

Charakterisierung von Sulfolipiden aus Mikroalgen, grünem Blattgemüse und anderen Matrices

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

an der Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

aus dem Institut für Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Judith Fischer aus Holzminden

Hamburg, Oktober 2023

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2017 bis August 2020 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

Gutachter der Dissertation:	Prof. Dr. Sascha Rohn Prof. Dr. Agnes Weiß
Mitglieder der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Sebastian Wicha Prof. Dr. Volkmar Vill Prof. Dr. Sascha Rohn
Datum der Disputation:	09.02.2024
Datum der Druckfreigabe:	19.02.2024

We must have perseverance and above all confidence in ourselves.

Marie Curie

Danksagung

An dieser Stelle gilt es DANKE zu sagen.

Zunächst ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes. Danke, dass du es mir ermöglicht hast, in deinem Arbeitskreis mein eigenständiges Forschungsprojekt umzusetzen. Danke, für zahlreichen wissenschaftlichen Input, den ich in den drei Jahren erfahren durfte. Danke, aber auch für die Freiheit und das Vertrauen, selbstständig an meiner Forschung arbeiten zu dürfen. Abschließend noch ein großes Danke, für die Möglichkeit an diversen nationalen und internationalen Fachtagungen teilnehmen zu können.

Frau Prof. Dr. Agnes Weiß danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön geht an Michaela Schafberg, die mich in den Anfangsphasen mit wertvollem Wissen zum GC-MS versorgt hat und dafür den einen oder anderen Feierabend geopfert hat.

Ebenso möchte ich Mascha Treblin, Tobias Sitz, Julia Häberlein und Irena Kefer danken, die mich im Zuge ihrer Abschlussarbeiten tatkräftig unterstützt haben.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Kolleginnen und Kollegen aus dem AK Rohn und dem AK Fischer. Danke, dass die Zeit nie langweilig wurde. Insbesondere danke ich aber meinen AK Rohn Kollegen und Kolleginnen für die wunderbare Zeit im Labor, für wissenschaftlichen Austausch, aber auch die Zeit abseits davon, bei tollen AK Feiern, kulinarischen und musikalischen Events. Danke, dass ihr die Zeit der Promotion so besonders gemacht habt.

Ein ganz besonderes Danke geht an meine Bürokollegin Marie Oest für die tolle Zeit während der Promotion. Sehr gerne denke ich an unseren gemeinsamen Einzug im Büro zurück, an wissenschaftlichen Input, an das ein oder andere Feierabendbier und beste musikalische Unternehmung beim Arbeiten. Es war ganz wunderbar das Büro mit dir zu teilen.

Ein riesiges Dankeschön geht auch an meine Freunde und Freundinnen, die mich bereits durch das Studium und zum Teil auch durch die Promotion begleitet haben. Ganz besonders an Jenny Zehring und Mareike Krell. Danke für alles, ihr seid die Besten. Ich möchte keinen Tag unserer Freundschaft missen und hoffe, dass wir noch lange gemeinsam durch dick und dünn gehen.

Auch meinen Eltern möchte ich ein großes Dankeschön aussprechen. Sie haben mir nicht nur ständigen Rückhalt gegeben, sondern durch ihre finanzielle und moralische Unterstützung das Studium und damit auch diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Zu guter Letzt geht ein riesiges Dankeschön an meinen Mann Malte Fischer, der nie die Hoffnung verloren hat, dass ich diese Arbeit fertig stellen kann und werde. Danke für deinen Rückhalt und Motivation dran zu bleiben.

An dieser Stelle auch noch ein abschließendes Dankeschön an alle, die bereit waren einen kleinen oder großen Teil meiner Arbeit zu lesen und mich damit beim Abschluss meiner Dissertation unterstützt haben.

Veröffentlichungen

Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Fischer, J., Treblin, M., Sitz, T., Rohn, S., 2021. *Development of a targeted-HPLC-ESI-QqQ-MS/MS method for the quantification of sulfolipids from a cyanobacterium, selected leafy vegetables, and a microalgae specie.* Analytical and Bioanalytical Chemistry.

Sitz, T, Domey, H., Fischer, J., Rohn, S., 2021, *An alternative approach for the synthesis of sulfoquinovosyldiacylglycerol.* Molecules.

Morschheuser, L., Wessels, H., Pille, C., Fischer, J., Hünninger, T., Fischer, M., Paschke-Kratzin, A. and Rohn, S., 2016. *HPTLC-aptastaining – Innovative protein detection system for high-performance thin-layer chromatography.* Scientific Reports.

Vorträge

Fischer, J., Sitz, T., Treblin, M., Rohn, S. *Quantifizierung von Sulfolipiden in diversen marinen und pflanzlichen Organismen.* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (Pflanzliche Nahrungsmittel) e.V. (DGQ), 04. – 06.03.2020, Hohenheim.

Poster

Sitz T, Domey H, Fischer J., Rohn S *Darstellung von Referenzsubstanzen zur Entwicklung analytischer Methoden für die Charakterisierung und Quantifizierung von Sulfolipiden.* Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, 18.03.2021, online.

Fischer, J., Sitz, T., Treblin, M., I. Kefer, Rohn, S. *Korrelation zwischen dem Gehalt an den Chlorophyllen-a/b und dem Sulfolipidgehalt in verschiedenen Blattgemüsen.* Regionalverbandstagung Nord/Nordost (Lebensmittelchemische Gesellschaft), 16. – 17.03.2020, Berlin.

Fischer, J., Sitz, T., Treblin, M., Rohn, S. *Quantification of sulfolipids from different marine organisms.* Aquaculture Europe 2019, 07. – 10.10.2019, Berlin.

Fischer, J., Sitz, T., Treblin, M., Rohn, S. *Quantifizierung von Sulfolipiden in diversen pflanzlichen Matrices.* 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag (Lebensmittelchemische Gesellschaft), 16. – 18.09.2019, Dresden.

Fischer, J., Sitz, T., Treblin, M., Rohn, S. *Quantifizierung von Sulfolipiden in diversen marinen Organismen.* 12. Bundesalgenstammtisch, 11. – 12.09.2019, Kiel.

Fischer, J., Sitz, T., Treblin, M., Rohn, S. *Quantification of sulfolipids from different marine organisms.* 9th European Symposium on Plant Lipids, 07. – 10.07.2019, Marseille.

Fischer, J., Sitz, T., Treblin, M., Rohn, S. *Entwicklung einer multi targeted-HPLC-ESI-QqQ-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Sulfolipiden.* Regionalverbandstagung Nord (Lebensmittelchemische Gesellschaft), 25. – 26.03.2019, Hamburg.

Fischer, J., Treblin, M., Häberlein, J., Rohn, S. *Isolation and Characterization of Sulfolipids from Spirulina sp.* 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag (Lebensmittelchemische Gesellschaft), 17. – 19.09.2018, Berlin.

Fischer, J., Treblin, M., Häberlein, J., Rohn, S. *Isolation and Characterization of Sulfolipids from Spirulina sp.* 55. Wissenschaftlicher Kongress der DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung), 07. – 09.03.2018, Hohenheim.

Fischer, J., Teske, D., Treblin, M., Vollmer, M., Rohn, S. *Isolation and Characterization of Sulfolipids from Spirulina sp.* Alga Europe, 05. – 07.12.2017, Berlin.

Morschheuser, L., Wessels, H., Pille, C., Fischer, J., Hünninger, T., Kallinich, C., Fischer, M., Paschke-Kratzin, A., Rohn, S. *HPTLC-aptastaining – Innovative protein detection system for high-performance thin-layer chromatography.* 6th International Symposium for Thin Layer Chromatography, 05.-08.07.2017, Berlin.

Morschheuser, L., Wessels, H., Pille, C., Hünninger, T., Fischer, J., Fischer, M., Paschke-Kratzin, A., Rohn, S. *HPTLC-Aptastaining – Entwicklung einer innovativen aptamerbasierten Detektionsmethode von Proteinen nach HPTLC.* 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12. - 14.09.2016, Freising. [Abstract abgedruckt in: Tagungsband 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Freising, ISBN 978-3-936028-98-0 (2016), pp. 274 und Lebensmittelchemie 2017; 71: 109]

Morschheuser, L., Wessels, H., Fischer, J., Pille, C., Hünninger, T., Fischer, M., Paschke-Kratzin, A., Rohn, S. *HPTLC-aptastaining – Entwicklung einer neuartigen Detektion von Proteinen nach HPTLC.* 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2015, Karlsruhe. [Abstract abgedruckt in: Hartwig A, Bunzel M, Schneider R (eds.), Tagungsband 44. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Karlsruhe, ISBN 978-3-936028-93-5 (2015), pp. 172 und Lebensmittelchemie 2016; 70: 87/88]

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
Maßeinheiten und Größen.....	VIII
SI-Präfixe	VIII
I. Zusammenfassung	1
II. Summary	4
III. Einleitung.....	6
IV. Theoretischer Hintergrund.....	7
1 Algen	7
2 Cyanobakterien	9
3 Blattgemüse	11
4 Lipide der Thylakoid-Membran	12
5 Biochemie von SQDGs	13
5.1 Biosynthese.....	13
5.2 Chemische Eigenschaften und Bedeutung für die Pflanzenphysiologie	14
5.3 Ernährungsphysiologische Relevanz von Sulfolipiden	16
5.4 Pharmakologische Relevanz von Sulfolipiden	16
6 Überblick über die Methoden in der Lipidanalytik	17
6.1 Allgemein	17
6.2 Analytik von Sulfolipiden	18
V. Problemstellung und Zielsetzung	20
VI. Ergebnisse und Diskussion	22
7 Isolierung reiner SQDGs	22
7.1 Charakterisierung mittels Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization	26
7.2 Charakterisierung mittels GC-FID und GC-MS.....	30
7.3 Fazit der Isolierung reiner SQDG Standards	36
8 Analytik zur Quantifizierung von SQDGs.....	37
8.1 Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode.....	37
8.2 Festphasenextraktion	40
9 Entwicklung der LC-ESI-MS/MS-Methode.....	46
9.1 Entwicklung der MRM-Methode.....	46
9.2 Entwicklung der flüssigchromatographischen Methode.....	48

9.3	Methodenvalidierung	52
9.3.1	Linearität und linearer Arbeitsbereich.....	52
9.3.2	Präzision.....	53
9.3.3	Genauigkeit.....	55
9.3.4	Wiederfindung	55
9.3.5	Analytische Grenzwerte	56
9.4	Fazit der HPLC-ESI-MS/MS Methodenentwicklung.....	56
10	Entwicklung einer GC-EI-MS Methode	57
10.1	Entwicklung der gaschromatographischen Methode.....	57
10.1.1	Entwicklung einer GC-ESI-MS Methode mit herkömmlicher Kapillarsäule.....	57
10.1.2	Entwicklung einer GC-ESI-MS Methode mit HT-Säule.....	59
11	Untersuchung von Pflanzenmaterial.....	61
12	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	65
VII.	Experimenteller Teil	66
13	Chemikalien, Geräte, Materialien und Softwares.....	66
14	Probenmaterial.....	66
15	Isolierung reiner SQDGs	66
15.1	Extraktionsmethode.....	66
15.2	Reinigungsmethoden.....	67
15.3	Charakterisierung mittels HPTLC	69
15.4	Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS	70
15.5	Charakterisierung mittels GC-FID	70
15.6	Charakterisierung mittels GC-MS	71
16	Analytik von Sulfolipiden	72
16.1	Entwicklung der Extraktionsmethode	72
16.1.1	Flüssig-Fest-Extraktion.....	72
16.1.2	Festphasenextraktion.....	73
16.2	Entwicklung der MRM-Methode.....	73
16.3	Entwicklung der LC-ESI-MS/MS.....	77
17	Herstellung von Stammlösungen und Kalibrierlösungen	78
17.1	Verwendete Standardsubstanzen	78
17.2	Verwendete Vergleichssubstanzen	79
17.3	Stammlösungen	80

17.4	Externe Kalibrierung.....	80
17.5	MRM-Stammlösungen.....	80
18	Methodenvalidierung.....	80
18.1.1	Verfahrenskenndaten	81
18.2	Entwicklung der GC-MS Methode.....	86
18.2.1	Derivatisierungsmethoden	86
18.2.2	Entwicklung des gaschromatographischen Systems	87
19	Photometrische Chlorophyll-Bestimmung.....	90
VIII.	Literaturverzeichnis.....	91
IX.	Anhang	98
20	Ergebnisse und Messwerte	98
21	Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte sowie Software..	104
21.1	Chemikalien.....	104
21.2	KMR Stoffe	105
21.3	Zusammensetzung des Peptid-Standards.....	106
22	Probenmaterial	106
22.1	Analysenzertifikat des verwendeten <i>Spirulina</i> sp.-Pulvers.....	107
23	Verbrauchsmaterialien.....	108
24	Geräte- und Softwareverzeichnis.....	109
24.1	Softwareverzeichnis	110
X.	Eidesstattliche Versicherung.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AFA	<i>Aphanizomenon flosaquae var. flosaquae</i>
BHT	Butylhydroxytoluol
BMEL	Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft
bspw.	beispielsweise
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CE	<i>Collision Energy</i>
Chl.	Chlorophyll
CXP	<i>Collision Exit Potential</i>
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DGDG	Digalactosyldiglycerol
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
DHA	Dihydroxybenzoesäure
DMFA	Dimethylformamid (N, N-Dimethylformamid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	<i>Declustering Potential</i>
dw	Trockengewicht (engl. <i>dry weight</i>)
EI	Elektronenstoßionisation (engl. <i>Electron Impact Ionization</i>)
engl.	englisch
EP	<i>Entrance Potential</i>
ESI	Elektronensprayionisation (engl. <i>Electrospray Ionization</i>)
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i>)
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flammenionisationsdetektor
FSME	Fettsäuremethylester
GC	Gaschromatographie
GHS	Global harmonisiertes System (engl. <i>Globally Harmonized System</i>)
Glc	Glucose
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (engl. <i>high-performance thin-layer chromatography</i>)
HT	Hochtemperatur (engl. <i>high-temperature</i>)
i.D.	Innendurchmesser
i. d. Tr.	in der Trockenmasse
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KMR	karzinogen, keimzellmutagen, reproduktionstoxisch
lat.	lateinisch

LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>Liquid Chromatography</i>)
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MeOH	Methanol
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
mio	Million
MRM	engl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PG	Phosphoglycerid
Qal	<i>Qualifier</i>
Qnt	<i>Quantifier</i>
RP	Reverse Phase
rpm	<i>rounds per minute</i>
Rt	Retentionszeit
SI	Internationales Einheitensystem
sp.	species
SPE	Festphasenextraktion (engl. <i>solid phase extraction</i>)
SQ	Sulfoquinovose (6-Sulfoquinovose, 6-Deoxy-6-Sulfo-D-Glucopyranose)
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerid
SQMG	Sulfoquinovosylmonoacylglycerid
t-BME	2-Methoxy-2-methylpropan
TCM	Trichlormethan (Chloroform)
TIC	Totalionenstrom (engl. <i>total ion current</i>)
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TOF	<i>time of flight</i>
UDP	Uridindiphosphat
USD	amerikanische Dollar
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche(nd)
WFR	Wiederfindungsrate
XIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm (engl. <i>Extracted Ion Chromatogramm</i>)
z.B.	zum Beispiel

Maßeinheiten und Größen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
bar	Bar
c	Konzentration
counts	Zähleinheiten pro Zeitintervall
cps	Zähleinheiten pro Zeitintervall (engl. <i>Counts per Second</i>)
Da	Dalton
g	Gramm
g	Beschleunigung
h	Stunden
L	Liter
M	Mol pro Liter
m	Meter
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
min	Minute
mol	Mol
psi	engl. <i>Pound per Square Inch</i>
s	Sekunden
t	Zeit
u	Atomare Masseneinheit
V	Volt
v/v	Volumenprozent
λ	Wellenlänge

SI-Präfixe

Symbol	Name	Wert
G	Giga	10^9
M	Mega	10^6
k	Kilo	10^3
d	Dezi	10^{-1}
c	Zenti	10^{-2}
m	Milli	10^{-3}
μ	Mikro	10^{-6}
n	Nano	10^{-9}

I. Zusammenfassung

Sulfolipide, insbesondere Sulfoquinovosylmonoacylglycerole (SQMG) und Sulfoquinovosyldiacylglycerole (SQDG), stellen seit ihrer Entdeckung 1959 ein interessantes Forschungsgebiet der Lipidgruppe pflanzlicher Matrices dar. Sie setzen sich aus dem Glucose-Derivat Sulfoquinovose und einem Diacylglycerol zusammen. Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen SQDGs, die sich chemisch durch die verknüpften Diacylglycerole differenzieren lassen. Da sie eine große Relevanz für pharmakologische und ernährungsphysiologische sowie pflanzenphysiologische Fragestellungen besitzen, wurden seit ihrer Entdeckung eine Vielzahl an Methoden zur Charakterisierung entwickelt und veröffentlicht. Diese stoßen jedoch schnell an verschiedenen Parametern an ihre Grenzen. Häufig werden SQDGs nicht quantitativ isoliert oder es wird der Gehalt an verschiedenen SQDGs als Summenparameter oder semi-quantitativ bestimmt. Ein weiteres Problem für die Quantifizierung von SQDGs besteht darin, dass nur ein SQDG kommerziell als Standard erwerbbar ist. Auch deuterierte SQDGs für den Einsatz bei massenspektrometrischen Methoden sind nicht kommerziell erwerbbar. In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene Faktoren der SQDG-Analytik betrachtet, um eine leistungsstarke Methode zur weiteren Erforschung der SQDGs zu entwickeln. Im Laufe dieser Arbeit wurde daher zum einen zunächst die Isolation einzelner, reiner SQDG-Standards untersucht und zum anderen versucht eine leistungsstarke, quantitative Bestimmungsmethode zu entwickeln, mit welcher eine parallele Quantifizierung einzelner SQDGs möglich ist. Für die Entwicklung der Quantifizierungsmethode wurden sowohl flüssigchromatographische als auch gaschromatographische Trennmethode gekoppelt mit massenspektrometrischen Methoden in Betracht gezogen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene Extraktions- und Reinigungsschritte entwickelt, um SQDGs aus Pflanzenmaterial zu isolieren. Die Entwicklung des ersten Isolierungsschrittes erfolgte in Anlehnung an Folch et al. und die Abtrennung des Chlorophylls konnte mittels Festphasenextraktion (SPE) bzw. säulenchromatographisch erreicht werden. Aus den gewonnen Rohextrakten wurden anschließend SQDGs fraktioniert. Diese Fraktionierung wurde sowohl mittels händisch durchgeführter Säulenchromatographie als auch präparativer HPLC an octadecyliertem Kieselgel durchgeführt. Die Charakterisierung der SQDGs in den einzelnen Fraktionen erfolgte anschließend mittels *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* Massenspektrometrie (MADLI-TOF-MS), Gaschromatographie gekoppelt mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) sowie Gaschromatographie gekoppelt mit Elektronenstoßionisation-Massenspektrometrie (GC-EI-MS). Die Untersuchungen der Fraktionen mittels MALDI-TOF-MS legten zunächst zwar nahe, dass es gelungen war einzelne SQDGs zu isolieren. Jedoch zeigte sich bei weiterführender Charakterisierung mittels GC-EI-MS und GC-FID, dass es sich auch bei diesen Fraktionen nicht um reine SQDGs handelte und die Methodik nach MADLI-TOF-MS in diesem Fall nicht ausreichend genau war. Die Isolierung einzelner, reiner SQDGs ist damit in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen. Jedoch konnten die Erkenntnisse des ersten Teils dieser Arbeit für die weitere Methodenentwicklung dienen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung einer quantitativen Isolationsmethode und einer Quantifizierungsmethode, die zwischen den einzelnen SQDGs differenzieren kann. Zunächst bestand die Herausforderung darin eine Isolations- und Reinigungsmethode zu entwickeln, mit welcher SQDGs möglichst rein und quantitativ extrahiert werden können. Die erste Herausforderung dabei lag darin, dass die SQDGs in Pflanzen hauptsächlich gebunden in den Zellwänden der Chloroplasten vorliegen und sich daher die Frage stellte, ob ein Zellaufschluss notwendig ist oder eine reine Fest-Flüssig-Extraktion ausreicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein mechanischer Zellaufschluss die Gehalte an extrahierten SQDGs deutlich erhöht. Dadurch ist die entwickelte Extraktionsmethode zwar etwas aufwändiger als bei vergleichbaren Methoden, aber das Ergebnis ist dennoch überzeugend. Auch die hohe Wiederfindungsrate bestätigt, dass es sich trotz der aufwändigen Aufarbeitung um eine zuverlässige und leistungsstarke Methode zur Extraktion von SQDGs handelt. Die entwickelte Methode kann nun zur Isolierung von SQDGs aus pflanzlichen und aquatischen Matrices eingesetzt und als Grundlage für weitere Untersuchungen der SQDG-Zusammensetzung in pflanzlichen Materialien in verschiedensten Fragestellungen angewendet werden.

Der nächste Schritt der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer zuverlässigen Quantifizierungsmethode zur simultanen Bestimmung des Gehalts an verschiedenen einzelnen SQDGs. Dabei wurden sowohl die Flüssigchromatographie gekoppelt mit Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) als auch die GC-EI-MS Methodik betrachtet und auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht. Im Zuge der LC-ESI-MS/MS Methodik konnte durch die Variation verschiedener Chromatographiebedingungen eine leistungsstarke Methode zur Trennung und Quantifizierung verschiedener SQDGs entwickelt werden. Die chromatographische Trennung der SQDGs wurde an einer Umkehrphase (RP-C18-Phase) erreicht. Die Trennung erfolgte mittels Gradientenelution mit einem Acetonitril-Wasser-Ammoniumsulfat-Gemisch als mobile Phase. Die Identifikation der SQDGs erfolgt mittels *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Die Identifikation der SQDGs wurde so zum einen über die Retentionszeit und zum anderen durch spezifische Fragmente gesichert. Die Quantifizierung erfolgte über einen strukturähnlichen internen Standard. Die entwickelte Methode wurde abschließend nach Vorgaben der *Food and Drug Administration* (FDA) validiert und die Ergebnisse zeigen, dass es sich um eine zuverlässige und sichere Nachweis- sowie Quantifizierungsmethode handelt.

Die Entwicklung einer GC-EI-MS basierten Detektionsmethode wurde ebenfalls in Betracht gezogen. Der Vorteil einer Quantifizierungsmethode mittels GC-MS gegenüber der LC-MS liegt in der besseren chromatographischen Trennung strukturähnlicher Substanzen aufgrund der höheren Trennböden der GC-Säulen. Da es sich bei SQDGs allerdings um komplexe Strukturen mit hohem Siedepunkt handelt, war fraglich, ob diese Methodik sinnvoll eingesetzt werden kann. Zudem setzt eine Verwendung von herkömmlichen Säulen auf jeden Fall eine Derivatisierung voraus. Neuartige Hochtemperatur-Säulen werden jedoch zum Teil auch im Bereich von hochmolekularen Substanzen eingesetzt und stellen eine interessante Entwicklung im Bereich der Gaschromatographie dar.

Es wurden daher zum einen herkömmliche Säulen, als auch Hochtemperatur-Säulen (HT-Säulen, engl. *high-temperature*) bei der Methodenentwicklung untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die SQDGs sowohl mittels herkömmlichen als auch mittels HT-Säulen nur nach vorangegangener Derivatisierung chromatographisch trennen und detektieren lassen. Aufgrund dessen zeigt diese Arbeit, dass die entwickelte LC-ESI-MS/MS Methode für die Identifizierung und Quantifizierung von SQDGs weitaus leistungsstärker als eine GC-MS Methode ist.

Abschließend wurden mit der validierten LC-ESI-MS/MS Methode beispielhaft einige Realproben untersucht und der SQDG-Gehalt dieser Proben betrachtet. Es wurde festgestellt, dass der SQDG-Gehalt in aquatischen Organismen komplexer ist als in Kormophyten. Die vorliegende Studie kann jedoch noch nicht den Grund für die hohe SQDG-Vielfalt aufdecken, aber mit der entwickelten Quantifizierungsmethode bietet sie ein nützliches Instrument zur Beantwortung dieser und weiterer Fragen. Parallel zur SQDG-Quantifizierung in ausgewählten Organismen, wurden auch fünf Blattgemüse auf ihren SQDG-Gehalt in Verbindung des Chlorophyll-a/b-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse legen nahe, dass es eine positive Korrelation zwischen SQDG und Chlorophyll a/b gibt. Um diese ersten Ergebnisse zu verifizieren, sind weitere Untersuchungen eines größeren Probensets notwendig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Zuge dieser Arbeit die Entwicklung einer zuverlässigen und quantitativen Methode für die Isolierung von SQDGs aus aquatischen Mikroorganismen und ausgewählten Blattgemüsen, eine Reinigung mittels SPE und eine empfindliche LC-ESI-MS/MS-Methode für die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung verschiedener, intakter SQMGs und SQDGs vorgestellt werden konnte. Die Präzision und Genauigkeit dieser Methode zur Analyse von SQDGs aus gefriergetrockneten Cyanobakterien, Mikroalgen und Pflanzenmaterial wurde exemplarisch an unterschiedlichen Matrices erfolgreich demonstriert.

II. Summary

Sulfolipids, especially sulfoquinovosylmonoacylglycerole (SQMG) and sulfoquinovosyl-diacylglycerols (SQDG), have been an interesting area of research in the lipid group of plant matrices since their discovery in 1959. They are composed of the glucose derivative sulfoquinovose and a diacylglycerol. There are a large number of different SQDGs, which can be chemically differentiated by the linked diglycerols. Since they are highly relevant to pharmacological, nutritional, and plant physiological issues, a variety of characterization methods have been developed and published since their discovery. However, these quickly reach their limits at various parameters. Often SQDGs are not isolated quantitatively or the different SQDGs are determined as sum parameters or semi-quantitatively. Another problem with the quantification of SQDGs is that only one SQDG can be commercially acquired as a standard. Deuterated SQDGs for use in mass spectrometric methods are also not commercially available. Therefore, in the present work, various factors of SQDG analysis were considered. First, the isolation of single, pure SQDG-standards was investigated, and second, an attempt was made to develop a powerful, quantitative determination method with which quantification of individual SQDGs is possible. For the quantification method, both a HPLC-ESI-MS/MS and a HT-GC-EI-MS method were considered.

In the first part of the present work, different extraction and purification steps were first developed to isolate SQDGs from plant material. The development of the first isolation step was based on Folch et al. and the separation of chlorophyll could be achieved by SPE or column chromatography. SQDGs were then fractionated from the crude extracts obtained. This fractionation was performed by hand-held column chromatography and preparative HPLC on octadecylated silica gel. The characterization of the SQDGs in the individual fractions was then performed by MADLI-TOF-MS, GC-FID as well as GC-EI-MS. The investigations using MALDI-TOF-MS suggested that it was possible to isolate individual SQDGs. However, further characterization by GC-MS and GC-FID showed that these fractions were also not pure SQDGs and that the MADLI-TOF-MS methodology was not sufficiently accurate in this case. Thus, the isolation of single, pure SQDGs was not successful in the present work. However, the findings of the first part of this work could serve for further method development.

The second part of the work dealt with the development of a quantitative isolation method and a quantification method that can differentiate between the individual SQDGs. First, the challenge was to develop an isolation and purification method that could extract SQDGs as purely and quantitatively as possible. The first challenge was that SQDGs in plants are mainly bound in the cell walls of chloroplasts and therefore the question arose whether cell disruption is necessary or a pure solid-liquid extraction is sufficient. The results of this work show that mechanical cell disruption significantly increases the contents of extracted SQDGs. As a result, the developed extraction method is somewhat more laborious than other methods, but the result is still convincing. Also, the high recovery rate confirms that it is a reliable and powerful workup method despite the laborious workup. The developed method can now be used to isolate SQDGs from plant matrices and can be used as a basis for further studies of the biochemical mechanisms of SQDG formation under specific growth conditions.

The next step of the present work was to develop a reliable quantification method for simultaneous determination of the content of various individual SQDGs. Both LC-MS and GC-MS methodologies were considered and tested for their applicability. In the course of LC-ESI-MS/MS methodology, a powerful method for separation and quantification of different SQDGs was developed by varying different chromatography conditions. Chromatographic separation of SQDGs was achieved on an RP-C18 phase. Elution was performed by gradient separation through an acetonitrile-water-ammonium sulfate mixture as the mobile phase. The identification of the SQDGs was performed by MRM. The identification of the SQDGs was thus assured on the one hand by the retention time and on the other hand by specific fragments. The developed method was finally validated. The validation was carried out according to FDA specifications and the results show that it is a reliable and safe detection and quantification method.

The development of a GC-MS based detection method was also considered. The advantage of a quantification method using GC-MS over LC-MS is the better chromatographic separation of structure-like substances due to the higher separation grounds of the GC columns. However, since SQDGs are complex structures with a high boiling point, it was questionable whether this methodology could be usefully employed. Moreover, using conventional columns requires derivatization in any case. However, novel high-temperature columns are partly used in the field of high molecular weight substances and represent an interesting development in the field of gas chromatography. Therefore, conventional columns as well as high-temperature columns were tested during method development. The results of this work show that SQDGs can be chromatographically separated and detected by both conventional and high-temperature columns only after prior derivatization. Based on this, this work shows that the developed LC-ESI-MS/MS method is far more powerful for identification and quantification of SQDGs than a GC-MS method.

Finally, the validated LC-ESI-MS/MS method was used to examine some real samples as examples, and the SQDG content of these samples was considered. It was found that the SQDG content in aquatic organisms is more different than that in cormophytes. However, the present study cannot yet reveal the reason for the high SQDG diversity, but with the developed quantification method, it provides a useful tool to answer this and other questions.

In parallel with SQDG quantification in selected organisms, five leafy vegetables were also analyzed for their SQDG content in relation to chlorophyll a/b content. The results suggest that there is a positive correlation between SQDG and chlorophyll a/b. Further studies of a larger sample set are needed to verify these initial results.

In summary, this work presented the development of a reliable and quantitative method for the isolation of SQDGs from aquatic microorganisms and selected leafy vegetables, purification by SPE, and a sensitive LC-ESI-MS/MS method for the simultaneous identification and quantification of various intact SQMGs and SQDGs. The precision and accuracy of this method for analyzing SQDGs from freeze-dried cyanobacteria, microalgae, and plant material were successfully demonstrated using different matrices as examples.

III. Einleitung

Bei den 1959 von Benson et al. erstmals beschriebenen Sulfolipiden handelt es sich vor allem um SQMGs und SQDGs, welche sich aus dem Glucose-Derivat Sulfoquinovose und einem Monoacylglycerol (SQMG) oder einem Diacylglycerol (SQDGs) zusammensetzen. Diese weckten Anfang der 90iger Jahre das Interesse der pharmakologischen Forschung, nachdem sie 1989 vom *US National Cancer Institute* (Bethesda/MA) als potentiell antiviral wirkende Substanzen eingestuft wurden [1, 2]. Es folgten eine Vielzahl an pharmakologischen Wirkungsstudien und es wurden eine Reihe potentieller pharmakologischer Wirkungen nachgewiesen [3-6].

Erst im neuen Jahrtausend wurde auch die ernährungsphysiologische Sicht auf SQMGs und SQDGs in den Fokus gerückt. So stellte sich beispielsweise die Frage, ob auch negative Auswirkungen durch den Abbau des schwefelhaltigen Glucose-Derivats möglich sind. Ein Denkansatz wurde 2018 von Burrichter et al. geliefert, welche den anaeroben mikrobiellen Abbau von Sulfoquinovose unter Bildung von Schwefelwasserstoff nachgewiesen haben [7]. Schwefelwasserstoff wird schon seit langem mit menschlicher Gesundheit und Krankheit in Verbindung gebracht und die Auswirkungen auf den Intestinaltrakt diskutiert [8]. Da Sulfoquinovose und daraus abgeleitete SQDGs und SQMGs in nennenswerten Mengen in Pflanzen, Algen und Cyanobakterien vorkommen, können sie auch in der menschlichen Ernährung eine Rolle spielen und möglicherweise auch Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben.

In der westlichen Welt ist Essen heutzutage weit mehr als bloße Nahrungsaufnahme. Durch die Ernährung wird das Leben sowohl auf physischer, als auch auf psychischer, sozialer, politischer und kultureller Ebene beeinflusst. Daher ist es kaum verwunderlich, dass Ernährungstrends immer vielfältiger und wechselbarer werden. Zum einen steigt das Angebot an vegetarischen und veganen Ersatzprodukten in den letzten Jahren rasant, zum anderen gibt es gehäuft Modeerscheinungen wie *Superfoods*, Paleo-Ernährung oder die verstärkte Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln. Gleichzeitig scheint man sich aber auch auf traditionelle, lokale Produkte zurückzubedenken, wie etwa Brennnessel, Grünkohl, Blaubeeren, die von den Medien dann als „heimisches *Superfood*“ angepriesen werden. Der Einfluss von scheinbar wenig relevanten Minorkomponenten, wie SQDGs und SQMGs, kann durch immer neue Ernährungstrends zunehmen. Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist es daher von Interesse diese Minorkomponenten genauer zu betrachten.

Ebenso hat auch die Pharmabranche nach wie vor ein Interesse an SQDGs, da sowohl Viren als auch Bakterien eine zunehmend steigende Resistenz gegenüber bekannten Wirkstoffen aufweisen [9]. Daher wird die Suche nach alternativen Wirkstoffen vermehrt auch in den Industrieländern wieder verstärkt vorangetrieben.

SQMGs sowie SQDGs bieten daher sowohl aus pharmakologischer wie auch aus ernährungsphysiologischer Sichtweise einen interessanten und spannenden pflanzlichen Wirkstoff, den es weiterhin zu untersuchen gilt.

IV. Theoretischer Hintergrund

1 Algen

Der Begriff „Alge“ hat in der Botanik oder Mikrobiologie keine taxonomische Bedeutung, sondern wird im allgemeinen Sprachgebrauch für im Wasser lebende, Sauerstoff bildende, Photosynthese betreibende, autotrophe Organismen verwendet. Es kann sich dabei um einzellige Organismen, koloniale Verbände, filamentöse oder andere einfache Strukturen handeln. Algen stellen keine monophyletische Gruppe in der Biologie dar, da ihre Unterarten in diverse systematische Einheiten (Bacteria, Plantae, Chromista oder Protozoen) eingeordnet werden können [10]. Es gibt vermutlich mehr als 20000 verschiedene eukaryotische Arten, die sich in Grün-, Braun-, Rot- und Kieselalgen unterteilen lassen, wodurch Algen zu den artenreichsten Pflanzengruppen zählen. Schätzungen reichen von 30000 bis zu einer Million verschiedener Spezies [10]. Eukaryotische Algen kommen als Einzeller (Mikroalgen, bspw. *Chlorella* sp.) oder als Vielzeller mit Zellverbänden von bis zu 60 m (Makroalgen, bspw. *Laminaria* sp.) vor.

Die Bedeutung von Algen für die Industrie, im Speziellen auch die Lebensmittelindustrie, nimmt stetig zu. Die weltweite Produktion von marinen Pflanzen, hauptsächlich marine Makroalgen, erreichte 2017 32,9 Millionen Tonnen, von denen 31,8 Millionen Tonnen (96,6 %) in Aquakulturen gezüchtet und geerntet wurden. Der Umsatz betrug weltweit 11,8 Mio USD. Die größten Produzenten von maritimen Aquakulturen sind Asien (31,6 Mio t), gefolgt von Amerika (16866 t) und Afrika (136581 t) [11].

Die wirtschaftliche Verwendung von Algen ist sehr vielseitig. Seit einigen Jahren gibt es Ansätze zur Gewinnung von Biokraftstoff aus Algen. Dagegen sind für die Lebensmittelindustrie vor allem die Gewinnung von Alginaten und Agar von großer Bedeutung. Algen werden auch als Futtermittel sowie in der Kosmetik- und Pharmaindustrie eingesetzt [12, 13]. Neben diesen modernen Verwendungsmöglichkeiten für Algen spielen sie aus ernährungswissenschaftlicher Sicht überwiegend in asiatischen, afrikanischen und südamerikanischen Ländern eine wichtige Rolle. Die Verwendung ist dabei, vor allem im asiatischen Raum, sehr vielseitig. Die Genera *Acanthophora*, *Caulerpa*, *Codium*, *Enteromorpha*, *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Laminaria*, *Laurencia*, *Macrocytis*, *Monostroma*, *Porphyra*, *Ulva* und *Undaria* werden in China, Indonesien, Japan und anderen asiatischen Ländern als Salat, Suppe(-neinlage) oder auch im Curry verzehrt. Auch in europäischen Breiten kann der Einsatz von Algen in traditionellen Rezepten nachgewiesen werden. Beispielsweise wird in Wales das sogenannte *Laver Bread* (hauptsächlich) aus *Porphyra umbilicalis* hergestellt. Diese Alge wächst rund um die Westküste Großbritanniens und an der Ostküste Irlands. Auch in Deutschland werden mittlerweile Produkte aus Algen, wie Nori (*Porphyra*), Dulse (*Rhodymenia*, *Palmaria*), Kombu (*Saccharina*), Wakame (*Undaria*) oder auch Hiiiki (*Hizikia*) verwendet. Nichtsdestotrotz spielen Algen in Europa in der Ernährung immer noch eine untergeordnete Rolle.

Neben der traditionellen Verwendung von Algen in der menschlichen Ernährung, gibt es mittlerweile auch einige Algen und aus Algen hergestellte Nahrungsergänzungsmittel welche in der Europäischen Union als *Novel Food* zugelassen sind.

Bei den sogenannten *Novel Food* handelt es sich um Lebensmittel, die vor dem 15. Mai 1997 nicht in nennenswertem Umfang in der Europäischen Union für den menschlichen Verzehr verwendet wurden [14]. Um ein Lebensmittel als *Novel Food* in der Europäischen Union zu vermarkten, muss zunächst der Status des Lebensmittels geprüft werden. Handelt es sich um ein *Novel Food*, bedarf es einer Zulassung durch die Europäische Kommission und wird nach positiver Prüfung in die Unionsliste zugelassener neuartiger Lebensmittel aufgenommen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die zurzeit in der EU zugelassenen *Novel Foods* aus Algen oder Algenbestandteilen.

Tabelle 1: In der EU als *Novel Food* zugelassene Algen bzw. Algenprodukte (Verordnung (EU) 2015/2283).

Ursprungsorganismus	Zulassung als <i>Novel Food</i>
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin-reiche Oleoresine
<i>Ulkenia</i> sp.	Algen Öl
<i>Fucus vesiculosus</i>	Fucoidan Extrakt
<i>Undaria pinnatifida</i>	Fucoidan Extrakt
<i>Odontella aurita</i>	
<i>Schizochytrium</i> sp.	DHA- und EPA-reiches Öl
<i>Schizochytrium</i> sp. (ATCC PTA-9695)	Öl
<i>Schizochytrium</i> sp.	Öl
<i>Schizochytrium</i> sp. (T18)	Öl
<i>Tetraselmis chuii</i>	getrocknete Mikroalgen

Der wachsende Markt von *Novel Foods* oder ähnlichen Produkten wie Nahrungsergänzungsmitteln wird durch die verstärkte Nachfrage nach Lebensmitteln mit besonderen Eigenschaften ständig erweitert und Lebensmittel aus Algen oder Algenbestandteile werden in Zukunft auch in Europa immer gefragter sein.

Weiterhin gibt es auch in Deutschland Empfehlungen für spezielle Ernährungsgruppen, die den Verzehr von Algen raten. Beispielsweise wird gemäß der Position der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE) „Vegane Ernährung“ für Menschen, die sich vegan ernähren, empfohlen als Ergänzung zu herkömmlichen Lebensmitteln, mit Mikroalgenölen angereicherte Lebensmittel als Lieferant für langkettige n3-Fettsäuren zu verzehren. Ergänzend dazu wird empfohlen Nori-Algen für die Versorgung mit Vitamin B₁₂ und Iod zu verzehren [15].

2 Cyanobakterien

Bei Cyanobakterien handelt es sich um prokaryotische Mitglieder der Algen. Sie wurden früher aufgrund ihres Lebensraumes und äußeren Erscheinungsbildes fälschlicherweise auch als Blaualgen bezeichnet. Diese falsche Bezeichnung rührt daher, dass ihre Lebensräume meist im oder am Wasser liegen, sie so den eukaryotischen Algen gleichen, und die Färbung von Cyanobakterien meist blaugrün aufgrund in den Zellen gebildeter Phycocyanine ist. Es gibt jedoch auch einige Arten die Phycoerythrine (rotbraun) oder schwarzgrüne Farbkomplexe bilden. Mittlerweile werden sie aufgrund ihres prokaryotischen Zellwandaufbaus und der DNA-Zusammensetzung der mikrobiologischen Domäne der Bacteria zugeordnet. Cyanobakterien sind die einzige Bakteriengruppe, die oxygene Photosynthese betreibt und sie weisen eine große morphologische Diversität auf.

Wie auch bei den Algen haben Cyanobakterien eine große ernährungsphysiologische Bedeutung in asiatischen, afrikanischen und südamerikanischen Ländern. Jedoch nimmt die Bedeutung der Cyanobakterien als Lebensmittel oder Nahrungsergänzungsmittel auch in Europa immer mehr zu. Bereits 1974 wurde *Spirulina* sp. von der *United Nations World Food Conference* als möglicherweise bestes Lebensmittel der Zukunft eingestuft. Diese Aussage wurde begründet durch die hohe Dichte an Nährstoffen, der schnellen Wachstumsrate sowie der einfachen Kultivierung. Zudem überwiegt die Produktionsmasse je Fläche die meisten Getreidearten um ein Vielfaches. Darüber hinaus hat die Verwendung von *Spirulina* sp. in vielen Ländern eine lange Historie. Ein traditionell bedeutendes Produkt für die menschliche Ernährung ist beispielsweise „Dihé“ aus *Spirulina maxima*. Dieses ist ein aus getrockneten *S. maxima* hergestelltes Produkt, welches im Tschad hergestellt und als Würzmittel in einer Vielzahl an Nahrungsmitteln Verwendung findet [16]. Aus einer anderen Spirulina-Art (*S. platensis*) wurde schon von den Azteken um 1300 eine Art Kuchen (tecuitlatl) hergestellt und als Lebensmittel verzehrt [17]. Dieses wird auch heutzutage noch in Mexico als Nahrungsmittel verwendet.

Anders als bei der traditionellen Verwendung gelangen Cyanobakterien, wie auch die Algen, eher als Nahrungsergänzungsmittel auf den europäischen Markt. Dabei ist in Europa auch in diesem Fall zu klären, ob es sich bei der entsprechenden Cyanobakterien-Spezies oder daraus gewonnen Extrakten um ein *Novel Food* handelt. Zur Prüfung ob ein *Novel Food* vorliegt, wurden der EFSA bisher drei Cyanobakterien vorgelegt. Es handelt sich dabei um *Aphanizomenon flosaquae* var. *flosaquae* (AFA-Alge), *Arthrospira platensis*, *Spirulina* sp.. Diese wurden bereits vor 1992 in nennenswertem Umfang vom Menschen verzehrt, daher wurden diese nicht als neuartige Lebensmittel eingestuft und können auch ohne Zulassung als solches europaweit vertrieben werden. Diese Cyanobakterien werden in Europa als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben und mit einer Vielzahl an positiven Eigenschaften beworben, für deren Wirksamkeit es aber selten wissenschaftliche Belege gibt.

Tabelle 2 stellt einen beispielhaften Vergleich zweier Produkte aus Cyanobakterien dar. Dabei handelt es sich um ein klassisches Produkt aus AFA-Algen und eine moderne Kultivierungsform, die sogenannte „Golden Chlorella“.

Tabelle 2: Vergleichende Darstellung zweier europäischer Cyanobakterium-Produkte

	<i>Aphanizomenon flosaquae</i> var. <i>flosaquae</i> [g/100 g]	<i>Golden Chlorella</i> [g/100 g]
Produkt	<i>effective nature</i> AFA Algen Tabs	Algae Drink (goldene Chlorella)
Kosten	49,90 Euro/100 g	18,32 Euro/100 g
Energie (kcal)	349	606
Eiweiß	66	9
Kohlenhydrate	15,8	39
davon Zucker	-	5,5
Fett	1,3	46
davon gesättigte Fettsäuren	0,3	8,6
Ballaststoffe	-	24
Salz	0,8	1,4

In klassischen Produkten liegt der ernährungsphysiologische Mehrwert in der Verwendung von Cyanobakterien in ihrem hohen Proteingehalt (bis zu 78 % i. d. Tr.), dem Gehalt an gamma-Linolensäure, beta-Carotin und Chlorophyll. Die Bedeutung von neuen Züchtungsformen wie der *Golden Chlorella* liegen hingegen in anderen Bestandteilen, wie in diesem Beispiel in der Zusammensetzung der Lipidbestandteile. Diese Art von Cyanobakterien wird beispielsweise als Ei-Ersatz für vegane Produkte beworben.

Die Größe des globalen Spirulina-Markts belief sich 2018 auf 348 Millionen US-Dollar und wird bis 2026 voraussichtlich 779 Millionen US-Dollar erreichen. Die geschätzte jährliche Wachstumsrate beträgt dabei 10,5 % von 2019 bis 2026. Millionen von Menschen verzehren demnach mittlerweile diverse Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel aus Cyanobakterien, die in Algenfarmen kultiviert werden. *Spirulina* sp. sind dabei wirtschaftlich besonders interessant, da diese Spezies in der Lage ist, die vorhandene Biomasse alle zwei bis fünf Tage zu verdoppeln. Die jährliche Produktion für den menschlichen Verzehr liegt bei über 1000 Tonnen, wobei die USA der weltweite Hauptproduzent sind, gefolgt von Thailand, Indien, Japan und China.

3 Blattgemüse

In Europa hat aber für die gesunde Ernährung des Menschen nach wie vor das Gemüse sehr viel mehr Bedeutung als Lebensmittel aus Algen und Cyanobakterien. Gemüse wurde schon in frühesten Kulturen angebaut und diente der Ernährung von Menschen und Nutztieren. Das Wort Gemüse stammt von dem mittelhochdeutschen Begriff „Gímüs“ ab, womit ein Brei aus gekochten Nutzpflanzen bezeichnet wurde. Heute umfasst der Überbegriff Gemüse essbare Pflanzenteile krautiger, wildwachsender oder kultivierter, überwiegend einjähriger Pflanzen. Eine Einteilung von Gemüse kann nach Art des genutzten Pflanzenteils erfolgen. Hierbei kann zwischen Blattgemüse (Spinat, Kohl, Salat), Blütengemüse (Artischocke, Blumenkohl), Fruchtgemüse (Tomate, Paprika, Kürbis), Wurzelgemüse (Kartoffel, Rübe), Sprossengemüse (Spargel, Kohlrabi), Zwiebelgemüse (Zwiebel, Lauch, Knoblauch) oder Samengemüse (Erbsen, Bohnen) unterschieden werden. In dieser Arbeit wurde überwiegend mit Vertretern der Blattgemüse gearbeitet, da die SQDGs hauptsächlich in der Chloroplasten-Membran vorliegen und folglich überwiegend im Blattmaterial zu finden sind. Daher soll diese Nahrungsmittelgruppe im Folgenden näher betrachtet werden. Blattgemüse ist kein definierter Begriff der Botanik, sondern der Umgangssprache, der als Sammelbegriff für bestimmte Pflanzenarten verwendet wird. darunter werden vor allem Gemüse gezählt, bei denen die Blätter und/oder Stiele verzehrt werden können. Die größte und vielfältigste Gruppe innerhalb der Blattgemüse stellen die Salate dar, aber auch Kohlgemüse, wie Weißkohl, Rotkohl oder Grünkohl, sowie Mangold und Spinat, als Vertreter der Gänsefußgewächse werden zu den Blattgemüsen gezählt. Tabelle 3 stellt einen Überblick über verschiedene Vertreter von Blattgemüsen zusammen und zeigt, dass diese sich über verschiedene botanische Pflanzenfamilien erstrecken. Allen Blattgemüsen gemein ist ihr wichtiger Stellenwert für die menschliche Ernährung. Blattgemüse weisen in der Regel einen sehr geringen Kaloriengehalt auf und sind dagegen reich an wertvollen Inhaltsstoffen wie Vitaminen, Mineralstoffen, Ballaststoffen, Chlorophyllen sowie bioaktiven Verbindungen.

Tabelle 3: Übersicht über ausgewählte Vertreter der Blattgemüse-Sorten.

Blattgemüse	Botanische Familie	Lateinische Bezeichnung
Kopfsalat Radicchio Endivien Löwenzahn	Korbblütler	<i>Asteraceae/Compositae</i>
Feldsalat	Baldriangewächs	<i>Valerianoideae</i>
Mangold Spinat	Gänsefußgewächs	<i>Chenopodiaceae</i>
Wirsing Rotkohl	Kreuzblütler	<i>Brassicacea</i>

Einer Ernährungsstudie des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) zufolge, werden knapp 5,6 kg/Person und Jahr an Salat und 8 kg/Person und Jahr an Blattgemüse verzehrt. Darüber hinaus zeigte die Studie ein stetiges Wachstum im Konsum von Gemüse seit 1950 [18].

4 Lipide der Thylakoid-Membran

Bei der Pflanzenphysiologie handelt es sich um ein Teilgebiet der Botanik, welches sich mit Funktionsabläufen in der Pflanze beschäftigt. Es werden dabei vor allem physikalische und (bio)chemische Prozesse betrachtet und untersucht. Ein Teilgebiet der Pflanzenphysiologie ist die Stoffwechselphysiologie, welche sich mit Stoff- und Energiewechsel in Pflanzen beschäftigt. Einer der wichtigsten Stoffwechselfvorgänge in Pflanzen ist die Photosynthese. Photosynthese beschreibt den Vorgang in phototrophen Organismen, bei dem mit Hilfe von Lichtenergie aus Kohlenstoffdioxid und Wasser in erster Linie Kohlenhydrate gebildet werden. So werden in etwa 10^6 bis 10^7 Tonnen organische Substanzen aus Kohlenstoffdioxid und Wasser gebildet [19]. Die Photosynthese hat damit direkt oder indirekt einen sehr großen Einfluss auf das Leben und die Ernährung aller Lebewesen. In eukaryontischen Zellen läuft die Photosynthese in den Chloroplasten ab. Die Chloroplasten grenzen sich durch eine Doppelmembran zum Cytoplasma hin ab. Innerhalb der Chloroplasten-Matrix, dem Stroma, befindet sich ein charakteristisches Merkmal der Chloroplasten die sogenannten Thylakoid-Membranen. In diesen laufen die photosynthetischen Lichtreaktionen ab. Die Thylakoidmembranen bestehen aus verschiedenen Lipiden und Polypeptiden.

Die Lipide, die Teil der Thylakoid-Membran sind, liegen in den Chloroplasten in sehr unterschiedlicher Form vor, die nach ihrer Funktion grob in drei Gruppen unterteilt werden können [20]:

1. Lipide mit strukturgebender Funktion:
 - vor allem Phospho- und Galactolipide
2. Lipide mit vorwiegend energieabsorbierender Funktion
 - Pigmente, wie beispielsweise Prenylipide, Chlorophylle, Carotinoide
3. Lipide mit Funktion im photosynthetischen Elektronentransport
 - Phyllochinone, Ubichinone, Plastochinone

Für die vorliegende Arbeit sind hauptsächlich die Lipide mit strukturgebender Funktion von Bedeutung und sollen daher etwas genauer betrachtet werden. Den größten Teil dieser Gruppe nehmen die Galactolipide mit circa 75 % ein. Es handelt sich dabei um Lipide, die sich aus einem Diacylglycerol und ein oder zwei Galactose-Moleküle zusammensetzen. Einen kleineren Anteil mit etwa 10 % machen die Phospholipide (speziell Phosphatidylglycerol) aus. Weitere 5 % der Lipide in der Thylakoid-Membran stellen die sogenannten Sulfoquinovosyldiacylglycerole (SQDG) [21]. Die Biosynthese der strukturgebenden Lipide läuft in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten ab [22, 23].

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Isolation und Charakterisierung der SQDGs. Daher wird im Folgenden Kapitel die (bio-)chemischen, ernährungsphysiologischen sowie pharmakologischen Eigenschaften der SQDGs im speziellen weiter ausgeführt.

5 Biochemie von SQDGs

Schwefel spielt in vielen Organismen eine essentielle Rolle für die Entwicklung, das Wachstum und das Überleben und liegt meist als Sulfat gebunden vor. Schwefelverbindungen kommen daher ubiquitär in vielen Lebensformen vor, zu nennen sind hier, neben den Sulfaten, beispielsweise die Aminosäuren Cystein und Methionin oder das Tripeptid Gluthathion, Biotin oder auch Thiamin. Liegt Schwefel in Lipiden gebunden vor, spricht man von Sulfolipiden. Dazu zählen unter anderem Alkylsulfate, Sulfatide und Sulfoquinovosyldiacylglycerole (SQDG). SQDGs spielen eine wichtige Rolle im Schwefelkreislauf von Pflanzen und aquatischen Organismen.

SQDGs wurden erstmals von Benson *et al.*, 1959 beschrieben. Sie werden von photosynthetisch aktiven Pflanzen, Cyanobakterien und Algen gebildet [2]. Nach der ersten Beschreibung in Spinat, wurde ihr Vorkommen bereits in einer Vielzahl an pflanzlichen und marinen Organismen bestätigt. Dazu zählen verschiedene Cyanobakterien (*Lyngbya lagerheimii* [1], *Oscillatoria raoi* [24]), das Nichtschwefelbakterium *Rhodobacter sphaeroides* [25], Mikroalgen (*Heterosigma ceterae* [26], *Pavlova lutheri* [27]), Makroalgen (*Gigartina tenella* [28]) und die Pflanze *Spinacia oleracea* (Spinat) [25].

5.1 Biosynthese

Die Biosynthese von SQDGs läuft in den Lamellenmembranen der Chloroplasten ab. Die Aufklärung des Mechanismus zur biosynthetischen Bildung von sulfonierter Glucose stellte eine große Herausforderung an die Wissenschaft dar. Zur Biosynthese der Sulfoquinovose gab es anfänglich mehrere Theorien.

Zunächst wurden Vorschläge für die Biosynthese von SQDGs über den umgekehrten sulfoglykolytischen Weg in der Literatur diskutiert. Die Grundlage für diese Diskussion basierte auf dem Nachweis von Sulfonsäuren, einschließlich 2-Phospho-3-Sulfolactat, 3-Sulfolactat, 3-Sulfolactaldehyd, 6-Desoxy-6-Sulfo-D-Fructose und freier Sulfoquinovose (SQ) [29].

Andere Arbeiten legten nahe, dass die Sulfonsäure von SQ auf der Ebene von Zuckernukleotiden durch die Zugabe von Sulfit (abgeleitet von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat), von UDP-Glc abgeleiteten 5,6-en oder 4-keto-5,6-en eingeführt werden könnte [30, 31].

Der erste große Durchbruch gelang durch die Zugabe von UDP-SQ nach osmotischen Schock zu Chloroplasten, die mit radioaktivem DAG vormarkiert waren [32]. Dies führte zu einer Verbesserung der Synthese von radioaktiv markiertem SQDG, was die Schlussfolgerung unterstützt, dass eine UDP-SQ-abhängige Transferase für den letzten Schritt der SQDG-Biosynthese verantwortlich ist. Diese Erkenntnisse stimmen mit der Biosynthese von SQDG aus UDP-Glucose und Sulfit in einem zweistufigen Prozess über UDP-SQ überein.

Abbildung 1 zeigt den schematischen Ablauf der Biosynthese von SQDG, dabei wird Glucose-1-Phosphat in einem dreistufigen, Enzym-katalysierten Prozess zu SQDG umgesetzt. Im ersten Schritt wird Glucose-1-Phosphat zu UDP-Glucose umgesetzt. Im zweiten Schritt wird diese durch die UTP-SQ-Synthase (unterschiedlich bezeichnet als SqdB, SQD1 oder Agl3, abhängig vom Organismus) weiter umgesetzt. Dieser Schritt beinhaltet die Substitution der 6-Hydroxygruppe der UDP-Glucose durch Sulfit.

Der dritte Schritt umfasst die Übertragung einer Sulfoquinovosyl-Gruppe zum Diacylglycerol (DAG) und wird durch eine Glykosyltransferase, die UDP-SQ-DAG-Sulfoquinovosyltransferase (SQD2), katalysiert. Die molekulare Grundlage für diesen Pfad wurde erstmals in dem photoheterotrophen Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides* nachgewiesen und stellt die Grundlage für viele weitere Forschungsarbeiten dar [30].

5.2 Chemische Eigenschaften und Bedeutung für die Pflanzenphysiologie

SQDG, nach IUPAC als 1,2-di-O-acyl-3-O-(6-deoxy-6-sulfo- α -D-glucopyranosyl)-sn-glycerol bezeichnet, setzen sich aus dem Glucose-Derivat Sulfoquinovose und einem Diacylglycerol zusammen. Sie können sich hinsichtlich ihrer Struktur im Hinblick auf die Länge und/oder Sättigungsgrad der Fettsäuren entsprechend unterscheiden. Das Glucose-Derivat Sulfoquinovose trägt an Position 6, anstelle einer Hydroxygruppe, eine Sulfonatgruppe und ist daher bei physiologischem pH-Wert negativ geladen. Des Weiteren ist es am anomeren Kohlenstoffatom über eine glycosidische Bindung mit Glycerol (sn_3) verbunden, das im Allgemeinen zwei Fettsäuren (sn_1 , sn_2) aufweist, die in Länge und Sättigungsgrad variieren [33, 34]. In jüngerer Zeit wurden aber auch Sulfolipide beschrieben, die nur eine Fettsäure entweder an sn_1 oder sn_2 aufweisen [33]. Bei diesen handelt es sich dann um SQMGs. Abb. 2 zeigt beispielhaft die Strukturen eines SQDGs und eines SQMGs. SQDGs werden von photosynthetisch aktiven Organismen gebildet, zu denen u.a. Moose, Farne, höhere Pflanzen, Algen und Bakterien zählen. Dort kommen sie besonders zahlreich im photosynthetischen Gewebe vor und sind Teil von Thylakoid-Membranen. Den größten Lipidanteil der Thylakoid-Membran machen die neutralen Glykolipide Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) aus, wobei die anionischen Lipide Phosphoglyceride (PG) und SQDG nur zu kleinen Teilen vorhanden sind. Diese sind trotz ihrer mengenmäßigen Nachrangigkeit sehr wichtige Strukturelemente, da PG und SQDG für die negative Ladung der Membranoberfläche und damit für die Stabilisierung der lamellaren Lipidphase verantwortlich sind [35]. Aufgrund des fast ubiquitären Vorkommens der Sulfolipide in photosynthetisch aktiven Organismen und der Lokalisierung am Photosynthese-Apparat wurde lange eine Korrelation zwischen dem Auftreten von SQDG und der Fähigkeit Photosynthese zu betreiben vermutet. Viele photosynthetisch aktive Organismen haben die Fähigkeit, sich an spezifische Umweltbedingungen anzupassen. Dazu gehört auch die Reaktion auf den Mangel an verfügbarem Phosphat, welche zur „Sulfolipid-Phospholipid-Austausch“-Hypothese führte [34]. Diese besagt, dass eine reverse Proportionalität zwischen den beiden anionischen Lipiden in der Thylakoid-Membran besteht. Bei Phosphatmangel wird mehr SQDG synthetisiert, dadurch wird immer eine bestimmte Konzentration an anionischen Lipiden in der Thylakoid-Membran aufrechterhalten und es kann Phosphat gespart werden. Sowohl SQDG als auch PG besitzen eine sehr ähnliche, zylindrische Struktur und verfügen über einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren, sodass die Funktion der Membran durch die Substitution nicht eingeschränkt wird [34].

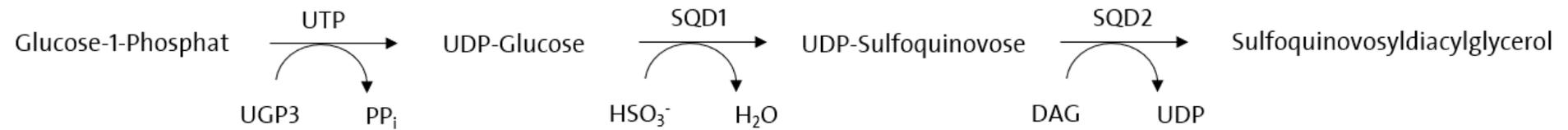


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Biosynthese von SQDGs (modifiziert nach [35]).

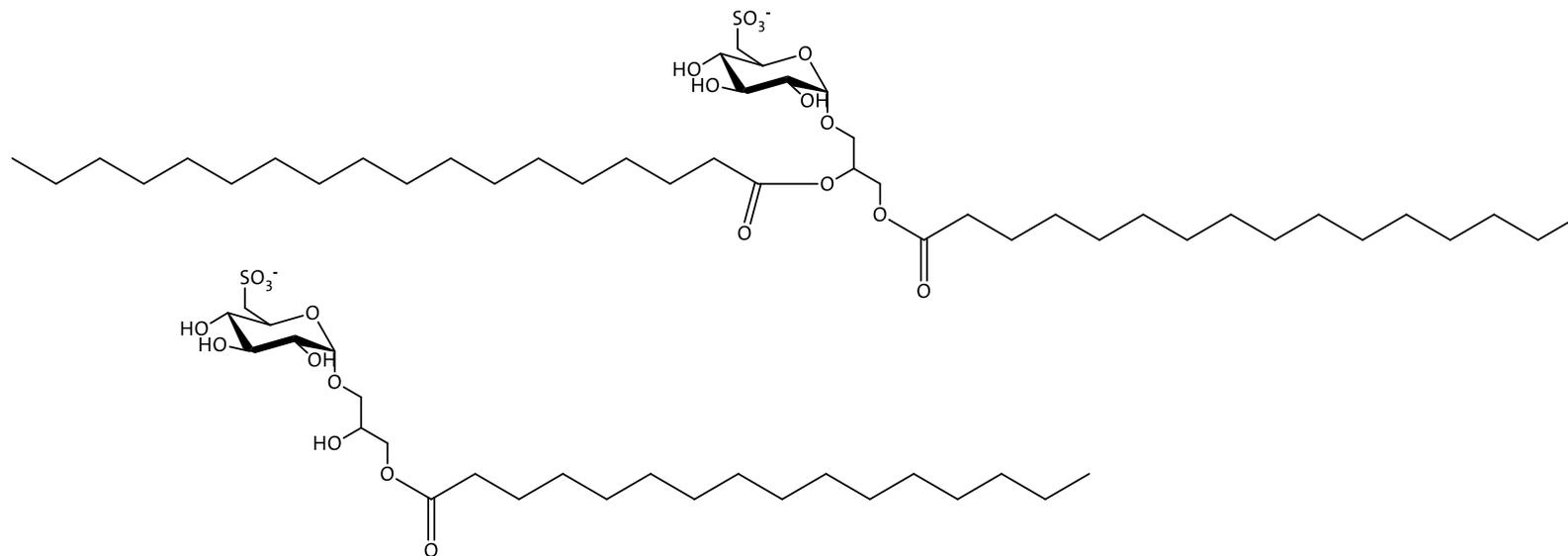


Abbildung 2: Strukturformel eines SQDG (oben) und eines SQMG (unten).

5.3 Ernährungsphysiologische Relevanz von Sulfolipiden

Da SQDG in großen Mengen in der Natur und vor allem in Pflanzen vorkommen, sind diese Lipide auch als Bestandteil in Nahrungsmitteln von Menschen und Tieren zu finden. Interessant, im Hinblick auf ernährungsphysiologische Einflüsse, ist hierbei die enthaltene Sulfonat-Gruppe. Der aerobe Abbau von Sulfoquinovose führt über bislang zwei bekannte Wege zu Kohlenstoffdioxid, Wasser und Sulfat. Diese Stoffwechselprodukte sind für Mensch und Tier unbedenklich, jedoch handelt es sich bei den typischen Mikroorganismen der humanen Darmflora überwiegend um anaerobe Spezies. Die ernährungsphysiologische Relevanz von SQDGs wird daher eher durch die Untersuchung des anaeroben Abbaus von SQ gezeigt. Dieser anaerobe Abbau von SQ wurde 2018 von Burrichter et al. betrachtet. Sie legten in ihrer Studie dar, dass manche Mikroorganismen zur anaeroben Bildung von Schwefelwasserstoff aus Sulfoquinovose (SQ) befähigt sind. In ihrer Publikation verwendeten sie ein Co-Kultur-Model aus *Escherichia coli* K-12 and *Desulfovibrio* sp. DF1 [7]. Da eine Schwefelwasserstoff Bildung durch das Mikrobiom im Intestinaltrakt demnach denkbar wäre und Schwefelwasserstoff bereits mit einigen potentiellen Einflüssen auf die menschliche Gesundheit und Krankheit in Verbindung gebracht wird, ist es wichtig den bakteriellen Abbau der Sulfoquinovose (SQ) auch im humanen intestinalen Mikrobiom in Hinblick auf Schwefelwasserstoff-Bildung genauer zu untersuchen [8].

5.4 Pharmakologische Relevanz von Sulfolipiden

Seit der ersten Isolierung von SQDGs werden mögliche pharmakologische Wirkungen und Einsatzmöglichkeiten von SQDGs und deren Derivaten als Pharmazeutika in der Literatur und Forschung diskutiert.

Bereits 1989 wurden SQDGs vom *National Cancer Institute* als potentielle antiviral wirksame Substanzen eingestuft. Gustafson et al. untersuchten daraufhin diese potentiell antiviralen Eigenschaften von SQDG-Gemischen aus Cyanobakterien. Ihre Versuche konnten eine Wirkung von SQDG-haltigen Extrakten gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV) zeigen.

Sie stellten dabei eine Reduktion des durch HIV verursachten pathologischen Effekts auf Lymphblasten und eine Abnahme des Hüllproteins p24 fest [1].

An die Forschung von Gustafson et al. schlossen sich in den späten 90er Jahren weitere Arbeiten an, die zusätzlich eine Reduktion der Enzymaktivität des Enzyms HIV-1-Reverse Transkriptase um bis zu 90 % durch SQDG-haltige Extrakte nachweisen konnten [24, 36].

Neben den antiviralen Eigenschaften wurden ebenfalls in den 90er Jahren mögliche entzündungshemmende Eigenschaften von Liu et al. untersucht. Dabei wurden unter anderem SQDG-haltige Extrakte aus Tüpfelfarnen (*Polypodium* sp.) extrahiert und es konnte die Inhibierung einer Entzündungsreaktion festgestellt werden [3].

Parallel dazu untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen die anticancerogenen Eigenschaften von SQDGs [37, 38, 4, 5]. Die Arbeiten von Hanashami et al. sowie Murakami et al. zeigten beispielsweise, dass SQDGs nicht nur inhibitorisch auf virulente DNA-Polymerasen wirken können, sondern auch einen inhibitorischen Effekt auf die eukaryotischen DNA-Polymerasen α und β ausbilden können [38, 39, 37]. Murakami et al. zeigten diesen Sachverhalt mit in vitro Experimenten.

SQMG zeigten dabei eine apoptotische Wirkung auf Magenkrebszellen aufgrund ihrer Polymerase Inhibitionsfähigkeit. Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung von den gebundenen Fettsäuren abhängig ist und SQMG eine drei- bis fünffach höhere Wirkung aufweisen als SQDGs [38]. Dieser Sachverhalt konnte auch von Sahara et al. beobachtet werden [4]. Das pharmakologische Interesse an SQDGs ist auch heute noch nicht erloschen, wie eine jüngere Studie aus 2018 zeigt. Hier beschreiben Takakusagi et al. eine strahlungssensibilisierende Wirkung auf Krebszellen in Mäusen nach der Gabe des synthetisch hergestellten Sulfolipid-Derivats 3-O-(6-Sulfo- α -D-quinovopyranosyl)-Propan-1,3-diol.

6 Überblick über die Methoden in der Lipidanalytik

6.1 Allgemein

Die Gruppe der Lipide stellt eine sehr heterogene Gruppe von natürlich vorkommenden Verbindungen da. Gemeinsam haben diese Verbindungen, dass sie sehr schlecht in Wasser löslich (hydrophob), dagegen aber gut löslich in unpolaren Lösungsmitteln sind. Fahy et al. fügte 2005 dieser Definition ergänzend hinzu, dass es sich bei Lipiden um kleine, organische Verbindungen mit lipophilen oder amphipathischen Eigenschaften handelt, welche komplett oder zum Teil aus Kondensationsreaktionen zwischen Carbanion und Thioestern und/oder auf Carbokation-basierter Kondensation von Isopren-Einheiten entstehen [40]. Weiter führt Fahy et al. auf, dass Lipide in einfache und komplexe Lipidgruppen untergliedert werden können. Einfache Lipide bilden demnach bei Hydrolyse zwei Produkte und komplexe Lipide bilden drei oder mehrere Hydrolyse Produkte. Des Weiteren können komplexe Lipide in unpolare und polare Gruppen untergliedert werden. Abbildung 3 stellt einen Überblick über die verschiedenen Lipidklassen dar und lässt erkennen, wie vielseitig die Gruppe der Lipide und wie vielfältig das daraus resultierende chemische Verhalten ist.

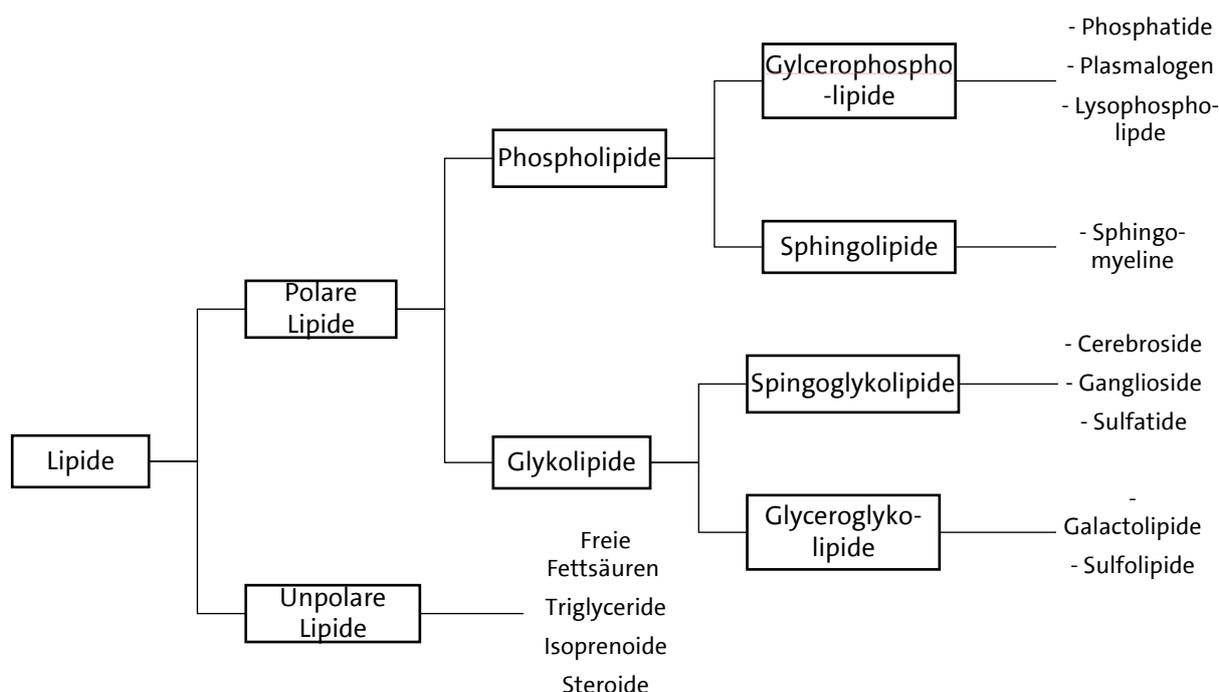


Abbildung 3: Klassifizierung von Lipiden nach ihrer Polarität und strukturellen Merkmalen. Modifiziert nach [41]

Bei Lipiden handelt es sich also um eine sehr vielfältige Stoffklasse, welche Fette, Wachse, Sterole, fettlösliche Vitamine und viele andere Substanzen umfasst. Die Vielfältigkeit der Lipide führt dazu, dass in der Lipidanalytik eine große Anzahl an Methoden zur Isolierung, Reinigung und anschließenden Identifikation oder Quantifizierung anwendbar sind [42]. In der Analytik wird die starke Lipophilie von Lipiden zur Extraktion der gewünschten Substanzen aus der Matrix genutzt. Abbildung 4 stellt verschiedene Ansätze der Lipidanalytik dar.

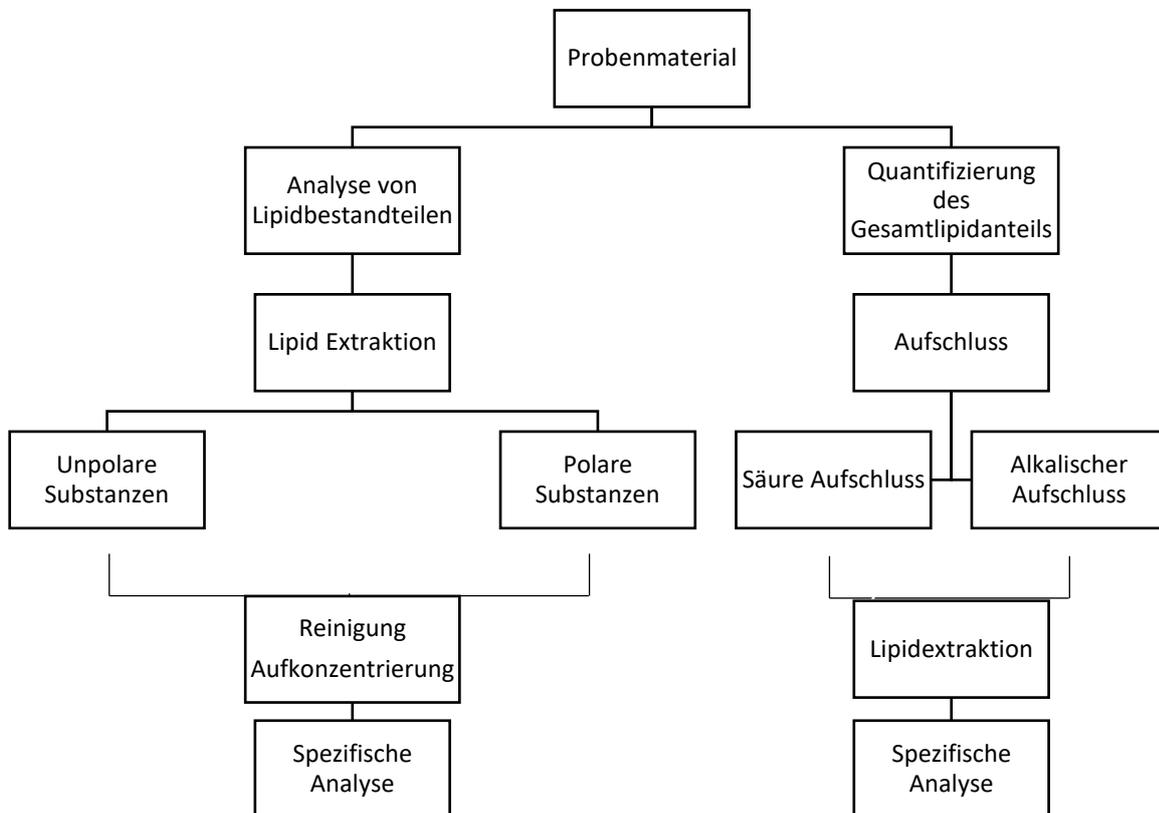


Abbildung 4: Verschiedene Ansätze der Lipidanalytik. Modifiziert nach [42]

Es ist in der Lipidanalytik daher immer unerlässlich, eine genau Zielstellung festzulegen, um die optimale Probenvorbereitung und Extraktion von gewünschten Zielsubstanzen gewährleisten zu können. Dabei sind generell die Unterscheidung zwischen *Lipodomics*-Ansätzen, also der nicht-zielgerichteten Untersuchung der Lipidzusammensetzung beziehungsweise der zielgerichteten Untersuchung einzelner Lipidfraktionen zu beachten.

6.2 Analytik von Sulfolipiden

1959 beschrieben Benson et al. erstmals SQDGs. In ihrer Arbeit wurden photosynthetische Mikroorganismen und höhere Pflanzen in Gegenwart von $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ kultiviert. Ein Lipidextrakt wurde auf Papier chromatographisch aufgetrennt. Sie untersuchten die chemische Zusammensetzung und die molekulare Struktur mit verschiedenen radiochromatographischen Methoden. In den späten sechziger Jahren folgten viele chromatographische und kristallographische Studien, um mehr über die Struktur und Funktion des neu beschriebenen Sulfolipids zu erfahren [43]. 1989 wurden Sulfolipide vom *National Cancer Institute* als potentielle antiviral wirksame Substanzen eingestuft [1]. Danach wurden viele Untersuchungen zu möglicher pharmakologischer Relevanz durchgeführt. Dabei wurde in der Regel ein Isolationsverfahren angewendet um SQDGs als Lipidextrakt zu gewinnen, aber keine genauere

Untersuchung der einzelnen Lipidverbindungen durchgeführt [6]. Wurde dennoch eine Quantifizierung der Sulfolipide vorgenommen, wurden diese als Summenparameter mit Methoden quantifiziert, die nicht zwischen verschiedenen SQDGs unterschieden. Dabei wurden zum einen dünnenschichtchromatographische zum anderen aber auch flüssigchromatographische Methoden herangezogen [44-47]. Zusätzlich zur Quantifizierung als Summenparameter wurde, in manchen Veröffentlichungen, eine Identifizierung der Fettsäuren, welche Bestandteil der SQDGs sind, mittels GC-FID-Methoden vorgenommen [48, 49]. Gaschromatographische Methoden zur Untersuchung von Sulfolipiden, abgesehen von Untersuchungen der Fettsäuren, wurden bislang nicht veröffentlicht, da es sich um schwer verdampfbare Substanzen handelt. Untersuchungen von ähnlichen Verbindungen wie Monogalactosyldiacylglycerolen (MGDGs) und Digalactosyldiacylglycerolen (DGDGs) mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurden jedoch durchgeführt und veröffentlicht. Mit Hilfe dieser Methoden war es möglich Galactolipide nachzuweisen und zu quantifizieren, auch wenn sie umfangreiche präanalytische Verfahren wie Reinigung und Derivatisierung zur Umsetzung in flüchtige Analyten voraussetzen [50, 48]. Mittels kollisionsinduzierter Dissoziations-Tandem-Massenspektrometrie (CID-MS/MS) wurden weitere Untersuchungen von Sulfolipiden aus komplexen Lipidextrakten durchgeführt. Durch die CID-MS/MS konnten darüber hinaus auch Strukturinformationen über die Fettsäuren in sn1- und sn2-Position getroffen werden. Bei der Fragmentierung mittels CID-MS/MS wurden immer wieder ähnliche Fragmente (m/z 225, 165, 153, 95, 81), welche aus den Sulfolipiden entstehen können, beobachtet. Diese Fragmente gehen auf die Fragmentierung der Sulfoquinovose-Gruppe zurück und sind damit spezifisch für alle Sulfolipide. Des Weiteren konnten Fragmente beobachtet werden, welche auf den Neutralverlust der Fettsäuren zurückgeführt werden können. Diese lassen einen Rückschluss auf die Fettsäurezusammensetzung des jeweiligen Sulfolipids zu [51-53]. Eine mögliche Fragmentierung von SQDGs ist beispielhaft in Abb. 5 dargestellt.

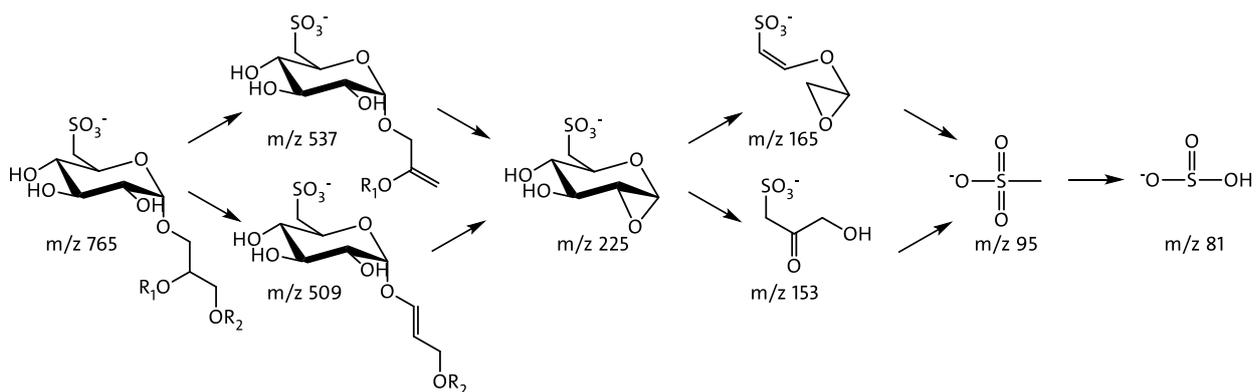


Abbildung 5: Mögliche Fragmentierung von SQDGs bei kollisionsinduzierter Dissoziation [53]. R1/R2 stehen für die variierende Fettsäure des SQDGs.

Es wurde weiterhin mittels CID-MS/MS festgestellt, dass das Fragment welches aus der Fragmentierung der sn1-Fettsäure resultiert, eine höhere Intensität zeigt und so auf die Regiochemie des Glycerol-Rückgrats der SQDG geschlossen werden kann [53].

Neuere Veröffentlichungen beschäftigten sich im Zuge von *Lipodomics*-Ansätzen mit der Identifizierung von neuen SQDGs. [54-57]

V. Problemstellung und Zielsetzung

Die Relevanz von SQ, SQMGs sowie SQDGs für pharmakologische und ernährungsphysiologische sowie pflanzenphysiologische Fragestellungen konnte vielfach gezeigt werden. Die entsprechende Analytik zur Untersuchung und Quantifizierung von SQ, SQMGs sowie SQDGs ist jedoch an einigen Stellen noch lückenhaft. Beispielsweise werden bei vielen Quantifizierungsmethoden für SQDGs nach wie vor Summenparameter/-methoden verwendet und nicht zwischen den einzelnen SQDGs unterschieden. Die Trennung der SQDGs sowie die Quantifizierung einzelner Verbindungen ist nicht oder nur teilweise publiziert. Auch bei *Lipodomics*-Ansätzen werden zwar die unterschiedlichen SQDGs qualitativ betrachtet aber nicht quantitativ bestimmt.

Für die Quantifizierung von Substanzen sind geeignete Standards unabdingbar und da nur ein einziges SQDG kommerziell erhältlich ist, liegt ein Augenmerk der Arbeit darauf, SQDGs zu isolieren und so zu reinigen, dass sie als Quantifizierungsstandard verwendet werden können. Dafür sollen verschiedene Extraktionsmethoden und anschließende Reinigungsmethoden angewendet und auf ihre Leistungsfähigkeit zur Isolierung einzelner SQDGs hin untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung und Validierung einer geeigneten, zuverlässigen Quantifizierungsmethode sowie der Anwendung dieser auf ausgewählte Probensets. Es werden sowohl flüssigchromatographische als auch gaschromatographische Methoden in Betracht gezogen.

Die Methodenentwicklung gliedert sich in drei Teile: Zunächst sollte eine möglichst quantitative Extraktion, anschließend ein flüssigchromatisches bzw. gaschromatographisches System zur Trennung der einzelnen SQDGs sowie eine massenspektrometrische Detektion entwickelt werden.

- **Probenvorbereitung:** Um eine quantitative Bestimmung der SQDGs gewährleisten zu können, liegt der erste Schwerpunkt der Methodenentwicklung daher darauf SQDGs zunächst aus *Spirulina* sp. zu isolieren und zu charakterisieren. Die Methode zur Isolierung soll dabei quantitativ sein und auch in Zellmembranen gebundene Sulfolipide möglichst komplett isolieren und extrahieren. Es sollen daher nicht nur klassische Flüssigextraktionen Anwendung finden, sondern auch der Einfluss mechanischer Aufarbeitungsschritte sowie Reinigungs- und Anreicherungs-schritte mittels SPE betrachtet werden.
- **Chromatographisches System:** Der zweite Schwerpunkt der Methodenentwicklung liegt anschließend darauf die SQDGs flüssigchromatographisch bzw. gaschromatographisch ausreichend zu trennen. Die Schwierigkeit dabei liegt darin, dass die einzelnen Verbindungen sich nur in einer oder zwei der gebundenen Fettsäuren unterscheiden und daher wenige Unterschiede zwischen den Substanzen die chromatographische Trennung beeinflussen können. Die Basislinientrennung der SQDGs soll durch Verwendung verschiedener stationärer und mobiler Phasen sowie unterschiedlichen Gradienten Verläufen und Temperaturen erreicht werden.

- **Spezifität:** Problematisch bei der massenspektrometrischen Untersuchung von SQDGs ist ihre chemisch sehr ähnliche Struktur. Sie unterscheiden sich maximal in einer oder zwei der gebundenen Fettsäuren und weisen daher ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster auf. Um die Spezifität der Methode zu erhöhen soll daher bei der Entwicklung der massenspektrometrischen Detektionsmethode der *Multi-Reaction-Monitoring-Modus* (MRM) verwendet werden.
- **Quantifizierung:** Ein weiteres Problem stellt die Art der Quantifizierung dar. Da nur ein SQDG als Standard kommerziell erworben werden kann und dieser auch natürlich in Pflanzen und Algenmaterial vorkommt, kann dieser nicht als interner Standard verwendet werden. Auch isotonenmarkierte Standards sind nicht kommerziell erhältlich. Es soll daher untersucht werden ob eine externe Kalibrierung eine hinreichend genaue Quantifizierung ermöglicht oder ob ein alternatives, strukturähnliches Lipid als interner Standard herangezogen werden muss.

Die entwickelte Methode soll anschließend nach wissenschaftlich anerkannten Leitsätzen validiert werden, um die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit nachzuweisen.

Abschließend sollen die gewonnenen Erkenntnisse und entwickelten Methoden auf ausgewähltes grünes Blattgemüse, Algen und Cyanobakterien angewendet werden. Dies soll zum einen Überblick über die SQDG-Zusammensetzungen in verschiedenen Organismen geben und die in der Literatur aufgestellte These überprüfen, dass je höher der Chlorophyll-Gehalt in grünem Blattgemüse ist, ein entsprechend hoher Gehalt an Sulfolipiden enthalten sein soll [33].

VI. Ergebnisse und Diskussion

Die vorliegende Arbeit lässt sich in vier Teile einteilen. Zunächst sollte die Entwicklung einer quantitativen Isolierungsmethode von SQDGs aus gefriergetrocknetem *Spirulina* sp.-Pulver erfolgen. Diese Isolate wurden anschließend mittels GC-FID, HPTLC und MALDI-TOF-MS charakterisiert. In einem weiteren Schritt wurde eine quantitative Isolierungsmethode und anschließende HPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Identifizierung und Quantifizierung entwickelt. Parallel dazu wurden auch Versuche zur Entwicklung einer GC-EI-MS-Methode durchgeführt. Abschließend wurde die entwickelte HPLC-ESI-MS/MS-Methode validiert und zur Untersuchung von diversem Pflanzenmaterial herangezogen.

7 Isolierung reiner SQDGs

Wie in Kapitel 6.2 beschrieben, liegen die Grenzen der aktuellen SQDG-Analytik in der Art der Quantifizierung. Die zurzeit veröffentlichten Methoden bestimmten den Gehalt an SQDGs als Summenparameter und nicht als einzelne Substanz. Ein Problem bei der Quantifizierung von SQDGs ist, dass nur ein reines SQDG kommerziell verfügbar ist. Daher sollte zunächst aus dem Analysenmaterial mithilfe von mehreren Aufarbeitungsschritten eine oder mehrere Standardsubstanzen isoliert und gereinigt werden, um sie im weiteren Verlauf der Arbeit als Standards verwenden zu können. Für die Isolierung wurden vier verschiedene bereits veröffentlichte Methoden zur Isolierung verschiedener Lipide als Ausgangsmethode getestet. Es wurden die Methoden nach Folch (1957), Naumann (2009), Keusgen (1996) und Souza (2012) [58-60, 53] ausgewählt. Ziel der Aufarbeitung waren zunächst eine Isolierung der Lipide und eine Abtrennung des Chlorophylls, da dieses die weitere Analytik stören würde und auch zu einer starken Verunreinigung der analytischen Säulen führen kann. Die geeignetste Methode sollte dann in einem Scale-Up dazu verwendet werden, SQDGs zu isolieren und zu reinigen um sie als Standardsubstanzen verwenden zu können.

Die Methode nach Folch (1957) ist in der ursprünglichen Veröffentlichung eine Methode zur Extraktion und Reinigung von Lipiden aus tierischem Gewebe. Diese Methode (Folch-Extraktion) ist eine Standardmethode zur Isolation von Lipiden und wird in der Lipidanalytik sehr häufig als Isolationsmethode angewendet [61]. Das Untersuchungsmaterial wird dabei mit einer Mischung aus Chloroform/Methanol (2/1; v/v) extrahiert, unlösliche Bestandteile durch Filtration abgetrennt und der gewonnene Lipidextrakt mit Wasser bzw. einer Salzlösung bis zur Phasentrennung gewaschen. In dieser Arbeit wurde für den Waschschrift eine wässrige Kaliumchlorid-Lösung gewählt. Die Kaliumchlorid-Lösung wurde gewählt um den negativ geladenen SQDGs ein Gegenion zur Verfügung zu stehen und, so dass die Verbindung weniger polar ist und dadurch die Löslichkeit in der organischen Phase weiter erhöht wird.

Naumann (2009) beschäftigte sich ebenfalls mit der Extraktion und Reinigung von SQDGs aus marinen Organismen. Als Extraktionslösung wird in diesem Fall ein Gemisch aus Dichlormethan/Methanol (1/1; v/v) verwendet.

Die Methode nach Keusgen (1996) beschreibt eine Methode zur Extraktion von SQDGs aus der Alge *Heterosigma carterae*. Diese Methode verwendet als Extraktionslösung ein Gemisch aus Methanol/Chloroform (7/3; v/v).

Souza (2012) beschäftigt sich mit der Isolation von Glykolipiden aus der Alge *Osmundaria obtusiloba*. Bei dieser Methode wurde das Untersuchungsmaterial zunächst über Nacht mit Aceton extrahiert und der Aceton-unlösliche Rückstand anschließend mit Chloroform/Methanol (2/1; v/v) und Chloroform/Methanol (1/2; v/v) extrahiert.

Bei allen vier gewählten Isolierungsverfahren handelt es sich um Flüssig-Fest-Extraktionen, die auf der Löslichkeit der Analyten im Lösungsmittel beruhen. Es handelt sich also jeweils nicht um eine zielgerichtete Isolierung einzelner Substanzgruppen, sondern um die Isolierung einer großen Gruppe an Analyten ähnlicher Löslichkeit. Abbildung 6 zeigt die erhaltenen Lösungen nach Durchführung der verschiedenen Isolierungsmethoden. Es wird bereits optisch deutlich, dass keine der vier Extraktionsmethoden zu einer ausreichenden Abtrennung des Chlorophylls führte, sodass eine anschließende SPE oder andersartige Abtrennung des Chlorophylls unabdingbar war.

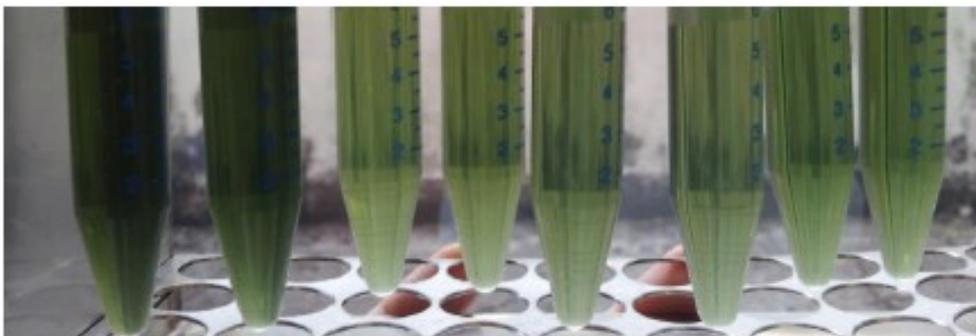


Abbildung 6: Isolutionslösungen nach den geprüften Methoden nach Folch (1957), Naumann (2009), Keusgen (1996) und Souza (2012), jeweils in Doppelbestimmung.

Eine einfache Möglichkeit zur Abtrennung von Chlorophyllen stellt die Verwendung von Aktivkohle dar. Dies wurde bereits in anderen Veröffentlichungen zur Trennung von Chlorophyll aus pflanzlichen Extrakten diskutiert [62, 63]. Aktivkohle stellt auf Grund ihrer porenreichen, amorphen Struktur einen Stoff mit guten adsorptiven Eigenschaften gegenüber unpolaren Stoffen dar. Die Verwendung von Aktivkohle zur Abtrennung des Chlorophylls sollte nun auch in dieser Arbeit untersucht werden. Fraglich war jedoch, ob die adsorptiven Eigenschaften von Aktivkohle zu unbestimmt sind und es so auch zu einem hohen Verlust an SQDGs kommen wird. Um dieses Verhalten zu untersuchen, wurden die erstellten Lipidextrakte mit Aktivkohle versetzt und filtriert. Die gewonnenen Lösungen wurden vor und nach der Behandlung mit Aktivkohle mittels HPTLC auf ihren Gehalt an SQDGs untersucht. Abbildung 7 zeigt die entwickelten HPTLC Platten mit den Extrakten vor (Abb. 7, Bande 1, 2) und nach (Abb. 7, Bande 3, 4) der Behandlung mit Aktivkohle. Die SQDGs weisen einen Retentionsfaktor von 0,3 auf und sind in Abbildung 7 rotmarkiert. Es zeigt sich dabei jedoch, dass zwar sowohl die Begleitmatrix aber auch die SQDGs sehr stark an die Aktivkohle adsorbierten und aus dem Extrakt so entfernt werden. Aktivkohle stellt daher keine geeignete Methode zur Abtrennung des Chlorophylls dar. Im nächsten Schritt wurden daraufhin verschiedene säulenchromatographische Aufreinigungsschritte zur Reinigung der Lipidlösungen untersucht.

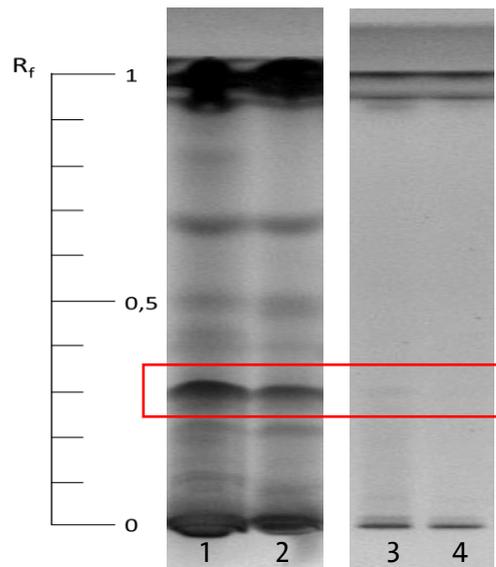


Abbildung 7: HPTLC Platte mit chromatographisch getrennten SQDG Extrakten (Bande 1 und 2) und chromatographisch getrennten SQDG Extrakten nach Behandlung mit Aktivkohle (Bande 3 und 4). Entwickelt und derivatisiert nach Kapitel 14.3. Der Bereich der SQDG-Banden ist rot markiert.

Zwei der gewählten Veröffentlichungen zur Isolation von SQDGs, Naumann (2009) und Souza (2012), umfassen bereits eine SPE-Methode zur Reinigung der extrahierten Lipidlösungen.

Diese wurden als Ausgangspunkt zur Reinigung der isolierten Lipidfraktion untersucht. Es wurden die vier ausgewählten Methoden zur Lipidisolierung jeweils mit beiden SPE-Methoden kombiniert durchgeführt.

Zunächst wurden die vier Lipidextraktionen mit der SPE nach Souza et al (2012) kombiniert. Bei dieser Methode wurde als Säulenmaterial polares Kieselgel verwendet. Nach der Probenaufgabe erfolgten zunächst Waschschrte mit Chloroform und Aceton und die eigentliche Elution der SQDGs sollte mit Methanol erreicht werden. Abb. 8 zeigt die vier Extraktionslösungen, welche die gereinigten und isolierten SQDG Extrakte enthalten. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Methode geeignet ist, um das Chlorophyll zum größten Teil abzutrennen. Optisch ist dies vor allem bei der Kombination der Isolationsmethode nach Naumann (2009) beziehungsweise Souza (2012) und der SPE-Methode nach Souza (2012) der Fall.

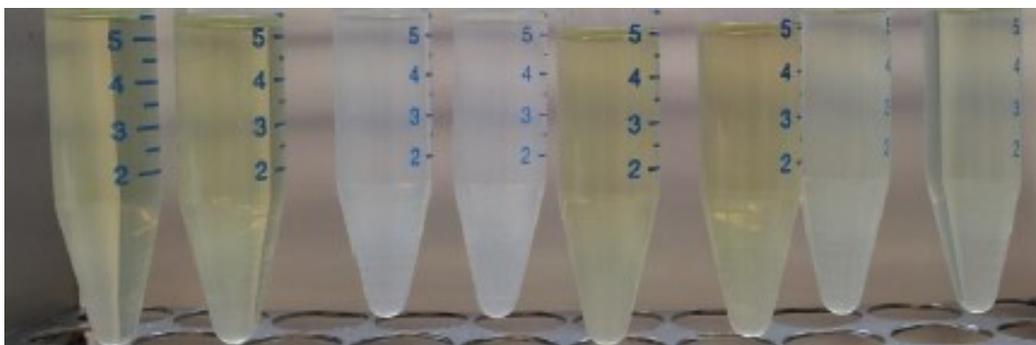


Abbildung 8: Elutionslösungen nach der SPE-Methode nach Souza et al (2012) nach den Extraktionsmethoden nach Folch (1957), Naumann (2009), Keusgen (1996) und Souza (2012), jeweils in Doppelbestimmung.

Die zweite SPE-Methode, die in Betracht gezogen wurde, verwendet aminopropyliertes Kieselgel. Nach der Probenaufgabe wurde zunächst mit Dichlormethan/Isopropanol/Methanol (15/30/50; v/v/v) Nebenbestandteile von der Säule eluiert und anschließend mit Dichlormethan/Acetonitril/Isopropanol/Methanol/0,1 M Ammoniumacetatlösung (10/10/10/50/15; v/v/v/v/v) die SQDGs eluiert. Abb. 9 zeigt die Elutionslösungen nach der SPE-Methode nach Naumann (2009). Optisch fällt bereits auf, dass in allen Lösungen noch eine höhere Konzentration an Chlorophyll enthalten ist, als nach der Reinigung mittels SPE-Methode nach Souza et al (2012). Die Kombination der Isolation nach Naumann und der SPE nach Naumann liefern in diesem Fall die Extraktionslösung mit der optisch geringsten Grünfärbung.

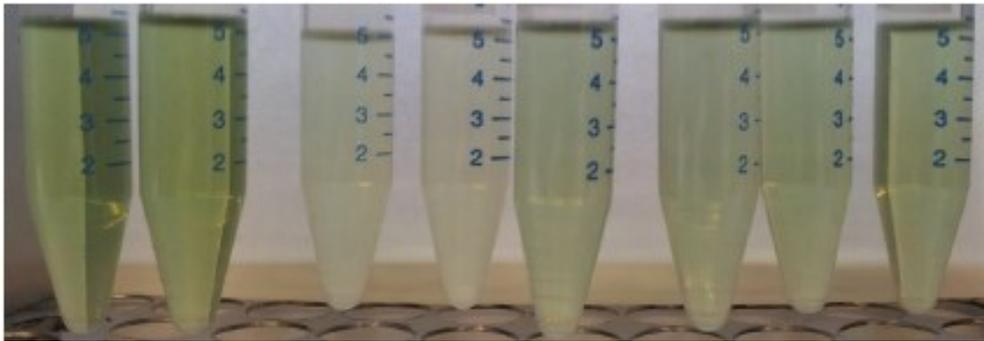


Abbildung 9: Elutionslösungen nach der SPE-Methode nach Naumann (2009) nach den Extraktionsmethoden nach Folch (1957), Naumann (2009), Keusgen (1996) und Souza (2012), jeweils in Doppelbestimmung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Abtrennung des Chlorophylls aus dem Rohextrakt an Kieselgel erfolgreicher als an aminopropyliertem Kieselgel ist.

Des Weiteren ist auch die Handhabung der SPE nach Souza (2012) einfacher, da zur Aktivierung, für die Waschschritte und zur Elution nur reine Lösungsmittel verwendet werden. Ein weiterer Aspekt, welche für die SPE nach Souza (2012) spricht, ist der finanzielle Aspekt.

Sowohl die gekauften, mit Kieselgel befüllten SPE-Kartuschen als auch reines Kieselgel sind an sich günstiger als die aminopropylierte Variante. Die Reinigung des Rohextraktes erfolgte daher im weiteren Verlauf der Arbeit an Kieselgel. Aus dem gereinigten Rohextrakt sollten nun die einzelnen SQDGs fraktioniert werden. Dafür wurden sowohl Versuche mit präparativer Säulenchromatographie also auch Versuche mittels präparativer HPLC durchgeführt.

Zunächst sollte aus den durchgeführten Vorversuchen eine präparative Isolierung reiner SQDGs abgeleitet werden. Mittels präparativer Säulenchromatographie in größerem Maßstab sollten nun einzelne SQDGs extrahiert werden. In Anlehnung an das Adsorption/Desorptions-Trennverfahren wurden zwei Säulen nach einander verwendet [64]. Dabei wurde ähnlich der untersuchten SPE-Methoden zum einen eine präparative Säule mit Kieselgel gepackt, an der zunächst störende Begleitmatrix abgetrennt werden sollte und anschließend eine zweite Säule mit octadecylmodifiziertem Kieselgel befüllt. An dieser sollte die eigentliche Trennung der einzelnen SQDGs erreicht werden. Abb. 10 stellt schematisch den Ablauf des Adsorptions/Desorptions-Trennverfahrens dar. In Säule 1 werden die Begleitsubstanzen abgetrennt, die eigentliche Fraktionierung der Zielmoleküle erfolgt dann in Säule 2.

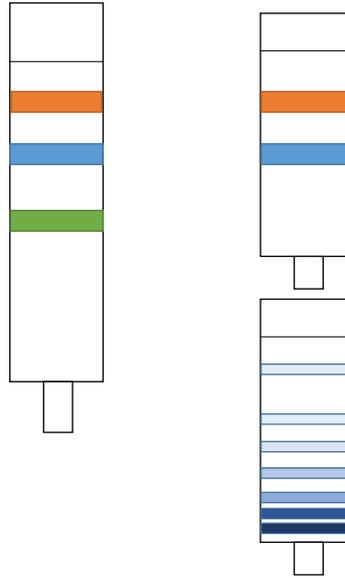


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer einzelnen Säulenchromatographie und des Adsorptions/Desorptions-Trennverfahrens.

Die Elution erfolgt mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser (1/1; v/v) sowie Acetonitril/Wasser (7/3; v/v). Die Abnahme der Polarität soll dazu führen, dass die relativ apolaren SQDGs möglichst quantitativ von der Säule desorbiert werden. Es wurden 35 Fraktionen in jeweils 10 mL Fraktionen gesammelt und anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersucht.

Neben dem Versuch die Rohextrakte händisch mittels Adsorption/Desorptions-Trennverfahren an zwei präparativen Säulen zu trennen, wurde auch eine Fraktionierung mittels präparativer HPLC durchgeführt. Dabei wurde der Rohextrakt zunächst ebenfalls an einer Kieselgelsäule von einem Teil der Begleitmatrix getrennt und anschließend die präparative Trennung an einer präparativen C18-HPLC-Säule durchgeführt. Da kein geeigneter Detektor für die Visualisierung der SQDGs vorhanden war, wurde die Fraktionierung nach bestimmten Zeitabständen vorgenommen. Für die Entwicklung eines geeigneten Gradienten und Festlegung der Fraktionsabstände wurde sich an der HPLC-ESI-MS/MS nach Granafei (2017) orientiert [33]. Die Fraktionen, die mittels präparativer HPLC gewonnen wurden, wurden ebenfalls anschließend mittels MALDI-TOF-MS auf den Gehalt an SQDGs untersucht.

7.1 Charakterisierung mittels Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Fraktionen aus der händisch durchgeführten Säulenchromatographie und die Fraktionen die mittels präparativer HPLC gewonnen wurden, wurden mittels MALDI-TOF-MS auf ihre Reinheit und Zusammensetzung untersucht. Es sollte damit zunächst ein Überblick über die in *Spirulina* sp. vorhandenen SQDGs gewonnen werden und darüber hinaus untersucht werden, ob sich eines oder mehrere SQDGs mittels Säulenchromatographie oder präparativer HPLC isolieren lässt.

Für die Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS ist eine Kalibrierung des Geräts im gewünschten Massenbereich vor jeder Untersuchung notwendig, diese wurde im negativen Ionenmodus über einen Peptid-Standard im Massenbereich von 700 – 3500 Da durchgeführt. Für die Messung mittels MALDI-TOF-MS ist darüber hinaus immer eine Matrix nötig.

Es wurden verschiedene Matrices untersucht, dafür wurde der Peptid-Standard mit 9-Aminoacridin (1:50), DHB (1:20) und HCCA (1:50) gemischt und auf das Target aufgetragen und die Fragmentierung untersucht. Das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis lieferte dabei HCCA. HCCA bietet außerdem den Vorteil, dass nur wenige Peaks (m/z 603, m/z 665 und m/z 814) in dem m/z -Bereich von 600 bis 900 erhalten wurden. In diesem Massenbereich liegen auch die SQDGs, sodass sich der Massenbereich der SQDG kaum mit dem Peptid-Standard überschneiden. Abbildung 11 zeigt das Chromatogramm der reinen Matrix HCCA. man kann sehr gut erkennen, dass die Peaks der Matrix hauptsächlich im Bereich unter m/z 700 auftreten und daher wenig Überschneidungen mit dem Massenbereich der SQDGs auftreten und sich HCCA daher sehr gut als Matrix für die Untersuchung von SQDGs eignet. Für alle nachfolgenden MALDI-TOF-MS-Messungen wurde daher HCCA als Matrix verwendet.

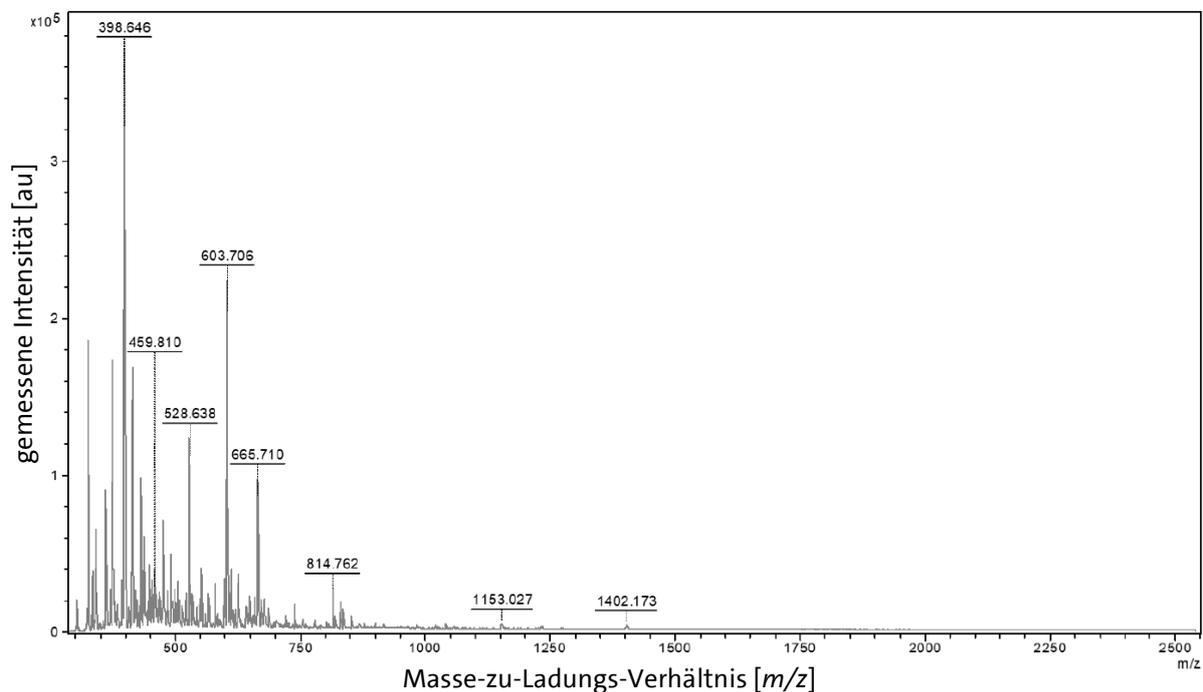


Abbildung 11: Mittels MALDI-TOF-MS gemessenes Massenspektrum der reinen Matrix HCCA.

Für die Messung wurden die Messlösungen mit HCCA als Matrix gemischt und auf ein *Polished Steel Target* aufgetragen. Tabelle 4 stellt einen Überblick über die gefundenen SQDGs in den einzelnen Fraktionen der händischen Säulenchromatographie dar. Es wurde nur der Masse- zu Ladungsbereich von 600 bis 900 berücksichtigt und darauf geachtet, dass die Massen nur in der Untersuchungslösung nicht jedoch im Matrix-Blindwert zu finden sind. Die gefunden Massen sind in der Tabelle nach ihrer Intensität geordnet.

Tabelle 4: Ergebnisse der MADLI-TOF-MS Messungen der Fraktionen der händisch durchgeführten Säulenchromatographie. Die gefundenen Massenzahlen sind absteigend nach der Intensität geordnet.

Extraktionsmittel	Messlösung	Massenzahlen [m/z]
	HCCA	603, 779
Acetonitril/Wasser (1/1; v/v)	1. Fraktion	-
	2. Fraktion	-
	3. Fraktion	-
	4. Fraktion	697, 867, 725, 834
	5. Fraktion	697, 867, 725, 834
Acetonitril/Wasser (7/3; v/v)	1. Fraktion	834, 696, 868, 725, 620, 848, 882
	2. Fraktion	-
	3. Fraktion	833, 849, 867
	4. Fraktion	831, 833, 815, 867, 847
	5. Fraktion	831, 817
	6. Fraktion	817, 833, 868, 725, 792, 850, 765
	7. Fraktion	817, 834, 791, 765, 849, 867
	8. Fraktion	818, 834, 792, 766, 850, 868, 804, 882
	9. Fraktion	818
	10. Fraktion	818
Acetonitril	1. Fraktion	818, 792, 834, 766, 805, 850, 868, 882
	2. Fraktion	817
	3. Fraktion	817, 833, 791, 849, 867, 805, 881
	4. Fraktion	818, 834, 792, 868, 725, 683, 620, 881, 683 765
	5. Fraktion	818, 834, 792, 868, 725, 846, 766, 805, 683, 882
	6. Fraktion	818, 834, 868, 725, 620, 792, 848, 882
	7. Fraktion	817, 834, 620, 867, 792, 725, 765
	8. Fraktion	818, 834, 868, 847, 792, 806
	9. Fraktion	818, 834, 620, 868, 792, 850, 765
	10. Fraktion	818, 834, 620, 847, 868, 792
	11. Fraktion	818, 834, 620, 792, 850, 868, 806, 765
	12. Fraktion	818, 834, 620, 848, 792, 868, 805, 765
	13. Fraktion	818, 620, 834, 794, 848, 806, 765, 868
	14. Fraktion	818, 834, 620, 848, 794, 806, 868
	15. Fraktion	818, 620, 804, 834, 792, 848, 765
	16. Fraktion	818, 620, 834, 808, 792, 848, 765
	17. Fraktion	-
	18. Fraktion	818, 620, 794, 804, 834
	19. Fraktion	818, 620, 833, 793, 806
	20. Fraktion	818, 620, 613, 804, 794, 834
	SPE-Extrakt (1:100 verdünnt)	817, 794, 833, 620, 808, 849, 765, 867

Es wird ersichtlich, dass die Säulenchromatographie in den meisten Fraktionen nicht ausgereicht hat, ein einzelnes SQDG zu isolieren und so als reinen Standard zu gewinnen. Lediglich in der 9. und 10. Fraktion, die mittels eines Acetonitril/Wasser-Gemisches (7/3; v/v), von der Säule desorbiert wurden, wurde SQDG m/z 818 als einzelnes Molekül nachgewiesen. In der 2. Fraktion aus reinem Acetonitril konnte das SQDG m/z 817 nachgewiesen werden. Diese Fraktionen wurden vereinigt und mittels Gefriertrocknung zu einem Feststoff aufgearbeitet. Es wurde so eine Ausbeute von 89 mg Feststoff gewonnen. Bei dem extrahierten und getrockneten Feststoff handelte es sich um ein farbloses, kristallines Produkt, welches allerdings auch braun-grünliche Stückchen aufwies. Der optische Eindruck zeige daher bereits, dass es sich nicht um ein reines Produkt handelt, sondern immer noch Fremdstoffen enthalten sind. Der gewonnene Feststoff wurde zur weiteren Charakterisierung mittels GC-FID und GC-MS auf die enthaltenen Fettsäuren untersucht (vgl. Kapitel 7.2).

Neben den Fraktionen der händischen Säule wurden auch die Fraktionen, welche mittels präparativer HPLC gewonnen wurden mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Tabelle 5 stellt die Ergebnisse der Untersuchung der Fraktionen der präparativen HPLC, welche mittels MALDI-TOF-MS gewonnen wurden zusammen.

Tabelle 5: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS Messungen der Fraktionen der präparativen HPLC. Die gefundenen Massenzahlen sind absteigend nach der Intensität geordnet.

Fraktion:	MALDI-TOF-MS: Massenzahlen [m/z]
0	817, 833, 867, 847
1	849, 833, 817, 867
2	833, 849
3	833, 815, 849, 793
4	833
5	-
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-
11	-
12	-
13	-
14	725, 747
15	649, 803, 756, 719, 881
16	868, 881, 845, 733, 793, 765
17	846, 867, 881, 833, 650, 795
18	845, 831, 865, 881, 805
19	831, 849, 819, 807
20	831, 815, 849, 761
21	831, 815, 761, 847
22	831, 813, 861, 761, 847
23	815, 789, 833, 847, 759

Es wird ersichtlich, dass auch mit der präparativen HPLC überwiegend gemischte SQDG-Fraktionen gewonnen wurden. Fraktion 4 weist als einzige Fraktion ein reines SQDG (m/z 833) auf. In Fraktion 2 und 3 wurde SQDG m/z 833 ebenfalls in hoher Konzentration nachgewiesen. Diese drei Fraktionen wurden ebenfalls vereinigt und mittels Gefriertrocknung zu einem Feststoff aufgearbeitet. Es wurde so eine Ausbeute von 40 mg Feststoff gewonnen. Auch dieser Feststoff wurde mittels GC-FID und GC-MS auf die enthaltenen Fettsäuren untersucht (vgl. Kapitel 7.2).

7.2 Charakterisierung mittels GC-FID und GC-MS

Die gewonnenen Feststoffe, welche nach der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS, erhalten wurden, wurden anschließend auch mit GC-FID und GC-MS auf die enthaltenen Fettsäuren hin untersucht. Zur Untersuchung der Fettsäuren wurden verschiedene Verfahren aus der Literatur ausgewählt. Es wurden die Methoden nach Kind et al. (2012), Keusgen et al. (1997) und Morimoto et al. (1993) ausgewählt [26, 65, 66]. Allen Methoden beruhen zunächst auf einer Abspaltung der Fettsäuren und anschließender Umwandlung in Fettsäuremethylester, da diese leicht verdampfbar sind und daher mittels Gaschromatograph getrennt und bestimmt werden können.

Die Methode nach Kind et al. (2012) beruht auf einer Umesterung mittels methanolischer Bortrifluorid-Lösung (13 - 15%-ig). Dabei erfolgen Spaltung und Umesterung der Fettsäuren in einem Schritt.

Die Methode nach Keusgen et al. (1997) beruht ebenfalls auf einer Umesterung mittels methanolischer Bortrifluorid-Lösung. Jedoch werden die Fettsäuren zunächst mittels Natriumhydroxid-Lösung abgespalten und diese Methode umfasst zusätzliche Reinigungsschritte. Sie ist daher etwas aufwendiger als die Methode nach Kind et al. (2012).

Bei der Methode nach Morimoto et al. (1993) wird eine Lipase zur Abspaltung der Fettsäuren verwendet. Die Veresterung erfolgt dann ebenfalls mit methanolischer Bortrifluorid-Lösung.

Zusätzlich wurde die Methode nach Morimoto et al. (1993) modifiziert, wobei die Veresterung nicht mit methanolischer Bortrifluorid-Lösung vorgenommen wurde, sondern mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH).

Da von dem SQDG m/z 817/818 eine höhere Ausbeute erhalten wurde, wurde dieser zur Untersuchung der vier Methoden verwendet. Mit diesen vier Methoden wurde ein Teil der SQDG-Lösung m/z 817/818 jeweils in Doppelbestimmung umgesetzt und die umgeesterten Proben anschließend mittels Gaschromatographie getrennt und die Fettsäuremethylester mittels FID detektiert.

Dobrev et al. führten einige Untersuchungen durch, um zu zeigen, welche Bedingungen zu den besten Ergebnissen bei enzymatischer Lipidspaltung führen [67]. Sie zeigten mit diesen Versuchen, dass die Lipase aus *Rhizopus arrhizus* eine hohe Aktivität bei 25–35 °C und einem pH-Wert von 7 - 9 besitzt.

Bei den beiden Ansätzen, die eine enzymatische Spaltung der Fettsäuren von den SQDG beinhalten, wurde daher darauf geachtet, dass ein pH-Wert von 7–8 eingehalten wurde.

Aufarbeitungsmethode (Keusgen et al. (1997)). Bei der Methode nach Morimoto et al. (1993) konnten die Peaks nur sehr schlecht vom Grundrauschen unterschieden werden. Die Spaltung mittels TMSH scheint nicht ausreichend zu sein. Die Verwendung einer Lipase zur Spaltung der Fettsäuren von den SQDG und anschließende Veresterung mittels methanolischer Bortrifluorid-Lösung ergab gute Ergebnisse. Die Peaks konnten anhand eines Standards bestimmten Fettsäuremethylestern zugeordnet werden. Es wurden daher die beiden gewonnenen Feststoffe nach Methode drei umgeestert und mittels GC-FID untersucht.

Die Identifizierung der Peaks erfolgte anhand des in Abb. 12 dargestellten Fettsäuremethylester-Standards. In der Probe konnten mittels GC-FID mehrere Fettsäuremethylester identifiziert werden. Es ist jedoch auch deutlich zu erkennen, dass die Konzentration der Fettsäuremethylester in den Proben sehr niedrig ist und eine eindeutige Identifizierung aufgrund der Begleitmatrix nicht ganz einfach ist. Da ein FID als Detektor nicht spezifisch für bestimmte Substanzen ist, sondern alle Kohlenwasserstoff-haltigen Verbindungen detektiert werden können, erklärt die hohe Intensität des Grundrauschens.

Abb. 13 und 14 zeigen die Chromatogramme der isolierten SQDGs mit den Massen 817 und 833.

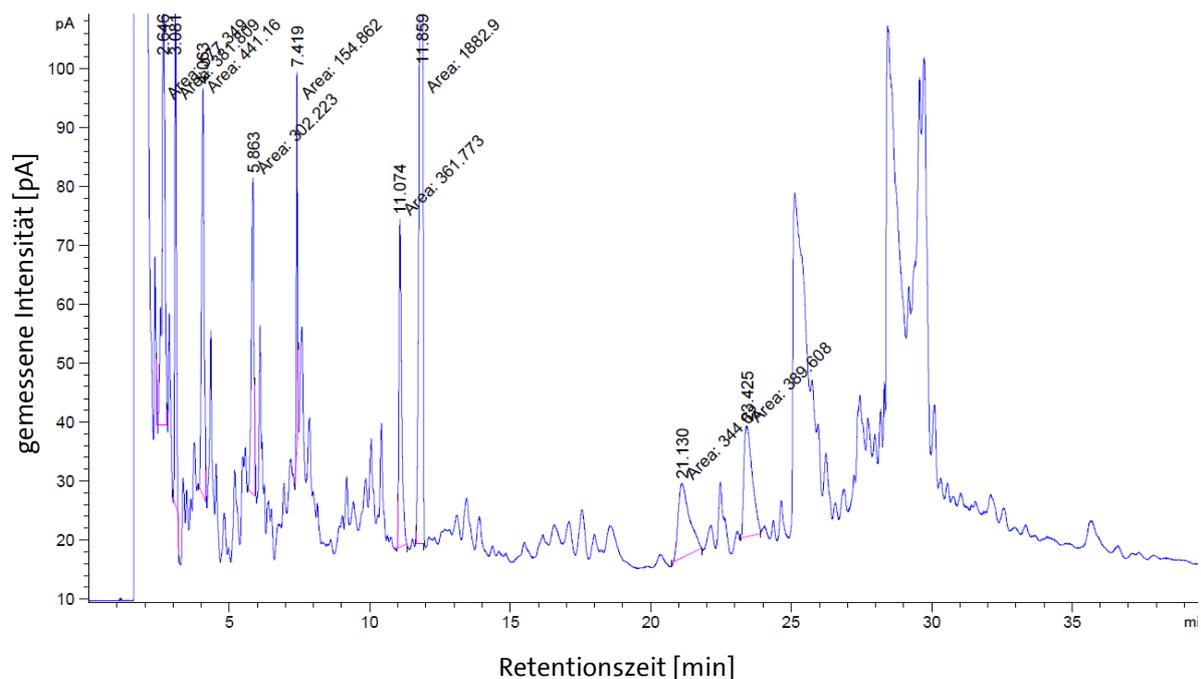


Abbildung 13: GC-FID-Chromatogramm des isolierten Standards m/z 817, Veresterung erfolgt nach Kapitel 14.5. Aufgetragen wurde die Retentionszeit [min, x-Achse] gegen die gemessene Intensität [pA, y-Achse]. Relevante Peaks sind jeweils mit Retentionszeit und berechneter Peakfläche beschriftet, diese Daten können Tabelle 6 entnommen werden.

Die Tabellen 6 und 7 stellen eine mögliche Zuordnung der Fettsäuren dar.

Tabelle 6: Mittleres GC-FID gemessene Peaks des Standards m/z 817 mit Retentionszeit, Peakfläche und einer möglichen Fettsäure Zuordnung.

SQDG m/z 817		
Ret. Zeit [min]	Peakfläche [au]	Mögliche Fettsäure
2,6	577,3	-
3,1	381,8	C8:0
4,1	441,2	C10:0
5,9	302,2	C12:0
7,4	154,9	(BHT)
11,1	361,8	C16:1
11,9	1883	C17:0
21,1	344,6	-
23,4	389,6	-

Der isolierte Standard m/z 817 lieferte durch die GC-FID Messung nach der Umesterung neun Peaks. Davon konnten anhand des externen Standards fünf Peaks bestimmten Fettsäuremethylestern zugeordnet werden. Bei dem Peak bei Retentionszeit 7,4 handelt es sich um BHT welches als Antioxidans der Reaktionslösung zugegeben wurde. Die höchste Intensität weist der Peak bei Retentionszeit 11,9 auf. Hier könnte es sich um Margarinsäuremethylester ($C_{17:0}$) handeln. Dieser eluiert im FSME-Standard ebenfalls bei einer Retentionszeit von 11,9. Weiterhin wurden Peaks bei den Retentionszeiten 3,1, 4,1, 5,9, 11,1 min detektiert, welche anhand des externen Standards bestimmten Fettsäuremethylestern zugeordnet werden konnten. Bei einer Retentionszeit von 3,1 min eluierte im externen Standard der Fettsäuremethylester C8:0, bei der Retentionszeit 4,1 min der Fettsäuremethylester C10:0, bei der Retentionszeit 5,9 min der Fettsäuremethylester C12:0 und bei der Retentionszeit 11,1 min der Fettsäuremethylester C16:1.

Das fünf mögliche Fettsäuremethylester in der Probe nachgewiesen werden konnte, führt dazu, dass 25 mögliche Kombinationen der Fettsäuren in SQDGs möglich sind. Jedoch kann in keiner Kombination der mittels GC-FID gemessenen Fettsäuren ein SQDG mit der Masse 817 gebildet werden. Die nachgewiesenen Fettsäuren weisen alle ein zu geringes Molekulargewicht auf. Mittels MALDI-TOF-MS wurden neben der Zielsubstanz m/z 817 auch folgende SQDGs nachgewiesen: 725, 806, 822. Um ein SQDG m/z 822 zu bilden wäre die Verknüpfung von zwei Margarinsäuren oder einer Kombination aus je einer Stearin- und Palmitinsäure notwendig. Margarinsäure wurde mittels GC-FID mit einem sehr großen Anteil nachgewiesen. Eine mögliche Kombination die ein SQDG mit m/z 806 bilden würde, ist eine Verknüpfung mit dem Fettsäuren Margarinsäure und Palmitoleinsäure. Die beide ebenfalls mittels GC-FID nachgewiesen wurden. Es wurden so Fettsäuren mittels GC-FID nachgewiesen die rechnerisch SQDGs mit der mittels MALDI-TOF-MS detektierten Masse bilden können. Jedoch ist es sehr verwunderlich, dass das SQDG welches bei der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS den größten Teil ausgemacht hat, mittels GC-FID gar nicht nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Begründung könnte sich in der verwendeten Lipase finden. Die verwendete Lipase aus *Rhizopus* sp. weist eine 1,3-Regioselektivität auf. Sie spaltet daher vorwiegend die sn-1 Fettsäuren. Weiterhin verfügt diese Lipase eine maximale Aktivität gegenüber mittelkettigen Fettsäuren ($C_8 - C_{10}$) [67].

Dies könnte erklären, warum diese Fettsäuren auch in größerer Menge in der Probe nachgewiesen werden konnten und andere, länger-kettige Fettsäuren gar nicht detektiert wurden.

Nachfolgend ist in Abb. 14 das GC-FID Chromatogramm der FSME Messung des Standards m/z 833 dargestellt.

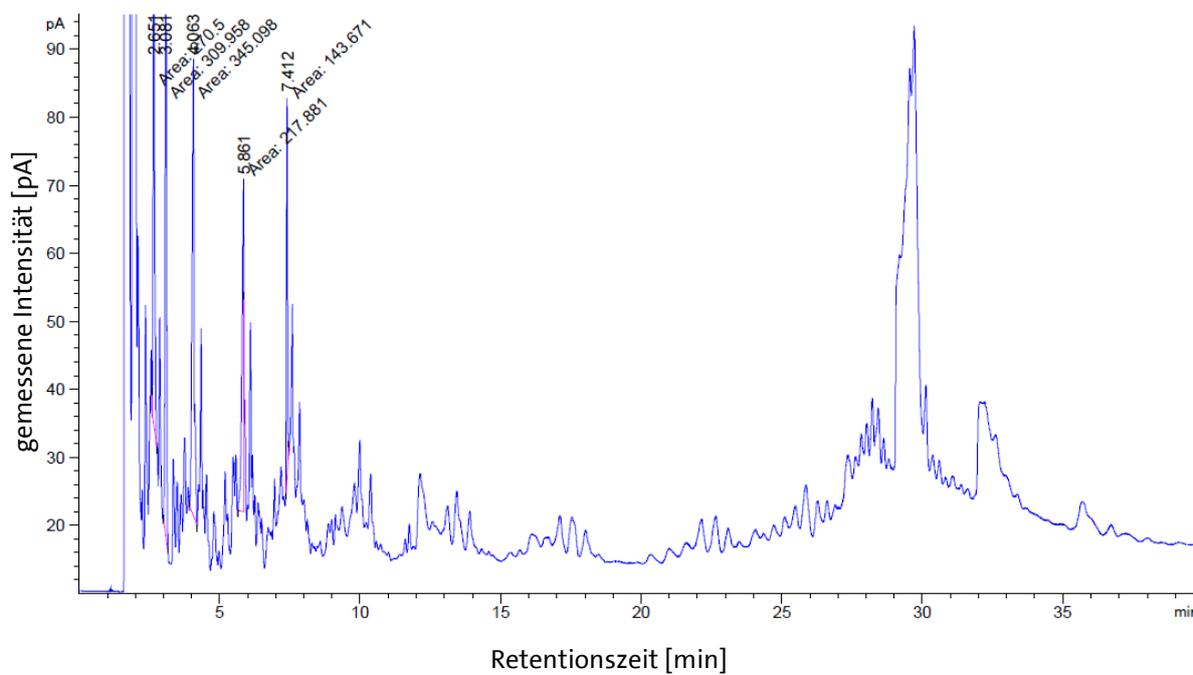


Abbildung 14: GC-FID Chromatogramm des isolierten Standards m/z 833. Veresterung erfolgt nach Kapitel 14.5. Aufgetragen wurde die Retentionszeit [min, x-Achse] gegen die gemessene Intensität [pA, y-Achse]. Relevante Peaks sind jeweils mit Retentionszeit und berechneter Peakfläche beschriftet, diese Daten können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: Mittles GC-FID gemessene Peaks des Standards m/z 833 mit Retentionszeit, Peakfläche und einer möglichen Fettsäure Zuordnung.

SQDG m/z 833		
Ret. Zeit [min]	Peakfläche [au]	Mögliche Fettsäure
2,7	270,5	-
3,1	310,0	C8:0
4,1	345,1	C10:0
5,9	217,9	C12:0
7,4	143,7	(BHT)

Im zweiten Standard mit der Zielsubstanz m/z 833 wurden 5 Peaks (Retentionszeit 2,7, 3,1, 4,1, 5,9, 7,4 min) detektiert. Drei dieser Peaks konnten anhand des externen Standards bestimmten Fettsäuremethylestern zugeordnet werden. Bei dem Peak mit Retentionszeit 7,4 min handelt es sich ebenfalls wieder um zugesetztes BHT. Bei einer Retentionszeit von 3,1 min eluierte im externen Standard der Fettsäuremethylester C8:0, bei der Retentionszeit 4,1 min der Fettsäuremethylester C10:0 und bei der Retentionszeit 5,9 min der Fettsäuremethylester C12:0.

Mit diesen Fettsäuren ist es rechnerisch nicht möglich das SQDG m/z 833 zu bilden, da die Molekulargewichte dieser Fettsäuren zu niedrig sind. Ein anderes SQDG wurde in diesem Fall mittels MALDI-TOF-MS nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels GC-FID keine ausreichend genaue Aussage über die enthaltenen Fettsäuren gemacht werden kann. Da es sich bei einem FID, wie oben bereits beschrieben wurde, um einen nicht spezifischen Detektor handelt, ist ein hohes Grundrauschen, durch die Begleitsubstanzen aufgetreten. Dies macht eine Zuordnung der Substanzen zu den entsprechenden Peaks schwer. Darüber hinaus war auch die Konzentration der Fettsäuren sehr gering, was die Identifizierung der Peaks ebenfalls erschwerte.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine Identifizierung der Fettsäuremethylester mittels GC-EI-MS eindeutigere Ergebnisse liefert. Für diese Versuche wurde zum einen die isolierte SQDG Lösung m/z 817. Zur Überprüfung der Methode wurde zum einen Heptadecansäure vor der Aufarbeitung zugegeben. Darüber sollte geprüft werden, ob die Umesterung erfolgreich war. Zum anderen wurde Nonadecansäuremethylester als interner Standard zugegeben. Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm des isolierten SQDG m/z 817. Die Identifizierung der Peaks erfolgte mittels NIST Datenbank der OPENChrome® Software. Im Vergleich zu den Chromatogrammen der GC-FID Untersuchungen wird direkt ersichtlich, dass die Peaks höhere Intensitäten sowie weniger Begleitmatrix enthalten ist. Durch die höhere Intensität der Peaks setzten sich diese auch eindeutig vom Grundrauschen ab und können besser integriert und ausgewertet werden.

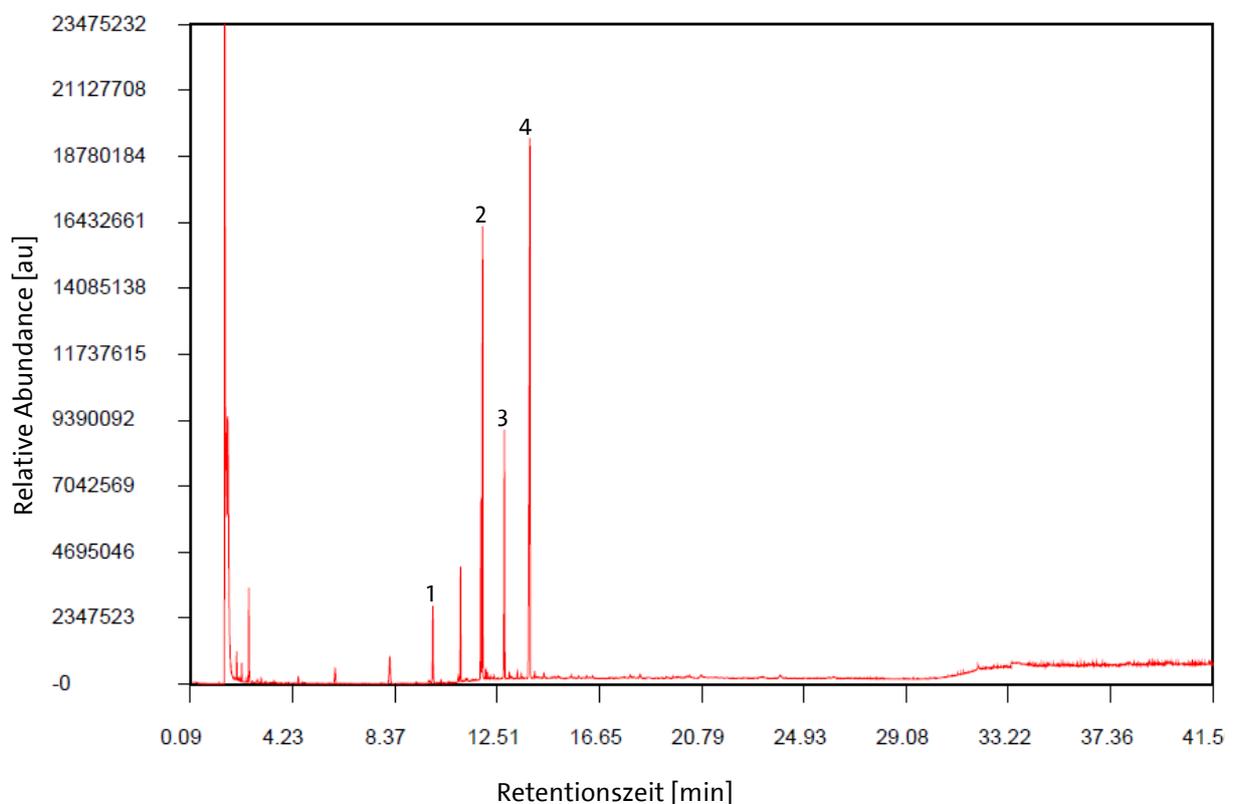


Abbildung 15: GC-EI-MS Chromatogramm des isolierten Standards m/z 817. Veresterung erfolgt nach Kapitel 14.5. Peak 1 (RT 10,96 min): Hexadecansäuremethylester, Peak 2 (RT 11,86 min): Heptadecansäuremethylester, Peak 3 (RT 12,75 min): Octadecansäuremethylester, Peak 4 (RT 13,78 min): Nonadecansäuremethylester. Peak 1 – 4 identifiziert mittels NIST-Datenbank.

Tabelle 8: Mittleres GC-EI-MS gemessene Peaks des Standards m/z 817 mit Retentionszeit, Peakfläche und einer möglichen Fettsäure Zuordnung sowie der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit von OPENChrome®.

Ret. Zeit [min]	Peakfläche [au]	FSME	Übereinstimmung [%]
10,96	56933494	C16:0	92,3
11,86	277242576	C17:0	91,4
12,75	154326602	C18:0	93,2
13,78	502951100	C19:0	91,1

Im selbst isolierten Standard wurden vier Peaks detektiert. Diese konnten vier Fettsäuremethylestern zugeordnet werden. Dabei handelt es sich bei Peak 2 bei 11,86 min um Heptadecansäuremethylester und bei Peak 4 bei 13,78 min um Nonadecansäuremethylester. Bei diesen beiden Substanzen handelt es sich um die zugegebenen Standards zur Verfahrenskontrolle. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Aufarbeitung und chromatographische Trennung erfolgreich war. Bei Peak 1 (Retentionszeit 10,96 min) handelt es sich um Hexadecansäuremethylester und der Peak 3 bei Retentionszeit 12,75 min wurde als Octadecansäuremethylester identifiziert. Die Kombination dieser beiden Fettsäuren würde zu einem SQDG mit m/z 822 führen. Dieses SQDG wurde mittels MALDI-TOF-MS ebenfalls in diesem Standard nachgewiesen. Jedoch konnten auch mittels GC-EI-MS keine Fettsäuren nachgewiesen werden, die ein SQDG mit m/z 817 bilden würden.

7.3 Fazit der Isolierung reiner SQDG-Standards

Die Isolierung SQDG-haltiger Extrakte nach verschiedenen Veröffentlichungen ist gelungen und konnte mittels HPTLC nachgewiesen werden. Die erhaltenen Extrakte enthielten jedoch eine Vielzahl an verschiedenster Begleitsubstanzen, darunter auch hohe Gehalte an Chlorophyllen, welche für weitere analytische Methoden abgetrennt werden mussten. Eine Reinigung der einzelnen Extrakte konnte durch SPE sowie Säulenchromatographie oder präparativer HPLC erreicht werden. Jedoch war der Versuch SQDG Standards in ausreichender Reinheit durch verschiedene Isolierungs- und Reinigungsschritte zu gewinnen, nicht erfolgreich. Die Trennung der einzelnen SQDGs konnte in präparativem Maßstab nicht erreicht werden, wie durch verschiedene Methoden (MALDI-TOF-MS, GC-FID, GC-MS) gezeigt werden konnte. Die Entwicklung einer Fraktionierung der einzelnen SQDGs wurde in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt, da sich eine Isolierung in diesem Fall als zu Arbeits- sowie Materialintensiv herausstellte. Des Weiteren lässt sich abschließend sagen, dass es sich bei der Messung mittels MALDI-TOF-MS zwar um ein schnelles und einfach durchführbares Screeningverfahren handelt, es aber keine genaue Aussage über die Qualität einer Isolierung von Einzelstandards aus natürlichen Materialien handelt. So wurden die SQDGs, welche mittels MALDI-TOF-MS als Hauptbestandteil in einzelnen Fraktionen nachgewiesen wurden, durch andere Methoden nicht bestätigt. Eine Alternative zur präparativen Darstellung von SQDGs als Standardsubstanzen, ist die Darstellung über chemische Synthese. Da es sich dabei um ein sehr aufwendiges Verfahren handelt, wurde dies in einer separaten Promotionsarbeit durchgeführt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher doch auf den einen kommerziell erwerblichen Standard zurückgegriffen und mit diesem eine Methode zur Quantifizierung entwickelt.

8 Analytik zur Quantifizierung von SQDGs

Parallel zur Entwicklung einer Methode zur Darstellung mehrerer ausreichend reiner Standards wurde eine Probenvorbereitungsmethode entwickelt, mit welcher auch gebundene SQDGs mit isoliert werden können, um eine quantitative Bestimmung gewährleisten zu können. Die Entwicklung einer quantitativen Isolierung der freien und gebundenen SQDGs erforderte zunächst eine erweiterte und optimierte Probenvorbereitungsmethode.

8.1 Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode

Zunächst sollte eine Methode zur quantitativen Isolierung von SQDGs aus aquatischen sowie pflanzlichen Organismen entwickelt werden. Da es sich bei getrockneten Pflanzenmaterialien um hoch komplexe Matrices handelt, ist die Entwicklung einer sicheren und zuverlässigen Isolierungsmethode um SQDGs quantitativ aus pflanzlichen Matrices zu isolieren, unabdingbar. Erschwerend kommt hinzu, dass SQDGs hauptsächlich gebunden in Zellmembranen vorliegen. Ziel der Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode war auch eine Erfassung dieser in Zellmembranen gebundenen SQDGs. Zunächst stellte sich daher die Frage nach einem geeigneten Verfahren zum Zellaufschluss sowie dem idealen Extraktionsmittel. Es wurden verschiedene Lösungsmittelsysteme in Anlehnung an die in Kapitel 7 durchgeführten Extraktionen ausgewählt und sowohl 0,5 als auch 1,0 g *Spirulina* sp. damit extrahiert. Durch die verschiedenen Einwaagen sollten Übersättigungsphänomene ausgeschlossen werden. Die Rohextrakte wurden mittels HPTLC auf ihren SQDG Gehalt sowie andere Begleitsubstanzen, die mit extrahiert wurden, untersucht. Um die Extraktion der verschiedenen Lösungsmittelsysteme bewerten zu können, wurden sie mittels HPTLC dünnschichtchromatographisch aufgetragen und entwickelt. Abb. 16 zeigt beispielhaft eine entwickelte HPTLC Platte mit verschiedenen *Spirulina* sp.-Extrakten.

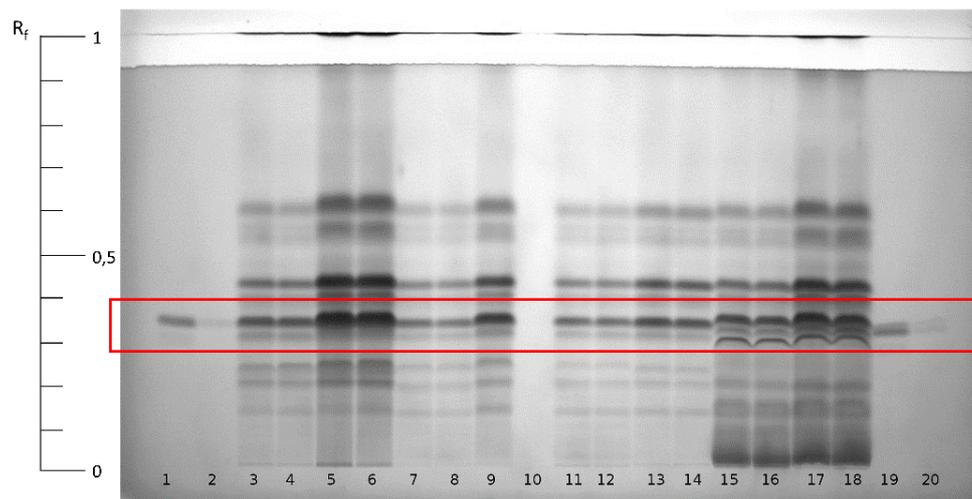


Abbildung 16: Untersuchung verschiedener Lösungsmittelsysteme (vgl Tab. 9) zur Extraktion von SQDGs. Entwickelt und derivatisiert nach Kapitel 14.3. Die Belegung der Banden 1 – 20 ist in Tabelle 9 aufgeführt. Die Höhe der SQDG-Banden ist rot markiert.

Tabelle 9: Belegung der HPTLC Platte aus Abbildung 16.

Position	Lösungsmittelsystem	Einwaage [g]
1, 19	kommerzieller SQDG-815-Standard (Avanti® Polar Lipids, Inc, Alabaster, USA)	1 g/L
2, 20	kommerzieller SQDG-815-Standard (Avanti® Polar Lipids, Inc, Alabaster, USA)	0,5 g/L
3, 4	Chloroform/Methanol (3/2; v/v)	0,5
5, 6	Chloroform/Methanol (3/2; v/v)	1
7, 8	Methyl tert-butyl ether (MTBE) /Methanol (3/2; v/v)	0,5
9, 10	MTBE/Methanol (3/2; v/v)	1
11, 12	Ethanol	0,5
13, 14	Ethanol	1
15, 16	Ethanol/Methanol/Wasser (3/3/1.5; v/v/v)	0,5
17, 18	Ethanol/Methanol/Wasser (3/3/1.5; v/v/v)	1

Der kommerziell erworbene SQDG-815-Standard (Abb. 16, Position 1, 2, 19, 20) wurde sowohl aus einer Lösung mit einer Konzentration von 0,5 g/L und 1 g/L aufgetragen. Es wird dabei ersichtlich, dass die der Standard eine deutliche Bande bei einem Retentionsfaktor von 0,32 aufweist. Jedoch kann bei der höheren Konzentration erkennen, dass es der Standard auch eine Verunreinigung enthält. Dies wurde auch mittels LC-ESI-MS/MS bestätigt. Bei der Verunreinigung handelt es sich um ein weiteres SQDG. Betrachtet man die anderen Lösungsmittelsysteme, sieht man, dass alle eine hohe Affinität zu SQDGs aufweisen und eine ähnlich intensive Bande auf Höhe des SQDG Standards aufweisen. Bewertet man allerdings die Matrixbestandteile, die von den entsprechenden Lösungsmittelsystemen extrahiert wurden, fällt auf, dass besonders die Mischung aus Ethanol/Methanol/Wasser (3/3/1.5; v/v/v) (Abb. 16, Position 15 - 18) einen großen Anteil an Fremdbestandteilen mitextrahiert hat. Reines Ethanol (Abb. 13, Position 11 - 14) sowie das Lösungsmittelsystem Methyl-tert-butylether (MTBE)/Methanol (3/2, v/v) (Abb. 16, Position 7 - 10) führte zu einer geringeren Extraktion von Begleitmatrix. Jedoch war auch der Gehalt an extrahierten SQDGs bei diesen Extraktionslösungen auch am geringsten. Die Extraktionskraft gegenüber SQDGs ist daher bei diesen Lösungsmittelsystemen nicht groß genug.

Das Lösungsmittelsystem aus Chloroform/Methanol (3/2, v/v) (Abb. 16, Position 3 - 6) scheint am geeignetsten zu sein. Es weist den höchsten Extraktionsgrad auf und zeigt eine ähnlich starke Extraktion von Begleitsubstanzen. Auch in Kapitel 7 wurde das Lösungsmittelsystem Chloroform und Methanol bereits als effektivstes Lösungsmittelsystem beschrieben.

Wie bereits beschrieben liegen die SQDGs in Pflanzenmaterialien hauptsächlich gebunden in den Membranen vor uns es sollte in einem weiteren Schritt eine mechanische Bearbeitung der Probe untersucht werden. Da vermutet wurde, dass dadurch gebundene SQDGs besser extrahiert werden können. Für einen mechanischen Zellaufschluss wurde die Verwendung einer Kugelmühle untersucht. Dabei wird das Probenmaterial in einer Plombe unter starker Schwingung mit Kugeln bearbeitet und so die Zellen aufgeschlossen. Es wurden parallel *Spirulina sp.*-Proben mit vorherigem Zellaufschluss und ohne Zellaufschluss extrahiert.

Beide Ansätze wurden fünf Mal mit Chloroform/Methanol (3/2, v/v) extrahiert und nach jedem Extraktionsschritt das gewonnene Extrakt mittels LC-ESI-MS/MS auf den Gehalt an Sulfolipiden untersucht.

Zur Bestimmung des Sulfolipidgehalts, wurde repräsentativ der Gehalt an SQDG 815 betrachtet, da dieses SQDG das dominante Sulfolipid in der vorliegenden Matrix darstellt und auch nach dem 5. Extraktionsschritt noch nachweisbar war. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Extraktion ohne vorherigen Aufschluss mittels Kugelmühle. Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der Extraktion mit vorherigem Aufschluss mittels Kugelmühle. Es wird ersichtlich, dass der Gesamtgehalt nach fünffacher Extraktion nach Zellaufschluss mittels Kugelmühle deutlich höher ist. Auch ohne vorangegangene Zellaufschluss kann der Gehalt an SQDGs bei der Extraktion durch eine Erhöhung der Extraktionsschritte erhöht werden. Dies hätte jedoch einen erhöhten Verbrauch an Lösungsmittel und eine arbeitsintensivere Aufarbeitung zur Folge. Die Ergebnisse aus Tabelle 11 und 12 wurden zur Veranschaulichung in einer Grafik aufgetragen. Diese ist in Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Extraktion ohne vorherigen Aufschluss mittels Kugelmühle.

Extraktionsstufe	Peakfläche [counts] bezogen auf SQDG m/z 815	Anteil [%]
1	4,86E+06	73,33
2	4,86E+06	20,54
3	4,86E+06	5,27
4	4,86E+06	0,72
5	4,86E+06	0,14
Gesamtgehalt	4,86E+06	100

Tabelle 11: Ergebnisse der Extraktion mit vorherigem Aufschluss mittels Kugelmühle.

Extraktionsstufe	Peakfläche [counts] bezogen auf SQDG m/z 815	Prozentualer Anteil [%]
1	4,01E+06	57,90
2	1,22E+06	17,54
3	1,32E+06	19,06
4	2,34E+05	3,37
5	1,47E+05	2,12
Gesamtgehalt	6,93E+06	100

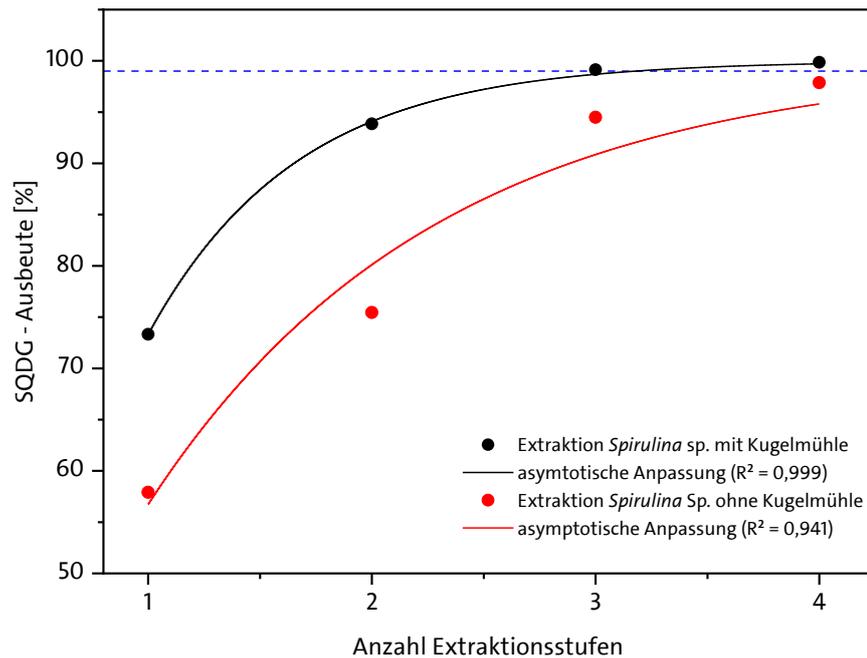
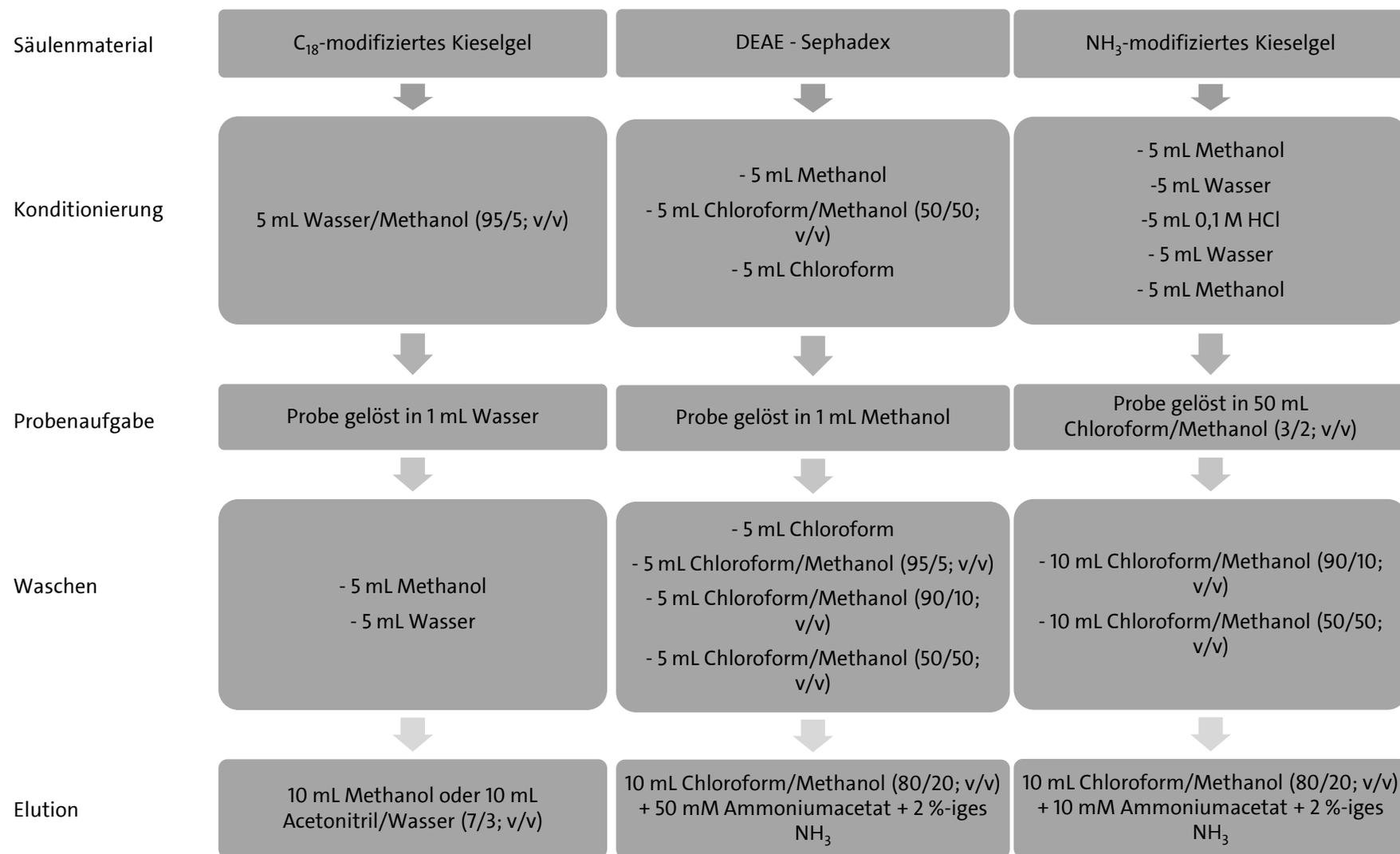


Abbildung 17: Ausbeute an SQDG durch Extraktion mit vorangehendem Aufschluss mit Kugelmühle (schwarz) und Extraktion ohne mechanischem Zellaufschluss (rot).

8.2 Festphasenextraktion

Festphasenextraktionen (SPE) bieten in der Analytik zwei große Vorteile. Zunächst kann mittels SPE eine Reinigung der Untersuchungslösung vorgenommen werden und parallel eine Konzentrierung der Zielmoleküle erfolgen. Es wird dabei die Adsorption der Zielmoleküle und der Matrixbestandteile zur gewählten Festphase genutzt. In verschiedenen Wasch- und abschließenden Elutionsschritten mit unterschiedlich starken organischen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmitteln mit unterschiedlichem pH-Werten werden zunächst unerwünschte Matrixbestandteile entfernt und abschließend mit einem passenden Elutionsmittel die Zielmoleküle wieder von der Festphase gelöst. Dies ist häufig notwendig, um hochsensitive Geräte wie Massenspektrometer vor einer Verschmutzung durch mitextrahierte Stoffe zu schützen. In diesem Falle stellen vor allem co-eluierende Chlorophylle ein Problem in der Analytik da. Da SQDGs zusätzlich in sehr kleinen Konzentrationen im Pflanzenmaterial vorliegen, ist es von Vorteil die Konzentration der Stoffe vor weiteren analytischen Schritten in der Probe zu erhöhen, indem eine Konzentrierung an der Festphase vorgenommen wird. Durch den Einsatz der SPE kann also die Probe gereinigt und der Gehalt an SQDGs konzentriert werden. Dies führt zu einer Steigerung der chromatographischen Empfindlichkeit und Verbesserung der Nachweisgrenze. Sowie einer Verringerung von Matrixeffekten und schützt das Messsystem vor übermäßiger Kontamination.



Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus weisen SQDGs einen amphiphilen Charakter auf und es bieten daher unterschiedliche Festphasen ein mögliches Potential zur Reinigung und Konzentrierung der Probe an. Daher wurde zum einen ein Octadecyl-modifiziertes Kieselgel mit Affinität zum unpolaren Teil der SQDGs getestet und zum anderen zwei Kieselgele, die so modifiziert wurden, dass sie eine Anionenaustausch-Funktionalität besitzen. Diese tritt selektiv in Wechselwirkung mit der, bei neutralen pH-Bedingungen, vollständig dissoziierten Sulfonatgruppe der SQDGs. Die Eluate der einzelnen Schritte (Probenauftragung, Waschschrirte und Elution) wurden jeweils separat aufgefangen und mittels HPTLC auf den Gehalt von SQDGs untersucht.

Nachfolgende Abbildung 18 zeigt die Eluate der SPE-Arbeitsschritte (Probenauftragung, Waschschrirte und Elution) nach dünnschichtchromatographischer Trennung. Die Elution wurde ebenfalls in 2 mL Fraktionen aufgefangen und separat betrachtet um das optimale Elutionsvolumen zu bestimmen.

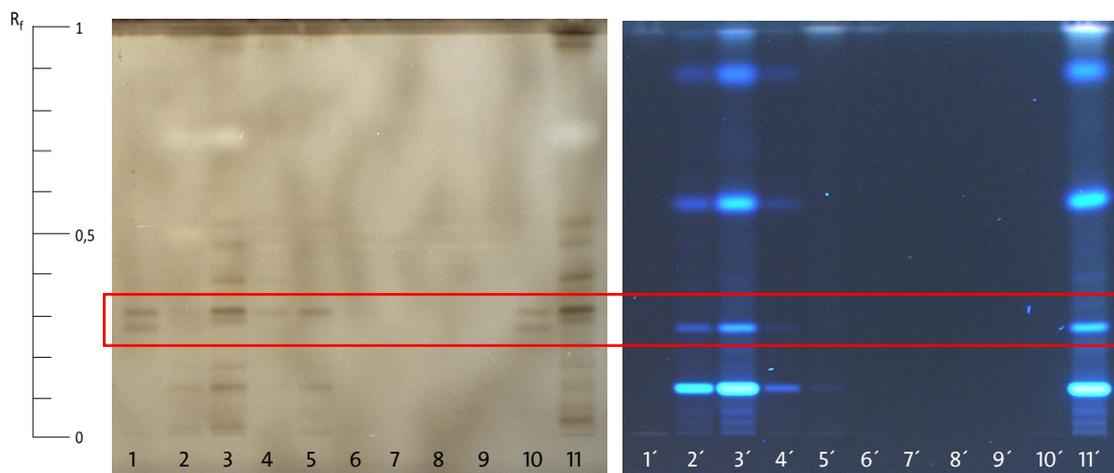


Abbildung 18: Entwickelte HPTLC-Platte der mittels SPE an octadecyl-modifiziertem Kieselgel gewonnenen Lösungen (vgl. Tab. 12). Links Aufnahme nach Derivatisierung bei sichtbarem Licht, rechts nach Derivatisierung bei UV-Licht 366 nm. Entwickelt und derivatisiert nach Kapitel 14.3. Die Belegung der Banden 1/1' – 11/11' ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Höhe der SQDG-Banden ist rot markiert.

Tabelle 12: Belegung der HPTLC-Platte aus Abbildung 18.

Position	Auftragung
1, 1'	SQDG Standard 100 ppm
2, 2'	Probenauftrag
3, 3'	Waschschrirte I 5 mL MeOH/ Wasser
4, 4'	Waschschrirte II 5 mL Wasser
5, 5'	Elution: 2 mL ACN/ Wasser (7/3; v/v)
6, 6'	Elution: 2 mL ACN/ Wasser (7/3; v/v)
7, 7'	Elution: 2 mL ACN/ Wasser (7/3; v/v)
8, 8'	Elution: 2 mL ACN/ Wasser (7/3; v/v)
9, 9'	Elution: 2 mL ACN/ Wasser (7/3; v/v)
10, 10'	SQDG-Standard 100 ppm
11, 11'	<i>Spirulina</i> sp.-Extrakt

Durch die dünnschichtchromatographische Betrachtung wird ersichtlich, dass bereits nach Probenauftrag, während der Waschschriffe und zum Teil auch während der Elution von der Festphase der SPE gespült wurden. Neben den SQDGs wurden auch andere unspezifische Substanzen während des Waschschriffes eluiert. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass es sich bei diesem SPE-Ansatz, um ein nicht geeignetes Verfahren handelt um die SQDGs spezifisch an die Festphase zu binden und dann durch einen geeigneten Spülschritt zu eluieren. Dies kann daran liegen, dass die Adsorption an das vorliegende octadecyl-modifizierte Kieselgel nicht stark und spezifisch genug ist, um die SQDGs beständig zu binden ohne zu parallel auch unspezifisch Begleitsubstanzen zu binden. Es wurde zusätzlich versucht, durch eine Erhöhung des Wasseranteils die Elutionsstärke im Waschschritt zu verringern. Dies führte zwar zu einer gemilderten Elution der SQDGs. Jedoch wiesen die Begleitsubstanzen ein ähnliches Verhalten auf und konnten durch die veränderte Waschlösung ebenfalls nicht mehr von der Festphase getrennt werden und damit keine ausreichende Reinigung der Probe erreicht werden. Es wurde anhand des internen Standards auch eine Wiederfindungsrate für das Verfahren bestimmt. Diese lag bei 41,1 % für die Elutionsfraktionen.

Diese Wiederfindungsrate spiegelt gut, die in der Abbildung sichtbar gemachten Verluste an SQDGs während der Probenauftragung und der Waschschriffe. Abschließend lässt sich also sagen, dass die SQDGs keine ausreichend, spezifischen Bindungen mit der vorliegenden Festphase eingehen und es zu hohen Verlusten und keiner Reinigung während der Durchführung der SPE kommt.

Parallel zum octadecyl-modifizierten Kieselgel wurde eine Trennung und Reinigung an DEAE-modifiziertem Sephadex betrachtet. Nachfolgende Abbildung 19 zeigt, dass die Anionen-Austauschfunktionalität des DEAE-modifizierte Sephadex eine deutlich selektivere Trennung der SQDGs erlauben, als das zuvor beschriebene octadecyl-modifizierte Kieselgel.

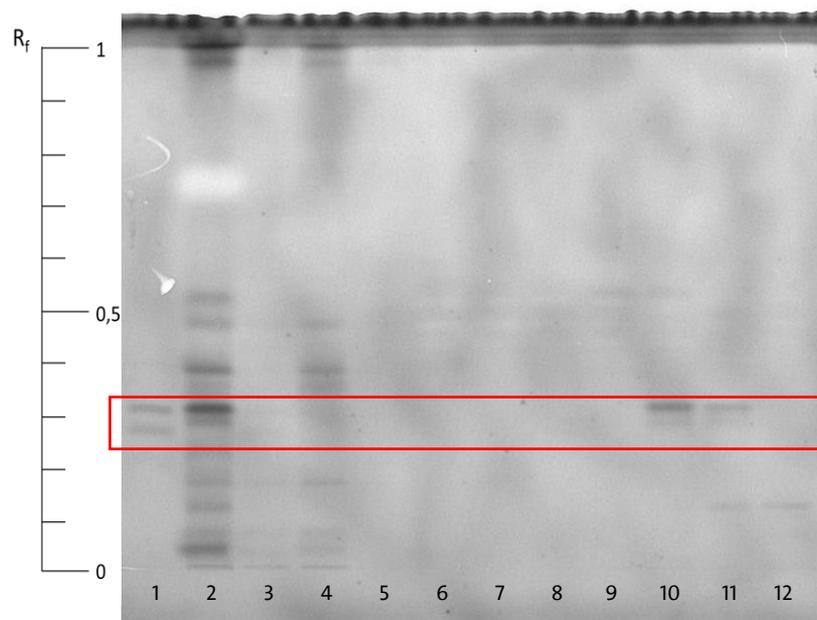


Abbildung 19: Entwickelte HPTLC Platte der mittels SPE an DEAE gewonnenen Lösungen (vgl. Tab. 13). Entwickelt und derivatisiert nach Kapitel 14.3. Die Belegung der Banden 1 – 12 ist in Tabelle 13 dargestellt. Die Höhe der SQDG-Banden ist rot markiert.

Tabelle 13: Belegung der HPTLC Platte aus Abbildung 19.

Position	Auftragung
1,	SQDG Standard 100 ppm
2	<i>Spirulina</i> sp.-Extrakt
3	Probenauftrag
4	Waschen: 5 mL CHCl ₃
5	Waschen: 2,5 mL CHCl ₃ /MeOH (95/5; v/v)
6	Waschen: 2,5 mL CHCl ₃ MeOH (95/5; v/v)
7	Waschen: 5 mL CHCl ₃ /MeOH (90/10; v/v)
8	Waschen: 5 mL CHCl ₃ /MeOH (50/50; v/v)
9	Elution: 2 mL Chloroform/Methanol (80/20; v/v) + 100 mM Ammoniumacetat + 2 %-iges NH ₃
10	Elution: 2 mL Chloroform/Methanol (80/20; v/v) + 100 mM Ammoniumacetat + 2 %-iges NH ₃)
11	Elution: 2 mL Chloroform/Methanol (80/20; v/v) + 100 mM Ammoniumacetat + 2 %-iges NH ₃
12	Elution: 2 mL Chloroform/Methanol (80/20; v/v) + 100 mM Ammoniumacetat + 2 %-iges NH ₃

Es ist deutlich zu erkennen, dass die SQDGs weder nach der Probenauftragung (Abb. 19 Bande 3) noch während der Waschschritte (Abb. 19 Bande 4 - 8) von der Festphase gespült werden. Die Begleitmatrix kann jedoch durch die Waschschritte deutlich reduziert werden. Vor allem durch den Waschschritt mit Chloroform (Abb. 19 Bande 4) konnte ein großer Teil der Begleitsubstanzen abgetrennt werden. Auch der Waschschritt mit Chloroform/Methanol (90/10; v/v) (Abb. 19 Bande 7) führte durch eine leichte Erhöhung der Polarität des Lösungsmittelgemischs, zu einer Abtrennung weiterer, unspezifischer Begleitstoffe. Durch den Waschschritt mit Chloroform/Methanol (95/5; v/v) (Abb. 19 Bande 5 und 6) konnte keine Trennung von Begleitsubstanzen erzielt werden. Es scheint, dass der Polaritätswechsel von Waschschritt 1 zu Waschschritt 2 nicht groß genug war. Daher wurde dieser waschschritt in der weiteren Methodenentwicklung im späteren Verlauf durch eine Verdopplung des Volumens der Waschlösung Chloroform/Methanol (90/10; v/v) ersetzt. Nach der Abtrennung einiger unspezifischer Matrixbestandteile konnte die Lösung der Sulfolipide von der Festphase nach 4 mL Elutionsmittel erreicht werden und erforderte insgesamt 6 mL bis zur vollständigen Elution (Abb. 19 Bande 9 - 12). Auch für die Durchführung der SPE mit DEAE-modifiziertem Sephadex wurde eine Wiederfindungsrate bestimmt. Diese lag in diesem Fall bei 76,1 %. Die SPE mit DEAE-modifiziertem Sephadex zeigt also nicht nur eine deutlich selektivere Trennung der SQDGs von der Begleitmatrix als die SPE mit octadecyl-modifiziertem Kieselgel, sondern weist auch einen geringeren Verlust von SQDGs auf. Man kann jedoch erkennen, dass mit den SQDGs auch in diesem Fall noch unspezifische Begleitsubstanzen eluieren (Abb. 19 Bande 9 – 12). Diese verhalten sich ähnlich wie die SQDGs und eluieren erst nach einer Erhöhung der Ionenstärke durch Ammoniumacetat im Elutionsmittel. Es wird daher vermutet, dass es sich ebenfalls um anionische Verbindungen handeln könnte. Ein Vergleich mit einer ähnlichen Studie legen nahe, dass es sich um Phospholipide handeln könnte [64].

Abschließend lässt sich sagen, dass das DEAE-modifizierte Sephadex eine gute Selektivität und Trennvermögen gegenüber den SQDGs aufweist. Allerdings ergaben sich mit der Handhabung der Durchführung der SPE mit DEAE-modifiziertem Sephadex einige Schwierigkeiten und Nachteile. Zunächst mussten die Säulen mit DEAE-modifiziertem Sephadex selbst gepackt werden, daraus folgte ein hoher Arbeitsaufwand und führte auch zu Problemen mit der Reproduzierbarkeit. Ein weiteres, schwerwiegendes Problem, war, dass der Polaritätswechsel von Methanol zu Chloroform zu einer starken Verminderung der Durchflussrate führte. Nach dem Lösungsmittelwechsel zeigte das Säulenmaterial eine starke Kontraktion, so dass auch unter Druck (> 1 bar) nur noch eine Durchflussrate von 0,3 mL/min erreicht wurde und dadurch ein sehr großer Zeitaufwand für die Durchführung der SPE folgt. Da jedoch nach Etablierung der Methode ein Screening zahlreicher Proben folgen sollte, war das Ziel der Methodenentwicklung möglichst zeiteffizient zu sein und es wurde ein weiteres Festphasensystem mit kommerziell erhältlichem aminopropyl-modifiziertem Kieselgel untersucht. Zunächst wurde wie bei den vorhergehenden Untersuchungen die einzelnen Schritte der SPE isoliert aufgefangen und mittels HPTLC getrennt und betrachtet. Abb. 20 zeigt die Eluate der einzelnen SPE-Schritte an aminopropyl-modifiziertem Kieselgel.

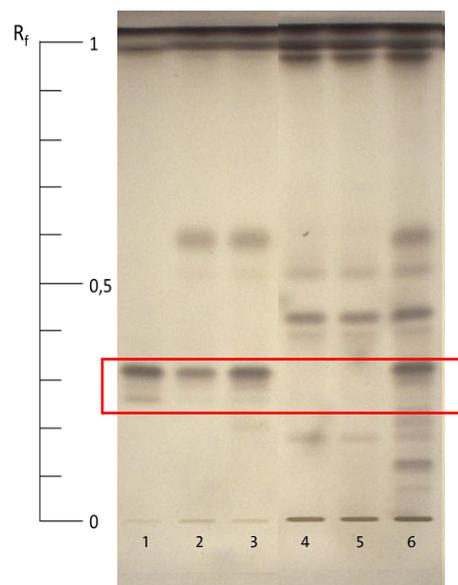


Abbildung 20: Entwickelte HPTLC Platte der mittels SPE an aminopropyl-modifiziertem Kieselgel gewonnenen Lösungen (vgl. Tab. 14). Entwickelt und derivatisiert nach Kapitel 14.3. Die Belegung der Banden 1–6 ist in Tabelle 14 dargestellt. Die Höhe der SQDG-Banden ist rot markiert.

Tabelle 14: Belegung der HPTLC Platte aus Abbildung 20.

Position	Auftragung
1,	SQDG Standard 100 ppm
2	Elution: 10 mL Chloroform/Methanol (80/20; v/v) + 10 mM Ammoniumacetat + 2 %-iges NH ₃
3	Elution: 10 mL Chloroform/Methanol (80/20; v/v) + 10 mM Ammoniumacetat + 2 %-iges NH ₃
4	Waschen: 10 mL CHCl ₃ /MeOH (90/10; v/v)
5	Waschen: 10 mL CHCl ₃ /MeOH (50/50; v/v)
6	<i>Spirulina</i> sp.-Extrakt

Es ist zu erkennen, dass bei der Verwendung von aminopropyl-modifiziertem Kieselgel als Festphase mehr unspezifische Substanzen mit den SQDGs eluieren als bei der Verwendung von DEAE-modifiziertem Sephadex. Der Grund hierfür liegt jedoch nicht an der Festphase, sondern an einer Erhöhung der Ionenstärke des Elutionsmittel. Im vorliegenden SPE-Versuch wurde eine Verdopplung der Ammoniumacetat-Konzentration sowie ein Zusatz von 2 % Ammoniak vorgenommen, um eine verbesserte Elution der SQDGs zu erreichen. Neben der Elution der Begleitsubstanzen konnte jedoch auch Wiederfindungsraten von 96 % für Alfalfa, 89 % für Brennnessel und 73 % für *Spirulina* sp. erreicht werden.

Die stärkere Verunreinigung der Probe wurde für eine Verbesserung der Wiederfindungsrate in Kauf genommen. Da im weiteren Verlauf der Aufarbeitung und Trennung mittels HPLC eine weitere Kompensierung der Verunreinigung erfolgt und daher toleriert werden kann.

9 Entwicklung der LC-ESI-MS/MS-Methode

Die Kombination aus Flüssigchromatographie (LC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) hat sich in den vergangenen Jahren zu einem Standardverfahren in der Analytik von ionisierbaren Biomolekülen etabliert. LC-MS/MS Methoden bieten ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten. Es können sowohl qualitative Screening Methoden zum reinen Nachweis von Substanzen durchgeführt werden, aber auch quantitative Bestimmungen von mehreren Substanzen in einer Analyse durchgeführt werden. Durch verschiedene Ionisierungstechniken kann die LC-MS/MS Methodik für die Untersuchung eines breiten Spektrums verschiedenster Substanzen verwendet werden. Auch im Bereich der SQDGs sind bereits LC-MS/MS Methoden veröffentlicht. Diese bereits publizierte Methoden zur Qualifizierung oder Quantifizierung stoßen jedoch entweder mit ihrer Selektivität oder Sensitivität recht schnell an ihre Grenzen. Die meisten der Methoden bestimmen SQDGs nach wie vor als Summenparameter. In dieser Arbeit sollte daher eine Methode zur selektiven und sensitiven Detektion von SQDGs entwickelt werden. Insbesondere die LC-MS/MS Analytik hat sich bei komplexen Fragestellungen als leistungsstarkes Instrument der Analytik bewiesen. Aufgrund vielseitiger Ionisierungstechniken, kann mittels LC-MS/MS Methoden eine Vielzahl an sehr verschiedenen Analyten untersucht werden. Bei klinischen oder bioanalytischen Fragestellungen ist die *Electron-Spray-Ionisation* (ESI) die am meist genutzte Technik [68].

9.1 Entwicklung der MRM-Methode

Für die Entwicklung einer sensitiven und selektiven Detektionsmethode wurde das sogenannte *Multiple-Reaction-Monitoring* (MRM) verwendet. Ein großer Vorteil des MRM Modus ist, das Erreichen hoher Sensitivitäten bei gleichzeitiger Unterdrückung von Interferenzen bei komplexen Matrices. Die MRM-Übergänge der verschiedenen SQDGs wurden durch direkte Flußinjektion eines *Arthrospira* sp.-Rohextrakts (Acetonitril/Wasser (9/1; v/v)) mit 10 mM Ammoniumacetat in die ESI-Quelle im positiven und negativen Ionisationsmodus erhalten. Der Rohextrakt wurde verwendet, da es nur einen kommerziell erhältlichen SQDG-Standard gab und es darum ging, eine Methode für mehrere SQDGs zu entwickeln. Für jedes Vorläufer-Ion, das auf der Grundlage des Vollscans (m/z 50-1000) ausgewählt wurde, wurden die drei intensivsten Fragment-Ionen (Produkt-Ionen) bestimmt. Tabelle 29 fasst die Vorläufer- und Fragment-Ionen aller in der vorliegenden Studie getesteten Verbindungen zusammen.

Die Einstellungen des Massenanalysators wurden für alle Analyten optimiert, um die Transmission und Empfindlichkeit jedes charakteristischen Massenübergangs zu maximieren. Diese Optimierungen wurden automatisch mit Hilfe des *Autotune*-Modus der Analyst®-Software 1.6.1 (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland) erfasst. Dabei wurde auf das Fragmentierungsmuster geachtet, und es wurden nur Massenzahlen mit Fragmenten, die für SQDGs typisch sind, einbezogen. Solche Fragmente von SQDGs sind m/z 81, m/z 125, m/z 153, m/z 165, m/z 225 und m/z 255. Ein umfassender Überblick über das Fragmentierungsmuster ausgewählter SQDGs wurde von Zhang et al. veröffentlicht [51]. Abbildung 1 zeigt beispielhaft die Fragmentierung des SQDG^o816. Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur der verschiedenen SQDGs basiert auf der Masse [M-H]. Das bedeutet zum Beispiel, dass SQDG 817 die Masse m/z 816 [M-H] als Hauptfragment in der MRM-Methode hat. Weiterhin ist in Abbildung 1 beispielhaft dargestellt, welche Fragmente als dominante Bestandteile bei der Ionisierung im negativen Modus gebildet werden. Es handelt sich dabei hauptsächlich um die Fragmente mit einem Masse-/Ladungsverhältnis von m/z 81 und m/z 225. Weitere Fragmente entstehen durch die Trennung der Fettsäuren. Diese Massen lassen eine Unterscheidung und Identifizierung der SQDGs. In der beispielhaften Abbildung handelt es sich um die Fragmente m/z 537 und m/z 559. Das Fragment m/z 537 entspricht dem Verlust der Fettsäure 18:2 (Linolsäure) und m/z 559 der Fettsäure 16:0 (Palmitinsäure). Eine weitere Identifizierung der Fettsäuren war nicht immer möglich, da es sich bei einigen Sulfolipiden um isobare Verbindungen handelt, bei denen die Fettsäurekombinationen gleich sind, sich aber in ihrer Position unterscheiden. Im negativen Modus wurde nur das Fragment des intakten Fettsäureverlusts nachgewiesen. Die Messung wurde im negativen Modus durchgeführt, da Sulfolipide aufgrund ihrer stark sauren Sulfonatgruppe leicht deprotoniert werden, um das quasi-molekulare Ion [M-H] zu bilden. In dieser Arbeit wurden sowohl der negative als auch der positive Ionenmodus untersucht, aber die Ergebnisse der Ionisierung im negativen Modus waren deutlich aussagekräftiger. Der negative Ionenmodus ist besonders für elektrophile Substituenten geeignet wie die Sulfonsäuregruppe, die im Vergleich zum positiven Ionenmodus hundertmal empfindlicher nachgewiesen werden konnte. Die Intensität im positiven Modus war so gering, dass die Software nicht in der Lage war, die Daten als MRM-Ansatz zu erfassen. Möglicherweise war die Bildung der positiven Addukte nicht stabil genug, so dass keine geeigneten Fragmente aufgenommen werden konnten, da die Bildung des Sulfonsäure-Ions mit der Abspaltung eines Protons stabilere Fragmente lieferte. Dies wurde bereits von Keusgen et al. (1997) beobachtet [26]. Xu et al. (2010) beobachteten dasselbe Phänomen für SQDGs bei Verwendung des positiven Ionisierungsmodus. Obwohl sie versuchten, verschiedene Modifikatoren zur Stabilisierung der SQDG-Fragmente im positiven Modus zu verwenden, erzielten sie keine befriedigenden Ergebnisse [55]. Lu et al. (2012) veröffentlichten eine Studie über Glykolipide. Sie zeigten, dass der positive Modus für neutrale Galactolipide geeignet ist. Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) werden bevorzugt im positiven Modus nachgewiesen, während SQDGs und Phosphoglycerole (PG) als negativ geladene Glykolipide effizienter im negativen Modus ionisiert werden [69]. In neueren Veröffentlichungen wurde der positive Modus nicht mehr erwähnt. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Messungen der negative Ionenmodus verwendet, und in der vorliegenden Studie wurde eine automatische Optimierung der Verbindungen durchgeführt.

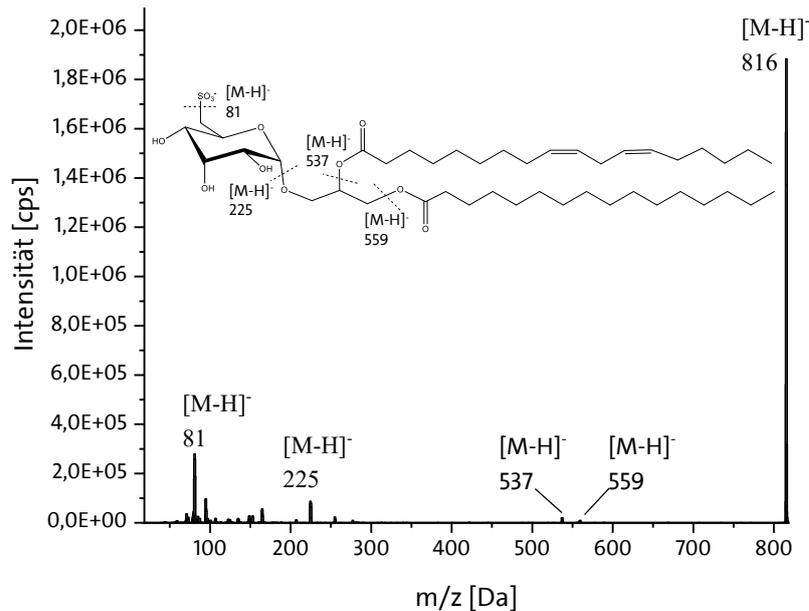


Abbildung 21: ESI-MS Spektrum der massenspektrometrischen Untersuchung des SQDG 816.

Um SQDGs eindeutig von anderen Substanzen im gleichen Massenbereich zu unterscheiden, wurden drei Analyten mit ähnlicher Masse und ähnlichen Eigenschaften ausgewählt. Bei der Verwendung von Dipalmitoylphosphatidylcholin (734 g/mol) und Sojalecithin (644 g/mol) konnten im Vollscan im negativen Ionisierungsmodus keine Peaks im Zielbereich von m/z 50-1000 gefunden werden. Für Ceramid (780 g/mol) wurden die Fragmente m/z 601 und m/z 628 im negativen Ionisierungsmodus nachgewiesen. Ihre Fragmentierungsmuster wiesen jedoch keine typischen Fragmente eines SQDGs auf. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den gefundenen Analyten tatsächlich um Sulfolipide handelt und dass sie mit Hilfe der MRM von Molekülen derselben Klasse mit ähnlichen Eigenschaften unterschieden werden können.

Neben den Vergleichssubstanzen wurde auch der interne Standard mittels MRM auf sein spezifisches Fragmentmuster untersucht. Als interner Standard wurde ein synthetisches Sulfo-Ceramid (3-O-Sulfo-D-Galactosyl- β -1'-N-Lauroyl-D-Erythro-Sphingosin) mit der molaren Masse 794 g/mol gewählt. Es ist in seiner chemischen Struktur sehr ähnlich aufgebaut wie die SQDGs und kommt natürlicherweise nicht in pflanzlichen Matrices vor. Die drei intensivsten Fragmente stellen die m/z -Verhältnisse 96,0; 58,0 und 80,0 dar. Diese sind in Tabelle 29 aufgeführt.

9.2 Entwicklung der flüssigchromatographischen Methode

In dem *Spirulina*-Pulverextrakt wurden 25 SQDGs und ein SQMG mittels MRM nachgewiesen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von SQDGs weisen die meisten von ihnen ähnliche oder gleiche Fragment-Ionen auf, welche zur Identifizierung und Quantifizierung mittels MRM herangezogen werden. Eine flüssigchromatographische Trennung vor der massenspektrometrischen Untersuchung ist daher unabdingbar. Weiterhin dient die flüssigchromatographische Trennung dazu die Ionensuppression zu reduzieren. Die Bedingungen für das flüssigchromatographische System wurden auf Grundlage einer Literaturübersicht und eines empirischen Ansatzes ausgewählt und die Ergebnisse werden im Folgenden betrachtet und diskutiert. Für die Entwicklung der flüssigkeitschromatographischen Methode wurde ein Extrakt aus *Spirulina* sp. verwendet. Als Kriterien zur Beurteilung der

Leistung der flüssigchromatographischen Methode wurde die Trennung der Analyten, die Signalintensitäten und die erhaltenen Peakformen sowie eine möglichst geringe Analysendauer bei einer ausreichenden Mindestretentionszeit bewertet.

Einfluss der stationären Phase

Das Herzstück der flüssigchromatographischen Trennung von verschiedenen Analysen stellt die Trennsäule da. In dieser befindet sich die stationäre Phase, welche sich in Hinblick auf das Säulenmaterial, Länge der Trennstrecke, Dicke des Beschichtungsmaterials und auch Partikeldurchmesser stark unterscheiden und maßgeblich an der Qualität der Trennmethode beteiligt ist. Zur Beurteilung der Chromatographieleistung einer Methode werden unter anderem eine Basislinientrennung der Analyten, die Peakform, eine hohe chromatographische Auflösung sowie eine geringe Analysendauer betrachtet. Anlehnend an die entwickelte Festphasenextraktion wurde octadecyl-modifiziertes und aminopropyliertes Kieselgel für die Trennphasen der Chromatographiesäule verwendet. Folgende Chromatographiesäulen wurden für die Methodenentwicklung getestet:

- RP C18 (Kinetex, 150 x 2,1 mm i.D., 2.6 μm , 100 \AA , Phenomenex® Inc.)
- RP NH2 (Nucleodur, 150 x 4,6 mm i.D., 3 μm , 110 \AA , Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)

Bei der Auswahl der Säulen wurde darauf geachtet, dass die Partikelgröße $>2\mu\text{m}$ ist, da bei kleineren Partikeln ein zu hoher Gegendruck entstehen könnte und damit die Verwendung einer *Ultra Performance Liquid Chromatography*-Anlage (UPLC) notwendig geworden wäre.

Aufgrund der apolaren Eigenschaften der Trennsäule können die SQDGs mittels VAN-DER-WAALS-Kräften unterschiedlich lange an dem Säulenmaterial retardiert und so voneinander getrennt werden.

In Anlehnung an Naumann (2009) wurde eine aminopropylierte Säule verwendet. Hierbei konnte jedoch keine Trennung der einzelnen Analyten erreicht werden [59]. Die Elution der SQDGs erfolgte als ein breiter Peak co-eluierender Substanzen. Für die Methodenentwicklung wurde die aminopropylierte Säule daher nicht weiter betrachtet.

Nach Keusgen et al. (1997) wurde eine RP18-Säule und ein Fluss von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ gewählt [22]. Hier konnten bereits mit dem ersten Gradienten (vgl. Abb. 22) erkennbare Peaks erhalten werden. Diese waren zwar auch nicht Basislinien getrennt und stark co-eluierend, aber die Tendenz zur besseren Peak-Bildung bereits erkennbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weitere Optimierung und Entwicklung des flüssigchromatographischen Systems mit der RP-C18-Säule (Kinetex, 150 x 2,1 mm i.D., 2.6 μm , 100 \AA , Phenomenex® Inc.) weitergearbeitet. Neben der Trennsäule haben jedoch auch die Zusammensetzung der mobilen Phase sowie andere Chromatographiebedingungen einen großen Einfluss auf die Trennung. Diese wurden im weiteren Verlauf der Arbeit optimiert und angepasst.

Einfluss des Lösungsmittels

SQDGs haben einen großen apolaren Anteil in ihrer chemischen Struktur, der von den Fettsäuren herrührt. Verschiedene SQDGs können nur durch Bindung an verschiedene Fettsäuren

unterschieden werden und werden daher sehr ähnlich stark an der Säule retardiert. Ein geeigneter Laufmittelgradient und eventuelle Zusätze von Salzen sind daher unabdingbar für eine erfolgreiche Trennung von SQDGs. Die Hersteller der Säulen geben an, dass bei einem binären System eine mobile Phase aus Wasser und die andere aus Methanol, Acetonitril oder Isopropanol bestehen sollte. Die Entwicklung der SPE zeigte bereits, dass eine Elution von SQDG mit Acetonitril an octadecyliertem Kieselgel gute Ergebnisse liefert. Daher wurde zunächst Acetonitril als mobile Phase gewählt. Tabelle 16 zeigt den ersten Laufmittelgradient, der zu Beginn der Methodenentwicklung erstellt wurde sowie den finalen Laufmittelgradienten.

Tabelle 15: erster getesteter Laufmittelgradient und finaler Laufmittelgradient.

Laufmittelgradient 1		Finaler Laufmittelgradient	
Zeit [min]	Anteil A [%]	Zeit [min]	Anteil A [%]
0	100	0	97
2	100	2	97
5	60	6	1
9	60	40	1
15	0	42	97
22	0	52	97
34	100	-	-
44	100	-	-

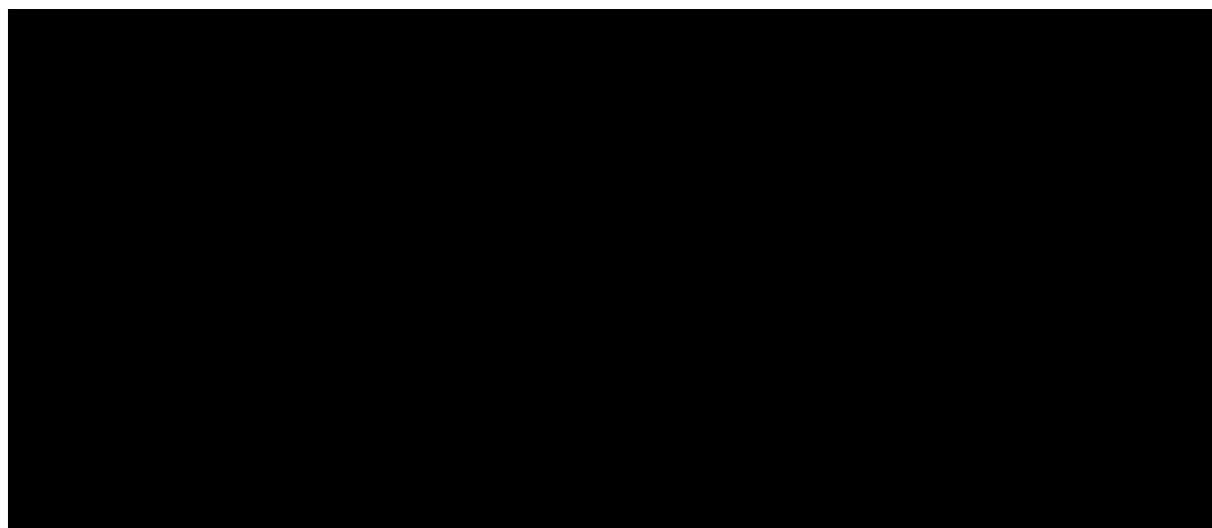


Abbildung 22: Gesamtionenchromatogramm (*total ion chromatogram*, TIC) des *Arthrospira* sp.-Extrakts (1:100 mit Acetonitril verdünnt) a) erster Gradient, b) finaler Gradient. Der zeitliche Ablauf des Gradienten ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Abb. 2 zeigt das Gesamtionenchromatogramm (*total ion chromatogram*, TIC) des *Arthrospira* sp.-Extrakts (1:100 mit Acetonitril verdünnt), der mit dem ersten HPLC-Gradienten chromatographisch getrennt wurde (Abb. 22a). Im Vergleich dazu zeigt Abb. 22b das Gesamtionenchromatogramm des MRM-Extrakts von *Arthrospira* sp. (1:100 mit Acetonitril verdünnt), das mit dem letzten HPLC-Gradienten gemessen wurde. Bei der Verwendung des ersten Gradienten überlappen sich die Peaks in einem engen Bereich zwischen der 22. und 24. Minute und es erfolgte nur eine schlechte Trennung der Analyten. Allerdings fällt bereits auf, dass

sich die Analyten im mittleren Bereich des Chromatogramms befinden und sich die Bedingungen als Basis für die Methodenentwicklung eignen. Ziel war nun, die Analyten in diesem Bereich weiter zu trennen. Aus dem Chromatogramm wird ersichtlich, dass die Elution der SQDGs während der zweiten Plateauphase erfolgt.

Die erste Plateauphase während des Laufmittelwechsels hat keinen Einfluss auf die Trennung und wurde daher im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung aus der Methode entfernt. Im Gegensatz dazu zeigt das Chromatogramm des endgültigen Gradienten, dass sich die Peaks über einen Bereich von 27 Minuten (9. bis 36. Minute) erstrecken und eine fast basale Trennung zwischen den Peaks zu erkennen ist.

Einfluss von Modifiern

Ein weiterer Parameter, der während der Methodenentwicklung betrachtet wurde, war der pH-Wert sowie der Zusatz von Modifiern zur mobilen Phase. Über die Änderung des pH-Wertes kann beeinflusst werden, ob die Analyten protoniert oder deprotoniert vorliegen und darüber die Wechselwirkung mit der stationären Phase verstärkt oder vermindert werden. Die Verwendung von Modifiern, stellt eine Möglichkeit dar, die Fragmentierung zu verbessern, da beispielsweise Ammonium-Addukte gute Fragmentierungseigenschaften aufweisen [70]. Unter anderem lässt sich dadurch aber auch die Signalintensität speziell des intensivsten Massenübergangs erhöhen. In anderen publizierten Methoden der Analytik von SQDGs werden sowohl neutrale [60], saure [47] als auch basische [52] mobile Phasen verwendet. Daher wurde auch in dieser Arbeit, der Einfluss des pH-Wertes bzw. die Zugabe von Modifiern auf die chromatographische Trennung der SQDGs untersucht. Als Ausgangssystem wurde ein Gradient aus reinem Acetonitril und bidestilliertem Wasser als Elutionsmittel verwendet. Die SQDGs eluierten mit diesem Elutionsgradient stark co-eluierend erst bei 37 min. Daher sollte zunächst Ameisensäure als Zusatz zur mobilen Phase zugegeben werden. Der abgesenkte pH-Wert, sollte dazu führen, dass die Sulfonsäure-Gruppe der SQDGs in undissoziiertem Zustand vorliegt. Durch die Protonierung der Sulfonsäure-Gruppe sollte die Polarität der SQDGs herabgesetzt werden und dadurch die Wechselwirkungen mit der Säule verringern. Es zeigte sich jedoch, dass die Verwendung von Ameisensäure nicht den gewünschten Effekt hatte. Die SQDGs eluierten weiterhin sehr spät und zudem nahm auch die Intensität des Signals ab. Die Protonierung der Sulfonsäure-Gruppe scheint keinen ausreichend großen Effekt auch die Trennung der SQDGs zu haben. Von einem sauren pH-Wert wurde daher in der weiteren Methodenentwicklung abgesehen.

In einem weiteren Schritt sollte ein leicht basischer Modifier untersucht werden. Dafür wurde in Anlehnung an Robbins et al. (2015) ein Zusatz von Ammoniumacetat zur mobilen Phase gewählt. In der Methode von Robbins et al. (2015) wurde Ammoniumacetat für die flüssigchromatographische Trennung von Sulfiten verwendet. Der Zusatz dieses Puffers sorgt dafür, dass die SQDGs weitestgehend negativ geladen vorliegen und im negativen Ionenmodus besser ionisiert werden können. Die Ionisierung der SQDGs hängt stark von der Sulfatgruppe ab [71]. Die flüssigchromatographische Trennung der SQDGs konnte durch den Zusatz von Ammoniumacetat stark verbessert werden. In Abb. 22b ist die Trennung der SQDGs mit dem finalen Gradienten mit Zusatz von Ammoniumacetat dargestellt.

Einfluss der Temperatur

Ein weiterer Parameter der während der Methodenentwicklung betrachtet wurde, war die Temperatur des Säulenofens. Durch ein Temperieren der Säule über den Säulenofen, können die Bedingungen während der chromatographischen Trennung konstant gehalten und besser kontrolliert werden. Durch eine Erhöhung der Temperatur kann die Molekülgeschwindigkeit bei der chromatographischen Trennung beeinflusst werden. Eine Temperaturerhöhung hat eine Erhöhung der Molekülgeschwindigkeit des Analyten zur Folge, sodass die Elution schneller erfolgt. Die Trennung wurde bei 25 und 30 °C durchgeführt und bewertet. Die Erhöhung der Temperatur führte allerdings dazu, dass die Trennschärfe sich aufgrund der schnelleren Elution, verschlechterte und einzelne SQDGs stärker co-eluierten. Daher wurde die Temperatur der temperierten Raumtemperatur angepasst und die Trennung bei 20 °C durchgeführt.

Fazit der LC-ESI-MS/MS Methodenentwicklung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung einer LC-ESI-MS/MS Methode zur schnellen und sicheren Identifizierung von SQDGs aus pflanzlichen Matrices gelungen ist. Es können mit Hilfe der Methode verschiedene SQDGs zeitgleich detektiert und quantifiziert werden.

9.3 Methodenvalidierung

Unter einer Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit und Qualität einer analytischen Methode. Der Umfang einer Validierung kann variieren und hängt stark davon ab, wie die Methode in der Analytik angewendet werden soll. In dieser Arbeit, war das Ziel der Validierung zu zeigen, dass die Aufarbeitung und die Quantifizierung mittels LC-ESI-MS/MS dazu geeignet sind, SQDGs zuverlässig und reproduzierbar durchzuführen. Hierfür wurden folgende Verfahrensmerkmale charakterisiert: Normalverteilung, Varianzhomogenität, Linearität, Präzision, Wiederfindung, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Die Methodenvalidierung erfolgte anhand eine Grundkalibrierung im Konzentrationsbereich von 1 µg/mL bis 10 µg/mL der Standardsubstanz SQDG 816.

Zunächst setzen die meisten statistischen Test eine Normalverteilung der Daten voraus. Die Prüfung auf Normalverteilung wurde mit dem Schnelltest nach DAVID durchgeführt (vgl. Kapitel 17.1.1). Die rechnerische Prüfung ergab, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % für die Daten sowohl Normalverteilung und Varianzhomogenität vorliegt.

9.3.1 Linearität und linearer Arbeitsbereich

Soll eine Quantifizierung von Substanzen mittels Kalibriergerade erfolgen, ist eine Linearität unabdingbar, da im linearen Arbeitsbereich die Konzentration des Analyten direkt proportional zum Messsignal vorliegt. Im unteren Konzentrationsbereich wird der lineare Arbeitsbereich durch die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze beschränkt, im höheren Konzentrationsbereich tritt bei zu hohen Konzentrationen eine Sättigung des Detektorsystems auf, wobei die Proportionalität nicht mehr gegeben ist, da es zu einem abflachen der Gerade kommt. Die Kalibrierfunktion kann durch verschiedene mathematische Verfahren beschrieben werden. In den meisten Fällen wird eine Kalibrierfunktion 1. Ordnung einer quadratischen Regression (2. Ordnung) vorgezogen.

Zur Überprüfung der Linearität wurden zunächst der Quotient (A_A/A_{IST}) aus der gemessenen Peakfläche des Analyten (A_A) und der Peakfläche des Internen Standards (A_{IST}) gegen den Quotient ($c[A]/c[IST]$) aus Konzentration des Analyten ($c[A]$) und Konzentration des Internen Standards ($c[IST]$) aufgetragen und die entstandene Gerade einer visuellen Prüfung unterzogen. Ergänzend wurden rechnerisch die Regressionskoeffizienten R^2 für das lineare und das quadratische Kalibriermodell ermittelt. Die Regressionskoeffizienten liefern ein weiteres Werkzeug zur Beurteilung, ob sich die lineare oder quadratische Regression die besseren Ergebnisse an die Anpassung der Gerade liefert. Dabei liefert das Modell mit dem höheren Wert für R^2 die bessere Anpassung.

Eine weitere Beurteilung erfolgte über die berechnete Reststandardabweichung S_R und S_{RQ} (vgl. Gleichung 4 und 5). Es gilt: wenn $S_R < S_{RQ}$, dann handelt es sich um einen linearen Zusammenhang, wenn $S_R > S_{RQ}$, dann wäre eine quadratische Regression zu bevorzugen. Die in Tabelle 16 dargestellten Ergebnisse, legen nahe, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer gegebenen Linearität im gewählten Arbeitsbereich ausgegangen werden kann.

Tabelle 16: Berechnete Parameter zur Bestimmung der gegebenen Linearität.

R^2 (linear)	R^2 (quadratisch)	S_R	S_{RQ}	PG berechnet	PG tabelliert
0,9969	0,9968	0,0109	0,0111	0,76	3,50

PG (berechnet) = Prüfgröße nach Mandel, PG (tabelliert) Prüfgröße aus F-Tabelle (n=10) $\alpha = 0,95$

Abbildung 23 zeigt die erstellte Gerade zur Überprüfung der Linearität.

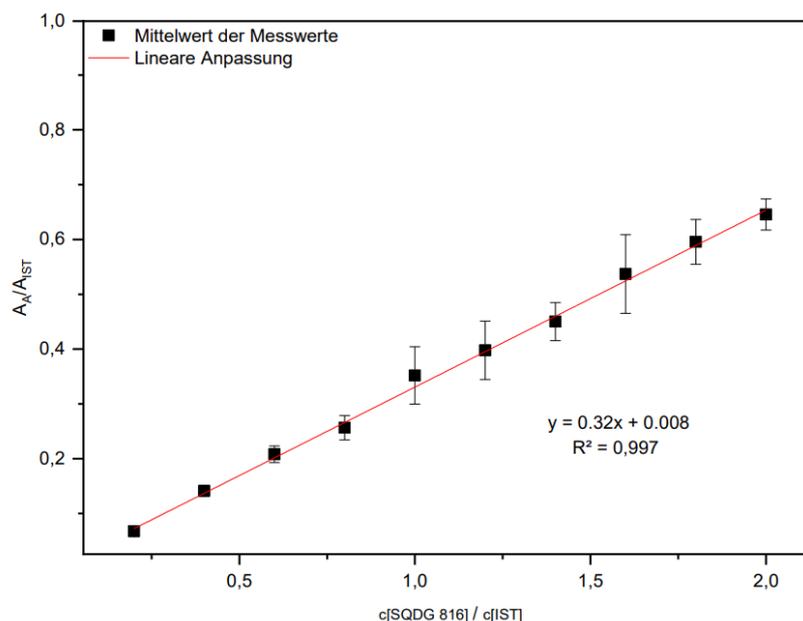


Abbildung 23: Beispielhafte Regressionsgerade zur Bestimmung der Sulfolipide. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung je Messpunkt.

9.3.2 Präzision

Über die Präzision kann eine Aussage über die Streuung der Messwerte getroffen werden. Mathematisch wird sie durch die Reststandardabweichung sowie den Verfahrensvariationskoeffizienten beschrieben. Es wurde sowohl die Wiederholungspräzision als auch die Vergleichspräzision betrachtet. Diese wurden mit Gleichung 8 berechnet. Die Empfehlung der FDA gibt vor, dass der Verfahrensvariationskoeffizient C_v unter 15 % liegen soll, um eine ausreichend hohe Präzision gewährleisten zu können [72].

Wiederholungspräzision

Mit der Wiederholungspräzision (*Intra-day Precision*) wird überprüft, wie sicher ein Messgerät misst. Sie ist also ein Maß für Systemfehler. Um die Wiederholungspräzision zu bestimmen wird eine Methode mehrmals unter gleichen Umständen wiederholt. Die Messung erfolgt mit demselben Messgerät, demselben Messsystem und wird vom selben Bearbeiter durchgeführt. Weiterhin erfolgt die Untersuchung innerhalb kurzer Zeitabstände. Die Wiederholungspräzision in der vorliegenden Arbeit wurde durch die Mehrfachmessung von Proben mit verschiedener Konzentration (QC 1 bis 3) bestimmt. Zum einen wurde die Wiederholungspräzision für den SQDG-Standard-817 und zum anderen für den internen Standard untersucht. Tabelle 17 stellt die Ergebnisse der Untersuchung für die Wiederholungspräzision zusammen. Daraus kann entnommen werden, dass alle untersuchten Proben die Anforderung der FDA ($C_v < 15\%$) erfüllen.

Tabelle 17: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederholungspräzision.

Standard 817			interner Standard		
QC1 C_v [%]	QC2 C_v [%]	QC3 C_v [%]	QC1 C_v [%]	QC2 C_v [%]	QC3 C_v [%]
10,6	11,0	4,9	7,2	5,9	7,7

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision (*Inter-day Precision*) beschreibt die Präzision unter Vergleichsbedingungen. Dafür wird derselbe Analyt unter verschiedenen Rahmenbedingungen untersucht. Die Zeit der Messung, der Bearbeiter oder auch das Messinstrument kann hier geändert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Proben aufgearbeitet und derselbe Analyt zu verschiedenen Messzeiten untersucht. Tabelle 18 stellt einen Überblick über die Ergebnisse der Bestimmung der Vergleichspräzision dar. Wie auch bei der Wiederholungspräzision liegen die Ergebnisse alle unter 15 % und erfüllen damit die Anforderungen der FDA.

Tabelle 18: Ergebnisse der Bestimmung der Vergleichspräzision.

Standard 817			interner Standard		
QC1 C_v [%]	QC2 C_v [%]	QC3 C_v [%]	QC1 C_v [%]	QC2 C_v [%]	QC3 C_v [%]
6,3	7,4	4,1	9,6	13,4	7,0

9.3.3 Genauigkeit

Die Genauigkeit einer Methode beschreibt die Abweichung eines Messwertes zum tatsächlichen Konzentrationswert. Für die Bestimmung der Genauigkeit wurden der relative Fehler (RE, *Relative Error*) bei unterschiedlichen Konzentrationsbereichen bestimmt. Die Genauigkeit sollte nach Empfehlungen der FDA 15 % nicht überschreiten [73]. Eine Ausnahme stellt der Bereich der Bestimmungsgrenze da. In diesem niedrigsten Bereich ist eine Diskrepanz von bis zu 20 % akzeptabel. Tabelle 20 stellt einen Überblick über die Ergebnisse der Bestimmung der Genauigkeit zusammen.

Die Ergebnisse streuen um Null und liegen für alle Konzentrationsniveaus unter 15 %. Sie erfüllen damit die Anforderungen der FDA. Die schlechtesten Werte für die Genauigkeit finden sich im unteren Konzentrationsbereich. Dies ist nicht überraschend, da der RE-Wert bei der quantitativen Analyse von der Konzentration abhängig ist.

Tabelle 19: Ergebnisse der Bestimmung der Genauigkeit.

QC	eingesetzte Konzentration [µg/µL]	gemessene Konzentration [µg/µL]	RE
1	0,2	0,178	-10,91
2	0,4	0,406	1,53
3	0,6	0,614	2,34
4	0,8	0,765	-4,44
5	1	1,059	5,88
6	1,2	1,200	0,01
7	1,4	1,364	-2,57
8	1,6	1,631	1,97
9	1,8	1,817	0,95
10	2	1,966	-1,68

9.3.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung (*recovery*) stellt keinen typischen Parameter einer Methodvalidierung da, sondern ist ein Fachbegriff aus der analytischen Chemie. Die Wiederfindung wird zur Bewertung der Qualität eines analytischen Verfahrens eingesetzt. Dabei wird das Verhältnis der Menge an Analyt, welcher vor der Probenaufarbeitung zugesetzt wurde, und der ermittelten Menge an Analyt bewertet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wiederfindungsrate bezogen auf den internen Standard für verschiedene Materialien bestimmt. Die ausgewählten Materialien wurden im späteren Verlauf der Arbeit für weitere Untersuchungen herangezogen. Es handelt sich dabei um *Spirulina* sp., *Chlorella vulgaris*, Spinat und Brennesel. Die berechneten Werte für die Wiederfindung betragen für *Spirulina* sp. 83 %, für *C. vulgaris* 95,8 %, für Spinat 88,2 % und für Brennessel 89,6 %. Die Werte der Wiederfindungsrate liegen für alle Probenmaterialien in einem akzeptablen Bereich.

Die Unterschiede zwischen den Wiederfindungsraten können durch Unterschiede der vorbereiteten Probenmaterialien begründet werden. Bei dem *Spirulina* sp.-Material handelte es sich beispielsweise um ein sehr feines, industriell hergestelltes Pulver was in der Probenaufarbeitung schwerer zu handhaben war.

9.3.5 Analytische Grenzwerte

Die analytischen Grenzwerte stellen die Nachweis- und Bestimmungsgrenze dar. Die Nachweisgrenze x_{NWG} (*Lower Limit of Detection* (LLOD)) beschreibt dabei die kleinste Menge des Analyten in der Probe, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 50 % erfasst werden kann. Die Bestimmungsgrenze x_{BG} (*Lower Limit of Quantification* (LLOQ)) dagegen beschreibt die geringste quantifizierbare Konzentration in einer Probe, die mit der methodeneigenen Präzision und Genauigkeit bestimmt werden kann.

Die Bestimmung von LLOD und LLOQ erfolgte nach der in DIN 32654 beschriebenen Kalibriergeradenmethode. Es ergab sich für LLOD ein Wert von 0,48 µg/mL und für LLOQ ein Wert von 1,44 µg/mL.

9.4 Fazit der HPLC-ESI-MS/MS Methodenentwicklung

Die Entwicklung einer zuverlässigen und quantitativen Methode für die Isolierung von SQDGs aus Cyanobakterien und Blattmaterial von Kormophyten, eine Reinigung des Rohextraktes mit SPE und eine ausreichend sensitive HPLC-ESI-MS/MS-Methode für die gleichzeitige Identifizierung und Quantifizierung verschiedener, intakter SQMGs und SQDGs wurde erfolgreich durchgeführt. Die Präzision und Genauigkeit dieser Methode zur Analyse von SQDGs aus gefriergetrockneten Cyanobakterien, Mikroalgen und Pflanzenmaterial wurde exemplarisch an unterschiedlichen Matrices erfolgreich demonstriert.

Die Probenvorbereitung ist zwar etwas aufwändiger als bei vergleichbaren Methoden zur Untersuchung von SQDGs, aber das Ergebnis ist dennoch überzeugend. Die entwickelte Methode kann nun weiterführenden Untersuchungen der biochemischen Mechanismen der Bildung von SQDG unter bestimmten Wachstumsbedingungen eingesetzt werden. Darüber hinaus kann die Bedeutung von SQDG und SQMG in Rohstoffen, die für die Lebensmittelverarbeitung verwendet werden, und die Folgen für die menschliche Ernährung mit Hilfe dieser Methode untersucht und charakterisiert werden. Die vorliegende Studie kann jedoch noch nicht den Grund für die hohe SQDG-Vielfalt aufdecken, aber mit der entwickelten Quantifizierungsmethode bietet sie ein nützliches Instrument zur Beantwortung dieser und weiterer Fragen.

10 Entwicklung einer GC-EI-MS Methode

10.1 Entwicklung der gaschromatographischen Methode

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte auch die GC-EI-MS Methodik zur Identifikation und Quantifizierung von SQDGs in Betracht gezogen werden. Der größte Vorteil der Gaschromatographie gegenüber der Flüssigchromatographie, ist die hohe Trennschärfe bei strukturähnlichen Analyten. Aufgrund der langen Kapillarsäulen, die für die Gaschromatographie verwendet werden, findet die Trennung über deutlich mehr Trennböden als bei der HPLC statt. Handelt es sich aber um schwerflüchtige Analyten, wie bei den SQDG die der vorliegenden Arbeit betrachtet werden, ist ein Derivatisierungsschritt notwendig um die Analyten in die Gasphase überführen zu können. Dies stellt einen bedeutenden Nachteil der Gaschromatographie gegenüber der HPLC dar. Denn daraus folgt ein größerer Aufwand bei der Probenvorbereitung. Jedoch gibt es bei den GC-Kapillarsäulen auch Weiterentwicklungen der stationären Phase. So schaffen neuartige Säulen neue Einsatzmöglichkeiten für die Analytik von hoch molekularen Verbindungen (>600 Da) mittels Gaschromatographie [74]. Es wird beispielsweise möglich auch Oligosaccharide oder Triglyceride mittels Gaschromatographie zu untersuchen [75, 76, 74]. In der vorliegenden Arbeit wurden daher zum einen Methoden, welche eine Derivatisierung der Analyten voraussetzen und Methoden, die eine HT-Säule verwendet untersucht und entwickelt.

10.1.1 Entwicklung einer GC-ESI-MS Methode mit herkömmlicher Kapillarsäule

Zunächst wurden verschiedene Derivatisierungsmethoden ausgewählt, mit welchem zum einen die Fettsäuren und Glycerol von der Sulfoquinovose getrennt werden sollten. Anschließend wurden die Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern umgeestert.

Dafür wurde die bereits in Kapitel 7.2 vorgestellte Methode verwendet. Um die Sulfoquinovose verdampfbar zu machen, wurden verschiedenen Derivatisierungsreagenzien in Betracht gezogen. Es wurden zwei Methoden zur Acetylierung [77, 50] und zwei Methoden zur Silylierung [78, 79] untersucht. Diese wurden zunächst an einer Glucose getestet, da Sulfoquinovose zu teuer für diese Vorversuche war. Mit der Methode zur Acetylierung nach Williams et al. (1975) wurden die besten Ergebnisse erzielt [50]. Abb. 24 zeigt das Chromatogramm der derivatisierten Glucose, welches mittels GC-MS gemessen wurde. Mittles NIST-Datenbank konnte Peak 1 bei RT 13,97 mit einer Wahrscheinlichkeit von 91,3 % als α -D-Glucose-2,3,4,5,6-pentaacetat identifiziert werden. Peak 2 bei RT 14,20 wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von 92,2 % als β -D-Glucose-2,3,4,5,6-pentaacetat identifiziert. Wie zu erwarten wurde die Glucose mit der Acetylierungsmethode nach Williams et al (1975) zu α -D-Glucose-2,3,4,5,6-pentaacetat bzw. β -D-Glucose-2,3,4,5,6-pentaacetat umgesetzt. Die Methode nach Williams et al (1975) wurde daher im weiteren Verlauf der Arbeit zur Derivatisierung der Sulfoquinovose eingesetzt.

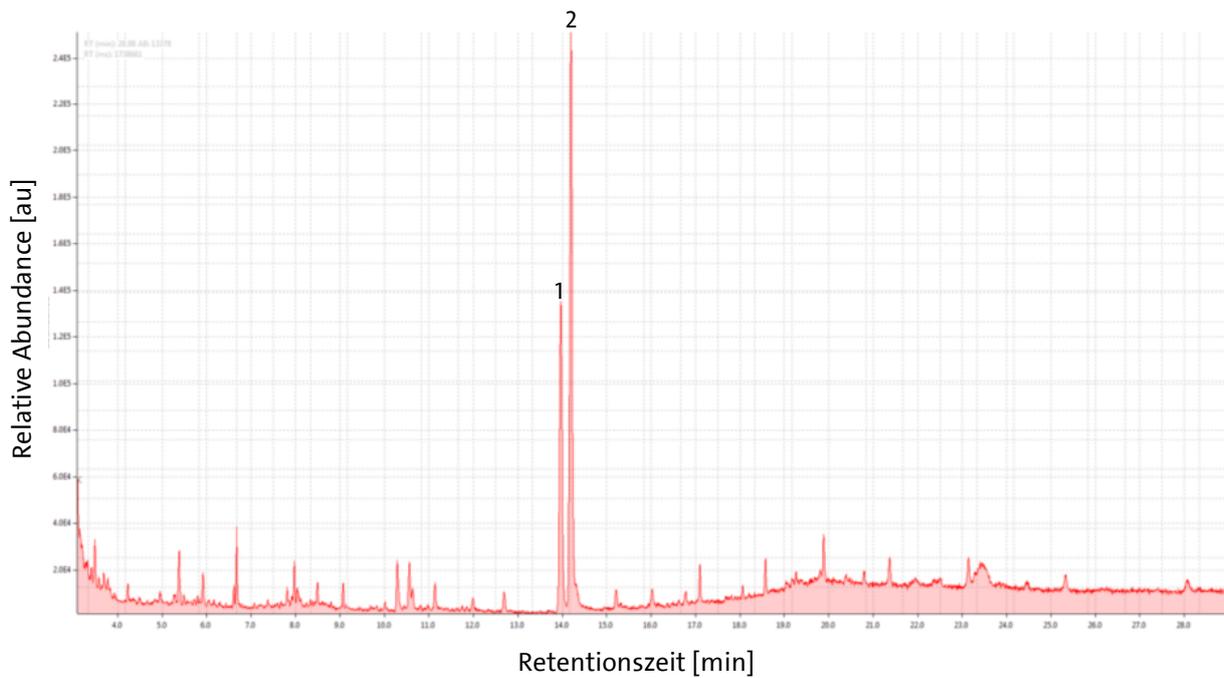


Abbildung 24: GC-MS Chromatogramm von Glucose derivatisiert nach WILLIAMS et. al. (1975). Peak 1 (RT 13,97 min): α -D-Glucose-2,3,4,5,6-pentaacetat, Peak 2 (RT 14,20): β -D-Glucose-2,3,4,5,6-pentaacetat. Peak 1 und 2 identifiziert mittels NIST-Datenbank.

In nächsten Schritt sollte nun versucht werden, die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Probenvorbereitung zur Analyse der Fettsäuren mit der Acetylierung der Sulfoquinovose zu kombinieren. Abbildung 25 stellt schematisch den Ablauf der Molekülsplaltung und der anschließenden Derivatisierung da.

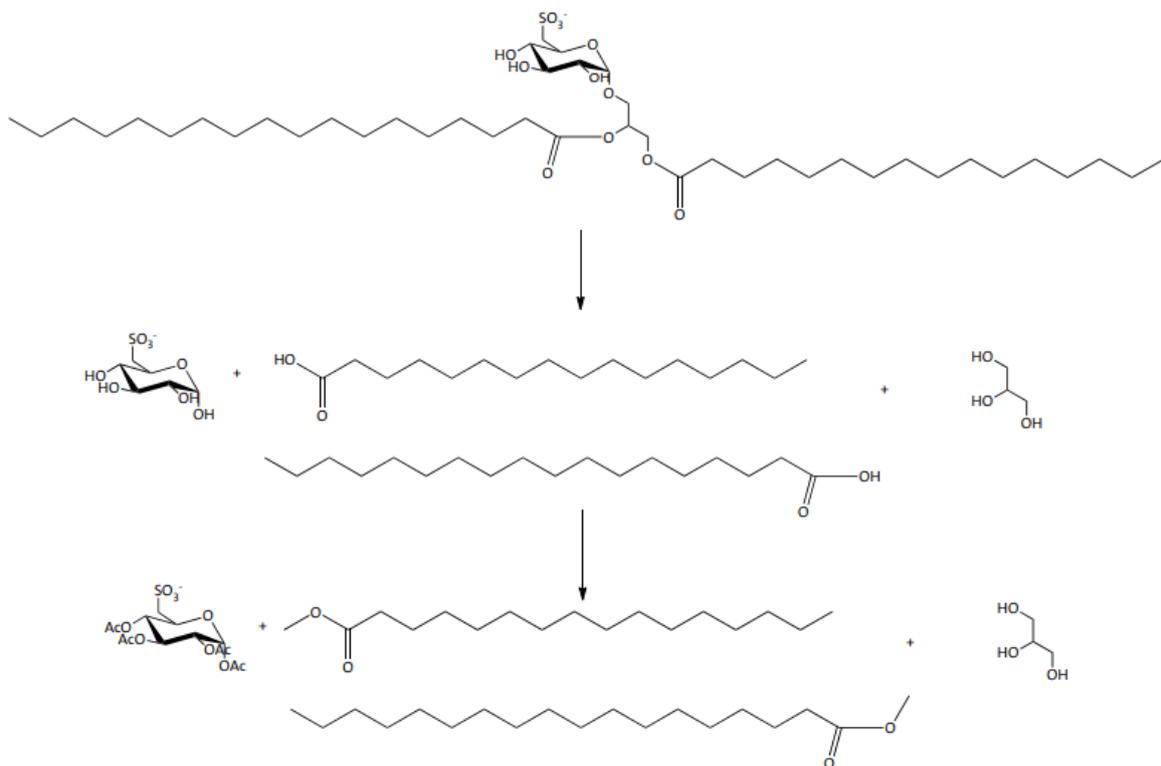


Abbildung 25: Schematischer Ablauf der Spaltung des SQDG und anschließende Derivatisierung.

Zunächst wurde die Molekülsplaltung und Derivatisierung in einem Schritt versucht. Dafür wurde TMSH zur Spaltung der Fettsäuren verwendet. Bei der anschließenden GC-MS Untersuchung konnten allerdings nur die derivatisierten Fettsäuren nachgewiesen werden. Zunächst wurde vermutet, dass sich die beiden Derivatisierungsreagenzien bei der Reaktion stören könnten oder die Acetylgruppen von der Sulfoquinovose im Reaktionsgemisch wieder abgespalten werden. Daher wurde in einem weiteren Versuch wieder auf eine Lipase zur Trennung der Fettsäuren zurückgegriffen. Damit wurde gewährleistet, dass nur die Bindung zwischen Fettsäure und Glycerol und nicht zwischen Sulfoquinovose und Acetylgruppe aufgelöst werden kann. Jedoch blieb auch dieser Versuch erfolglos. Es konnten bei diesem Versuch weder Fettsäuremethylester noch eine derivatisierte Sulfoquinovose nachgewiesen werden.

Der Versuch die Sulfoquinovose und Fettsäuren parallel mittels GC-EI-MS zu detektieren ist nicht gelungen. Es konnten lediglich die Fettsäuren identifiziert werden, wenn eine Derivatisierung mit TMSH durchgeführt wurde.

10.1.2 Entwicklung einer GC-ESI-MS Methode mit HT-Säule

Für die eine weitere Methodenentwicklung wurde anschließend eine HT-Säule verwendet (SGE HT5 12 m, 0,32 mm, 0,1 μm). Es handelt sich dabei um eine Kapillarsäule mit 8 %-igem Phenyl äquivalent Polycarboransiloxan und ist laut Herstellerangaben bei Temperaturen bis zu 480 °C stabil. Zunächst wurde versucht Glucose sowie SQDG underivatisiert zu analysieren. Dies war jedoch nicht erfolgreich, da selbst die Temperatur von 480 °C nicht ausreichten um die sehr stabilen Moleküle zersetzungsfrei in die Gasphase zu überführen. Es wurde daher ebenfalls die Spaltung und Derivatisierung vor der GC-MS Analytik durchgeführt.

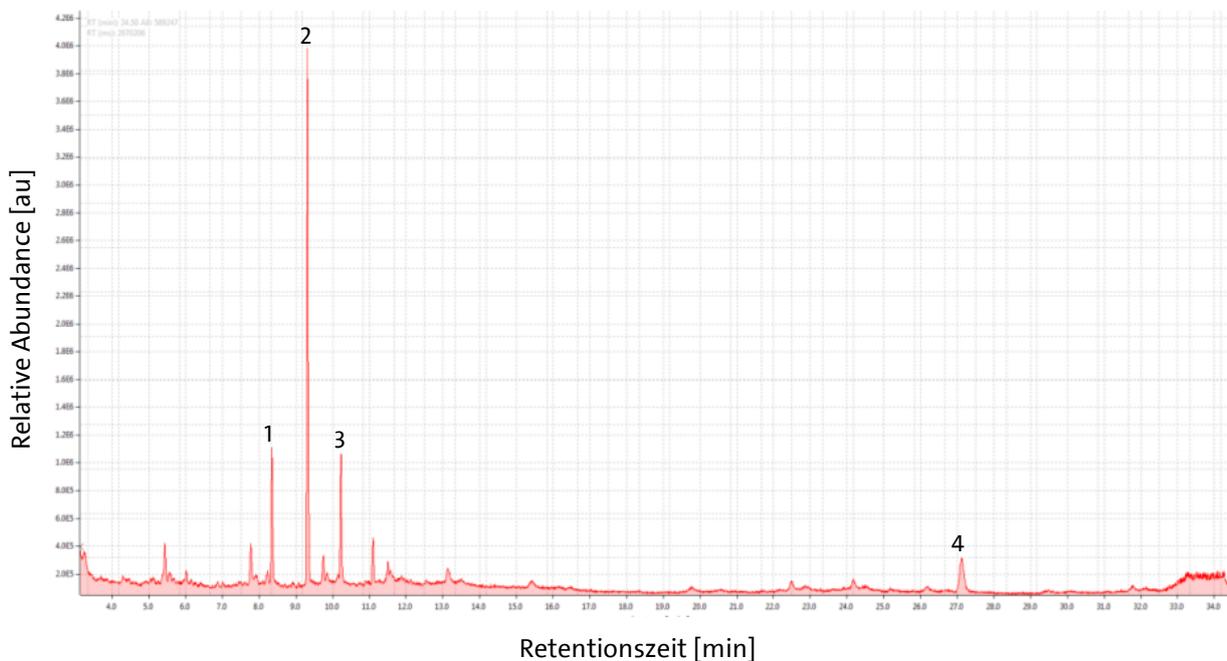


Abbildung 26: GC-EI-MS Chromatogramm des Sulfolipid-Standards nach Spaltung mit TMSH und anschließender Derivatisierung. Peak 1 (RT 8,34 min): Hexadecansäuremethylester, Peak 2 (RT 9,32 min): Heptadecansäuremethylester, Peak 3 (RT 10,23 min): Octadecansäuremethylester. Peak 1–3 identifiziert mittels NIST-Datenbank, Peak 4 (RT 27,12 min) Sulfoquinovose.

Bei den detektierten Peaks (Abb. 26, RT 8,34 min und RT 10,21 min) handelt es sich um die beiden Fettsäuren, Hexadecansäure und Octadecansäure, die vom Sulfolipid-Standard abgespalten wurden. Die detektierte Heptadecansäure (Abb. 26 RT 9,32 min) wurde zur Überprüfung der Reaktion zugegeben. Des Weiteren konnte ein Peak bei 27,12 min mit einem m/z 316 nachgewiesen werden. Es könnte sich dabei um die Sulfoquinovose handeln. Abb. 27 zeigt das Massenspektrum der Substanz bei RT 27,12 min. Es können keine SQ typischen Fragmente erkannt werden, weshalb es fraglich bleibt, ob es sich tatsächlich um Sulfoquinovose handelt.

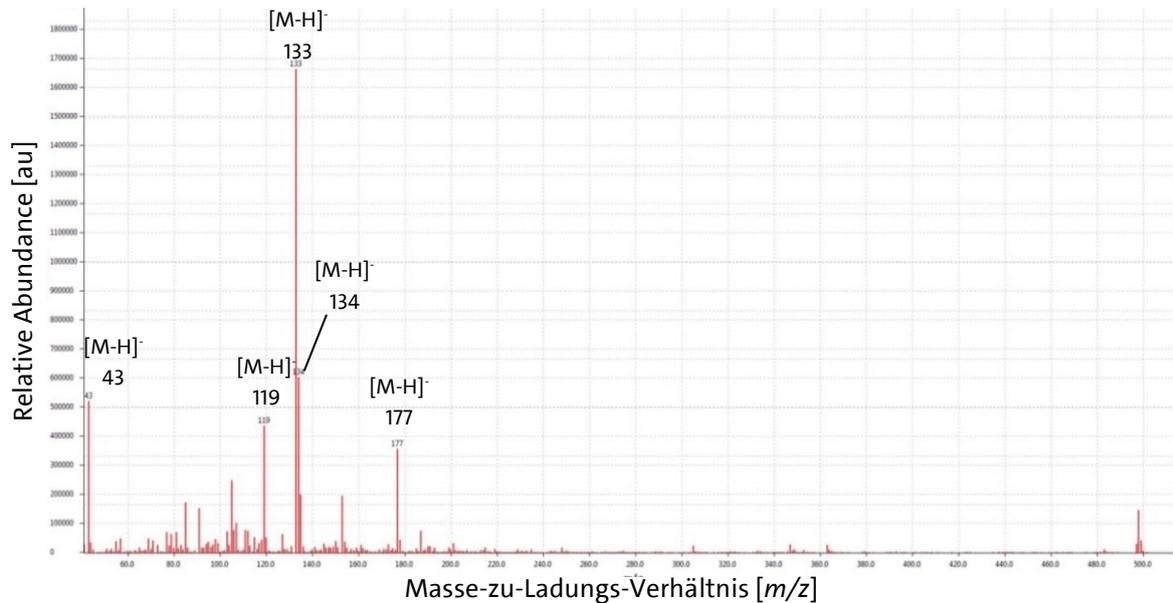


Abbildung 27: EI-MS Chromatogramm der massenspektrometrischen Untersuchung der Substanz m/z 316. Gemessene Fragmente in absteigender Masse 177, 134, 133, 119, 43.

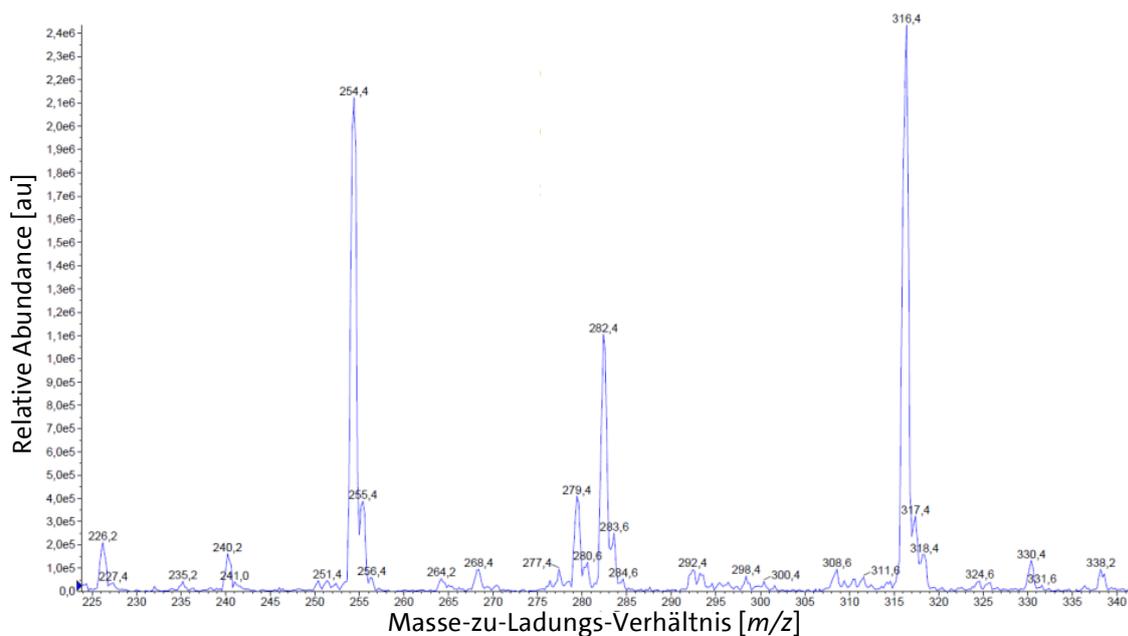


Abbildung 28: Qq-ESI-MS Chromatogramm der mittels Direkteinlass untersuchten derivatisierten SQDG-Lösung. Es wurden Substanzen mit den m/z -Verhältnissen 254,4; 279,4; 316,4 nachgewiesen. Bei der Substanz m/z 254,4 handelt es sich um Hexadecansäure, bei der Substanz m/z 279,4 handelt es sich um Linolensäure, bei der Substanz m/z 316,4 wird vermutet, dass es sich um Sulfoquinovose handelt.

Die Reaktionslösung wurde daher zur weiteren Klärung mittels Direkteinlass am QqQ-ESI-MS untersucht. Auch hier konnten zum einen die Fettsäuren und zum anderen das Fragment mit m/z 316 nachgewiesen werden. Das Fragmentierungsmuster der Substanz mit m/z 316 konnte nicht weiter untersucht werden, da die Konzentration zu gering war. Es wäre daher notwendig reine Sulfoquinovose als Vergleichsmaterial chromatographisch und massenspektrometrisch zu untersuchen. Dies war im Zuge der vorliegenden Arbeit allerdings nicht möglich.

Abschließend lässt sich sagen, dass zwar Hinweise darauf deuten, dass Sulfoquinovose mittels GC-EI-MS nachgewiesen werden, zur genauen Klärung allerdings weitere Untersuchungen fehlen. Doch auch wenn der positive Nachweis für Sulfoquinovose erbracht wird, ist der Nutzen, der aus der GC-EI-MS Analytik im Bereich der SQDGs erbracht wird sehr gering. Da auch mit den neuartigen HT-Säulen eine Spaltung und Derivatisierung der SQDGs unumgänglich ist und so keine Identifikation einzelner SQDGs möglich wäre. Es könnte wieder nur ein Summenparameter für Sulfoquinovose und Fettsäuren bestimmt werden und eine Quantifizierung wäre ausschließlich über das SQ-Fragment gegeben. Die GC-MS Analytik kann also nur sehr begrenzt zur Identifikation und Quantifizierung von SQDGs herangezogen werden. Die HPLC-ESI-MS/MS Methodik ist in diesem Bereich der Analytik der GC-EI-MS deutlich überlegen und daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine weiteren Versuche einer Methodenentwicklung mittels GC-EI-MS betrieben.

11 Untersuchung von Pflanzenmaterial

Mit Hilfe der entwickelten Extraktionsmethode wurden verschiedene Pflanzenmaterialien sowie aquatische Organismen auf ihren SQDG-Gehalt sowie die SQDG Zusammensetzung untersucht. Es wurden als Vertreter der aquatischen Organismen *Chlorella vulgaris* und *Spirulina* sp. sowie als Vertreter der Kormophyten Spinat und Basilikum gewählt. Spinat wurde als Beispielorganismus gewählt, da in diesem die ersten SQDGs entdeckt wurde und bereits andere Literatur zu SQDGs in Spinat veröffentlicht wurden [2, 80]. Zu SQDGs in Basilikum dagegen gibt es noch keine veröffentlichten Daten. Parallel zu den beiden Vertretern der Kormophyten sollten auch zwei Vertreter der Mikroalgen betrachtet werden. Dafür wurde *C. vulgaris* gewählt, da es sich dabei um den prominentesten Vertreter der Mikroalgen handelt und *C. vulgaris* auch eine Bedeutung als Nahrungsergänzungsmittel in Europa besitzt. Es sind bereits wissenschaftliche Publikationen zu SQDGs im Bereich der Mikroalgen veröffentlicht. Diese zeigen, dass der SQDG Gehalt zwischen den einzelnen Mikroalgen stark variieren kann. So wurden SQDG Gehalt beispielsweise in *Heterosigma carterae* von 5,3 mg/g [26] und in *Dictyochloris fragrans* von 0,9 mg/g [81] nachgewiesen. Diese Gehalte wurden jedoch nur als Summenparameter bestimmt. Die einzige Methode, die zwischen einzelnen SQDGs differenzierte und getrennt quantifizierte ist zu *Spirulina* sp. veröffentlicht [57].

Mit der Methode, die in dieser Arbeit entwickelt wurde, wurden SQDG Gehalte von 1,7 mg/g in *Spirulina* sp., 1 mg/g in *C. vulgaris*, 702 mg/g in Spinat und 387 mg/g in Basilikum.

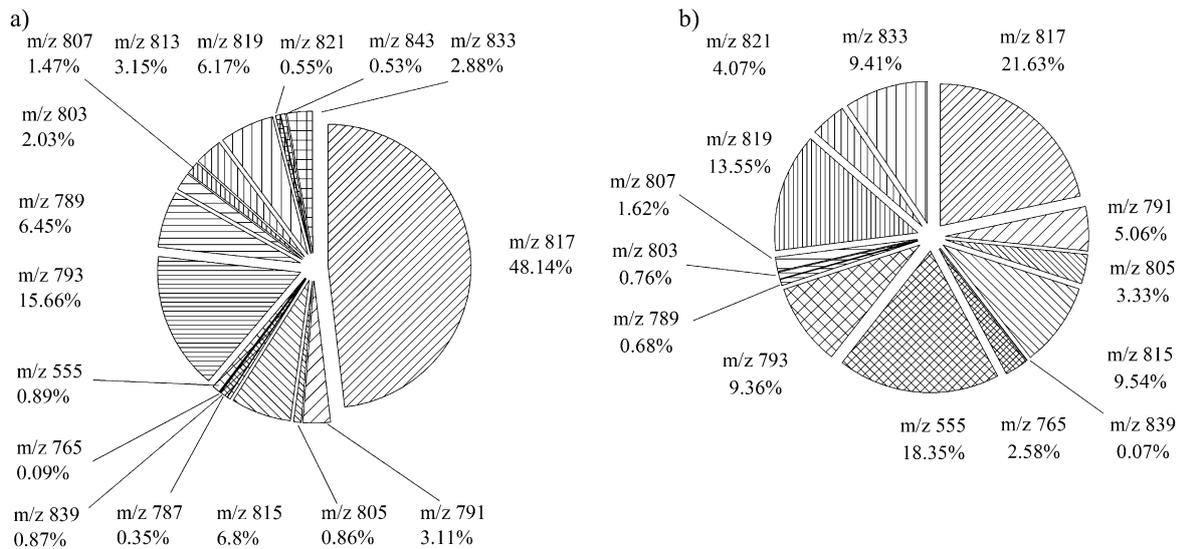


Abbildung 29: Zusammensetzung der SQDGs in *C. vulgaris* (a) und *Spirulina sp.* (b). Abbildung bereits veröffentlicht [82].

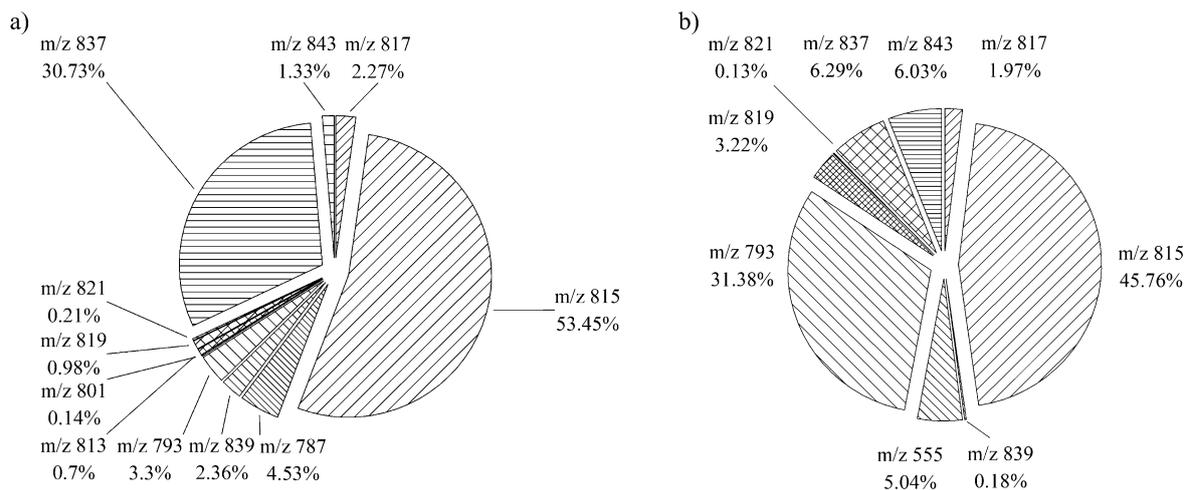


Abbildung 30: Zusammensetzung der SQDGs in *Spinat* (a) und *Basilikum* (b) [82].

Abbildungen 29 und 30 stellen einen Überblick über die SQDG Zusammensetzung in den vier Beispielsorganismen dar. Man kann erkennen, dass die SQDG Zusammensetzung zwischen den Organismen variiert. Vor allem der Unterschied zwischen *C. vulgaris* (Abb. 29 a) und *Spirulina sp.* (Abb. 29 b) wird sehr deutlich. Während in *C. vulgaris* (Abb. 29 a) das SQGD 817 mit 48,14 % die Hauptkomponente darstellt ist die Variation SQDGs in *Spirulina sp.* sehr viel höher.

Bei den Kormophyten (Abb. 30 a und b) ist die Verteilung der SQDGs ähnlicher als bei den aquatischen Organismen. In beiden liegt das SQDG 815 als Hauptkomponente vor.

Antonelli et al. veröffentlichten 2019 eine ähnliche Studie zu SQDG in *Spirulina sp.* [57]. in Tabelle 20 ist die SQDG-Zusammensetzung in *Spirulina sp.* die in dieser Arbeit bestimmt wurde den Ergebnissen von Antonelli et al. gegenübergestellt.

Tabelle 20: Gehalt an ausgewählten SQDGs in *Spirulina* sp. mittels zweier unterschiedlicher Methoden bestimmt.

SQDG	SQDG Gehalt¹ [%]	SQDG Gehalt² [%]
555	49,45	18,35
791	3,63	5,06
793	5,89	9,36
815	4,94	9,54
817	12,93	21,63
819	2,55	13,55

¹SQDG Gehalt veröffentlicht von Antonelli et al. [57]; ²SQDG Gehalt nach dieser Methode, veröffentlicht von Fischer et al. [82]

Ein Vergleich der beiden Studien zeigt, dass sich die Ergebnisse der beiden Studien unterscheiden. Die Unterschiede können an verschiedenen Kultivierungsbedingungen, Verarbeitung oder auch der Lagerung der *Spirulina* sp.-Proben liegen. Auch die gewählten Methoden die zur Extraktion und Quantifizierung der SQDGs verwendet wurde, können die Ergebnisse stark beeinflussen. Den größten Unterschied in der Aufarbeitung stellt die durchgeführte SPE da. Die unterschiedlichen SPE-Phasen können zu einer Veränderung des extrahierten SQDG Musters führen.

Auch die verwendete massenspektrometrische Methode unterscheidet sich stark. Antonelli et al. (2019) konnten mit Hilfe eines hochauflösenden UHPLC-HRMS die Regioselektivität zwischen einzelnen SQDGs bestimmen. Die in dieser Arbeit entwickelte Methode legte dagegen den Fokus auf eine präzisere Quantifizierung mittels MRM.

Aufgrund der These, dass je mehr Chlorophyll in einem pflanzlichen Organismus vorliegt, desto mehr SQDGs sind enthalten, wurde parallel zur Untersuchung der SQDG-Gehalte in Beispielsorganismen, auch 5 ausgewählte Blattgemüse auf ihren Gesamtgehalt an SQDG im Zusammenhang mit dem enthaltenen Chlorophyll untersucht [33]. Dafür wurde der SQDG-Gehalt nach der entwickelten Methode und der Chlorophyll-Gehalt photometrisch bestimmt. Als Beispielorganismen wurden für diese Untersuchungen Blattspinat, Rauke, Romana-Salat, Feldsalat und Pak Choi ausgewählt. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Bestimmungen des SQDG-Gehaltes und des Chlorophyll a/b-Gehaltes. Der höchste Gehalt an Chlorophyll a/b wurde in Spinat nachgewiesen, gefolgt von Rauke und Romana-Salat. Der Gehalt in Feldsalat und Pak Choi ist deutlich niedriger. Bei der Betrachtung des SQDG-Gehaltes fällt auf, dass Romanasalat den höchsten Gesamtgehalt besitzt, gefolgt von Spinat und Rauke. Auch hier weisen Feldsalat und Pak Choi deutlich niedrigere Werte auf. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang des Gehaltes an SQDGs und Chlorophyll gibt. Die Werte zeigen, dass die These je höher der Chlorophyll-Gehalt, desto höher der SQDG-Gehalt, hier bestätigt wurde. Um eine statistische Betrachtung oder eine Korrelation der Werte durchzuführen, war jedoch der Probenumfang zu gering.

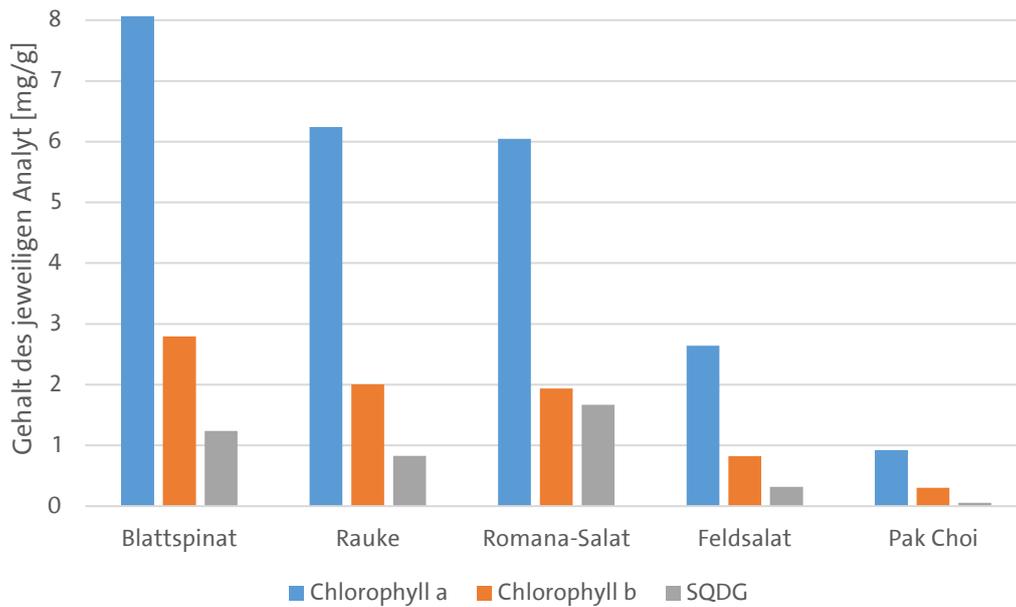


Abbildung 31: Gesamt-SQDG-Gehalt und Gehalt an Chlorophyll a und b in ausgewählten Blattgemüsen.

Eine mögliche Erklärung, für den niedrigeren SQDG-Gehalt, trotz höherem Chlorophyll-Gehalt, im Spinat gegenüber dem Romana-Salat, kann in verschiedenen Stoffwechseln der Gemüsearten nach dem Ernten zu finden sein. Nach der Ernte sind in frischem Gemüse noch Stoffwechselaktivitäten vorhanden, dies führt unter anderem zu kurzer Haltbarkeit speziell bei Blattgemüse, wie Spinat und Salat. Zu den noch aktiven Prozessen zählen die Respiration (Sauerstoff-Aufnahme) und Transpiration (Wasser-Abgabe). Um diesen Prozessen entgegen zu wirken, wird eine Kühlung empfohlen. Neben den Atmungsprozessen haben auch einige Enzyme, unter anderem Glykolipid-Hydrolasen (darunter die Sulfolipase), noch eine Restaktivität. Die Sulfolipase ist ein Enzym, das SQDGs deacyliert und dadurch den Gehalt im Blattgewebe verringert [84]. Der Spinat der hier untersucht wurde, wurde einen Monat vor den anderen Blattgemüsen beschafft und bis zur Verwendung tiefgefroren gelagert. In dieser Zeit kann es zu einer Reduktion an SQDG durch Enzymaktivität gekommen sein und so zu möglicherweise verfälschten Ergebnissen. Das hier verwendete Pflanzenmaterial war außerdem nicht standardisiert, sondern herkömmliches Gemüse aus einem örtlichen Supermarkt. Die Pflanzen waren also unbekanntem Umwelteinflüssen ausgesetzt. Diese können unter anderem durch Trockenheit, Frost, Nährstoffmangel oder Schädlingsbefall zu abiotischem Stress führen. Benning et al. berichteten beispielsweise über starke Veränderungen in der Lipidzusammensetzung von photosynthetisch-aktiven Bakterien und der Pflanze *A. thaliana* als Reaktion auf einen Phosphatmangel [35]. Um eine validierte Aussage über eine mögliche positive Korrelation von SQDG und Chlorophyll wäre daher eine Untersuchung eines großen Probensets aus standardisiert angebauten Pflanzen notwendig.

12 Schlussfolgerungen und Ausblick

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Isolierung von einzelnen SQDGs und der Darstellung dieser als reine Standards. Es ist mit den angewendeten Methoden nicht gelungen, ein einzelnes SQDG in ausreichender Reinheit zu isolieren. Die weitere Isolierung von SQDGs wurde nicht weiterverfolgt, da es sich bei den präparativen Arbeiten um sehr zeit- und kostenintensive Aufarbeitungen handelt. Eine alternative Möglichkeit einen reinen Standard herzustellen, wäre die synthetische Darstellung eines SQDGs. Dieser Ansatz wurde in einer weiteren Promotionsarbeit verfolgt und die erfolgreiche Synthese eines SQDGs wurde 2021 von Sitz et al. veröffentlicht [85].

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Isolationsmethode entwickelt, mit welcher auch in Zellmembranen gebundene SQDGs extrahiert werden können. Bei dieser vorgestellten Methode handelt es sich um eine leistungsstarke und zuverlässige, wenngleich auch aufwendige Methode zur Isolation von SQDGs aus pflanzlichen und aquatischen Organismen.

Die Methodenentwicklung zur Quantifizierung der isolierten SQDGs umfasste Untersuchungen mittels flüssig- als auch gaschromatographischer Trennung und anschließender massenspektrometrischer Quantifizierung. Mittels Flüssigchromatographie konnten die SQDGs hinreichend getrennt werden und mittels MRM detektiert und quantifiziert werden. Mittels Gaschromatographie konnten keine ausreichend überzeugenden Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der hohen molekularen Masse, war eine Derivatisierung der SQDGs unabdingbar, was zu einem hohen prä-analytischen Aufwand führt. Weitere Versuche eine gaschromatographische Detektionsmethode sind erst sinnvoll, wenn mittels GC-Ofen deutlich höhere Temperaturen erreicht werden können, da manche modernen HT-Säulen laut Herstellerangabe bei Temperaturen bis 450 °C betrieben werden können. Sollte dies technisch machbar sein, würden sich weitere Versuche einer Trennung mittels GC möglicherweise auszahlen, da die Trennschärfe zwischen den SQDGs eventuell erhöht werden kann.

Die Anwendung der entwickelten Methode auf kleine Probensets wurden abschließend durchgeführt. Es wurde zum einen der SQDG-Gehalt und die SQDG-Zusammensetzung in zwei Kormophyten und zwei aquatischen Organismen betrachtet und zum anderen der SQDG-Gehalt im Zusammenhang mit dem Chlorophyll a/b-Gehalt in fünf Blattgemüsen bewertet. Auch hier können weiterführende Untersuchungen zu SQDG-Gehalt und Zusammensetzung in definierten Probensets, beispielsweise unter bekannten Anbaubedingungen, folgen. Eine Betrachtung des SQDG-Gehaltes in mit Schwefel gedüngtem Salat wurde bereits von Körber et al. 2023 durchgeführt und veröffentlicht [86]. Die Anwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Methode kann nun zur weiteren Untersuchung von SQDGs in verschiedensten Organismen herangezogen werden und ein nützliches Werkzeug zur Erforschung dieser stellen.

VII. Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Arbeit sollten diverse Methoden für die Charakterisierung von Sulfolipiden aus marinen sowie pflanzlichen Materialien entwickelt werden. Dafür wurde zunächst eine Isolationsmethode entwickelt und anschließend die Charakterisierung der SQDGs mittels GC-EI-MS, LC-ESI-MS/MS, HPTLC, MALDI-TOF-MS durchgeführt sowie abschließend eine Quantifizierungsmethode mittels LC-ESI-MS/MS entwickelt und validiert. Die entwickelten Methoden, verwendeten Chemikalien, Materialien, Geräte und Softwares sind im Folgenden aufgeführt.

13 Chemikalien, Geräte, Materialien und Softwares

Ein detailliertes Verzeichnis der verwendeten Chemikalien ist in Kapitel 20 Tabelle 45 aufgeführt. Die Lagerung der erstellten Standardlösungen erfolgte bei -20 °C im Tiefkühler. Die verwendeten Materialien sind in Kapitel 22 Tabelle 49 aufgeführt. Ein Verzeichnis der verwendeten Geräte und Softwares einschließlich Herstellerangaben und Spezifikationen ist in Kapitel 23 Tabelle 50 und 51 aufgeführt.

14 Probenmaterial

Die Isolierung und Charakterisierung von SQDGs erfolgte aus *Spirulina* sp., welches bereits als getrocknetes Pulver vorlag. Dieses Analysenmaterial wurde vom Institut für Lebensmittel- und Umweltforschung e.V. zur Verfügung gestellt. Das entsprechende Analysenzertifikat ist in Kapitel 21.1, Abb. 32 abgebildet.

Darüber hinaus wurde weiteres, nicht zertifiziertes Probenmaterial verwendet. Eine Übersicht über das verwendete Probenmaterial ist in Kapitel 21 Tabelle 48 zusammengestellt. Frisches Probenmaterial wurde mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und mit Mörser und Pistill zermahlen und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene Pulver wurde bei -20 °C im Tiefkühler gelagert.

15 Isolierung reiner SQDGs

15.1 Extraktionsmethode

Es wurden vier bereits in der Literatur beschriebene Methoden ausgewählt und ihr Einsatz zur Isolierung von SQDGs untersucht. Es wurden die Methoden nach Folch (1957), Naumann (2009), Keusgen (1996) und Souza (2012) [58-60, 53] für die Isolierung von SQDGs getestet.

Als effektivste Methode zur Isolierung von SQDGs erwies sich eine Isolation in Anlehnung an Folch et al. (1957) [58]. Um etwa 100 mg SQDG zu isolieren, wurden 160 g Analysenmaterial mit 1 L Extraktionsmittel (Chloroform/Methanol (3/2; v/v)) gemischt und für 60 min im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurde die Extraktionslösung filtriert. Das Filtrat wurde mit einer 0,75 %-igen wässrigen Kaliumchlorid-Lösung versetzt und erneut für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die zweiphasige Lösung wurde mit Hilfe eines Scheidetrichters getrennt und die organische Phase an der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 15 mL Methanol aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

15.2 Reinigungsmethoden

Um den Extrakt, welcher nach 14.1 gewonnen wurde, zu reinigen wurden verschiedene Methoden getestet. Es wurde eine Reinigung an Aktivkohle, eine Reinigung mittels SPE sowie Säulenchromatographie in Betracht gezogen.

Reinigung über Aktivkohle

Der Rohextrakt wurde mit 2 bzw. 4 g Aktivkohle versetzt und für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Die Mischung wurde dabei zwischendurch regelmäßig aufgeschüttelt. Danach wurde die Mischung für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zu weiteren Untersuchungen mittels HPTLC verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Festphasenextraktion

Für die Durchführung der Festphasenextraktion wurden die Methoden nach Naumann (2009) und Souza (2012) getestet [53, 59]. Als effektivere Methode erwies sich die Methode nach Souza (2012). Daher wurde die Reinigung der Proben in Anlehnung an diese Methode durchgeführt.

Es wurden leere SPE-Kartuschen mit 0,5 g Kieselgel befüllt. Die stationäre Phase wurde mit je 1 mL Wasser, Methanol und Chloroform konditioniert. 1 mL Extraktlösung wurde nach der Konditionierung aufgegeben. Anschließend wurde mit 5 mL Chloroform und 3 mL Aceton gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2,5 mL Methanol. Das Eluat wurde durch einen PTFE-Filter spitzentfiltriert und für weitere Untersuchungen verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Säulenchromatographie

Es wurden zwei verschiedene Säulenchromatographie Methoden durchgeführt. Säulenchromatographie I diente der Reinigung des Rohextraktes. Säulenchromatographie II diente der Vereinzelung der SQDGs.

Für den ersten Reinigungsschritt mittels Säulenchromatographie I wurde Kieselgel verwendet. Dafür wurden in einem Scale-up eine Glassäule mit 50 g Kieselgel (Kieselgel 60, 0,040 – 0,063 mm Korngröße) verwendet. Die stationäre Phase wurde mit je 200 mL bidestilliertem Wasser, Methanol und Chloroform konditioniert. Danach wurde der Probenextrakt aufgegeben und mit 500 mL Chloroform und 300 mL Aceton gewaschen. Die Sulfolipide wurden mit 300 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde an der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt und in 15 mL Methanol aufgenommen. Die gewonnene Lösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Anschließend an die erste Reinigung erfolgte eine Vereinzelung der SQDGs mittels Säulenchromatographie II. Dafür wurde eine Glassäule mit 25 g octadecyl-modifiziertem Kieselgel (Kieselgel 60, RP 18, 0,047 – 0,060 mm Korngröße) befüllt. Die stationäre Phase wurde mit je 50 mL Acetonitril und Acetonitril/bidest. Wasser (1/1; v/v) konditioniert. Der mittels Säulenchromatographie I gewonnene Extrakt wurde anschließend aufgegeben. Die Elution erfolgte nacheinander mit 50 mL Acetonitril/bidest. Wasser (1/1; v/v), 100 mL Acetonitril/bidest. Wasser (7/3; v/v) und 200 mL Acetonitril. Die Eluate wurden in 35 Fraktionen von je 10 mL aufgefangen. Die Lagerung der gesammelten Fraktionen erfolgt bei 4 °C im Kühlschrank.

Präparative HPLC

Zur Vereinzelung der SQDGs wurde der nach 14.1 gewonnene *Spirulina* sp.-Extrakt mittels präparativer HPLC getrennt. Die Chromatographiebedingungen sind Tab. 21 zu entnehmen. Es wurden 200 Läufe durchgeführt und die Fraktionen gesammelt. Der zeitliche Ablauf des Fraktionssammlers ist Tabelle 22 zu entnehmen. Die jeweiligen Fraktionen wurden in Plastikröhrchen vereinigt und unter Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Mittles Differenzwägung wurde ermittelt wie viel Rückstand pro Fraktion gewonnen wurde. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Die gewonnenen Rückstände wurde in 500 µL Acetonitril aufgenommen. Die Lagerung der gesammelten Fraktionen erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Tabelle 21: Chromatographiebedingungen der präparativen HPLC zur Trennung der SQDGs.

Parameter der präparativen HPLC			
Eluent A	10 mM Ammoniumacetat in Wasser		
Eluent B	10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Wasser (9/1; v/v)		
Flussrate	200 µL/min		
Gradient	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0	97	3
	2	97	3
	15	3	97
	383	3	97
	35	97	3
	45	97	3
Chromatographiesäule	Phenomenex® Kinetex, 2.6 u C18, 100 Å, 150 x 2,1 mm		
Säulenofentemperatur	20 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		

Tabelle 22 stellt den zeitlichen Ablauf der Fraktionssammlung und die Masse der gewonnenen Rückstände dar.

Tabelle 22: Zeitlicher Ablauf des Fraktionssammlers und gewonnener Gehalt an Rückstand je Fraktion.

Fraktion	Zeit [min]	gewonnener Rückstand [mg]
0	8,00 – 9,00	0,0
1	9,02 – 10,00	2,8
2	10,02 – 11,00	0,0
3	11,02 – 12,00	1,1
4	12,02 – 13,50	17
5	13,52 – 15,00	25
6	15,52 – 16,50	8,8
7	16,52 – 17,70	26

Fortsetzung Tabelle 23: Zeitlicher Ablauf des Fraktionssammlers und gewonnener Gehalt an Rückstand je Fraktion.

Fraktion	Zeit [min]	gewonnener Rückstand [mg]
8	18,02 – 19,00	1,8
9	19,02 – 20,00	12
10	20,02 – 21,00	13
11	21,22 – 21,90	0,1
12	21,92 – 22,40	0,1
13	22,52 – 23,60	8,7
14	23,62 – 24,90	14
15	26,02 – 27,00	1,8
16	27,02 – 28,00	3,0
17	28,02 – 29,00	2,8
18	29,02 – 30,00	3,4
19	30,02 – 31,00	2,2
20	31,02 – 32,00	1,9
21	32,02 – 33,00	1,4
22	33,02 – 34,00	0,7
23	34,02 – 35,00	0,4

15.3 Charakterisierung mittels HPTLC

Die verschiedenen Schritte der Methodenentwicklung wurden mittels HPTLC auf ihre Leistungsfähigkeit überprüft. Die Parameter der verwendeten HPTLC-Methode sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Parameter der verwendeten HPTLC-Methode.

Stationäre Phase	Silica 60: 10x20 cm
Vorkonditionierung	Methanol, bei 100 °C für 10 min trocknen
Laufhöhe	80 mm
Applikation	Volumen: 10 µL Bandenbreite 8 mm Start X/Start Y: 10 mm/12 mm Sprühgas: Stickstoff Spüllösung Methanol/Wasser (50/50; v/v)
Mobile Phase	Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (8,5/1,5/1/0,36; v/v/v/v)
Derivatisierung	1 s eintauchen in Kupfersulfat 5 %-ig in 8 %-iger Phosphorsäure, anschließend 30 min. erhitzen bei 160 °C

15.4 Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS

Für die Messung mittels MALDI-TOF-MS wurde eine Matrixlösung und ein Peptid-Standard (vgl. Tabelle 47) verwendet. Die Matrixlösung setzt sich aus 15 mg HCCA in 1 mL TA 30 (Gemisch aus Acetonitril und einer 0,1 %igen wässrigen Trifluoressigsäurelösung (7/3; v/v)) zusammen. Bei dem Peptid-Standard handelt es sich um den Peptid-Standard II (Peptide Calibration Standard II, Bruker Corporation, MA, USA), welcher als 1:50 Verdünnung in HCCA verwendet wurde.

Die erhaltenen SQDG-Extrakte wurden 1:100 verdünnt. 1 µL der verdünnten Lösung wurden mit 1 µL einer MALDI-TOF-MS geeigneten Matrix gemischt. 0,5 µL des Proben-Matrix-Gemisches wurden auf ein *Polished Steel Target* pipettiert. Es wurde auch zu jeder Messung die reine Matrix und ein Peptid-Standard zur Kalibrierung des Massenspektrometers auf das *Polished Steel Target* aufgetragen.

Tabelle 24: Verwendete Parameter des MALDI-TOF-MS zur Untersuchung der SQDGs.

MALDI-TOF-MS Parameter	
Gerät	MALDI-TOF-MS (Bruker UltrafleXtreme Smartbeam II Laser)
Laser	2 kHz FlatTop smartbeam-II™
Ionenmodus	negativ
Stickstoffquelle	337 nm, Laser focus 10 µm, FlashDetector™ 1 ppm Massengenauigkeit
<i>m/z</i> -Bereich	300 – 2900 Da

15.5 Charakterisierung mittels GC-FID

Es wurden verschiedene Methoden für die Spaltung und Veresterung der Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern untersucht. Die besten Ergebnisse wurden durch die Kombination zweier Methoden erzeugt. Zunächst erfolgt die Abspaltung der Fettsäuren mit Hilfe einer Lipase (Morimoto et al. 1993). Die Fettsäuren wurden anschließend in Anlehnung an Kind et al. (2012) zu Fettsäuremethylestern umgesetzt [65, 66].

400 µL der zu untersuchenden Lösung wurde unter Stickstoff zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 0,25 mL Phosphatpuffer (9 mg Kaliumdihydrogenphosphat und 12 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 1 L Wasser) und 5 mg Lipase (aus *Rhizopus arrhizus*) versetzt. Die Suspension wurde für 5 h bei 35 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Der Suspension wurde anschließend 200 mL Hexan, 50 µL Toluol und 100 µL methanolische Bortrifluoridlösung (13 – 15 %-ig) zugegeben. Die Lösung wurde dann für 10 min bei 70 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Um die Phasentrennung zu verbessern wurden 200 µL Wasser und 200 µL Hexan zugegeben. 100 µL der organischen Phase wurde in ein Vial pipettiert und mittels GC-FID untersucht. Tab. 25 stellt die Chromatographiebedingungen zusammen.

Tabelle 25: Chromatographiebedingungen der GC-FID Messung zur Bestimmung der Fettsäuremethylester.

GC-FID Parameter				
Injektionsvolumen [μL]	1			
Temperatur des Injektors [$^{\circ}\text{C}$]	250			
Split	75:1			
Trärgas	Stickstoff			
Säule	CP-Sil 88, 50 m x 0,25 mm; 0,20 μm			
Temperaturprogramm	Rate	Zieltemperatur	Temperatur	Gesamtzeit
	[$^{\circ}\text{C}/\text{min}$]	[$^{\circ}\text{C}$]	halten [min]	[min]
	-	140	8,00	8,00
	10,00	230	10	27,00
	50	240	30,00	57,20
Gesamtdauer des Temperaturprogramms [min]	57,20			
Detektor	FID			
Temperatur des Detektors [$^{\circ}\text{C}$]	250			

15.6 Charakterisierung mittels GC-MS

500 μL der zu untersuchenden Lösung wurden unter Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 500 μL Methanol, 850 μL 2-Methoxy-2-methylpropan (*t*-BME) und 150 μL Heptadecansäure-Lösung ($c = 5 \text{ mg/mL}$ in Methanol/*t*-BME (1/1; v/v)) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 min auf dem Vortexer inkubiert. 50 μL dieser Lösung wurden in ein Vial pipettiert und mit 25 μL Nonadecansäuremethylester-Lösung ($c = 1,50 \text{ mg/mL}$ in Methanol/*t*-BME (1/1; v/v)) und 25 μL Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 80 $^{\circ}\text{C}$ und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die erhaltene Lösung wurde direkt zur GC-MS Messung eingesetzt. Tab. 26 stellt die Chromatographiebedingungen zusammen.

Tabelle 26: Chromatographiebedingungen der GC-MS Messung zur Bestimmung der Fettsäuremethylester.

GC-EI-MS Parameter				
Injektionsvolumen [μL]	1			
Split	5:1			
Trärgas	Helium			
Säule	Agilent 122-7032 DB Wax, 30 m, 0.25 mm x 0.25 μm			
Temperaturprogramm	Rate	Zieltemperatur	Temperatur	Gesamtzeit
	[$^{\circ}\text{C}/\text{min}$]	[$^{\circ}\text{C}$]	halten [min]	[min]
	-	160	8,00	8,00
	20	230	18,50	30,00
	10	250	9,50	41,50

Fortsetzung Tabelle 26: Chromatographiebedingungen der GC-MS Messung zur Bestimmung der Fettsäuremethylester.

GC-EI-MS Parameter	
Gesamtdauer des Temperaturprogramms [min]	41,50
Detektor	Quadrupol
Temperatur des Detektors [°C]	250

16 Analytik von Sulfolipiden

16.1 Entwicklung der Extraktionsmethode

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Methoden zur Charakterisierung von Sulfolipiden aus organischen Materialien, wie Algen, Blattgemüse oder auch Cyanobakterien entwickelt werden. Grundlage einer erfolgreichen Identifizierung sowie Quantifizierung ist eine effiziente und möglichst vollständige Extraktion der Analyten aus der Matrix.

16.1.1 Flüssig-Fest-Extraktion

Die entwickelte und optimierte Aufarbeitung zur Isolation von Sulfolipiden aus organischen Blattmaterialien ist nachfolgend dargestellt:

1. 0,5 g lyophilisiertes Probenmaterial 5 min in Kugelmühle vermahlen (Frequenz 25 Hz, 4 Kugeln $\varnothing = 1,5$ cm)
2. Zugabe von 10 mL Chloroform/Methanol (3/2; v/v) zum Probenmaterial in Kugelmühlenbombe
3. 10 min in Kugelmühle vermahlen (Frequenz 25 Hz, 4 Kugeln $\varnothing = 1,5$ cm)
4. Extraktionsgemisch vollständig in Reaktionsgefäß überführen
5. 10 mL Chloroform/Methanol (3/2; v/v) zugeben, Kugelmühlenbombe nachspülen
6. 15 min mit Vortexer homogenisieren, dann 15 min im Ultraschallbad behandeln
7. 5 min bei 4000 rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen
8. Rückstand mit 20 mL Chloroform/Methanol (3/2; v/v) versetzen
9. 15 min mit Vortexer homogenisieren, dann 15 min im Ultraschallbad behandeln
10. 5 min bei 4000 rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen
11. Schritt 6 – 8 dreimal wiederholen, Überstände vereinen
12. Lösungsmittel unter Stickstoffstrom abtrennen und in 5 mL Chloroform/Methanol (3/2; v/v) aufnehmen

Die Lagerung des gewonnenen Extraktes erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

16.1.2 Festphasenextraktion

Der nach 15.1.1 isolierte Rohextrakt wurde mittels Festphasenextraktion gereinigt. Tabelle 27 gibt das Schema der finalen SPE-Durchführung wieder.

Tabelle 27: Schematische Darstellung der Reinigung des Rohextrakts mittels SPE.

Säulenmaterial	Aminopropyl-modifiziertes Kieselgel (500 mg/6 mL)
Konditionierung	<ul style="list-style-type: none"> • 5 mL MeOH, 5 mL Wasser • 5 mL 0,1 M HCl • 5 mL Wasser, 5 mL MeOH
Probenauftragung	Probe gelöst in 5 mL Chloroform/Methanol (3/2; v/v)
Waschen	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mL Chloroform/Methanol (90/10; v/v) • 10 mL Chloroform/Methanol (50/50; v/v)
Elution	10 mL Chloroform/Methanol (80/20; v/v) + 100 mM NH ₄ -acetat + 2 mL 25 %-iges NH ₃

Da die Elution mit salzhaltigen Lösungsmitteln erfolgte, folgt ein Waschschrift, um das Eluat vor der weiteren Verwendung vom Salz zu befreien.

- Eluat + 2 mL 0,9 %-iger Kaliumchlorid-Lösung, vortexen, 10 min im Ultraschallbad behandeln, 5 min bei 4000 rpm zentrifugieren
- Organische Phase abtrennen und Rückstand bei 40 °C mittels Vakuum-Zentrifuge getrocknet
- Rückstand in 1 mL MeOH aufnehmen

16.2 Entwicklung der MRM-Methode

Die Quantifizierung der SQDGs sollte mittels MRM Methode erfolgen. Dadurch sollte die Selektivität der Detektion erhöht werden. Hierzu wurden nacheinander der externe Standard, der interne Standard und ein *Spirulina* sp.-Extrakt mittels Spritzenpumpe (Fließgeschwindigkeit 10 µL/min) direkt in die ESI-Quelle eingebracht. Zusätzlich wurden noch Vergleichssubstanzen (vgl. Kapitel 16.2) auf ihre Fragmentierungsmuster untersucht. Über die Funktion *Automatic Compound Optimization* der AB SCIEX Analyst1.6.1® -Software wurde für jedes SQDGs sowie für den internen Standard die drei intensivsten Fragmente sowie die optimalen Ionisierungsparameter bestimmt. Die drei Fragmente werden nachfolgend als Qnt (höchste Intensität), Qal 1 (zweithöchste Intensität) und Qal 2 (dritthöchste Intensität) bezeichnet. Eine zusammenfassende Darstellung der detektierten SQDG mit Massenübergängen ist in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 28: Geräteparameter und Einstellungen des Massenspektrometers.

Massenspektrometer Parameter	
Massenspektrometer	API 4000 QTRAP® System (SCIEX, Darmstadt)
<i>Curtain Gas</i> [psi]	10
<i>Collision Gas</i> [psi]	<i>medium</i>
<i>Ionspray Voltage</i> [V]	-4500

Fortsetzung Tabelle 28: Geräteparameter und Einstellungen des Massenspektrometers.

Massenspektrometer Parameter	
Temperatur [°C]	0
<i>Ion Source Gas 1</i> [psi]	16
<i>Ion Source Gas 2</i> [psi]	0
<i>Interface heater</i>	<i>on</i>
<i>Software</i>	Analyst® Software Version: 1.6.1

Tabelle 29: Optimierte Parameter des massenspektrometrischen Systems im negativen Modus für die SQDGs sowie den internen Standard.

Analyt	Rt [min]	M [g/mol]	MRM- Übergang [m/z]	DT [ms]	DP [V]	EP [V]	CE [P]	CXP [V]
792 (ISD)	20,5	794	792,0 → 96,0	150	-155	-10	-128	-15
			792,0 → 58,0	150	-155	-10	-130	-1
			792,0 → 80,0	150	-155	-10	-128	-3
555	9,23	555	555,0 → 80,0	150	-130	-10	-100	-3
			555,0 → 94,0	150	-130	-10	-80	-5
			555,0 → 224,0	150	-130	-10	-64	-15
765	19,7	765	765,0 → 80,0	150	-110	-10	-120	-11
			765,0 → 224,0	150	-110	-10	-64	-15
			765,0 → 94,0	150	-110	-10	-112	-5
787	15,4	787	787,3 → 80,0	150	-155	-10	-112	-11
			787,3 → 224,0	150	-155	-10	-64	-1
			787,3 → 164,0	150	-155	-10	-11	-11
789	17,4	789	789,2 → 80,8	150	-165	-10	-130	-1
			789,2 → 224,7	150	-165	-10	-64	-17
			789,2 → 164,7	150	-165	-10	-14	-11
791	11,7	791	791,0 → 81,0	150	-160	-10	-104	-3
			791,0 → 225,0	150	-160	-10	-64	-5
			791,0 → 165,0	150	-160	-10	-80	-1

DT: *dwell time*; DP: *declustering potential*; EP: *entrance potential*; CE: *collision energy*; CXP: *collision cell exit potential*.

Fortsetzung Tabelle 29: Optimierte Parameter des massenspektrometrischen Systems im negativen Modus für die SQDGs sowie den internen Standard.

Analyt	Rt [min]	M [g/mol]	MRM- Übergang [m/z]	DT [ms]	DP [V]	EP [V]	CE [P]	CXP [V]
793	25,7	793	793,0 → 80,8	150	-135	-10	-130	-9
			793,0 → 224,8	150	-135	-10	-17	-17
			793,0 → 79,9	150	-135	-10	-1	-1
801	16,6	801	801,3 → 81	150	-150	-10	-130	-11
			801,3 → 152,9	150	-150	-10	-70	-9
			801,3 → 224,9	150	-150	-10	-62	-15
803	18,9	803	803,4 → 80,6	150	-185	-10	-128	-3
			803,4 → 224,8	150	-185	-10	-64	-17
			803,4 → 164,5	150	-185	-10	-80	-11
805	23,1	805	805,0 → 81,0	150	-65	-10	-114	-3
			805,0 → 80,0	150	-65	-10	-126	-1
			805,0 → 224,0	150	-65	-10	-68	-17
807	29,7	807	807,2 → 80,6	150	-130	-10	-126	-1
			807,2 → 224,9	150	-130	-10	-66	-11
			807,2 → 94,8	150	-130	-10	-108	-3
813	15,7	813	813,3 → 80,9	150	-160	-10	-130	-1
			813,3 → 152,7	150	-160	-10	-72	-13
			813,3 → 94,7	150	-160	-10	-126	-1
815	18,4	815	815,4 → 80,9	150	-205	-10	-118	-3
			815,4 → 152,7	150	-205	-10	-64	-15
			815,4 → 94,7	150	-205	-10	-106	-5
817	21,3	817	817,0 → 81,0	150	-230	-10	-120	-11
			817,0 → 225,0	150	-230	-10	-66	-17
			817,0 → 165,0	150	-230	-10	-72	-9
819	26,1	819	819,3 → 80,8	150	-150	-10	-116	-1
			819,3 → 225,1	150	-150	-10	-68	-3
			819,3 → 164,7	150	-150	-10	-72	-13

DT: *dwell time*; DP: *declustering potential*; EP: *entrance potential*; CE: *collision energy*; CXP: *collision cell exit potential*.

Experimenteller Teil

Fortsetzung Tabelle 29: Optimierte Parameter des massenspektrometrischen Systems im negativen Modus für die SQDGs sowie den internen Standard.

Analyt	Rt [min]	M [g/mol]	MRM- Übergang [m/z]	DT [ms]	DP [V]	EP [V]	CE [P]	CXP [V]
821	36,0	821	821,5 → 80,8	150	-140	-10	-130	-1
			821,5 → 225,1	150	-140	-10	-72	-1
			821,5 → 95,0	150	-140	-10	-120	-5
837	14,6	837	837,2 → 80,9	150	-80	-10	-124	-3
			837,2 → 224,7	150	-80	-10	-66	-15
			837,2 → 165,1	150	-80	-10	-74	-1
839	16,3	839	839,3 → 80,0	150	-110	-10	-120	-5
			839,3 → 224,0	150	-110	-10	-62	-17
			839,3 → 164,0	150	-110	-10	-76	-11
841	18,6	841	841,3 → 80,9	150	-200	-10	-124	-11
			841,3 → 224,7	150	-200	-10	-72	-15
			841,3 → 164,7	150	-200	-10	-82	-9
843	22,7	843	843,3 → 80,9	150	-170	-10	-118	-3
			843,3 → 224,9	150	-170	-10	-68	-17
			843,3 → 94,7	150	-170	-10	-110	-3
845	28,0	845	845,4 → 80,9	150	-175	-10	-118	-3
			845,4 → 224,6	150	-175	-10	-70	-11
			845,4 → 94,8	150	-175	-10	-120	-15
847	10,4	847	847,3 → 81,1	150	-170	-10	-122	-11
			847,3 → 224,7	150	-170	-10	-70	-15
			847,3 → 95	150	-170	-10	-110	-1
833	13,0	833	833,5 → 81,1	150	-100	-10	-124	-3
			833,5 → 224,8	150	-100	-10	-66	-19
			833,5 → 165	150	-100	-10	-75	-11
849	11,9	849	849,4 → 80,8	150	-160	-10	-130	-11
			849,4 → 224,7	150	-160	-10	-72	-3
			849,4 → 94,6	150	-160	-10	-130	-3

DT: *dwell time*; DP: *declustering potential*; EP: *entrance potential*; CE: *collision energy*; CXP: *collision cell exit potential*

Fortsetzung Tabelle 29: Optimierte Parameter des massenspektrometrischen Systems im negativen Modus für die SQDGs sowie den internen Standard.

Analyt	Rt [min]	M [g/mol]	MRM- Übergang [m/z]	DT [ms]	DP [V]	EP [V]	CE [P]	CXP [V]
855	11,0	855	855,0 → 80,0	150	-145	-10	-128	-1
			855,0 → 224,0	150	-145	-10	-74	-11
			855,0 → 164,0	150	-145	-10	-80	-9
867		867	867,0 → 80,0	150	-175	-10	-128	-3
			867,0 → 224,0	150	-175	-10	-78	-15
			867,0 → 164,0	150	-175	-10	-86	-1
871		871	871,0 → 80,0	150	-195	-10	-126	-3
			871,0 → 224,0	150	-195	-10	-72	-17
			871,0 → 164,0	150	-195	-10	-80	-7

DT: dwell time; DP: declustering potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: collision cell exit potential.

16.3 Entwicklung der LC-ESI-MS/MS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Gradienten Verläufe, variierende Flussraten sowie variierende Temperaturen des Säulenofens getestet. Des Weiteren wurden als stationäre Phase die beiden nachfolgend aufgeführten Säulen getestet:

- RP C18 (Kinetex, 150 x 2,1 mm i.D., 2.6 µm, 100 Å, Phenomenex® Inc.)
- RP NH2 (Nucleodur, 150 x 4,6 mm i.D., 3 µm, 110 Å, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG)

Die Parameter der optimierten Chromatographiebedingungen sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Finale Parameter der HPLC-Methode zur Trennung von SQDGs.

HPLC Parameter			
HPLC Pumpe	Agilent 1260 Infinity Quaternary LC System		
Eluent A	10 mM Ammoniumacetat in Wasser		
Eluent B	10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Wasser (9/1; v/v)		
Flussrate	200 µL/min		
Gradient	Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
	0	97	3
	2	97	3
	7	1	99
	38	1	99
	44	97	3
	50	97	3

Fortsetzung Tabelle 30: Finale Parameter der HPLC-Methode zur Trennung von SQDGs.

HPLC Parameter	
Säulenofen	Agilent Column Oven
Chromatographiesäule	Phenomenex® Kinetex® C18, 150, 2,1 mm i.D., 2,6 µm
Säulenofentemperatur	30 °C
Autosampler	Agilent Autosampler
Injektionsvolumen	5 µL
Software	Analyst® Software (Version 1.6.1)

Nachfolgende Gleichung 1 wurde zur Berechnung der Konzentration der einzelnen SQDGs verwendet.

$$c_A = \frac{c_{\text{ist}} \cdot \left(\frac{A_A}{A_{\text{ist}}} \cdot b \right)}{m} \cdot \text{WFR} \quad \text{Gleichung 1}$$

c_A	[µg/mL]	Konzentration des Sulfolipids
c_{ist}	[µg/mL]	Konzentration des eingesetzten internen Standards
A_A	[au]	gemessene Peakfläche (Peakfläche des Sulfolipids)
A_{ist}	[au]	gemessene Peakfläche (Peakfläche des Internen Standards)
m	[au/µg/mL]	Steigung der Regressionsgerade
b	[au]	y- Achsenabschnitt der Regressionsgerade
WFR	[%]	Wiederfindungsrate

17 Herstellung von Stammlösungen und Kalibrierlösungen

17.1 Verwendete Standardsubstanzen

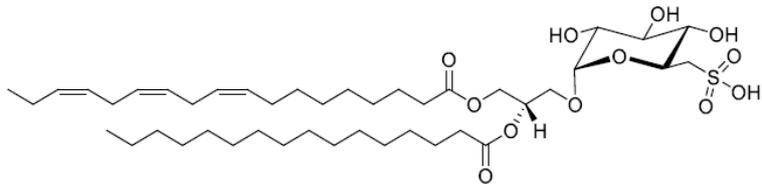
Als externer Standard wurde das kommerziell erwerbliche SQDG mit der Masse 815 g/mol verwendet. Dieses wird in dieser Arbeit als SQDG 815 bezeichnet.

Als interner Standard (IST) wurde ein synthetisches Ceramid mit der molaren Masse 794 g/mol verwendet. Es weist strukturelle Ähnlichkeit zu SQDGs auf, kommt jedoch in pflanzlichen Matrices nicht vor.

Beide Substanzen wurden von Avanti® Polar Lipids, Inc, Alabaster, USA bezogen.

SQDG 815

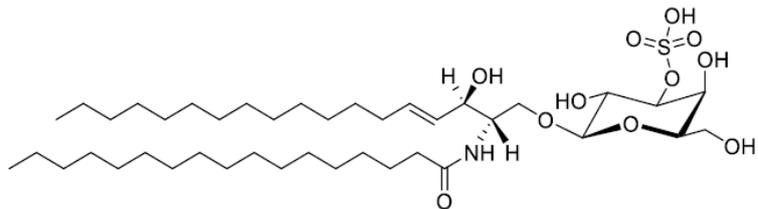
2-O-Hexadecanoyl-1-O-(9Z, 12Z, 15Z-octadecatrienoyl)-glycerol 3-(6-deoxy-6-sulfo- α -D-glucopyranoside)



(als Ammoniumsalz)

IST

3-O-sulfo-D-galactosyl- β 1-1'-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosine



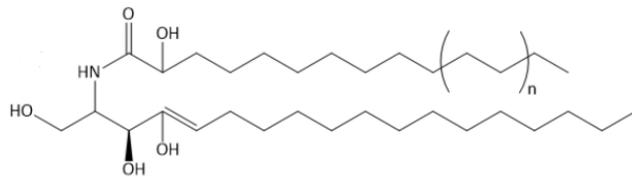
(als Ammoniumsalz)

17.2 Verwendete Vergleichssubstanzen

Als Vergleichssubstanzen wurden weitere Lipid Analyten mit SQDG-ähnlicher Masse und ähnlichen chemischen Eigenschaften ausgewählt und mittels ESI-QqQ auf ihre Fragmentierungsmuster untersucht.

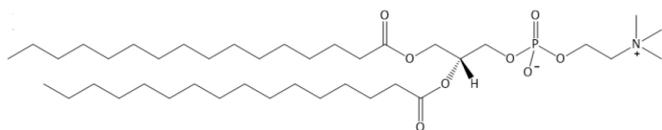
Ceramid

780 g/mol



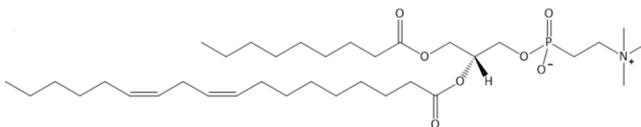
Dipalmitoylphosphatidylcholin

734 g/mol



Sojalecithin

(hier: (2-Nonanoyloxy-3-Octadeca-9,12-Dienoyloxypropoxy)-[2-(Trimethylazaniumyl)ethyl]phosphinat)



644 g/mol

17.3 Stammlösungen

5 mg des kommerziell erwerblichen SQDG 815 Standards wurden in 1 mL Methanol gelöst, so dass eine finale Konzentration von 5 mg/mL (1000 ppm) vorlag.

Für die Herstellung der Stammlösung des internen Standards wurde 1 mg in 1 mL Methanol eingewogen, so dass eine finale Konzentration von 1 mg/mL (1000 ppm) vorlag.

Die Vergleichssubstanzen (vgl. Kapitel 16.2) wurden so eingewogen, dass 1 mM Lösungen in Acetonitril vorlagen. Die Lösung wurde für 10 min im Ultraschallbad behandelt und danach durch einen PTFE-Spritzenfilter filtriert. Die Filtrate wurden dann wie unter Teil 15.2 beschrieben am ESI-QqQ per Direkteinlass auf die *Precursor Ions* und die dazugehörigen Fragmente untersucht.

Die Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Tiefkühler gelagert.

17.4 Externe Kalibrierung

Die Stammlösung des SQDG 815 wurde so verdünnt, dass ein definierter Konzentrationsbereich mit Kalibrierpunkten in äquidistantem Abstand abgedeckt wurde. Zu jedem Kalibrierpunkt wurde ein identisches Volumen an IST-Stammlösung gegeben.

17.5 MRM-Stammlösungen

Für die Entwicklung der MRM Methode wurden Lösungen des SQDG 815 sowie des IST mit 10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Wasser (9/1; v/v) so verdünnt, dass 10 µmolare Lösungen erhalten wurden.

Für das Einmessen weiterer SQDGs wurde ein Rohextrakt aus *Spirulina* sp. hergestellt. Dieser wurde in verschiedenen Verdünnungen 1:100, 1:1000 und 1:10000 dann wie unter Kapitel 15.2 beschrieben am ESI-QqQ per Direkteinlass auf die *Precursor Ions* und die dazugehörigen Fragmente untersucht.

18 Methodvalidierung

Die Validierung weißt die Zuverlässigkeit einer Methode nach. Laut DIN ISO 8402 versteht man unter einer Validierung: das „Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind.“ Der maximale Umfang einer Validierung umfasst Richtigkeit, Präzision, Linearität, Wiederfindungsrate, Selektivität, Robustheit, Nachweisgrenze und Bestimmungszweck. Der Umfang jeder Validierung richtet sich aber individuell nach Art und Zweck der Analysenmethode und kann daher von der durchführenden Stelle festgelegt werden.

Für die in dieser Arbeit optimierte Methode wurden folgende Validierungspunkte ausgewählt: Nachweis-, und Bestimmungsgrenze, Linearität, Präzision und Wiederholbarkeit.

18.1.1 Verfahrenskenndaten

Normalverteilung

Grundlage für die Anwendung von den meisten statistischen Test der Validierung, sind normalverteilte Werte. Von normalverteilten Werten spricht man, wenn die Messergebnisse in Form einer Glockenkurve (Gauß'sche Verteilung) um den Erwartungswert μ (wahrer Wert) verteilt sind. In dieser Arbeit wurde der Test auf Normalverteilung nach DAVID angewendet. Dabei wird eine Prüfgröße berechnet (Gleichung 2) und mit tabellierten Werten verglichen.

$$PG = \frac{V}{s} \quad \text{Gleichung 2}$$

PG	-	Prüfgröße
V	[au]	Variationsbreite (Differenz zwischen größten und kleinsten Messwert)
s	[au]	Standardabweichung

Anwendungsbereich

Der Anwendungsbereich einer Methode muss zu Beginn der Validierung definiert werden, um zu definieren für welche Matrix, Methode, Analyt und Messbereich die Validierung gilt. In der vorliegenden Arbeit umfasst der Anwendungsbereich die Extraktion, Identifizierung und Quantifizierung von verschiedenen MQDGs und SGDGs aus Blattmaterialien phototropher Organismen und Cyanobakterien in gefriergetrockneter, fein zermahlener Form. Die Quantifizierung erfolgt dabei über eine externe Kalibrierreihe und einen internen Standard (3-O-sulfo-D-galactosyl- β 1-1'-N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosin) mittels HPLC-ESI-MS/MS in einem Konzentrationsbereich von 1 – 10 $\mu\text{g/mL}$.

Selektivität und Spezifität

Die Selektivität beschreibt die Fähigkeit einer Methode mehrere Analyten nebeneinander eindeutig zu identifizieren und fehlerfrei zu quantifizieren. Dabei darf die Methode nicht durch vorkommende endogene und exogene Substanzen (bspw. Verunreinigungen, Matrixbestandteile) in ihrer Richtigkeit gestört werden.

Die Spezifität dagegen beschreibt die Fähigkeit einer Methode eine Substanz in der Probe akkurat und fehlerfrei nachzuweisen und zu quantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine LC-ESI-MS/MS Methode entwickelt und validiert. Hierbei werden die Analyten nicht nur durch ihre typischen Massenübergänge identifiziert, sondern auch durch das flüssigchromatographische System getrennt und erhalten somit eine zusätzliche substanzabhängige Retentionszeit, wodurch die Selektivität weiter verbessert wird.

Zur Überprüfung der Selektivität der vorliegenden Methode wurden sechs Leerwertproben undotiert analysiert. Des Weiteren wurden die Massenübergänge ähnlicher Lipide untersucht (vgl. Kapitel 16.2).

Kalibrierfunktion

Mithilfe der Kalibrierfunktion wird der funktionale Zusammenhang zwischen Analyt Konzentration und Messignal beschrieben. Kalibrierfunktionen können linear, linearisiert oder nicht-linear sein. Soll mit einer linearen Kalibrierfunktion gearbeitet werden, ist sicherzustellen, dass Messignal direkt proportional zur Konzentration ist. Der Messbereich in welchem dieser Zusammenhang gegeben ist, wird als linearer Arbeitsbereich beschrieben. Durch den Korrelationskoeffizienten R^2 und die Steigung m kann die Güte der linearen Kalibrierfunktion beschrieben werden. Die Beurteilung der graphischen Darstellung einer Kalibrierfunktion als lineare Regressionsgerade, kann zunächst optisch und subjektiv erfolgen. Sollten keine offensichtlichen Abweichungen auftreten, kann auch auf weitere statistische Test verzichtet werden. Sind allerdings kritische Punkte oder mögliche Ausreißer erkennbar, kann zusätzlich eine Residualanalyse oder ein Linearitätstest nach MANDEL erfolgen.

Die Residualanalyse ist ein mathematisches Modell zur Prüfung, ob die das gewählte Kalibriermodell die Messdaten ausreichend gut beschreibt. Man berechnet dazu die Residuen d_i . Diese Werte ergeben sich aus der vertikalen Abweichung der Messwerte von der berechneten Regressionsgerade.

$$d_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{Gleichung 3}$$

d_i	[au]	Residue
y_i	[au]	Messsignal an i-ter Stelle
\hat{y}_i	[au]	Zu y_i zugehöriger Wert, berechnet aus der Regressionsfunktion

Der bereits erwähnte Linearitätstest nach MANDEL ist ein weiteres mathematisches Verfahren zur Bestimmung der Güte des gewählten Kalibriermodells. Mit Gleichung (4) und (5) werden die Reststandardabweichung der linearen Regression und der quadratischen Funktion berechnet. Diese spiegelt die Präzision der linearen bzw. quadratischen Funktion wieder und ist ein Maß für die Streuung der Residuen in y-Richtung um die Regressionsfunktion.

Es gilt je größer der Wert, desto größer ist die Streuung der Residuen und die Präzision entsprechend geringer. Es gilt darüber hinaus, wenn $s_R < s_{RQ}$, dann kann die Kalibrierfunktion im betrachteten Bereich als linear angesehen werden.

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad \text{Gleichung 4}$$

s_R [au] Reststandardabweichung der linearen Regression

$$s_{RQ} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 3}} \quad \text{Gleichung 5}$$

s_{RQ} [au] Reststandardabweichung der quadratischen Regression

Zusätzlich kann rechnerisch mit Hilfe des Anpassungstests nach MANDEL auch die Signifikanz der oben beschriebenen Ergebnisse berechnet werden. Dazu wird Gleichung 6 verwendet.

$$\Delta s^2 = (n - 2) \cdot s_R^2 - (n - 3) \cdot s_{RQ}^2 \quad \text{Gleichung 6}$$

Δs^2 Differenz der Abweichungsvarianzen

$$PG = \frac{\Delta s^2}{s_{RQ}^2} \quad \text{Gleichung 7}$$

PG Prüfgröße

Mit Hilfe von Gleichung 7 wird die Prüfgröße berechnet und mit dem Wert aus der F-Tabelle verglichen. Es gilt, wenn $PG < F$ -Wert, dann ist der Unterschied als nicht signifikant und die Kalibrierfunktion im untersuchten Konzentrationsbereich als linear anzusehen. Wenn $PG > F$ -Wert sollte ein quadratisches Kalibriermodell in Betracht gezogen werden.

Präzision

Die zufällige Streuung von Messwerten um den Mittelwert wird als Präzision bezeichnet. Man kann dabei zwischen Wiederhol-, Labor- und Vergleichspräzision unterteilen. Die Wiederholpräzision beschreibt entweder sich wiederholende Messungen einer Probe unter gleichbleibenden Bedingungen in kurzen Zeitintervallen (*Intra-Day* Präzision) oder in variierenden Zeitpunkten (*Inter-Day* Präzision). Um die Messpräzision mathematisch bewerten zu können, wird der Variationskoeffizient aus einer Messreihe mit Gleichung 8 berechnet.

$$c_v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 8}$$

c_v	[%]	Variationskoeffizient
s	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Standardabweichung
\bar{x}	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Mittelwert

Für die Bestimmung der Wiederholungspräzision wurden in der vorliegenden Arbeit Standardlösungen mit verschiedener Konzentration (QC 1, 2, 3) analysiert und eine Mehrfachmessung dieser Lösungen vorgenommen. Zum einen wurde die Wiederholungspräzision für den SQDG-Standard-817 und zum anderen für den internen Standard betrachtet. Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt:

QC 1 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, QC 11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und QC 3 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Die verwendeten Konzentrationen sollten die Präzision über den gesamten linearen Arbeitsbereich darstellen.

Die Bestimmung der Vergleichspräzision erfolgte in dieser Arbeit ebenfalls zum einen für den SQDG-Standard-817 und zum anderen für den internen Standard. Es wurden in dieser Arbeit sechs *Spirulina* sp.-Proben, nach vorherigem zudotieren verschiedener Konzentrationen von SQDG-Standard-817 und internen Standard, aufgearbeitet. Diese Analyten wurden dann an verschiedenen Messtagen untersucht. Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt:

QC 1 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, QC 11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und QC 3 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Die verwendeten Konzentrationen sollten die Präzision über den gesamten linearen Arbeitsbereich darstellen.

Genauigkeit

Für die Bestimmung der Genauigkeit wurden 10 Standardlösungen verwendet und eine Sechsfachbestimmung durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen im Bereich von 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Die Konzentrationen und Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Wiederfindung

Die Wiederfindung ist ein Maß, um die Effizienz der Aufarbeitung zu beschreiben. Über die Wiederfindung lässt sich eine Aussage über mögliche Verluste bei der Aufarbeitung oder zu hohe Ausbeuten aufgrund von Matrixeinflüssen treffen. Mathematisch wird die Wiederfindung beschrieben als das Verhältnis einer gemessenen Analyt Konzentration zum realen Wert an Analyten. Die Wiederfindung wird nach Gleichung 9 berechnet und in Prozent angegeben.

$$\text{WFR} = \frac{x_{\text{ist}}}{x_{\text{soll}}} \cdot 100\% \quad \text{Gleichung 9}$$

WFR	[%]	Wiederfindungsrate
x_{ist}	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	gemessene Konzentration
x_{soll}	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	eingesetzte Konzentration

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach der Kalibriergeradenmethode bestimmt. Dazu wurde eine Kalibriergerade im Bereich der vermuteten Nachweisgrenze erstellt und mehrfach gemessen. Aus der erstellten Regressionsgerade wurden dann Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit Gleichung 10 ermittelt.

$$x_{\text{NWG}} = \frac{s_R}{m} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Gleichung 10}$$

x_{NWG}		Nachweisgrenze
m	[$\text{au}/\mu\text{g}/\text{mL}$]	Steigung der Regressionsgerade
t		Quantil der t-Verteilung (n-2), $\alpha = 0,01$
p		Anzahl der Parallelbestimmungen
n		Anzahl Kalibrierpunkte
\bar{x}	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Mittelwert
x_i	[$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Konzentration an i-ter Stelle

18.2 Entwicklung der GC-MS Methode

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine GC-EI-MS-Methode entwickelt, mit der die Trennung und Detektion von Sulfolipiden ermöglicht wird. Im folgenden Abschnitt werden die Entwicklung der GC-EI-MS-Methode sowie notwendige Derivatisierungsschritte dargestellt.

18.2.1 Derivatisierungsmethoden

Für die Derivatisierung der Sulfolipide wurden verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen. Tabelle 31 stellt einen Überblick über die untersuchten Derivatisierungsmöglichkeiten, die in dieser Arbeit untersucht wurden dar. Die Durchführung der jeweiligen Derivatisierungsmöglichkeiten ist ebenfalls in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Mögliche Derivatisierungsansätze zur Bestimmung von SQDG mittels GC-EI-MS.

Acetylierung	Acetylierung	Silylierung	Silylierung
100 µL SQDG-Stamm-Lösung, Lösungsmittel mit Stickstoff abdampfen			
+ 100 µL 0,1 M Ammoniak-lösung	+ 0,2 mL Pyridin	+ 500 µL Pyridin (mit 2 %-igem Hydroxylaminhydrochlorid)	+ 500 µL Dimethylformamid (DMFA)
+ 1 mL Natriumborhydrid (NaBH ₄) (2 %-ig) in Dimethylsulfoxid (DMSO)	+ 0,1 mL Essigsäureanhydrid		+ 100 µL BSTFA
1 h, 60 °C	30 min, 80 °C	30 min, 70 °C	1 h, 80 °C
+ 100 µL Myo-Inosit (Interner Standard)		Abkühlen auf Raumtemperatur	
+ 2 mL Essigsäureanhydrid		+ 900 µL Hexamethyldisilazan (HMDS)	
+ 200 µL 1-Methylimidazol		+ 100 µL Trifluoressigsäure (TFA)	
Abkühlen auf Raumtemperatur			
+ 2 mL Dest. Wasser		1 h, 80 °C	
+ 2 mL DCM			
Wässrige Phase abtrennen, organische Phase 2x in 5 mL dest. Wasser waschen, Wasser ausfrieren und abtrennen			

1 Lebensmittelchemisches Praktikum, Universität Hamburg (2006); 2 bearbeitet nach Williams et al. (1975); 3 in Anlehnung an Füzfaï et al. (2004); 4 in Anlehnung an Schummer et al. (2009) [50, 78, 79, 77]

Für weitere Untersuchungen mittels GC-FID wurden Methoden zur Spaltung der Fettsäuren von den SQDGs untersucht. Tabelle 32 stellt die zwei Methoden die gewählt wurden dar.

Tabelle 32: Trennung der Fettsäuren von den SQDGs mittels TMSH und Lipase.

Fettsäurespaltung mit TMSH	Fettsäurespaltung mit Lipase
0,5 mL Sulfolipidstandard (c= 1 mg/mL) bzw. 1,5 mL Extrakt mit Stickstoff eindampfen	0,5 mL Sulfolipidstandard (c= 1 mg/mL) mit Stickstoff eindampfen
Rückstand + 500 µL MeOH, 850 µL <i>t</i> -BME und 150 µL Heptadecensäure ¹ (c= 5 mg/mL in MeOH/ <i>t</i> -BME (1/1; v/v))	+ 5 mg Lipase
20 min vortexen	+ 0,25 mL Puffer (Kaliumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, (91,2/8,8; v/v) pH= 7,7; pH-Wert-Einstellung mit 1 M Natronlauge)
+ 25 µL Nonadecansäuremethylester ¹ (C= 1,5 mg/mL in MeOH/ <i>t</i> -BME, (1/1; v/v))	Suspension für 5 h bei 35 °C schütteln (Thermoschüttler)
+ 25 µL Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)	0,5 mL Sulfolipid-Standard (c= 1 mg/mL) mit Stickstoff eindampfen
30 s vortexen, 30 min bei 80°C schütteln (Thermoschüttler)	+ 5 mg Lipase

18.2.2 Entwicklung des gaschromatographischen Systems

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Temperaturgradienten, Flussraten, Injektionsmodi und die folgenden zwei Säulen getestet.

- Agilent HP-5ms 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm
- SGE HT5 12 m, 0,32 mm, 0,1 µm

Tabelle 33: Allgemeine GC-EI-MS Parameter

GC-EI-MS Parameter	
Probenaufgabe	GERSTEL MPS <i>Liquid Injection</i>
Injektionsvolumen	1 µL
Trägergas	Helium
Detektor	Quadrupol, positiver Modus

Experimenteller Teil

Tabelle 34: Parameter der GC-EI-MS Methoden 1 bis 5.

		Methode 1	Methode 2	Methode 3	Methode 4	Methode 5
Einstellung Injektor	Modus:	Split	Splitless	Split	Split	Split
	<i>Initial Temperature</i> [°C]	250	250	250	250	250
	<i>Pressure</i> [bar]	0,399	0,400	0,400	0,336	0,336
	<i>Split ratio</i>	10:1	5,3	10:1	5,29:1	5,29:1
	<i>Split flow</i> [mL/min]	5,3	0,00	44,6	23,6	23,6
	<i>Total flow</i> [mL/min]	8,8	13,2	51,9	30,9	30,9
Einstellung GC Ofen	<i>Initial Temperature</i> [°C]	150	80	100	80	80
	<i>Initial time</i> [min]	3,00	2,00	3,00	3,00	3,00
	<i>Equilibration time</i> [min]	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Temperaturprogramm	siehe Tabelle 35				
Gesamtdauer [min]		29	51	44	44	44
Detektortemperatur [°C]		250	250	250	250	250

Tabelle 35: Temperaturprogramm der einzelnen Methoden.

Methode 1			Methode 2			Methode 3		
Rate [°C/min]	Endtemp. [°C]	Dauer [min]	Rate [°C/min]	Endtemp. [°C]	Dauer [min]	Rate [°C/min]	Endtemp. [°C]	Dauer [min]
10	200	6	10	240	2	10	200	6
10	250	5	10	320	5	10	250	5
10	250	5	10	350	5	10	350	5
-	-	-	10	400	5	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 35: Temperaturprogramm der einzelnen Methoden.

Methode 4			Methode 5		
Rate [°C/min]	Endtemp. [°C]	Dauer [min]	Rate [°C/min]	Endtemp. [°C]	Dauer [min]
5	150	5	5	150	5
5	180	5	5	250	5
10	250	4	10	300	4
-	-	-	10	320	1

19 Photometrische Chlorophyll-Bestimmung

Die Extraktion von Chlorophyll a und b erfolgt nach der optimierten Methode nach Ghosh et al. (2018) [83]. Dafür wurden 300 mg des frischen Probenmaterials mit 20 mL 80 %-iger Acetonlösung homogenisiert. Anschließend wurde bei 4 °C und 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde in Alufolie verpackten Gefäßen bis zur Messung gelagert, um eine Photooxidation in der Lösung zu vermeiden.

Die Quantifizierung wurde anschließend mittels UV/Vis-Photometer vorgenommen. Dafür wurde das verwendete Lösungsmittel als Vergleichslösung eingesetzt. Die Messung erfolgte bei Wellenlängen 663 und 645 nm.

Die Berechnung des Chlorophyll-Gehaltes wurde mittels Gleichung 11 und 12 berechnet.

$$G_{\text{Chlorophyll a}} = \frac{[12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}] \cdot V_{\text{ges}}}{1000 \cdot m_{\text{Einwaage}}} \quad \text{Gleichung 11}$$

$G_{\text{Chlorophyll a}}$	mg/mL	Gehalt an Chlorophyll a
A663	nm	Absorption bei Wellenlänge 663 nm
A645	nm	Absorption bei Wellenlänge 645 nm
V_{ges}	mL	eingesetztes Volumen
m_{Einwaage}	mg	Einwaage des Probenmaterials

$$G_{\text{Chlorophyll b}} = \frac{[22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}] \cdot V_{\text{ges}}}{1000 \cdot m_{\text{Einwaage}}} \quad \text{Gleichung 12}$$

$G_{\text{Chlorophyll b}}$	mg/mL	Gehalt an Chlorophyll b
A663	nm	Absorption bei Wellenlänge 663 nm
A645	nm	Absorption bei Wellenlänge 645 nm
V_{ges}	mL	eingesetztes Volumen
m_{Einwaage}	mg	Einwaage des Probenmaterials

VIII. Literaturverzeichnis

1. Gustafson KR, Cardellina JH, Fuller RW, Weislow OS, Kiser RF, Snader KM et al. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(16):1254-8.
2. Benson A, Daniel H, Wiser R. A sulfolipid in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1959;45(11):1582.
3. Liu B, Diaz F, Bohlin L, Vasänge M. Quantitative determination of antiinflammatory principles in some *Polypodium* species as a basis for standardization. *Phytomedicine*. 1998;5(3):187-94.
4. Sahara H, Hanashima S, Yamazaki T, Takahashi S, Sugawara F, Ohtani S et al. Anti-tumor effect of chemically synthesized sulfolipids based on sea urchin's natural sulfoquinovosylmonoacylglycerols. *Japanese journal of cancer research*. 2002;93(1):85-92.
5. Mizushina Y, Maeda N, Kawasaki M, Ichikawa H, Murakami C, Takemura M et al. Inhibitory action of emulsified sulfoquinovosyl acylglycerol on mammalian DNA polymerases. *Lipids*. 2003;38(10):1065-74.
6. Chirasuwan N, Chaiklahan R, Kittakoo P, Chanasattru W, Ruengjitchatchawalya M, Tanticharoen M et al. Anti HSV-1 activity of sulphoquinovosyl diacylglycerol isolated from *Spirulina platensis*. *Sci Asia*. 2009;35:137-41.
7. Burrichter A, Denger K, Franchini P, Huhn T, Müller N, Spitteller D et al. Anaerobic degradation of the plant sugar sulfoquinovose concomitant with H₂S production: *Escherichia coli* K-12 and *Desulfovibrio* sp. strain DF1 as co-culture model. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2792.
8. Attene-Ramos MS, Wagner ED, Plewa MJ, Gaskins HR. Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Molecular Cancer Research*. 2006;4(1):9-14.
9. Kurth R, Buchholz U, Haas W. Antivirale Arzneimittel—keine Wunderwaffe, aber ein wichtiger Baustein der Pandemieplanung. 2006.
10. Guiry MD. How many species of algae are there? *Journal of phycology*. 2012;48(5):1057-63.
11. Fishery F, Statistics A. *FAO annuaire*. FAO: Rome, Italy. 2019.
12. Wells ML, Potin P, Craigie JS, Raven JA, Merchant SS, Helliwell KE et al. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of applied phycology*. 2017;29(2):949-82.
13. Holdt SL, Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*. 2011;23(3):543-97.
14. Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001. .

15. Richter M, Boeing H, Grünewald-Funk D, Heseker H, Kroke A, Leschik-Bonnet E et al. Vegane Ernährung. *stil*. 2016;1:2.
16. Sharma NK, Tiwari SP, Tripathi K, Rai AK. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology*. 2011;23(6):1059-81.
17. Gantar M, Svirčev Z. MICROALGAE AND CYANOBACTERIA: FOOD FOR THOUGHT 1. *Journal of phycology*. 2008;44(2):260-8.
18. BMEL. Obst, Gemüse, Zitrusfrüchte, Schalen- und Trockenobst <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung-fischerei/versorgungsbilanzen/obst-gemuese-zitrusfruechte-schalen-und-trockenobst/>. letzter Zugriff 28.03.2023 10:34.
19. Menke W, Trebst A, Menke W. Die Struktur der Chloroplasten. Springer; 1967.
20. Adler K, Brecht E, Meister A, Schmidt O, Süß K-H. Die Chloroplasten-Thylakoid-Membran: Biogenese, Pigmentorganisation, Protein-Funktionsbeziehungen und Degeneration während der Seneszenz. Eine Übersicht. *Die Kulturpflanze*. 1979;27(1):13-48.
21. Dörmann P, Benning C. Galactolipids rule in seed plants. *Trends in plant science*. 2002;7(3):112-8.
22. Douce R, Joyard J. Biosynthesis of thylakoid membrane lipids. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*. 1996:69-101.
23. Vothknecht UC, Westhoff P. Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2001;1541(1-2):91-101.
24. Reshef V, Mizrahi E, Marezki T, Silberstein C, Loya S, Hizi A et al. New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *Journal of natural products*. 1997;60(12):1251-60.
25. Gage DA, Huang Z-H, Benning C. Comparison of sulfoquinovosyl diacylglycerol from spinach and the purple bacterium *Rhodospira rubra* by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Lipids*. 1992;27(8):632-6.
26. Keusgen M, Curtis JM, Thibault P, Walter JA, Windust A, Ayer SW. Sulfoquinovosyl diacylglycerols from the alga *Heterosigma carterae*. *Lipids*. 1997;32(10):1101-12.
27. Eichenberger W, Gribi C. Lipids of *Pavlova lutheri*: cellular site and metabolic role of DGCC. *Phytochemistry*. 1997;45(8):1561-7.
28. Ohta K, MIZUSHIMA Y, Hirata N, Takemura M, Sugawara F, Matsukage A et al. Sulfoquinovosyldiacylglycerol, KM043, a new potent inhibitor of eukaryotic DNA polymerases and HIV-reverse transcriptase type 1 from a marine red alga, *Gigartina tenella*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1998;46(4):684-6.
29. Benson A. The plant sulfolipid. *Advances in lipid research*. Elsevier; 1963. p. 387-94.

30. Benning C, Somerville C. Identification of an operon involved in sulfolipid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology*. 1992;174(20):6479-87.
31. Gabriel O. Biosynthesis of sugar residues for glycogen, peptidoglycan, lipopolysaccharide, and related systems. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. 1987;1:504-11.
32. HEINZ E, SCHMIDT H, HOCH M, JUNG KH, BINDER H, SCHMIDT RR. Synthesis of different nucleoside 5'-diphospho-sulfoquinovoses and their use for studies on sulfolipid biosynthesis in chloroplasts. *European journal of biochemistry*. 1989;184(2):445-53.
33. Goddard-Borger ED, Williams SJ. Sulfoquinovose in the biosphere: occurrence, metabolism and functions. *Biochemical Journal*. 2017;474(5):827-49.
34. Granafei S, Losito I, Palmisano F, Cataldi TRI. Unambiguous regiochemical assignment of sulfoquinovosyl mono- and diacylglycerols in parsley and spinach leaves by liquid chromatography/electrospray ionization sequential mass spectrometry assisted by regioselective enzymatic hydrolysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2017;31(18):1499-509. doi:10.1002/rcm.7928.
35. Benning C. Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Annual review of plant biology*. 1998;49(1):53-75.
36. Loya S, Reshef V, Mizrahi E, Silberstein C, Rachamim Y, Carmeli S et al. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: contribution of different moieties to their high potency. *Journal of natural products*. 1998;61(7):891-5.
37. Hanashima S, Mizushina Y, Yamazaki T, Ohta K, Takahashi S, Sahara H et al. Synthesis of sulfoquinovosylacylglycerols, inhibitors of eukaryotic DNA polymerase α and β . *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2001;9(2):367-76.
38. Murakami C, Yamazaki T, Hanashima S, Takahashi S, Ohta K, Yoshida H et al. Structure–function relationship of synthetic sulfoquinovosyl-acylglycerols as mammalian DNA polymerase inhibitors. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;403(2):229-36.
39. Murakami C, Kumagai T, Hada T, Kanekazu U, Nakazawa S, Kamisuki S et al. Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases. *Biochemical pharmacology*. 2003;65(2):259-67.
40. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill Jr AH, Murphy RC et al. A comprehensive classification system for lipids. *European journal of lipid science and technology*. 2005;107(5):337-64.
41. Traversier M, Gaslondes T, Milesi S, Michel S, Delannay E. Polar lipids in cosmetics: recent trends in extraction, separation, analysis and main applications. *Phytochemistry reviews*. 2018;17(5):1179-210.
42. Mossoba MM, Kramer JK, Brenna JT, McDonald RE. *Lipid Analysis and Lipidomics: New Techniques and Applications*. AOCS Publishing; 2006.

43. O'Brien JS, Benson A. Isolation and fatty acid composition of the plant sulfolipid and galactolipids. *Journal of Lipid Research*. 1964;5(3):432-6.
44. Herrero M, Vicente MJ, Cifuentes A, Ibáñez E. Characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the lipid fraction of *Spirulina platensis* pressurized ethanol extract. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*. 2007;21(11):1729-38.
45. Makhlof Brahmi M, Portmann C, D'Ambrosio D, Woods TM, Banfi D, Reichenbach P et al. Telomerase inhibitors from cyanobacteria: isolation and synthesis of sulfoquinovosyl diacylglycerols from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Chemistry-A European Journal*. 2013;19(14):4596-601.
46. Plouguerné E, de Souza LM, Sasaki GL, Cavalcanti JF, Villela Romanos MT, da Gama BA et al. Antiviral Sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Marine drugs*. 2013;11(11):4628-40.
47. Hielscher-Michael S, Griehl C, Buchholz M, Demuth H-U, Arnold N, Wessjohann LA. Natural Products from microalgae with potential against Alzheimer's Disease: Sulfolipids are potent glutaminy cyclase inhibitors. *Marine drugs*. 2016;14(11):203.
48. Logvinov S, Gerasimenko N, Esipov A, Denisenko VA. Examination of the structures of several glycerolipids from marine macroalgae by NMR and GC-MS. *J Phycol*. 2015;51(6):1066-74. doi:10.1111/jpy.12338.
49. Logvinov S, Denisenko V, Dmitrenok P, Moiseenko O. Sulfoquinovosyldiacylglycerins from *Scaphechinus mirabilis*. *Chemistry of natural compounds*. 2012;48(2):175-9.
50. Williams J, Watson G, Khan M, Leung S, Kuksis A, Stachnyk O et al. Gas-liquid chromatography of plant galactolipids and their deacylation and methanolysis products. *Analytical biochemistry*. 1975;66(1):110-22.
51. Zhang X, Phaner CJ, Ferguson-Miller SM, Reid GE. Evaluation of ion activation strategies and mechanisms for the gas-phase fragmentation of sulfoquinovosyldiacylglycerol lipids from *Rhodobacter sphaeroides*. *International journal of mass spectrometry*. 2012;316:100-7.
52. Granafei S, Losito I, Palmisano F, Cataldi TR. Unambiguous regiochemical assignment of sulfoquinovosyl mono- and diacylglycerols in parsley and spinach leaves by liquid chromatography/electrospray ionization sequential mass spectrometry assisted by regioselective enzymatic hydrolysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2017;31(18):1499-509.
53. de Souza LM, Sasaki GL, Romanos MTV, Barreto-Bergter E. Structural characterization and anti-HSV-1 and HSV-2 activity of glycolipids from the marine algae *Osmundaria obtusiloba* isolated from Southeastern Brazilian coast. *Marine drugs*. 2012;10(4):918-31.
54. La Barbera G, Antonelli M, Cavaliere C, Cruciani G, Goracci L, Montone CM et al. Delving into the polar lipidome by optimized chromatographic separation, high-resolution mass

spectrometry, and comprehensive identification with Lipostar: microalgae as case study. *Analytical chemistry*. 2018;90(20):12230-8.

55. Xu J, Chen D, Yan X, Chen J, Zhou C. Global characterization of the photosynthetic glycerolipids from a marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2010;663(1):60-8.

56. Cutignano A, Luongo E, Nuzzo G, Pagano D, Manzo E, Sardo A et al. Profiling of complex lipids in marine microalgae by UHPLC/tandem mass spectrometry. *Algal research*. 2016;17:348-58.

57. Antonelli M, Benedetti B, Cavaliere C, Cerrato A, La Barbera G, Montone CM et al. Enrichment procedure based on graphitized carbon black and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for elucidating sulfolipids composition of microalgae. *Talanta*. 2019;205:120162.

58. Folch J, Lees M, Sloane Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.

59. Naumann Y. Sulfoquinovosyldiacylglyceride – antiviral aktive Substanzen. 2009.

60. Keusgen M, Curtis JM, Ayer SW. The use of nicotines and sulfoquinovosyl monoacylglycerols in the analysis of monounsaturated n-3 fatty acids by mass spectrometry. *Lipids*. 1996;31(2):231-8.

61. Wenk MR. *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer; 2019.

62. Tzima K, Brunton NP, Rai DK. Evaluation of the impact of chlorophyll removal techniques on polyphenols in rosemary and thyme by-products. *Journal of food biochemistry*. 2020;44(3):e13148.

63. Phaisan S, Yusakul G, Sakdamas A, Taluengjit N, Sakamoto S, Putalun W. A green and effective method using oils to remove chlorophyll from *Chromolaena odorata* (L.) RM King & H. Rob. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 2020;42(5).

64. Rizov I, Doulis A. Separation of plant membrane lipids by multiple solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2001;922(1):347-54.

65. Kind T, Meissen JK, Yang D, Nocito F, Vaniya A, Cheng Y-S et al. Qualitative analysis of algal secretions with multiple mass spectrometric platforms. *Journal of Chromatography A*. 2012;1244:139-47.

66. Morimoto T, MURAKAMI N, NAGATSU A, SAKAKIBARA J. Studies on glycolipids. VII. Isolation of two new sulfoquinovosyl diacylglycerols from the green alga *Chlorella vulgaris*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1993;41(9):1545-8.

67. Dobrev G, Zhekova B, Nedelcheva P, Chochkov R, Krastanov A. Characterization of crude lipase from *Rhizopus arrhizus* and purification of multiplicity forms of the enzyme. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2011;25(1):2295-300.

68. Vogeser M. Anwendung der HPLC-Tandem-Massenspektrometrie in der klinischen Chemie/The use of HPLC-tandem mass spectrometry in clinical chemistry. *Journal of Laboratory Medicine*. 2004;28(3):195-204.
69. Lu N, Wei D, Chen F, Yang ST. Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis* under salt stress. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2012;114(3):253-65.
70. Hua Y, Jenke D. Increasing the sensitivity of an LC–MS method for screening material extracts for organic extractables via mobile phase optimization. *Journal of chromatographic science*. 2012;50(3):213-27.
71. Robbins KS, Shah R, MacMahon S, de Jager LS. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of sulfite in food. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(21):5126-32.
72. Food U, Administration D. Guidance for industry. Bioanalytical method validation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252f1.html>. 2001.
73. Kromidas S. Validierung in der Analytik. John Wiley & Sons; 2011.
74. dos Santos Pereira A, de Aquino Neto FR. High-temperature high-resolution gas chromatography: breaching the barrier to the analysis of polar and high molecular weight compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1999;18(2):126-36.
75. Carlsson NG, Karlsson H, Sandberg AS. Determination of oligosaccharides in foods, diets, and intestinal contents by high-temperature gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1992;40(12):2404-12.
76. Simoneau C, Hannaert P, Anklam E. Detection and quantification of cocoa butter equivalents in chocolate model systems: analysis of triglyceride profiles by high resolution GC. *Food Chemistry*. 1999;65(1):111-6.
77. UHH. Lebensmittelchemisches Praktikum. 2006.
78. Füzfai Z, Katona ZF, Kovács E, Molnár-Perl I. Simultaneous identification and quantification of the sugar, sugar alcohol, and carboxylic acid contents of sour cherry, apple, and berry fruits, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(25):7444-52.
79. Schummer C, Delhomme O, Appenzeller BM, Wennig R, Millet M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*. 2009;77(4):1473-82.
80. Kuriyama I, Musumi K, Yonezawa Y, Takemura M, Maeda N, Iijima H et al. Inhibitory effects of glycolipids fraction from spinach on mammalian DNA polymerase activity and human cancer cell proliferation. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2005;16(10):594-601.

81. Golik J, Dickey JK, Todderud G, Lee D, Alford J, Huang S et al. Isolation and structure determination of sulfonoquinovosyl dipalmitoyl glyceride, a P-selectin receptor inhibitor from the alga *Dictyochloris fragrans*. *Journal of natural products*. 1997;60(4):387-9.
82. Fischer J, Treblin M, Sitz T, Rohn S. Development of a targeted HPLC-ESI-QqQ-MS/MS method for the quantification of sulfolipids from a cyanobacterium, selected leafy vegetables, and a microalgae species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021;413:1941-54.
83. Ghosh P, Das P, Mukherjee R, Banik S, Karmakar S, Chatterjee S. Extraction and quantification of pigments from Indian traditional medicinal plants: A comparative study between tree, shrub, and herb. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018;9(7):3052-9.
84. Benson A. Plant membrane lipids. *Annual review of plant physiology*. 1964;15(1):1-16.
85. Körber TT, Sitz T, Abdalla MA, Mühling KH, Rohn S. LC-ESI-MS/MS Analysis of Sulfolipids and Galactolipids in Green and Red Lettuce (*Lactuca sativa* L.) as Influenced by Sulfur Nutrition. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):3728.
86. Sitz T, Domey H, Fischer J, Rohn S. An Alternative Approach for the Synthesis of Sulfoquinovosyldiacylglycerol. *Molecules*. 2021;26(14):4275.
87. Gefahrstoffinformationssystem (GESTIS) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. at: <http://www.dguv.de/ifa/GESTIS/GESTISStoffdatenbank/index.jsp>. (letzter Zugriff: 08.08.2023).
88. Bruker. Instructions for Use Peptide Calibration Standard II.: www.bruker.com/care. (letzter Zugriff: 08.08.2023).

IX. Anhang

20 Ergebnisse und Messwerte

Tabelle 36: Zusammensetzung des verwendeten externen GC-FID Fettsäuremethylester-Standard mit Retentionszeiten und Trivialnamen der dazugehörigen Fettsäuren.

FSME	Trivialname der Fettsäure	Retentionszeit [min]
C8:0	Caprylsäure	2,975
C10:0	Caprinsäure	4,276
C12:0	Laurinsäure	5,838
BHT	-	7,383
C14:0	Myristinsäure	9,334
C16:0	Palmitinsäure	9,927
C16:1	Palmitoleinsäure	10,519
C17:0	Margarinsäure	11,924
C18:0	Stearinsäure	12,506
C18:1	Ölsäure	13,672
C18:2	Linolsäure	15,111
C18:3	Linolensäure	15,218
C20:0	Arachinsäure	17,354
C22:0	Behensäure	18,694
C22:1	Erucasäure	19,238
C24:0	Lignocerinsäure	22,885

Tabelle 37: Gemessene Peakflächen des Standards SQDG m/z 815 für die Grundkalibrierung (G1 -G6) nach der HPLC-ESI-MS/MS-Methode

$c_{SQDG\ m/z\ 815}$ [µg/mL]	Peakfläche G1 [au]	Peakfläche G2 [au]	Peakfläche G3 [au]	Peakfläche G4 [au]	Peakfläche G5 [au]	Peakfläche G6 [au]
1	93900	66800	75900	87000	82400	85700
2	195000	188000	160000	193000	189000	186000
3	272000	278000	230000	279000	274000	260000
4	303000	328000	327000	340000	363000	339000
5	404000	388000	437000	529000	464000	501000
6	533000	497000	530000	520000	610000	592000
7	581000	643000	596000	654000	634000	617000
8	667000	656000	764000	746000	732000	782000
9	802000	727000	802000	746000	779000	813000
10	902000	780000	820000	832000	868000	887000

Tabelle 38: Gemessene Peakflächen des internen Standards IST (5 µg/mL) m/z 792 für die Grundkalibrierung (G1 -G6) nach der HPLC-ESI-MS/MS-Methode

C_{SQDG} m/z 815 [µg/mL]	Peakfläche G1 [au]	Peakfläche G2 [au]	Peakfläche G3 [au]	Peakfläche G4 [au]	Peakfläche G5 [au]	Peakfläche G6 [au]
1	1340000	1340000	1150000	1180000	1130000	1170000
2	1530000	1380000	1120000	1250000	1350000	1270000
3	1400000	1380000	1180000	1230000	1210000	1260000
4	1260000	1410000	1140000	1230000	1370000	1410000
5	1290000	1450000	1200000	1280000	1260000	1300000
6	1120000	1520000	1200000	1350000	1610000	1570000
7	1250000	1540000	1220000	1640000	1350000	1330000
8	1400000	1500000	1230000	1290000	1240000	1510000
9	1490000	1210000	1230000	1300000	1330000	1290000
10	1420000	1130000	1340000	1280000	1280000	1440000

Tabelle 39: Berechnung zu Schnelltest nach DAVID auf Normalverteilung für die Grundkalibrierung (G1 -G6).

c_{SQDG} m/z 815 [$\mu\text{g/mL}$]	Response G1	Response G2	Response G3	Response G4	Response G5	Response G6	Spannweite (V)	Standardabweichung (s)	berechnete Prüfgröße PG	Tabellierte Prüfgröße für $n = 6$, $p = 99\%$ untere bis obere Grenze
1	0,070	0,050	0,066	0,074	0,073	0,074	0,024	0,009	2,603	2,15 - 3,16
2	0,127	0,136	0,143	0,154	0,140	0,147	0,027	0,009	2,909	2,15 - 3,16
3	0,194	0,2020	0,194	0,226	0,227	0,206	0,032	0,015	2,140	2,15 - 3,16
4	0,240	0,232	0,286	0,276	0,265	0,240	0,054	0,022	2,431	2,15 - 3,16
5	0,314	0,268	0,364	0,413	0,369	0,384	0,145	0,052	2,772	2,15 - 3,16
6	0,477	0,327	0,442	0,387	0,378	0,376	0,150	0,053	2,813	2,15 - 3,16
7	0,464	0,417	0,489	0,398	0,469	0,464	0,052	0,035	1,493	2,15 - 3,16
8	0,475	0,438	0,622	0,581	0,588	0,518	0,184	0,072	2,563	2,15 - 3,16
9	0,537	0,600	0,652	0,572	0,586	0,628	0,115	0,041	2,817	2,15 - 3,16
10	0,634	0,690	0,618	0,652	0,663	0,617	0,073	0,028	2,607	2,15 - 3,16

Zur Berechnung wurden die Response-Werte verwendet, Ratio aus Peakfläche SQDG 815 (G1 -G6) und Peakfläche IST (G1 -G6) (vgl. Tab. 39). Bei grün markierten PG ist Normalverteilung mit $p = 99\%$ vorhanden.

Tabelle 40: Berechnung der Varianzhomogenität für die Grundkalibrierung (G1 -G6).

c_{SQDG} m/z 815 [$\mu\text{g/mL}$]	Response G1	Response G2	Response G3	Response G4	Response G5	Response G6	Spannweite (V)	Standardabweichung (s)	berechnete Prüfgröße PG	Tabellierte Prüfgröße für $n = 6$, $p = 99\%$ untere bis obere Grenze
1	0,070	0,050	0,066	0,074	0,073	0,074	0,024	0,009	9,68	10,97
10	0,634	0,690	0,618	0,652	0,663	0,617	0,073	0,028		

Zur Berechnung wurden die Response-Werte verwendet, berechnet aus dem Quotient der Peakfläche SQDG 815 (G1 -G6) und Peakfläche IST (G1 -G6) (vgl. 40). Bei grün markierten PG besteht eine Varianzhomogenität mit $p = 99\%$.

$c_{\text{SQDG } m/z$ 815 [$\mu\text{g/mL}$]	Response 1	Response 2	Response 3	Mittelwert	Standardabweichung (S_R)	Steigung (m)	Quantil der t- Verteilung (n-2) $\alpha = 0.1$
0,01	0,00063	0,00072	0,007	0,00279	0,00365	0,3134	1,63
0,05	0,0013	0,0152	0,012	0,00981	0,00744		
0,1	0,038	0,036	0,034	0,0366	0,00195		
0,5	0,161	0,157	0,161	0,1597	0,00231		

Tabelle 41: Berechnete und gemessene Werte zur Bestimmung der Nachweisgrenze.

Zur Berechnung wurden die Response-Werte verwendet, berechnet aus dem Quotient der gemessenen Peakfläche SQDG 815 und Peakfläche IST

Tabelle 42: Ergebnisse der Untersuchung des SQDG Profils ausgewählter Matrices.

Material	817	791	805	867	882	885	815	787	839	765	555	793	789
	[µg/g]												
	dw												
Spinat	15,92	-	-	-	-	-	375,46	31,82	16,60	-	-	23,17	-
Basilikum	7,63	-	-	-	-	-	177,31	-	0,70	-	19,53	121,58	-
<i>Spirulina</i> sp.	373,62	87,34	57,61	-	-	-	164,89	-	1,21	44,48	317,10	161,74	11,76
<i>C. vulgaris</i>	497,17	32,16	8,83	-	-	-	70,23	3,66	9,00	0,96	9,21	161,74	66,60

Fortsetzung Tabelle 42: Ergebnisse der Untersuchung des SQDG Profils ausgewählter Matrices.

Material	801	803	807	813	819	821	837	841	843	845	847	833	Gesamt
	[µg/g]												
	dw												
Spinat	1,00	-	-	4,91	6,87	1,46	215,89	-	9,32	-	-	-	702,43
Basilikum	-	-	-	-	12,46	0,52	24,37	-	23,37	-	-	-	387,48
<i>Spirulina</i> sp.	-	13,05	28,04	-	234,03	70,28	-	-	-	-	-	162,53	1727,70
<i>C. vulgaris</i>	-	20,99	15,18	32,51	63,68	5,72	-	-	5,45	-	-	29,75	1032,85

[µg/g] dw = µg SQDG pro g Trockengewicht

Tabelle 43: Messwerte der Chlorophyll a und b Quantifizierung in fünf ausgewählten Blattgemüsen.

Probenbezeichnung	Einwaage [g]	$A_{(663\text{ nm})}$ [AU]	$A_{(645\text{ nm})}$ [AU]	$c_{(\text{Chl.-a})}$ [mg/g]	$c_{(\text{Chl.-b})}$ [mg/g]
Blattspinat	0,2151	2,382	0,9090	7,756	2,697
	0,2166	2,613	0,9940	8,452	2,918
	0,2147	2,448	0,9330	7,987	2,794
Mittelwert [mg/g]				8,065	2,794
Standardabweichung [mg/g]				0,3543	0,1127
Rauke	0,2153	1,957	0,722	6,385	2,055
	0,2152	1,954	0,719	6,379	2,041
	0,2161	1,835	0,678	5,964	1,926
Mittelwert [mg/g]				6,243	2,007
Standardabweichung [mg/g]				0,2414	0,07062
Romana-Salat	0,2159	1,863	0,686	6,062	1,943
	0,2174	1,904	0,702	6,152	1,978
	0,2169	1,828	0,672	5,922	1,890
Mittelwert [mg/g]				6,046	1,937
Standardabweichung [mg/g]				0,1161	0,04384
Feldsalat	0,2167	0,802	0,292	2,603	0,8122
	0,2131	0,721	0,261	2,380	0,7328
	0,2179	0,9090	0,3310	2,934	0,8203
Mittelwert [mg/g]				2,639	0,8203
Standardabweichung [mg/g]				0,2783	0,09175
Pak Choi	0,2169	0,2900	0,1080	0,9384	0,3087
	0,2181	0,2670	0,1000	0,8588	0,3140
	0,2191	0,3030	0,1120	0,9713	0,3029
Mittelwert [mg/g]				0,9229	0,3029
Standardabweichung [mg/g]				0,05781	0,01476

Tabelle 44: SQDG-Gehalt in fünf ausgewählten Blattgemüsen.

Probenbezeichnung	SQDG Gehalt [mg/g]
Blattspinat	1,24
Rauke	0,83
Romana-Salat	1,67
Feldsalat	0,32
Pak Choi	0,05

21 Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte sowie Software

21.1 Chemikalien

Tabelle 45: Chemikalienverzeichnis verwendeter Chemikalien mit Hinweisen zu Sicherheit [87].

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
4-(Dimethylamino)-pyridin	GHS06	310, 301, 315,319	302, 352-305, 351+338
Aceton	GHS02, GHS07	225, 319, 336, EUH066	210, 240, 305+351+338, 403+233
Acetonitril	GHS02, GHS07	225, 332, 302, 312, 319	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Aktivkohle	-	-	-
Ammoniumacetat	-	-	-
Bortrifluorid, 13-15 %-ig in Methanol	GHS04, GHS05, GHS06, GHS08	280, 330, 314, 335, 373, EUH014, EUH071	260, 280, 304+340, 303+361+353, 305+351+338, 315, 308+313, 405, 403
C18-RP	-	-	-
Ceramid	-	-	-
Chloroform	GHS06, GHS08	302, 331, 315, 319, 351, 361d, 336, 372	261, 281, 305+351+338, 311
Dichlormethan	GHS07, GHS08	315, 319, 335, 336, 351, 373	261, 281, 305+351+338
Dicyclohexylcarbodiimid	GHS05, GHS06	302,311,317,318	210, 233, 240, 305+351+338,
Dipalmitoylphosphatidylcholin	-	-	-
Ethanol	GHS02, GHS06, GHS08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352, 304+340, 308+310, 403+235
HCCA (α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure)	GHS07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Heptadecansäure	GHS07	315,319	302+352,280,305+351+338
Hexan	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	225, 304, 361f, 373, 315, 336, 411	210, 240, 273, 301+310, 331, 302+352, 403+235
Isopropanol	GHS02, GHS07	225, 319, 336	210, 233, 240, 305+351+338, 403+235
Kaliumchlorid	-	-	-
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	-
Kieselgel 60	-	-	-
Kieselgel, C18-RP	-	-	-
Lithiumchlorid	-	-	-
Magnesiumchlorid	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 45: Chemikalienverzeichnis verwendeter Chemikalien mit Hinweisen zu Sicherheit [84].

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352, 304+340, 308+310, 403+235
Nonadecansäure- methylester	-	-	-
Natrium- hydrogenphosphat	-	-	-
Peptide Calibration Standard II 700- 3500 Da	-	-	-
Phosphorsäure 85 %-ig	GHS05,	290, 314, 335	304+340+310, 305+351+338
Rhizolipase, Lipase 100 T	-	-	-
Salzsäure 32 %-ig	GHS05, GHS07	290, 314, 335	304+340+310, 305+351+338
Sulfo-Ceramide (d18:1/17:0)	-	-	-
Sulfoquinovosyl-di- acylglycerol	-	-	-
tert- Butylmethylether	GHS02, GHS07	225,315	210,233,240,302+352,4 03+235
Toluol	GHS02, GHS07, GHS08	225, 361d, 304, 373, 315, 336	210, 240, 301+310+330, 302+352, 308+313, 314, 403+233
Trimethyl- sulfoniumhydroxid	GHS02, GHS06, GHS08	225,301,311,315,319,331 ,370	210,260,280,301+310,3 05+351+338,311
Tridecansäure	GHS07	315,319	302+352,280,305+351+ 338

21.2 KMR Stoffe

Tabelle 46: Verwendete KMR Stoffe.

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie (GHS)
67-66-3	Trichlormethan	Extraktion, SPE- Clean-UP Menge ca. 2000 mL	K: 1B, M: 2, RF: -

21.3 Zusammensetzung des Peptid-Standards

Tabelle 47: Zusammensetzung des Peptid-Kalibrierungs-Standards II [88].

Peptid	[M – H] ⁻ [g/mol]
Bradykinin 1 - 7	755,4
Angiotensin II	1044,4
Angiotensin I	1294,7
Substanz P	1345,7
Bombesin	1617,8
ACTH clip 1-17	2091,1
ACTH clip 18-39	2463,2
Somatostatin 28	3145,5

22 Probenmaterial

Die in Tabelle 48 aufgeführten Probenmaterialien wurden unter anderem für die Methodenentwicklung, sowie anschließend für die Quantifizierung von Sulfolipiden verwendet. Die Probenmaterialien lagen zum Teil bereits in pulverisierter Form vor. Frische Proben wurden nach Kapitel 13 vorbereitet und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 48: Verwendetes Probenmaterial.

Nr.	Wissenschaftlicher Name	Trivialname	Vertreiber	Ursprungsland
1	<i>Spirulina</i> sp.	Spirulina	IGV GmbH, Nuthetal	Deutschland
2	<i>Spinacia oleracea</i>	Blattspinat	Edeka AG, Hamburg	Italien
3	<i>Urtica dioica</i>	Brennnessel	Lebepur GmbH, Berlin	Deutschland
4	<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorella	IGV GmbH, Nuthetal	Deutschland
5	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i>	Romana-Salat	Edeka AG, Hamburg	Deutschland
6	<i>Valerianella locusta</i>	Feldsalat	Edeka AG, Hamburg	Deutschland
7	<i>Eruca sativa</i>	Rauke	Edeka AG, Hamburg	Deutschland
8	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	Pak-Choi	Edeka AG, Hamburg	Deutschland

22.1 Analysezertifikat des verwendeten *Spirulina* sp.-Pulvers



A.-Scheunert-Allee 40/41, D 14558 Nuthetal

Certificate of Analysis

Spirulina NATURE

Lot Nr.: RSP80TT-437

General free of GMO, irradiation, pesticides, colorants, preservatives and additives, origin Myanmar

Detailed	Parameter		Value
	Color		
Smell			specific
Consistence			powder
Moisture	4.15		g/100g
Proteins	55.82		g/100g
Minerals	6.2		g/100g
Lipid	5.95		g/100g
Microbiology	Total aerobic plate count	$2 \cdot 10^4$	cfu/g
	Molds	$4 \cdot 10^1$	cfu/g
	Yeasts	$4 \cdot 10^1$	cfu/g
	Enterobacteriaceae	$< 3 \cdot 10^1$	cfu/g
	E. coli	negative	/g
	Salmonella	negative	/25g
	Bacillus cereus	negative	/g
Heavy Metals	Lead	≤ 3.0	mg/kg
	Mercury	≤ 0.1	mg/kg
	Cadmium	≤ 1.0	mg/kg
	Arsenic	0.069	mg/kg

Storage Dry, dark, frost-free
MFD 10.10.2014
EXPD 09.10.2018

Specification data are based on manufacturer's information, completed with internal analysis by ILU e.V..
 Please contact us for additional analysis or in case of variances.

Abbildung 32: Analysezertifikat des verwendeten *Spirulina* sp.-Pulvers.

23 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 49: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Drehverschlussdeckel	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Schraubkappe, 10 mm, PP
Filterpapier	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Deutschland	595 Filter Paper Circles, d=185 mm
Glasvials	Wilcom Germany GmbH	1,5 mL, klar
Glasvials (Schraubgewinde)	Wilcom Germany GmbH	1 mL, klar, 10 mm Schraubgewinde
HPTLC-Platten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	HPTLC Silica gel 60 20x10 cm
Inlets	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	0,25 mL, klar
MALDI-Targets	Bruker, Billerica, MA, USA	MTP 384 target plate ground steel BC/ MTP 384 target plate polished steel TF
NMR-Röhrchen	Deutero GmbH	Boro400-5-7
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co.	10 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL
PTFE-Filter	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland	Chromafil®, Porengröße 0,20 µm, d=25 mm
SPE-Kartuschen C18	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland	Chromabond® C18, 0,5 g, 6 mL
SPE-Kartuschen NH ₂	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland	Chromabond® NH ₂ , 0,5 g, 3 mL
SPE-Kartuschen SiO ₂	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland	Chromabond® SiO ₂ , 0,5 g, 6 mL
SPE-Kartuschen ohne Befüllung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	6 mL
Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Injekt®, 2 mL
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co.	1,5 mL, 2 mL, Polypropylen
Septen	Wilcom Germany GmbH	10 mm, PTFE
Vial (Crimpverschluss)	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland	Crimp neck vials N 11
Vial-(Crimp)-Deckel	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	1,3 mm, PTFE
Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	Pyrogenfrei, Polypropylen, 15 mL, 50 mL

24 Geräte- und Softwareverzeichnis

Tabelle 50: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage	Sartorius AG	Modell 1602004
Analysenwaage	Mettler Toledo AG	Modell TLE104E
GC-FID	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	7820A
GC-MS	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	6890 Series
Gefrierschrank	Bosch GmbH	-18 °C
Gefrierschrank	Eppendorf AG	New Brunswick Scientific, Ultra low temperature freezer -86 °C
HPLC-ESI-MS/MS (API 4000™)	HPLC: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA ESI-MS/MS: AB SCIEX, Foster City, CA, USA	1200 Series API 4000™ System
HPLC mit Fraktionssammler	Shimadzu, Kyoto, Japan	Shimadzu UFLC
HPTLC Autosampler	Camag, Berlin, Deutschland	Automatic TLC Sampler 4
HPTLC Photodokumentationseinheit	Camag, Berlin, Deutschland	TLC Visualizer
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG	Research Plus, Volumina 1-10, 10-100, 10-200, 100-1000
Kühlschrank	Bosch GmbH	Explosionssgeschützter Innenraum
Lyophylle	Martin Christ GmbH, Osterode, Deutschland	Alpha 1-4 LSC
MALDI-TOF-MS	Bruker, Billerica, MA, USA	Bruker ultrafleXtreme™ mit smartbeam-II™ laser
NMR	Bruker Daltonik GmbH	Bruker AVANCE III HD 400 MHz Spektrometer (AV3400)
Probenkonzentrator	Bibby Scientific Limited	Stuart® Sample Concentrator SBHCONC/1
Rotationsverdampfer	Pumpe: Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland Halterung: Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	CVC2 LABOROTA 4000

Fortsetzung Tabelle 50: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Thermoschüttler	Ditabis AG, Pforzheim, Deutschland	ThermoMixer Hettich
Ultraschallbad	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland	Sonorex Super
UV/VIS-Spektralphotometer	Thermo Fischer Scientific- Shanghai	Model: Evolution™ 201; max.: 150 W, 50-60 Hz, 100 - 240 V
Vakuumpfuge	Martin Christ GmbH, Osterode, Deutschland	RVC 2-25 CDplus
Vortex	VWR International GmbH	Digital Vortex Mixer, 230 V
Zentrifuge	Eppendorf AG	Centrifuge 5810 R, für Proben von 1,5 – 50 mL

24.1 Softwareverzeichnis

Tabelle 51: Verwendete Software.

Software	Hersteller	Version
Analyst®1.6.1	AB SCIEX, Foster City, CA, USA	Version 1.6.1
ChemDraw® Professional	PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA	Version 15.0.0.106
flexAnalysis 3.3	Bruker, Billerica, MA, USA	
OPENChrom	Lablicate GmbH, Hamburg, Deutschland	
OpenLAB	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	
GC/MSD ChemStation	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	
Microsoft® Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Version 14.0.7229.5000
Microsoft® Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA	Version 14.0.7229.5000
Origin Pro®	OriginLab Corporation	Version 9.1.0G (64-bit)
Shimadzu LC-solution	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan	
Trap Control svc	Bruker Daltonik GmbH	Version 7.0
winCats	Camag, Berlin, Deutschland	

– Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht enthalten –

X. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Metzingen, Oktober 2023

Ort, Datum

Judith Fischer