgerät belassen (n=6). Werte > 15% sind fett markiert.

Analyt	Stabilität auf dem Abdampfgerät					
	Glasvials			PP		
	Kontrolle RSD [%]	20 min RE [%]	RSD [%]	Kontrolle RSD [%]	30 min RE [%]	RSD [%]
Cer d18:1/16:0	11,25	-0,26	3,01	9,11	-3,23	7,27
Cer d18:0/22:0	4,29	1,35	8,42	10,16	-0,43	8,96
Cer d18:0/24:0	<b>4,33</b>	<b>2,79</b>	5,54	5,71	-0,68	7,68
Cer d18:1/22:0	5,97	1,14	2,43	2,95	-0,51	2,59
Cer d18:1/23:0	<b>2,99</b>	<b>-1,15</b>	3,74	4,51	2,19	4,98
Cer d18:1/24:0	5,44	-0,94	2,78	4,31	-0,65	2,67
Cer d18:2/22:0	<b>6,15</b>	0,54	7,37	5,73	-1,28	<b>9,84</b>
DG 32:0	11,95	-1,61	5,72	6,18	5,65	1,94
DG 32:1	4,39	-0,21	5,77	3,94	0,88	3,67
DG 34:1	5,16	-1,05	3,75	1,95	0,77	2,11
DG 34:2	6,49	-0,97	4,57	5,7	1,83	3,43
DG 36:1	1,77	-0,03	3,78	3,15	-1,04	2,91
DG 36:2	3,88	-0,01	2,86	2,11	-2,05	1,76
DG 36:3	2,99	1,58	2,93	2,78	-0,36	2,65
DG 36:4	<b>7,88</b>	<b>-0,22</b>	3,59	<b>5,95</b>	<b>-1,2</b>	4,37
DG 38:5	5,51	10,57	31,37	8,31	-7,01	10,93
DG 38:6	13,24	-11,85	18,31	4,58	7,97	19,5
FA 15:0	15,31	-0,6	7,62	9,16	<b>-5,4</b>	18,92
FA 16:0	17,06	10,42	11,39	16,69	2,1	11,83
FA 16:1	10,64	9,25	9,75	15,19	-0,61	16,07
FA 17:0	7,25	1,05	10,43	12,48	-3,78	8,68
FA 17:1	10,72	1,23	11,25	17,01	-3,37	11,81
FA 18:0	8,56	2,83	7,06	17,07	-6,54	16,47
FA 18:1	7,45	-1,42	6,01	10,31	0,9	7,63
FA 18:2	13,7	7,36	11,7	6,9	-6,09	11,92
FA 18:3	6,49	2,3	9,34	7,34	5,68	10,14
FA 18:4	8,96	7,15	12,06	16,97	-8,78	7,31
FA 20:1	6,93	-1,15	9,9	10,19	-4,39	10,03
FA 20:2	4,49	4,31	7,49	7,18	-0,15	8,05
FA 20:4	5,42	2,16	8,1	4,01	1,48	6,86
FA 20:5	5,01	5,04	9,11	7,63	-2,66	10,88
FA 22:4	7,25	0,82	9,36	8,49	3,06	6,95
FA 22:6	6,88	3,77	6,9	2,35	-0,29	3,99
FA 24:0	12,1	1,72	6,1	8,89	-9,59	16,38
FA 24:1	12,92	-7,94	23,18	23,97	-6,12	26,08
Hex2Cer d18:1/16:0	8,02	-1,34	4,13	8,26	5,83	6,77
Hex2Cer d18:1/24:1	14,75	2,79	5,13	10,92	-0,71	7,6
HexCer d18:1/16:0	12,61	-6,36	5,76	8,28	-0,84	5,84
HexCer d18:1/24:0	3,21	-2,89	4,57	3,74	-1,5	4,38
LPC 14:0	3,94	1,4	3,14	2,65	0,5	<b>2,98</b>
LPC 15:0	3,87	-1,51	3,78	3,04	1,06	3,05
LPC 16:0	2,9	0,7	1,46	2,41	0,22	2,51
LPC 16:1	2,57	-1	4,15	2,42	0,58	3,09
LPC 17:0	4,93	0,79	3,38	<b>3,18</b>	0,15	<b>2,23</b>
LPC 18:0	2,69	0,52	3,16	2,87	0,91	2,71

Analyt	Stabilität auf dem Abdampfgerät					
	Kontrolle RSD [%]	Glasvials		Kontrolle RSD [%]	PP	
		RE [%]	20 min RSD [%]		RE [%]	30 min RSD [%]
LPC 18:1	3	1,22	3	1,89	-0,94	2,04
LPC 18:2	3,99	-0,08	2,57	2,31	0,31	2,05
LPC 18:3	3,36	0,55	4,31	2,34	-0,73	2,95
LPC 20:0	3,26	-0,46	7,92	4,17	0,83	7,56
LPC 20:1	4,24	-1,39	7,4	4,91	-0,49	6,53
LPC 20:2	8,88	1,6	4,86	3,76	0,89	4,09
LPC 20:3	4,03	-0,2	2,89	<b>2,52</b>	-1,92	<b>3,8</b>
LPC 20:4	3,3	0,72	2,93	<b>2,59</b>	0,93	2,57
LPC 20:5	3,21	-0,13	4,39	1,7	-3,57	2,39
LPC 22:0	11,06	<b>1,04</b>	11,96	13,38	-9,69	10,78
LPC 22:4	4	-0,48	8,65	4,12	<b>3,91</b>	6,25
LPC 22:5	6,02	-2,82	3,8	8,69	3,77	4,03
LPC 22:6	2,9	0,51	7,44	3,25	-0,51	3,26
LPC 24:0	4,97	1,49	8,83	9,31	0,44	8,53
LPC O-16:0	3,8	1,59	4,13	4,69	1,34	2,41
LPC O-16:1	3,45	2,26	4,28	2,21	0,66	2,82
LPC O-18:0	5,59	2,09	6,4	3,42	2,87	5,37
LPC O-18:1	7,43	3,28	7,05	3,37	-0,77	4,11
LPE 16:0	6,92	-1,83	5,1	3,81	2,88	2,9
LPE 18:0	3,46	-0,38	4,68	2,28	1,82	2,73
LPE 18:1	5,01	-0,39	4,73	3,68	0,85	3,36
LPE 18:2	6,37	-1,11	5,82	3,99	3,07	4,69
LPE 20:3	4,23	0,68	5,47	6,82	1,61	5,72
LPE 20:4	5,02	-0,19	5,19	3,58	2,58	4,15
LPE 22:6	6,17	0,37	6,75	3,9	1,6	4,4
LPE O-16:1	5,51	1,64	7,38	3,28	1,23	3,4
LPE O-18:1	4,84	0,14	4,18	3,96	0,99	3,43
LPI 18:0	7,82	0,39	7,86	4,33	3,13	3,92
LPI 18:2	8,43	4,59	7,18	6,21	-0,42	4,45
LPI 20:3	20,79	-0,14	10,46	13,61	15,22	22,37
LPI 20:4	5,41	3,86	7,03	4,74	2,87	2,25
PC 30:0	3,98	-0,21	2,54	3,45	2,26	2,87
PC 30:1	5,23	-2,1	1,64	3,85	-1,05	2,34
PC 30:2	7,39	0,52	9,8	12,41	-5,03	5,82
PC 32:0	3,69	-0,26	1,94	2,62	1,29	2,84
PC 32:1	2,94	-1,33	2,03	2,21	-0,09	3,61
PC 32:2	3,27	-0,22	2,78	3,39	-2,7	2
PC 33:2	4,67	-2,14	2,88	4,4	-0,19	2,87
PC 34:0	1,79	0,57	3,15	3,48	-1,17	3,59
PC 34:1	4,04	-1,6	1,72	2,83	0,03	1,94
PC 34:2	3,73	-1,41	2,08	2,61	-0,85	1,32
PC 34:3	3,47	-0,8	2,52	2,94	-1,34	1,47
PC 34:4	4,97	-2,82	0,97	3,47	-3,3	1,96
PC 34:5	1,24	-3,12	6,11	3,65	-1,38	4,73
PC 36:1	2,09	0,05	1,93	2,27	-1,25	2,51
PC 36:2	3,51	-1,11	1,45	2,51	-0,98	1,77
PC 36:3	3,67	-0,77	1,97	2,27	-1,02	1,62
PC 36:4	3,38	-2,28	2,31	1,7	-2,13	1,73
PC 36:5	2,02	-1,54	2,79	2,57	-3,01	<b>1,61</b>

Analyt	Stabilität auf dem Abdampfgerät					
	Kontrolle RSD [%]	Glasvials		Kontrolle RSD [%]	PP	
		RE [%]	20 min RSD [%]		30 min RE [%]	RSD [%]
PC 38:2	2,67	-0,53	2,63	1,89	-1,31	<b>1,97</b>
PC 38:3	3,89	-1,47	1,19	0,59	-4,5	3,71
PC 38:4	3,87	-1,52	1,38	2,85	-1,49	1,65
PC 38:6	3,43	-2,33	2,29	2,25	-2,59	1,29
PC 40:4	2,76	-0,83	2,45	3,13	-2,72	1,77
PC 40:6	3,9	-1,84	1,63	<b>2,68</b>	-3,05	<b>1,14</b>
PC 40:7	4,93	-1,65	2,51	<b>4,11</b>	-4,03	<b>2,66</b>
PC O-16:0_16:0	2,63	-2,26	5,26	5,82	6,36	4,83
PC O-16:0_18:2	7,1	-5,12	5,1	6,71	0,73	6,85
PC O-16:0_20:4	4,03	1,75	3,43	4,15	-1,2	5,66
PC O-16:1_16:0	5,02	-9,81	7,23	3,22	6,28	4,25
PC O-16:1_18:1	3,68	8,28	9,65	3,4	4,49	11,4
PC O-16:1_18:2	4,31	-0,28	1,99	3,32	2,19	2,88
PC O-16:1_20:4	3,08	0,7	3,79	3,6	0,51	5,41
PC O-18:0_20:4	3,28	5,73	6,59	10,18	1,85	6,4
PC O-18:1_20:4	8,46	-3,49	10,1	3,13	0,39	8,42
PC O-34:1	4,67	0,89	3,56	6,28	4,94	10,29
PE 32:1	4,19	-3,74	6,09	4,33	-2,88	4,59
PE 34:1	4,04	1,92	5,81	4,06	4,61	2,37
PE 34:2	3,66	-4,86	3,23	2,52	-0,42	3,28
PE 34:3	6,31	1,78	13,37	5,4	0,54	11,48
PE 36:1	5,63	3,53	1,6	7,08	3,31	5,59
PE 36:2	3,46	-4,1	3,99	2,39	4,11	4,59
PE 36:3	5,32	-1,51	4,6	4,29	2,44	5,42
PE 36:4	2,34	-1,73	4,61	3,19	0,22	4,78
PE 36:5	7,53	-0,9	6,23	4,94	4,7	7,53
PE 38:4	3,21	-2,94	1,04	4,29	2,43	4,77
PE 38:5	6,23	-6,86	10,28	5,32	-2,95	5,35
PE 38:6	5,81	-3,76	2,52	3,24	3,51	6,85
PE 40:6	2,17	-3,21	3,31	3,53	2,84	3,59
PE 40:7	4,63	-0,09	7,15	1,43	1,04	5,43
PE O-16:1_18:2	3,06	-6,3	5,05	5,42	-0,16	<b>1,71</b>
PE O-16:1_20:4	4,07	-2,86	2,59	<b>2,65</b>	3,29	3,84
PE O-18:1_18:1	5,8	-0,09	3,4	<b>6,95</b>	-1,62	<b>7,3</b>
PE O-18:1_18:2	7,08	1,47	6,57	6,65	4,41	5,4
PE O-18:1_20:4	3,79	-4,12	3,26	<b>5,83</b>	-1,13	<b>3,04</b>
PE O-18:2_20:4	3,24	-3,79	5,37	2,02	0,48	5,34
PI 32:1	20,22	10,56	10,62	10,18	4,65	9,4
PI 34:1	2,38	0,95	4,24	5,26	2,31	4,77
PI 34:2	2,05	-1,98	2,95	3,66	3,11	5,37
PI 36:1	5,29	1,04	6,21	6,36	2,25	4,71
PI 36:2	5,26	2,44	3,02	6,09	2,28	5,87
PI 36:3	7,63	1,21	8,76	6,68	-1,14	12,27
PI 36:4	4,37	3,13	5,79	2,86	1,76	3,75
PI 38:3	3,46	2,32	3,58	6,62	4,4	7,64
PI 38:4	7,65	0,3	7,41	9,44	<b>6,24</b>	8,82
PI 38:6	7,83	-1,32	5,77	3,73	-2,24	5,69
PI 40:6	5,87	1,39	2,6	5,74	7,92	7,11
PS 36:1	9,43	0,46	6,8	6,1	-1,69	4,19



Analyt	Stabilität auf dem Abdampfgerät					
	Kontrolle RSD [%]	Glasvials		Kontrolle RSD [%]	PP	
		RE [%]	RSD [%]		RE [%]	RSD [%]
SE 27:1/14:1	8,84	2,14	7,6	1,74	1,43	8,68
SE 27:1/16:1	3,88	-4,8	4,27	3,62	2,43	6,15
SE 27:1/17:1	3,97	-1,35	5,56	5,09	0,62	7,41
SE 27:1/18:1	3,89	-4,98	3,57	6,48	0,41	4,87
SE 27:1/18:2	4,12	-1,82	2,1	3,16	0,3	2,78
SE 27:1/20:3	5,5	1,45	3,91	4,66	-2,34	5,05
SE 27:1/20:4	3,42	0,06	0,88	1,31	0,21	3,54
SE 27:1/20:5	2,45	1,76	1,65	2,28	-1,07	3,23
SE 27:1/22:4	4,23	-2,88	6,53	7,35	-5,12	7,99
SE 27:1/22:6	2,33	2,98	1,4	1,93	-2,6	2,98
SM 30:1	3,52	-0,83	3,63	3,47	0,18	3,51
SM 32:1	5,79	-1,49	0,91	3,28	-0,4	1,87
SM 32:2	4,9	-0,49	3,55	2,3	-0,62	3,44
SM 33:1	4,7	-0,79	2,72	4,5	-0,19	2,69
SM 33:2	7,35	4,18	2,74	5,62	-2,26	8,13
SM 34:0	4,85	0,62	1,88	3,38	1,64	4,19
SM 34:1	3,34	-0,9	1,7	2,65	0,12	2,98
SM 34:2	6,64	-1,23	1,39	2,87	-2,43	1,98
SM 35:1	4,86	-1,24	3,95	3,61	0,2	5,01
SM 36:0	9,38	1,54	2,9	4,83	-0,99	4,27
SM 36:1	4,44	-0,75	2,49	3,41	1,95	2,49
SM 36:2	3,33	-0,26	3,04	3,21	-1,46	3,34
SM 36:3	3,58	0,9	3,1	5,75	-2,4	3,16
SM 37:1	4,76	-0,43	4,78	1,06	1,09	3,75
SM 38:1	2,19	0,25	2,63	2,73	-0,26	2,57
SM 38:2	3,74	-1,74	2,7	3,28	-0,35	2,78
SM 39:1	3,64	0,28	1,83	3,7	-1,17	1,57
SM 40:1	2,13	0,35	2,4	3,11	0,22	2,58
SM 40:2	2,51	-0,14	2,05	2,3	-1,15	2,13
SM 40:3	4,22	-0,19	7,62	2,61	-6,37	5,73
SM 41:1	2,49	-0,04	2,37	3,43	0,03	2,9
SM 41:2	4,04	-1,13	2,47	2,57	-1,11	2,49
SM 42:1	2,43	0,38	2,61	3,13	0,42	2,89
SM 42:2	1,59	-3,29	10,18	2,95	-0,99	1,88
SM 42:3	2,06	<b>-0,33</b>	2,32	2,16	-2,05	2,18
SM 43:1	3,04	<b>-0,71</b>	4,11	<b>3,29</b>	<b>0,36</b>	4,29
SM 43:2	3,23	-1,45	2,22	3,52	-0,11	2,54
ST 19:2_OH2_S	6,43	0,82	7,07	4,05	0,68	5,85
ST 19:2_OH3_S	5,84	2,97	5,32	2,07	0,66	2,35
ST 27:1_OH	9,79	0,08	3,61	3,54	-1,66	3,66
ST 27:1_OH_S	4,24	1,7	4,13	3,35	0,79	6,27
TG 42:1	25,34	-11,54	4,97	4,77	1,61	5,36
TG 42:2	23,46	-5,58	7,92	2,39	2,34	5,75
TG 44:0	12,52	-6,75	3,2	2,11	0,48	2,15
TG 44:1	16,97	-7,57	3,43	4,18	2,85	2,35
TG 44:2	13,1	-3,98	3,96	5,9	2,53	4,27
TG 46:1	8,41	-2,09	3,27	3,24	1,17	1,39
TG 46:2	10,27	-2,69	2,5	3,7	2,12	2,56
TG 46:3	10,02	-1,07	2,77	1,39	1,38	3,74

Stabilität auf dem Abdampfgerät

Analyt	Glasvials			PP		
	Kontrolle RSD [%]	20 min RE [%] RSD [%]	Kontrolle RSD [%]	30 min RE [%] RSD [%]		
TG 48:1	4,84	0,79 2,14	1,92	-0,18 2,42		
TG 48:2	4,55	0,45 3,99	2,74	-0,44 3,49		
TG 48:3	6,28	0,84 2,41	3,94	0,14 2,65		
TG 48:4	2,82	1,55 3,19	3,1	0,7 4,53		
TG 50:1	4,22	-1,26 3,01	2,2	0,15 3,84		
TG 50:2	3,11	-0,16 2,04	1,7	-0,85 2,1		
TG 50:3	3,29	-0,17 3,84	2,19	-2,35 3,64		
TG 50:4	3,69	1,68 2,4	3,2	-1,55 3,43		
TG 52:1	5,25	1,03 3,03	5,06	-2,02 4,12		
TG 52:2	3,28	-0,32 2,64	2,51	-0,35 3,3		
TG 52:3	2,92	-1,04 2,14	1,58	0,14 2,21		
TG 52:4	2,47	0,52 2,43	2,69	-1,78 2,64		
TG 52:5	3,78	0,99 2,11	2,93	-2,37 3,38		
TG 54:1	6,07	0,06 3,96	5,16	1,18 5,38		
TG 54:2	4,9	0,61 3,42	5,25	-2,06 4,37		
TG 54:3	3,57	-0,85 3,74	4,82	-0,93 3,05		
TG 54:4	4,2	-1,9 3,19	3,6	-1,51 2,86		
TG 54:5	3,09	0,6 3,35	3,79	-2,94 3,44		
TG 54:6	3,04	1,1 5,64	3,06	1,82 3,85		
TG 56:1	10,99	-12 9,11	8,26	3,26 7,62		
TG 56:2	7,17	3,65 4,61	8,81	2,25 4,47		
TG 56:3	9,53	1,73 8,13	6,72	-0,92 5,17		
TG 56:4	4,23	1,86 1,81	6,83	-3,55 7,71		
TG 56:5	4,49	-1,35 3,27	4,34	-2,56 3,29		
TG 56:6	5,17	1,07 2,09	3,44	-0,9 3,97		
TG 58:4	14,59	8,65 10,97	23,1	17,45 24,99		
TG 58:6	7,03	-0,9 7,01	5,8	<b>4,84</b> 5,77		
Thyroxin	9	-2,21 6,14	5,29	<b>6,62</b> 5,08		

Tabelle 40: Stabilität von rekonstituierten Lipidextrakten bei Raumtemperatur.

Die Proben wurden extrahiert und nach der Rekonstitution mit 120 µL Methanol für 4 h bei Raumtemperatur gelagert (n=5). Werte > 15% sind fett markiert.

**Stabilität von Lipid-Extrakten bei Raumtemperatur**

Analyt	Kontrolle	4 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
Cer d18:1/16:0	0,96	-0,27	6,39
Cer d18:0/22:0	6,18	-1,64	13,18
Cer d18:0/24:0	6,51	-1,44	7,95
Cer d18:1/22:0	1,08	-2,58	2,54
Cer d18:1/23:0	2,56	-1,1	1,63
Cer d18:1/24:0	2,12	-1,86	2,78
Cer d18:2/22:0	3,65	3,25	3,3
DG 32:1	9,91	-4,45	4,42
DG 34:1	4,45	-5,27	2,67
DG 34:2	4,69	-4,78	2,61
DG 36:1	3,66	-4,67	1,86
DG 36:2	3,62	-1,64	1,63
DG 36:3	3,77	-1,93	1,74
DG 36:4	3,46	-4,17	1,37
DG 38:5	3,99	-3,8	4,3
DG 38:6	6,16	-4,68	4,62
FA 14:0	10,9	<b>24,26</b>	<b>22,05</b>
FA 15:0	<b>22,48</b>	<b>33,99</b>	<b>45</b>
FA 16:0	<b>21,1</b>	10,21	8,19
FA 16:1	<b>17,39</b>	<b>40,44</b>	<b>69,25</b>
FA 17:0	<b>18,38</b>	<b>24,67</b>	<b>22,73</b>
FA 17:1	13,55	<b>40,3</b>	<b>50,96</b>
FA 18:0	<b>21,34</b>	9,63	6,58
FA 18:1	7,5	-4,57	6,86
FA 18:2	9,8	-4,57	10,83
FA 18:3	4,07	8,86	6,78
FA 18:4	4,62	7,44	6,99
FA 20:1	1,08	9,24	6,13
FA 20:2	10,24	9,7	<b>18,78</b>
FA 20:4	2,05	3,9	8,48
FA 20:5	5,5	0,07	6,42
FA 22:4	4,09	5,38	5,16
FA 22:6	4,61	4,19	3,55
FA 24:0	13,55	<b>44,62</b>	<b>24,27</b>
FA 24:1	8,04	11,71	7,01
Hex2Cer d18:1/16:0	8,22	-0,63	3,26
Hex2Cer d18:1/24:1	10,92	5,43	7,12
HexCer d18:1/16:0	3,01	-7,34	9,84
HexCer d18:1/24:0	2,63	-3,52	2,3
LPC 14:0	3,47	-2,12	2,43
LPC 15:0	3,7	-3,3	1,23
LPC 16:0	3,36	-0,39	0,86
LPC 16:1	3,67	-2,31	2,38
LPC 17:0	4,16	-2,21	1,7
LPC 18:0	3,74	-1,32	0,8
LPC 18:1	3,47	-1,36	0,44
LPC 18:2	3,13	-1,8	1,76

**Stabilität von Lipid-Extrakten bei Raumtemperatur**

Analyt	Kontrolle	4 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
LPC 18:3	4,22	-2,62	1,46
LPC 20:0	3,93	1,46	1,78
LPC 20:1	3,21	-1,39	1,96
LPC 20:2	4,58	-5,57	2,4
LPC 20:3	9,64	-6,21	1,89
LPC 20:4	4,33	-2,71	1,66
LPC 20:5	3,7	-0,67	1,53
LPC 22:0	7,47	-4,32	4,55
LPC 22:4	6,89	-6,14	5,87
LPC 22:5	3,12	-3,23	2,79
LPC 22:6	4	-2,47	1,96
LPC 24:0	3	1,8	0,75
LPC O-16:0	1	2,33	1,79
LPC O-16:1	3,11	3,04	4,09
LPC O-18:0	4,76	3,86	5,05
LPC O-18:1	2,49	0,23	2,96
LPE 16:0	5,27	0,44	3,91
LPE 18:0	3,87	2,55	2,18
LPE 18:1	2,55	-0,06	2,96
LPE 18:2	2,08	0,13	1,54
LPE 20:3	5,11	1,06	3,33
LPE 20:4	3,51	1,48	2,48
LPE 22:6	6,25	0,81	4,27
LPE O-16:1	6,56	9	7,14
LPE O-18:1	4,15	7,11	2,84
LPI 18:0	4,53	13,79	4,47
LPI 18:2	8,8	-2,66	5,37
LPI 20:3	2,86	1,1	12,19
LPI 20:4	6,67	4,53	6,7
PC 30:0	3,17	-1,63	1,56
PC 30:1	2,54	-1,91	3,21
PC 30:2	2,22	4,11	3,92
PC 32:0	2,24	-2,34	2,39
PC 32:1	3,11	-1,88	2,09
PC 32:2	2,79	-2,03	1,57
PC 33:2	1,89	-1,2	1,81
PC 34:0	2,24	-1,09	1,31
PC 34:1	2,16	-2,49	2,06
PC 34:2	1,76	-1,04	1,81
PC 34:3	1,84	-1,94	1,38
PC 34:4	2,74	-3,06	4,15
PC 34:5	1,49	-1,73	3,98
PC 36:1	2,41	-1,35	1,41
PC 36:2	2,31	-0,67	2,26
PC 36:3	2,45	-2,21	2,22
PC 36:4	2,16	-0,43	1,68
PC 36:5	2,15	-2,2	2,1
PC 38:2	1,93	-1,73	1,46
PC 38:3	1,88	-0,46	1,09
PC 38:4	1,87	-2,26	2,04

Stabilität von Lipid-Extrakten bei Raumtemperatur

Analyt	Kontrolle	4 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
PC 38:6	1,87	-2,33	0,83
PC 40:4	2,95	-3	1,44
PC 40:6	2,45	-2,65	2,59
PC 40:7	3,36	-2,68	1,94
PC O-16:0_16:0	2,57	-0,67	8,07
PC O-16:0_18:2	4,19	-1,95	4,31
PC O-16:0_20:4	4,11	-0,36	1,09
PC O-16:1_16:0	7,57	4,16	5,76
PC O-16:1_18:1	4,44	5,3	2,07
PC O-16:1_18:2	5,05	0,34	3,07
PC O-16:1_20:4	3,49	0,77	4,81
PC O-18:0_20:4	6,63	1,03	11,31
PC O-18:1_20:4	6,42	2,87	4,94
PC O-34:1	4,33	2,37	3,55
PE 32:1	4,39	7,18	5,63
PE 34:1	6,78	-2,93	5,08
PE 34:2	3,6	-1,46	5,58
PE 34:3	4,42	-7,22	8,1
PE 36:1	4,21	-0,99	4,85
PE 36:2	4,12	1,4	4,9
PE 36:3	6,28	-3,41	4,88
PE 36:4	5,92	3,68	4,38
PE 36:5	6,12	-4,1	3,33
PE 38:4	4,3	-1,15	7,11
PE 38:5	4,79	-0,72	7,11
PE 38:6	6,49	-2,07	5
PE 40:6	3,71	1,86	3,01
PE 40:7	7,2	1,86	5,85
PE O-16:1_18:2	5,8	-0,43	4,07
PE O-16:1_20:4	5,36	4,29	6,57
PE O-18:1_18:1	5,4	0,5	4,72
PE O-18:1_18:2	9,04	3,33	7,68
PE O-18:1_20:4	4,99	-2,84	6,48
PE O-18:2_20:4	4,22	-0,19	3,54
PI 32:1	7,22	-8,36	2,78
PI 34:1	5,18	-2,35	8,93
PI 34:2	6,29	4,11	3,87
PI 36:1	6,2	2,02	2,85
PI 36:2	3,95	-0,7	4,69
PI 36:3	10,22	3,63	5,79
PI 36:4	7,89	-0,95	2,67
PI 38:3	5,96	-0,41	6,74
PI 38:4	4,2	-1,46	5,25
PI 38:6	12,4	7,23	<b>15,03</b>
PI 40:5	7,4	-0,3	10,59
PI 40:6	6,78	-0,76	4,36
PS 36:1	14,53	3,71	<b>17,8</b>
SE 27:1/14:1	3,89	5,93	<b>15,09</b>
SE 27:1/16:1	3,86	-2,42	1,07
SE 27:1/17:1	6,48	-2,72	4,58

Stabilität von Lipid-Extrakten bei Raumtemperatur

Analyt	Kontrolle	4 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
SE 27:1/18:1	5,19	-1,57	1,64
SE 27:1/18:2	4,91	-1,69	3
SE 27:1/20:3	5,14	0,47	5,36
SE 27:1/20:4	3,27	-2,36	1,19
SE 27:1/20:5	3,22	-0,41	1,78
SE 27:1/22:4	6,03	-8,36	5,11
SE 27:1/22:6	3,03	-1,02	1,84
SE 27:1/24:1	6,53	3,11	5,21
SM 30:1	2,87	2	2,88
SM 32:1	2,81	-0,5	2,78
SM 32:2	2,4	0	1,18
SM 33:1	1,99	-1,57	1,98
SM 33:2	6,42	-5,58	6,71
SM 34:0	6,23	0,22	3,61
SM 34:1	1,88	-2,17	2,2
SM 34:2	4,23	-3,35	2,87
SM 35:1	2,38	-0,36	4,68
SM 36:0	11,66	-8,15	6,45
SM 36:1	2,97	-1,82	2,6
SM 36:2	3,89	-0,9	4,42
SM 36:3	3,12	-1,18	5,44
SM 37:1	2,89	-3,19	1,46
SM 38:1	2,19	-2	1,97
SM 38:2	2,96	-3,75	4,83
SM 39:1	2,43	-1,67	2,33
SM 40:1	3,07	-1,55	2,41
SM 40:2	2,51	-1,91	2,02
SM 40:3	4,74	-0,71	5,83
SM 41:1	3,29	-0,49	1,63
SM 41:2	2,44	-1,76	1,03
SM 42:1	2,79	-1,3	3,04
SM 42:2	2,52	-1,07	1,92
SM 42:3	2,52	-2,1	2,27
SM 43:1	1,18	-1,05	2,5
SM 43:2	3,63	-1,72	2,71
ST 19:2_OH2_S	5,82	-0,69	5,42
ST 19:2_OH3_S	7,11	-5,93	8,82
ST 27:1_OH	4,68	-4,48	4,94
ST 27:1_OH_S	4,35	14,84	<b>18,27</b>
TG 42:1	2,67	-1,79	1,52
TG 42:2	1,92	-2,1	1,87
TG 44:0	3,97	-1,47	3,33
TG 44:1	2,14	-0,62	1,1
TG 44:2	1,96	-1,31	1,2
TG 46:1	2,95	-2,89	1,62
TG 46:2	1,47	-1,44	1,41
TG 46:3	2,92	-1,76	1,09
TG 48:1	3,6	0,82	5,75
TG 48:2	3,23	-2,36	1,52
TG 48:3	2,12	0,05	1,97

**Stabilität von Lipid-Extrakten bei Raumtemperatur**

Analyt	Kontrolle	4 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
TG 48:4	2,27	-1,45	1,75
TG 50:1	2,4	-1,03	3,15
TG 50:2	2,78	-1,69	2,69
TG 50:3	1,89	-1,22	2,06
TG 50:4	2,01	-0,91	1,65
TG 52:1	6,51	-1,18	4,73
TG 52:2	3,78	-0,8	4,26
TG 52:3	2,65	-2,07	1,64
TG 52:4	2,52	-1,53	1,78
TG 52:5	2,48	-0,92	2,02
TG 54:1	4,1	-1,81	4,04
TG 54:2	4,97	-1	3,07
TG 54:3	4,24	-2,51	2,11
TG 54:4	3,11	-1,63	2,56
TG 54:5	2,69	-1,31	1,98
TG 54:6	10,01	-0,09	8,15
TG 56:1	7,74	-0,74	5,11
TG 56:2	3,26	-2,83	2,91
TG 56:3	4,5	-0,76	3,11
TG 56:4	6,8	-3,89	2,56
TG 56:5	3,22	-1,58	1,37
TG 56:6	4,29	0,61	4,02
TG 58:1	9,42	-0,23	7,02
TG 58:2	2,23	-2,98	3,22
TG 58:3	2,26	-2,9	3,24
TG 58:4	6,03	-0,36	3,68
TG 58:6	<b>15,16</b>	-4,59	13,54
Thyroxin	3,07	-5,3	4,21

## Anhang

Tabelle 41: Frier-Tau-Stabilität von Humanplasma.

Die Proben wurden bei -80 °C gelagert und unterliefen die angegebene Anzahl Frier-Tau-Zyklen (n=5).  
Werte > 15% sind fett markiert. Kontroll. = Kontrolle (1 Frier-Tau Zyklus)

	Frier-Tau-Stabilität von Humanplasma						
	Kontroll. RSD [%]	1 Zyklus		2 Zyklen		3 Zyklen	
		RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
Cer d18:1/16:0	8,53	0,72	9,52	4,21	8,96	1,36	5,02
Cer d18:0/22:0	11,42	8,57	4,62	3,95	5,83	4,04	7,98
Cer d18:0/24:0	3,34	10,06	10,58	10,15	4,41	3,28	7,05
Cer d18:1/16:0	8,53	0,72	9,52	4,21	8,96	1,36	5,02
Cer d18:1/22:0	3,35	2,26	2,63	2,58	2,95	2,13	2,73
Cer d18:1/23:0	4,67	3,59	4,08	1,7	3,76	1,62	3,09
Cer d18:1/24:0	2,71	5,47	3,36	3,29	2,33	4,08	3,19
Cer d18:2/22:0	3,29	0,46	4,17	2,83	4,02	-1,24	7,77
DG 32:1	6,59	6,97	2,55	9,31	4,51	9,88	6,58
DG 34:1	2,87	4,89	2,9	5,16	2,71	3,51	4,38
DG 34:2	4,14	4,63	2,49	3,42	1,49	5,84	1,8
DG 36:1	4,76	1,29	3,64	2,96	2,47	3,48	3,24
DG 36:2	2,51	4,53	1,75	3,02	2,22	3,85	1,91
DG 36:3	3,37	4,47	2,12	2,46	1,32	3,18	1,83
DG 36:4	3,41	4,4	2	2,5	2,42	4,23	1,92
DG 38:5	1,73	5,7	3,56	1,27	1,66	3,12	1,65
DG 38:6	6,48	1,86	5,33	2,28	5,87	0,8	3,87
FA 14:0	14,06	8,46	5,61	<b>38,12</b>	<b>29,6</b>	<b>16,89</b>	<b>16,51</b>
FA 15:0	6,73	7,59	7,24	<b>46,1</b>	<b>35,55</b>	<b>39,28</b>	<b>18,9</b>
FA 16:0	12,45	<b>27,61</b>	<b>17,94</b>	<b>23,97</b>	<b>15,49</b>	<b>29,92</b>	<b>16,08</b>
FA 16:1	13,84	<b>16,71</b>	11,18	<b>50,83</b>	<b>35,8</b>	<b>41</b>	8,72
FA 17:0	<b>17,53</b>	1,41	5,75	<b>35,1</b>	<b>26,35</b>	<b>27,2</b>	14,86
FA 17:1	13,86	<b>18,23</b>	<b>18,83</b>	<b>31,22</b>	<b>48,03</b>	<b>35,87</b>	<b>15,55</b>
FA 18:0	4,41	<b>25,23</b>	14,83	<b>30,22</b>	12,45	<b>21,05</b>	<b>17,49</b>
FA 18:1	7,56	1,78	<b>15,36</b>	14,44	6,3	-2,61	9,34
FA 18:2	6,71	0,84	4,61	-1,69	7,7	2,25	9,62
FA 18:3	8,23	5,05	12,96	7,65	12,27	6,49	7,39
FA 18:4	<b>16,01</b>	-1,77	6,33	-0,97	4,83	0,01	10,4
FA 20:1	<b>16,41</b>	1,14	<b>15,21</b>	0,53	9,73	10,65	10,39
FA 20:2	12,83	-0,04	9,96	<b>15,49</b>	<b>18,7</b>	7,68	7,27
FA 20:4	6,09	4,8	5,8	9,21	6,81	4,51	4,21
FA 20:5	5,92	6,37	1,34	7,08	3,33	5,14	4,01
FA 22:4	12,48	6,71	8,91	9,95	6,52	6,98	2,52
FA 22:6	10,97	3,94	4,62	4,9	3,32	3,25	4,57
FA 24:0	<b>20,32</b>	<b>28,14</b>	14,79	<b>33,68</b>	<b>27,31</b>	<b>30,49</b>	<b>17,53</b>
FA 24:1	6,93	1,94	4,38	2,35	7,25	7,5	4,76
Hex2Cer d18:1/16:0	2,99	4,21	4,01	3,76	2,66	6,32	3,28
Hex2Cer d18:1/24:1	6,32	3,09	2,01	0,66	8,27	4,03	7,01
HexCer d18:1/16:0	7,08	10,74	7,38	3,09	5,18	0,05	4,3
HexCer d18:1/24:0	3,02	5,85	2,58	5,15	4,51	5,72	1,85
LPC 14:0	2,38	1,93	3,16	1,38	3,65	3,17	2,13
LPC 15:0	3,63	1,92	1,42	-0,47	4	0,71	1,07
LPC 16:0	1,35	3,56	2,65	2,23	1,89	2,8	1,39
LPC 16:1	1,44	0,64	3	-0,71	2,65	0,71	1,11
LPC 17:0	2,13	4,22	2,94	3,55	1,93	3,5	2,68
LPC 18:0	2,28	3,28	3,25	4,03	2,04	3,26	1,45
LPC 18:1	1,18	3,08	2,78	0,96	1,55	2,66	1,31



## Frier-Tau-Stabilität von Humanplasma

	Kontrol. RSD [%]	1 Zyklus		2 Zyklen		3 Zyklen	
		RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
LPC 18:2	2,2	2,82	2,27	-0,87	2,57	2,63	0,82
LPC 18:3	3,02	1,39	2,9	0,96	2,79	2,4	0,7
LPC 20:0	2,81	5,1	4,67	1,28	4,56	2,93	3,45
LPC 20:1	1,96	5,95	2,89	4,84	3,61	3,6	1,88
LPC 20:2	2,33	3,03	5,08	2,19	5,72	3,9	6,4
LPC 20:3	2,14	2,76	3,29	0,48	3,91	1,68	1,94
LPC 20:4	1,52	2,15	1,38	-0,2	2,77	2,05	1,74
LPC 20:5	2,46	2,91	3,88	1,01	3,67	2,63	1,16
LPC 22:0	9,17	3,53	8,08	9,51	4,79	-5,67	9,24
LPC 22:4	3,26	1,82	5,82	-0,16	6,11	-1,4	5,16
LPC 22:5	4,08	4,49	3,39	1,61	2,41	3,88	3,51
LPC 22:6	2,09	1,51	3,1	0,7	1,95	1,86	2,55
LPC 24:0	6,89	6,78	3,83	2,3	2,77	4,69	3,9
LPC O-16:0	5,72	2,47	3,07	6,61	5,02	4,3	2,48
LPC O-16:1	6,85	3,99	5,99	6,88	6,72	4,62	2,15
LPC O-18:0	5,08	4,54	4,22	5	3,18	1,69	5,56
LPC O-18:1	8,73	3,08	4,04	10,29	8,29	2,74	2,09
LPE 16:0	7,36	4,49	5,32	4,74	4,76	0,15	1,66
LPE 18:0	7,2	2,22	4,39	4,51	3,44	1,51	3
LPE 18:1	7,58	1,66	5,7	3,67	4,55	1,17	1,81
LPE 18:2	6,63	2,91	5,41	2,8	4,46	1,59	2,61
LPE 20:3	8,59	0,27	9,67	-0,28	7,43	-3,21	2,55
LPE 20:4	6,79	1,53	5,92	3,76	3,44	1,41	1,62
LPE 22:6	7,21	2,14	7,86	1,52	4,71	-1,99	2
LPE O-16:1	6,64	8,64	4,59	10,59	4,5	0,39	3,59
LPE O-18:1	5,12	5,16	5,96	9,77	2,85	-1,28	2,32
LPI 18:0	5,24	0,14	3,21	1,2	3,64	2,74	2,01
LPI 18:2	2,93	-2,64	4,92	-0,58	4,76	1,27	2,98
LPI 20:3	7	1,82	4,44	-2,37	9,14	7,44	5,91
LPI 20:4	1,12	-0,81	5,85	-0,94	6,85	0,58	4,61
PC 30:0	3,09	4,36	3,78	0,88	1,67	3,13	1,19
PC 30:1	3,5	6,8	5,6	4,26	3,1	4,39	2,17
PC 30:2	8,47	-1,95	6,74	14,25	13,78	-4,65	3,89
PC 32:0	2,34	3,77	2,5	1,24	1,75	2,51	1,05
PC 32:1	1,13	3,75	3	1,24	1,42	2,1	1,42
PC 32:2	2,41	4,55	2,78	1,6	2,52	2,91	3,17
PC 33:2	4,83	1,54	3,04	-1,76	2,57	2	2,21
PC 34:0	4,1	3,39	1,93	0,76	3,57	2,76	1,47
PC 34:1	2,14	3,19	2,28	-0,26	1,5	0,75	1,08
PC 34:2	1,32	0,93	3,02	-0,82	1,11	0,74	0,77
PC 34:3	1,63	3,85	4,17	1,13	1,62	3,11	2,43
PC 34:4	3,47	4,99	3,57	3,36	2,95	4,06	2,88
PC 34:5	5,11	6	7,43	2,82	2,6	2,49	2,53
PC 36:1	2,49	3,65	3,46	1,25	2,16	1,76	0,95
PC 36:2	1,96	2,66	3,13	0,17	1,66	0,7	0,89
PC 36:3	2,22	1,93	2,8	0,05	1,78	1,18	1,4
PC 36:4	1,59	2,3	2,49	0,27	1,88	0,51	1,32
PC 36:5	2,18	2,84	2,98	0,68	1,68	2,71	0,7
PC 38:2	2,23	4,38	3,23	1,45	1,73	3,55	0,94
PC 38:3	4,44	2,33	3,15	1,02	2,57	1,91	1,78

	Frier-Tau-Stabilität von Humanplasma						
	Kontrol. RSD [%]	1 Zyklus		2 Zyklen		3 Zyklen	
		RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
PC 38:4	2,03	4,18	2,75	0,8	1,37	2,18	0,99
PC 38:6	2,91	2,53	4,34	0,48	2,73	2,31	1,63
PC 40:4	3,67	4,51	3,48	1,13	2,14	3,05	2,78
PC 40:6	2,78	4,76	2,69	2,03	2,56	2,21	0,9
PC 40:7	2,23	1,99	3,59	1,02	2,68	0,24	1,04
PC O-16:0_16:0	4,47	1,08	2,25	3,27	7,16	1,68	5,4
PC O-16:0_18:2	7,37	2,31	6,19	-2,21	4,5	-2,22	5,12
PC O-16:0_20:4	3,6	2,21	1,4	0,27	5,11	0,1	6,1
PC O-16:1_16:0	9,47	5,88	4,38	4,84	5,93	7,88	5,13
PC O-16:1_18:1	8,44	-0,07	4,92	4,8	4,83	3,21	2,85
PC O-16:1_18:2	4,93	4,6	3,59	0,54	4,21	2	6,19
PC O-16:1_20:4	6,6	1,15	5,4	2,09	3,14	3,55	4,72
PC O-18:0_20:4	6,82	3,01	4,92	6,8	3,05	3,63	4,84
PC O-18:1_20:4	9,08	4,99	8,18	2,14	3,27	-2,74	5,71
PC O-34:1	6,97	0,65	3,87	0,99	3,3	3,2	1,23
PE 32:1	6,74	1,06	6,1	-0,62	8,89	-4,37	8,27
PE 34:1	6,13	1,15	2,95	1,67	4,35	-0,58	4,37
PE 34:2	8,88	-0,74	2,72	1,35	5,42	2,32	5,39
PE 34:3	10,17	-3,65	6,47	3,52	12,93	-1,44	4,49
PE 36:1	5,68	1,06	4,02	2,72	5,71	0,72	4,21
PE 36:2	5,94	4,87	4,39	3,21	6,6	2,91	2,29
PE 36:3	7,95	6,17	2,6	6,93	5,82	4,09	5,61
PE 36:4	7,89	4,53	5,6	4,87	6,01	2,5	3,12
PE 36:5	7,94	5,92	2,51	4,49	5,08	4,6	2,68
PE 38:4	6,66	4,47	5,35	3,46	4,56	0,98	2,92
PE 38:5	7,21	-3,13	5,22	-1,59	5,67	0,73	5,65
PE 38:6	7,3	5,01	5,24	1,43	7,42	3,06	5,45
PE 40:6	7,74	2,3	2,15	3,74	4,89	1,35	5,08
PE 40:7	9,63	3,6	6,91	3,52	6,53	0,1	3,27
PE O-16:1_18:2	9,72	0,91	2,6	3,39	4,29	0,63	1,28
PE O-16:1_20:4	7,47	2,82	3,29	2,94	4,73	2,03	5,62
PE O-18:1_18:1	10,18	5,76	5,96	6,51	7,59	2,61	2,25
PE O-18:1_18:2	5,51	3,99	6,23	2,67	5,74	-0,51	6,06
PE O-18:1_20:4	8,49	4,63	4,2	2,37	3,44	0,22	4,3
PE O-18:2_20:4	9,86	0,55	6,75	4,47	4,24	0,72	2,89
PI 32:1	<b>17,82</b>	9,12	6,76	5,06	12,62	4,94	10,63
PI 34:1	5,81	7,62	7,01	8,14	5,81	5,92	2,67
PI 34:2	9,63	-1,39	5,67	-2,49	3,25	-3,59	5,18
PI 36:1	8,89	5,5	3,37	4,38	4,24	4,22	4,24
PI 36:2	5,79	2,06	3,99	3,1	5,72	-0,51	3,38
PI 36:3	10,77	-2,81	5,21	-5,43	8,28	-4,24	6,07
PI 36:4	8,81	4,56	4,53	2,37	5,36	-0,31	2,75
PI 38:3	4,45	1,65	6,49	3,53	6,88	2,63	4,49
PI 38:4	7,01	5,52	4,56	8,9	4,65	4,13	3,88
PI 38:6	10,91	-2,55	5,6	-0,95	9,61	-5,89	3,4
PI 40:5	9,64	11,2	8,8	<b>15,3</b>	7,86	11,62	8,18
PI 40:6	4,58	6,6	4,25	3,92	9,02	4,96	5,21
PS 36:1	<b>19,09</b>	3,71	<b>15,04</b>	-14,03	<b>28,41</b>	-1,13	11,41
SE 27:1/14:1	5,33	4,61	6,44	3,42	5,55	-2,86	7,68
SE 27:1/16:1	4,94	2,41	7,87	-0,58	3,78	0,83	4,64

## Frier-Tau-Stabilität von Humanplasma

	Kontrol. RSD [%]	1 Zyklus		2 Zyklen		3 Zyklen	
		RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
SE 27:1/17:1	6,48	1,41	6,68	-0,12	4,71	1,77	4,49
SE 27:1/18:1	4,66	-0,52	3,2	0,57	2,87	-0,93	3,4
SE 27:1/18:2	4,48	-1,44	5,05	-2,1	2,55	-1,12	2,84
SE 27:1/20:3	4,78	-0,69	5,09	-3,82	1,3	-2,86	2,44
SE 27:1/20:4	3,03	1,42	4,98	0,19	1,31	0,73	4,09
SE 27:1/20:5	1,26	3,35	3,94	3,28	2,1	1,48	3,34
SE 27:1/22:4	3,92	-0,08	4,04	0,63	8,81	-5,58	4,8
SE 27:1/22:6	1,46	2,62	4,6	3,78	2,92	1,2	3,5
SE 27:1/24:1	9,69	-2,84	9,5	6,08	3,9	0,65	12,77
SM 30:1	4,3	6,05	2,99	4,4	1,34	4,25	3,01
SM 32:1	4,26	3,15	2,59	1,39	2,75	2,73	1,76
SM 32:2	3,02	5,37	4,1	2,13	1,72	2,93	3,05
SM 33:1	3,01	3,75	4,76	2,23	2,18	3,8	1,69
SM 33:2	4,19	1,09	4,35	1,4	9,05	0,36	7,59
SM 34:0	3,42	3,35	3,47	3,62	2,13	2,42	2,56
SM 34:1	1,67	2,28	2,76	-0,32	1,44	1,53	0,73
SM 34:2	4,71	4,29	3,05	2,8	1,81	3,44	3,49
SM 35:1	1,77	4,8	4,61	1,37	3,9	4,26	2,87
SM 36:0	7,09	1,52	7,86	-2,8	7,62	-2,9	4,34
SM 36:1	2,11	4,17	3,36	1,08	3,07	2,61	1,7
SM 36:2	2,71	4,4	3,65	1,46	2,25	2,05	2,13
SM 36:3	4,99	2,99	4,48	6,06	6,85	2,76	6,29
SM 37:1	3,32	3,77	4,26	-0,45	2,45	1,19	3,36
SM 38:1	3,03	5,57	3,09	2,57	1,74	4,28	1,53
SM 38:2	3,42	6,16	2,84	1,7	2,52	2,09	2
SM 39:1	2,71	3,15	2,96	1,04	2,35	0,98	2,12
SM 40:1	2,19	6,1	2,59	3,24	1,47	4,26	0,84
SM 40:2	3,23	5,6	2,96	2,79	1,01	3,97	1,11
SM 40:3	1,82	7,65	5,72	5,92	6,37	8,19	3,79
SM 41:1	3,33	4,15	2,96	2,29	1,85	4,19	1,91
SM 41:2	3,76	3,28	3,92	2,01	1,4	2	1,19
SM 42:1	4,23	4,91	3,38	4,37	2,8	3,96	0,69
SM 42:2	1,82	5,03	2,7	2,53	1,29	3,77	0,91
SM 42:3	3,1	5,81	3,23	2,94	1,17	4,37	1,17
SM 43:1	4,07	3,64	3,97	2,65	2,71	2,95	3,53
SM 43:2	3,13	3,21	3,02	1,39	1,18	2,78	2,13
ST 19:2_OH2_S	2,7	-1,68	5,21	-2,51	3,22	2,37	4,42
ST 19:2_OH3_S	5,45	-2,72	6,18	-5,29	6,08	0,65	6,41
ST 27:1_OH	5,46	6,44	5,14	3,52	3,14	2,61	5,7
ST 27:1_OH_S	5,29	4,63	7,29	<b>15,05</b>	<b>16,18</b>	10,73	13,85
TG 42:1	3,16	3,48	3,46	2,32	2,1	2,3	1,82
TG 42:2	2,71	2,41	3,86	1,22	2,61	1,82	1,27
TG 44:0	1,83	1,14	6,13	0,93	1,26	-2,03	5,25
TG 44:1	2,77	3,54	3,65	2,85	2,44	1,97	2,23
TG 44:2	2,54	2,34	3,96	1,64	2,86	1,06	1,62
TG 46:1	0,87	2,02	3,33	1,67	2,23	1,3	2,15
TG 46:2	2,31	4,05	3,53	2,85	2,8	2,7	1,44
TG 46:3	2,97	2,64	3,85	1,82	2,5	0,84	1,1
TG 48:1	4,37	-1,67	4,11	-1,1	2,15	-1,7	3,97
TG 48:2	1,01	1,44	3,59	1,24	1,93	0,83	2,44

## Frier-Tau-Stabilität von Humanplasma

	Kontrol. RSD [%]	1 Zyklus		2 Zyklen		3 Zyklen	
		RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
TG 48:3	2,67	3,47	4,04	2,88	3,29	1,46	1,34
TG 48:4	2,46	3,21	3,03	2,97	2,57	1,1	1,54
TG 50:1	3,5	1,78	4,34	1,03	1,02	-1,71	7,38
TG 50:2	2,73	-1,18	3,59	-0,59	0,38	-2,07	2,45
TG 50:3	2,05	1,35	4,88	-0,27	2,05	-0,54	3,43
TG 50:4	2,89	2,79	3,88	2,61	2,36	1,38	2,36
TG 52:1	4,59	2,73	4,91	-0,2	2,09	-1,61	13,32
TG 52:2	4,1	1,46	6,44	-0,3	1,79	-1,56	3,56
TG 52:3	2,72	-1,91	4,11	-1,15	1,82	-2,36	3,07
TG 52:4	1,82	1,25	4,4	-0,33	2,17	-0,56	2,92
TG 52:5	2,24	2,76	3,31	2,32	2,37	1,48	2,12
TG 54:1	3,98	-3,08	7,56	-0,77	3,6	-6,43	<b>17,24</b>
TG 54:2	4,32	2,98	3,42	0,83	3,6	0,33	6,68
TG 54:3	3,06	-1	6,54	-2,09	2,71	-3,31	4,39
TG 54:4	3	-0,28	4,21	-0,63	2,14	-3,25	2,81
TG 54:5	1,44	1,58	4,31	-0,61	2,02	-2,56	1,79
TG 54:6	4,47	0,93	6,81	-2,67	8,69	2,16	8,24
TG 56:1	5,6	0,83	7,19	3,73	4,16	-5,41	<b>18,19</b>
TG 56:2	2,88	-1,71	7,13	0,32	3,81	-1,92	7,96
TG 56:3	3,81	2,43	3,55	1,04	4,44	-0,57	5,68
TG 56:4	3,56	-1,42	8,15	-4,04	4,18	-4,96	6,59
TG 56:5	1,65	-0,1	4,04	0,79	1,71	-2,77	3,41
TG 56:6	3,18	1,14	7,9	-1,15	2,01	-1,76	2,15
TG 58:1	5,65	4,15	7,85	5,99	6,35	-1,92	<b>18,49</b>
TG 58:2	1,92	0,43	5,89	3,18	3,93	-2,92	9,78
TG 58:3	2,88	-3,15	7,28	-0,85	3,42	-2,56	8,67
TG 58:4	3,07	-0,2	4,67	1,83	4,95	-1,63	3,94
TG 58:6	11,37	-1,25	<b>15,94</b>	5,17	2,25	-8,57	12,21

Tabelle 42: Stabilität von extrahiertem Humanplasma bei 6 °C auf dem Autosampler.

Die Proben wurden an verschiedenen Tagen vorbereitet und vor der Messung für die angegebene Zeit auf dem Autosampler gelagert (maximal 72 h). Werte > 15% sind fett markiert (n=5).

Analyt	Autosampler-Stabilität						
	0 Std.	24 h		48 h		72 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
Cer d18:1/16:0	3,76	-3,5	3,4	-3,38	1,84	0,87	6,8
Cer d18:0/22:0	5,43	-0,47	10,26	-6,32	10,13	0,61	7,74
Cer d18:0/24:0	3,12	5,95	10,22	1,39	4,23	1,01	1,93
Cer d18:1/16:0	3,76	-3,5	3,4	-3,38	1,84	0,87	6,8
Cer d18:1/22:0	2,83	4,61	6,96	-2,54	1,65	-0,29	3,27
Cer d18:1/23:0	3,02	-3,14	7,16	-7,34	2,99	-6,02	3,09
Cer d18:1/24:0	2,27	5,03	7,4	0,73	2,47	3,66	0,93
Cer d18:2/22:0	4,66	8,65	7,8	6,12	5,8	1,74	4
DG 32:1	3,07	<b>18,23</b>	<b>19,18</b>	6,43	5,5	7,72	2,23
DG 34:1	1,48	9,06	5,03	6,65	2,79	11,48	2,33
DG 34:2	3,19	4,94	6,12	1,98	3,21	9,07	2,74
DG 36:1	2,16	9,14	8,52	2,89	4,25	11,23	5,04
DG 36:2	1,6	5,95	3,39	2,9	2,96	9,42	1,88
DG 36:3	3,95	5,33	2,77	3,92	3,56	9,46	1,63
DG 36:4	2,71	4,2	5,16	9,13	<b>15,3</b>	8,68	5,24
DG 38:5	7,91	1,75	4,58	-0,52	5,12	2,02	1,36
DG 38:6	2	1,59	4,59	0,23	4,48	5,98	4,11
FA 14:0	2,19	-0,76	3,28	-2,56	5,26	-1,78	6,27
FA 15:0	8,11	1,09	8,36	-6,74	7,29	8,31	14,12
FA 16:0	8,03	3,77	6,06	-7,29	12,31	-0,64	4,65
FA 16:1	4,08	-0,63	4,55	0,87	3,91	0,94	6,89
FA 17:0	3,42	2,48	5,04	-6,38	6,58	2,85	5,45
FA 17:1	3,92	5,01	6,31	0,81	7,65	7,16	12,08
FA 18:0	8,66	7,01	13,63	-11	<b>20,6</b>	-3,66	9,27
FA 18:1	1,74	-0,54	3,6	-0,71	4,48	-0,92	3,37
FA 18:2	3,34	0,11	2,99	2,18	3,06	1,04	4,05
FA 18:3	2,43	-0,12	2,81	1,58	3,59	0,44	3,16
FA 18:4	4,27	-1,77	3,6	1,35	4,74	-1,69	3,73
FA 20:1	2,81	1,15	4,05	-0,07	4,04	2,22	3,75
FA 20:2	2	2,32	2,47	1,01	4,17	3,23	6,09
FA 20:4	3,44	-1,43	2,15	1,24	3,14	0,92	2,84
FA 20:5	5,58	-1,21	2,45	0,82	3,22	2,97	5,83
FA 22:4	5,62	-0,25	4,16	0,71	4,36	-0,88	2,08
FA 22:6	3,2	-0,89	2,55	0,43	3,64	-0,03	1,91
FA 24:0	<b>18,94</b>	-5,05	7,15	1,09	4,62	7,45	14,71
FA 24:1	7,49	0,62	8,61	0,33	7,81	2,49	5,69
Hex2Cer d18:1/16:0	2,17	4,03	2,93	-2,66	3,33	-0,5	1,97
Hex2Cer d18:1/24:1	2,57	-1,97	7,02	-2,06	7,81	-3,5	2,3
HexCer d18:1/16:0	3,35	-1,96	3,79	-1,06	7,12	-0,97	8,41
HexCer d18:1/24:0	2,2	8,63	6,92	1,77	1,78	7,09	2,71
LPC 14:0	1,46	2,12	3,12	0,3	3,97	1	2,93
LPC 15:0	1	1,47	3,06	-0,67	2,7	2,93	1,83
LPC 16:0	2,3	3,3	2,25	1,42	2,32	3,67	0,96
LPC 16:1	2,6	3,06	3,39	1,93	3,31	4,3	2,31
LPC 17:0	1,81	0,8	2,66	0,33	2,73	1,37	2,59
LPC 18:0	1,47	0,5	2,29	0,13	2,15	3,43	1,43

Analyt	Autosampler-Stabilität						
	0 Std.	24 h		48 h		72 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
LPC 18:1	1,99	1,24	3,06	0,74	2,39	3,5	1,3
LPC 18:2	2,54	1,8	1,38	1,66	2,24	3,12	1,4
LPC 18:3	2,55	2,14	2,81	-2,89	9,01	4,4	3,14
LPC 20:0	3,64	8,02	9,65	4,43	3,3	3,58	3,56
LPC 20:1	2,46	0,62	2,95	0,81	4,67	3,31	1,91
LPC 20:2	3,26	-1,15	6,23	-4,8	4,96	4,89	11,68
LPC 20:3	2,05	4,27	1,8	2,83	2,33	5,1	0,77
LPC 20:4	2,5	4,94	1,97	3,67	2,29	7,05	2,21
LPC 20:5	1,31	1,63	1,85	1,87	4,38	3,65	2,92
LPC 22:0	5,41	2,45	5,68	13,61	6,31	11,8	5,5
LPC 22:4	3,76	11,13	4,39	4,86	3,2	11,2	4,35
LPC 22:5	3,03	-0,71	1,59	3,84	2,27	6,17	3,48
LPC 22:6	1,93	3,17	2,53	2,59	1,98	6,41	2,76
LPC 24:0	3,71	4,43	2,44	-6,13	3,28	-0,85	4,44
LPC O-16:0	3,46	0,16	2,75	2,43	3,44	-0,22	3,61
LPC O-16:1	2,66	-0,86	2,67	0,24	3,03	-0,66	4,19
LPC O-18:0	3,6	-0,9	2,84	1,74	4,95	0,61	1,54
LPC O-18:1	4,11	1,16	5,24	3,01	2,95	0,82	3,16
LPE 16:0	1,76	-0,2	3,21	3,12	3,45	0,35	2,99
LPE 18:0	2,96	-0,52	3,56	1,47	3,73	0,43	3,48
LPE 18:1	3,24	0,87	2,28	4,43	3,5	3,87	1,38
LPE 18:2	3,91	3,31	3,76	6,63	5,33	3,07	4,32
LPE 20:3	5,15	10,81	4,03	<b>32,63</b>	8,39	<b>37,37</b>	6,97
LPE 20:4	4,21	9,24	12,94	<b>23,43</b>	13,01	12,82	<b>17,51</b>
LPE 22:6	2,35	13,47	3,34	<b>26,79</b>	6,47	<b>26,57</b>	5,62
LPE O-16:1	2,78	1,01	6,91	8,27	2,85	7,73	6,49
LPE O-18:1	6,76	2,68	6,38	8,02	2,83	10,7	3,88
LPI 18:0	3,53	3,68	4,11	9,2	3,99	13,86	4,77
LPI 18:2	4,97	1,09	4,66	9,53	9,18	3,41	3,44
LPI 20:3	6,97	-10,79	14,46	-8,52	14,09	1,1	11,24
LPI 20:4	2,01	0,49	4,64	2,43	1,86	-1,91	5,74
PC 30:0	1,93	2,47	5,53	0,06	2,48	1,2	1,61
PC 30:1	1,81	3	7,47	0,14	2,3	2,58	1,59
PC 30:2	4,42	0,02	5,77	-3,82	3,98	-0,79	4,89
PC 32:0	2,39	3,09	4,27	0,45	2,08	3,18	3,6
PC 32:1	1,97	6,52	6,94	1,58	2,91	0,25	2,84
PC 32:2	1,79	3,27	7,06	-0,04	1,69	3,07	2,62
PC 33:2	2,15	0,9	3,74	-0,7	1,4	0,11	1,14
PC 34:0	1,64	1,57	2,55	0,09	3,59	3,92	2,34
PC 34:1	1,98	2,14	6,24	-0,05	1,99	2,4	2,81
PC 34:2	2,19	5,44	7,91	1,33	0,87	1,02	3,13
PC 34:3	1,39	3,48	5,55	0,83	1,33	2,92	2,02
PC 34:4	1,45	1,44	7,59	0,22	1,32	3,07	2,77
PC 34:5	2,32	-0,18	6,57	-1,05	3,88	1,21	1,84
PC 36:1	2,36	1,61	2,21	-0,64	0,65	3,11	1,24
PC 36:2	3,19	2,87	5,43	0,83	2,48	2,03	2,99
PC 36:3	1,51	3,44	5,7	1,09	1,56	3,81	2,34
PC 36:4	1,81	6,15	9,66	0,61	2,04	0,03	2,79
PC 36:5	0,44	1,44	4,02	0,69	1,82	2,93	2,01

Analyt	Autosampler-Stabilität						
	0 Std.	24 h		48 h		72 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
PC 38:2	2,66	1,02	3,04	-0,46	2,04	2,05	0,94
PC 38:3	6,05	-0,38	6,22	-1,74	7,06	6,2	6,92
PC 38:4	1,39	4,11	10,89	-0,52	1,87	0,49	2,74
PC 38:6	1,23	0,84	5,94	0,5	0,58	1,52	2,29
PC 40:4	0,95	0,9	1,74	0,14	1,84	3,67	3,26
PC 40:6	3,25	0,95	5,4	0,62	2,35	3,55	3,4
PC 40:7	1,35	1,18	9,62	-0,69	2,49	0,2	2,16
PC O-16:0_16:0	3,43	-1,24	3,56	2,63	3,82	0,39	1,66
PC O-16:0_18:2	4,13	0,48	3,71	1,42	1,93	1,44	2,14
PC O-16:0_20:4	4,32	-0,48	5,25	-0,58	2,54	-0,56	3,56
PC O-16:1_16:0	6,33	0,06	5,7	0,48	3,26	-1,86	4,49
PC O-16:1_18:1	5,5	-3,14	5,84	-0,47	4,86	-1,47	3,27
PC O-16:1_18:2	4,91	-1,03	5,66	-1,67	3,5	-0,34	4,96
PC O-16:1_20:4	6,79	-0,08	6,87	-0,5	3,07	-0,38	6,55
PC O-18:0_20:4	7,61	-0,8	7,59	-0,93	2,64	1,77	4,02
PC O-18:1_20:4	4,73	-1,15	5,16	1,12	2,79	-0,65	3,86
PC O-34:1	5,13	-0,18	6,05	-1,26	4,62	-0,38	4,9
PE 32:1	5,46	-1,19	5,57	-1,19	2,55	0,49	7,2
PE 34:1	3,14	0,08	2,55	-0,95	3,72	-0,8	3,64
PE 34:2	2,9	-1,22	1,64	-0,38	1,99	-0,49	2,79
PE 34:3	8,75	-6,42	6,82	-3,7	8,84	-3,86	4,2
PE 36:1	2,56	0,56	3,89	-0,18	2,84	-2,08	2,73
PE 36:2	5,35	-2,13	3,47	0,44	4,29	-1,65	3,17
PE 36:3	2,28	0,51	4,29	-0,63	1,7	-0,19	4,04
PE 36:4	2,94	-1,23	4,89	1,3	2,57	0,17	4,7
PE 36:5	4,83	-1,94	5,25	6,34	4,35	-2,58	3,18
PE 38:4	5,11	0,97	5,12	2,02	3,92	0,75	3,6
PE 38:5	3,59	-0,12	2,8	0,18	3,06	-1,2	2,14
PE 38:6	5,61	0,26	4,17	0,47	2,81	0,24	4,43
PE 40:6	4,51	-2,35	5,66	-0,81	4,13	-0,32	3,61
PE 40:7	7	4,03	2,74	0,6	8,03	2,34	6,29
PE O-16:1_18:2	3,88	-1,16	5,31	2,6	2,12	-0,58	4,92
PE O-16:1_20:4	4,8	-2,35	6,03	0,48	3,87	1,42	5,19
PE O-18:1_18:1	2,95	4,43	2,08	1,64	0,9	0,87	6,2
PE O-18:1_18:2	2,89	0,56	2,49	0,67	2,23	1,06	3,93
PE O-18:1_20:4	4,25	-0,34	2,44	1,47	0,72	2,93	5,79
PE O-18:2_20:4	4,15	-0,75	2,68	3,48	4,74	0,28	5,15
PI 32:1	5,51	-2,91	4,2	0,77	3,14	1,11	7,27
PI 34:1	6,68	1,78	6,13	1,46	4,03	2,12	4,35
PI 34:2	2,59	-0,59	3,34	1,72	4,16	4,2	5,77
PI 36:1	4,03	4,58	2,89	0,95	3,89	2,89	2,7
PI 36:2	6,72	-0,52	4,13	-1,11	3,21	-1,37	2,71
PI 36:3	10,33	-4,66	5,03	-2,81	7,74	-6,95	5,76
PI 36:4	8,18	1,9	10,81	5,67	8,24	7,03	7,34
PI 38:3	5,77	1,63	2,66	0,88	5,13	0,62	2,4
PI 38:4	8,8	-0,7	9,41	-0,25	4,89	0,71	9,47
PI 38:6	4,47	1,45	5,96	-1,55	6,22	-3,22	6,29
PI 40:5	4,41	-1,27	5,65	1,4	4	1,75	2,01
PI 40:6	4,11	-3,65	4,27	-0,65	4,38	-2,74	2,02

Analyt	Autosampler-Stabilität						
	0 Std.	24 h		48 h		72 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
PS 36:1	8,94	14,97	<b>20,1</b>	-3,6	14,58	10,9	<b>21,35</b>
SE 27:1/14:1	2,53	1,1	2,86	-3,02	4,9	-2,66	1,5
SE 27:1/16:1	8,36	-7,06	6,17	-5,52	6,97	-7,44	6,52
SE 27:1/17:1	1,24	-2,53	7,21	-6,99	7,68	-10,75	4,38
SE 27:1/18:1	5,73	5,29	6,33	5,81	7,27	0,18	4,1
SE 27:1/18:2	7,97	-2,15	7,61	-6,43	8,37	-7,3	10,02
SE 27:1/20:3	5,59	-7,96	6,52	-5,48	6,02	-6,5	8,46
SE 27:1/20:4	5,22	-2,38	5,41	-3,38	4,68	-6,58	4,65
SE 27:1/20:5	2,25	-0,3	2,62	-2,92	3,07	-3,69	2,76
SE 27:1/22:4	10,35	-8,84	9,05	-1	3,4	-6,09	4,02
SE 27:1/22:6	1,74	-2,23	3,18	-1,37	2,15	-3,57	1,96
SE 27:1/24:1	7,38	-5,27	10,52	-9,26	8,69	<b>-16,27</b>	7,61
SM 30:1	1,81	2,74	5,46	-1,06	2,42	2,81	1,51
SM 32:1	2,17	2,09	6,75	0,15	1,14	2,8	1,65
SM 32:2	2,6	3,33	5,72	1,13	1,12	4,27	1,56
SM 33:1	1,69	1,86	4,94	-0,9	1,99	3,14	1,82
SM 33:2	9,4	1,66	7,26	2,05	4,24	3,03	3,05
SM 34:0	1,74	1,48	7,83	-1,46	3,24	0,23	4,68
SM 34:1	1,45	7,06	7,38	1,11	1,23	2,69	2,78
SM 34:2	1,16	2,48	9,33	-0,08	2,23	2,2	3,37
SM 35:1	2,2	1,76	5,32	-0,9	3,59	1,28	3,56
SM 36:0	5,49	9,79	5,15	6,32	2,98	0,74	5,99
SM 36:1	1,71	2,52	5,02	-0,34	2,3	0,86	1,91
SM 36:2	1,19	3,94	3,73	0,62	3,24	1,37	4,92
SM 36:3	4,06	0,21	7,52	1,85	5,14	-1,5	6
SM 37:1	3,55	1,76	1,71	-1,43	1,81	4,52	1,52
SM 38:1	1,63	1,17	2,23	-0,68	1,35	3,18	0,96
SM 38:2	1,65	0,76	2,35	-2,72	3,31	0	1,8
SM 39:1	1,05	3,29	3	1,45	1,68	5,34	0,87
SM 40:1	2,24	3	2,44	1,01	2,53	4,17	0,79
SM 40:2	3,18	1,03	2,9	0,1	2,42	3,38	0,52
SM 40:3	2,76	1,3	3,11	-1,96	5,33	2,65	2,75
SM 41:1	3,18	4,45	3,24	0,86	2,31	4,67	0,54
SM 41:2	1,33	1,23	2,16	0,76	1,84	3,93	1,03
SM 42:1	1,77	3,71	4,02	0,43	3,25	5,4	1,66
SM 42:2	2,02	2,36	2,29	0,72	2,71	4,37	0,66
SM 42:3	3,67	0,29	2,94	0,27	2,6	3,56	0,52
SM 43:1	3,96	4,36	6,56	2,77	2,12	3,74	2,55
SM 43:2	3,43	2,48	3,69	0,91	2,8	4,12	2,76
ST 19:2_OH2_S	1,97	2,21	0,67	3,66	2,71	-0,8	3,98
ST 19:2_OH3_S	2,93	1,21	4,24	1,18	5,81	-5	11,05
ST 27:1_OH	1,46	4,79	13,36	-0,76	2,67	1,43	4,93
ST 27:1_OH_S	3,28	-0,69	2,49	-0,59	3,7	0,43	3,73
TG 42:1	3,09	3,79	7,23	-1,27	1,55	1,65	3,3
TG 42:2	4,48	4,29	12,85	0,27	5,46	3,19	3,27
TG 44:0	3,01	1,16	6,55	-5,88	3,34	-4,84	2,04
TG 44:1	2,27	5,01	5,91	0,06	3,19	1,61	1,13
TG 44:2	2,15	3,78	9,27	-0,44	5,88	1,1	2,46
TG 46:1	1,88	3,48	5,05	-0,94	1,84	0,05	1,83



Analyt	Autosampler-Stabilität						
	0 Std.	24 h		48 h		72 h	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]
TG 46:2	1,81	5,91	7,21	1,32	4,11	2,42	1,19
TG 46:3	2,03	7,11	11,8	-0,8	1,7	2,41	1,81
TG 48:1	3,07	-3,73	5,97	-1,37	1,27	-2,08	3,35
TG 48:2	1,15	-0,59	4,05	-1,72	2,01	-1,1	1,57
TG 48:3	1,96	2,68	4,14	-0,51	1,95	0,69	1,55
TG 48:4	2,26	3,68	6,79	-0,01	1,35	2,3	0,65
TG 50:1	4,34	-3,55	4,15	-3,87	3,4	-7,16	3,99
TG 50:2	2,16	-1,38	4,53	0,43	1,92	-1,51	3,11
TG 50:3	1,63	-2,2	3,07	-1,07	1,81	-0,14	1,61
TG 50:4	1,5	1,21	2,03	0	0,37	1,39	1,5
TG 52:1	1,43	-4,75	2,72	-5,56	2,77	-7,56	1,22
TG 52:2	2,44	-2,8	3,6	1,42	1,22	-4,29	2,4
TG 52:3	1,87	-1,37	2,7	0,03	2,29	-1,91	3,29
TG 52:4	2,25	-1,89	1,79	-0,39	1,68	-1,46	4,79
TG 52:5	0,89	0,69	2,59	-0,04	0,22	1,13	1,17
TG 54:1	1,62	-12,02	4,94	-12,53	3,37	-14,51	2,03
TG 54:2	2,56	-1,99	1,69	3,38	2,72	2,34	1,77
TG 54:3	1,73	-4,01	3,72	0,34	0,95	-4,41	1,66
TG 54:4	0,75	-1,53	2,72	1,85	1,43	-0,41	2,44
TG 54:5	3,7	-1,59	2,07	-0,49	2,81	1,81	3,19
TG 54:6	1,96	0,51	4,41	-1,57	1	0,94	2,27
TG 56:1	5,34	-4,38	14,41	-9,1	5,1	-13,94	2,72
TG 56:2	2,71	-7,6	6,3	-1,39	3,6	-3,67	2
TG 56:3	2,4	-3,1	2,87	1,39	2,85	-0,34	1,45
TG 56:4	3,39	-5,95	4,86	1,77	1,19	-3,08	2,37
TG 56:5	1,55	3,75	7,01	5,59	3,58	4,72	1,43
TG 56:6	5,89	3,21	11,8	-0,08	3,64	0,29	4,65
TG 58:1	4,84	-5,92	<b>18,65</b>	-13,75	4,77	<b>-18,91</b>	5,67
TG 58:2	4,29	-4,82	11,87	-1,19	2,66	-6,15	2,47
TG 58:3	3,98	-6,36	7,91	-0,17	2,05	-1,82	2,57
TG 58:4	2,82	-7,47	4,68	-2,84	8,98	-2,96	2,88
TG 58:6	9,32	-2,53	10,33	4,99	6,21	2,49	6,07

## Anhang

Tabelle 43: Stabilität der trockenen Lipid-Extrakte bei -40 bzw. -80 °C.

Die Proben wurden an verschiedenen Tagen extrahiert, nach dem Abdampfen weggefroren und für die angegebene Zeit gelagert. Die Lagerzeiten entsprechen jeweils der maximalen untersuchten Zeit. Werte > 15% sind fett markiert (n=5).

Analyt	Stabilität trockener Lipidextrakte					
	-40°C			-80°C		
	0 Std. RSD [%]	144 Std. RE [%]	RSD [%]	0 Std. RE [%]	166 Std. RE [%]	RSD [%]
Cer d18:1/16:0	4,84	-3,72	4,73	3,24	1,16	7,7
Cer d18:0/22:0	14,81	-7,81	5,53	4,17	-4,98	4,82
Cer d18:0/24:0	6,11	-1,3	1,41	7,98	-1,68	4,61
Cer d18:1/16:0	4,84	-3,72	4,73	3,24	1,16	7,7
Cer d18:1/22:0	3,61	-2,53	1,35	2,72	-1,15	1,68
Cer d18:1/23:0	10,13	-6,3	1,55	2,63	-8,21	2,92
Cer d18:1/24:0	5,28	-2,71	1,24	1,1	0,17	1,92
Cer d18:2/22:0	5,35	-3,5	4,81	4,94	1,13	4,65
DG 32:1	5,71	-4,57	1,82	0,85	0,03	2,8
DG 34:1	0,67	-2,89	1,18	0,95	-0,43	1,69
DG 34:2	3,23	-0,14	2,94	1,95	-2,2	3,54
DG 36:1	6,33	-2,5	1,87	2,65	-1,45	2,59
DG 36:2	1,33	-3,84	1,86	2,59	0,1	2,5
DG 36:3	4,3	1,07	2,85	5,11	-1,99	2,75
DG 36:4	4,95	9,84	<b>16,18</b>	3,61	1,21	3,66
DG 38:5	2,62	2,17	6,24	5,53	0,08	2,71
DG 38:6	3,05	-7,17	5,26	10,25	3,29	3,14
FA 14:0	12,17	-0,68	3,7	5,02	-0,78	3,82
FA 15:0	<b>19,68</b>	-10,23	7,6	13,99	-6,15	7,91
FA 16:0	10,38	-10,32	3,89	2,54	-3,09	3,24
FA 16:1	8,7	0,01	3,48	6,26	0,34	3,46
FA 17:0	10,33	-6,46	3,38	8,5	-3,11	2,26
FA 17:1	10,6	-5,88	5,31	12	-5,89	4,54
FA 18:0	14,45	<b>-16,18</b>	3,14	5,73	-6,73	8,8
FA 18:1	4,91	-2,27	2,99	2,18	1,98	3,93
FA 18:2	7,29	-2,06	3,09	3,69	3,64	2,93
FA 18:3	7,56	-1,5	3,66	2,6	0,8	2,1
FA 18:4	9,05	-1,49	6,08	4,35	2,13	8,88
FA 20:1	5,2	-1,7	5,03	3,86	-2,28	2,72
FA 20:2	5,05	-0,52	5,62	3,48	1,43	1,62
FA 20:4	6,46	0,08	1,75	2,74	1,81	4,35
FA 20:5	5,16	0,39	2,24	2,57	1,27	5,26
FA 22:4	7,63	-2,35	3,95	2,52	3,19	3,26
FA 22:6	7,06	-1,54	2,16	1,89	-0,35	2,89
FA 24:0	14,3	-11,7	12,18	<b>22,93</b>	-10,08	6
FA 24:1	7,54	-0,95	10,82	10,64	2,15	6,8
Hex2Cer d18:1/16:0	2,46	-2,86	1,5	3,99	-1,13	4,14
Hex2Cer d18:1/24:1	2,41	3,31	1,02	4,8	-2,25	1,99
HexCer d18:1/16:0	6,19	-1,96	6,97	3,25	3,63	6,17
HexCer d18:1/24:0	3,97	-3,89	2,38	1,91	-2,76	4,23
LPC 14:0	3,64	0,02	4,33	2,28	2,86	2,91
LPC 15:0	2,98	-1,94	3,01	2,51	0,69	2,04
LPC 16:0	3,03	-0,83	2	2,02	1,81	0,87
LPC 16:1	4,4	0,03	4,04	2,1	2,14	1,87

Stabilität trockener Lipidextrakte

Analyt	-40°C			-80°C		
	0 Std.	144 Std.		0 Std.	166 Std.	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RE [%]	RSD [%]
LPC 17:0	3,41	-2,44	1,95	2,52	0,56	3,27
LPC 18:0	3,27	-1,72	1,91	1,66	0,81	1,25
LPC 18:1	3,21	-0,63	1,48	0,94	1,56	1,13
LPC 18:2	2,94	-0,76	1,74	2,72	0,97	1,34
LPC 18:3	4,08	-0,95	8,1	5,11	3,49	3,38
LPC 20:0	4,12	-1,24	3,11	7,79	5,21	5,23
LPC 20:1	3,07	-2,33	4,15	2,34	0,38	2,76
LPC 20:2	5,34	-2,06	3,39	3,57	-0,51	5,39
LPC 20:3	3,05	1,78	1,55	2,36	1,31	1,57
LPC 20:4	2,96	-0,66	1,95	2,2	0,46	1,74
LPC 20:5	3,77	0,44	3,32	3,04	2,58	3,02
LPC 22:0	0,79	-6,51	9,26	13,29	-5,1	7,5
LPC 22:4	2,48	-2,37	6,1	7,38	3,17	6,44
LPC 22:5	3,41	1,48	1,79	3,18	-0,88	3,94
LPC 22:6	3,93	0,74	1,94	2,86	0,92	2,16
LPC 24:0	4,88	-1,98	5,52	3,19	-0,11	6,86
LPC O-16:0	7,45	0,02	4,11	1,87	1,62	2,14
LPC O-16:1	6,75	0,67	4,94	4,05	2,04	3,21
LPC O-18:0	6,76	-0,19	3,98	4,16	-3,18	4,07
LPC O-18:1	8,06	-2,03	5,75	2,9	-0,41	1,39
LPE 16:0	5,21	2,57	3,3	3,64	2,33	4,17
LPE 18:0	6,47	0,51	3,36	2,78	1,96	2,4
LPE 18:1	5,92	4,02	4,53	2,91	3,19	2,86
LPE 18:2	6,44	1,99	5,57	3,73	1,78	3,71
LPE 20:3	<b>21,76</b>	-6,99	<b>18,06</b>	2,85	1,42	8,36
LPE 20:4	5,29	1,71	2,17	3,44	-2,85	3,62
LPE 22:6	5,9	3,52	3,43	3,34	-0,94	3,76
LPE O-16:1	6,58	-0,3	3,36	6,56	3,18	4,11
LPE O-18:1	5,32	4,33	4,81	5,28	3,86	1,64
LPI 18:0	8,73	-3,56	8,3	6,38	-2,49	4,31
LPI 18:2	<b>15,03</b>	2,69	11,21	10,02	1,06	5,47
LPI 20:3	8,51	-3,03	1,48	6,85	2,18	11,38
LPI 20:4	3,61	-2,43	4,25	4,52	2,74	2,64
PC 30:0	1,21	-0,99	0,83	3,17	-1,17	1,21
PC 30:1	1,15	0,4	1,24	2,27	2,05	3,06
PC 30:2	6,09	-4,23	2,73	7,35	-1,92	6,86
PC 32:0	0,79	-3,42	1,54	1,51	0,7	1,66
PC 32:1	2,81	-0,93	1,8	1,53	1,47	1,31
PC 32:2	2,29	1,08	2,12	1,4	2,08	1,78
PC 33:2	1,87	0,3	2,73	1,59	-1,03	4,34
PC 34:0	2,84	-2,3	1,9	1,53	1,67	3,25
PC 34:1	1,19	-3,21	1,25	1,73	2,03	2,15
PC 34:2	1,96	-0,84	1,18	2,89	1,95	1,78
PC 34:3	1,63	0,27	0,76	2,16	0,63	0,93
PC 34:4	1,75	2,18	1,15	1,08	3,01	1,45
PC 34:5	3,81	-0,23	1,43	2,74	1,99	2,96
PC 36:1	1,23	-2,22	1,17	0,76	1,13	1,9
PC 36:2	1,69	-2,22	1,78	1,84	1,24	2,58

Stabilität trockener Lipidextrakte

Analyt	-40°C			-80°C		
	0 Std.	144 Std.		0 Std.	166 Std.	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RE [%]	RSD [%]
PC 36:3	1,14	-0,86	1,73	1,68	1,06	1,58
PC 36:4	2,94	-1,03	1,92	1,66	1,33	2,27
PC 36:5	1,66	1,99	1,64	1,48	1,73	1,3
PC 38:2	2,58	-2,07	1,36	1,88	1,05	2,77
PC 38:3	4,89	-1,32	6,79	6,03	-1,36	5,17
PC 38:4	1,71	-1,71	1,3	1,96	2,14	1,71
PC 38:6	0,44	1,73	1,03	1,65	-0,53	1,47
PC 40:4	2,82	-0,36	2,45	1,24	0,93	3,59
PC 40:6	1,5	1,59	1,64	1,86	1,65	0,69
PC 40:7	1,41	0,15	3,11	3,17	1,67	1,61
PC O-16:0_16:0	4,91	-3,16	3,39	2,9	-4,12	3,47
PC O-16:0_18:2	3,82	-2,4	3,17	3,61	-1,4	2,61
PC O-16:0_20:4	7,2	-5,69	4,32	6,76	-3,36	5,63
PC O-16:1_16:0	6,33	-1,08	2,91	4,09	-4,48	2,09
PC O-16:1_18:1	4,66	-2,38	3,01	6,48	-1,64	4,16
PC O-16:1_18:2	5,84	-5,3	4,23	6,84	-1,69	6,74
PC O-16:1_20:4	5,34	-2,48	4,07	5,13	-2,68	5,55
PC O-18:0_20:4	4,92	-4,18	5,38	11,41	-3,47	8,69
PC O-18:1_20:4	3,45	-2,79	2,35	5,37	-0,82	3,56
PC O-34:1	5,51	-2,55	3,63	4,93	-3,94	6,56
PE 32:1	7,01	9,37	7,01	6,49	6,43	7,67
PE 34:1	3,47	-0,69	3,68	4,72	1,13	4,55
PE 34:2	2,07	1,54	3,33	5,43	1,86	4,49
PE 34:3	5,16	4,62	10,67	5,78	0,37	7,24
PE 36:1	3,37	3,45	1,81	4,69	2,31	2,6
PE 36:2	3,63	-0,95	3,89	3,32	0,43	1,54
PE 36:3	4,19	0,31	1,58	2,55	-0,53	1,67
PE 36:4	3,78	2,18	0,83	4,35	1,63	2,65
PE 36:5	4,5	-2,26	4,7	4,43	-3,48	6,09
PE 38:4	5,49	1,66	2,73	3,8	-0,33	3,36
PE 38:5	4,48	1,64	3,79	4,38	-0,35	2,96
PE 38:6	2,43	5,48	1,82	3,02	4,27	5,62
PE 40:6	1,8	-0,07	2,48	4,46	5,09	2,74
PE 40:7	3,7	7,9	4,77	3,87	1,71	7,86
PE O-16:1_18:2	3,16	0,75	5,42	5,81	3,88	2,92
PE O-16:1_20:4	1,71	2,55	4,01	4,38	4,23	2,72
PE O-18:1_18:1	5,42	4,17	2,12	5,6	-1,37	7,6
PE O-18:1_18:2	6,39	1,02	3,82	8,36	2,66	1,49
PE O-18:1_20:4	8,19	0,43	5,04	8,57	2,59	3,24
PE O-18:2_20:4	2,58	-0,23	2,41	7,41	2,68	2,91
PI 32:1	<b>15,58</b>	1,36	11,85	4,67	2,95	4,13
PI 34:1	10,02	-3,14	9,19	2,64	0,8	3,79
PI 34:2	9,2	-6,73	8,12	8,56	3	7,51
PI 36:1	11,11	-1	4,6	10,3	2,42	6,75
PI 36:2	6,46	-6,04	4,2	3,38	-2,9	4,98
PI 36:3	<b>19,62</b>	-7,03	12,5	11,7	-5,52	8,42
PI 36:4	<b>17,46</b>	2,94	<b>15,92</b>	13,42	3,95	7,38
PI 38:3	5,24	-1,78	3,25	9,32	-1,85	10,07

Stabilität trockener Lipidextrakte

Analyt	-40°C			-80°C		
	0 Std.	144 Std.		0 Std.	166 Std.	
	RSD [%]	RE [%]	RSD [%]	RE [%]	RE [%]	RSD [%]
PI 38:4	11,58	-7,3	6,89	6,83	-1,85	5,55
PI 38:6	9,82	-2,14	8,3	6,51	-3,21	10,25
PI 40:5	13,97	1,61	9,73	4,76	-1,79	4,62
PI 40:6	5,6	-0,96	1,62	7,79	-1,57	4,12
PS 36:1	<b>15,67</b>	-3,84	7,28	<b>20,32</b>	-11,85	4,13
SE 27:1/14:1	4,32	0,05	2,38	1,35	-6,13	4,56
SE 27:1/16:1	7,19	-3,19	2,91	2,87	0,48	1,33
SE 27:1/17:1	3,61	-2,94	3,74	2,78	-5,49	4,86
SE 27:1/18:1	5,41	0,86	3,51	6,27	-1,37	3,24
SE 27:1/18:2	8,82	0,23	6,1	5,61	-4,15	2,43
SE 27:1/20:3	8,87	-1,07	3,27	4,25	-1,53	1,86
SE 27:1/20:4	4,62	-1,99	4,66	2,47	-2,23	1,71
SE 27:1/20:5	2,54	-1,93	1,74	2,12	-4,52	2,47
SE 27:1/22:4	5,65	0,72	8,37	4,7	1,77	7,56
SE 27:1/22:6	1,28	1,29	1,94	1,28	-3,11	0,84
SE 27:1/24:1	14,98	2,86	3,18	11,36	-4,65	6,34
SM 30:1	3,19	-0,94	3,04	2,63	-0,98	2,22
SM 32:1	0,12	0,84	1,5	1,52	2,47	2,96
SM 32:2	2,11	-1,73	1,46	1,33	0,65	2,78
SM 33:1	3,46	-0,52	1,12	2,72	-0,1	1,86
SM 33:2	5,06	1,64	5,21	5,54	0,97	2,26
SM 34:0	4,02	0,28	1,54	3,72	1,96	4,39
SM 34:1	2,01	-1,68	2,05	1,75	1,91	2,22
SM 34:2	2,64	1,62	2,85	2,12	3,3	1,32
SM 35:1	3,22	-3,35	2,66	3,32	0,51	1,8
SM 36:0	9,37	-1,72	6,75	7,6	-4,38	9,37
SM 36:1	1,46	-1,89	1,21	2,47	0,36	2,61
SM 36:2	2,11	0,44	2,65	2,21	0,63	2,07
SM 36:3	4,5	1,39	4,3	3,66	4,23	10,29
SM 37:1	3,72	0,05	1,73	1,56	-3,27	5,92
SM 38:1	1,79	-2,14	1,12	1,54	0,83	2,05
SM 38:2	1,62	-1,75	2,48	2,74	1,9	3,4
SM 39:1	2,99	-2,35	1,79	1,67	-0,85	1,73
SM 40:1	2,63	-3,74	2,2	2,52	1,15	2,38
SM 40:2	1,98	-1,63	1,54	1,68	0,08	3,53
SM 40:3	4,23	0,1	4,05	2,57	2,78	3,88
SM 41:1	3,64	-4,1	2,34	2,61	-0,37	2,24
SM 41:2	2,17	-1,71	1,56	0,88	-0,08	1,24
SM 42:1	4,62	-4,28	1,74	2,53	-0,27	1,81
SM 42:2	2,74	-3,13	1,68	1,98	1,2	1,83
SM 42:3	2,27	-1,89	1,37	1,44	0,16	3,69
SM 43:1	6,67	-7,64	3,5	3,4	1,12	2,55
SM 43:2	3,15	-2,68	2,32	1,78	-0,81	2,31
ST 19:2_OH2_S	6,86	-2,57	3,13	4,92	-0,24	3,32
ST 19:2_OH3_S	8,69	-7,34	3,51	9,07	6,49	5,41
ST 27:1_OH	2,88	1,34	2,86	1,24	2,58	1,27
ST 27:1_OH_S	6,12	0,23	5,47	4,07	0,26	2,58
TG 42:1	9,65	-4,86	1,6	1,95	-0,68	3,54

Stabilität trockener Lipidextrakte

Analyt	-40°C			-80°C		
	0 Std. RSD [%]	144 Std. RE [%]	RSD [%]	0 Std. RE [%]	166 Std. RE [%]	RSD [%]
TG 42:2	10,58	-5,5	1,5	3,05	-1,33	2
TG 44:0	8,37	-6,12	1,45	3,71	0,27	1,86
TG 44:1	8,69	-4,25	1,36	2,73	-0,83	1,47
TG 44:2	12,5	-3,91	1,58	4,76	-2,92	5,05
TG 46:1	5,99	-3,7	1,33	1,92	1,1	2,67
TG 46:2	9,26	-4,97	0,51	2,11	-2,14	1,58
TG 46:3	9,79	-4,39	1,39	1,46	-1,95	3,2
TG 48:1	5,36	-1,1	1,1	3,89	1,74	2,1
TG 48:2	4,63	-2,35	1,96	2,93	0,68	2,51
TG 48:3	3,96	-3,15	3,05	1,22	-1,47	1,8
TG 48:4	6,92	-6,47	3,42	1,63	-1,11	1,36
TG 50:1	4,09	0,63	1,91	3,76	1,67	2,43
TG 50:2	3,5	-0,84	1,21	3,15	1,88	1,85
TG 50:3	2,9	-1,77	1,95	2,62	0,56	2,37
TG 50:4	3,02	-0,3	1,22	1,18	-0,88	1,5
TG 52:1	3,76	0,99	3,66	2,32	2,07	3,16
TG 52:2	3,24	-0,14	2,27	2,83	1,82	3,22
TG 52:3	3,7	-0,59	1,84	3,01	2,78	2,5
TG 52:4	1,74	0,17	2,58	3,1	0,04	2,11
TG 52:5	2,46	-0,47	0,86	2,29	-1,73	1,62
TG 54:1	2,07	5,75	2,8	4,28	1,27	3,78
TG 54:2	3,73	2,78	3,55	1,95	1,02	2,8
TG 54:3	3,88	0,03	1,55	2,14	0,98	1,61
TG 54:4	3,4	-1,1	1,64	2,11	1,54	2,01
TG 54:5	2,12	-0,2	3,66	3,61	-0,64	2,78
TG 54:6	1,63	-2,06	0,8	1,84	-0,72	1,77
TG 56:1	<b>15,18</b>	0,35	3,62	3,53	-1,93	2,79
TG 56:2	3,03	4,74	2,23	4	0,9	1,8
TG 56:3	2,23	2,43	3,62	2,22	0,45	1,21
TG 56:4	3,35	0,65	1,66	1,95	1,99	2,41
TG 56:5	3,52	2,01	2,17	1,88	1	2,02
TG 56:6	4,23	-0,81	3,75	4,82	0,72	1,93
TG 58:1	<b>20,86</b>	-2,34	3,92	6,18	-0,49	3,25
TG 58:2	8,18	4,83	2,44	3,75	1,06	2,89
TG 58:3	6,33	6,25	2,24	5,52	2,74	1,83
TG 58:4	3,96	7,47	3,28	4,26	-3,56	1,98
TG 58:6	12,94	6,55	10	5,76	0,94	9,8

Tabelle 44: Kurzzeitstabilität von humanem K<sub>3</sub>EDTA-Vollblut bei RTp und in Eiswasser. Dargestellt sind die 89 Lipide, die nach 24 h Lagerung bei RTp verändert waren ( $p < 0,1$ ,  $n=10$ ).

Analyten	Stabilität von K <sub>3</sub> EDTA-Vollblut (RE ± SD [%])			
	4 h Eis	24 h Eis	4 h RTp	24 h RTp
Acyl-CN 16:0	11,74 ± 8,94	11,42 ± 14,81	28,62 ± 20,54	117,34 ± 37,95
Acyl-CN 18:1	16,29 ± 9,20	30,95 ± 18,20	94,75 ± 43,08	290,66 ± 118,18
Cer d18:1/24:0	5,51 ± 24,12	-0,13 ± 13,23	-4,94 ± 22,34	-0,88 ± 19,73
DG 32:1	2,75 ± 14,23	0,87 ± 12,56	20,75 ± 12,88	68,32 ± 27,77
DG 34:1	-1,55 ± 8,74	3,24 ± 9,08	44,60 ± 22,89	184,66 ± 52,91
DG 36:1	-3,21 ± 8,63	-1,57 ± 7,52	20,53 ± 13,49	90,66 ± 26,47
DG 36:2	-2,09 ± 7,59	-0,40 ± 6,38	9,34 ± 9,71	40,38 ± 14,79
DG 36:3	-1,66 ± 8,21	0,03 ± 5,99	9,86 ± 10,56	37,90 ± 14,37
DG 36:4	-2,27 ± 8,78	-2,15 ± 7,58	8,08 ± 10,95	29,24 ± 13,90
DG 38:6	2,62 ± 8,90	1,03 ± 8,67	5,64 ± 11,80	23,36 ± 15,57
FA 18:2	13,02 ± 25,62	10,47 ± 33,11	18,25 ± 21,94	29,81 ± 38,06
FA 18:3	17,21 ± 25,54	11,13 ± 36,47	15,41 ± 24,30	18,14 ± 40,80
FA 18:4	10,10 ± 27,96	7,85 ± 35,29	17,39 ± 29,46	37,67 ± 47,68
FA 20:4	20,21 ± 21,36	26,58 ± 32,37	-11,35 ± 20,04	-23,60 ± 23,51
FA 20:5	20,25 ± 22,92	25,11 ± 32,04	-11,10 ± 20,64	-23,14 ± 24,80
FA 22:4	18,73 ± 19,95	29,43 ± 31,32	5,86 ± 22,50	-28,84 ± 16,86
FA 22:6	24,64 ± 17,28	28,79 ± 17,65	20,88 ± 15,81	16,28 ± 19,27
LPC 14:0	0,45 ± 7,46	3,28 ± 8,36	39,22 ± 20,62	148,99 ± 52,67
LPC 15:0	0,71 ± 7,08	4,33 ± 6,63	41,26 ± 20,56	158,18 ± 61,54
LPC 16:0	2,94 ± 6,81	4,71 ± 7,97	45,36 ± 24,33	158,30 ± 72,28
LPC 16:1	2,01 ± 7,07	4,08 ± 7,54	44,27 ± 22,90	157,65 ± 60,28
LPC 17:0	2,49 ± 5,86	5,88 ± 6,13	48,66 ± 25,21	198,20 ± 85,65
LPC 18:0	0,47 ± 8,13	5,03 ± 8,39	51,62 ± 27,36	203,02 ± 94,52
LPC 18:1	3,52 ± 7,49	5,38 ± 6,80	28,62 ± 17,39	102,88 ± 49,70
LPC 18:2	0,23 ± 7,94	1,77 ± 6,02	8,88 ± 10,49	30,27 ± 21,37
LPC 18:3	-0,14 ± 8,41	-1,59 ± 8,56	9,80 ± 12,42	55,16 ± 28,46
LPC 20:0	2,47 ± 9,96	7,73 ± 10,26	28,93 ± 19,58	100,63 ± 43,39
LPC 20:1	3,34 ± 7,19	9,98 ± 10,37	50,38 ± 24,83	191,55 ± 84,44
LPC 20:2	-3,72 ± 10,69	5,57 ± 7,93	33,19 ± 22,54	134,37 ± 60,98
LPC 20:3	0,37 ± 8,58	2,91 ± 7,82	14,40 ± 12,74	47,89 ± 30,64
LPC 20:4	0,37 ± 11,47	3,15 ± 9,95	24,11 ± 18,33	92,02 ± 47,82
LPC 20:5	-2,09 ± 8,97	0,38 ± 8,19	19,59 ± 14,87	79,96 ± 40,61
LPC 22:0	6,26 ± 13,41	8,13 ± 13,21	9,90 ± 9,30	40,40 ± 15,83
LPC 22:5	-0,17 ± 13,23	6,96 ± 14,10	20,20 ± 17,30	68,68 ± 40,08
LPC 22:6	0,32 ± 10,71	4,32 ± 10,54	21,57 ± 16,68	79,11 ± 41,50
LPC O-16:0	2,30 ± 8,34	11,37 ± 11,20	53,80 ± 24,03	238,33 ± 80,03
LPC O-16:1	1,28 ± 9,84	9,71 ± 11,56	45,79 ± 20,03	167,54 ± 66,82
LPC O-18:0	-2,35 ± 9,75	5,23 ± 10,03	36,74 ± 21,28	193,48 ± 68,65
LPC O-18:1	4,13 ± 7,97	15,26 ± 8,63	82,52 ± 33,41	344,84 ± 129,76
LPE 16:0	4,38 ± 9,99	8,35 ± 7,46	11,67 ± 15,27	34,64 ± 30,03
LPE 17:0	2,22 ± 9,07	4,72 ± 7,97	9,16 ± 18,11	42,91 ± 29,71
LPE 18:0	0,83 ± 10,01	6,07 ± 6,42	22,00 ± 16,73	75,53 ± 42,97
LPE 18:1	5,08 ± 6,83	9,26 ± 7,59	3,66 ± 10,07	12,83 ± 14,69
LPE 18:2	4,97 ± 10,48	8,67 ± 9,66	-1,42 ± 8,05	-13,19 ± 8,90

Stabilität von K<sub>3</sub>EDTA-Vollblut (RE ± SD [%])

Analyten	4 h Eis	24 h Eis	4 h RTp	24 h RTp
LPE O-16:1	2,50 ± 7,28	18,46 ± 9,06	49,42 ± 10,93	185,10 ± 43,10
LPG 18:1	3,47 ± 8,89	3,92 ± 13,16	-1,11 ± 11,45	5,40 ± 15,92
LPG 18:2	5,53 ± 13,56	0,35 ± 14,01	7,11 ± 14,39	12,20 ± 21,84
LPI 18:0	-0,72 ± 10,52	7,05 ± 19,19	6,16 ± 9,87	27,10 ± 14,07
LPI 20:3	-1,90 ± 15,72	3,18 ± 12,93	-0,74 ± 11,49	6,29 ± 16,48
LPI 20:4	0,56 ± 9,91	8,03 ± 13,47	4,29 ± 9,05	12,11 ± 16,66
PC 30:0	0,78 ± 9,00	4,25 ± 5,48	-7,17 ± 5,56	-20,13 ± 2,52
PC 30:1	1,12 ± 9,43	3,32 ± 8,66	-9,71 ± 9,03	-30,89 ± 6,06
PC 30:2	-0,15 ± 16,44	-0,86 ± 7,84	-6,33 ± 10,90	-27,88 ± 28,07
PC 32:0	1,30 ± 8,61	3,03 ± 8,96	-3,89 ± 7,94	-10,53 ± 5,41
PC 32:1	-0,25 ± 8,04	2,41 ± 4,97	-9,61 ± 7,25	-27,67 ± 3,14
PC 32:2	0,92 ± 8,80	2,87 ± 6,39	-5,69 ± 7,60	-20,36 ± 4,08
PC 33:2	1,47 ± 8,35	4,98 ± 5,05	-2,82 ± 8,30	-14,92 ± 4,27
PC 34:1	1,41 ± 6,72	2,70 ± 6,38	-1,33 ± 5,58	-8,01 ± 3,76
PC 34:2	1,28 ± 6,92	3,41 ± 5,52	-0,98 ± 5,94	-9,72 ± 3,69
PC 34:3	0,10 ± 8,78	3,07 ± 5,66	-5,50 ± 8,66	-17,96 ± 5,95
PC 34:4	-0,13 ± 9,16	3,37 ± 6,95	-1,90 ± 8,67	-9,70 ± 5,16
PC 34:5	-3,09 ± 11,51	1,37 ± 7,62	-5,00 ± 10,41	-11,99 ± 6,62
PC 36:1	1,12 ± 9,13	2,85 ± 7,66	0,09 ± 8,23	-7,06 ± 6,39
PC 36:2	1,82 ± 6,97	3,37 ± 7,22	0,00 ± 6,25	-8,26 ± 5,37
PC 36:5	1,93 ± 9,11	4,09 ± 6,22	-1,02 ± 8,91	-8,43 ± 6,18
PC 40:4	2,56 ± 7,50	6,52 ± 8,83	3,79 ± 8,75	2,32 ± 7,03
PC 42:6	0,82 ± 7,64	12,73 ± 18,00	8,22 ± 19,09	1,97 ± 15,15
PC O-16:1_16:0	13,67 ± 24,00	21,70 ± 28,77	24,79 ± 38,29	22,61 ± 29,13
PC O-16:1_18:2	9,02 ± 23,07	18,84 ± 28,59	22,06 ± 41,12	20,22 ± 26,76
PC O-16:1_20:4	10,32 ± 20,74	18,49 ± 25,62	21,91 ± 38,66	25,48 ± 30,94
PC O-18:1_18:1	11,95 ± 11,83	17,02 ± 22,26	13,88 ± 20,88	17,01 ± 22,15
PC O-18:1_18:2	14,58 ± 12,32	18,65 ± 24,35	18,71 ± 24,58	15,62 ± 19,82
PC O-18:1_20:4	8,31 ± 26,64	12,90 ± 30,55	17,89 ± 43,43	25,80 ± 28,16
PE 32:1	0,60 ± 8,80	13,03 ± 10,01	-10,50 ± 10,51	-15,48 ± 8,53
PE 34:2	3,72 ± 8,72	6,37 ± 7,87	-3,40 ± 8,33	-9,09 ± 5,79
PE 36:1	2,94 ± 16,81	5,35 ± 14,66	-5,83 ± 14,62	-4,67 ± 14,96
PE 36:2	7,52 ± 16,26	9,97 ± 11,55	-3,08 ± 10,67	-3,81 ± 12,90
PE 40:6	-2,04 ± 11,50	2,87 ± 10,05	-2,33 ± 8,77	-2,24 ± 10,08
PI 38:5	1,42 ± 15,19	7,27 ± 14,28	3,18 ± 12,05	-1,64 ± 13,84
SE 27:1/20:5	2,97 ± 11,52	8,95 ± 11,59	6,46 ± 11,57	15,63 ± 12,23
SM 33:1	-0,19 ± 7,75	0,61 ± 6,15	-1,26 ± 9,46	-0,59 ± 5,78
SM 34:2	-0,79 ± 8,99	-1,06 ± 8,27	-1,66 ± 10,05	-5,77 ± 7,53
SM 39:1	0,26 ± 10,27	-0,57 ± 9,74	1,89 ± 11,96	-1,04 ± 8,26
ST 27:1_OH	4,56 ± 5,29	5,84 ± 9,03	-2,39 ± 8,34	-10,62 ± 5,59
TG 44:1	-1,47 ± 14,65	-0,02 ± 14,91	-3,34 ± 15,33	0,82 ± 18,25
TG 46:1	-1,86 ± 11,85	1,68 ± 11,14	-2,53 ± 12,24	-2,06 ± 14,88
TG 46:3	-1,28 ± 11,17	0,14 ± 9,45	-2,48 ± 10,95	-1,33 ± 15,04
TG 48:2	-0,50 ± 8,77	3,45 ± 10,65	-0,84 ± 10,16	-2,37 ± 11,07
TG 48:4	-1,01 ± 10,74	1,57 ± 10,45	-1,74 ± 11,41	-1,80 ± 12,84



Tabelle 45: Kurzzeitstabilität von humanem NaF/Citrat-Vollblut bei RTp und in Eiswasser.  
 Dargestellt sind die 89 Lipide, die nach 24 h Lagerung bei RTp verändert waren ( $p < 0,1$ ,  $n=10$ ).

<b>Stabilität von NaF/Citrat-Vollblut (RE <math>\pm</math> SD [%])</b>				
<b>Analyten</b>	<b>4 h Eis</b>	<b>24 h Eis</b>	<b>4 h RTp</b>	<b>24 h RTp</b>
<b>Acyl-CN 16:0</b>	3,52 $\pm$ 7,75	7,88 $\pm$ 14,66	122,13 $\pm$ 53,47	136,40 $\pm$ 64,43
<b>Acyl-CN 18:1</b>	7,59 $\pm$ 7,75	18,98 $\pm$ 8,29	129,64 $\pm$ 41,77	134,07 $\pm$ 65,88
<b>Cer d18:1/24:0</b>	-21,66 $\pm$ 19,74	-19,13 $\pm$ 18,45	8,53 $\pm$ 22,58	0,36 $\pm$ 25,35
<b>DG 32:1</b>	-9,99 $\pm$ 38,52	3,12 $\pm$ 22,29	23,60 $\pm$ 43,46	43,22 $\pm$ 51,91
<b>DG 34:1</b>	-17,33 $\pm$ 17,26	-13,95 $\pm$ 16,30	16,18 $\pm$ 20,59	39,02 $\pm$ 23,81
<b>DG 36:1</b>	-18,61 $\pm$ 11,97	-9,75 $\pm$ 16,34	9,97 $\pm$ 17,28	17,16 $\pm$ 18,93
<b>DG 36:2</b>	-18,40 $\pm$ 15,15	-15,29 $\pm$ 14,54	10,06 $\pm$ 16,04	11,11 $\pm$ 17,06
<b>DG 36:3</b>	-18,86 $\pm$ 16,35	-16,43 $\pm$ 15,51	11,22 $\pm$ 17,85	14,99 $\pm$ 19,93
<b>DG 36:4</b>	-18,65 $\pm$ 15,81	-14,01 $\pm$ 16,28	13,66 $\pm$ 17,67	20,53 $\pm$ 21,77
<b>DG 38:6</b>	-13,95 $\pm$ 15,39	-14,22 $\pm$ 19,25	15,78 $\pm$ 22,83	20,46 $\pm$ 21,20
<b>FA 18:2</b>	14,85 $\pm$ 30,11	6,37 $\pm$ 30,58	16,74 $\pm$ 25,34	3,45 $\pm$ 23,37
<b>FA 18:3</b>	12,33 $\pm$ 36,64	3,25 $\pm$ 35,40	15,88 $\pm$ 28,70	-0,65 $\pm$ 22,36
<b>FA 18:4</b>	17,61 $\pm$ 36,94	13,61 $\pm$ 34,70	23,37 $\pm$ 29,76	7,31 $\pm$ 23,85
<b>FA 20:4</b>	12,55 $\pm$ 21,32	20,86 $\pm$ 26,10	77,67 $\pm$ 32,21	118,91 $\pm$ 86,55
<b>FA 20:5</b>	17,07 $\pm$ 26,76	12,72 $\pm$ 25,26	45,02 $\pm$ 24,73	40,15 $\pm$ 26,28
<b>FA 22:4</b>	13,84 $\pm$ 27,09	11,29 $\pm$ 26,67	27,05 $\pm$ 26,35	38,21 $\pm$ 43,12
<b>FA 22:6</b>	16,08 $\pm$ 15,99	16,92 $\pm$ 18,62	21,63 $\pm$ 11,45	20,98 $\pm$ 21,41
<b>LPC 14:0</b>	0,37 $\pm$ 6,23	1,59 $\pm$ 8,62	3,23 $\pm$ 7,08	20,28 $\pm$ 7,61
<b>LPC 15:0</b>	-0,95 $\pm$ 6,89	1,05 $\pm$ 9,72	4,33 $\pm$ 8,51	21,86 $\pm$ 7,69
<b>LPC 16:0</b>	-1,23 $\pm$ 7,47	1,22 $\pm$ 9,70	4,99 $\pm$ 8,12	26,75 $\pm$ 9,73
<b>LPC 16:1</b>	-1,10 $\pm$ 6,04	1,05 $\pm$ 8,79	2,39 $\pm$ 7,87	18,03 $\pm$ 8,01
<b>LPC 17:0</b>	-2,89 $\pm$ 5,72	-1,12 $\pm$ 9,73	6,83 $\pm$ 9,37	31,37 $\pm$ 12,92
<b>LPC 18:0</b>	-8,35 $\pm$ 6,92	-5,83 $\pm$ 10,85	7,89 $\pm$ 11,07	35,82 $\pm$ 13,40
<b>LPC 18:1</b>	-0,14 $\pm$ 6,03	1,88 $\pm$ 9,02	2,46 $\pm$ 8,44	16,56 $\pm$ 9,22
<b>LPC 18:2</b>	-0,03 $\pm$ 4,79	1,04 $\pm$ 8,97	1,03 $\pm$ 7,74	5,31 $\pm$ 6,80
<b>LPC 18:3</b>	1,08 $\pm$ 5,28	-2,18 $\pm$ 11,43	-2,36 $\pm$ 13,07	9,17 $\pm$ 10,45
<b>LPC 20:0</b>	-8,21 $\pm$ 8,81	-8,55 $\pm$ 9,21	7,09 $\pm$ 8,49	18,64 $\pm$ 9,63
<b>LPC 20:1</b>	0,61 $\pm$ 6,84	1,19 $\pm$ 12,81	4,64 $\pm$ 10,94	30,45 $\pm$ 19,41
<b>LPC 20:2</b>	0,94 $\pm$ 14,39	3,36 $\pm$ 13,93	3,70 $\pm$ 14,40	23,97 $\pm$ 15,50
<b>LPC 20:3</b>	-0,81 $\pm$ 6,63	1,84 $\pm$ 9,57	1,10 $\pm$ 8,74	8,36 $\pm$ 8,13
<b>LPC 20:4</b>	-0,89 $\pm$ 8,85	2,96 $\pm$ 10,26	4,09 $\pm$ 11,84	16,35 $\pm$ 10,99
<b>LPC 20:5</b>	-1,23 $\pm$ 6,19	0,93 $\pm$ 9,69	2,34 $\pm$ 10,10	13,41 $\pm$ 9,51
<b>LPC 22:0</b>	-11,08 $\pm$ 15,40	-8,62 $\pm$ 16,19	2,48 $\pm$ 14,45	8,71 $\pm$ 11,33
<b>LPC 22:5</b>	1,66 $\pm$ 7,67	7,02 $\pm$ 10,34	6,79 $\pm$ 14,20	20,83 $\pm$ 11,28
<b>LPC 22:6</b>	-0,97 $\pm$ 5,98	2,81 $\pm$ 10,19	3,75 $\pm$ 9,13	14,46 $\pm$ 9,07
<b>LPC O-16:0</b>	-3,86 $\pm$ 7,24	-0,76 $\pm$ 10,83	8,21 $\pm$ 9,91	32,78 $\pm$ 12,62
<b>LPC O-16:1</b>	-0,63 $\pm$ 12,12	-0,02 $\pm$ 13,67	5,17 $\pm$ 13,34	20,70 $\pm$ 15,48
<b>LPC O-18:0</b>	-10,27 $\pm$ 10,83	-8,26 $\pm$ 11,15	10,25 $\pm$ 15,46	26,82 $\pm$ 14,41
<b>LPC O-18:1</b>	-0,84 $\pm$ 9,18	2,78 $\pm$ 14,48	10,35 $\pm$ 13,58	43,30 $\pm$ 19,45
<b>LPE 16:0</b>	-1,43 $\pm$ 8,09	-0,20 $\pm$ 10,55	3,45 $\pm$ 9,38	13,11 $\pm$ 13,66
<b>LPE 17:0</b>	-6,42 $\pm$ 14,31	-5,31 $\pm$ 11,54	1,77 $\pm$ 19,01	14,38 $\pm$ 19,94
<b>LPE 18:0</b>	-12,93 $\pm$ 9,90	-11,73 $\pm$ 10,83	7,24 $\pm$ 11,52	19,92 $\pm$ 15,38
<b>LPE 18:1</b>	-0,14 $\pm$ 6,80	-0,82 $\pm$ 8,65	1,78 $\pm$ 10,98	7,65 $\pm$ 9,39
<b>LPE 18:2</b>	0,61 $\pm$ 6,64	0,12 $\pm$ 10,56	-1,83 $\pm$ 11,21	0,02 $\pm$ 8,06

## Stabilität von NaF/Citrat-Vollblut (RE ± SD [%])

Analyten	4 h Eis	24 h Eis	4 h RTp	24 h RTp
LPE O-16:1	0,13 ± 14,99	0,76 ± 16,28	30,88 ± 22,26	166,71 ± 61,20
LPG 18:1	4,96 ± 11,50	-0,22 ± 8,15	3,19 ± 8,61	-4,27 ± 12,53
LPG 18:2	19,24 ± 51,53	14,42 ± 48,69	16,83 ± 47,64	16,55 ± 58,79
LPI 18:0	-6,24 ± 7,61	-7,77 ± 11,07	16,07 ± 12,34	45,23 ± 17,75
LPI 20:3	-9,78 ± 11,50	-7,30 ± 12,43	-8,85 ± 8,89	-7,79 ± 15,51
LPI 20:4	-1,71 ± 7,91	-2,93 ± 9,91	4,64 ± 8,31	18,18 ± 9,95
PC 30:0	-11,51 ± 11,17	-13,49 ± 11,92	1,33 ± 12,28	-4,87 ± 12,81
PC 30:1	-8,87 ± 11,02	-9,46 ± 13,78	-0,47 ± 13,31	-7,01 ± 12,54
PC 30:2	-8,37 ± 7,02	-9,75 ± 9,29	-1,00 ± 5,38	-2,88 ± 12,12
PC 32:0	-14,20 ± 10,91	-13,31 ± 10,69	0,47 ± 12,62	-3,40 ± 15,01
PC 32:1	-7,70 ± 9,98	-9,79 ± 9,59	1,08 ± 10,84	-4,20 ± 10,34
PC 32:2	-6,40 ± 9,33	-8,81 ± 11,73	2,95 ± 13,11	-2,60 ± 10,54
PC 33:2	-8,43 ± 8,92	-10,71 ± 10,30	1,69 ± 10,73	-1,93 ± 10,37
PC 34:1	-9,94 ± 8,57	-9,01 ± 8,76	1,46 ± 10,25	-1,57 ± 8,63
PC 34:2	-8,57 ± 8,45	-10,13 ± 7,97	0,32 ± 9,17	-2,09 ± 7,66
PC 34:3	-9,99 ± 8,62	-10,46 ± 10,59	0,99 ± 12,32	-3,20 ± 10,23
PC 34:4	-7,24 ± 7,98	-9,13 ± 12,57	1,92 ± 12,73	-0,99 ± 8,69
PC 34:5	-6,56 ± 11,64	-8,94 ± 12,85	1,53 ± 13,73	-2,05 ± 10,25
PC 36:1	-13,54 ± 9,77	-10,30 ± 11,61	1,83 ± 12,21	-2,14 ± 10,01
PC 36:2	-9,68 ± 8,44	-8,07 ± 8,73	1,80 ± 9,71	-2,41 ± 7,88
PC 36:5	-9,72 ± 9,10	-11,35 ± 11,47	0,69 ± 12,69	-1,91 ± 10,43
PC 40:4	-10,69 ± 10,64	-8,87 ± 11,68	1,53 ± 11,70	0,11 ± 9,83
PC 42:6	-4,84 ± 25,12	-2,76 ± 19,30	8,41 ± 15,36	5,39 ± 19,21
PC O-16:1_16:0	-17,14 ± 14,56	-19,67 ± 15,02	0,84 ± 28,54	-4,98 ± 26,51
PC O-16:1_18:2	-13,95 ± 13,49	-15,91 ± 16,10	-5,90 ± 21,49	-6,08 ± 24,33
PC O-16:1_20:4	-9,75 ± 15,11	-13,11 ± 16,50	-3,23 ± 22,92	-1,90 ± 23,74
PC O-18:1_18:1	-12,10 ± 17,87	-14,48 ± 13,60	4,26 ± 24,33	-4,05 ± 23,11
PC O-18:1_18:2	-14,04 ± 14,32	-15,23 ± 16,85	-1,76 ± 24,75	-1,60 ± 16,61
PC O-18:1_20:4	-12,15 ± 17,65	-12,71 ± 16,25	-8,72 ± 22,80	-4,62 ± 25,65
PE 32:1	-3,98 ± 29,46	-10,82 ± 17,41	15,57 ± 24,41	7,61 ± 25,31
PE 34:2	-7,28 ± 11,40	-8,74 ± 10,92	7,14 ± 15,39	7,59 ± 12,83
PE 36:1	-8,65 ± 12,55	-7,53 ± 12,45	10,04 ± 14,01	6,73 ± 15,67
PE 36:2	-8,48 ± 8,57	-8,59 ± 9,40	3,97 ± 11,28	4,62 ± 13,37
PE 40:6	-7,15 ± 9,18	-7,12 ± 10,77	5,58 ± 12,99	5,25 ± 14,13
PI 38:5	-8,62 ± 9,87	-12,98 ± 17,07	-3,05 ± 13,66	-2,63 ± 8,29
SE 27:1/20:5	-19,49 ± 12,96	-20,98 ± 13,56	5,48 ± 21,25	5,02 ± 21,07
SM 33:1	-17,66 ± 13,85	-16,13 ± 16,77	3,87 ± 20,23	-1,76 ± 19,49
SM 34:2	-14,01 ± 10,36	-14,56 ± 17,29	2,47 ± 17,29	-2,14 ± 12,86
SM 39:1	-19,99 ± 15,23	-12,79 ± 21,31	4,53 ± 18,74	-0,38 ± 17,44
ST 27:1_OH	-14,96 ± 12,58	-14,12 ± 14,31	4,79 ± 14,07	0,18 ± 16,02
TG 44:1	-23,93 ± 22,06	-24,73 ± 16,43	9,06 ± 31,17	0,71 ± 20,51
TG 46:1	-20,77 ± 17,97	-24,13 ± 12,83	9,30 ± 26,40	2,92 ± 25,74
TG 46:3	-22,35 ± 18,50	-27,25 ± 13,10	6,64 ± 25,42	-1,69 ± 16,69
TG 48:2	-19,78 ± 19,09	-25,45 ± 12,86	6,24 ± 21,48	1,93 ± 20,02
TG 48:4	-20,59 ± 19,99	-28,33 ± 14,37	5,90 ± 23,48	2,47 ± 19,64

Tabelle 46: Kurzzeitstabilität von humanem K<sub>3</sub>EDTA-Plasma bei RTp und in Eiswasser.  
 Dargestellt sind die 89 Lipide, die nach 24 h Lagerung bei RTp verändert waren (p < 0,1, n=10).

Analyten	Stabilität von K <sub>3</sub> EDTA-Plasma (RE ± SD [%])				
	4 h Eis	24 h Eis	2 h RTp	4 h RTp	24 h RTp
Acyl-CN 16:0	0,45 ± 15,89	-1,91 ± 11,47	-1,91 ± 11,47	-0,04 ± 9,68	4,70 ± 8,92
Acyl-CN 18:1	2,21 ± 17,19	-2,11 ± 7,98	-2,11 ± 7,98	-1,63 ± 5,11	-0,79 ± 6,51
Cer d18:1/24:0	0,91 ± 12,50	0,93 ± 9,25	0,93 ± 9,25	-2,84 ± 8,72	-7,06 ± 11,43
DG 32:1	2,63 ± 14,48	8,49 ± 10,14	8,49 ± 10,14	25,85 ± 12,02	111,33 ± 32,42
DG 34:1	2,29 ± 7,38	5,53 ± 6,66	5,53 ± 6,66	36,74 ± 12,57	191,16 ± 56,73
DG 36:1	0,72 ± 7,30	1,87 ± 5,38	1,87 ± 5,38	15,08 ± 9,22	77,71 ± 25,99
DG 36:2	-0,65 ± 2,52	-1,27 ± 5,39	-1,27 ± 5,39	6,43 ± 5,11	35,10 ± 16,01
DG 36:3	-1,49 ± 2,51	-1,66 ± 5,14	-1,66 ± 5,14	7,28 ± 5,95	37,43 ± 17,04
DG 36:4	-0,44 ± 3,63	-1,84 ± 4,13	-1,84 ± 4,13	8,59 ± 5,70	40,48 ± 16,55
DG 38:6	1,39 ± 5,32	1,78 ± 6,32	1,78 ± 6,32	7,48 ± 7,97	28,43 ± 12,55
FA 18:2	0,59 ± 7,97	1,28 ± 8,68	1,28 ± 8,68	9,60 ± 10,18	29,54 ± 28,27
FA 18:3	-2,83 ± 7,16	-0,31 ± 6,61	-0,31 ± 6,61	1,99 ± 8,91	14,89 ± 29,28
FA 18:4	-1,19 ± 12,05	-1,82 ± 8,91	-1,82 ± 8,91	3,53 ± 11,63	36,90 ± 42,45
FA 20:4	-0,13 ± 5,13	14,86 ± 13,70	14,86 ± 13,70	14,77 ± 12,00	87,09 ± 61,74
FA 20:5	-1,09 ± 4,76	13,65 ± 12,42	13,65 ± 12,42	13,63 ± 12,24	66,76 ± 53,21
FA 22:4	-2,56 ± 7,61	1,60 ± 9,14	1,60 ± 9,14	-0,99 ± 5,84	9,34 ± 14,88
FA 22:6	-3,55 ± 5,45	0,02 ± 5,42	0,02 ± 5,42	4,08 ± 5,18	23,44 ± 13,47
LPC 14:0	-0,68 ± 4,86	0,26 ± 5,08	0,26 ± 5,08	27,30 ± 10,45	122,51 ± 43,06
LPC 15:0	-0,97 ± 3,71	0,77 ± 4,34	0,77 ± 4,34	30,22 ± 13,99	136,07 ± 52,69
LPC 16:0	-1,02 ± 4,46	-0,09 ± 5,15	-0,09 ± 5,15	32,64 ± 16,65	138,34 ± 66,24
LPC 16:1	-0,45 ± 4,21	-0,43 ± 3,64	-0,43 ± 3,64	28,96 ± 11,09	132,28 ± 47,96
LPC 17:0	-1,78 ± 2,99	0,08 ± 4,76	0,08 ± 4,76	36,50 ± 15,62	175,15 ± 72,10
LPC 18:0	-0,48 ± 3,10	0,22 ± 4,05	0,22 ± 4,05	40,87 ± 17,45	187,96 ± 81,81
LPC 18:1	-1,41 ± 3,05	-0,47 ± 3,69	-0,47 ± 3,69	19,96 ± 9,41	86,95 ± 38,71
LPC 18:2	-1,95 ± 2,39	-2,67 ± 3,78	-2,67 ± 3,78	5,26 ± 5,71	26,28 ± 16,94
LPC 18:3	3,61 ± 6,19	4,34 ± 8,80	4,34 ± 8,80	15,75 ± 8,68	52,97 ± 20,44
LPC 20:0	-1,50 ± 6,24	-1,78 ± 7,81	-1,78 ± 7,81	17,73 ± 11,58	78,15 ± 23,58
LPC 20:1	1,57 ± 4,42	2,60 ± 5,59	2,60 ± 5,59	38,60 ± 20,28	165,43 ± 66,57
LPC 20:2	-2,34 ± 8,94	-0,55 ± 6,62	-0,55 ± 6,62	26,46 ± 16,39	124,24 ± 58,68
LPC 20:3	-1,36 ± 4,19	-0,49 ± 5,53	-0,49 ± 5,53	7,77 ± 6,99	41,26 ± 25,81
LPC 20:4	-2,00 ± 3,90	-0,05 ± 4,19	-0,05 ± 4,19	14,13 ± 8,38	73,87 ± 34,45
LPC 20:5	-1,71 ± 4,04	-2,91 ± 5,50	-2,91 ± 5,50	12,70 ± 5,52	66,09 ± 27,79
LPC 22:0	1,35 ± 8,70	1,05 ± 8,53	1,05 ± 8,53	13,69 ± 9,29	33,65 ± 14,78
LPC 22:5	-0,40 ± 3,13	1,21 ± 5,84	1,21 ± 5,84	11,25 ± 5,20	62,98 ± 25,18
LPC 22:6	0,10 ± 3,90	2,48 ± 4,94	2,48 ± 4,94	14,66 ± 6,98	70,98 ± 26,45
LPC O-16:0	-1,47 ± 2,33	2,97 ± 4,96	2,97 ± 4,96	41,68 ± 15,23	193,91 ± 63,10
LPC O-16:1	0,04 ± 12,04	-1,98 ± 10,04	-1,98 ± 10,04	34,04 ± 11,74	147,13 ± 47,04
LPC O-18:0	-0,11 ± 6,30	3,32 ± 5,79	3,32 ± 5,79	34,94 ± 12,54	147,72 ± 45,93
LPC O-18:1	0,50 ± 4,02	4,04 ± 5,40	4,04 ± 5,40	57,61 ± 17,47	269,30 ± 89,61
LPE 16:0	-5,50 ± 4,58	-2,15 ± 4,82	-2,15 ± 4,82	5,17 ± 8,69	30,24 ± 25,58
LPE 17:0	-6,63 ± 10,09	-6,19 ± 12,66	-6,19 ± 12,66	4,83 ± 19,31	41,22 ± 36,28
LPE 18:0	-4,01 ± 3,17	-0,07 ± 6,52	-0,07 ± 6,52	12,49 ± 9,53	65,62 ± 36,91
LPE 18:1	-4,72 ± 4,86	-2,69 ± 6,01	-2,69 ± 6,01	0,31 ± 6,54	11,63 ± 12,95
LPE 18:2	-5,65 ± 4,64	-3,45 ± 3,89	-3,45 ± 3,89	-4,98 ± 6,32	-11,35 ± 5,47

Analyten	Stabilität von K <sub>3</sub> EDTA-Plasma (RE ± SD [%])				
	4 h Eis	24 h Eis	2 h RTp	4 h RTp	24 h RTp
LPE O-16:1	-0,18 ± 9,60	-0,65 ± 7,31	-0,65 ± 7,31	29,54 ± 15,42	135,41 ± 40,98
LPG 18:1	-0,94 ± 6,82	-4,10 ± 7,23	-4,10 ± 7,23	-1,80 ± 8,69	-2,13 ± 10,03
LPG 18:2	-1,61 ± 12,93	-0,73 ± 13,78	-0,73 ± 13,78	0,46 ± 13,58	-0,16 ± 12,03
LPI 18:0	-1,47 ± 9,78	-3,40 ± 7,29	-3,40 ± 7,29	3,34 ± 9,22	31,88 ± 15,14
LPI 20:3	-1,08 ± 15,19	-5,04 ± 16,29	-5,04 ± 16,29	10,34 ± 18,40	9,74 ± 10,16
LPI 20:4	-0,50 ± 9,34	-5,11 ± 7,17	-5,11 ± 7,17	5,45 ± 9,54	10,62 ± 5,31
PC 30:0	-1,40 ± 5,65	-1,62 ± 4,97	-1,62 ± 4,97	-4,53 ± 5,25	-20,67 ± 7,41
PC 30:1	0,29 ± 6,54	-3,84 ± 4,58	-3,84 ± 4,58	-7,50 ± 7,10	-31,52 ± 8,12
PC 30:2	-16,16 ± 33,43	-6,90 ± 10,76	-6,90 ± 10,76	-8,72 ± 11,84	-28,19 ± 27,74
PC 32:0	-2,22 ± 4,80	-2,28 ± 5,25	-2,28 ± 5,25	-4,92 ± 5,29	-13,90 ± 5,81
PC 32:1	-1,57 ± 6,57	-3,32 ± 3,66	-3,32 ± 3,66	-8,08 ± 3,29	-28,45 ± 6,00
PC 32:2	-0,83 ± 5,16	-3,38 ± 5,03	-3,38 ± 5,03	-4,87 ± 5,63	-21,27 ± 6,65
PC 33:2	-1,82 ± 5,37	-3,09 ± 3,66	-3,09 ± 3,66	-4,25 ± 4,26	-17,72 ± 5,55
PC 34:1	-1,45 ± 3,50	-2,04 ± 4,56	-2,04 ± 4,56	-3,75 ± 4,97	-10,50 ± 5,27
PC 34:2	-2,03 ± 4,77	-2,52 ± 4,60	-2,52 ± 4,60	-3,58 ± 3,62	-13,55 ± 5,32
PC 34:3	-1,29 ± 4,97	-3,87 ± 5,41	-3,87 ± 5,41	-5,31 ± 4,21	-19,67 ± 6,67
PC 34:4	0,04 ± 5,86	-4,95 ± 3,31	-4,95 ± 3,31	-3,27 ± 4,34	-11,34 ± 6,03
PC 34:5	-3,09 ± 6,37	-4,13 ± 6,00	-4,13 ± 6,00	-8,42 ± 8,15	-14,96 ± 7,32
PC 36:1	-2,85 ± 2,42	-2,95 ± 5,12	-2,95 ± 5,12	-3,87 ± 5,00	-10,87 ± 5,53
PC 36:2	-1,75 ± 2,24	-1,58 ± 5,14	-1,58 ± 5,14	-3,04 ± 4,71	-10,79 ± 5,05
PC 36:5	-1,17 ± 4,87	-4,62 ± 5,96	-4,62 ± 5,96	-2,35 ± 5,20	-12,03 ± 5,68
PC 40:4	-2,69 ± 3,09	-2,96 ± 5,15	-2,96 ± 5,15	-1,19 ± 6,06	-4,25 ± 5,31
PC 42:6	8,73 ± 21,56	9,73 ± 28,02	9,73 ± 28,02	12,69 ± 31,39	11,05 ± 35,98
PC O-16:1_16:0	2,45 ± 13,46	4,03 ± 16,05	4,03 ± 16,05	12,92 ± 21,25	0,20 ± 25,06
PC O-16:1_18:2	2,76 ± 12,71	4,67 ± 20,53	4,67 ± 20,53	12,95 ± 18,11	5,22 ± 16,50
PC O-16:1_20:4	-2,10 ± 10,69	2,00 ± 17,07	2,00 ± 17,07	11,71 ± 16,47	0,33 ± 21,77
PC O-18:1_18:1	1,22 ± 14,74	8,73 ± 14,68	8,73 ± 14,68	1,56 ± 19,09	-5,28 ± 21,76
PC O-18:1_18:2	1,14 ± 14,45	2,32 ± 14,25	2,32 ± 14,25	3,65 ± 24,31	-5,27 ± 19,02
PC O-18:1_20:4	-1,36 ± 9,46	2,42 ± 18,52	2,42 ± 18,52	8,68 ± 13,23	7,64 ± 12,54
PE 32:1	-5,83 ± 10,59	-5,58 ± 7,43	-5,58 ± 7,43	-5,10 ± 9,09	-16,51 ± 8,18
PE 34:2	-2,77 ± 4,81	-2,87 ± 5,81	-2,87 ± 5,81	-1,75 ± 4,39	-13,44 ± 6,57
PE 36:1	-3,96 ± 4,74	-2,18 ± 9,05	-2,18 ± 9,05	-4,96 ± 4,44	-11,41 ± 8,34
PE 36:2	-2,70 ± 6,35	-2,71 ± 6,18	-2,71 ± 6,18	-4,39 ± 6,03	-15,44 ± 6,33
PE 40:6	-3,79 ± 5,73	-5,36 ± 6,18	-5,36 ± 6,18	-2,14 ± 3,16	-9,54 ± 6,05
PI 38:5	10,32 ± 7,98	-0,48 ± 8,96	-0,48 ± 8,96	5,16 ± 18,50	2,26 ± 12,36
SE 27:1/20:5	0,53 ± 4,24	1,64 ± 9,92	1,64 ± 9,92	7,63 ± 6,09	13,60 ± 12,61
SM 33:1	-1,35 ± 6,84	-2,93 ± 7,79	-2,93 ± 7,79	-1,41 ± 7,75	-3,29 ± 10,40
SM 34:2	0,18 ± 6,69	-2,64 ± 6,46	-2,64 ± 6,46	-1,00 ± 6,03	-4,62 ± 9,10
SM 39:1	-3,03 ± 5,48	-3,09 ± 9,15	-3,09 ± 9,15	-1,86 ± 8,77	-5,35 ± 9,86
ST 27:1_OH	-2,02 ± 4,51	-0,36 ± 4,61	-0,36 ± 4,61	-2,25 ± 5,71	-13,68 ± 7,94
TG 44:1	26,07 ± 66,36	1,44 ± 8,06	1,44 ± 8,06	8,81 ± 8,13	0,65 ± 8,96
TG 46:1	11,39 ± 27,60	1,02 ± 6,62	1,02 ± 6,62	6,86 ± 8,31	0,96 ± 10,01
TG 46:3	3,08 ± 9,23	-1,78 ± 8,94	-1,78 ± 8,94	5,10 ± 7,26	0,09 ± 8,09
TG 48:2	1,93 ± 4,64	0,28 ± 7,35	0,28 ± 7,35	5,34 ± 7,88	-1,26 ± 9,49
TG 48:4	0,61 ± 4,23	0,83 ± 8,24	0,83 ± 8,24	7,00 ± 7,84	0,18 ± 8,68

Tabelle 47: Kurzzeitstabilität von humanem NaF/Citrat-Plasma bei RTp und in Eiswasser.  
Dargestellt sind die 89 Lipide, die nach 24 h Lagerung bei RTp verändert waren ( $p < 0,1$ ,  $n=10$ ).

Analyten	Stabilität von NaF/Citrat-Plasma (RE $\pm$ SD [%])				
	4 h Eis	24 h Eis	2 h RTp	4 h RTp	24 h RTp
Acyl-CN 16:0	1,69 $\pm$ 11,01	6,17 $\pm$ 15,84	6,17 $\pm$ 15,84	0,67 $\pm$ 8,68	9,07 $\pm$ 12,22
Acyl-CN 18:1	1,15 $\pm$ 7,83	3,16 $\pm$ 8,09	3,16 $\pm$ 8,09	2,38 $\pm$ 9,41	10,02 $\pm$ 16,37
Cer d18:1/24:0	-0,23 $\pm$ 8,08	2,19 $\pm$ 21,72	2,19 $\pm$ 21,72	7,65 $\pm$ 17,55	13,39 $\pm$ 7,91
DG 32:1	1,55 $\pm$ 23,52	1,28 $\pm$ 17,16	1,28 $\pm$ 17,16	12,85 $\pm$ 31,25	54,71 $\pm$ 43,48
DG 34:1	-0,12 $\pm$ 9,97	1,43 $\pm$ 14,00	1,43 $\pm$ 14,00	10,97 $\pm$ 16,51	60,13 $\pm$ 16,80
DG 36:1	-5,88 $\pm$ 12,25	-1,52 $\pm$ 11,82	-1,52 $\pm$ 11,82	5,00 $\pm$ 6,99	23,96 $\pm$ 12,42
DG 36:2	-1,23 $\pm$ 8,48	0,44 $\pm$ 15,66	0,44 $\pm$ 15,66	4,55 $\pm$ 13,40	15,74 $\pm$ 8,82
DG 36:3	-0,27 $\pm$ 9,67	2,03 $\pm$ 16,74	2,03 $\pm$ 16,74	6,80 $\pm$ 15,33	17,90 $\pm$ 10,91
DG 36:4	-1,16 $\pm$ 9,48	-0,12 $\pm$ 15,81	-0,12 $\pm$ 15,81	6,30 $\pm$ 15,37	17,60 $\pm$ 11,35
DG 38:6	-2,27 $\pm$ 15,32	-2,44 $\pm$ 21,28	-2,44 $\pm$ 21,28	2,60 $\pm$ 16,72	13,06 $\pm$ 15,45
FA 18:2	0,89 $\pm$ 11,64	-2,83 $\pm$ 8,20	-2,83 $\pm$ 8,20	3,81 $\pm$ 11,27	5,58 $\pm$ 11,53
FA 18:3	1,53 $\pm$ 11,13	0,78 $\pm$ 10,38	0,78 $\pm$ 10,38	1,11 $\pm$ 6,81	2,15 $\pm$ 12,38
FA 18:4	-1,87 $\pm$ 6,85	3,58 $\pm$ 10,98	3,58 $\pm$ 10,98	-1,53 $\pm$ 8,47	2,41 $\pm$ 12,37
FA 20:4	1,24 $\pm$ 7,54	0,06 $\pm$ 6,12	0,06 $\pm$ 6,12	2,87 $\pm$ 5,46	16,87 $\pm$ 11,43
FA 20:5	-0,92 $\pm$ 7,55	-2,86 $\pm$ 8,33	-2,86 $\pm$ 8,33	1,22 $\pm$ 4,89	11,98 $\pm$ 9,58
FA 22:4	-0,69 $\pm$ 7,41	-1,14 $\pm$ 10,75	-1,14 $\pm$ 10,75	2,72 $\pm$ 5,21	3,39 $\pm$ 6,13
FA 22:6	0,60 $\pm$ 8,83	0,99 $\pm$ 7,28	0,99 $\pm$ 7,28	1,35 $\pm$ 7,30	5,91 $\pm$ 9,23
LPC 14:0	0,45 $\pm$ 6,28	3,55 $\pm$ 6,11	3,55 $\pm$ 6,11	7,80 $\pm$ 5,28	32,38 $\pm$ 10,84
LPC 15:0	0,83 $\pm$ 5,06	3,67 $\pm$ 7,83	3,67 $\pm$ 7,83	7,25 $\pm$ 5,96	35,42 $\pm$ 11,34
LPC 16:0	-0,27 $\pm$ 4,05	3,29 $\pm$ 7,80	3,29 $\pm$ 7,80	9,22 $\pm$ 5,91	41,52 $\pm$ 16,29
LPC 16:1	-0,06 $\pm$ 3,38	2,55 $\pm$ 5,99	2,55 $\pm$ 5,99	6,90 $\pm$ 3,75	32,67 $\pm$ 10,70
LPC 17:0	-0,17 $\pm$ 4,04	2,76 $\pm$ 5,83	2,76 $\pm$ 5,83	8,84 $\pm$ 3,93	45,50 $\pm$ 14,35
LPC 18:0	0,03 $\pm$ 5,44	1,79 $\pm$ 8,64	1,79 $\pm$ 8,64	10,46 $\pm$ 4,84	53,67 $\pm$ 19,51
LPC 18:1	-0,05 $\pm$ 3,52	2,85 $\pm$ 6,81	2,85 $\pm$ 6,81	5,53 $\pm$ 3,74	25,22 $\pm$ 9,25
LPC 18:2	0,00 $\pm$ 3,22	3,24 $\pm$ 7,58	3,24 $\pm$ 7,58	3,24 $\pm$ 3,92	9,56 $\pm$ 6,53
LPC 18:3	-1,24 $\pm$ 7,39	1,66 $\pm$ 5,88	1,66 $\pm$ 5,88	2,03 $\pm$ 6,98	10,25 $\pm$ 6,71
LPC 20:0	-0,59 $\pm$ 5,98	5,06 $\pm$ 9,86	5,06 $\pm$ 9,86	7,88 $\pm$ 7,98	21,92 $\pm$ 11,28
LPC 20:1	-0,84 $\pm$ 5,94	3,57 $\pm$ 8,12	3,57 $\pm$ 8,12	8,52 $\pm$ 5,75	39,58 $\pm$ 16,55
LPC 20:2	-0,01 $\pm$ 4,90	4,83 $\pm$ 9,82	4,83 $\pm$ 9,82	7,61 $\pm$ 7,42	30,03 $\pm$ 17,91
LPC 20:3	-0,18 $\pm$ 4,01	3,09 $\pm$ 7,11	3,09 $\pm$ 7,11	5,46 $\pm$ 3,09	14,55 $\pm$ 7,40
LPC 20:4	1,71 $\pm$ 5,62	4,12 $\pm$ 9,05	4,12 $\pm$ 9,05	5,95 $\pm$ 4,36	22,78 $\pm$ 11,30
LPC 20:5	-0,55 $\pm$ 4,54	3,24 $\pm$ 8,06	3,24 $\pm$ 8,06	5,78 $\pm$ 3,85	19,05 $\pm$ 8,83
LPC 22:0	-4,84 $\pm$ 12,29	2,69 $\pm$ 18,84	2,69 $\pm$ 18,84	6,41 $\pm$ 14,61	13,59 $\pm$ 19,80
LPC 22:5	0,83 $\pm$ 6,98	3,07 $\pm$ 8,56	3,07 $\pm$ 8,56	8,10 $\pm$ 6,20	20,62 $\pm$ 10,85
LPC 22:6	1,34 $\pm$ 4,74	4,19 $\pm$ 7,94	4,19 $\pm$ 7,94	6,20 $\pm$ 2,05	20,04 $\pm$ 9,38
LPC O-16:0	-1,68 $\pm$ 5,27	2,41 $\pm$ 5,56	2,41 $\pm$ 5,56	8,56 $\pm$ 6,44	41,52 $\pm$ 16,76
LPC O-16:1	0,84 $\pm$ 7,17	-0,92 $\pm$ 9,04	-0,92 $\pm$ 9,04	4,17 $\pm$ 10,51	26,48 $\pm$ 19,78
LPC O-18:0	-1,82 $\pm$ 8,55	-0,44 $\pm$ 6,29	-0,44 $\pm$ 6,29	8,06 $\pm$ 9,55	33,77 $\pm$ 15,32
LPC O-18:1	-0,42 $\pm$ 5,90	0,27 $\pm$ 8,60	0,27 $\pm$ 8,60	8,71 $\pm$ 8,88	56,93 $\pm$ 28,46
LPE 16:0	0,13 $\pm$ 5,39	2,36 $\pm$ 6,39	2,36 $\pm$ 6,39	4,31 $\pm$ 5,16	14,23 $\pm$ 10,63
LPE 17:0	-3,60 $\pm$ 8,09	1,55 $\pm$ 8,59	1,55 $\pm$ 8,59	5,08 $\pm$ 9,53	10,57 $\pm$ 11,60
LPE 18:0	0,40 $\pm$ 7,37	4,07 $\pm$ 9,36	4,07 $\pm$ 9,36	6,85 $\pm$ 6,51	23,60 $\pm$ 11,34
LPE 18:1	0,11 $\pm$ 7,40	3,53 $\pm$ 6,99	3,53 $\pm$ 6,99	4,66 $\pm$ 5,07	10,81 $\pm$ 8,29
LPE 18:2	1,12 $\pm$ 8,28	3,24 $\pm$ 7,28	3,24 $\pm$ 7,28	3,77 $\pm$ 5,05	5,14 $\pm$ 8,15

<b>Stabilität von NaF/Citrat-Plasma (RE ± SD [%])</b>					
<b>Analyten</b>	<b>4 h Eis</b>	<b>24 h Eis</b>	<b>2 h RTp</b>	<b>4 h RTp</b>	<b>24 h RTp</b>
LPE O-16:1	2,97 ± 10,24	2,42 ± 10,10	2,42 ± 10,10	8,45 ± 13,04	43,23 ± 19,11
LPG 18:1	-1,06 ± 9,62	0,20 ± 6,89	0,20 ± 6,89	-0,08 ± 6,28	-3,58 ± 7,11
LPG 18:2	-4,36 ± 12,23	1,66 ± 7,82	1,66 ± 7,82	-3,62 ± 10,75	-6,77 ± 11,54
LPI 18:0	-7,72 ± 17,96	-3,15 ± 19,48	-3,15 ± 19,48	-2,16 ± 18,87	4,43 ± 19,97
LPI 20:3	2,31 ± 11,48	-0,77 ± 18,36	-0,77 ± 18,36	-2,05 ± 10,13	-4,84 ± 13,80
LPI 20:4	-2,83 ± 10,60	-0,46 ± 12,59	-0,46 ± 12,59	-1,55 ± 11,53	0,28 ± 10,52
PC 30:0	0,77 ± 6,33	1,88 ± 12,07	1,88 ± 12,07	1,90 ± 8,17	-2,14 ± 7,28
PC 30:1	0,61 ± 7,07	5,10 ± 12,08	5,10 ± 12,08	3,91 ± 9,34	-8,58 ± 8,35
PC 30:2	-1,23 ± 6,83	0,76 ± 12,68	0,76 ± 12,68	4,91 ± 16,44	-5,41 ± 7,80
PC 32:0	-0,51 ± 6,16	1,92 ± 12,62	1,92 ± 12,62	2,07 ± 8,43	-0,23 ± 5,90
PC 32:1	-0,88 ± 5,09	2,59 ± 11,27	2,59 ± 11,27	1,48 ± 6,50	-5,72 ± 8,32
PC 32:2	-1,24 ± 6,79	3,12 ± 13,92	3,12 ± 13,92	2,04 ± 7,15	-4,40 ± 5,84
PC 33:2	0,59 ± 5,59	4,13 ± 11,43	4,13 ± 11,43	2,42 ± 8,03	-1,31 ± 5,90
PC 34:1	-0,05 ± 4,64	1,51 ± 11,06	1,51 ± 11,06	1,33 ± 6,09	0,29 ± 4,71
PC 34:2	0,18 ± 4,24	1,39 ± 10,84	1,39 ± 10,84	0,71 ± 5,54	-0,64 ± 5,80
PC 34:3	-1,09 ± 6,85	2,87 ± 13,49	2,87 ± 13,49	1,18 ± 7,26	-3,02 ± 7,72
PC 34:4	-0,09 ± 6,23	3,76 ± 14,28	3,76 ± 14,28	3,79 ± 7,66	-1,59 ± 6,93
PC 34:5	3,67 ± 8,35	6,77 ± 13,56	6,77 ± 13,56	5,95 ± 9,82	3,03 ± 7,08
PC 36:1	-0,87 ± 6,64	3,32 ± 12,54	3,32 ± 12,54	2,14 ± 8,87	2,39 ± 4,64
PC 36:2	-0,52 ± 4,72	3,23 ± 10,28	3,23 ± 10,28	2,04 ± 5,73	0,05 ± 4,72
PC 36:5	-1,24 ± 5,96	2,26 ± 14,52	2,26 ± 14,52	2,30 ± 7,15	-0,37 ± 5,95
PC 40:4	-1,76 ± 7,09	2,47 ± 12,17	2,47 ± 12,17	1,59 ± 8,22	3,48 ± 4,95
PC 42:6	-3,75 ± 10,74	4,52 ± 28,51	4,52 ± 28,51	-6,81 ± 17,74	-3,80 ± 15,47
PC O-16:1_16:0	-3,17 ± 15,37	-1,36 ± 12,54	-1,36 ± 12,54	1,81 ± 11,56	-0,23 ± 20,50
PC O-16:1_18:2	-1,78 ± 13,77	-2,77 ± 14,06	-2,77 ± 14,06	2,83 ± 10,70	2,09 ± 19,16
PC O-16:1_20:4	-2,83 ± 15,03	-0,43 ± 13,68	-0,43 ± 13,68	3,17 ± 11,01	0,82 ± 14,63
PC O-18:1_18:1	-4,54 ± 13,43	1,56 ± 10,46	1,56 ± 10,46	5,21 ± 14,19	2,59 ± 15,83
PC O-18:1_18:2	-5,35 ± 17,16	1,96 ± 15,32	1,96 ± 15,32	6,25 ± 12,58	-3,03 ± 11,63
PC O-18:1_20:4	-2,09 ± 16,32	0,13 ± 10,47	0,13 ± 10,47	3,83 ± 9,59	2,94 ± 14,56
PE 32:1	2,34 ± 13,59	8,36 ± 11,97	8,36 ± 11,97	5,07 ± 8,35	1,56 ± 16,45
PE 34:2	-1,52 ± 5,94	0,06 ± 6,77	0,06 ± 6,77	2,94 ± 6,22	0,97 ± 4,26
PE 36:1	-0,05 ± 5,06	-0,52 ± 7,16	-0,52 ± 7,16	2,11 ± 6,16	4,28 ± 7,26
PE 36:2	-2,51 ± 5,31	1,69 ± 5,04	1,69 ± 5,04	4,03 ± 6,84	3,34 ± 9,46
PE 40:6	0,89 ± 4,88	-0,08 ± 8,79	-0,08 ± 8,79	4,31 ± 5,73	5,43 ± 8,06
PI 38:5	5,37 ± 15,32	5,96 ± 24,94	5,96 ± 24,94	10,22 ± 20,09	0,08 ± 13,98
SE 27:1/20:5	-1,42 ± 9,84	2,24 ± 22,58	2,24 ± 22,58	7,17 ± 11,68	8,83 ± 11,70
SM 33:1	-4,21 ± 10,99	-0,85 ± 16,61	-0,85 ± 16,61	0,16 ± 13,38	2,08 ± 9,22
SM 34:2	-4,43 ± 9,84	-0,69 ± 16,75	-0,69 ± 16,75	1,67 ± 10,95	-0,49 ± 7,89
SM 39:1	-4,40 ± 9,61	1,10 ± 14,68	1,10 ± 14,68	1,93 ± 12,48	5,33 ± 7,41
ST 27:1_OH	-2,26 ± 8,92	0,39 ± 12,59	0,39 ± 12,59	1,91 ± 8,65	-0,48 ± 6,33
TG 44:1	-0,56 ± 11,62	3,19 ± 21,15	3,19 ± 21,15	10,81 ± 22,20	11,92 ± 15,60
TG 46:1	0,34 ± 12,44	1,98 ± 23,00	1,98 ± 23,00	11,11 ± 20,67	9,50 ± 17,63
TG 46:3	-1,03 ± 11,44	3,21 ± 21,35	3,21 ± 21,35	9,43 ± 17,90	9,63 ± 14,46
TG 48:2	-0,74 ± 12,19	2,58 ± 22,67	2,58 ± 22,67	11,15 ± 22,80	7,04 ± 13,87
TG 48:4	0,12 ± 15,09	3,52 ± 22,67	3,52 ± 22,67	11,66 ± 22,99	9,74 ± 14,71

Tabelle 48: Relative Peakfläche in Mausplasma nach Injektion von LPS bzw. Zymosan.

Dargestellt sind die in Mausplasma detektierbaren Lipide von den 139 durch Entzündung in Plasma oder Pfoten veränderten Lipiden (relative chromatographische Peakfläche in %,  $p < 0,05$ ;  $n=7$  bis 8)). Ct = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, Zym = Zymosan.

Rel. Peakflächen in Plasma (rel. zu Ct $\pm$ RSD [%])			
	RSD Ct	Zym	LPS
Acyl-CN 16:0	23.35	105.63 $\pm$ 21.40	122.96 $\pm$ 30.67
Acyl-CN 18:0	19.88	104.32 $\pm$ 32.52	113.29 $\pm$ 19.44
Acyl-CN 18:1	22.10	110.92 $\pm$ 31.92	144.63 $\pm$ 31.37
Acyl-CN 18:2	27.59	99.91 $\pm$ 25.29	140.88 $\pm$ 49.95
Cer d18:1/16:0	17.35	91.28 $\pm$ 11.08	101.76 $\pm$ 20.25
Cer d18:1/24:0	20.16	92.95 $\pm$ 24.86	113.19 $\pm$ 30.40
DG 32:1	27.69	57.78 $\pm$ 26.07	70.87 $\pm$ 15.01
DG 34:1	27.13	55.78 $\pm$ 32.59	65.40 $\pm$ 23.68
DG 34:3	14.28	80.62 $\pm$ 8.37	81.60 $\pm$ 5.03
DG 36:1	14.15	56.38 $\pm$ 33.21	77.89 $\pm$ 29.41
DG 36:4	26.14	77.08 $\pm$ 22.98	61.07 $\pm$ 24.83
FA 15:2	24.13	126.62 $\pm$ 52.12	191.64 $\pm$ 62.87
FA 16:1	50.16	24.75 $\pm$ 28.89	79.62 $\pm$ 63.34
FA 18:1	12.94	58.17 $\pm$ 35.49	123.81 $\pm$ 36.11
FA 18:1_OH3	38.68	117.79 $\pm$ 29.44	219.06 $\pm$ 110.76
FA 18:2_OH	41.89	51.19 $\pm$ 30.28	116.42 $\pm$ 63.69
FA 18:2_OH2	35.54	88.65 $\pm$ 24.47	111.45 $\pm$ 38.84
FA 18:3_OH	26.78	84.48 $\pm$ 27.75	191.63 $\pm$ 42.99
FA 20:2	38.40	42.05 $\pm$ 14.94	89.71 $\pm$ 35.47
FA 20:3	22.26	53.80 $\pm$ 20.29	105.49 $\pm$ 36.03
FA 20:5	45.33	78.04 $\pm$ 21.04	119.28 $\pm$ 33.10
FA 24:1	30.60	49.07 $\pm$ 27.45	84.56 $\pm$ 31.78
HexCer d18:1/16:0	21.22	104.00 $\pm$ 26.11	113.90 $\pm$ 17.53
HexCer d18:1/20:0_OH	28.40	105.99 $\pm$ 8.22	99.25 $\pm$ 30.54
LPC 15:0	24.86	106.90 $\pm$ 9.67	107.19 $\pm$ 27.96
LPC 16:0	19.98	100.74 $\pm$ 11.12	110.34 $\pm$ 27.95
LPC 16:1	18.30	87.88 $\pm$ 18.55	135.31 $\pm$ 24.89
LPC 17:0	26.66	109.08 $\pm$ 5.87	103.89 $\pm$ 27.29
LPC 18:0	24.35	93.51 $\pm$ 10.86	101.55 $\pm$ 26.15
LPC 18:1	17.24	97.41 $\pm$ 14.99	138.71 $\pm$ 22.48
LPC 18:2	21.28	98.82 $\pm$ 12.03	117.22 $\pm$ 22.82
LPC 18:3	21.59	94.27 $\pm$ 9.56	122.54 $\pm$ 25.83
LPC 19:0	26.71	116.96 $\pm$ 9.92	105.02 $\pm$ 30.30
LPC 20:0	27.54	102.50 $\pm$ 13.11	100.92 $\pm$ 37.49
LPC 20:1	25.27	98.53 $\pm$ 15.97	114.57 $\pm$ 19.18
LPC 20:2	25.27	98.14 $\pm$ 16.39	117.67 $\pm$ 25.66
LPC 20:3	19.31	84.06 $\pm$ 19.37	109.96 $\pm$ 28.33
LPC 20:4	40.84	98.65 $\pm$ 16.60	111.91 $\pm$ 27.26
LPC 20:5	36.07	78.63 $\pm$ 22.74	116.99 $\pm$ 34.95
LPC 22:0	21.18	102.72 $\pm$ 10.23	104.57 $\pm$ 30.28
LPC 22:1	27.63	106.45 $\pm$ 17.64	108.82 $\pm$ 25.82
LPC 24:0	22.33	104.45 $\pm$ 9.55	111.75 $\pm$ 29.51

## Rel. Peakflächen in Plasma (rel. zu Ct ± RSD [%])

	RSD Ct	Zym	LPS
LPC O-16:0	23.09	94.15 ± 13.04	95.94 ± 23.51
LPC O-18:0	19.46	102.91 ± 10.30	102.50 ± 21.26
LPE 16:1	15.03	77.35 ± 16.88	129.90 ± 22.78
LPE 17:0	24.72	110.31 ± 12.17	106.92 ± 27.77
LPE O-16:1	17.22	106.46 ± 15.95	115.40 ± 19.16
LPG 18:2	20.68	91.12 ± 13.70	119.73 ± 19.86
LPI 18:0	21.37	96.28 ± 15.41	112.71 ± 8.29
LPI 18:2	29.26	87.98 ± 14.49	113.37 ± 23.55
LPI 20:4	29.71	82.35 ± 9.60	112.17 ± 19.72
PC 32:2	24.61	92.40 ± 18.65	107.29 ± 32.51
PC 33:2	27.52	107.49 ± 9.40	91.45 ± 35.24
PC 34:3	22.78	96.99 ± 13.12	108.84 ± 33.25
PC 34:4	19.06	102.49 ± 13.80	117.03 ± 34.60
PC 35:1	25.37	111.04 ± 13.64	114.35 ± 27.44
PC 36:3	19.82	94.86 ± 15.25	100.49 ± 21.81
PC 38:2	26.04	99.14 ± 17.51	102.53 ± 27.72
PC 38:3	21.24	87.13 ± 15.33	100.90 ± 20.88
PC 40:1	22.60	106.74 ± 9.79	106.74 ± 37.77
PC 40:2	27.97	103.21 ± 23.94	104.73 ± 36.07
PC 41:2	30.60	77.78 ± 23.63	103.44 ± 8.24
PC 42:2	24.21	100.33 ± 21.41	94.75 ± 38.71
PC O-16:0_16:0	25.34	101.46 ± 13.97	102.17 ± 20.03
PC O-16:0_18:2	20.86	86.10 ± 30.62	80.70 ± 15.12
PC O-16:0_20:4	29.27	92.75 ± 12.33	91.79 ± 22.12
PC O-16:1_18:2	28.58	96.05 ± 21.67	90.21 ± 19.38
PC O-18:1_20:4	20.64	86.71 ± 20.68	81.34 ± 17.31
PC O-34:1	24.88	100.23 ± 13.10	94.66 ± 18.42
PC O-30:0	24.30	107.23 ± 15.99	111.60 ± 16.75
PC O-34:0	22.06	111.29 ± 18.51	90.02 ± 22.37
PC O-34:3	22.28	97.51 ± 10.87	95.22 ± 20.37
PC O-36:1	17.56	111.60 ± 11.19	108.93 ± 20.55
PC O-36:2	23.72	111.73 ± 16.26	105.33 ± 19.84
PC O-36:3	19.78	97.04 ± 12.90	88.15 ± 25.65
PE 32:1	26.81	62.62 ± 38.37	93.68 ± 22.83
PE 34:1	32.33	77.43 ± 18.77	107.95 ± 18.89
PE 34:2	32.14	86.68 ± 19.65	89.93 ± 29.01
PE 34:3	31.81	81.25 ± 20.24	102.22 ± 20.09
PE 36:2	30.37	79.59 ± 18.45	82.45 ± 24.15
PE 36:3	28.73	82.15 ± 14.21	86.64 ± 19.75
PE 36:4	22.02	101.71 ± 16.51	101.98 ± 29.74
PE 38:4	21.07	97.29 ± 18.97	96.10 ± 28.56
PE O-16:1_18:2	31.52	118.91 ± 13.94	110.28 ± 27.54
PI 36:1	17.05	96.41 ± 21.39	100.13 ± 27.15
PI 36:3	19.99	94.82 ± 10.75	92.05 ± 25.64
PI 38:5	17.82	115.21 ± 15.37	110.15 ± 21.88
SE 27:1/16:1	24.28	76.52 ± 26.30	124.21 ± 27.49



## Rel. Peakflächen in Plasma (rel. zu Ct ± RSD [%])

	RSD Ct	Zym	LPS
SE 27:1/18:1	18.58	96.34 ± 14.57	118.51 ± 20.86
SE 27:1/18:2	17.45	102.41 ± 10.06	96.48 ± 23.26
SE 27:1/20:0	29.78	106.87 ± 37.58	77.86 ± 48.99
SE 27:1/20:1	25.77	88.55 ± 12.89	107.38 ± 22.94
SE 27:1/20:2	25.74	96.89 ± 14.01	92.82 ± 38.09
SE 27:1/20:3	17.60	93.75 ± 17.06	118.86 ± 20.57
SE 27:1/20:4	22.75	103.85 ± 12.28	102.64 ± 21.82
SM 33:1	22.87	118.59 ± 11.37	113.19 ± 22.58
SM 34:1	19.56	106.26 ± 9.29	108.17 ± 24.19
SM 34:2	26.61	109.29 ± 17.00	108.75 ± 40.01
SM 39:1	32.71	124.14 ± 11.54	113.76 ± 41.36
SM 44:2	18.12	58.33 ± 22.76	61.12 ± 22.49
ST 27:1_OH_S	18.95	115.83 ± 16.53	137.54 ± 19.93
TG 44:2	32.70	50.03 ± 34.93	61.87 ± 20.17
TG 46:1	35.62	48.33 ± 48.09	59.62 ± 28.34
TG 46:2	38.66	47.16 ± 42.97	56.03 ± 29.75
TG 46:3	34.06	54.88 ± 29.95	56.38 ± 17.92
TG 48:1	42.14	39.99 ± 65.89	52.01 ± 38.19
TG 48:2	51.10	36.89 ± 72.07	49.82 ± 41.24
TG 48:3	45.84	41.26 ± 51.40	53.29 ± 43.03
TG 48:4	36.71	53.56 ± 22.59	61.76 ± 17.54
TG 50:1	33.98	44.25 ± 51.73	52.91 ± 37.59
TG 50:2	42.19	40.32 ± 60.74	53.21 ± 40.95
TG 50:3	44.65	40.24 ± 50.12	50.92 ± 47.76
TG 51:1	30.17	46.21 ± 37.20	51.18 ± 30.76
TG 51:2	46.55	43.39 ± 44.98	47.67 ± 38.39
TG 51:3	42.36	47.79 ± 34.46	47.51 ± 41.73
TG 51:4	37.22	47.00 ± 31.13	44.78 ± 46.07
TG 52:1	29.87	45.72 ± 47.25	56.16 ± 38.06
TG 52:2	35.87	47.43 ± 45.17	57.59 ± 38.98
TG 52:3	31.12	55.12 ± 30.68	56.87 ± 41.73
TG 53:3	37.85	53.80 ± 31.61	56.71 ± 39.08
TG 54:1	33.83	44.04 ± 53.01	59.25 ± 43.20
TG 54:2	35.75	48.11 ± 43.69	61.53 ± 33.56
TG 54:4	30.74	61.20 ± 30.21	60.31 ± 34.82
TG 54:5	38.92	57.04 ± 29.46	50.07 ± 45.65
TG 56:4	24.74	62.57 ± 27.84	77.09 ± 25.26
TG 58:1	35.72	59.64 ± 39.32	70.71 ± 22.34

Tabelle 49: Relative Peakflächen in Mauspfoten nach Injektion von LPS bzw. Zymosan.

LPS oder Zymosan (Zym) wurden in die rechte Pfote (r) injiziert. Linke Pfoten (l) und Kontrollen (Ct) waren unbehandelt. Dargestellt sind die in Pfoten detektierbaren Lipide von den 139 in Plasma oder Pfoten signifikant veränderten Lipiden (relative chromatographische Peakfläche in %,  $p < 0,05$ ;  $n=8$ ). Weitere Details siehe Abschnitt 2.3.2., „-“ = nicht detektierbar.

	Rel. Peakflächen in Pfoten-Homogenaten (rel. zu Ct r $\pm$ RSD [%])					
	RSD Ct r	Ct l	Zym l	Zym r	LPS l	LPS r
<b>Acyl-CN 16:0</b>	53.44	95.56 $\pm$ 37.89	81.65 $\pm$ 26.71	147.65 $\pm$ 35.96	173.19 $\pm$ 37.69	215.85 $\pm$ 44.94
<b>Acyl-CN 18:0</b>	39.01	82.43 $\pm$ 25.54	78.19 $\pm$ 21.86	105.08 $\pm$ 17.90	125.46 $\pm$ 29.79	132.55 $\pm$ 32.62
<b>Acyl-CN 18:1</b>	49.00	96.87 $\pm$ 42.19	93.68 $\pm$ 25.08	177.16 $\pm$ 52.76	209.07 $\pm$ 47.27	242.75 $\pm$ 56.61
<b>Acyl-CN 18:2</b>	57.35	102.04 $\pm$ 41.78	89.07 $\pm$ 26.79	167.93 $\pm$ 39.73	226.74 $\pm$ 65.64	258.06 $\pm$ 56.29
<b>Cer d18:1/16:0</b>	57.49	113.22 $\pm$ 28.44	91.90 $\pm$ 37.12	124.01 $\pm$ 29.39	151.34 $\pm$ 30.09	159.44 $\pm$ 29.73
<b>Cer d18:1/24:0</b>	41.69	105.68 $\pm$ 24.63	93.72 $\pm$ 33.37	124.79 $\pm$ 23.85	171.12 $\pm$ 51.82	152.62 $\pm$ 29.55
<b>DG 32:1</b>	41.57	111.24 $\pm$ 42.23	111.85 $\pm$ 35.06	95.80 $\pm$ 33.57	131.18 $\pm$ 34.08	115.39 $\pm$ 18.98
<b>DG 34:1</b>	51.41	100.66 $\pm$ 40.35	103.09 $\pm$ 32.85	98.29 $\pm$ 25.65	134.50 $\pm$ 24.66	127.08 $\pm$ 18.66
<b>DG 34:3</b>	28.00	112.54 $\pm$ 23.31	105.77 $\pm$ 22.06	87.53 $\pm$ 7.72	105.93 $\pm$ 24.07	95.00 $\pm$ 19.11
<b>DG 36:1</b>	56.55	97.07 $\pm$ 34.12	92.11 $\pm$ 30.32	90.44 $\pm$ 28.71	146.73 $\pm$ 22.07	125.20 $\pm$ 22.26
<b>DG 36:4</b>	60.23	104.31 $\pm$ 40.99	112.93 $\pm$ 36.28	89.34 $\pm$ 24.67	155.15 $\pm$ 30.28	121.68 $\pm$ 20.18
<b>FA 15:2</b>	64.60	96.23 $\pm$ 40.22	100.56 $\pm$ 17.46	150.98 $\pm$ 24.46	133.33 $\pm$ 34.59	228.62 $\pm$ 63.06
<b>FA 18:1</b>	7.39	94.51 $\pm$ 3.90	85.53 $\pm$ 4.41	102.45 $\pm$ 15.25	102.03 $\pm$ 19.82	103.31 $\pm$ 15.27
<b>FA 18:1_OH</b>	27.62	100.74 $\pm$ 34.36	81.67 $\pm$ 17.27	86.99 $\pm$ 23.77	103.93 $\pm$ 18.33	120.44 $\pm$ 7.29
<b>FA 18:1_OH3</b>	35.51	117.27 $\pm$ 41.05	90.67 $\pm$ 46.30	67.77 $\pm$ 64.28	166.25 $\pm$ 49.02	108.01 $\pm$ 43.53
<b>FA 18:2_OH</b>	53.75	119.49 $\pm$ 45.60	73.41 $\pm$ 41.80	109.41 $\pm$ 34.69	130.37 $\pm$ 19.62	157.51 $\pm$ 14.48
<b>FA 18:3_OH</b>	15.49	94.35 $\pm$ 16.05	86.51 $\pm$ 1.06	-	110.11 $\pm$ 22.83	93.84 $\pm$ 15.66
<b>FA 19:0</b>	8.01	-	101.97 $\pm$ 11.51	105.31 $\pm$ 11.38	116.33 $\pm$ 11.89	106.55 $\pm$ 8.53
<b>FA 20:2</b>	44.19	116.40 $\pm$ 24.92	105.30 $\pm$ 27.05	131.91 $\pm$ 27.40	119.05 $\pm$ 27.51	142.22 $\pm$ 18.29
<b>FA 20:3</b>	35.39	111.12 $\pm$ 33.94	113.03 $\pm$ 41.27	160.97 $\pm$ 28.56	133.70 $\pm$ 24.59	193.05 $\pm$ 24.51
<b>FA 20:5</b>	38.23	110.35 $\pm$ 32.05	85.36 $\pm$ 26.50	146.91 $\pm$ 30.79	109.02 $\pm$ 20.21	163.62 $\pm$ 13.95
<b>FA 24:1</b>	54.23	112.71 $\pm$ 45.79	89.56 $\pm$ 32.66	89.62 $\pm$ 20.99	148.97 $\pm$ 60.61	125.83 $\pm$ 49.40
<b>HexCer d18:1/16:0</b>	53.33	97.19 $\pm$ 39.47	76.01 $\pm$ 33.95	127.12 $\pm$ 28.56	113.72 $\pm$ 27.13	148.04 $\pm$ 19.41
<b>HexCer d18:1/20:0_OH</b>	38.99	114.09 $\pm$ 35.52	99.39 $\pm$ 27.02	1537.64 $\pm$ 52.31	143.37 $\pm$ 24.90	944.92 $\pm$ 33.17
<b>LPC 15:0</b>	20.91	99.58 $\pm$ 12.93	88.73 $\pm$ 16.05	88.12 $\pm$ 17.64	125.02 $\pm$ 15.96	108.00 $\pm$ 14.11
<b>LPC 16:0</b>	45.77	103.82 $\pm$ 36.11	107.02 $\pm$ 31.92	171.26 $\pm$ 35.29	152.41 $\pm$ 23.03	188.92 $\pm$ 12.01
<b>LPC 16:1</b>	49.32	124.19 $\pm$ 26.22	92.70 $\pm$ 42.77	112.62 $\pm$ 36.06	187.87 $\pm$ 36.49	187.20 $\pm$ 24.30
<b>LPC 17:0</b>	50.36	108.90 $\pm$ 40.94	99.25 $\pm$ 24.99	147.37 $\pm$ 32.10	156.98 $\pm$ 31.00	166.25 $\pm$ 18.46
<b>LPC 17:1</b>	48.71	85.23 $\pm$ 35.03	75.96 $\pm$ 41.14	98.41 $\pm$ 32.72	80.08 $\pm$ 39.88	104.81 $\pm$ 40.09
<b>LPC 18:0</b>	53.70	101.77 $\pm$ 39.00	98.67 $\pm$ 29.42	149.68 $\pm$ 34.05	130.97 $\pm$ 20.46	162.86 $\pm$ 17.58
<b>LPC 18:1</b>	50.28	111.69 $\pm$ 33.10	99.62 $\pm$ 36.35	179.85 $\pm$ 40.95	196.30 $\pm$ 30.00	252.04 $\pm$ 23.59
<b>LPC 18:2</b>	54.24	116.41 $\pm$ 28.83	103.59 $\pm$ 36.59	212.95 $\pm$ 50.00	186.65 $\pm$ 38.38	250.98 $\pm$ 35.86
<b>LPC 18:3</b>	40.58	115.71 $\pm$ 18.98	93.44 $\pm$ 52.55	140.11 $\pm$ 44.43	167.05 $\pm$ 47.11	192.29 $\pm$ 36.46
<b>LPC 19:0</b>	42.70	106.73 $\pm$ 32.98	125.74 $\pm$ 22.74	200.14 $\pm$ 38.70	148.33 $\pm$ 27.78	189.92 $\pm$ 18.35
<b>LPC 20:0</b>	46.31	110.03 $\pm$ 33.08	98.49 $\pm$ 34.49	119.83 $\pm$ 32.65	154.72 $\pm$ 31.45	148.06 $\pm$ 20.15
<b>LPC 20:1</b>	43.03	115.34 $\pm$ 27.41	100.18 $\pm$ 20.09	173.39 $\pm$ 41.45	161.15 $\pm$ 32.00	202.16 $\pm$ 17.27
<b>LPC 20:4</b>	55.72	96.45 $\pm$ 37.47	113.48 $\pm$ 41.45	174.60 $\pm$ 47.74	164.46 $\pm$ 38.38	195.52 $\pm$ 33.37
<b>LPC 22:0</b>	67.17	117.06 $\pm$ 38.82	87.92 $\pm$ 43.55	64.23 $\pm$ 43.34	181.23 $\pm$ 39.96	126.72 $\pm$ 26.87
<b>LPC 22:1</b>	44.97	120.61 $\pm$ 23.54	104.54 $\pm$ 23.56	99.65 $\pm$ 45.66	166.94 $\pm$ 28.51	141.01 $\pm$ 24.10
<b>LPC 24:0</b>	69.99	121.11 $\pm$ 41.56	83.14 $\pm$ 43.08	59.46 $\pm$ 40.49	197.72 $\pm$ 44.79	133.37 $\pm$ 27.76

## Rel. Peakflächen in Pfoten-Homogenaten (rel. zu Ct r ± RSD [%])

	RSD Ct r	Ct l	Zym l	Zym r	LPS l	LPS r
LPC O-16:0	43.54	123.74 ± 25.23	103.50 ± 28.73	754.00 ± 48.05	131.76 ± 25.33	527.58 ± 31.41
LPC O-18:0	26.87	103.61 ± 12.28	110.50 ± 21.43	490.81 ± 43.95	112.55 ± 18.54	357.74 ± 30.93
LPE 16:1	52.96	107.39 ± 27.06	102.28 ± 39.63	68.05 ± 49.88	120.75 ± 35.61	104.20 ± 28.81
LPE 17:0	44.52	115.49 ± 36.62	100.49 ± 31.92	96.15 ± 33.19	156.93 ± 33.88	139.95 ± 21.38
LPE O-16:1	56.32	120.46 ± 31.28	91.15 ± 35.09	134.15 ± 31.82	138.16 ± 33.16	173.74 ± 33.77
LPE O-20:3	43.15	103.24 ± 18.67	101.83 ± 25.36	194.37 ± 42.87	113.79 ± 35.42	201.22 ± 31.54
LPG 18:2	40.40	117.10 ± 30.56	99.31 ± 26.85	132.62 ± 29.70	150.38 ± 24.67	156.96 ± 21.75
LPI 18:0	51.93	123.99 ± 49.16	95.93 ± 32.94	153.46 ± 36.15	123.08 ± 27.51	181.99 ± 26.59
LPI 18:2	30.29	114.24 ± 23.06	102.90 ± 30.42	109.36 ± 36.32	134.65 ± 29.25	139.31 ± 25.34
LPI 20:4	45.35	108.48 ± 32.24	110.20 ± 35.40	164.00 ± 30.78	138.76 ± 34.47	174.30 ± 26.85
LPS 18:1	36.21	119.68 ± 28.77	97.05 ± 35.72	96.22 ± 29.35	155.41 ± 39.29	141.27 ± 28.57
PC 30:2	76.98	110.40 ± 37.04	70.38 ± 49.11	61.29 ± 26.54	132.63 ± 33.57	93.96 ± 31.28
PC 32:2	69.88	104.81 ± 43.56	83.41 ± 41.40	73.57 ± 33.59	158.62 ± 35.28	125.18 ± 21.20
PC 33:2	67.39	109.32 ± 39.03	88.49 ± 38.50	79.12 ± 34.17	165.67 ± 35.77	130.06 ± 24.15
PC 34:3	52.30	110.28 ± 37.14	93.35 ± 32.72	99.33 ± 26.02	163.66 ± 29.93	146.39 ± 18.76
PC 34:4	60.25	101.56 ± 45.82	107.48 ± 36.62	81.89 ± 19.14	162.14 ± 38.00	119.75 ± 20.18
PC 35:1	76.49	107.58 ± 64.04	73.95 ± 32.98	86.07 ± 28.89	176.24 ± 38.74	152.58 ± 18.11
PC 36:3	63.03	107.88 ± 45.23	94.30 ± 36.11	123.64 ± 30.38	171.20 ± 33.07	168.68 ± 19.17
PC 38:2	60.76	110.52 ± 41.34	92.36 ± 34.57	96.18 ± 30.05	160.04 ± 31.27	139.89 ± 17.82
PC 38:3	61.19	111.65 ± 42.90	94.02 ± 31.91	120.68 ± 29.92	163.92 ± 30.00	161.19 ± 14.60
PC 40:1	52.43	115.13 ± 43.19	95.37 ± 38.03	71.57 ± 25.85	154.25 ± 28.49	117.42 ± 18.57
PC 40:2	65.64	115.37 ± 38.34	91.75 ± 37.01	72.71 ± 33.15	164.38 ± 32.81	125.13 ± 19.43
PC 41:2	67.18	116.57 ± 40.56	92.36 ± 41.53	69.68 ± 37.33	172.50 ± 36.40	126.67 ± 26.53
PC 42:2	68.89	114.81 ± 39.97	85.53 ± 38.14	63.87 ± 38.18	158.21 ± 34.24	120.75 ± 22.33
PC O-16:0_16:0	33.72	117.31 ± 20.44	105.91 ± 19.28	1533.03 ± 52.09	126.44 ± 13.53	996.29 ± 24.79
PC O-16:0_18:2	5.07	128.48 ± 8.59	-	1394.20 ± 51.19	116.81 ± 24.10	838.61 ± 26.16
PC O-16:0_20:4	44.23	118.17 ± 22.96	106.08 ± 18.00	403.43 ± 44.61	136.11 ± 16.06	274.78 ± 23.46
PC O-16:1_16:0	31.38	107.89 ± 25.69	99.74 ± 24.54	86.18 ± 27.81	120.33 ± 18.65	105.65 ± 13.02
PC O-16:1_18:2	31.35	78.86 ± 20.39	61.71 ± 30.97	82.10 ± 21.07	96.59 ± 16.46	84.88 ± 22.53
PC O-18:1_20:4	49.15	108.49 ± 28.15	108.13 ± 23.89	349.18 ± 42.37	128.25 ± 35.42	268.12 ± 22.07
PC O-34:1	37.57	111.26 ± 25.74	102.70 ± 20.05	357.21 ± 41.57	126.09 ± 13.35	261.77 ± 17.88
PC O-30:0	44.39	109.92 ± 32.18	94.10 ± 26.07	500.88 ± 48.67	124.01 ± 22.77	401.83 ± 18.79
PC O-34:0	39.60	98.72 ± 28.50	89.30 ± 24.97	989.38 ± 55.30	104.38 ± 27.88	673.20 ± 24.05
PC O-34:3	54.95	112.06 ± 30.99	94.14 ± 28.48	96.62 ± 26.41	144.82 ± 30.66	135.80 ± 19.46
PC O-36:1	50.59	100.87 ± 34.77	81.78 ± 23.04	80.68 ± 20.21	139.31 ± 25.09	131.04 ± 13.77
PC O-36:2	41.53	112.00 ± 29.53	102.40 ± 18.70	1550.42 ± 52.11	130.52 ± 19.98	998.11 ± 25.07
PC O-36:3	55.81	117.10 ± 33.85	106.09 ± 30.33	2891.89 ± 57.92	137.88 ± 28.31	1686.80 ± 23.84
PE 32:1	55.59	113.98 ± 38.92	86.67 ± 39.38	69.68 ± 26.40	150.87 ± 28.95	117.93 ± 14.15
PE 32:2	66.36	113.93 ± 40.94	80.54 ± 45.27	60.35 ± 35.58	161.21 ± 31.95	119.37 ± 20.56
PE 34:1	45.80	111.00 ± 38.28	99.32 ± 31.09	87.86 ± 19.41	142.11 ± 23.08	118.39 ± 10.58
PE 34:2	60.53	110.47 ± 39.70	86.88 ± 37.35	82.88 ± 29.58	156.32 ± 30.37	131.13 ± 16.27
PE 34:3	63.93	117.39 ± 38.30	82.33 ± 40.47	69.69 ± 39.04	164.13 ± 32.03	129.56 ± 22.36
PE 36:2	58.43	107.85 ± 43.28	86.58 ± 31.96	94.03 ± 24.37	157.56 ± 28.89	141.21 ± 14.23

## Rel. Peakflächen in Pfoten-Homogenaten (rel. zu Ct r ± RSD [%])

	RSD Ct r	Ct l	Zym l	Zym r	LPS l	LPS r
PE 36:3	60.98	108.95 ± 40.69	90.43 ± 37.93	97.51 ± 31.85	165.47 ± 33.32	145.74 ± 22.86
PE 36:4	53.07	106.67 ± 43.02	104.93 ± 36.05	95.57 ± 20.09	145.97 ± 26.44	121.84 ± 10.73
PE 38:2	64.19	101.74 ± 44.77	83.45 ± 34.09	90.13 ± 27.05	153.29 ± 35.43	134.47 ± 14.87
PE 38:4	53.99	101.84 ± 41.23	101.26 ± 33.29	103.88 ± 24.19	140.26 ± 29.02	124.69 ± 15.91
PE O-16:1_18:2	51.20	111.85 ± 39.42	95.43 ± 32.58	173.40 ± 32.85	138.69 ± 25.20	166.18 ± 16.07
PGE2*	44.82	115.57 ± 41.09	70.36 ± 21.44	55.10 ± 49.50	37.11 ± 45.43	61.00 ± 71.20
PI 36:1	57.55	112.51 ± 46.49	83.25 ± 32.92	115.15 ± 21.84	145.75 ± 29.86	160.20 ± 23.42
PI 36:3	37.45	108.12 ± 25.25	84.40 ± 29.93	168.50 ± 30.37	115.12 ± 31.59	171.45 ± 16.35
PI 38:5	34.89	106.79 ± 29.86	110.80 ± 28.66	98.61 ± 24.20	69.05 ± 22.43	71.35 ± 10.22
SE 27:1/16:1	48.07	117.20 ± 44.38	79.80 ± 39.70	185.36 ± 43.82	157.16 ± 16.54	254.54 ± 27.38
SE 27:1/18:1	46.16	113.44 ± 35.42	82.64 ± 34.52	328.80 ± 46.50	167.51 ± 25.64	361.48 ± 38.68
SE 27:1/18:2	66.37	109.48 ± 52.15	96.46 ± 38.58	1056.36 ± 62.76	144.46 ± 46.32	724.86 ± 32.47
SE 27:1/20:0	47.72	114.30 ± 59.06	78.94 ± 33.76	82.10 ± 24.38	143.90 ± 18.52	125.87 ± 18.27
SE 27:1/20:1	46.98	116.93 ± 49.00	79.04 ± 42.82	98.76 ± 29.35	154.02 ± 14.54	146.40 ± 16.27
SE 27:1/20:2	78.29	112.40 ± 83.34	113.21 ± 41.60	196.18 ± 52.41	136.25 ± 46.70	171.11 ± 55.00
SE 27:1/20:3	50.53	115.99 ± 30.58	92.44 ± 31.58	573.29 ± 53.80	155.45 ± 28.21	555.36 ± 43.39
SE 27:1/20:4	73.09	105.68 ± 59.03	105.90 ± 45.99	1171.32 ± 65.27	153.83 ± 53.30	845.44 ± 42.02
SE 27:1/24:1	38.22	117.18 ± 33.86	86.61 ± 43.91	98.24 ± 31.86	142.29 ± 20.00	129.54 ± 21.43
SM 33:1	63.14	113.94 ± 43.39	92.55 ± 30.81	99.22 ± 27.36	163.86 ± 32.31	142.71 ± 14.04
SM 34:1	59.04	110.14 ± 43.51	101.97 ± 36.96	144.30 ± 31.72	148.78 ± 28.04	156.79 ± 14.23
SM 34:2	57.26	107.72 ± 45.38	107.17 ± 41.43	105.50 ± 26.48	141.68 ± 26.53	131.31 ± 12.39
SM 39:1	49.86	117.19 ± 36.80	102.39 ± 30.54	97.84 ± 26.24	164.98 ± 30.09	136.96 ± 14.62
SM 43:2	36.99	95.52 ± 38.84	95.49 ± 22.78	84.33 ± 18.99	112.37 ± 28.58	101.12 ± 26.58
ST 27:1_OH_S	57.94	103.24 ± 29.06	86.32 ± 39.17	96.36 ± 25.51	191.91 ± 50.91	138.30 ± 32.79
TG 44:2	81.61	134.49 ± 108.86	205.53 ± 79.55	100.38 ± 53.54	118.63 ± 39.01	77.52 ± 33.05
TG 46:1	62.12	120.05 ± 79.67	137.16 ± 58.15	87.52 ± 46.23	121.46 ± 49.71	82.84 ± 36.41
TG 46:2	81.17	124.79 ± 104.43	156.79 ± 70.23	77.97 ± 38.41	121.05 ± 53.67	79.49 ± 42.57
TG 46:3	81.74	127.47 ± 109.93	168.58 ± 71.75	81.82 ± 34.88	123.76 ± 52.46	80.44 ± 42.69
TG 48:1	63.56	117.58 ± 76.76	107.00 ± 49.01	69.99 ± 27.82	117.37 ± 56.81	88.40 ± 42.91
TG 48:2	76.20	119.18 ± 90.54	116.54 ± 54.72	62.63 ± 24.89	123.89 ± 68.15	85.59 ± 50.33
TG 48:3	84.87	123.10 ± 106.52	140.37 ± 65.77	65.21 ± 25.49	131.57 ± 72.03	85.21 ± 51.55
TG 48:4	87.50	127.09 ± 114.58	170.37 ± 69.81	77.01 ± 28.37	121.28 ± 57.55	76.98 ± 49.58
TG 50:1	68.10	119.59 ± 84.01	108.79 ± 47.93	76.82 ± 26.94	110.34 ± 48.96	94.03 ± 36.82
TG 50:2	74.06	118.24 ± 90.28	114.44 ± 52.32	65.99 ± 24.59	117.58 ± 61.55	87.77 ± 49.81
TG 50:3	79.19	118.41 ± 95.34	123.67 ± 55.75	61.88 ± 23.59	127.32 ± 72.47	86.53 ± 58.77
TG 51:1	36.94	116.16 ± 54.46	115.18 ± 32.18	106.66 ± 28.59	115.93 ± 44.31	97.60 ± 27.89
TG 51:2	61.25	115.57 ± 69.66	131.23 ± 44.47	89.86 ± 16.62	131.05 ± 49.34	99.79 ± 42.17
TG 51:3	69.91	120.69 ± 86.53	133.95 ± 50.87	77.14 ± 17.72	135.81 ± 57.69	99.13 ± 53.63
TG 51:4	73.80	113.95 ± 94.63	132.25 ± 53.89	66.20 ± 17.94	137.17 ± 65.05	92.05 ± 62.88
TG 52:1	65.69	117.75 ± 80.86	115.92 ± 43.91	109.79 ± 24.13	112.43 ± 40.50	106.38 ± 27.17
TG 52:2	73.00	120.60 ± 91.46	130.73 ± 52.87	85.95 ± 24.05	117.48 ± 48.96	96.29 ± 38.39

## Rel. Peakflächen in Pfoten-Homogenaten (rel. zu Ct r ± RSD [%])

	RSD Ct r	Ct l	Zym l	Zym r	LPS l	LPS r
<b>TG 52:3</b>	73.09	118.26 ± 89.94	135.07 ± 52.55	75.71 ± 22.26	122.29 ± 55.17	87.41 ± 51.44
<b>TG 53:3</b>	67.34	118.77 ± 83.34	145.32 ± 47.42	85.03 ± 18.69	127.45 ± 47.36	94.13 ± 45.46
<b>TG 54:1</b>	40.38	116.01 ± 56.03	131.16 ± 47.34	176.38 ± 32.57	119.45 ± 33.31	130.13 ± 26.30
<b>TG 54:2</b>	63.79	120.71 ± 78.38	137.88 ± 47.67	113.35 ± 21.47	122.06 ± 38.44	108.37 ± 27.88
<b>TG 54:4</b>	70.69	118.25 ± 88.12	155.31 ± 52.95	78.07 ± 21.17	124.65 ± 48.26	83.90 ± 50.76
<b>TG 54:5</b>	79.64	120.63 ± 101.70	152.63 ± 56.91	72.51 ± 17.30	122.98 ± 57.90	80.28 ± 58.14
<b>TG 56:4</b>	52.21	119.98 ± 79.44	168.94 ± 58.03	106.93 ± 16.71	125.57 ± 31.53	100.30 ± 29.15

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] N.G. Frangogiannis, Biomarkers: hopes and challenges in the path from discovery to clinical practice, *Transl Res* 159(4) (2012) 197-204.
- [2] F. Shashi Amur, BIOMARKER TERMINOLOGY: SPEAKING THE SAME LANGUAGE, (BIOMARKER QUALIFICATION PROGRAM EDUCATIONAL MODULE SERIES—MODULE 1) (2019).
- [3] F.-N.B.W. Group, BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource, Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US), Co-published by National Institutes of Health (US), Bethesda (MD) (2018).
- [4] V. Brower, Biomarkers: Portents of malignancy, *Nature* 471(7339) (2011) S19-21.
- [5] FDA, <https://www.fda.gov/drugs/cder-biomarker-qualification-program/about-biomarkers-and-qualification>, 2019. (Accessed 22.11.2019).
- [6] K.D. Cashman, E.G. van den Heuvel, R.J. Schoemaker, D.P. Preveraud, H.M. Macdonald, J. Arcot, 25-Hydroxyvitamin D as a Biomarker of Vitamin D Status and Its Modeling to Inform Strategies for Prevention of Vitamin D Deficiency within the Population, *Advances in nutrition* 8(6) (2017) 947-957.
- [7] P. Autier, Vitamin D status as a synthetic biomarker of health status, *Endocrine* 51(2) (2016) 201-202.
- [8] G.P. Moss, P.A.S. Smith, D. Tavernier, Glossary of class names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Recommendations 1995), *Pure and Applied Chemistry* 67(8-9) (1995) 1307-1375.
- [9] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J. Wakelam, E.A. Dennis, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *J Lipid Res* 50 Suppl (2009) S9-14.
- [10] O. Fiehn, Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes, *Plant molecular biology* 48(1-2) (2002) 155-71.
- [11] Á. López-López, Á. López-González, T.C. Barker-Tejeda, C. Barbas, A review of validated biomarkers obtained through metabolomics, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 18(6) (2018) 557-575.
- [12] M.M. Rinschen, J. Ivanisevic, M. Giera, G. Siuzdak, Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics, *Nature reviews. Molecular cell biology* 20(6) (2019) 353-367.
- [13] X. Han, R.W. Gross, Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics, *J Lipid Res* 44(6) (2003) 1071-9.
- [14] M.R. Wenk, The emerging field of lipidomics, *Nature reviews. Drug discovery* 4(7) (2005) 594-610.
- [15] T. Cajka, O. Fiehn, Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry, *Trends Analyt Chem* 61 (2014) 192-206.
- [16] [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Metabolomics\\_schema.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Metabolomics_schema.png),. (Accessed 19.11.2019).
- [17] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, Jr., R.C. Murphy, C.R. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E.A. Dennis, A comprehensive classification system for lipids, *J Lipid Res* 46(5) (2005) 839-61.
- [18] O. Quehenberger, A.M. Armando, A.H. Brown, S.B. Milne, D.S. Myers, A.H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K.N. Jones, S. Kelly, R.L. Shaner, C.M. Sullards, E. Wang, R.C. Murphy, R.M. Barkley, T.J. Leiker, C.R. Raetz, Z. Guan, G.M. Laird, D.A. Six, D.W. Russell, J.G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, E.A. Dennis, Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma, *J Lipid Res* 51(11) (2010) 3299-305.
- [19] M. Murakami, Lipid mediators in life science, *Experimental animals* 60(1) (2011) 7-20.
- [20] T. Shimizu, Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the

- regulation of immunity and inflammation, *Annual review of pharmacology and toxicology* 49 (2009) 123-50.
- [21] P.V. Escriba, Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine, *Trends in molecular medicine* 12(1) (2006) 34-43.
- [22] M.N. Barber, S. Risis, C. Yang, P.J. Meikle, M. Staples, M.A. Febbraio, C.R. Bruce, Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes, *PLoS One* 7(7) (2012) e41456.
- [23] S. Zhornitsky, K.A. McKay, L.M. Metz, C.E. Teunissen, M. Rangachari, Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes, *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 5 (2016) 53-65.
- [24] J. Lotsch, S. Schiffmann, K. Schmitz, R. Brunkhorst, F. Lerch, N. Ferreiros, S. Wicker, I. Tegeder, G. Geisslinger, A. Ultsch, Machine-learning based lipid mediator serum concentration patterns allow identification of multiple sclerosis patients with high accuracy, *Sci Rep* 8(1) (2018) 14884.
- [25] R. Izzo, M.M. Figliuzzi, G. Monteleone, Sphingosine-1-phosphate receptor: a novel therapeutic target in ulcerative colitis, *Expert Review of Clinical Immunology* 12(11) (2016) 1137-1139.
- [26] T. Kobayashi, S. Nishiumi, A. Ikeda, T. Yoshie, A. Sakai, A. Matsubara, Y. Izumi, H. Tsumura, M. Tsuda, H. Nishisaki, N. Hayashi, S. Kawano, Y. Fujiwara, H. Minami, T. Takenawa, T. Azuma, M. Yoshida, A Novel Serum Metabolomics-Based Diagnostic Approach to Pancreatic Cancer, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 22(4) (2013) 571-579.
- [27] T.A. Lydic, Y.H. Goo, Lipidomics unveils the complexity of the lipidome in metabolic diseases, *Clinical and translational medicine* 7(1) (2018) 4.
- [28] B. Jenkins, J.A. West, A. Koulman, A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic Acid (c15:0) and heptadecanoic Acid (c17:0) in health and disease, *Molecules* 20(2) (2015) 2425-44.
- [29] C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294(5548) (2001) 1871-5.
- [30] E.M. Smyth, T. Grosser, M. Wang, Y. Yu, G.A. FitzGerald, Prostanoids in health and disease, *J Lipid Res* 50 Suppl (2009) S423-8.
- [31] F. Sasaki, T. Yokomizo, The leukotriene receptors as therapeutic targets of inflammatory diseases, *International immunology* 31(9) (2019) 607-615.
- [32] G. Folco, G. Rossoni, C. Buccellati, F. Berti, J. Maclouf, A. Sala, Leukotrienes in cardiovascular diseases, *American journal of respiratory and critical care medicine* 161(2 Pt 2) (2000) S112-6.
- [33] C.N. Serhan, S. Yacoubian, R. Yang, Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators, *Annual review of pathology* 3 (2008) 279-312.
- [34] W. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R. Pertwee, L. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam, Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor, *Science* 258(5090) (1992) 1946-1949.
- [35] D.W. Foster, The role of the carnitine system in human metabolism, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1033 (2004) 1-16.
- [36] A. Spagnoli, U. Lucca, G. Menasce, L. Bandera, G. Cizza, G. Forloni, M. Tettamanti, L. Frattura, P. Tiraboschi, M. Comelli, Long-term acetyl-L-carnitine treatment in Alzheimer's disease, *Neurology* 41(11) (1991) 1726-1726.
- [37] L.L. Jones, D.A. McDonald, P.R. Borum, Acylcarnitines: role in brain, *Progress in lipid research* 49(1) (2010) 61-75.
- [38] M.G. Schooneman, F.M. Vaz, S.M. Houten, M.R. Soeters, Acylcarnitines: reflecting or inflicting insulin resistance?, *Diabetes* 62(1) (2013) 1-8.

## Literaturverzeichnis

---

- [39] L.L. Listenberger, X. Han, S.E. Lewis, S. Cases, R.V. Farese, Jr., D.S. Ory, J.E. Schaffer, Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6) (2003) 3077-82.
- [40] W.W. Christie, Plasma Lipoproteins, 2019. <https://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/lipoprot/index.htm>. (Accessed 20.01.2020).
- [41] K. Starowicz, B. Przewlocka, Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367(1607) (2012) 3286-99.
- [42] R. Cachope, Functional diversity on synaptic plasticity mediated by endocannabinoids, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367(1607) (2012) 3242-53.
- [43] A. Bilkei-Gorzo, The endocannabinoid system in normal and pathological brain ageing, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 367(1607) (2012) 3326-41.
- [44] S. Carrasco, I. Merida, Diacylglycerol, when simplicity becomes complex, *Trends Biochem Sci* 32(1) (2007) 27-36.
- [45] A.L. Henneberry, M.M. Wright, C.R. McMaster, The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of Fatty Acid and lipid head group specificity, *Molecular biology of the cell* 13(9) (2002) 3148-61.
- [46] A. Yamashita, Y. Hayashi, Y. Nemoto-Sasaki, M. Ito, S. Oka, T. Tanikawa, K. Waku, T. Sugiura, Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms, *Progress in lipid research* 53 (2014) 18-81.
- [47] T. Harayama, H. Riezman, Understanding the diversity of membrane lipid composition, *Nature reviews. Molecular cell biology* 19(5) (2018) 281-296.
- [48] J. Suzuki, D.P. Denning, E. Imanishi, H.R. Horvitz, S. Nagata, Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells, *Science* 341(6144) (2013) 403-6.
- [49] J.O. De Craene, D.L. Bertazzi, S. Bar, S. Friant, Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways, *Int J Mol Sci* 18(3) (2017).
- [50] J. Dudek, Role of Cardiolipin in Mitochondrial Signaling Pathways, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5(90) (2017).
- [51] P. Brites, H.R. Waterham, R.J. Wanders, Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease, *Biochim Biophys Acta* 1636(2-3) (2004) 219-31.
- [52] N.E. Braverman, A.B. Moser, Functions of plasmalogen lipids in health and disease, *Biochim Biophys Acta* 1822(9) (2012) 1442-52.
- [53] D. Hosford, P. Braquet, Platelet-Activating Factor (PAF), in: P.J. Delves (Ed.), *Encyclopedia of Immunology* (Second Edition), Elsevier, Oxford, 1998, pp. 1971-1973.
- [54] F. Paltauf, Ether lipids in biomembranes, *Chemistry and Physics of Lipids* 74(2) (1994) 101-139.
- [55] T.F. da Silva, J. Eira, A.T. Lopes, A.R. Malheiro, V. Sousa, A. Luoma, R.L. Avila, R.J. Wanders, W.W. Just, D.A. Kirschner, M.M. Sousa, P. Brites, Peripheral nervous system plasmalogens regulate Schwann cell differentiation and myelination, *The Journal of clinical investigation* 124(6) (2014) 2560-70.
- [56] L.J. Pike, X. Han, K.N. Chung, R.W. Gross, Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis, *Biochemistry* 41(6) (2002) 2075-88.
- [57] K. Tulodziecka, B.B. Diaz-Rohrer, M.M. Farley, R.B. Chan, G. Di Paolo, K.R. Levental, M.N. Waxham, I. Levental, Remodeling of the postsynaptic plasma membrane during neural development, *Molecular biology of the cell* 27(22) (2016) 3480-3489.



- [58] P.E. Glaser, R.W. Gross, Plasmenylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion, *Biochemistry* 33(19) (1994) 5805-12.
- [59] A. Brodde, A. Teigler, B. Brugger, W.D. Lehmann, F. Wieland, J. Berger, W.W. Just, Impaired neurotransmission in ether lipid-deficient nerve terminals, *Human molecular genetics* 21(12) (2012) 2713-24.
- [60] O. Skaff, D.I. Pattison, M.J. Davies, The vinyl ether linkages of plasmalogens are favored targets for myeloperoxidase-derived oxidants: a kinetic study, *Biochemistry* 47(31) (2008) 8237-45.
- [61] A.J. Kettle, C.C. Winterbourn, Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production, *Redox report : communications in free radical research* 3(1) (1997) 3-15.
- [62] A.K. Thukkani, F.F. Hsu, J.R. Crowley, R.B. Wysolmerski, C.J. Albert, D.A. Ford, Reactive chlorinating species produced during neutrophil activation target tissue plasmalogens: production of the chemoattractant, 2-chlorohexadecanal, *J Biol Chem* 277(6) (2002) 3842-9.
- [63] C.J. Albert, A.K. Thukkani, R.M. Heuertz, A. Slungaard, S.L. Hazen, D.A. Ford, Eosinophil peroxidase-derived reactive brominating species target the vinyl ether bond of plasmalogens generating a novel chemoattractant, alpha-bromo fatty aldehyde, *J Biol Chem* 278(11) (2003) 8942-50.
- [64] F. Facciotti, G.S. Ramanjaneyulu, M. Lepore, S. Sansano, M. Cavallari, M. Kistowska, S. Forss-Petter, G. Ni, A. Colone, A. Singhal, J. Berger, C. Xia, L. Mori, G. De Libero, Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus, *Nature immunology* 13(5) (2012) 474-80.
- [65] A. Broniec, R. Klosinski, A. Pawlak, M. Wrona-Krol, D. Thompson, T. Sarna, Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems, *Free radical biology & medicine* 50(7) (2011) 892-8.
- [66] A. Broniec, A. Zadlo, A. Pawlak, B. Fuchs, R. Klosinski, D. Thompson, T. Sarna, Interaction of plasmenylcholine with free radicals in selected model systems, *Free radical biology & medicine* 106 (2017) 368-378.
- [67] T. Tsukahara, R. Tsukahara, S. Yasuda, N. Makarova, W.J. Valentine, P. Allison, H. Yuan, D.L. Baker, Z. Li, R. Bittman, A. Parrill, G. Tigyi, Different residues mediate recognition of 1-O-oleyllysophosphatidic acid and rosiglitazone in the ligand binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *J Biol Chem* 281(6) (2006) 3398-407.
- [68] J.E. Jang, H.S. Park, H.J. Yoo, I.J. Baek, J.E. Yoon, M.S. Ko, A.R. Kim, H.S. Kim, H.S. Park, S.E. Lee, S.W. Kim, S.J. Kim, J. Leem, Y.M. Kang, M.K. Jung, C.G. Pack, C.J. Kim, C.O. Sung, I.K. Lee, J.Y. Park, J.C. Fernandez-Checa, E.H. Koh, K.U. Lee, Protective role of endogenous plasmalogens against hepatic steatosis and steatohepatitis in mice, *Hepatology* 66(2) (2017) 416-431.
- [69] P.L. Wood, V.A. Locke, P. Herling, A. Passaro, G.B. Vigna, S. Volpato, G. Valacchi, C. Cervellati, G. Zuliani, Targeted lipidomics distinguishes patient subgroups in mild cognitive impairment (MCI) and late onset Alzheimer's disease (LOAD), *BBA clinical* 5 (2016) 25-8.
- [70] C. Tessier, K. Sweers, A. Frajerman, H. Bergaoui, F. Ferreri, C. Delva, N. Lapidus, A. Lamaziere, J.P. Roiser, M. De Hert, P. Nuss, Membrane lipidomics in schizophrenia patients: a correlational study with clinical and cognitive manifestations, *Transl Psychiatry* 6(10) (2016) e906.
- [71] N. Fabelo, V. Martin, G. Santpere, R. Marin, L. Torrent, I. Ferrer, M. Diaz, Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease, *Molecular medicine* 17(9-10) (2011) 1107-18.
- [72] J. Graessler, D. Schwudke, P.E. Schwarz, R. Herzog, A. Shevchenko, S.R. Bornstein, Top-down lipidomics reveals ether lipid deficiency in blood plasma of hypertensive patients, *PLoS One* 4(7) (2009) e6261.
- [73] K.H. Pietilainen, T. Rog, T. Seppanen-Laakso, S. Virtue, P. Gopalacharyulu, J. Tang, S. Rodriguez-Cuenca, A. Maciejewski, J. Naukkarinen, A.L. Ruskeepaa, P.S. Niemela, L. Yetukuri, C.Y. Tan, V. Velagapudi, S. Castillo, H. Nygren, T. Hyotylainen, A. Rissanen, J. Kaprio, H. Yki-Jarvinen, I. Vattulainen, A. Vidal-Puig, M. Oresic, Association of lipidome remodeling in the adipocyte membrane with acquired obesity in humans, *PLoS*

biology 9(6) (2011).

[74] P. Puri, M.M. Wiest, O. Cheung, F. Mirshahi, C. Sargeant, H.K. Min, M.J. Contos, R.K. Sterling, M. Fuchs, H. Zhou, S.M. Watkins, A.J. Sanyal, The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 50(6) (2009) 1827-38.

[75] M. Oresic, S. Simell, M. Sysi-Aho, K. Nanto-Salonen, T. Seppanen-Laakso, V. Parikka, M. Katajamaa, A. Hekkala, I. Mattila, P. Keskinen, L. Yetukuri, A. Reinikainen, J. Lahde, T. Suortti, J. Hakalax, T. Simell, H. Hyoty, R. Veijola, J. Ilonen, R. Lahesmaa, M. Knip, O. Simell, Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes, *The Journal of experimental medicine* 205(13) (2008) 2975-84.

[76] X. Chen, H. Chen, M. Dai, J. Ai, Y. Li, B. Mahon, S. Dai, Y. Deng, Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions, *Oncotarget* 7(24) (2016) 36622-36631.

[77] J.M. Dean, I.J. Lodhi, Structural and functional roles of ether lipids, *Protein Cell* 9(2) (2018) 196-206.

[78] O.G. Mouritsen, M.J. Zuckermann, What's so special about cholesterol?, *Lipids* 39(11) (2004) 1101-13.

[79] J.W. Cornforth, G.D. Hunter, G. Popjak, Studies of cholesterol biosynthesis. II. Distribution of acetate carbon in the ring structure, *The Biochemical journal* 54(4) (1953) 597-601.

[80] S.T. Yang, A.J.B. Kreuzberger, J. Lee, V. Kiessling, L.K. Tamm, The role of cholesterol in membrane fusion, *Chem Phys Lipids* 199 (2016) 136-143.

[81] W.W. Christie, *Sterols: 1. Cholesterol and Cholesterol Esters*, 2019. <https://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/cholest/index.htm>. (Accessed 20.01.2020).

[82] C.C. Schwartz, J.M. VandenBroek, P.S. Cooper, Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans, *J Lipid Res* 45(9) (2004) 1594-607.

[83] J. Belkner, H. Stender, H. Kuhn, The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E, *J Biol Chem* 273(36) (1998) 23225-32.

[84] P.M. Hutchins, R.C. Murphy, Cholesteryl ester acyl oxidation and remodeling in murine macrophages: formation of oxidized phosphatidylcholine, *J Lipid Res* 53(8) (2012) 1588-97.

[85] M.S. Gibson, N. Domingues, O.V. Vieira, Lipid and Non-lipid Factors Affecting Macrophage Dysfunction and Inflammation in Atherosclerosis, *Front Physiol* 9 (2018) 654.

[86] A.R. Tall, L. Yvan-Charvet, Cholesterol, inflammation and innate immunity, *Nature reviews. Immunology* 15(2) (2015) 104-16.

[87] K.R. Feingold, C. Grunfeld, The effect of inflammation and infection on lipids and lipoproteins, *Endotext* [Internet], MDText. com, Inc.2019.

[88] A.H. Merrill, Jr., M.C. Sullards, Opinion article on lipidomics: Inherent challenges of lipidomic analysis of sphingolipids, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(8) (2017) 774-776.

[89] O. Cuvillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P.G. Vanek, O.A. Coso, S. Gutkind, S. Spiegel, Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate, *Nature* 381(6585) (1996) 800-3.

[90] A. Olivera, S. Spiegel, Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens, *Nature* 365(6446) (1993) 557-60.

[91] S. Spiegel, S. Milstien, The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity, *Nature reviews. Immunology* 11(6) (2011) 403-15.

[92] Y. Takuwa, W. Du, X. Qi, Y. Okamoto, N. Takuwa, K. Yoshioka, Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis, *World journal of biological chemistry* 1(10) (2010) 298-306.

- [93] M. Maceyka, K.B. Harikumar, S. Milstien, S. Spiegel, Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease, *Trends in cell biology* 22(1) (2012) 50-60.
- [94] R.N. Lemaitre, P.N. Jensen, A. Hoofnagle, B. McKnight, A.M. Fretts, I.B. King, D.S. Siscovick, B.M. Psaty, S.R. Heckbert, D. Mozaffarian, N. Sotoodehnia, Plasma Ceramides and Sphingomyelins in Relation to Heart Failure Risk, *Circulation: Heart Failure* 12(7) (2019) e005708.
- [95] J. Kurz, M.J. Parnham, G. Geisslinger, S. Schiffmann, Ceramides as Novel Disease Biomarkers, *Trends in molecular medicine* 25(1) (2019) 20-32.
- [96] N. Plotegher, L. Bubacco, E. Greggio, L. Civiero, Ceramides in Parkinson's Disease: From Recent Evidence to New Hypotheses, *Front Neurosci* 13 (2019) 330.
- [97] L. Růžička, Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene, *Pure and Applied Chemistry* 6(4) (1963) 493-524.
- [98] L. Katz, Polyketide diversity, in: W. Schönfeld, H.A. Kirst (Eds.), *Macrolide Antibiotics*, Birkhäuser Basel, Basel, 2002, pp. 157-175.
- [99] P. Caffrey, J.F. Aparicio, F. Malpartida, S.B. Zotchev, Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents, *Current topics in medicinal chemistry* 8(8) (2008) 639-53.
- [100] C.R. Raetz, T.A. Garrett, C.M. Reynolds, W.A. Shaw, J.D. Moore, D.C. Smith, Jr., A.A. Ribeiro, R.C. Murphy, R.J. Ulevitch, C. Fearn, D. Reichart, C.K. Glass, C. Benner, S. Subramaniam, R. Harkewicz, R.C. Bowers-Gentry, M.W. Buczynski, J.A. Cooper, R.A. Deems, E.A. Dennis, Kdo2-Lipid A of *Escherichia coli*, a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4, *J Lipid Res* 47(5) (2006) 1097-1111.
- [101] G. Liebisch, K. Ekroos, M. Hermansson, C.S. Ejsing, Reporting of lipidomics data should be standardized, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862(8) (2017) 747-751.
- [102] HMDB, metabocard for LysoPC(16:0/0). <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0010382>. (Accessed 21.11.2018).
- [103] B.L. Poad, H.T. Pham, M.C. Thomas, J.R. Nealon, J.L. Campbell, T.W. Mitchell, S.J. Blanksby, Ozone-induced dissociation on a modified tandem linear ion-trap: observations of different reactivity for isomeric lipids, *J Am Soc Mass Spectrom* 21(12) (2010) 1989-99.
- [104] A.T. Maccarone, J. Duldig, T.W. Mitchell, S.J. Blanksby, E. Duchoslav, J.L. Campbell, Characterization of acyl chain position in unsaturated phosphatidylcholines using differential mobility-mass spectrometry, *J Lipid Res* 55(8) (2014) 1668-77.
- [105] M. Groessl, S. Graf, R. Knochenmuss, High resolution ion mobility-mass spectrometry for separation and identification of isomeric lipids, *Analyst* 140(20) (2015) 6904-11.
- [106] L.M.L. Gateway, Structure Database (LMSD). <http://www.lipidmaps.org/data/structure/LMSDSearch.php?Mode=SetupTextOntologySearch>. (Accessed 10.02.2018).
- [107] Lipidomics Standards Initiative, In-source Fragmentation. <https://lipidomics-standards-initiative.org/resources/in-source-fragmentation>. (Accessed 01.10.2018).
- [108] E.L. Schymanski, H.P. Singer, J. Slobodnik, I.M. Ipolyi, P. Oswald, M. Krauss, T. Schulze, P. Haglund, T. Letzel, S. Grosse, N.S. Thomaidis, A. Bletsou, C. Zwiener, M. Ibanez, T. Portoles, R. de Boer, M.J. Reid, M. Onghena, U. Kunkel, W. Schulz, A. Guillon, N. Noyon, G. Leroy, P. Bados, S. Bogialli, D. Stipanicev, P. Rostkowski, J. Hollender, Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis, *Anal Bioanal Chem* 407(21) (2015) 6237-55.
- [109] Lipidomics Standards Initiative, Isobaric Overlap. <https://lipidomics-standards-initiative.org/resources/isobaric-overlap>. (Accessed 01.10.2018).
- [110] Lipidomics Standards Initiative, Isomeric Overlap. <https://lipidomics-standards->

## Literaturverzeichnis

---

initiative.org/resources/isomeric-overlap. (Accessed 01.10.2018).

[111] M.N. G. Rücker, G. G. Willems, Instrumentelle Pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysemethoden, 4 ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2007.

[112] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science* 50(24) (1995) 3869-3882.

[113] N. Haider, Trenn- und Analysemethoden organischer Arzneistoffe. <http://merian.pch.univie.ac.at/pch/lv/trenn/trenn.pdf>. (Accessed 16.10.2019).

[114] S.C. Moldoveanu, V. David, Chapter 4 - Basic Information Regarding the HPLC Techniques, in: S.C. Moldoveanu, V. David (Eds.), *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*, Elsevier, Boston, 2017, pp. 87-187.

[115] J.J. Kirkland, J.W. Henderson, J.J. DeStefano, M.A. van Straten, H.A. Claessens, Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 762(1-2) (1997) 97-112.

[116] A.M. Faria, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20 (2009) 1385-1398.

[117] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography A* 499 (1990) 177-196.

[118] F. Fei, D.M. Bowdish, B.E. McCarry, Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS, *Anal Bioanal Chem* 406(15) (2014) 3723-33.

[119] S. Wernisch, S. Pennathur, Evaluation of coverage, retention patterns, and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics, *Anal Bioanal Chem* 408(22) (2016) 6079-91.

[120] P.A. Vorkas, G. Isaac, M.A. Anwar, A.H. Davies, E.J. Want, J.K. Nicholson, E. Holmes, Untargeted UPLC-MS profiling pipeline to expand tissue metabolome coverage: application to cardiovascular disease, *Anal Chem* 87(8) (2015) 4184-93.

[121] B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, S. Sidamonidze, E. Kasashima, E. Yashima, Y. Okamoto, 3-Fluoro-, 3-chloro- and 3-bromo-5-methylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation, *Journal of Chromatography A* 787(1) (1997) 67-77.

[122] J.W. Dolan, Mobile-Phase Degassing: What, Why, and How, *LCGC North America* 32(7) (2014) 482-487.

[123] J.H. Gross, *Massenspektrometrie Ein Lehrbuch*, Springer Spektrum 2013.

[124] IUPAC: Isotopic Composition of the Elements 1997, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 217-235.

[125] D.F. Smith, D.C. Podgorski, R.P. Rodgers, G.T. Blakney, C.L. Hendrickson, 21 Tesla FT-ICR Mass Spectrometer for Ultrahigh-Resolution Analysis of Complex Organic Mixtures, *Analytical Chemistry* 90(3) (2018) 2041-2047.

[126] Fiehn Lab, Mass Resolution and Resolving Power 2016. <https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/seven-golden-rules/mass-resolution>. (Accessed 20.12.2019).

[127] Fiehn Lab, Accurate mass, 2016. <https://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/seven-golden-rules/accurate-mass>. (Accessed 20.12.2019).

[128] A.W. A. D. McNaught, IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"), 2nd ed ed., Blackwell Scientific Publications 1997.

- [129] T. Nohmi, J.B. Fenn, Electrospray mass spectrometry of poly(ethylene glycols) with molecular weights up to five million, *Journal of the American Chemical Society* 114(9) (1992) 3241-3246.
- [130] E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure, *Analytical Chemistry* 45(6) (1973) 936-943.
- [131] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78 (1987) 53-68.
- [132] M. Giera, *Clinical Metabolomics - Methods and Protocols*, Springer Protocols 2018.
- [133] J. Ladislav Wiza, Microchannel plate detectors, *Nuclear Instruments and Methods* 162(1-3) (1979) 587-601.
- [134] A. Boerboom, Array detection of mass spectra, a comparison with conventional detection methods, *Organic Mass Spectrometry* 26(11) (1991) 929-935.
- [135] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, Molecular Beams of Macroions, *The Journal of Chemical Physics* 49(5) (1968) 2240-2249.
- [136] Y.M.a.F. J., Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme, *J. Phys. Chem.* 88(20) (1984) 4451 - 4459.
- [137] D.C. Tafllin, T.L. Ward, E.J. Davis, Electrified droplet fission and the Rayleigh limit, *Langmuir* 5(2) (1989) 376-384.
- [138] P. Kebarle, U.H. Verkerk, Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now, *Mass Spectrom Rev* 28(6) (2009) 898-917.
- [139] S. Crotti, R. Seraglia, P. Traldi, Some thoughts on electrospray ionization mechanisms, *European journal of mass spectrometry* 17(2) (2011) 85-99.
- [140] B.A. Thomson, J.V. Iribarne, Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure, *The Journal of Chemical Physics* 71(11) (1979) 4451-4463.
- [141] W.C. Byrdwell, Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids, *Lipids* 36(4) (2001) 327-46.
- [142] A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion, Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 59(22) (1987) 2642-2646.
- [143] R.S. Ron Wehrens, *Metabolomics: Practical Guide to Design and Analysis*, 1st ed., CRC Press 2019.
- [144] A. Bruins, ESI source design and dynamic range considerations. In "Electrospray Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications" (RB Cole, ed.), Wiley & Sons, New York, 1997.
- [145] Sciex, DuoSpray Ion Source for TripleTOF Systems-Operator Guide, RUO-IDV-05-6149-A (2017).
- [146] N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom Rev* 20(6) (2001) 362-87.
- [147] W. Paul, *Electromagnetic Traps for Charged and Neutral Particles*, Nobel Lecture, 1989.
- [148] Auflösung eines Massenspektrometers, 2010. [http://www.vias.org/tmanalytik\\_germ/hl\\_ms\\_resolution.html](http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_resolution.html). (Accessed 21.12.2019).
- [149] T. Clausthal', *Quadrupol-Massenfilter*. <http://www.icp-ms.de/tech/quad.html>.
- [150] S.D. Fuerstenau, W.H. Benner, J.J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, G. Siuzdak, Mass Spectrometry of an Intact Virus, *Angewandte Chemie International Edition* 40(3) (2001) 541-544.

## Literaturverzeichnis

---

- [151] M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby, Perfect Timing: Time-of-flight Mass Spectrometry†, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(9) (1997) 951-962.
- [152] Sciex, TripleTOF 6600-Systemhandbuch, RUO-IDV-05-6854-DE-B (2018).
- [153] Thermo Scientific, Specifications of the Orbitrap Exploris 480 Mass Spectrometer, 2020. <https://planetorbitrap.com/orbitrap-exploris-480#tab:specifications>. (Accessed 13.01.2020).
- [154] J. Dojahn, New TripleTOF® 6600 and SWATH™(2.0 for next generation proteomics and quantitative biology, *EuPA Open Proteomics* 5 (2014) 43.
- [155] AB Sciex, MS/MSALLwith SWATH®AcquisitionComprehensive Quantificationwith Qualitative Confirmation using the TripleTOF®Systems, RUO-MKT-02-2878-A (2015).
- [156] AB Sciex, Improved Data Quality Using Variable Q1 Window Widths in SWATH®Acquisition, RUO-MKT-02-2879-B (2017).
- [157] Sciex, 2017. <https://sciex.com/community/support-community/faqs-and-discussions/tripletof-systems/support/how-does-automatic-calibration-work-on-the-tripletof-systems>. (Accessed 02.10.2019).
- [158] X. Han, R.W. Gross, Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples, *Mass Spectrom Rev* 24(3) (2005) 367-412.
- [159] D.V. Yaroshenko, L.A. Kartsova, Matrix effect and methods for its elimination in bioanalytical methods using chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Chemistry* 69(4) (2014) 311-317.
- [160] M. Lísa, E. Cífková, M. Holčapek, Lipidomic profiling of biological tissues using off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1218(31) (2011) 5146-5156.
- [161] H. Nie, R. Liu, Y. Yang, Y. Bai, Y. Guan, D. Qian, T. Wang, H. Liu, Lipid profiling of rat peritoneal surface layers by online normal- and reversed-phase 2D LC QToF-MS, *J Lipid Res* 51(9) (2010) 2833-44.
- [162] H. Tian, J. Xu, Y. Xu, Y. Guan, Multidimensional liquid chromatography system with an innovative solvent evaporation interface, *J Chromatogr A* 1137(1) (2006) 42-8.
- [163] T. Cajka, J.T. Smilowitz, O. Fiehn, Validating Quantitative Untargeted Lipidomics Across Nine Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry Platforms, *Anal Chem* 89(22) (2017) 12360-12368.
- [164] C.Z. Ulmer, R.E. Patterson, J.P. Koelmel, T.J. Garrett, R.A. Yost, A Robust Lipidomics Workflow for Mammalian Cells, Plasma, and Tissue Using Liquid-Chromatography High-Resolution Tandem Mass Spectrometry, *Methods Mol Biol* 1609 (2017) 91-106.
- [165] O.L. Knittelfelder, B.P. Weberhofer, T.O. Eichmann, S.D. Kohlwein, G.N. Rechberger, A versatile ultra-high performance LC-MS method for lipid profiling, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 951-952 (2014) 119-28.
- [166] T. Yamada, T. Uchikata, S. Sakamoto, Y. Yokoi, E. Fukusaki, T. Bamba, Development of a lipid profiling system using reverse-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry with rapid polarity switching and an automated lipid identification software, *J Chromatogr A* 1292 (2013) 211-8.
- [167] K. Ikeda, M. Mutoh, N. Teraoka, H. Nakanishi, K. Wakabayashi, R. Taguchi, Increase of oxidant-related triglycerides and phosphatidylcholines in serum and small intestinal mucosa during development of intestinal polyp formation in Min mice, *Cancer Sci* 102(1) (2011) 79-87.
- [168] M. Lisa, M. Holcapek, High-Throughput and Comprehensive Lipidomic Analysis Using Ultrahigh-Performance Supercritical Fluid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal Chem* 87(14) (2015) 7187-95.
- [169] L. Laboureur, M. Ollero, D. Touboul, Lipidomics by Supercritical Fluid Chromatography, *Int J Mol Sci* 16(6) (2015) 13868-84.

- [170] J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, J.F. Tranchant, E. Lesellier, Hyphenation of ultra high performance supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation high resolution mass spectrometry: Part 1. Study of the coupling parameters for the analysis of natural non-polar compounds, *J Chromatogr A* (2017).
- [171] AB Sciex, MarkerView™ 1.2.1 Software Reference Manual, (2010).
- [172] E. Gorrochategui, J. Jaumot, S. Lacorte, R. Tauler, Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: overview and workflow, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2016).
- [173] R. Stolt, R.J.O. Torgrip, J. Lindberg, L. Csenki, J. Kolmert, I. Schuppe-Koistinen, S.P. Jacobsson, Second-Order Peak Detection for Multicomponent High-Resolution LC/MS Data, *Analytical Chemistry* 78(4) (2006) 975-983.
- [174] C.A. Smith, E.J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, G. Siuzdak, XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification, *Analytical Chemistry* 78(3) (2006) 779-787.
- [175] R. Tautenhahn, G.J. Patti, D. Rinehart, G. Siuzdak, XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data, *Analytical chemistry* 84(11) (2012) 5035-5039.
- [176] C.A. Smith, G.O. Maille, E.J. Want, C. Qin, S.A. Trauger, T.R. Brandon, D.E. Custodio, R. Abagyan, G. Siuzdak, METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database, *Therapeutic Drug Monitoring* 27(6) (2005) 747-751.
- [177] M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E.A. Dennis, C.K. Glass, A.H. Merrill, Jr., R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, S. Subramaniam, LMSD: LIPID MAPS structure database, *Nucleic acids research* 35(Database issue) (2007) D527-D532.
- [178] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A. Marcu, A.C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, Z. Sayeeda, E. Lo, N. Assempour, M. Berjanskii, S. Singhal, D. Arndt, Y. Liang, H. Badran, J. Grant, A. Serra-Cayuela, Y. Liu, R. Mandal, V. Neveu, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, C. Manach, A. Scalbert, HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018, *Nucleic acids research* 46(D1) (2018) D608-D617.
- [179] B.M. Warrack, S. Hnatyshyn, K.-H. Ott, M.D. Reily, M. Sanders, H. Zhang, D.M. Drexler, Normalization strategies for metabolomic analysis of urine samples, *Journal of Chromatography B* 877(5) (2009) 547-552.
- [180] W.B. Dunn, D. Broadhurst, P. Begley, E. Zelena, S. Francis-McIntyre, N. Anderson, M. Brown, J.D. Knowles, A. Halsall, J.N. Haselden, A.W. Nicholls, I.D. Wilson, D.B. Kell, R. Goodacre, C. Human Serum Metabolome, Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Nat Protoc* 6(7) (2011) 1060-83.
- [181] R.A. van den Berg, H.C. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, M.J. van der Werf, Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data, *BMC Genomics* 7 (2006) 142.
- [182] W.A. Hemmerich, Daten transformieren, 2020. <https://statistikguru.de/spss/vorraussetzungen-ueberpruefen/daten-transformieren/bekannt-datentransformationen.html>. (Accessed 20.03.2020).
- [183] O.M. Khalheim, Scaling of analytical data, *Analytica Chimica Acta* 177 (1985) 71-79.
- [184] A.K. Smilde, M.J. van der Werf, S. Bijlsma, B.J.C. van der Werff-van der Vat, R.H. Jellema, Fusion of Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data, *Analytical Chemistry* 77(20) (2005) 6729-6736.
- [185] E.M. Kasprzak, K.E. Lewis, Pareto analysis in multiobjective optimization using the collinearity theorem and scaling method, *Structural and Multidisciplinary Optimization* 22(3) (2014) 208-218.
- [186] B.P. Durbin, J.S. Hardin, D.M. Hawkins, D.M. Rocke, A variance-stabilizing transformation for gene-expression microarray data, *Bioinformatics* 18(suppl\_1) (2002) S105-S110.
- [187] F. US FDA UDoHaHS, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, USA, Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry, (2018).

## Literaturverzeichnis

---

- [188] S. Senn, N. Holford, H. Hockey, The ghosts of departed quantities: approaches to dealing with observations below the limit of quantitation, *Stat Med* 31(30) (2012) 4280-95.
- [189] M. Bergstrand, M.O. Karlsson, Handling data below the limit of quantification in mixed effect models, *AAPS J* 11(2) (2009) 371-80.
- [190] O. Harel, N. Perkins, E.F. Schisterman, The Use of Multiple Imputation for Data Subject to Limits of Detection, *Sri Lankan J Appl Stat* 5(4) (2014) 227-246.
- [191] W. Stacklies, H. Redestig, M. Scholz, D. Walther, J. Selbig, *pcaMethods*—a bioconductor package providing PCA methods for incomplete data, *Bioinformatics* 23(9) (2007) 1164-1167.
- [192] A. Alonso, S. Marsal, A. Julia, Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3 (2015) 23.
- [193] A. Victor, A. Elsässer, G. Hommel, M. Blettner, Judging a Plethora of p-Values, *Dtsch Arztebl International* 107(4) (2010) 50-6.
- [194] D.I. Broadhurst, D.B. Kell, Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments, *Metabolomics* 2(4) (2006) 171-196.
- [195] P. Fayers, Alphas, betas and skewy distributions: two ways of getting the wrong answer, *Advances in health sciences education : theory and practice* 16(3) (2011) 291-6.
- [196] C.A. Boneau, The effects of violations of assumptions underlying the test, *Psychol Bull* 57 (1960) 49-64.
- [197] R. Chin, B.Y. Lee, Chapter 15 - Analysis of Data, in: R. Chin, B.Y. Lee (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Trial Medicine*, Academic Press, New York, 2008, pp. 325-359.
- [198] D. Keller. <https://statistik-und-beratung.de/>. (Accessed 10.06.2017).
- [199] Student, The Probable Error of a Mean, *Biometrika* 6(1) (1908) 1-25.
- [200] N. Mohd Razali, B. Yap, Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests, *J. Stat. Model. Analytics* 2 (2011).
- [201] H. Ackermann, *Grundlagen der medizinischen Biometrie*, 7 ed., epsilon Verlag 2014.
- [202] <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35a.htm>. (Accessed 07.08.2019).
- [203] F. Wilcoxon, Individual Comparisons by Ranking Methods, *Biometrics Bulletin* 1(6) (1945) 80-83.
- [204] J. Hain. [https://www.uni-wuerzburg.de/fileadmin/10040800/user\\_upload/hain/SPSS/ANOVA.pdf](https://www.uni-wuerzburg.de/fileadmin/10040800/user_upload/hain/SPSS/ANOVA.pdf). (Accessed 05.08.2019).
- [205] R.G. O'Brien, M.K. Kaiser, MANOVA method for analyzing repeated measures designs: An extensive primer, *Psychological Bulletin* 97(2) (1985) 316-333.
- [206] M. Friedman, The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance, *Journal of the American Statistical Association* 32(200) (1937) 675-701.
- [207] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)* 57(1) (1995) 289-300.
- [208] T. Vargason, D.P. Howsmon, D.L. McGuinness, J. Hahn, On the Use of Multivariate Methods for Analysis of Data from Biological Networks, *Processes* 5(3) (2017).
- [209] H.G. Gika, G.A. Theodoridis, J.E. Wingate, I.D. Wilson, Within-day reproducibility of an HPLC-MS-based method for metabolomic analysis: application to human urine, *J Proteome Res* 6(8) (2007) 3291-303.
- [210] J. Subramanian, R. Simon, Overfitting in prediction models - is it a problem only in high dimensions?, *Contemporary clinical trials* 36(2) (2013) 636-41.



- [211] IBM, What is big data analytics?, 2020. <https://www.ibm.com/analytics/hadoop/big-data-analytics>. (Accessed 03.02.2020).
- [212] Big Data Framework, The 4 Characteristics of Big Data, 2020. <https://www.bigdataframework.org/four-vs-of-big-data/>. (Accessed 03.02.2020).
- [213] B. Gemeinholzer, J. Nieschulze, A. Tauch, A. Goesmann, Big Data in der Biologie: kein Problem mehr!, *Biologie in unserer Zeit* 49(1) (2019) 58-67.
- [214] F. Razavi, M.J. Tarokh, M. Alborzi, An intelligent Alzheimer's disease diagnosis method using unsupervised feature learning, *Journal of Big Data* 6(1) (2019).
- [215] S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58(2) (2001) 109-130.
- [216] MKS Umetrics, User Guide to SIMCA Version 13, 2012.
- [217] J.A. Westerhuis, H.C.J. Hoefsloot, S. Smit, D.J. Vis, A.K. Smilde, E.J.J. van Velzen, J.P.M. van Duijnhoven, F.A. van Dorsten, Assessment of PLSDA cross validation, *Metabolomics* 4(1) (2008) 81-89.
- [218] J. Trygg, S. Wold, Orthogonal projections to latent structures (O-PLS), *Journal of Chemometrics* 16(3) (2002) 119-128.
- [219] H.S. Tapp, E.K. Kemsley, Notes on the practical utility of OPLS, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(11) (2009) 1322-1327.
- [220] R.A. Johanson, R. Buccafusca, J.N. Quong, M.A. Shaw, G.T. Berry, Phosphatidylcholine removal from brain lipid extracts expands lipid detection and enhances phosphoinositide quantification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, *Anal Biochem* 362(2) (2007) 155-67.
- [221] J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley, A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES, *Journal of Biological Chemistry* 226(1) (1957) 497-509.
- [222] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8) 911-917.
- [223] V. Matyash, G. Liebisch, T.V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke, Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics, *J Lipid Res* 49(5) (2008) 1137-46.
- [224] A. Spielmeyer, J. Ahlborn, G. Hamscher, Simultaneous determination of 14 sulfonamides and tetracyclines in biogas plants by liquid-liquid-extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 406(11) (2014) 2513-24.
- [225] M. Pulfer, R.C. Murphy, Electrospray mass spectrometry of phospholipids, *Mass Spectrom Rev* 22(5) (2003) 332-64.
- [226] A.M. De Livera, M. Sysi-Aho, L. Jacob, J.A. Gagnon-Bartsch, S. Castillo, J.A. Simpson, T.P. Speed, Statistical methods for handling unwanted variation in metabolomics data, *Anal Chem* 87(7) (2015) 3606-15.
- [227] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72(1) (1976) 248-254.
- [228] L. Beretta, A. Santaniello, Nearest neighbor imputation algorithms: a critical evaluation, *BMC Med Inform Decis Mak* 16 Suppl 3(Suppl 3) (2016) 74-74.
- [229] G. King, J. Honaker, A. Joseph, K. Scheve, Analyzing Incomplete Political Science Data: An Alternative Algorithm for Multiple Imputation, *American Political Science Review* 95 (2001) 49-69.
- [230] J. Honaker, G. King, M. Blackwell, Amelia II: A Program for Missing Data, *Journal of Statistical Software* 45(7) (2011) 1-47.

## Literaturverzeichnis

---

- [231] J. Chong, D.S. Wishart, J. Xia, Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis, *Current Protocols in Bioinformatics* 68(1) (2019) e86.
- [232] EMA/CHMP/EWP/192217, Guideline on bioanalytical method validation, 2009 Rev. 1 Corr. 2 (2009).
- [233] H. Hovind, B. Magnusson, M. Krysell, U. Lund, I. Makinen, Internal Quality Control – Handbook for Chemical Laboratories, 4 ed., Nordic Innovation 2011.
- [234] V.V. Hernandez, C. Barbas, D. Dudzik, A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies, *Electrophoresis* 38(18) (2017) 2232-2241.
- [235] K.R. Patil, U.B. Mahajan, B.S. Unger, S.N. Goyal, S. Belemkar, S.J. Surana, S. Ojha, C.R. Patil, Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals, *Int J Mol Sci* 20(18) (2019).
- [236] A. Reis, A. Rudnitskaya, G.J. Blackburn, N. Mohd Fauzi, A.R. Pitt, C.M. Spickett, A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL, *J Lipid Res* 54(7) (2013) 1812-24.
- [237] A. Gil, W. Zhang, J.C. Wolters, H. Permentier, T. Boer, P. Horvatovich, M.R. Heiner-Fokkema, D.J. Reijngoud, R. Bischoff, One- vs two-phase extraction: re-evaluation of sample preparation procedures for untargeted lipidomics in plasma samples, *Anal Bioanal Chem* 410(23) (2018) 5859-5870.
- [238] C.Z. Ulmer, C.M. Jones, R.A. Yost, T.J. Garrett, J.A. Bowden, Optimization of Folch, Bligh-Dyer, and Matyash sample-to-extraction solvent ratios for human plasma-based lipidomics studies, *Anal Chim Acta* 1037 (2018) 351-357.
- [239] R.E. Patterson, A.J. Ducrocq, D.J. McDougall, T.J. Garrett, R.A. Yost, Comparison of blood plasma sample preparation methods for combined LC-MS lipidomics and metabolomics, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1002 (2015) 260-6.
- [240] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 1357 (2014) 36-52.
- [241] T. Cajka, O. Fiehn, Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics, *Anal Chem* 88(1) (2016) 524-45.
- [242] C.G. Juo, C.L. Chen, S.T. Lin, S.H. Fu, Y.T. Chen, Y.S. Chang, J.S. Yu, Mass accuracy improvement of reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry based urinary metabolomic analysis by post-run calibration using sodium formate cluster ions, *Rapid Commun Mass Spectrom* 28(16) (2014) 1813-20.
- [243] J. Chong, O. Soufan, C. Li, I. Caraus, S. Li, G. Bourque, D.S. Wishart, J. Xia, MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis, *Nucleic Acids Research* 46(W1) (2018) W486-W494.
- [244] A.J. Hackstadt, A.M. Hess, Filtering for increased power for microarray data analysis, *BMC bioinformatics* 10 (2009) 11.
- [245] S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures, *Journal of Chromatography A* 1058(1) (2004) 61-66.
- [246] M. Rabionet, A. Bayerle, C. Marsching, R. Jennemann, H.J. Grone, Y. Yildiz, D. Wachten, W. Shaw, J.A. Shayman, R. Sandhoff, 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis, *J Lipid Res* 54(12) (2013) 3312-21.
- [247] B. Magnusson, T. Naykki, H. Hovind, M. Krysell, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty, NORDTEST report TR 537 (project 1589-02) (2012).
- [248] T. Barri, L.O. Dragsted, UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics: effect of experimental artefacts and anticoagulant, *Anal Chim Acta* 768 (2013) 118-28.
- [249] K.D. Collins, Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process, *Methods* 34(3) (2004) 300-311.

- [250] L.A. Ferreira, V.N. Uversky, B.Y. Zaslavsky, Effects of the Hofmeister series of sodium salts on the solvent properties of water, *Physical Chemistry Chemical Physics* 19(7) (2017) 5254-5261.
- [251] W. Roehrig, S. Achenbach, B. Deutsch, M. Pischetsrieder, Quantification of 24 circulating endocannabinoids, endocannabinoid-related compounds and their phospholipid precursors in human plasma by UHPLC-MS/MS, *Journal of Lipid Research* (2019).
- [252] B. Kamlage, S.G. Maldonado, B. Bethan, E. Peter, O. Schmitz, V. Liebenberg, P. Schatz, Quality markers addressing preanalytical variations of blood and plasma processing identified by broad and targeted metabolite profiling, *Clin Chem* 60(2) (2014) 399-412.
- [253] P. Yin, R. Lehmann, G. Xu, Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies, *Anal Bioanal Chem* 407(17) (2015) 4879-92.
- [254] J.M. Onorato, P. Shipkova, A. Minnich, A.F. Aubry, J. Easter, A. Tymiak, Challenges in accurate quantitation of lysophosphatidic acids in human biofluids, *J Lipid Res* 55(8) (2014) 1784-96.
- [255] R. Gurke, D. Thomas, Y. Schreiber, S.M.G. Schäfer, S.C. Fleck, G. Geisslinger, N. Ferreirós, Determination of endocannabinoids and endocannabinoid-like substances in human K3EDTA plasma – LC-MS/MS method validation and pre-analytical characteristics, *Talanta* (2019).
- [256] A. Kumari, Chapter 4 - Beta Oxidation of Fatty Acids, in: A. Kumari (Ed.), *Sweet Biochemistry*, Academic Press 2018, pp. 17-19.
- [257] H. Wang, J. Ye, Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology, *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 16(1) (2015) 47-54.
- [258] C.J. Albert, J.R. Crowley, F.F. Hsu, A.K. Thukkani, D.A. Ford, Reactive chlorinating species produced by myeloperoxidase target the vinyl ether bond of plasmalogens: identification of 2-chlorohexadecanal, *J Biol Chem* 276(26) (2001) 23733-41.
- [259] S. Wallner, G. Schmitz, Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species, *Chem Phys Lipids* 164(6) (2011) 573-89.
- [260] V. Kota, H. Hama, 2'-Hydroxy ceramide in membrane homeostasis and cell signaling, *Advances in biological regulation* 54 (2014) 223-30.
- [261] G.H. Norris, C.N. Blesso, Dietary and Endogenous Sphingolipid Metabolism in Chronic Inflammation, *Nutrients* 9(11) (2017).
- [262] R.B. Mueller, A. Sheriff, U.S. Gaip, S. Wesselborg, K. Lauber, Attraction of phagocytes by apoptotic cells is mediated by lysophosphatidylcholine, *Autoimmunity* 40(4) (2007) 342-4.
- [263] A.M. Barcia, H.W. Harris, Triglyceride-rich lipoproteins as agents of innate immunity, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 41 Suppl 7 (2005) S498-503.
- [264] B.J. Van Lenten, A.M. Fogelman, M.E. Haberland, P.A. Edwards, The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(8) (1986) 2704-8.
- [265] Y. Wu, Y. Fu, C. Rao, W. Li, Z. Liang, C. Zhou, P. Shen, P. Cheng, L. Zeng, D. Zhu, L. Zhao, P. Xie, Metabolomic analysis reveals metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the lipopolysaccharide-induced mouse model of depression, *Behavioural brain research* 308 (2016) 115-27.
- [266] B. Feng, S. Wu, F. Liu, Y. Gao, F. Dong, L. Wei, Metabonomic analysis of liver tissue from BALB/c mice with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute hepatic failure, *BMC gastroenterology* 13 (2013) 73.
- [267] C.A. Rouzer, P.T. Ivanova, M.O. Byrne, H.A. Brown, L.J. Marnett, Lipid profiling reveals glycerophospholipid remodeling in zymosan-stimulated macrophages, *Biochemistry* 46(20) (2007) 6026-42.
- [268] D. Balgoma, A.M. Astudillo, G. Perez-Chacon, O. Montero, M.A. Balboa, J. Balsinde, Markers of monocyte activation revealed by lipidomic profiling of arachidonic acid-containing phospholipids, *Journal of*

## Literaturverzeichnis

---

immunology 184(7) (2010) 3857-65.

[269] C. Guijas, M.A. Bermudez, C. Meana, A.M. Astudillo, L. Pereira, L. Fernandez-Caballero, M.A. Balboa, J. Balsinde, Neutral Lipids Are Not a Source of Arachidonic Acid for Lipid Mediator Signaling in Human Foamy Monocytes, *Cells* 8(8) (2019).

[270] E.N. Posokhova, O.M. Khoshchenko, M.I. Chasovskikh, E.N. Pivovarova, M.I. Dushkin, Lipid synthesis in macrophages during inflammation in vivo: effect of agonists of peroxisome proliferator activated receptors alpha and gamma and of retinoid X receptors, *Biochemistry. Biokhimiia* 73(3) (2008) 296-304.

[271] L. Gil-de-Gomez, A.M. Astudillo, P. Lebrero, M.A. Balboa, J. Balsinde, Essential Role for Ethanolamine Plasmalogen Hydrolysis in Bacterial Lipopolysaccharide Priming of Macrophages for Enhanced Arachidonic Acid Release, *Frontiers in immunology* 8 (2017) 1251.

[272] C.N. Serhan, Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology, *Nature* 510(7503) (2014) 92-101.

[273] S.M. Gerd Geissligner, Thomas Gudermann, Burkhard Hinz, Peter Ruth, Mutschler Arzneimittelwirkungen, 11 ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2020.

[274] S.A. Pahwa R, Jialal I, Chronic Inflammation, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/?report=classic>. (Accessed 22.01.2020).

[275] I. Willenberg, K. Rund, S. Rong, N. Shushakova, F. Gueler, N.H. Schebb, Characterization of changes in plasma and tissue oxylipin levels in LPS and CLP induced murine sepsis, *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 65(2) (2016) 133-42.

[276] M. Hennebelle, A.H. Metherel, A.P. Kitson, Y. Otoki, J. Yang, K.S.S. Lee, B.D. Hammock, R.P. Bazinet, A.Y. Taha, Brain oxylipin concentrations following hypercapnia/ischemia: effects of brain dissection and dissection time, *J Lipid Res* 60(3) (2019) 671-682.

[277] K.L. Green, Quantitative studies on the accumulation of serum albumin and erythrocytes in mouse paw oedema induced by bradykinin or thermal injury, *Br J Exp Pathol* 59(1) (1978) 38-47.

[278] E. Aschheim, Rate of Protein Extravasation in Inflammation, *The American journal of physiology* 206 (1964) 327-30.

[279] R. Brunkhorst, W. Pfeilschifter, S. Patyna, S. Buttner, T. Eckes, S. Trautmann, D. Thomas, J. Pfeilschifter, A. Koch, Preanalytical Biases in the Measurement of Human Blood Sphingolipids, *Int J Mol Sci* 19(5) (2018).

[280] P. Yin, A. Peter, H. Franken, X. Zhao, S.S. Neukamm, L. Rosenbaum, M. Lucio, A. Zell, H.U. Haring, G. Xu, R. Lehmann, Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood, *Clin Chem* 59(5) (2013) 833-45.

[281] J. Qin, G. Chai, J.M. Brewer, L.L. Lovelace, L. Lebioda, Fluoride inhibition of enolase: crystal structure and thermodynamics, *Biochemistry* 45(3) (2006) 793-800.

[282] D.T. Waugh, Fluoride Exposure Induces Inhibition of Sodium-and Potassium-Activated Adenosine Triphosphatase (Na(+), K(+)-ATPase) Enzyme Activity: Molecular Mechanisms and Implications for Public Health, *Int J Environ Res Public Health* 16(8) (2019).

[283] R.W. Dharmaratne, Exploring the role of excess fluoride in chronic kidney disease: A review, *Hum Exp Toxicol* (2018) 960327118814161.

[284] PubChem, Methyl tert-butyl ether. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-tert-butyl-ether>. (Accessed 05.02.2020).

[285] J. Sostare, R. Di Guida, J. Kirwan, K. Chalal, E. Palmer, W.B. Dunn, M.R. Viant, Comparison of modified Matyash method to conventional solvent systems for polar metabolite and lipid extractions, *Analytica Chimica Acta* (2018).

[286] PubChem, Chloroform. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloroform>. (Accessed

05.02.2020).

- [287] M.H. Sarafian, M. Gaudin, M.R. Lewis, F.P. Martin, E. Holmes, J.K. Nicholson, M.E. Dumas, Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal Chem* 86(12) (2014) 5766-74.
- [288] M. Jemal, Z. Ouyang, Y.-Q. Xia, Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance, usage of incurred sample and well thought-out chromatography, *Biomed Chromatogr* 24(1) (2010) 2-19.
- [289] S.H.P. Bettini, M.P.P. de Miranda Josefovich, P.A.R. Muñoz, C. Lotti, L.H.C. Mattoso, Effect of lubricant on mechanical and rheological properties of compatibilized PP/sawdust composites, *Carbohydrate Polymers* 94(2) (2013) 800-806.
- [290] Baerlocher, Baerlocher Additives -Metallic Stearates, 2017.
- [291] A. Pakiet, J. Kobiela, P. Stepnowski, T. Sledzinski, A. Mika, Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review, *Lipids Health Dis* 18(1) (2019) 29.
- [292] D. Ackerman, S. Tumanov, B. Qiu, E. Michalopoulou, M. Spata, A. Azzam, H. Xie, M.C. Simon, J.J. Kamphorst, Triglycerides Promote Lipid Homeostasis during Hypoxic Stress by Balancing Fatty Acid Saturation, *Cell Rep* 24(10) (2018) 2596-2605 e5.
- [293] Avanti Polar Lipids, Ionization Constants Of Phospholipids. <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/ionization-constants>. (Accessed 04.01.2020).
- [294] H. Ogiso, T. Suzuki, R. Taguchi, Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of phosphatidic acid and phosphatidylserine, *Anal Biochem* 375(1) (2008) 124-31.
- [295] E. Cifkova, R. Hajek, M. Lisa, M. Holcapek, Hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of (lyso)phosphatidic acids, (lyso)phosphatidylserines and other lipid classes, *J Chromatogr A* 1439 (2016) 65-73.
- [296] T. Zullig, M. Trotsmuller, H.C. Kofeler, Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer, *Anal Bioanal Chem* (2019).
- [297] M. Koivusalo, P. Haimi, L. Heikinheimo, R. Kostianen, P. Somerharju, Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response, *Journal of Lipid Research* 42(4) (2001) 663-672.
- [298] G.M. Mackay, L. Zheng, N.J. van den Broek, E. Gottlieb, Analysis of Cell Metabolism Using LC-MS and Isotope Tracers, *Methods in enzymology* 561 (2015) 171-96.
- [299] X. Zhu, Y. Chen, R. Subramanian, Comparison of information-dependent acquisition, SWATH, and MS(All) techniques in metabolite identification study employing ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal Chem* 86(2) (2014) 1202-9.
- [300] A. Leggett, C. Wang, D.W. Li, A. Somogyi, L. Bruschiweiler-Li, R. Bruschiweiler, Identification of Unknown Metabolomics Mixture Compounds by Combining NMR, MS, and Cheminformatics, *Methods in enzymology* 615 (2019) 407-422.
- [301] T. Jombart, S. Devillard, F. Balloux, Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations, *BMC genetics* 11 (2010) 94.
- [302] N. Brunkhorst-Kanaan, K. Klatt-Schreiner, J. Hackel, K. Schroter, S. Trautmann, L. Hahnefeld, S. Wicker, A. Reif, D. Thomas, G. Geisslinger, S. Kittel-Schneider, I. Tegeeder, Targeted lipidomics reveal derangement of ceramides in major depression and bipolar disorder, *Metabolism* 95 (2019) 65-76.
- [303] S. Bazarganipour, J. Hausmann, S. Oertel, K. El-Hindi, S. Brachtendorf, I. Blumenstein, A. Kubesch, K. Sprinzi, K. Birod, L. Hahnefeld, S. Trautmann, D. Thomas, E. Herrmann, G. Geisslinger, S. Schiffmann, S.

## Literaturverzeichnis

---

Grösch, The Lipid Status in Patients with Ulcerative Colitis: Sphingolipids are Disease-Dependent Regulated, *Journal of Clinical Medicine* 8(7) (2019) 971.

[304] K.A. Veselkov, L.K. Vingara, P. Masson, S.L. Robinette, E. Want, J.V. Li, R.H. Barton, C. Boursier-Neyret, B. Walther, T.M. Ebbels, I. Pelczer, E. Holmes, J.C. Lindon, J.K. Nicholson, Optimized preprocessing of ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry urinary metabolic profiles for improved information recovery, *Anal Chem* 83(15) (2011) 5864-72.

[305] M. Jacob, A.L. Lopata, M. Dasouki, A.M. Abdel Rahman, Metabolomics toward personalized medicine, *Mass Spectrom Rev* 38(3) (2019) 221-238.

[306] B.B. Misra, C.D. Langefeld, M. Olivier, L.A. Cox, Integrated Omics: Tools, Advances, and Future Approaches, *Journal of molecular endocrinology* (2018).

[307] G. W. Irvine, S. Nguyen, An overview of the “-omics” fields at the forefront of next-generation personalized medicine and fundamental systems biology studies, *Biomedical Genetics and Genomics* 4(2) (2019).

[308] FDA, About Biomarkers and Qualification, 2019. <https://www.fda.gov/drugs/cder-biomarker-qualification-program/about-biomarkers-and-qualification>. (Accessed 25.03.2020).