

Etablierung einer flüssigkeitschromatographisch- massenspektrometrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Cholin und ihrer Metabolite

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Johne, Gabriela Elisabeth

aus Jena

Gießen 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen,
aus dem Biochemischen Institut.**

Gutachter: Prof. Dr. Lochnit, Günter

Gutachter: Prof. Dr. Bartkuhn, Marek

Tag der Disputation: 26.02.2026

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort / Datum

Unterschrift

Veröffentlichung in Zusammenhang mit dieser Arbeit

Poster

Gabriela Elisabeth Johne, Thomas Timm, Peter Krautwurst und Günter Lochnit

„Development of a sensitive LC-ESI-MS method for the quantitative analysis of cholines and phosphocholines” Berlin, Deutschland 7. Berliner LC-MS/MS Symposium 14.03.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Cholin und Cholinderivate und ihre spezifische Bedeutung im Kontext von Pathogenen

- 1.1.1. Cholin
- 1.1.2. Acetylcholin
- 1.1.3. Butyrylcholin
- 1.1.4. Glycerophosphocholin
- 1.1.5. Phosphocholin
- 1.1.6. Dimethylaminoethanol
- 1.1.7. D9- Cholin
- 1.1.8. CDP- Cholin

1.2. Probleme bei der massenspektrometrischen Analytik von Biomolekülen substituiert mit Cholin oder Cholinmetaboliten

1.3. Eine Übersicht publizierter Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cholin und Cholinmetaboliten

1.4. Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie

- 1.4.1. Massenspektrometrie
 - 1.4.1.1. Grundlagen der Massenspektrometrie
 - 1.4.1.2. Aufbau und Funktion eines Massenspektrometers
- 1.4.2. Flüssigkeitschromatographie
 - 1.4.2.1. Prinzip
 - 1.4.2.2. Mobile und stationäre Phasen

1.5. Ziel der Arbeit

2. Material und Methoden

2.1. Material und Chemikalien und Geräte

2.2. Methoden

Inhaltsverzeichnis

3. Ergebnisse

- 3.1. Charakterisierung der Analyten mit MALDI- TOF Massenspektrometrie
- 3.2. Auswahl der stationären Phase und Optimierung der chromatographischen Bedingungen
- 3.3. Auswahl der mobilen Phase
- 3.4. Selected Ion Recording (SIR)/ Total Ion Chromatogram (TIC)
- 3.5. Methodvalidierung

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktur von Cholin	4
Abbildung 2 Struktur von Acetylcholin	5
Abbildung 3 Struktur von Butyrylcholin	5
Abbildung 4 Struktur von Glycerophosphocholin	6
Abbildung 5 Struktur von Phosphocholin	8
Abbildung 6 Struktur von Dimethylaminoethanol	8
Abbildung 7 Schematische Zeichnung D9- Cholin	9
Abbildung 8 Strukturformel CDP- Cholin	10
Abbildung 9 Schematische Darstellung eines Massenspektrometers	18
Abbildung 10 Massenspektrometrische Ionisationsverfahren modifiziert nach Gross JH	18
Abbildung 11 Schematische Darstellung des makroskopischen ESI- Prozesses [62]	20
Abbildung 12 Schematischer Aufbau eines MALDI TOF Massenspektrometers (verändert nach Mann, M., Hedrickson, R.C. and Pandey, A. (2001))	21
Abbildung 13 Prinzip des MALDI Prozesses [62]	22
Abbildung 14 Wasserstoffbrückenbindung	24
Abbildung 15 Ionische Wechselwirkung	24
Abbildung 16 MALDI-TOF Spektrum von: Glycerophosphocholin (ATT-Präparation)	41
Abbildung 17 MALDI-TOF Spektrum von: CDP Cholin (ATT- Präparation)	41
Abbildung 18 LC-ESI MS-Spektrum von Cholin	46
Abbildung 19 LC-ESI-Spektrum von Acetylcholin mit Laufmittel: 1. Ammoniumformiat in ACN 2. Ammoniumformiat in Wasser	46
Abbildung 20 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: Wasser	47
Abbildung 21 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: Ammoniumformiat in Wasser	47
Abbildung 22 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: Ameisensäure	47
Abbildung 23 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: TFA	48
Abbildung 24 LC-ESI -Spektrum Butyrylcholin mit Laufmittel: Ammoniumformiat in Wasser	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25 LC-ESI -Spektrum von Glycerophosphocholin mit Laufmittel: 1. Wasser 2. TFA 3. Amoniumformiat in Wasser 4. Ammoniumformiat in ACN 5. Ameisensäure; Cholin als Fragment	49
Abbildung 26 LC-ESI-Spektrum von Phosphocholin mit Laufmittel Wasser	49
Abbildung 27 LC- ESI-Spektrum von DMAE mit Laufmittel: 1. Ameisensäure 2. TFA 3. Ammoniumformiat in Wasser 4. Ammoniumformiat in ACN	50
Abbildung 28 LC- ESI-Spektrum von D9- Cholin mit Laufmittel: Wasser	50
Abbildung 29 LC-ESI-Spektrum von CDP Cholin mit Laufmittel: 1. Ameisensäure 2. Wasser	51
Abbildung 30 LC-ESI-Spektrum von CDP Cholin mit Laufmittel: 1. Ammoniumformiat in Wasser 2. Ammoniumformiat in ACN	51
Abbildung 31 SIR-Spur von Cholin	55
Abbildung 32 SIR- Spur von Acetylcholin	55
Abbildung 33 SIR-Spur von Butyrylcholin	55
Abbildung 34 SIR-Spur von Glycerophosphocholin	56
Abbildung 35 SIR-Spur von Phosphocholin	56
Abbildung 36 SIR-Spur von DMAE	56
Abbildung 37 SIR-Spur von CDP-Cholin	57
Abbildung 38 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektionen von Cholin	60
Abbildung 39 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Cholin	60
Abbildung 40 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektionen für Acetylcholin	61
Abbildung 41 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Acetylcholin	62
Abbildung 42 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Butyrylcholin	63
Abbildung 43 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Butyrylcholin	64
Abbildung 44 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Glycerophosphocholin	65
Abbildung 45 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Glycerophosphocholin	66
Abbildung 46 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Phosphocholin	67
Abbildung 47 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Phosphocholin	68
Abbildung 48 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Dimethylaminoethanol	69
Abbildung 49 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Dimethylaminoethanol	70
Abbildung 50 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von CDP-Cholin	72
Abbildung 51 Linearer Bereich für die Quantifizierung von CDP Cholin	72
Abbildung 52 Modulation durch PC- Antigene modifiziert nach [87] Goodbridge et al.	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Sphingolipid basierte PC - Epitopstrukturen aus den Nematoden <i>A.suum</i> (a) <i>O. volvulus</i> (b) <i>L. sigmodontis</i> (c) <i>A. vitae</i> (d) <i>S.digitata</i> (e) und <i>C. elegans</i> (f)	12
Tabelle 2 Übersicht Material und Methode [47]	13
Tabelle 3 Übersicht Material und Methode [48]	13
Tabelle 4 Übersicht Material und Methode [49]	14
Tabelle 5 Übersicht Material und Methode [50]	14
Tabelle 6 Übersicht Material und Methode [51]	15
Tabelle 7 Übersicht Material und Methode [53]	15
Tabelle 8 Übersicht Material und Methode [52]	16
Tabelle 9 Atommassen, Isotope, rel. Häufigkeit, exakte isitopische Masse	30
Tabelle 10 Monoisotopische Masse von Cholin	31
Tabelle 11 Monoisotopische Masse von Acetylcholin	31
Tabelle 12 Monoisotopische Masse von Butyrylcholin	32
Tabelle 13 Monoisotopische Masse von Glycerophosphocholin	32
Tabelle 14 Monoisotopische Masse von Phophocholin	33
Tabelle 15 Monoisotopische Masse von Dimethylenolamin (DMAE)	33
Tabelle 16 Monoisotopische Masse von D9-Cholin	34
Tabelle 17 Monoisotopische Masse von CDP- Cholin	34
Tabelle 18 Säulen	35
Tabelle 19 Charakterisierung der Analyten mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	40
Tabelle 20 Säulenvergleich	43
Tabelle 21 Auswertung zur Auswahl der mobilen Phase	52
Tabelle 22 Standartabweichung für die Injektionen jeder Verdünnungsreihen von Cholin	59
Tabelle 23 Standartabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Acetylcholin	61
Tabelle 24 Standartabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Butyrylcholin	63
Tabelle 25 Standartabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Glycerophosphocholin	65
Tabelle 26 Standartabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Phosphocholin	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 27 Standardabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Dimethylaminoethanol	69
Tabelle 28 Standardabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von CDP- Cholin	71
Tabelle 29 Zusammenfassung der Ergebnisse	73

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
A.vitae	<i>Acanthocheilonema vitae</i>
ACN	Acetonitril
A.suum	<i>Ascaris suum</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C.elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CDP	Cytidindiphosphat
CRM	Charge-Residue Model
CRP	C-reaktives Protein
D9-Cholin	Deuterium-markiertes Cholin
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMAE	Dimethylaminoethanol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
et al.	et alia (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESI- MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
evtl.	eventuell
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
ggf.	gegebenenfalls
GP-Cho	Glycerophosphocholin
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i.d.R.	in der Regel
IEM	ion Evaporation Model

Abkürzungen

i.e.	id est (das heißt)
inkl.	inklusiv
Kap.	Kapitel
L	Liter
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie
max.	maximal
min.	minimal
ml	Milliliter
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NaP	Natriumphosphat
PC	Phosphocholin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Wasserstoffionenkonzentration
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIR	Selected Ion Recording
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time-of-flight
T.spiralis	<i>Trichinella spiralis</i>
u.a.	unter anderem
V	Volumen
vgl.	vergleiche
z.B	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Cholin und Cholinderivate und ihre spezifische Bedeutung im Kontext von Pathogenen

Cholin und seine Derivate wurden als strukturelle Komponenten sowohl bei prokaryotischen als auch bei eukaryotischen Pathogenen erkannt. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau von Membranen oder der Signalübertragung [1]. Für die Charakterisierung der biologischen Funktion parasitärer Antigene ist die detaillierte Kenntnis der Epitopstrukturen eine wichtige Voraussetzung. Im Rahmen der massenspektrometrischen Proteomanalytik lässt sich die Modifikation der Proteine genauer analysieren. Die Modifikation beeinflusst unter anderem die Lokalisation, Funktion, Konformation und Interaktion mit anderen Makromolekülen[2].

Die Modifikationen lassen sich in drei Arten unterscheiden: prätranslational, kotranslational und posttranslationale Modifikation. Die prätranslationale Modifikation bezieht sich auf die Veränderung vor der Proteinbiosynthese. Die Modifikation während der Polypeptidsynthese an den Ribosomen wird als kotranslationale Modifikation bezeichnet [3]. Nach erfolgter Translation kommt es durch Verknüpfung chemischer Gruppen (z. B. Phosphoryl-, Acetylgruppen etc.), Formierung Inter- bzw. Intraeptidbindungen (Thioesterbindungen, Disulfidbindungen etc.) und durch proteolytische Spaltung oder Entfernung N- terminalen Aminosäuren zur posttranslationalen Modifikation [4-6]. Diese sind am häufigsten vertreten und nehmen Einfluss auf die Funktionalität der Proteine [2].

Die Proteinmodifikationen können somit wichtige Schlüsselfunktionen für das Verständnis von physiologischen Vorgängen im Bereich der Medizin einnehmen. Des Weiteren sind die Modifikationen ein wichtiger Ansatzpunkt für potentiell therapeutische Interventionen [4].

Einleitung

Die massenspektrometrische Analyse von cholin- und insbesondere phosphocholin-substituierten Biomolekülen wird jedoch häufig durch eine deutlich geringere Empfindlichkeit in der Detektion beeinträchtigt, die auf den zwitterionischen Charakter insbesondere des PC-Substituenten und die Dominanz der vom zwitterionischen Rest abgeleiteten Fragmente zurückzuführen ist. Über die Biosynthese der Phosphocholin-Modifikation in multizellulären Pathogenen ist bisher wenig bekannt. Weder die Donor-Moleküle noch die entsprechenden Transferasen sind bislang für die meisten Organismen identifiziert worden. Um diese Fragen zu beantworten, wird eine zuverlässige und empfindliche Methode zum Nachweis und der Quantifizierung von Cholin und seiner Metabolite benötigt. Somit können dadurch auch genauere Aussagen zum Cholinstoffwechsel und seiner Metabolite getroffen werden.

1.1.1.Cholin

Cholin (Abb.1) hat als semi-essenzieller Nährstoff [7] viele physiologische Funktionen [8]. So kann Cholin zu Acetylcholin metabolisiert werden, welches einen wichtigen Neurotransmitter darstellt und somit auch als wichtiges Signalmolekül fungiert. Die Synthese des Acetylcholins ist abhängig von der Verfügbarkeit des Cholins, welche unter anderem durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst werden kann.

Zudem übernimmt es eine wichtige Funktion im Aufbau der Zellmembran, indem es als Vorläufermolekül für die Synthese der Membranphospholipide insbesondere des Phosphatidylcholins und Sphingomyelins im menschlichen Körper fungiert. Es trägt zur Stabilität und Fluidität der Zellmembran bei, was für den Transport von Molekülen und die Kommunikation zwischen Zellen entscheidend ist. Phosphatidylcholin ist ein wesentlicher Bestandteil von Lipoproteinen und wichtig für die Verpackung und den Transport von Triacylglyceride. Ohne Cholin kann somit Triacylglyceride nicht effizient transportiert werden und somit der Lipidstoffwechsel nicht adäquat im Körper stattfinden.

Die negative Auswirkung eines Cholinmangels auf die Leber kann durch verschiedene Symptome identifiziert werden. Klinisch imponieren Schmerzen im rechten Oberbauch, Müdigkeit und Leistungsschwäche. In schweren Fällen kann es sogar zu Aszites, Ikterus und Gerinnungsstörungen führen. Ein Mangel zeigt sich in einer Reihe von Leberfunktionsstörungen, Fettansammlung, Entzündung der Leber und das damit verbundene Krebsrisiko. Dabei kann die hepatische Steatose durch Bildgebung sichtbar gemacht werden oder durch laborchemische Untersuchungen belegt werden. Die Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat- Aminotransferase (AST), können oft zur Überprüfung auf einen Leberschaden laborchemisch herangezogen werden. Dies kann auf einen Mangel an Cholin hinweisen. Oxidativer Stress, Defekte der Lipoproteinsekretion und Dysfunktion des endoplasmatischen Retikulums können den Leberzelluntergang fördern [9].

Cholin kann durch die Umwandlung in Betain einen wichtigen Methylgruppendonator darstellen und somit auch die DNA des menschlichen Organismus beeinflussen. Eine Methylgruppenveränderung in der menschlichen DNA kann mit verschiedenen Karzinomen in Zusammenhang gebracht werden [7].

Einleitung

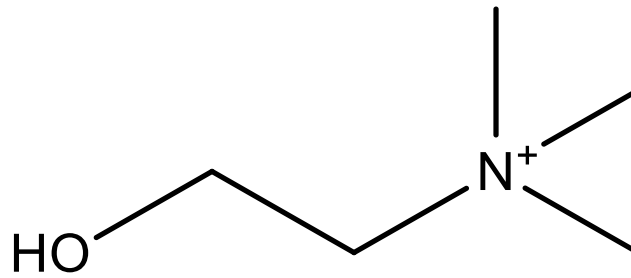


Abbildung 1 Struktur von Cholin

1.1.2. Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) entsteht durch die Veresterung von Acetat mit Cholin [10]. Acetylcholin spielt vor allem eine wichtige Rolle im Bereich der synaptischen Übertragung und Erregung einer Zelle. Acetylcholin kann externe und interne Reize induzieren und spielt eine wesentliche Rolle im peripheren Nervensystem. Im Bereich des somatischen Nervensystems dient es an der motorischen Endplatte der Signalübertragung [11, 12]. Es ist auch bei präganglionären parasympathischen, sowie einigen sympathischen postganglionären Nervenfasern des vegetativen Nervensystems beteiligt [13].

Acetylcholin wird mittels der Cholin- Acetyltransferase aus Acetyl Co-A und Cholin synthetisiert [14]. Das dazu benötigte Cholin lässt sich entweder aus dem Abbau cholinhaltiger Phospholipide oder aus extrazellulärer Zufuhr gewinnen. Acetylcholin wird zunächst in Vesikel gespeichert und bei Eintreffen eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt freigesetzt. Hier bindet es an nikotinische und/oder muskarinische Acetylcholinrezeptoren [15]. Nach erfolgreicher Bindung können zunächst Natriumionen in die Zelle einströmen und dort ein Aktionspotential auslösen [14]. Das Enzym Acetylcholin- Esterase baut das Acetylcholin schnell wieder ab. Cholin wird anschließend wieder in die präsynaptische Zelle aufgenommen [14].

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Acetylcholin nicht nur als Neurotransmitter dient, sondern auch ein Signalmolekül ist. Eine neuronal unabhängige cholinerge Kommunikation konnte zunächst in primitiven Organismen, anschließend auch in menschlichen Zellen (Urothel, Epithel der Atemwege, Endothelzellen des Ösophagus und der Harnblase etc.) nachgewiesen

Einleitung

werden [16-19]. Dieses System bezeichnet man auch als das non- neuronale cholinerge System [17].

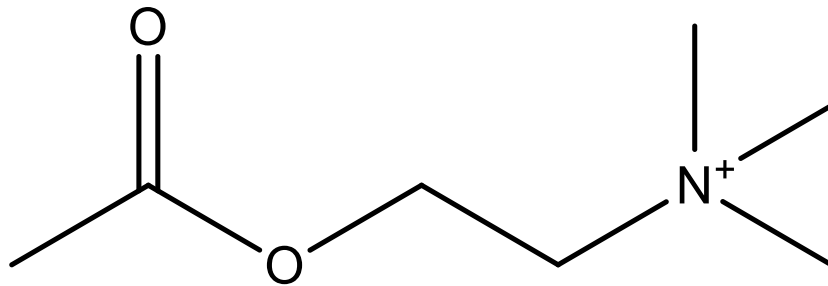


Abbildung 2 Struktur von Acetylcholin

1.1.3. Butyrylcholin

Butyrylcholin ist ebenfalls ein Ester des Cholins und eine organische Verbindung, welche jedoch nur in geringer Konzentration im Körper vorkommt. Es wird verwendet, um z.B. zwischen Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase zu unterscheiden [20]. Butyrylcholin kann ebenfalls einige der Rezeptoren aktivieren, welche Acetylcholin aktiviert. Somit hat es ebenso eine Funktion als Neurotransmitter. In der Medizin spielt die Butyrylcholinesterase eine wichtige Rolle bei der Muskelrelaxation. Hier kann durch Blockierung von Acetylcholinrezeptoren eine Signalkaskade und somit Erregung unterdrückt werden [21, 22].

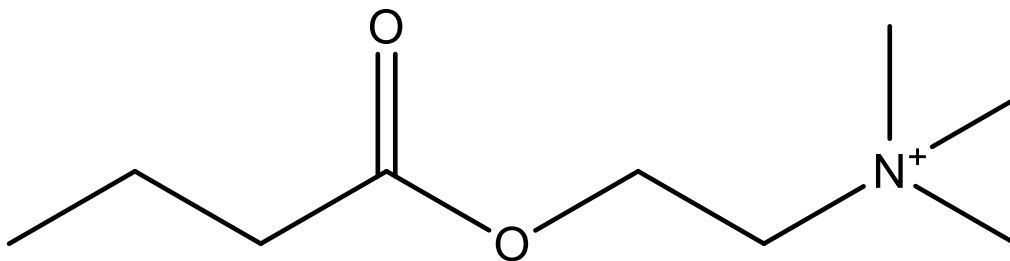


Abbildung 3 Struktur von Butyrylcholin

1.1.4 Glycerophosphocholin

Glycerophosphocholin kommt natürlich in sämtlichen Organismen vor und reichert sich vor allem in Gehirn und Niere an. Es kann die Blut Hirn Schranke passieren und dort als Vorstufe für Acetylcholin fungieren [23]. Im menschlichen Körper dient die Glycerophosphocholinphosphodiesterase als Schlüsselenzym bei der Umwandlung von Glycerophosphocholin in Cholin. Eine Umwandlung von Cholin in Acetylcholin wird durch die Cholinacetyltransferase katalysiert [23].

Im Alter sinkt der Spiegel des endogenen Glycerophosphatspiegels. Im Rahmen von präklinischen Studien konnte durch Gabe von Glycerophosphocholin die Gedächtnisleistung und kognitive Defizite verbessert werden [24]. Auch spielt Glycerophosphocholin eine wichtige Rolle im Bereich der Altersmedizin. So konnte bei Patienten mit einer Demenz eine Verbesserung der Sprache, Stimmung, Orientierung und Aufmerksamkeit nach Gabe von Glycerophosphocholin erzielt werden [25, 26].

In der Niere übernimmt Glycerophosphocholin eine wichtige osmotisch protektive Rolle, indem die Zellen des Nierenmarks vor zu hohen Konzentrationen von NaCl und Harnstoff geschützt wird [27].

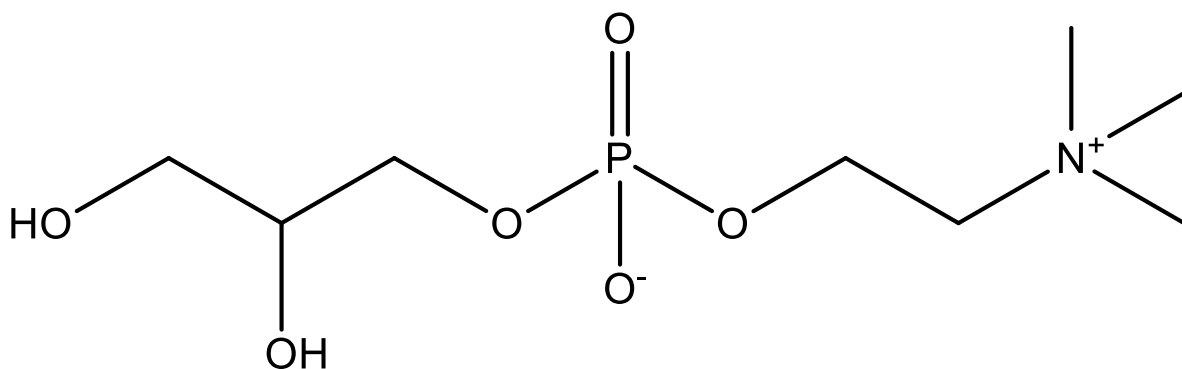


Abbildung 4 Struktur von Glycerophosphocholin

1.1.5. Phosphocholin

Phosphocholin nimmt eine wichtige Rolle bei immunmodulatorischen Funktionen ein. Als Pathogenitätsfaktor ist es sowohl bei Pro- als auch Eukaryoten weit verbreitet [1]. Durch die posttranslationale Modifikation kann es an Proteinen von Parasiten gebunden werden und die Immunabwehr des Wirts beeinflussen. Es wurde festgestellt, dass phosphocholinhaltige Antigene wichtige proliferative Signalwege in B- und T-Zellen, sowie in dendritischen Zellen und Mastzellen stören, wodurch das Überleben der Parasiten in ihren Wirten erleichtert wird [28, 29].

1967 wurde erstmals Phosphocholin an einer Polysaccharidkomponente der *Pneumokokken*-Zellwand gebunden lokalisiert [30]. Die posttranslationale Komponente konnte an Gram-negativen Bakterien, parasitären Nematoden, der menschlichen Plazenta und Protozoen gefunden werden [1, 31, 32]. Phosphocholin kann an Lipopolysachhariden, Lipoteichonsäuren, Teichonsäuren, Glykolipiden und Glykoproteinen gebunden vorliegen [1, 30, 33, 34]. Phosphocholin gebunden an Zuckern von Lipopolysacchariden ließen sich bei *Haemophilus influenza* aufweisen [35]. Über die Biosynthese der Phosphocholinmodifikation in multizellulären Pathogenen ist bisher wenig bekannt. Weder die Phosphocholin-Donor-Moleküle noch die entsprechenden Phosphocholin-Transferasen sind identifiziert worden. Um diese Fragen zu beantworten, werden empfindliche und zuverlässige Methoden für den Nachweis und die Quantifizierung von Cholin und Phosphocholin als wichtige Metaboliten des Cholinstoffwechsels benötigt [29].

Im Rahmen der evolutionären Entwicklung haben parasitäre Nematoden Abwehrmechanismen entwickelt, um eine Infektion im Wirt zu etablieren und dem Immunsystem zu entkommen. Hierbei spielt Phosphocholin eine wichtige Rolle als Immunmodulator. Phosphocholin zeigt sich in seiner Wirkung diametral. Zum einen dient Phosphocholin der wirtseigenen Infektabwehr, indem es das Komplementsystem aktiviert und die Phagozytose induziert. Zum anderen inhibiert es die Proliferation von B- und T- Lymphozyten und wirkt somit immunsuppressiv [1]. Somit ist es den Parasiten leichter möglich in den Wirt einzudringen und damit verschiedene Krankheiten und chronische Symptome wie Fatigue und ein geschwächtes Immunsystem zu begünstigen [36].

Einleitung

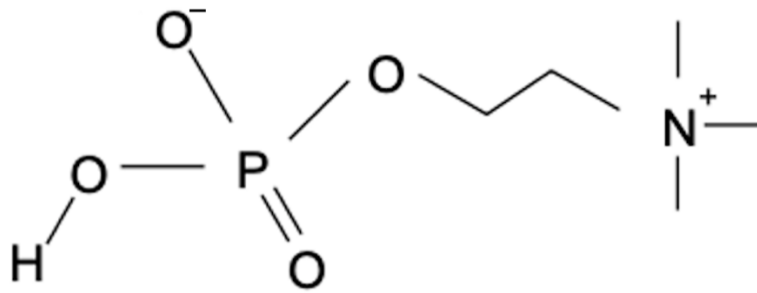


Abbildung 5 Struktur von Phosphocholin

1.1.6. Dimethylaminoethanol

Dimethylaminoethanol gilt als indirekter Vorläufer von Acetylcholin. Es kann in geringen Mengen im menschlichen Gehirn produziert werden. Reichlich liegt es in Fischen, vor wie zum Beispiel in Lachs und Sardinen [37].

In der Medizin wird es zur Gedächtnisleistungssteigerung und in der Dermatologie zur Reduktion von Falten angewendet [38].

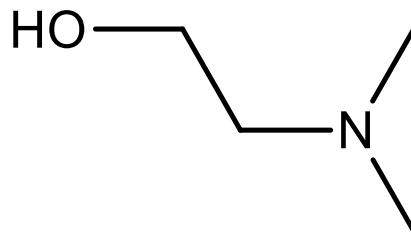


Abbildung 6 Struktur von Dimethylaminoethanol

1.1.7. D9 Cholin

D9 Cholin ist eine isotopenmarkierte Form des Cholins und wird chemisch hergestellt. Das Cholinmolekül enthält 9 Deuterium Isotope. Deuterium ist ein stabiles Isotop des Wasserstoffs, welches Verwendung in der Analytik von Stoffwechselmetaboliten des Cholins findet. Insbesondere spielt es eine wichtige Rolle zur Erforschung des Cholinmetabolismus oder der Verfolgung von Stoffwechselwegen im Körper [39]. Im Rahmen dessen können die Wege verfolgt werden, die Cholin im Körper nimmt. Auch die Cholinaufnahme und Cholinverwertung in verschiedenen Geweben kann dadurch untersucht werden. Man kann die Rate messen, mit der Cholin in die Zelle aufgenommen und in andere Moleküle umgewandelt wird [39, 40].

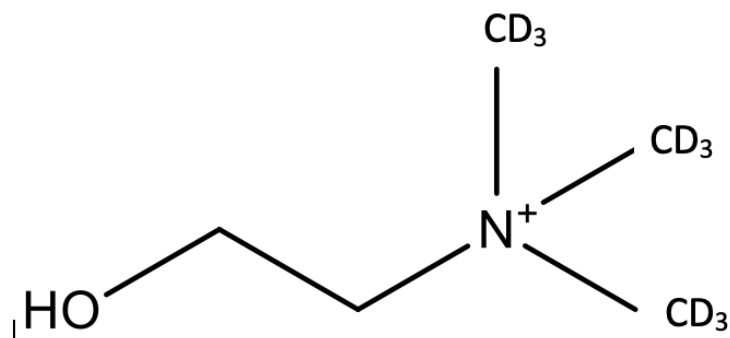


Abbildung 7 Schematische Zeichnung D9- Cholin

1.1.8. CDP – Cholin

Über einen Phosphorsäureester ist das Nucleosiddiphosphat der Base Cytosin mit Cholin verknüpft und ein essentieller Baustein für die Biosynthese von Phospholipiden.

CDP- Cholin ist eine natürlich vorkommende Verbindung und Zwischenprodukt des Zellmembranstoffwechsels [41]. Es gibt einige wissenschaftliche Studien, die sich mit den potentiellen Wirkungen von CDP- Cholin beschäftigen. Zum einen wird die kognitive Funktion verbessert, zum anderen konnten auch neuroprotektive Eigenschaften aufgezeigt werden, indem unter anderem das Fortschreiten der ischämischen Zellschädigung durch Unterdrückung der Freisetzung freier Fettsäuren beeinflusst wird [25, 42, 43]. Die Ausscheidung erfolgt renal oder nach dem Abbau als Kohlenstoffdioxid über die Lunge [44].

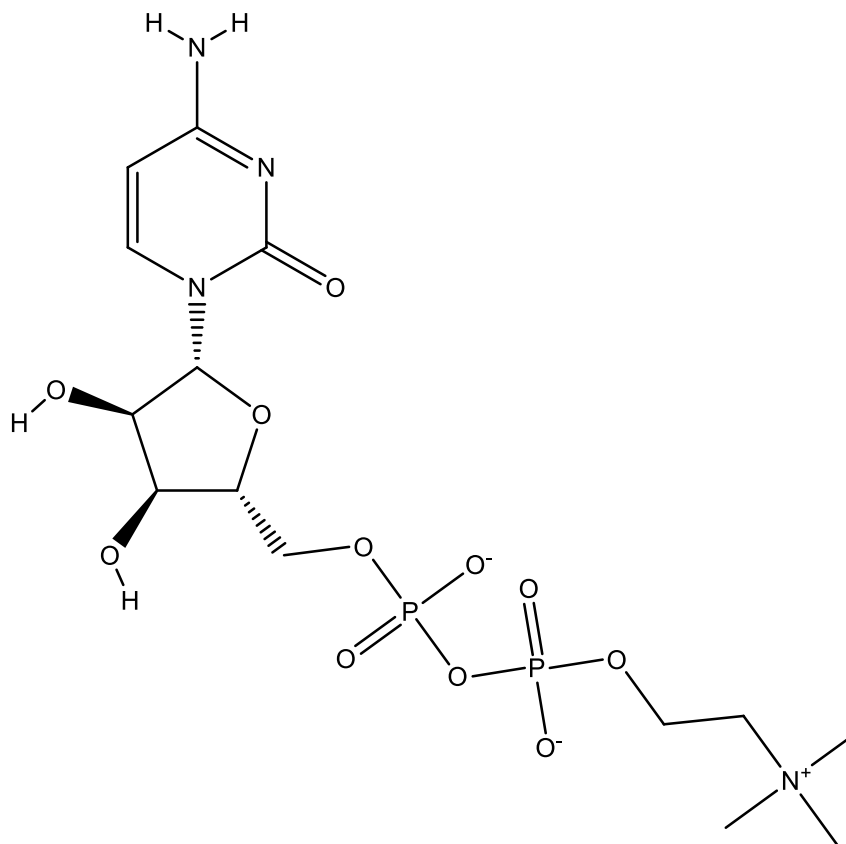


Abbildung 8 Strukturformel CDP- Cholin

1.2. Probleme bei der massenspektrometrischen Analytik von Biomolekülen substituiert mit Cholin oder Cholinmetaboliten

Die massenspektrometrische Analytik von Biomolekülen von Cholin oder Cholinmetaboliten ist aufgrund einiger Eigenschaften erschwert.

Ionisierungseffizienz:

Die Ionisierungseffizienz beschreibt die Effizienz, mit der Moleküle bei der Massenspektrometrie ionisiert werden können, bevor sie der Detektion zugeführt werden. Dies beeinflusst die Nachweisgrenze des Analyten und zum Teil auch die Fragmentierung des Moleküls und ist abhängig von der Art der Ionisierung und des verwendeten Massenspektrometers. Der z.T. zwitterionische Charakter und die hohe Polarität von Cholin und seiner Metabolite ist daher eine Herausforderung für die Ionisation. Dies kann zu einer geringen Nachweisempfindlichkeit führen.

Fragmentierungsmuster:

Die Fragmentierungsmuster von cholinhaltigen Verbindungen können komplex und daher oftmals schwer zu interpretieren sein. Dies kann die Identifizierung und Quantifizierung deutlich negativ beeinflussen. Insbesondere bei phosphocholinmodifizierten Proteinen sind Strukturdaten rar, da PC eine zwitterionische Eigenschaft aufweist. Dies führt zu charakteristischen, aber ungewöhnlichen Fragmentierungsmustern. Zur Analytik der Phosphocholinmodifikation bedarf es genauer Kenntnisse über die Phosphocholinepitopstruktur. Die massenspektrometrischen Analysen konzentrierten sich hauptsächlich auf phosphocholinsubstituierte Glykosphingolipide oder Glykane. Diese zeigen charakteristische Fragmentierungsmuster auf. Basierend auf den Verlust einer Trimethylaminiengruppe durch Hoffmanns Eliminierung und Bildung eines zyklischen Phosphodiesters [1, 45, 46].

Einleitung

Tabelle 1 Sphingolipid basierte PC - Epitopstrukturen aus den Nematoden *A.suum* (a) *O. volvulus* (b) *L. sigmodontis* (c) *A. vitae* (d) *S. digitata* (e) und *C. elegans* (f)

Structure	Organism
$\begin{matrix} \text{PC6}\gamma & \pm\text{PE6}\gamma \\ \text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer} \end{matrix}$	a, b, d
$\begin{matrix} \text{PC6}\gamma & \pm\text{PE6}\gamma \\ \text{GalNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer} \end{matrix}$	a, b, f
$\begin{matrix} \text{PC6}\gamma & \pm\text{PE6}\gamma \\ \text{Gal}(\alpha 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer} \end{matrix}$	a-f
$\begin{matrix} \text{PC6}\gamma \\ \text{Gal}(\alpha 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer} \\ \pm\text{Gal}(\alpha 1-2)\text{Fuc}(\alpha 1-3)^{\downarrow} \end{matrix}$	a
$\begin{matrix} \pm\text{Gal}(\beta 1-6)\gamma & \text{PC6}\gamma \\ \pm\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\alpha 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer} \end{matrix}$	a, f
$\begin{matrix} \pm\text{GlcNAc}(\beta 1-6)\text{Gal}(\beta 1-6)\gamma & \text{PC6}\gamma \\ \text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\alpha 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer} \end{matrix}$	a
$\begin{matrix} \text{Gal}(\beta 1-6)\gamma & \text{PC6}\gamma \\ \pm\text{GalNAc}(\beta 1-3)/\pm\text{Gal}(\alpha 1-3)[\text{Gal}(\beta 1-3)\text{Gal}(\alpha 1-3)\text{GalNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{Glc}(\beta 1-1)\text{Cer} \\ \text{Fuc}(\alpha 1-2)^{\downarrow} \end{matrix}$	a

Matrixeffekte:

Durch Matrixeffekte in der Probe kann es zu Signalunterdrückung und starkem Hintergrundrauschen kommen. In einer biologischen Probe kann durch das Vorhandensein unterschiedlicher Stoffe die Analyse erschwert sein. Durch das Vorhandensein von Matrixkomponenten kann die Ionisation der Analyte negativ beeinflusst werden. Bei der Untersuchung von menschlichem Plasma kann z.B. die Anwesenheit von Phospholipiden eine Ionisationssuppression und somit eine geringere Sensitivität herbeiführen.

Um diese Probleme zu minimieren sollten zum einen die Probenvorbereitungen und die internen Standards optimiert werden. Des Weiteren kann der Einsatz von Flüssigchromatographie (LC) oder Gaschromatographie (GC) vor der Massenspektrometrie und die Verwendung von hochauflösenden Massenspektrometern eine verbesserte Trennung und Detektion der Analyten ermöglichen.

1.3. Eine Übersicht publizierter Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cholin und Cholinmetaboliten

Bereits in mehreren Veröffentlichungen/Arbeiten gelang es durch Verwendung verschiedener Säulen und Lösungsmittel Cholin und seine Metabolite zu trennen [47-53].

Tabelle 2 Übersicht Material und Methode [47]

Analyte	Säule	Lösungsmittel	Gradient, Fluss
Cholin Betain Dimethylglycerin	5µm Hypersil Silica (Agilent) 2,1x100mm	A: 15mM Ammoniumformiat pH 3.5 B: Acetonitril	0.-0.1min: 25%A 3.5min: 80%A 3.6min: 25% A 5.6min:25%A 600µl/min

In dieser Studie entwickelten die Autoren eine effiziente Methode zur gleichzeitigen Bestimmung der oben genannten Analyte im menschlichen Plasma. Hintergrund dieser Untersuchung war, dass diese Analyte an vielen Funktionen im Körper beteiligt sind und ein Zusammenhang zwischen Lebensstil, Ernährung und chronischen Erkrankungen besteht [54]. Die Trennung der Analyte erfolgte mittels Normalphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf einer Silica Säule. Die detektierten Verbindungen wurden nach Elektrospray- Ionisation massenspektrometrisch identifiziert. Bei der Analyse von insgesamt 60 gesunden Blutspendern konnten die drei Analyte effizient und parallel nachgewiesen werden [47].

Tabelle 3 Übersicht Material und Methode [48]

Analyte	Säule	Lösungsmittel	Gradient, Fluss
Cholin Fluormethylcholin	50 µm SCX IC-PAK 3,9x150mm (Waters)	5mM HCl	konstant 1-1.25ml/min

Diese Methode beschäftigt sich mit der Detektion von Cholin und Fluormethylcholin. Die Synthese von Cholin und Fluormethylcholin spielt eine große Rolle bei der Tumordiagnostik. Die Radiotracer werden in der Positionen-Emissions- Tomographie (PET) eingesetzt, um Tumorzellen im Körper sichtbar machen zu können. Die hier untersuchten Cholinmetabolite wurden radioaktiv markiert. Die Substanzen werden vermehrt von Tumorzellen aufgenommen. Dies ermöglicht eine bessere Darstellung von Tumoren und Metastasen bei der PET. Zur Qualitätskontrolle entwickelten die Autoren eine Ionenaustausch- HPLC Methode, die es

Einleitung

ermöglicht, sowohl die radiochemische Reinheit des Endprodukts als auch die Restmenge des Vorläufermoleküls gleichzeitig zu überwachen. Im Rahmen der Untersuchung wurde zur Identifikation die Retentionszeit bestimmt und Referenzstandards zum Vergleich herangezogen [48].

Tabelle 4 Übersicht Material und Methode [49]

Analyte	Säule	Lösungsmittel	Gradient, Fluss
Cholin Acetylcholin	5µm Nucleosil 5SA 15x0,4cm	100mMNaPhosphat pH 6.7 7mM Tetramethylammonium- Perchlorat	Isokratisch 700µl/min

In dieser Studie präsentieren die Autoren eine effiziente Methode zum Nachweis von Acetylcholin (ACh) und Cholin (Ch) im neuronalen Gewebe. Die bisher bekannten Methoden zum Nachweis des Neurotransmitters bedurften einer zweiten Pumpe (eine Pumpe für die mobile Phase und eine Pumpe für die Zuführung der Enzymlösung) um Acetylcholin und Cholin nach Trennung mit der stationären Phase zu mischen [55]. Die Autoren nutzten jedoch die isokratische Elution und eine modifizierte mobile Phase, die sowohl die chromatographische Trennung als auch die enzymatische Reaktion unterstützt. Durch das vereinfachte System und Reduzierung potentieller Fehlerquellen ist der Nachweis von Acetylcholin und Cholin vereinfacht und auch die Empfindlichkeit erhöht [49].

Tabelle 5 Übersicht Material und Methode [50]

Analyte	Säule	Lösungsmittel	Gradient, Fluss
Betain Acetylcholin Cholin GP Cholin DDP Cholin P Cholin	Pecosphere-3CSi 5µm 4.6x83mm (Perkin- Elmer)	A: Acetonitril/EtOH/HOAc/1M Ammoniumacetat, H2O/ 0.1M NaPhosphat 800/68/2/3/127/10 B: A aber 400/68/44/88/400/10	0min: 100% A 6min: 100% A 12min: 100% B 22min: 100% B 23min: 100% A 29min: 100% A 1.5ml / min

In der Studie entwickelten die Autoren eine reproduzierbare Methode zur Bestimmung der oben genannten Cholinmetabolite. Im Rahmen der Analyse wurde eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) kombiniert. Die Trennung erfolgte zunächst durch die HPLC auf einer Silica Säule mit einem nichtlinearen Gradienten. Daraufhin wurde freies Cholin durch Hydrolyse gewonnen. Nach Isolierung durch Gaschromatographie konnte die Analyse im

Einleitung

Massenspektrometer erfolgen. Die Identifikation erfolgte durch den Vergleich der Rotationszeiten. Auch hier konnten die oben genannten Analyte detektiert und somit eine Technik entwickelt werden, welche es erleichtert, die Rolle des Cholins und seiner Metabolite in verschiedenen biologischen Prozessen aufzuklären [50, 54].

Tabelle 6 Übersicht Material und Methode [51]

Analyte	Säule	Lösungsmittel	Gradient, Fluss
Acetylcholin Cholin	Bakerbond Sufopropyl 5µm 60x4.6mm	0.1M NaP pH 7.5 5mM Tetraethylammonium- Chlorid	Isokratisch 1,2ml /min

Diese Studie von 1993 beschreibt eine Methode, welche Cholin und Acetylcholin im Gehirn und im Plasma von Ratten misst. Um eine genauere Konzentration zu messen, wurde eine HPLC-Methode beschrieben, bei der die Proben durch die Säule geführt werden und durch unterschiedliche Retentionszeiten identifiziert werden können. Die Ergebnisse zeigten, dass die Cholinkonzentration im Gehirn der Ratten höher als im Blutplasma war. Dies deutete darauf hin, dass das Gehirn einen Mechanismus besitzen könnte um Cholin aktiv aufzunehmen und zu speichern. Dies kann unter anderen eine wichtige Rolle bei der Acetylcholinsynthese spielen und somit zur Bereitstellung des Neurotransmitters [51].

Tabelle 7 Übersicht Material und Methode [53]

Analyte	Säule	Lösungsmittel	Gradient, Fluss
Phosphocholin Betain Dimethylglycin	AX10 Thermo Fisher Scientific 10µm 250x4.6mm	A: H ₂ O B: Ammoniumformiat 200mM pH 7.0	1ml/min 0: A 100% 50 A 0% 51 A 100% 75 A 100%

In dieser Studie wurden zunächst Hühnermuskelzellen mit Phospholipase C behandelt. Es kam zu einer Steigerung des Cholineinbaus in Lipide, zeitgleich wurde auch die Bildung von Phosphatidylcholin gesteigert.

Einleitung

Um den genauen Mechanismus nachzuvollziehen, wurde die Aktivität der am CDP-Cholin Weg beteiligten Enzyme gemessen. Um eine bessere Detektion zu gewährleisten, wurde ein radioaktives Molekül (Cholin mit radioaktiven Wasserstoff- Isotop) verwendet. Das angewandte Cholin wurde in die einzelnen Stoffwechselprodukte eingebaut. Die Trennung der verschiedenen Moleküle konnte durch Anionenaustauschchromatographie erreicht werden. Dabei wurde eine AX10 Säule verwendet. Durch die Trennung gelang es, verschiedene Fraktionen und deren Radioaktivität zu messen. Durch Vergleich mit Standards wurde festgelegt welches Molekül in welcher Fraktion war. Diese Methode ermöglichte somit die Analyse der Enzymaktivität. Es konnte aufgezeigt werden, dass durch die Behandlung mittels Phospholipase C die Aktivität verschiedener Moleküle signifikant erhöht ist [53].

Tabelle 8 Übersicht Material und Methode [52]

Analyte	Säule	Lösungsmittel	Gradient, Fluss
PC- Lipide	5µm Silikasäule 250x4.6mm 50°C Rainin- Varian	A: Chloroform- Methanol-30% Ammoniumhydroxid 80:19:1 B: Chloroform – Methanol- 30%- Ammoniumhydroxid 60:39:1 C: Chloroform – Methanol- 30%- Ammoniumhydroxid 60:34:1	1ml/min 0-5 A100% 2-15 B100% 20 B100% 30 C100% 45 C100% 50 A100% 60 A100%

In dieser Methode wurde die Trennung und Quantifizierung von über zehn Lipidklassen in einer chromatographischen Analyse vorgestellt. Insbesondere wurde hier die Phospholipidzusammensetzung in *Xenopus laevis* Zellen untersucht. Es wurde eine HPLC mit einem Lichtstredetektor kombiniert. Das Verfahren wurde für eine zwei Pumpen HPLC optimiert unter Verwendung einer Silikasäule. Die Ergebnisse zeigten, dass diese HPLC-ELSD-Methode eine präzise und reproduzierbare Quantifizierung der Lipide ermöglicht. Somit kann ein Einblick in die Zusammensetzung einzelner Lipide und der damit verbundenen Signalwege optimiert werden [52].

1.4. Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie

1.4.1 Massenspektrometrie

1.4.1.1 Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie gehört zu einer der wichtigsten analytischen Techniken zur Untersuchung von Biomolekülen. Das Grundprinzip liegt darin, Ionen zu erzeugen, diese in die Gasphase zu überführen und deren Masse zu Ladungsverhältnis qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Bereits 1990 stellte die Massenspektrometrie eine der wichtigsten analytischen Techniken für die Analyse von Proteinen und Peptiden dar [56]. Die Vorteile bestehen in Empfindlichkeit, Genauigkeit und der Möglichkeit, auch komplexe Gemische zu analysieren. Nicht nur die Untersuchung einzelner Proteine, Biomoleküle und Metabolite kann dadurch ermöglicht werden, sondern auch posttranslationale Modifikationen von Proteinen können genauer detektiert und untersucht werden [57, 58].

Das erste Massenspektrometer wurde im 20. Jahrhundert von Sir J.J. Thomson erbaut und Parabolspetrograph genannt. Ionen wurden in Entladungsröhren erzeugt und durch elektrische oder magnetische Felder geleitet. Daraufhin wurden die geladenen Teilchen in eine Flugbahn gelenkt und mittels Photoplatten oder Fluoreszenzschirme detektiert [59].

Die Anwendung zeigt sich in den Bereichen der Proteomik, Archäologie, Medizin und Chemie [57]. Trotz Verbrauch sehr geringer Substanzmengen (Subnanogrammbereich) spricht man von einer destruktiven Technik.

1.4.1.2 Aufbau und Funktion eines Massenspektrometers

Ein Massenspektrometer hat einen grundlegend dreigeteilten Aufbau

- Ionenquelle
- Massenanalysator
- Detektor

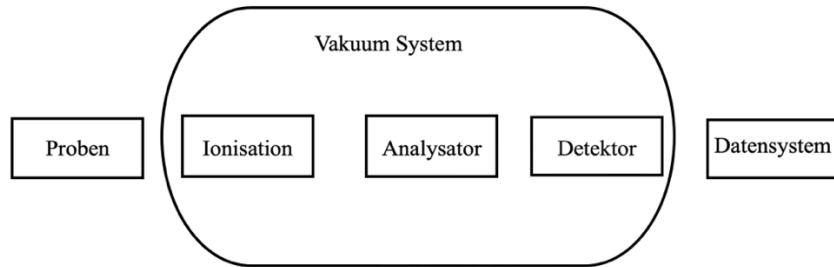


Abbildung 9 Schematische Darstellung eines Massenspektrometers

Zunächst erfolgt in der Ionenquelle die Ionisation der Analyten. Es gibt unterschiedlichste Verfahren, welche der Ionisation dienen.

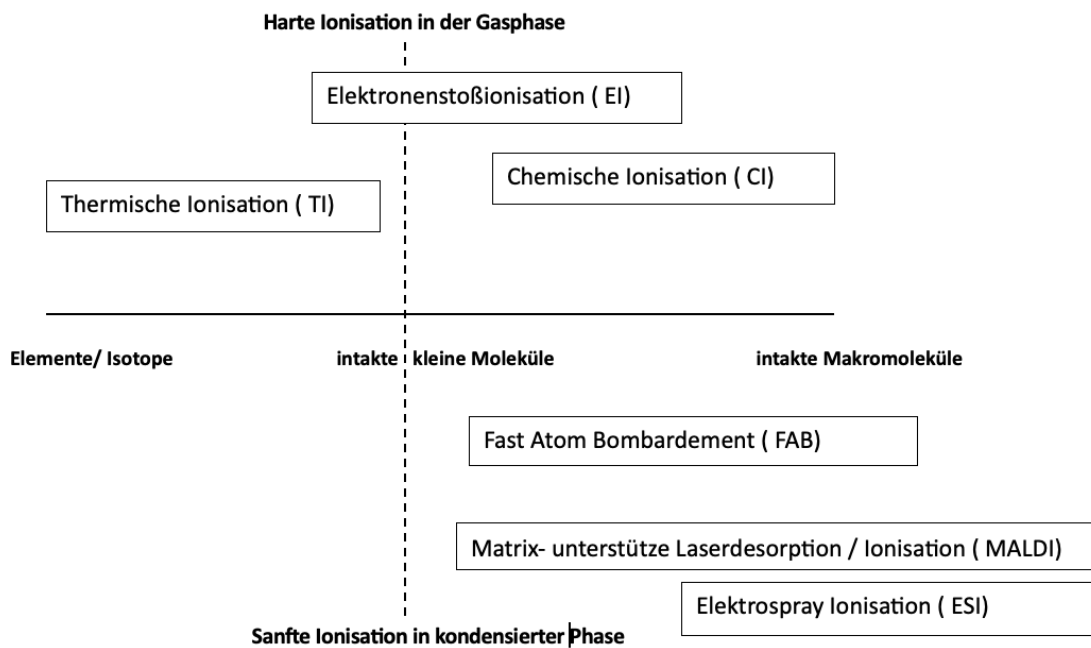


Abbildung 10 Massenspektrometrische Ionisationsverfahren modifiziert nach Gross JH

Einleitung

Die Ionisation ist die Grundvoraussetzung zur Durchführung einer Analyse. Die Analytik stieß zu Beginn schnell an ihre Grenzen, da durch angewandte Verfahren wie der Elektronenstoßionisation und Thermischen Ionisation eine starke Fragmentierung zu beobachten war und somit die Analyten zerstört wurden. In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgte die Entwicklung „sanfter“ Ionisationsmethoden, welche nun die Detektion intakter Moleküle ermöglichte. Zu diesen Verfahren zählen zum einen die Matrix-unterstützte Laserdesorption / Ionisation (MALDI) sowie die Elektrospray- Ionisation (ESI).

Elektrospray- Ionisations- Massenspektrometrie (ESI- MS)

Die Ionisation beruht auf der Dispersion der Probenflüssigkeit in sehr viele kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes. Zur Probenvorbereitung müssen die zu analysierenden Moleküle in gelöster Form vorliegen. Hierzu eignen sich als Lösungsmittel wässrige Gemische mit Zusatz von Methanol, Ethanol, Acetonitril usw..

Die Proben sollten frei von Puffersalzen und Detergenzien sein, um der Gefahr von ungewollten Ionensignalen durch Bildung von Clustern oder Aggregaten zu entgehen.

In der Elektrospray-Ionisation werden Ionen durch die Bildung von geladenen Tröpfchen erzeugt, die durch Verdampfung des Lösungsmittels und Coulomb- Explosionen zerfallen. Dieser Prozess erfordert eine Menge an Energie. Insbesondere die Desolvatisierung der Ionen. Das Lösungsmittel muss vollständig entfernt werden, um die Ionen in die Gasphase zu überführen [60]. Die Ionisation, also die Übertragung von Ladungsträgern wie zum Beispiel Protonen nimmt weniger Energie in Anspruch.

Der Transfer in die Gasphase erfolgt in einem elektrischen Feld [61]. Das stark elektrische Feld wird zwischen der Kapillarspitze (Anode) und der Gegenelektrode (Kathode) angelegt. Das elektrische Feld führt teilweise zu einer Trennung von negativen und positiven Ionen. Durch Abstoßungsreaktionen innerhalb der positiven Ionen und Anziehungskräfte des elektrischen Feldes bildet sich ein Kegel (Taylor- Kegel [62]).

Einleitung

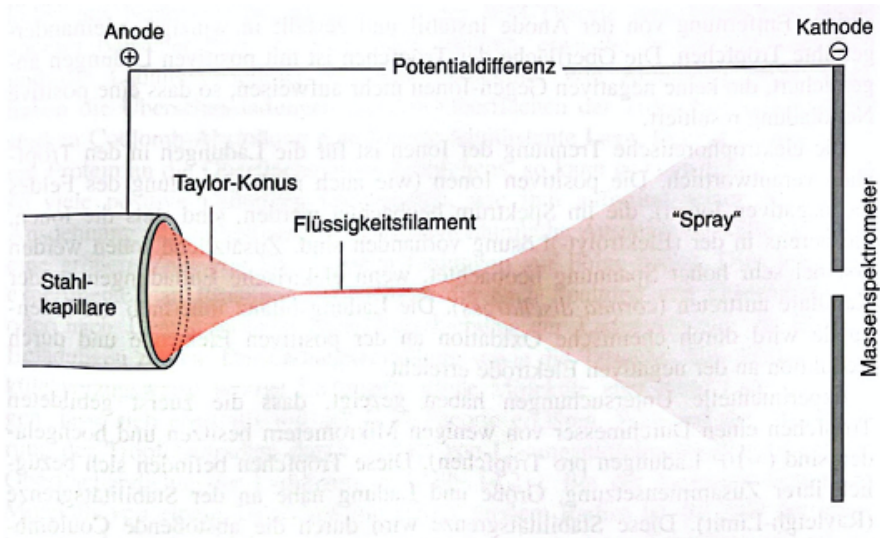


Abbildung 11 Schematische Darstellung des makroskopischen ESI-Prozesses [62]

Es bilden sich geladene Tropfen, welche durch Verdampfen weiterhin schrumpfen.

Der Prozess der Gasphasenionenbildung beruht auf verschiedenen Modellen. Zum einen das CRM *charge-residue model* [60], bei dem mehrfach geladene Moleküle entstehen. Zum anderen dem IEM *Ion-Evaporation model*. Hierbei werden die Ionen direkt herausgelöst.

Zum Transport der gebildeten Ionen zum Analysator wird mit einem Quadrupol gearbeitet. Das Quadrupol besteht aus zwei Paaren von gegenüberliegenden Stäben, die jeweils mit Wechselspannung und Gleichspannung betrieben werden. Durch die Wechselspannung wird ein elektrisches Feld erzeugt. Die Gleichspannung erzeugt ein statisches elektrisches Feld. Die Ionen gelangen in den Quadrupol und werden durch das elektrische Feld abgelenkt. Dabei können nur bestimmte Ionen mit bestimmten Massen-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z) den Detektor erreichen.

Eine selektive Trennung wird durch Spannungsvariationen ermöglicht. Hierbei wird die Durchlässigkeit für verschiedene m/z -Werte eingestellt [63]. Im Detektor bewirkt nun das auftreffende Ion eine Elektronkaskade und es entsteht ein Signal, welches durch einen Computer registriert wird.

Das Spektrum zeigt die charakteristischen Eigenschaften der Ionenbildung. Im Massenspektrum lassen sich z.B. die Molekulargewichte bestimmen. Die Bildung von mehrfach geladenen Ionen ist charakteristisch für den ESI-Prozess, somit kann es zu multiplen Signalen (häufig mit einer Gauß-Verteilung der Signale) im Spektrum kommen. Das Spektrum zeigt auf der y-Achse die Intensität und auf der x-Achse das Masse zu Ladungsverhältnis.

MALDI – TOF Massenspektrometer (matrix- assisted laser- desorption ionization time- of-flight Mass Spectrometry)

Die Matrix- unterstützte Laser Desorption/ Ionisation Massenspektrometrie wurde in den 80er Jahren u.a von Franz Hillenkamp und Michael Karas am Max- Planck- Institut für medizinische Forschung in Münster entwickelt. Hierbei wird die Matrixverbindung mit einer Probe vermischt und nach Trocknung und Kristallisation dann mit einem gepulsten Laser bestrahlt. Dadurch wurden Ionen erzeugt und in die Gasphase überführt, die dann analysiert werden können [64]. K. Tanka demonstrierte die Anwendung von MALDI-MS zur Analyse von großen Proteinen und erhielt 2002 den Nobelpreis für Chemie. Ein gepulster Laser wird auf das Target fokussiert und erzeugt einen Laserstrahl, welcher auf die Matrixmischung trifft und seine Energie überträgt. Durch Matrixmoleküle kann eine sanfte Überführung des zu analysierenden Ions erreicht werden und es findet weniger Fragmentierung statt. Die ionisierten Moleküle werden von einem elektrischen Feld in Richtung des Flugrohrs beschleunigt. Am Ende des Flugrohrs befindet sich ein Detektor, der die ankommenden Ionen erfasst[65].

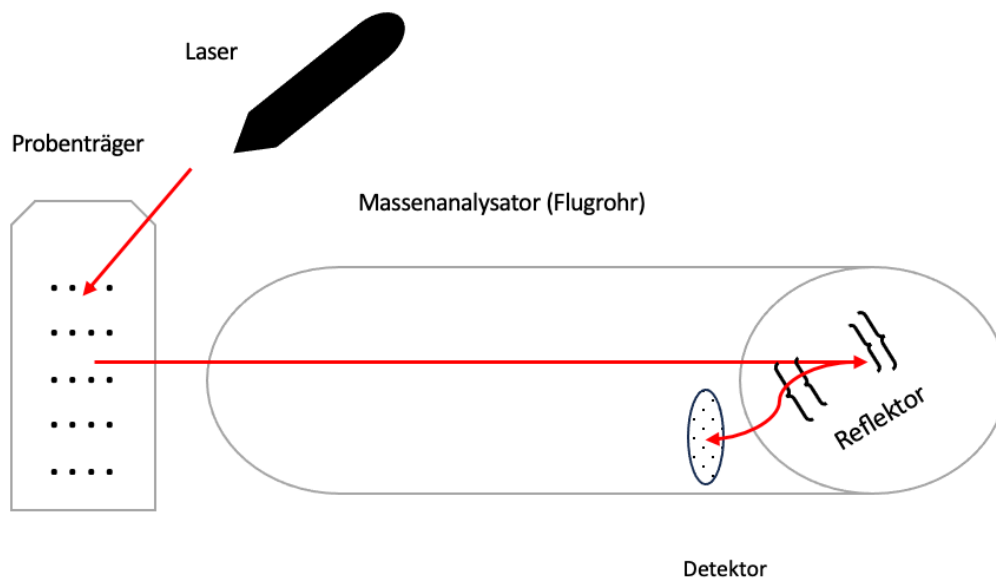


Abbildung 12 Schematischer Aufbau eines MALDI TOF Massenspektrometers (verändert nach Mann, M., Hedrickson, R.C. and Pandey, A. (2001))

Entscheidend für die Fragmentierung und Signalintensität ist die verwendete Matrixsubstanz. Es gibt verschiedene Matrixsubstanzen, die spezifische Eigenschaften aufweisen müssen, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Dazu gehören eine hohe Absorptionskapazität und eine gute Löslichkeit. Diese sind entscheidend, um eine effiziente Ionisation zu ermöglichen und die

Einleitung

Qualität der erfassten Massenspektren zu maximieren. Typische Matrizes sind zum Beispiel Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA). Nach Mischen der Probe und Matrix kommt es zur Kristallbildung und Verteilung des Analysats in dem Gitter der Kristalle. Diese dienen als Zielpunkt für den Laserstrahl. Die Moleküle können nun durch Desorption und Protonentransfer ionisiert werden.

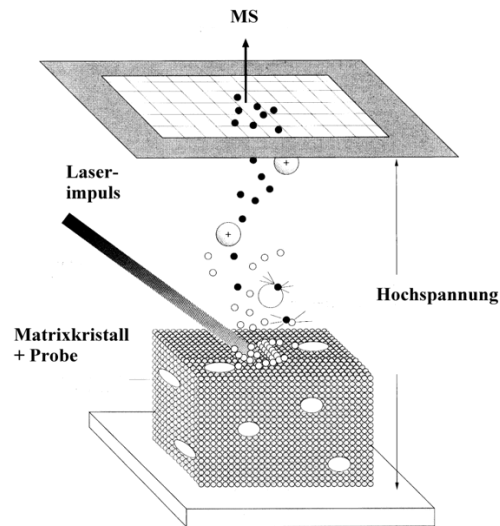


Abbildung 13 Prinzip des MALDI Prozesses [62]

Die ionisierten Moleküle besitzen zunächst geringe kinetische Energie. Durch die Erzeugung einer Spannung wird elektrostatisches Feld gewonnen, welches die Ionen beschleunigt und trennt. Die Ionen erhalten durch die Beschleunigung kinetische Energie.

Die Geschwindigkeit hängt von der Masse ab. Die Flugzeit kann daraufhin gemessen werden und zur Bestimmung des Masse-zu Ladungsverhältnis genutzt werden. Am Detektor wird dann das Signal zur Analyse verwendet, um ein Spektrum zu digitalisieren. Das resultierende Spektrum zeigt Signalpeaks auf, welche den auftreffenden Ionen entsprechen.

1.4.2. Flüssigkeitschromatographie

1.4.2.1. Prinzip

Die Flüssigkeitschromatographie ist eine Trennmethode, die zur Analyse und Trennung chemischer Verbindungen verwendet wird. Das Prinzip beruht auf einer Verteilung der zu trennenden Substanzen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase.

Somit soll eine Trennung und anschließende Quantifizierung ermöglicht werden. Die flüssigkeitsschromatographischen Trennverfahren können nach verschiedenen Wechselwirkungen eingeteilt werden [66].

Bei der *Ionenaustauschchromatographie* werden die zu trennenden Ionen durch ein ionenaustauschendes Material getrennt. Das ionenaustauschende Material besteht aus einer stationären Phase, die geladene Gruppen enthält, die entweder positiv (kationenaustauschend) oder negativ (anionenaustauschend) geladen sind. Die Ionen, welche eine entgegengesetzte Ladung zur festen Phase enthalten, werden stärker zurückgehalten, während die Ionen mit gleicher Ladung leichter die Säule verlassen [67]. Die Elution der gebundenen Ionen erfolgt in der Regel durch einen Salzgradienten.

Das zweite Trennverfahren ist die *Größenausschlusschromatographie*. Hier erfolgt die Trennung aufgrund der Größe. Das Prinzip liegt darin, dass die zu analysierenden Moleküle durch ein poröses Material geleitet werden. Große Moleküle können nicht in die Poren gelangen und werden somit schneller eluiert als kleinere Moleküle. In der Regel werden Gelsäulen verwendet, die aus einem porösen Material bestehen. Diese sind in der Regel vernetzte Polymere oder Gels, die als Molekularsieb fungieren (z.B. Dextran, Kieselgel) [68].

In dieser Arbeit findet die *Normalphasenchromatographie* Anwendung. Hier erfolgt die Trennung der Analyte aufgrund ihrer Polarität. In der Regel ist die stationäre Phase polar und die mobile unpolar oder weniger polar. Stoffe, welche getrennt werden zeigen unterschiedliche Affinität zu den beiden Phasen.

Silicagel oder Aluminiumoxid werden ebenfalls oft als stationäre Phase verwendet. Sie sind hochpolar und sie besitzen Hydroxylgruppen (-OH), welche in unterschiedliche Wechselwirkungen mit den Analyten treten können.

Einleitung

1. Wasserstoffbrückenbindungen

Die Hydroxylgruppe der stationären Phase kann mit funktionellen Gruppen (-OH, -COOH, =O) Wasserstoffbrückenbindungen bilden.

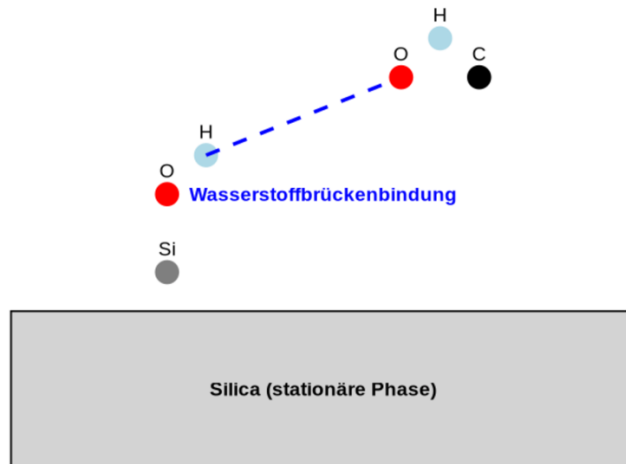


Abbildung 14 Wasserstoffbrückenbindung

2. Ionische Wechselwirkung

Unter sauren oder basischen Bedingungen können Analyte oder die stationäre Phase ionisiert vorliegen. Somit kann es zu einer ionischen Bindung kommen:

Einer elektrostatischen Anziehung

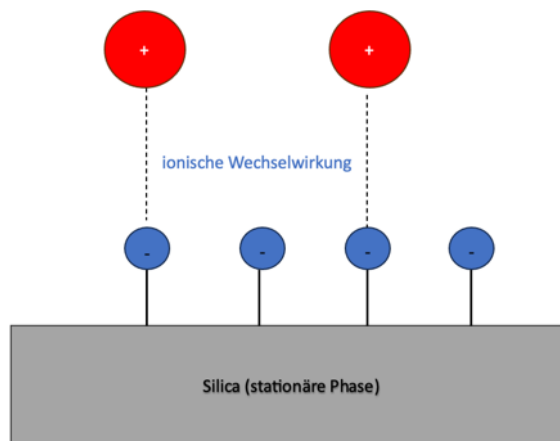


Abbildung 15 Ionische Wechselwirkung

Einleitung

Besonders stark polare Analyte haben somit auch eine stärkere Wechselwirkung mit der stationären Phase, während weniger polare eher in der mobilen Phase verbleiben und dadurch schneller durch die stationäre Phase transportiert werden. Die Retentionszeit ist somit geringer. Die Normalphasenchromatographie wird insbesondere in der chemischen Analytik angewendet. Insbesondere auch komplexe Stoffgemische können effektiv aufgetrennt und analysiert werden. Allerdings zeigen sich auch in diesem Verfahren Nachteile und somit Einschränkungen. Bei sehr stark polaren Stoffen kommt es zu sehr starken Wechselwirkungen führt oder gar einer irreversiblen Bindung zwischen zu analysierenden Stoffen und der stationären Phase.

1.4.2.2. Mobile und stationäre Phasen

Man unterscheidet zwischen einer festen Phase (stationären Phase) und mobilen Phase, in der sich das zu trennende Gemisch befindet. Die Trennung basiert auf unterschiedlichen Affinitäten zur stationären Phase.

Die mobile Phase ist das Lösungsmittel, in dem die Analyte gelöst sind und welches diese durch die Säule transportiert. Die Auswahl des Lösungsmittels ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel der Polarität des Analyts. Die oft verwendeten Lösungsmittel sind Wasser, Acetonitril, Tetrahydrofuran oder Methanol [47]. Die Wahl der mobilen Phase beeinflusst die Retentionszeit und Trennung. Die Pumpsysteme ermöglichen einen konstanten Fluss der mobilen Phase.

Die stationäre Phase befindet sich in einem Stahl-, oder Glasrohr, welches mit Trennmaterial gepackt ist. Das Eluat ist die Flüssigkeit, die aus der chromatographischen Säule oder dem Trennsystem austritt. Die grafische Darstellung der chromatographischen Trennung wird als Chromatogramm bezeichnet. Es zeigt die Verteilung der Analyten entlang der Zeitachse oder des Volumens. Bestehend aus x-Achse, welche die Zeit oder Volumen darstellt und y-Achse welche die Detektionsintensität oder Konzentration der Analyten angibt. Die entstandenen Peaks repräsentieren die einzelnen Analyte. Die Höhe des Peaks gibt an, wie viel von einem Analyten vorhanden ist, während die Breite des Peaks Informationen über die Effizienz der Trennung liefert.

1.5. Ziel der Arbeit

Die Untersuchungen der Weltgesundheitsorganisation ergaben, dass eine Infektion mit parasitären Nematoden bei 25% der Weltbevölkerung liegt. Damit zeigt sich eine erhebliche Belastung der Gesundheit weltweit. Die Mortalität in Zusammenhang mit den Infektionen ist nicht sehr hoch, jedoch verursachen Nematodeninfektionen chronische Beschwerden und beeinträchtigen die geistige und körperliche Entwicklung. Die Lebensqualität sinkt und es zeigt sich somit eine erhöhte Krankheitslast.

Durch eine Anpassung der Parasiten an das menschliche Immunsystem können diese länger überleben und den Wirt negativ beeinträchtigen.

Eine wichtige Rolle spielt bei dieser Immunmodulation das Phosphocholin. Durch die Immunmodulation ist es dem Parasiten möglich, Abwehrmechanismen des Immunsystems zu umgehen.

Um eine Strategie zur Bekämpfung und zur Erkennung genau dieser Immunmodulation zu ermöglichen ist das genaue Verständnis der Struktur und der Funktionsweise dieser Parasiten zu kennen. Hierbei spielt die Analyse der einzelnen Cholinmetabolite eine entscheidende Rolle. Es braucht daher eine gute Methode diese quantitativ zu bestimmen.

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht darin, eine Methode zu entwickeln. Die Cholin, Acetylcholin, Butyrylcholin, Glycerophosphocholin, Phosphocholin, Dimethylaminoethanolamin, D9- Cholin und CDP- Cholin mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit mit Hilfe einer HPLC-ESI-MS Methode quantitativ zu erfassen.

Es soll eine möglichst präzise Trennung und Identifizierung der Analyte ermöglicht werden, um diese später in komplexen biologischen Proben identifizieren zu können.

Die Entwicklung und Validierung der Methoden stellen den Kern der Arbeit dar. Die gewonnen Erkenntnisse bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Rolle in der Immunantwort und der Cholin-basierten Signalübertragung.

Letztendlich wäre es wünschenswert, wenn die Arbeit dazu beiträgt, neue Ansätze für die therapeutische Entwicklung und zur Bekämpfung von Nematodeninfektionen zu liefern. Durch ein besseres Verständnis sollte es möglich sein, neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln, die gezielt auf die Immunantwort des Wirts abzielen. Somit könnte eine verbesserte Lebensqualität der betroffenen Bevölkerung ermöglicht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material, Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt in p.a. Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen. Cholin, Acetylcholin, Butyrylcholin, Dimethylaminoethanol, CDP- Cholin, Glycerophosphocholin, Phosphocholin, Aminosäure und Ammoniumformiat wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Acetonitril wurde von Th. Greyer (Höxter-Stahle) gekauft. Das Wasser wurde mittels des „Milli-Q Ultra pure water system“ (Millipore, Eschborn) gereinigt und entsalzt.

GERÄTE

Massenspektrometer

HERSTELLER

Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer mit
Lifteinheit, Bruker Daltonik (Bremen)

Vortexer

Eppendorf (Hamburg)

Digitalwaage

Mettler- Toledo AJ150-PB30000 (Gießen)

LC/MS

Alliance HT Waters 2790 with Waters
micromass ZQ 4000 (Eschborn)

Diverse Materialien

HERSTELLER

Chromatographiesäule

ThermoFisher Acclaim 300. C-18, 3µm,
300A, 2,1*150mm (Dreieich)

Chromatographiesäule

Dr Maisch GmbH, Reprosil Pur ; C18- AQ-
5µm (Ammerbruch-Entringen)

Chromatographiesäule

VDSpher Pur 100 SIL

VDS optilab

4µm, 150x2.0 mm

VDSpher PUR SIL 4µm, 10 x 2,0 mm, P/K

Material und Methoden

(Berlin)

Pipetten

Eppendorf (Hamburg)

Edelstahl- MALDI-Targets

Bruker Daltonik (Bremen)

Software

Mass Lynx NT software Windows NT PC Waters (Eschborn)

Flex Analysis Bruker Daltonik (Bremen)

2.2. Methoden

Die Entwicklung einer LC-MS Methode umfasst mehrere Schritte, um eine selektive, empfindliche und reproduzierbare Bestimmung der Analyten zu ermöglichen. Für die zu analysierenden Analyten wurde zunächst die exakte Masse berechnet, um das Analyten selektiv detektieren zu können. Hierzu wurde die monoisotopische Masse berechnet. Diese berücksichtigt die am häufigsten vorkommenden Isotope, sodass eine Referenzmasse errechnet werden kann [69].

Zur Berechnung der monoisotopischen Masse von Cholin und dessen Metabolite werden hier die Atommassen der verwendeten Elemente, deren natürliche Isotope mit natürlicher Häufigkeit und exakter Masse aufgelistet [70, 71].

Tabelle 9 Atommassen, Isotope, rel. Häufigkeit, exakte isitopische Masse

Element	Atommasse	Isotopen	rel. Häufigkeit (%)	Isotopische Masse
C	12.011	¹² C	98.90	12.000000
		¹³ C	1.10	13.003355
H	1.00794	¹ H	99.985	1.007825
		² H = D	0.015	2.0141102
N	14.00674	¹⁴ N	99.634	14.003074
		¹⁵ N	0.366	15.000109
O	15.9994	¹⁶ O	99.762	15.994915
		¹⁷ O	0.038	16.999131
		¹⁸ O	0.200	17.999159
P	30.973762	³¹ P	100	30.973763
Na	22.989768	²³ Na	100	22.989770

Cholin hat die chemische Formel $C_5H_{14}N_1O_1$

Tabelle 10 Monoisotopische Masse von Cholin

Molekül	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>N</i>	<i>O</i>	<i>P</i>	<i>Na</i>
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	5	14	1	1	0	0
Produkt	60.000000	14.10955	14.003074	15.994915	0	0
Monoisotopische Masse	104,107539					

Acetylcholin hat eine chemische Formel von $C_7H_{16}N_1O_2$

Tabelle 11 Monoisotopische Masse von Acetylcholin

Molekül	<i>C</i>	<i>H</i>	<i>N</i>	<i>O</i>	<i>P</i>	<i>Na</i>
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	7	16	1	2	0	0
Produkt	84.000000	16.1252	14.003074	31.98983	0	0
Monoisotopische Masse	146.118104					

Butyrylcholin hat die chemische Formel $C_9H_{20}N_1O_2$

Tabelle 12 Monoisotopische Masse von Butyrylcholin

Molekül	C	H	N	O	P	Na
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	9	20	1	2	0	0
Produkt	108.000000	20.1565	14.003074	31.98983	0	0
Monoisotopische Masse	174.149404					

Glycerophosphocholin hat die chemische Formel $C_8H_{20}N_1O_6P_1$

Tabelle 13 Monoisotopische Masse von Glycerophosphocholin

Molekül	C	H	N	O	P	Na
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	8	20	1	6	1	0
Produkt	96.000000	20.1565	14.003074	95.96949	30.073763	0
Monoisotopische Masse	256.202827					

Glycerophosphocholin kann in verschiedenen Adduktformen detektiert werden:

- a) $[M + H]^+ m/z = 258,111$
- b) $[M + Na]^+ m/z = 280,093$

Phosphocholin hat die chemische Formel $C_5H_{13}N_1O_4P_1$

Tabelle 14 Monoisotopische Masse von Phosphocholin

Molekül	C	H	N	O	P	Na
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	5	13	1	4	1	0
Produkt	60.000000	13.101725	14.003074	63.97966	30.973763	0
Monoisotopische Masse	182.058222					

$$[M + H]^+ \text{ m/z} = 184,074$$

Dimethylaminoethanol hat die chemische Formel $C_4H_{11}N_1O_1$

Tabelle 15 Monoisotopische Masse von Dimethylenolamin (DMAE)

Molekül	C	H	N	O	P	Na
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	4	11	1	1	0	0
Produkt	48.000000	11.086075	14.003074	15.994915	0	0
Monoisotopische Masse	89.084064					

$$[M + H]^+ \text{ m/z} = 90.091$$

D9-Cholin hat die chemische Formel $C_5H_{23}N_1O_1$

Tabelle 16 Monoisotopische Masse von D9-Cholin

Molekül	C	H	N	O	P	Na
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	5	23	1	1	0	0
Produkt	60.000000	23.179975	14.003074	15.994915	0	0
Monoisotopische Masse	113.177964					

CDP-Cholin hat die chemische Formel $C_{14}H_{26}N_4O_{11}P_2$

Tabelle 17 Monoisotopische Masse von CDP-Cholin

Molekül	C	H	N	O	P	Na
Isotopische Masse	12.000000	1.007825	14.003074	15.994915	30.973763	22.989770
Formel	14	26	4	11	2	0
Produkt	168.000000	26.20345	56.012296	175.944065	61.947526	0
Monoisotopische Masse	488.107337					

$$[M + H]^+ \quad m/z = 489.115$$

$$[M + 2H]^+ \quad m/z = 490.115$$

$$[M + Na]^+ \quad m/z = 511$$

Beschreibung des Trennmodus

Cholin und Cholinderivate sind in der Regel polar oder sogar geladen. Somit bietet sich die Normalphasenchromatographie für die Trennung an. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären und mobilen Phase, was zu unterschiedlichen Retentionszeiten führt.

Säulen

Tabelle 18 Säulen

Säule	VDSpher Pur 100 SIL
Partikelgröße, Länge x Innendurchmesser Bestellnummer	4µm, 150x2.0 mm N1520E000VPI VDSpher PUR SIL 4µm, 10 x 2,0 mm, P/K
HPLC-Vorsäulenkartuschen	VDSpher PUR SIL
Partikelgröße, Länge x Innendurchmesser Bestellnummer	4µm, 10 x 2,0 mm V1020E000VPI
Vorsäulenkartuschenkopf Bestellnummer	15020508

Mobile Phase

Als Elutionsmittel wurden Ammoniumformiat 15mM in Wasser, pH 3,5 (Lösung A) sowie Acetonitril (Lösung B) genutzt. Ammoniumformiat ist ein polarer Puffer, der sich gut für die Trennung von Cholin und seinen Derivaten, welche polare Eigenschaften haben eignet, Der pH von 3,5 unterstützt die Ionisation, was die Trennung und Detektion erleichtert. Acetonitril ist ein Lösungsmittel, das für alle betrachteten Analyten gut geeignet ist und zudem leicht und rückstandsfrei beim ESI-Prozess verdampft. Des Weiteren kann die Effizienz der Trennung gesteigert werden.

Herstellung des Ammoniumformiatpuffers:

1. Berechnung der benötigten Menge Ammoniumformiat

Das Molekulargewicht von Ammoniumformiat beträgt 63,06 g/mol

2. Konzentration in mg/L

$$15\text{mM} = 15\text{mmol/L}$$

$$15\text{mmol/L} \times 63,06 \text{ mg/mmol} = 946 \text{ mg/L} = 473\text{mg}/500\text{ml}$$

3. 473 mg Ammoniumformiat werden gewogen und Wasser hinzugefügt.
4. pH Einstellung mittels Ameisensäure, hier bis auf 3,5 titrieren und restliches Wasser hinzufügen

Material und Methoden

Gradient/ Fuß

0 min 10% Lösung A

1 min 10% Lösung A

10 min 80% Lösung A

12 min 80% Lösung A

14 min 10% Lösung A

25 min 10% Lösung A

Zu Beginn der Analyse sorgt die hohe Konzentration von Acetonitril dafür, dass zunächst die Analyte an der Säule binden.

Ab der 10. Minute wird der Anteil von Wasser erhöht. Dies führt zu Elution der Analyte. Nach der Elution der polaren Analyten wird der Anteil von A wieder gesenkt. Diese Rückkehr zu den ursprünglichen Bedingungen dient dazu, unpolare Analyte, welche möglicherweise noch in der Säule zurückgehalten werden, zu eluieren. Die mobile Phase bleibt konstant bis zur 25. Minute um sicherzustellen, dass alle Analyte vollständig von der Säule eluiert werden und die Säule gereinigt wird, bevor die nächste Analyse beginnt.

Flussrate

Die Auswahl der Flussrate liegt bei 300 µl/min.

Injektion

Es wird ein Injektionsvolumen von 20 µl gewählt.

Säulentemperatur

Die Säulentemperatur bezieht sich auf die Temperatur, bei der die HPLC- Säule während der Analyse betrieben wird. Es wurden 30 °C gewählt.

Druck

Der Druck bezieht sich auf den Druck, unter dem die mobile Phase durch die Säule gepumpt wird. Der Druckbereich während der Trennung liegt bei 70 – 160 bar.

Die einzelnen Proben wurden in 10%Wasser und 90%Acetonitril gelöst

Material und Methoden

Herstellung der Verdünnungsreihe:

für 500µl Ansatz:								
			2	3	4	5	6	7
			*	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
in 20 µl	in 500 µl		2: 200 pmol/µl	3: 20 pmol/µl	4: 2 pmol/µl	5: 200 fmol/µl	6: 20 fmol/µl	6: 2 fmol/µl
100 pmol	2500 pmol		12.5 + 487.5					
50 pmol	1250 pmol			62.5 + 437.5				
20 pmol	500 pmol			25 + 475				
10 pmol	250 pmol			12.5 + 487.5				
5 pmol	125 pmol				62.5 + 437.5			
1 pmol	25 pmol				12.5 + 487.5			
500 fmol	12500 fmol					62.5 + 437.5		
250 fmol	6250 fmol					31.25 + 468.75		
100 fmol	2500 fmol					12.5 + 487.5		
50 fmol	1250 fmol						62.5 + 437.5	
20 fmol	500 fmol						25 + 475	
10 fmol	250 fmol						12.5 + 487.5	
5 fmol	125 fmol							62.5 + 437.5
2.5 fmol	62.5 fmol							31.25 + 468.75
1.25 fmol	31.25 fmol							15.6 + 484.4

*Stammlösung wurden wie folgt angesetzt:

1. Cholin : 27.8 µl/ml für 200 pmol/µl Stammlösung in H_2O
2. Acetylcholin: 36 µl/ml für 200 pmol/µl Stammlösung in H_2O
3. Butyrylcholin: 41 µl/ml für 200 pmol/ µl Stammlösung in H_2O
4. Glycerophosphocholin: 88.1 µl/ml für 200 pmol/µl Stammlösung in H_2O
5. Phosphocholin: 66.7 µl/ml für 200 pmol/ µl Stammlösung in H_2O
6. Dimethylaminoethanol: 2 µl/ml für 200 pmol/µl Stammlösung in H_2O
7. D9- Cholin: 29.9 µl/ml für 200 pmol/µl Stammlösung in H_2O
8. CDP – Cholin: 97.6 µl/ml für 200 pmol/µl Stammlösung in H_2O

**MALDI- TOF- MS – Matrix- assisted laser- desorption ionization time- of- flight
Massenspektrometer**

Die MALDI TOF MS Analysen wurde unter Verwendung des Ultraflex TOF/ TOF Massenspektrometers (Bruker Daltoniks, Bremen) durchgeführt. Dieses arbeitet mit einen Stickstofflaser und einer Lift MS/MS Einheit. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Sigma) in einer Lösung von Acetonitril und Phosphosäure eingesetzt. Zur Kalibrierung kamen Peptidstandarts von Bruker Daltoniks zum Einsatz. Diese wiesen eine Masse von 1000-4000 Da auf. Die Auswertung der Daten wurde mittels der Compass 1.1. Software durchgeführt, welche sich aus Flex Control 2,4, Flex Analysis und BioTools 3.0. zusammensetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Analyten mit MALDI -TOF Massenspektrometrie

Durch die Untersuchung der einzelnen verwendeten Analyten mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie konnten diese zunächst massenspektrometrisch charakterisiert werden. Es wurden verschiedene Methoden zur Probenvorbereitung angewendet. Hierbei werden zwei gängige Methoden angewendet. Zum einen die *dry droplet Technik*. Dabei wird zunächst die zu analysierende Substanz in einem Lösungsmittel gelöst. Ein Tropfen wird mit der Matrixlösung auf einer Targetplatte gemischt. Dabei wurde hier eine Edelstahl- MALDI-Targetplatte verwendet. Anschließend wurde diese mit einem Föhn getrocknet [72].

Bei der Thin Layer Methode wird eine sehr dünne Schicht Matrix auf die Trägerplatte aufgetragen. Mit Hilfe einer Pipette wird dann eine kleine Menge der Analytlösung gleichmäßig aufgetragen und anschließend luftgetrocknet [73]. Die Tabelle fasst die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden zusammen. Ein Nachweis der unterschiedlichen Cholinderivaten kann am besten durch die Dry Droplet Methode mittels HCCA Matrix erreicht werden. In den folgenden Abbildungen 16 und 17 werden nur ausgewählte Spektren gezeigt.

Tabelle 19 Charakterisierung der Analyten mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Analyt	Dry droplet HCCA Matrix 10mg/ml Lsg. In 0,1%TFA und 50%ACN+ Peptidstandart	Thin layer 10mg HCCA +90µl THF +5µl TFA +5µl 1M Citronensäure	Dry droplet ATT 5mg/ml AmCarb. 25mM	Dry Droplet DHB-Matrix
Acetylcholin	++	++	++	+
Butyrylcholin	++	-	++	-
Glycero-PC	++	++	++	+
DMAE	+	++	++	+
Phosphocholin	++	-	++	++
CDP-Cholin	++	-	++	+
Propargylcholin	+	++	++	+
D9-Cholin	++	++	++	-
Cholin	++	-	++	++

Legende:

++ = sehr gutes Signal + = gutes Signal - = kein Signal

Ergebnisse

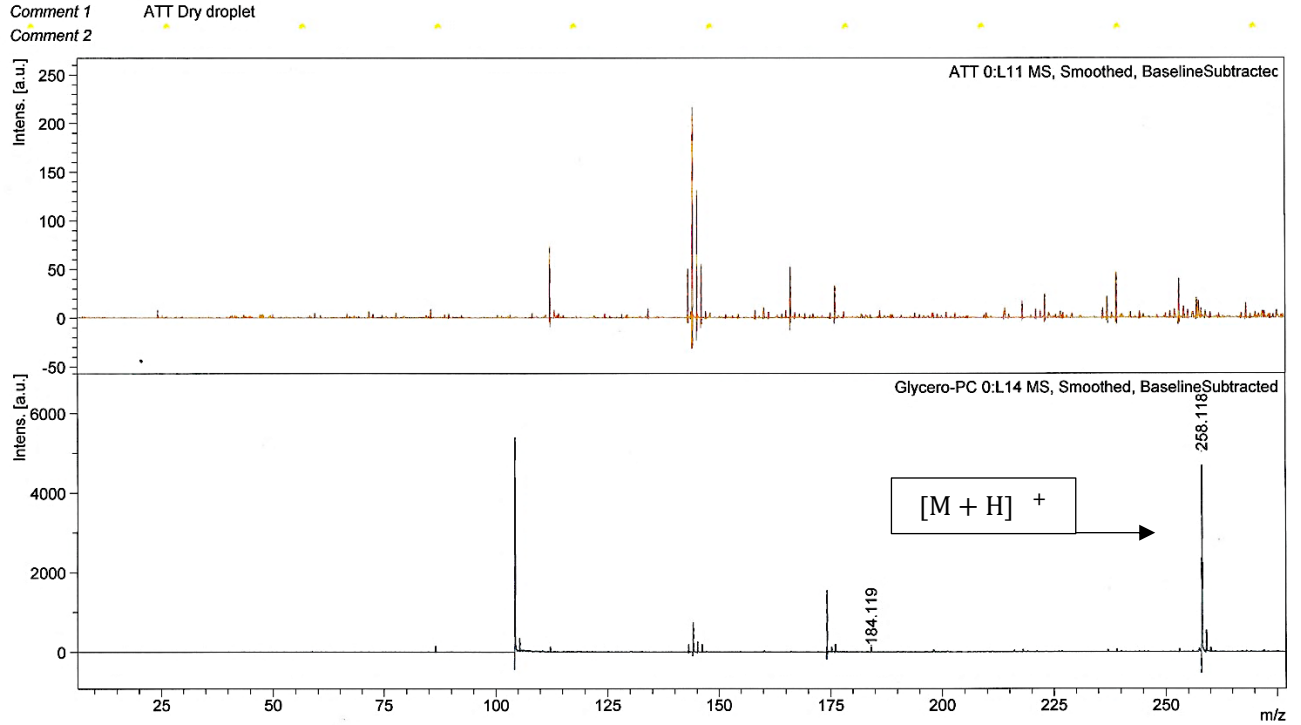


Abbildung 16 MALDI-TOF Spektrum von: Glycerophosphocholin (ATT-Präparation)

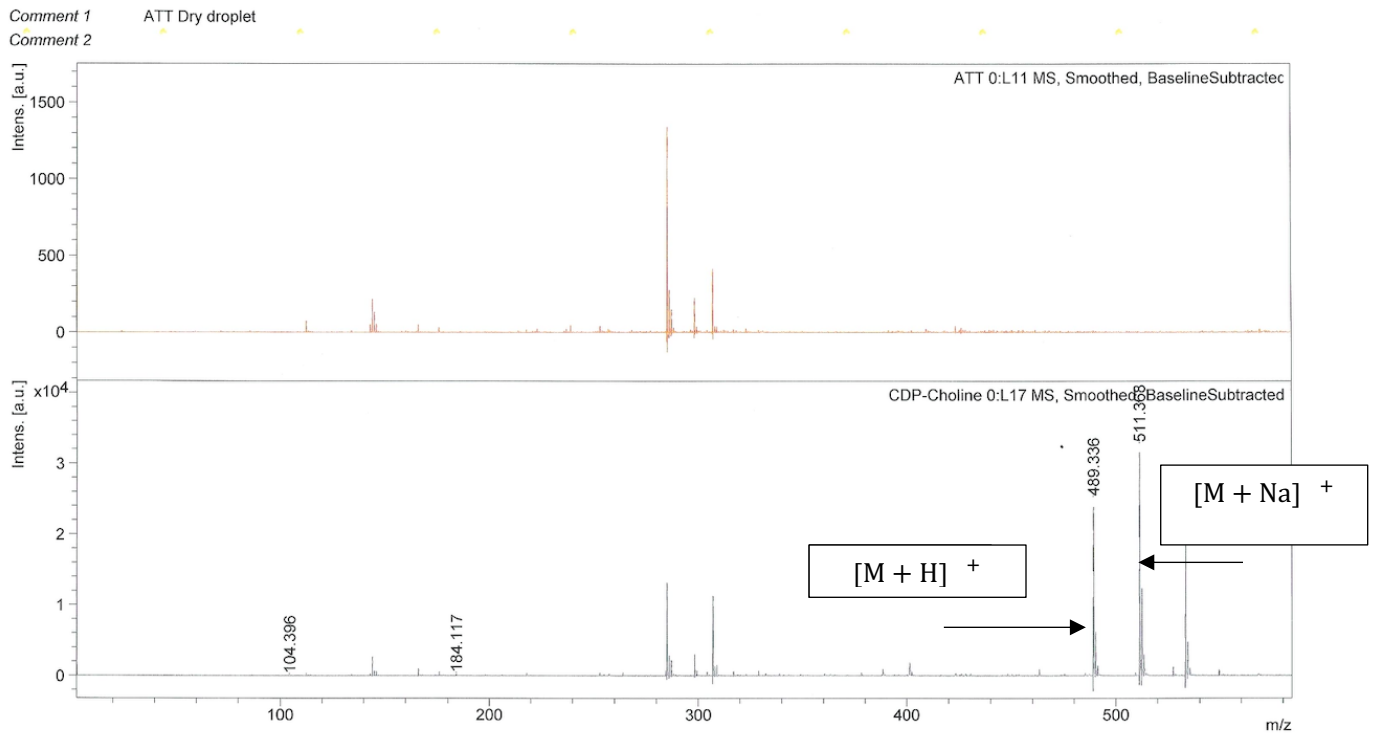


Abbildung 17 MALDI-TOF Spektrum von: CDP Cholin (ATT-Präparation)

3.2. Auswahl der stationären Phase und Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Die Auswahl der Säule basiert auf den physikalischen Eigenschaften der Analyte. Die Auswahl einer VDSpher Pur 100 SII- Säule war ein wichtiger Schritt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Diese Säule ist eine Silica- basierte HPLC- Säule, die speziell für die Trennung von unpolaren und polaren Verbindungen entwickelt wurde. Sie hat eine Partikelgröße von 14µm, was eine gute Trennleistung bei der Analyse von Cholinverbindungen ermöglicht[74]. Die Auswahl dieser Säule wurde getroffen, da es bei allen Analyten zu einer Trennung kam und somit eine Detektion und Quantifizierung aller Stoffe möglich ist.

Je nach ausgewählter Säule kommt es zur Wechselwirkung zwischen der mobilen Phase und den Analyten. Im Rahmen unserer Untersuchung wurde die Silikat und Diolsäule angewendet.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden verschiedene Methoden angewendet, um die optimale Säule und die optimale Flussrate zu finden.

Die vorliegende Tabelle 20 präsentiert das Ergebnis der Untersuchung einer Silica und einer Diolsäule. Dabei wurde die Retentionszeiten der Analyten bestimmt und versucht die Trennung der einzelnen Analyte zu optimieren. Es wurden verschiedene Flussraten (300 µl/min; 100 µl/min und 160 µl/min) verwendet, um die Sensitivität der Detektion und die Retentionszeit der analysierenden Substanzen zu optimieren. Die Flussrate hat dabei einen Einfluss auf die Interaktion zwischen mobiler und stationärer Phase. Die Retentionszeit ist wie bereits in der Einleitung erwähnt die Zeit, die das Analyt benötigt um die chromatographische Säule zu durchlaufen und den Detektor zu erreichen. Die Retentionszeit bietet somit einen wichtigen Parameter, um die Trennleistung und die Effizienz verschiedener Säulen für die Methodenoptimierung zu bewerten.

Ergebnisse

Tabelle 20 Säulenvergleich unter Anwendung verschiedener Flussraten und Temperaturen

	Silica Säule		Silica Säule		Silica Säule		Diol Säule	
	300µl/min		100µl/min		160µl/min		160µl/min	
	Temp.	30°C	Temp.	30°C		30°C	Temp.	30°C
		in pH3.5/ACN						
	Sens.	RT	Sens.	RT	Sens.	RT	Sens.	RT
Acetylcholin	+++	7.8	+++	8.9	+++	5.6	+++	3.5
Butyrylcholin	+++	7.1	+++	5.5	+++	3.4	+++	4.0
CDP-Cho	+++	9.9	+++	17.5	+++	12.6	+++	3.5
Cho	+++	8.2	+	9.2	+	5.7	+	3.4
D9-Cho	+++	8.2	+	5.2?	+	3.3	+	3.4
DMAE	+++	7.9	+++	8.4	+++	5.0	+++	3.4
Glycero-PC	+++	9.4	+++	15	+++	9.9	+++	3.3
PC	+++	11.0	+++	19	+++	14	+++	3.5

Legende:

RT= Retentionszeit im min. Sens. = Sensitivität

+++ = Signal sehr gut ; ++ = Signal gut ; + = Signal schwach ; - = Signal nicht vorhanden

1. Sensitivität

Die Silicatsäule zeigt bei den unterschiedlichen Flussraten insbesondere 300µl/min 100µl/min eine hohe Sensitivität zu beobachten. Dies zeigt auf, dass die Anwendung dieser Säule effektiver als die Diolsäule ist.

2. Retentionszeit

Bei einer Flussrate von 300µl/min zeigt sich eine effektive Retention und Trennung von polaren Verbindungen. Die Trennungseffizienz führt zu einer guten Peakform.

Bei einer Flussrate von 160 µl/min liegt zwar eine verkürzte Retentionszeit vor, jedoch sind die Peaks sehr breit.

Ergebnisse

Bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ sind die Retentionszeiten sehr hoch.

Die Diol Säule zeigt durchweg niedrige Retentionszeiten, die zwischen 3,3 und 4,0min liegen. Dies zeigt, dass die Diol Säule weniger geeignet ist, um die Verbindungen effizient zu trennen.

Insgesamt zeigt der Vergleich der Säulen, dass die Silicat-Säule besser geeignet ist und leistungsfähiger als die Diolsäule erscheint. Die Wahl der Flussrate hat einen signifikanten Einfluss auf die Retentionszeit und die Peakform. Im Rahmen der Untersuchungen wurde die Säulen mehrfach getestet. Die beste Reproduzierbarkeit zeigte sich bei einer Flussrate von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Auch die Retentionszeiten, Peakformen und die Sensitivitäten zeigen das gewünscht bessere Ergebnis. Es zeigt sich sowohl eine gute Trennungseffizienz, als auch eine angemessene Analysezeit.

3.3. Auswahl der mobilen Phase

Im Rahmen der Untersuchung wurden verschiedene Laufmittel angewandt um eine optimale Analyse zu gewährleisten.

- Wasser
- TFA 0,1%
- Ameisensäure 0,1%
- Ammoniumformiat mit Wasser pH= 3.5
- Ammoniumformiat mit ACN 20:80 pH= 3.5

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Trennung und Identifizierung der einzelnen Cholinmetabolite unter Verwendung der oben genannten Laufmittel. Durch die gezielten Variationen der mobilen Phase ließ sich eine präzise Bestimmung und Bedingung für die Detektion, Trennung und Quantifizierung optimieren. Die Wahl des Laufmittels spielt eine entscheidende Rolle, da sie nicht nur die Trennleistung in der Flüssigkeitschromatographie beeinflusst, sondern auch die Ionisierbarkeit der Metabolite im Massenspektrometer bestimmt. Verschiedene Laufmittel können unterschiedliche Wechselwirkungen eingehen. Dadurch kommt es zu unterschiedlich starken Bindungen mit der stationären Phase und somit variierenden Retentionszeiten. Insbesondere beeinflussen die Polarität und der pH-Wert die Ionisierbarkeit der einzelnen Cholinmetabolite. Die Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der verschiedenen Laufmittel zusammen.

Ergebnisse

Exemplarische Massenspektren ausgewählter Analyten

Cholin

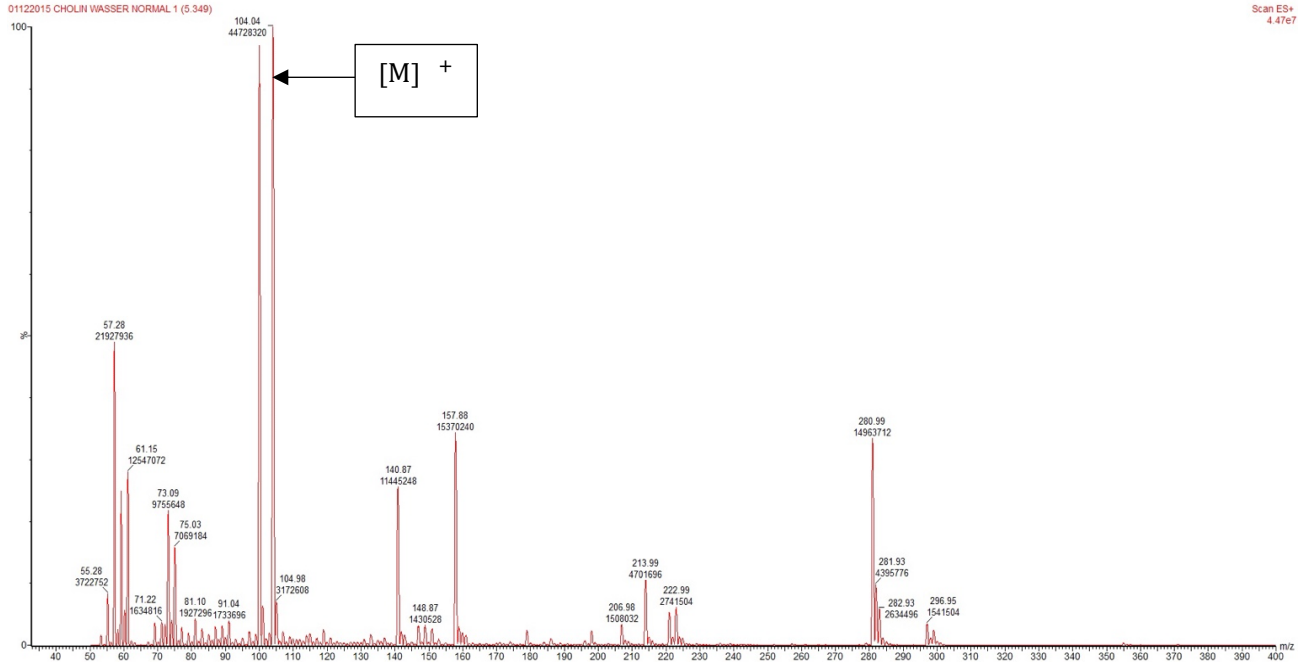


Abbildung 18 LC-ESI MS-Spektrum von Cholin

Acetylcholin

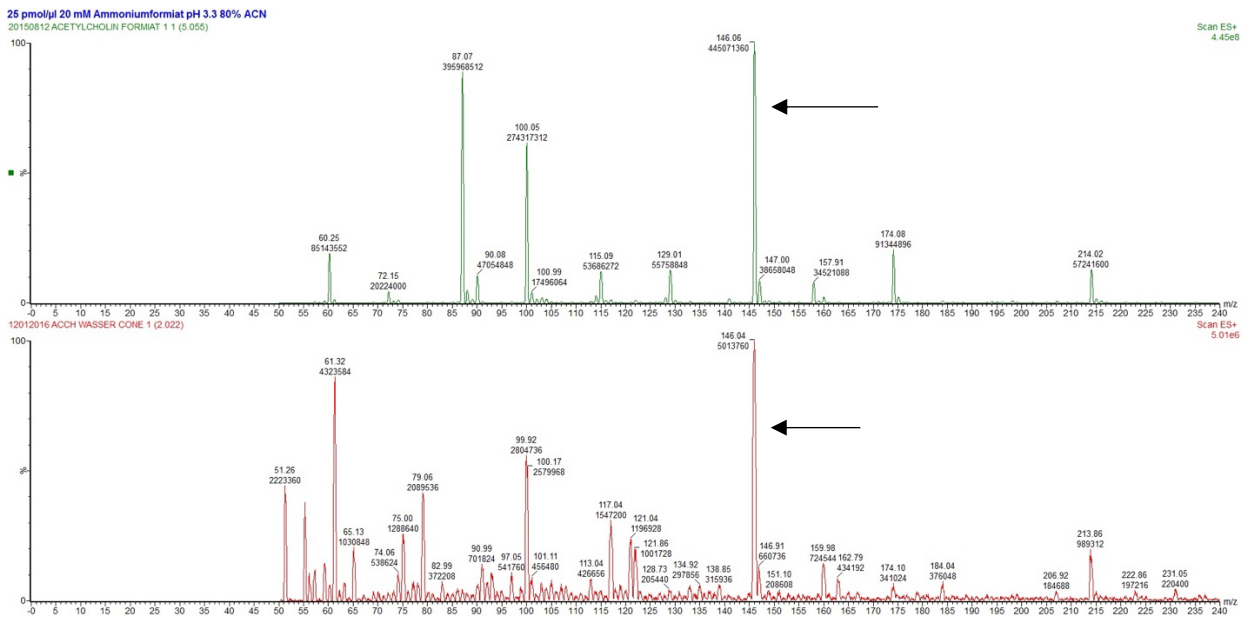


Abbildung 19 LC-ESI-Spektrum von Acetylcholin mit Laufmittel: 1. Ammoniumformat in ACN 2. Ammoniumformat in Wasser

Ergebnisse

Butyrylcholin

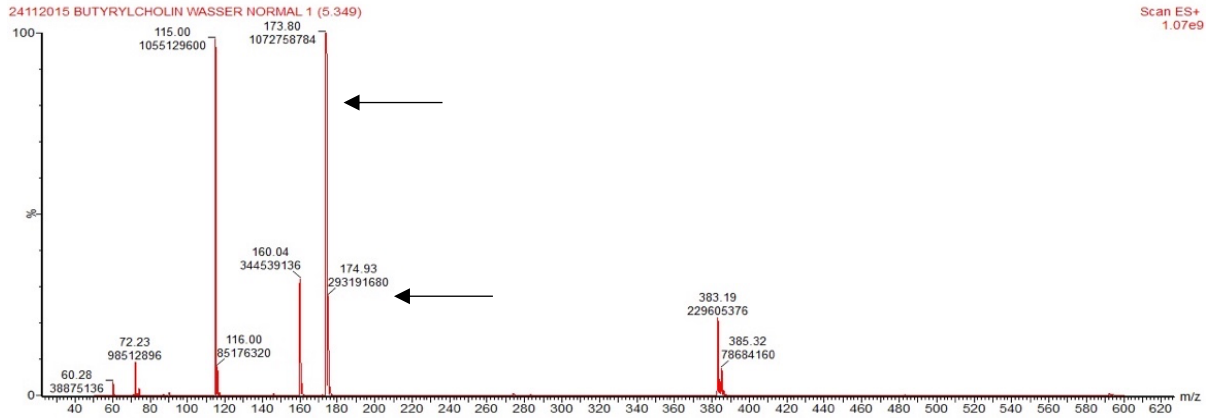


Abbildung 20 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: Wasser

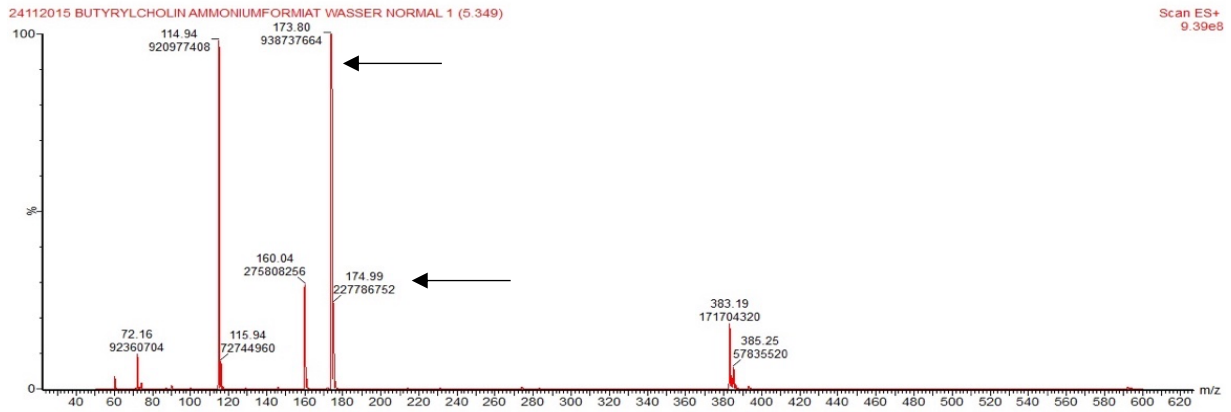


Abbildung 21 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: Ammoniumformiat in Wasser

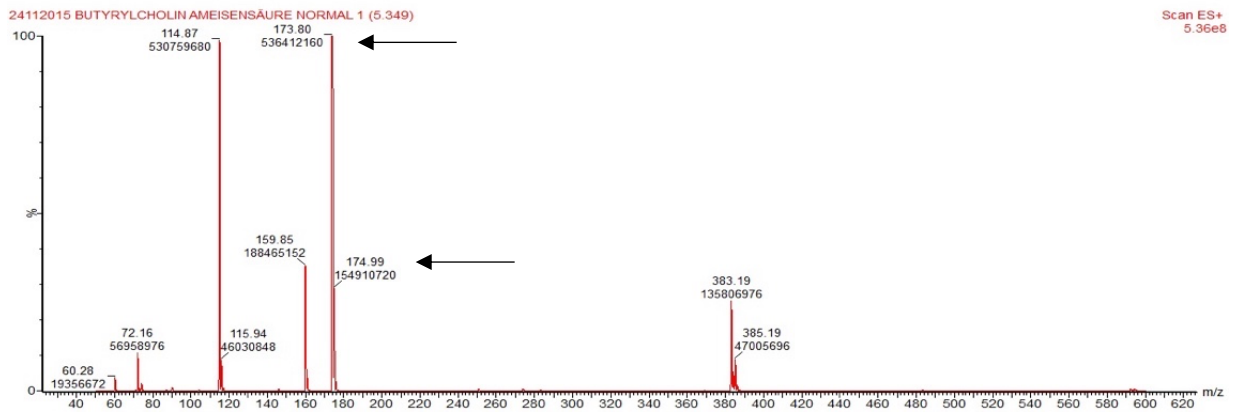


Abbildung 22 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: Ameisensäure

Ergebnisse

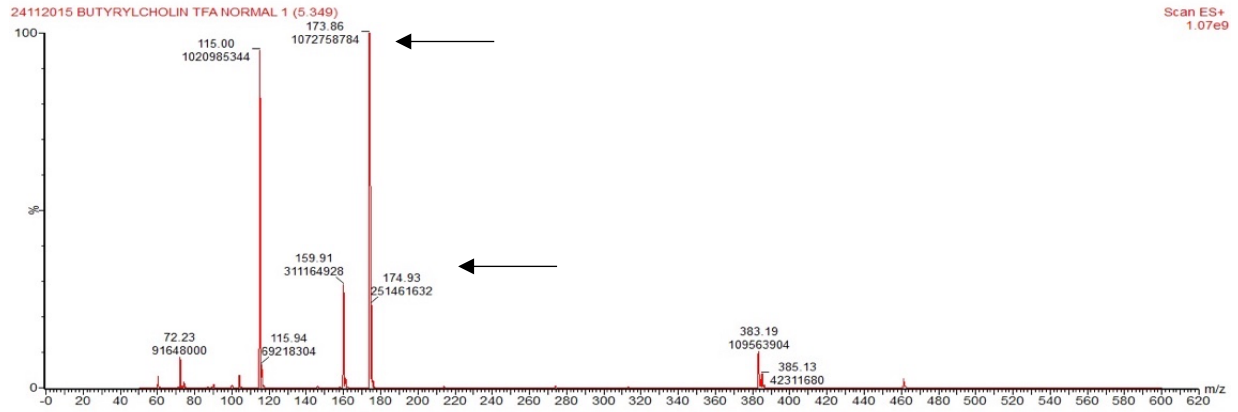


Abbildung 23 LC-ESI-Spektrum von Butyrylcholin mit Laufmittel: TFA

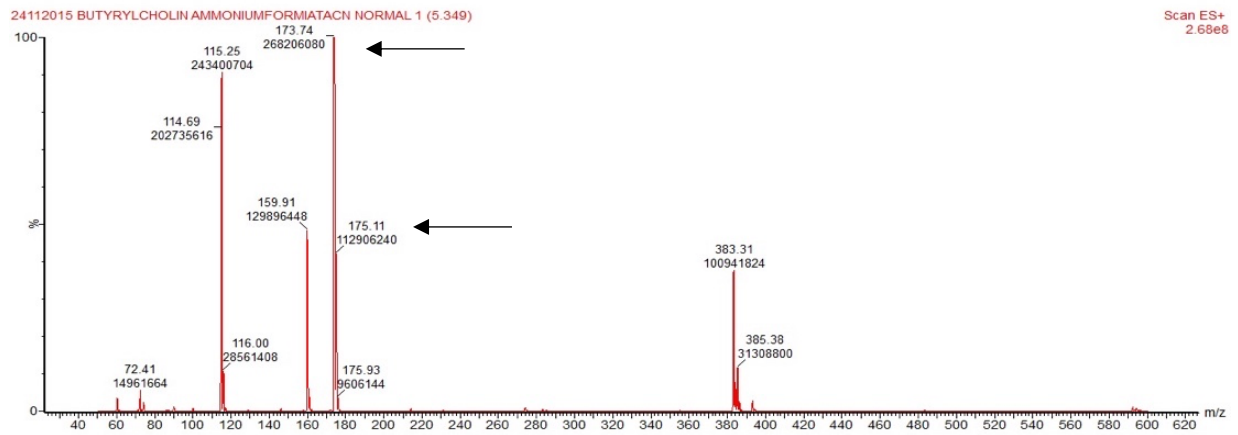


Abbildung 24 LC-ESI -Spektrum Butyrylcholin mit Laufmittel: Ammoniumformiat in Wasser

Ergebnisse

Glycerophosphocholin

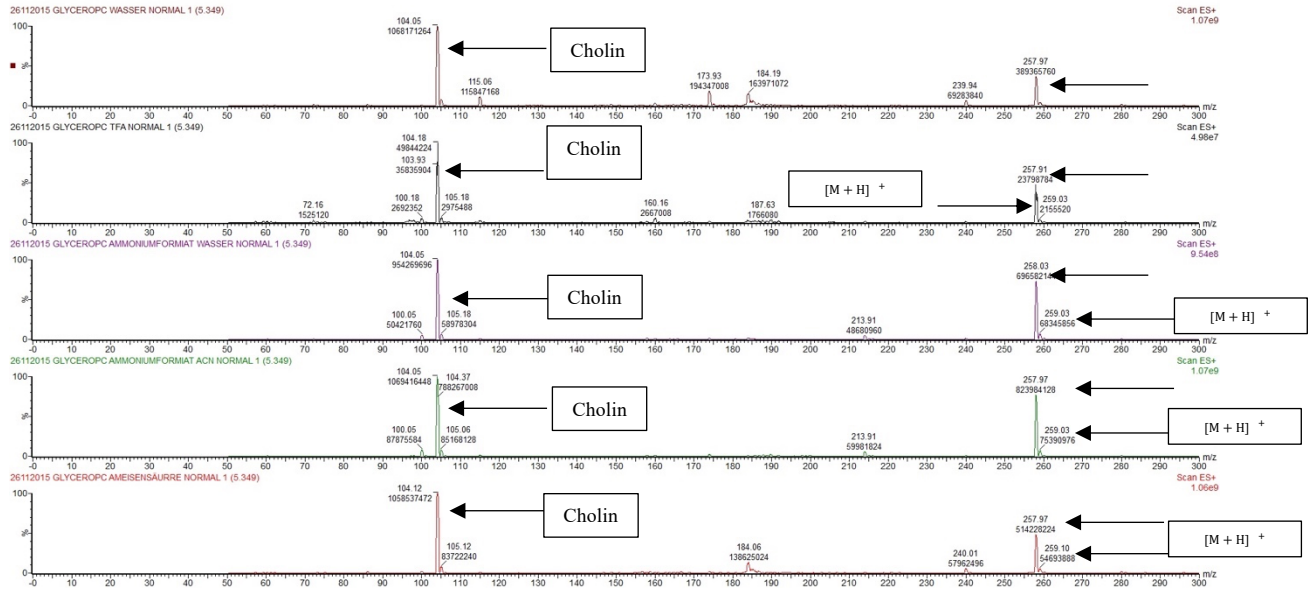


Abbildung 25 LC-ESI -Spektrum von Glycerophosphocholin mit Laufmittel: 1. Wasser 2. TFA 3. Ammoniumformiat in Wasser 4. Ammoniumformiat in ACN 5. Ameisensäure ;Cholin als Fragment

Phosphocholin

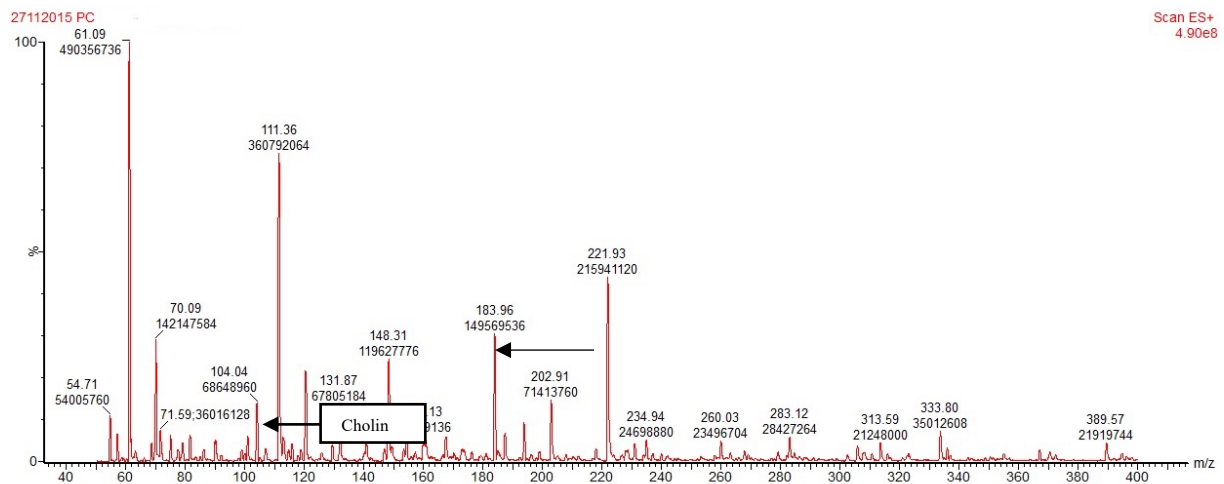


Abbildung 26 LC-ESI-Spektrum von Phosphocholin mit Laufmittel Wasser

Ergebnisse

Dimethylaminoethanol

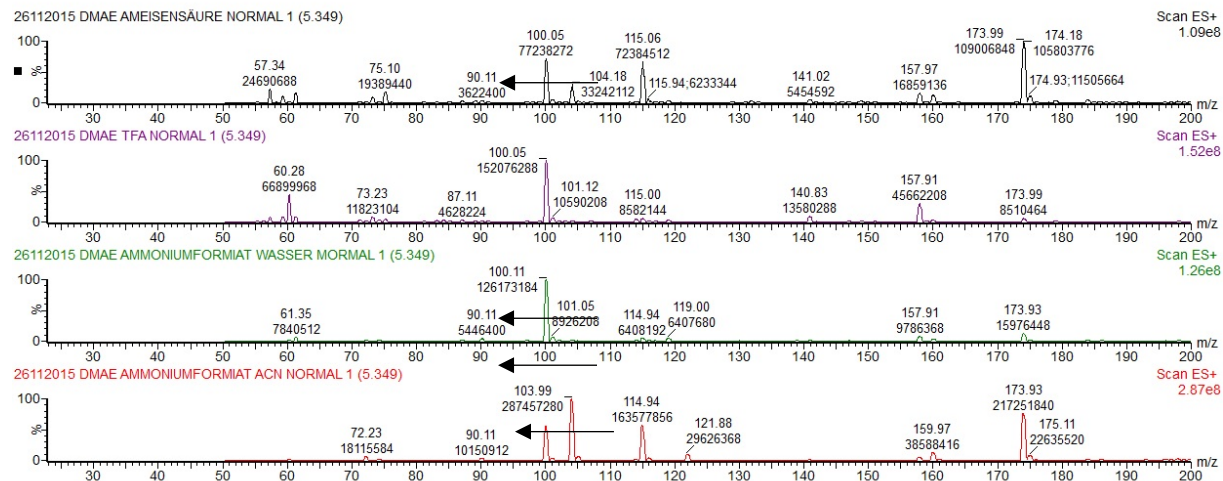


Abbildung 27 LC- ESI-Spektrum von DMAE mit Laufmittel: 1. Ameisensäure 2. TFA 3. Ammoniumformiat in Wasser 4. Ammoniumformiat in ACN

D9- Cholin

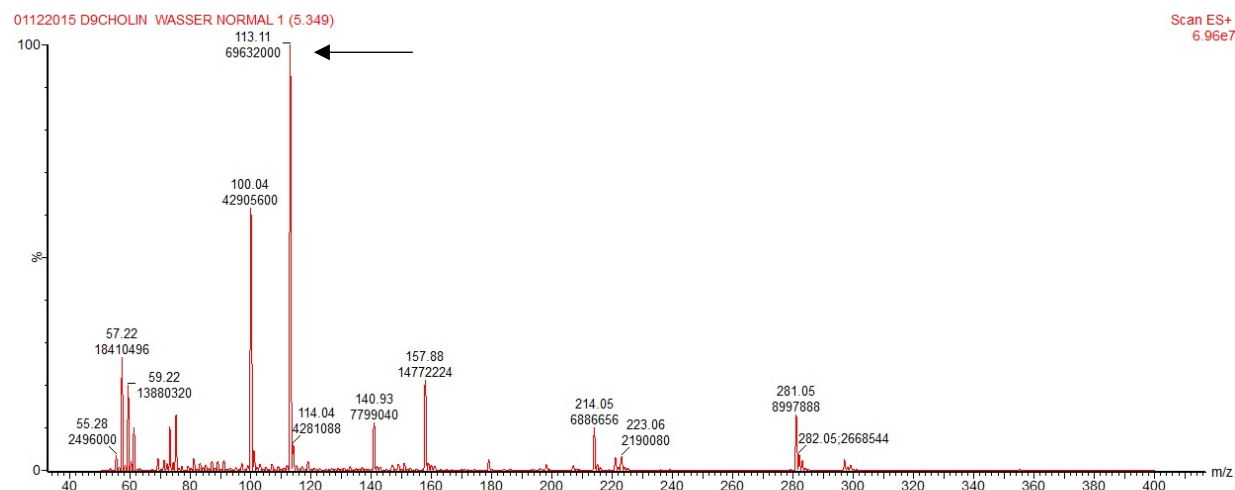


Abbildung 28 LC- ESI-Spektrum von D9- Cholin mit Laufmittel: Wasser

Ergebnisse

CDP- Cholin

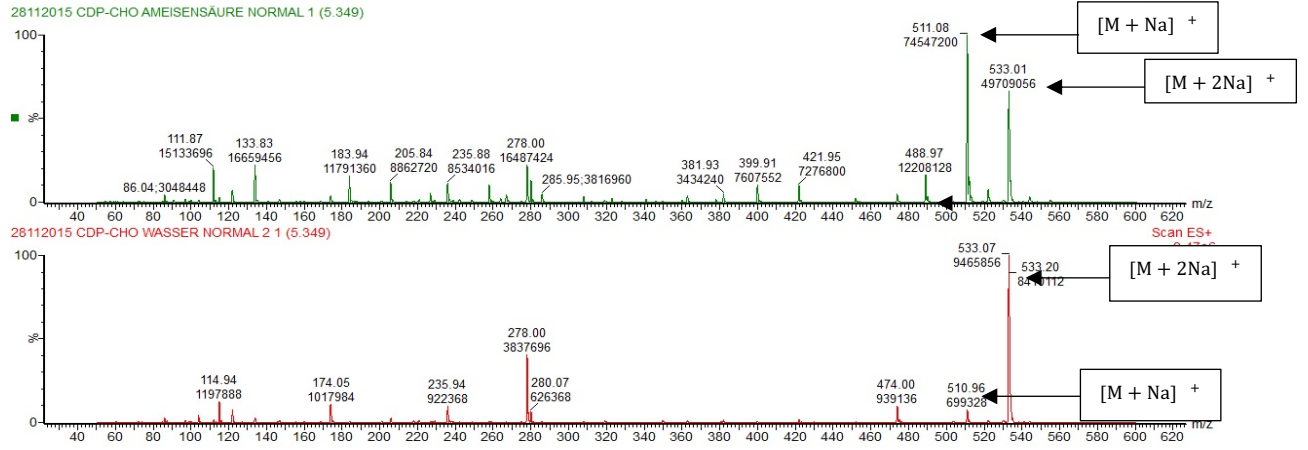


Abbildung 29 LC-ESI-Spektrum von CDP Cholin mit Laufmittel: 1. Ameisensäure 2. Wasser

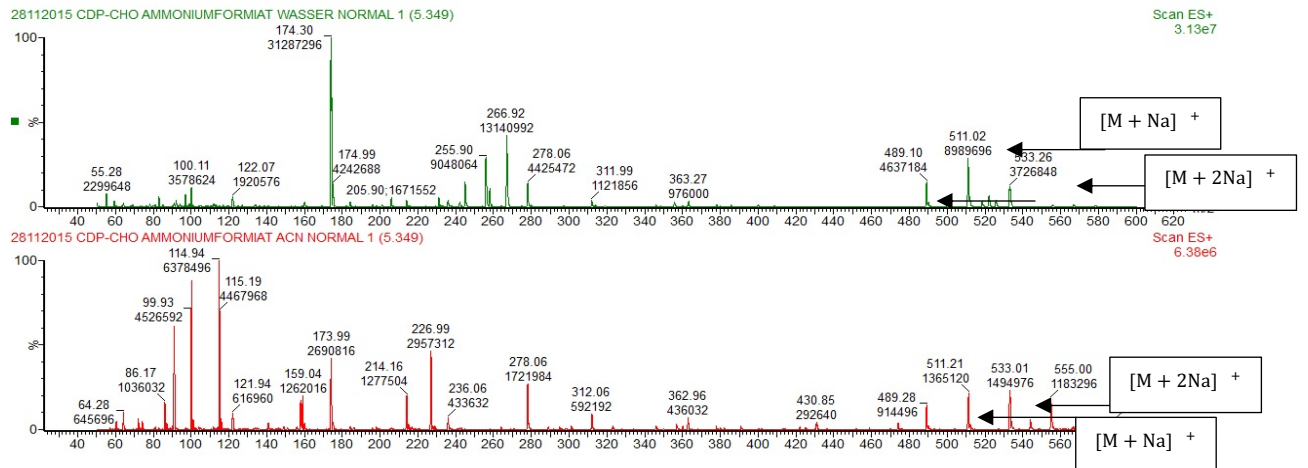


Abbildung 30 LC-ESI-Spektrum von CDP Cholin mit Laufmittel: 1. Ammoniumformiat in Wasser 2. Ammoniumformiat in ACN

Ergebnisse

Tabelle 21 Auswertung zur Auswahl der mobilen Phase

	Wasser	TFA	Ameisensäure	Ammoniumformiat in Wasser pH= 3.5	Ammoniumformiat in ACN pH= 3.5
Cho	++	-	-	+	-
Acetylcholin	++	-	-	+	+++
Butyrylcholin	++	+++	+++	+++	+++
Glycero-PC	+	+++	+++	+++	+++
PC	++	+	+	+	++
DMAE	+	++	++	++	++
D9-Cho	++	-	-	-	-
CDP- Cho	++	++	++	+	+

Legende: ++ = sehr gutes Signal + = gutes Signal - = kein Signal

In der vorliegenden Tabelle werden nochmals die Ergebnisse zur Auswahl des Laufmittels, also unserer mobilen Phase präsentiert. Cholin und seine Metabolite können aufgrund ihrer Polarität verschiedene Wechselwirkungen mit der mobilen Phase eingehen. Aufgezeigt sind die einzelnen Massenspektren und die damit verbundene Detektierbarkeit der einzelnen Analyte (mit einem Pfeil markiert). Wasser ist ein polares Lösungsmittel, jedoch zeigten sich einige Analyte in reinem Wasser bzw. Sauren Lösungsmitteln nicht stabil, weswegen wir 10% Wasser und 90% ACN als optimales Lösungsmittel für die Analyten gewählt haben. Ein hoher ACN-Anteil zu Beginn der Chromatographie führt zur guten Bildung der Analyte mit der stationären Phase. Die Elution erfolgt mit steigenden Wasseranteil.

Trifluoressigsäure ist stark organisch und kann die Ionisierung zwar verbessern, jedoch beeinflusst sie die Stabilität der Analyte bzw. kann zu Clusterbildung bei der ESI-Massenspektrometrie führen. Somit kann es zu unerwünschten Wechselwirkungen zwischen der mobilen und stationären Phase kommen [75]. Dabei kann es zu ionischen Wechselwirkungen oder auch Wasserstoffbrückenbindungen kommen, was die Retentionszeit deutlich verlängert. Ameisensäure ist ebenfalls polar, jedoch sind die Wechselwirkungen zwischen der Ameisensäure und der Säule ausgeprägter was zu einer vermehrten Retention führen kann. Die Analysezeit der einzelnen Cholinderivate kann dadurch verlängert sein und die Trennung damit ausbleiben [76].

Ergebnisse

Ammoniumformiat in Acetonitril kann sowohl polar als auch unpolar interagieren. Die Retention polarer Verbindungen ist jedoch verringert, wenn der Anteil an Acetonitril [77] zu hoch ist.

Stabilisierung und Protonierung

Cholin und seine Derivate liegen im Wasser z.T. als Kationen vor. Sie sind stark polar und sind in einem sauren Milieu positiv geladen. Ammoniumformiat wird eingesetzt, um eine chemische Stabilität der eingesetzten Derivate zu erreichen, der einzelnen Derivate kommen kann.

Effekt auf die Kationisation

Die Kationisation von Cholin und seiner Metabolite ist für die Trennung und Detektion wichtig. Ammoniumformiat begünstigt das saure Milieu. Die Trennung wird verschärft und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert.

Erhöhung der Probenstabilität

Das Ammoniumformiat stabilisiert nicht nur die Protonierung, sondern wird auch als Stabilisator. Choline sind empfindliche Moleküle. Bei schlechtem pH kann es zur Hydrolyse kommen oder zum Zerfall.

3.4. Selected Ion Recording (SIR)/ Total Ion Chromatogram (TIC)

Selected Ion Recording (SIR) und Total Ion Chromatogram (TIC) sind zentrale Konzepte, die der Quantifizierung von Cholin und seiner Metabolite dienen. Beide Methoden liefern unterschiedliche Informationen, die für Analyse und Quantifizierung der einzelnen Substanzen wichtig sind.

SIR (Selected Ion Recording)

Die Selected Ion Recording (SIR) Technik ist eine Methode in der Massenspektrometrie, bei der das Instrument gezielt bestimmte Masse-zu-Ladungs Verhältnisse (m/z) registriert. Dies ermöglicht eine verbesserte Empfindlichkeit und erhöhte Selektivität, da der Fokus auf den ausgewählten Ionen liegen [78].

Bei der Analyse von Cholin und dessen Metaboliten mittels SIR wird das Massenspektrometer so eingestellt, dass diese m/z den Zielverbindungen (Analyten) entsprechen.

In einem SIR-Chromatogramm repräsentiert jeder Peak die Detektion eines spezifischen Ions mit dem ausgewählten m/z - Wert. Die Position des Peaks entlang der Zeitachse gibt die Retentionszeit des Analyten an, während die Peakfläche oder -höhe proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe ist.

TIC (Total Ion Chromatogram)

Die Methode Total Ion Chromatogram (TIC) ist eine Methode bei der alle Ionen im gesamten Massenbereich des Massenspektrums über die Zeit hinweg aufgezeichnet werden.

Hierbei wird die Intensität aller Ionen aufgezeichnet und im Massenspektrometer detektiert. Somit wird die gesamte ionische Aktivität in einer Probe präsentiert ohne eine spezielle Auswahl von Ionen aufzuzeigen.

Die Ionen werden detektiert und ihre Intensität gegen die Zeit aufgetragen. Dabei wird ein Chromatogramm erstellt, welches einen Überblick darüber liefert, wie die Konzentration der Ionen in der Probe über die Zeit variieren.

Ergebnisse

Um die Intensität eines bestimmten Ions über die Zeit hinweg zu beobachten wird in dieser Arbeit die Nutzung des SIR-Traces bevorzugt. Durch das Selektieren eines bestimmten Ions kann die genaue Konzentration eines bestimmten Analyts schnell und genau gemessen werden.

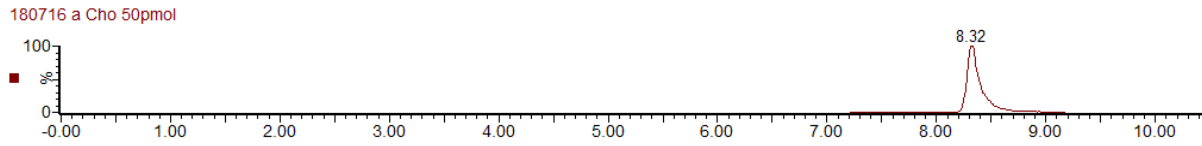


Abbildung 31 SIR-Spur von Cholin

Der Detektor ist gezielt auf $(m/z) = 104$ für Cholin eingestellt. Die Retentionszeit liegt bei 8,32 Minuten. Der Peak hat eine schmale Basis und gute Form, was auf eine gute Trennung und hohe Auflösung der Chromatographie hinweist.

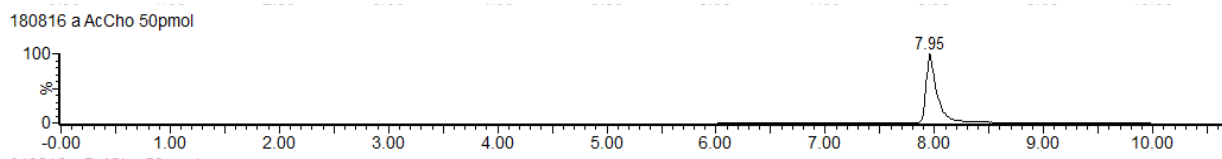


Abbildung 32 SIR- Spur von Acetylcholin

Das Massenspektrum ist gezielt auf $(m/z) = 146$ für Acetylcholin eingestellt. Die Retentionszeit liegt bei 7,95 Minuten. Die Intensität ist bei 100%. Der Peak hat eine schmale Basis und gute Form.

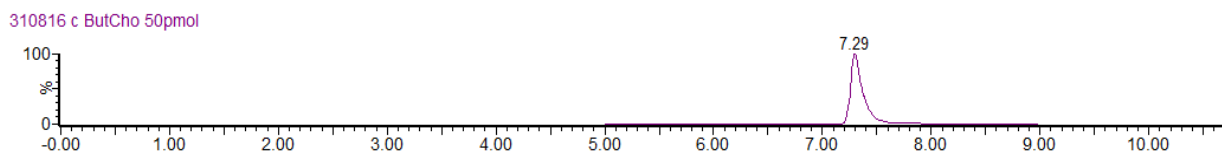


Abbildung 33 SIR-Spur von Butyrylcholin

Das Massenspektrum ist gezielt auf $(m/z) = 174$ für Butyrylcholin. Die Retentionszeit liegt bei 7,29 Minuten. Die Intensität ist bei 100%. Der Peak ist auch hier schmal und hat eine gute Form.

Ergebnisse

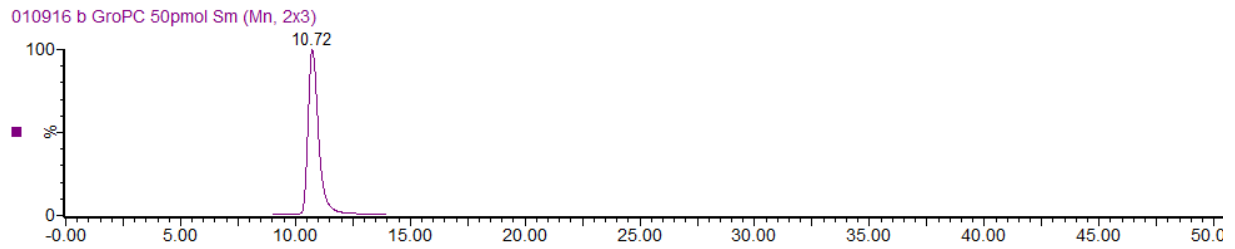


Abbildung 34 SIR-Spur von Glycerophosphocholin

Das Massenspektrum ist gezielt auf $(m/z) = 258$ für Glycerophosphocholin. Die Retentionszeit liegt bei 10,72 Minuten. Die Intensität ist 100%. Der Peak ist sehr schmal und eine sehr gute Form

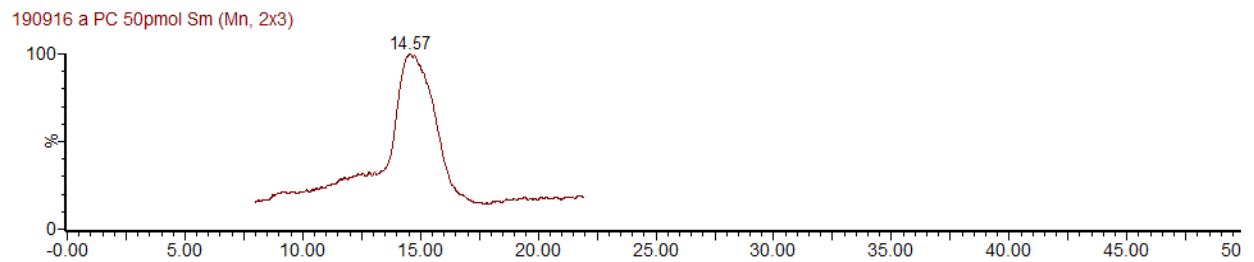


Abbildung 35 SIR-Spur von Phosphocholin

Das Massenspektrum ist gezielt auf $(m/z) = 184$ für Phosphocholin. Der Peak der Retentionszeit liegt bei 14,57 Minuten. Der Peak ist auf beiden Seiten deutlich breiter. Das Signal zeigt eine leichte Asymmetrie. Es zeigt sich ein breites Signal.

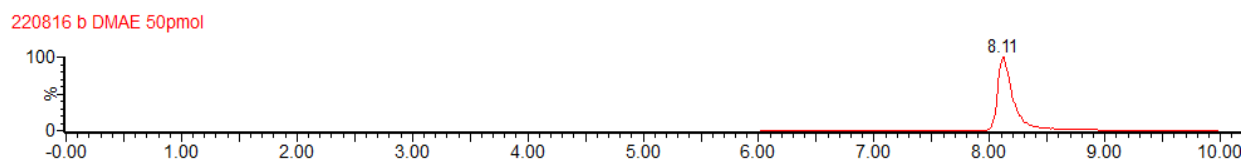


Abbildung 36 SIR-Spur von DMAE

Ergebnisse

Das Massenspektrum ist gezielt auf $(m/z) = 90$ für Dimethylaminoethanol. Die Retentionszeit liegt bei 8,11 Minuten. Die Intensität ist 100%. Der Peak ist schmal und eine sehr gute Form

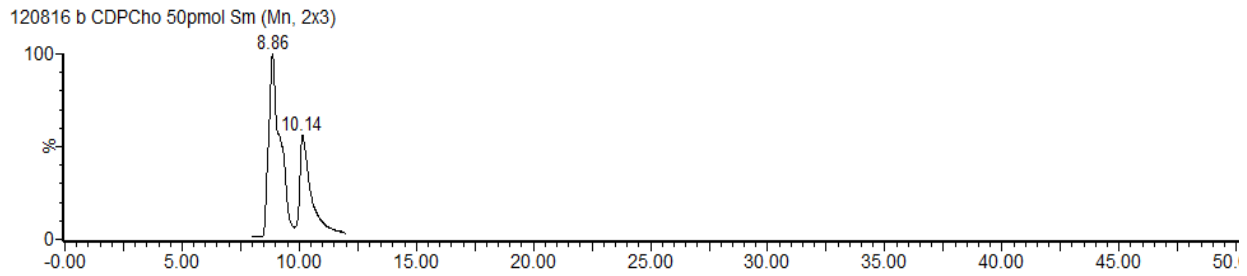


Abbildung 37 SIR-Spur von CDP-Cholin

Das Massenspektrum ist gezielt auf $(m/z)=489$ für CDP-Cholin. Die Retentionszeit liegt bei 8,86 Minuten, jedoch erscheint ein zweiter Peak bei 10,14 Minuten. Hier liegen zwei Peaks vor. Dieses Phänomen lässt sich durch strukturelle Isomere erklären. Somit liegt zwar eine identische Summenformel und Masse vor, jedoch unterschiedliche Konfiguration des Moleküls.

3.5. Methodenvalidierung

Die Validierung einer HPLC-Methode umfasst mehrere Parameter.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection= LOD) ist die niedrigste Konzentration eines Analyten, die mit einer bestimmten Methode signifikant nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze wurde hier durch die Analyse der Verdünnungsreihe bestimmt. Die Verdünnungsreihe hilft zudem auch den linearen Bereich der angewandten Methode zu definieren. Der lineare Bereich ist der Konzentrationsbereich, in dem die Peakfläche/ Höhe des Analyts proportional zur Konzentration dessen ist. Die mittlere relative Standardabweichung wird hier verwendet um die Reproduzierbarkeit der Methode zu bewerten. Für die quantitative Analyse von Cholin und Cholinmetaboliten ist es wichtig, dass der RSD innerhalb eines akzeptablen Bereichs liegt (<10%)

Im Rahmen der Methodenetablierung und Optimierung wurde eine komplette Verdünnungsreihe hergestellt, um die Nachweisgrenze (LOD) sowie die Linearität der Methode zu bestimmen. Die Experimente wurden an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, wobei jeweils Triplikate jeder Verdünnungsstufe analysiert wurden.

Des Weiteren wurde für die Quantifizierung der lineare Bereich der einzelnen Präparate bestimmt. Zentrales Element der Bewertung der Linearität ist der Regressionskoeffizient (R^2) Dieser Koeffizient ist das Maß für die Güte der Anpassung einer Regressionslinie an die experimentellen Daten. Ein R^2 von 1 zeigt eine perfekte lineare Beziehung.

Ergebnisse

Cholin

Zur Quantifizierung des Cholins wurden verschiedene Versuche und Anpassungen im Messprozess durchgeführt. Es wurden mehrere Verdünnungsreihen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit und die Linearität in verschiedene Konzentrationen zu testen. Des Weiteren erfolgten im Rahmen der Untersuchung auch Reporduzierbarkeitstest über mehrere Tage und mittels drei Injektionen pro Tag. Die Höhe der Peakflächen war stark abhängig von der Reinheit des verwendeten Sprayeingangs, was die Quantifizierung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse z.T. erschwerte.

Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass die LOD für Cholin bei 100 fmol liegt, während eine sichere Quantifizierung ab 250 fmol möglich ist. Der lineare Bereich erstreckt sich aus 250 fmol bis 100 pmol.

Tabelle 22 Standardabweichung für die Injektionen jeder Verdünnungsreihen von Cholin

fmol	Inj 1	Inj 2	Inj 3	MW	Stdabw.	RSD	
250	547.944.875	516.600.813	518.125.281	527.556.990	14429839,5	2,74	
500	507.222.938	486.403.594	457.200.750	483.609.094	20516850,73	4,24	
1000	734.100.875	742.584.938	769.799.563	748.828.459	15227940,2	2,03	
5000	3.736.574.500	3.676.181.500	3.394.339.750	3.602.365.250	149148215,1	4,14	
10000	6.896.226.000	6.996.259.000	7.285.999.500	7.059.494.833	165287473,4	2,34	
20000	14.223.688.000	14.159.697.000	14.238.873.000	14.207.419.333	34309492,18	0,24	
50000	36.136.756.000	35.860.948.000	36.340.216.000	36.112.640.000	196402036,7	0,54	
100000	67.187.320.000	70.103.096.000	67.809.368.000	68.366.594.667	1253877609	1,83	
						2,26	MW RSD

Die Analyse der Cholin Quantifizierung zeigt, dass die Mittelwerte der Injektionen konsistent sind und die Standardabweichung und RSD- Werte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse anzeigen.

Der Regressionswert liegt bei 0,9993 und bestätigt somit die Zuverlässigkeit der Methode zur quantitativen Bestimmung von Cholin.

Ergebnisse

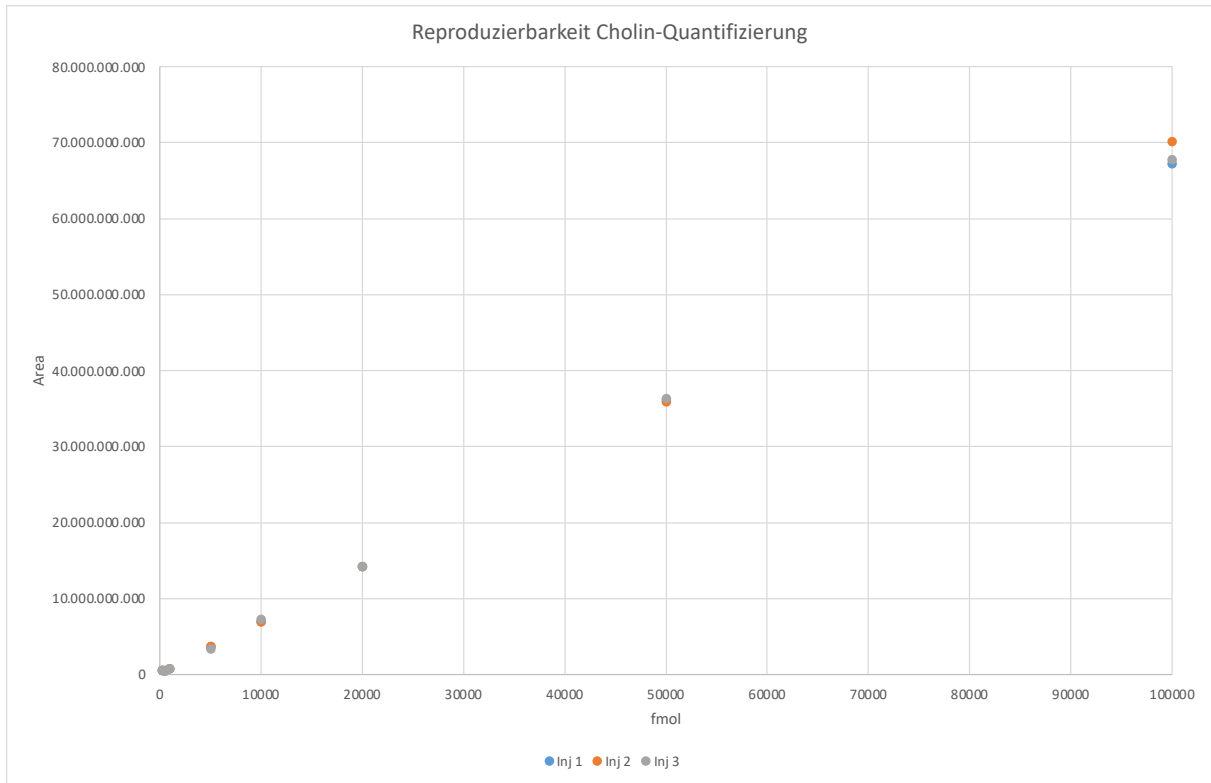


Abbildung 38 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektionen von Cholin

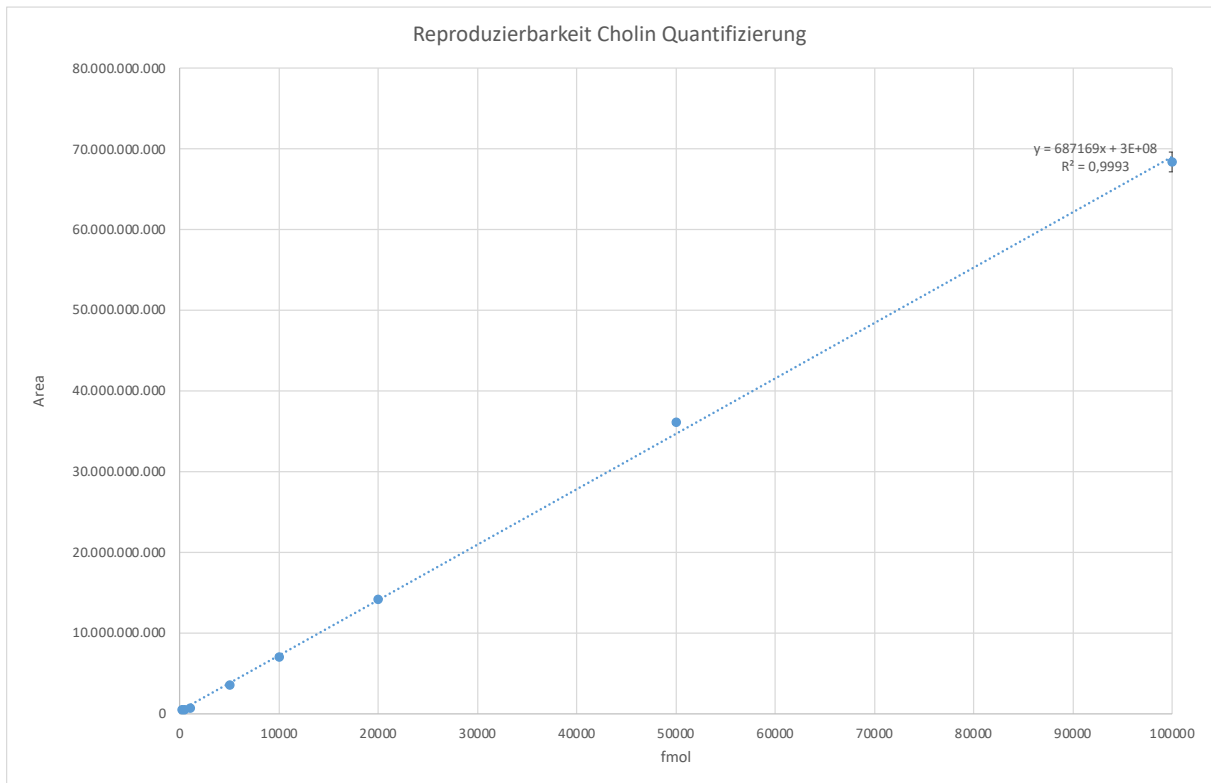


Abbildung 39 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Cholin

Ergebnisse

Acetylcholin

Die LOD wurde hier bei 20 fmol ermittelt. Der lineare Bereich liegt zwischen 100 fmol und 100 pmol. Die Analysen zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag.

Tabelle 23 Standardabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Acetylcholin

fmol	Inj 1	Inj 2	Inj 3	MW	Stdabw.	RSD	
100	188.218.516	203.395.891	187.141.625	192.918.677	7421541,988	3,85	
250	283.113.031	358.795.313	322.587.313	321.498.552	30906752,25	9,61	
500	667.956.125	646.787.813	585.395.875	633.379.938	35013112,41	5,53	
1000	1.192.294.375	1.239.313.500	1.105.127.375	1.178.911.750	55592565,6	4,72	
5000	5.203.044.500	5.456.852.500	5.387.311.000	5.349.069.333	107087017,6	2,00	
10000	9.654.516.000	10.217.316.000	9.511.323.000	9.794.385.000	304717390,3	3,11	
20000	19.953.822.000	19.692.830.000	19.635.728.000	19.760.793.333	138468309,8	0,70	
50000	49.012.164.000	50.223.324.000	49.222.416.000	49.485.968.000	528407594,5	1,07	
100000	87.714.784.000	88.315.016.000	89.318.472.000	88.449.424.000	661565281,8	0,75	
						3,48	MW RSD

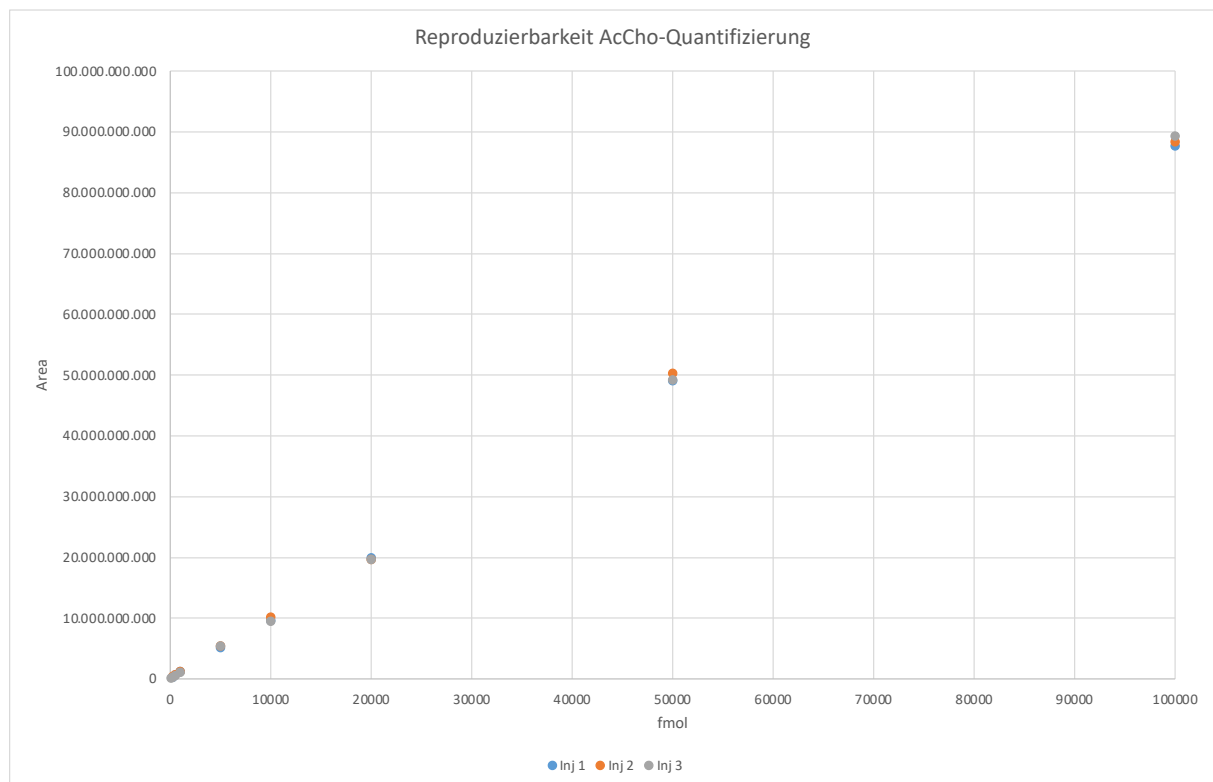


Abbildung 40 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektionen für Acetylcholin

Ergebnisse

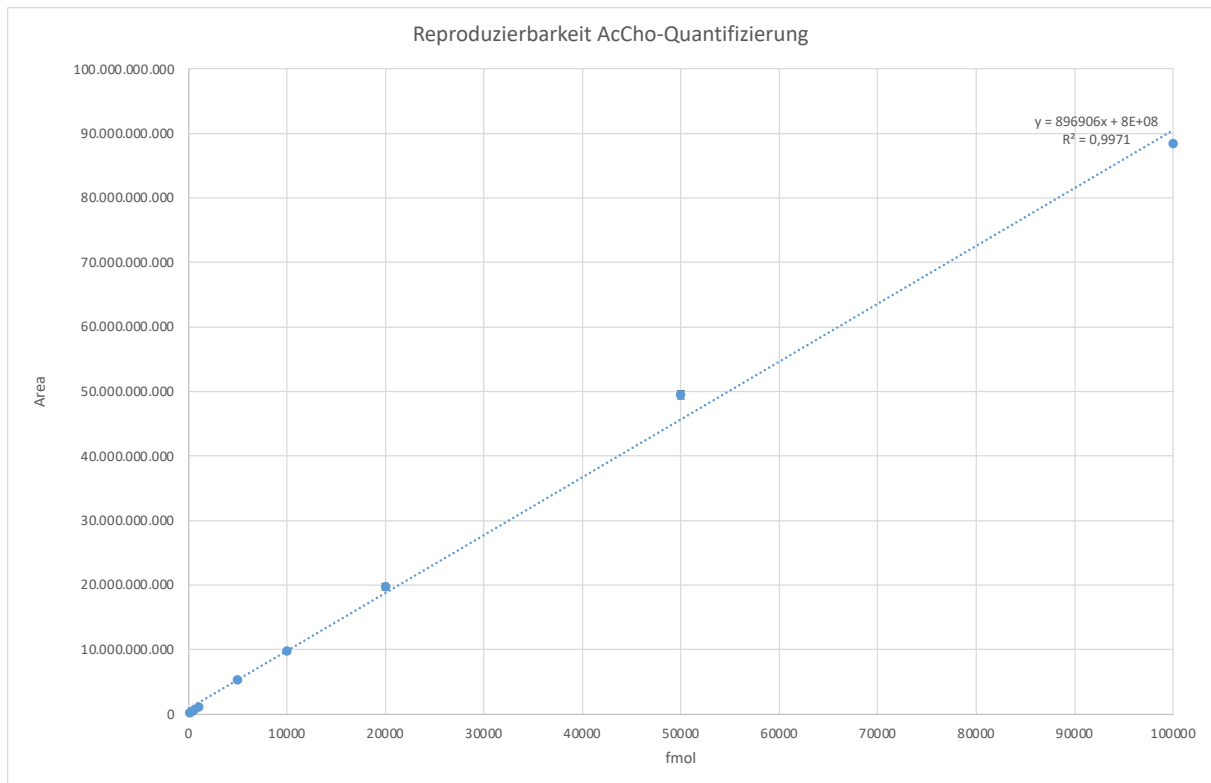


Abbildung 41 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Acetylcholin

Die RSD-Werte lagen durchgängig unter 4%, wobei im höheren Konzentrationsbereich (2.500-100000 fmol) sogar Werte unter 1% erreicht wurden. Der Regressionswert liegt bei 0,997 und bestätigt somit die Zuverlässigkeit der Methode zur quantitativen Bestimmung von Acetylcholin.

Ergebnisse

Butyrylcholin

Auch hier wurden die Verdünnungsreihen umfassend an mehreren Tagen für die komplette Verdünnungsreihe dreifach analysiert. Die Ergebnisse der Analyse zeigen, dass die LOD für Butyrylcholin bei 100 fmol liegt, während eine sichere Quantifizierung ab 250 fmol möglich ist. Der lineare Bereich erstreckt sich aus 100 fmol bis 50 pmol.

Tabelle 24 Standardabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Butyrylcholin

fmol	Inj 1	Inj 2	Inj 3	MW	Stdabw.	RSD	
100	152.316.219	162.253.953	169.989.016	161.519.729	7233544,624	4,48	
250	380.682.031	288.865.000	296.261.688	321.936.240	41649159,64	12,94	
500	553.767.000	511.970.219	498.966.250	521.567.823	23378994,16	4,48	
1000	891.553.313	836.920.563	959.875.750	896.116.542	50299846,23	5,61	
5000	4.952.643.500	6.231.403.500	6.741.008.000	5.975.018.333	752268529,8	12,59	
10000	12.086.448.000	11.814.578.000	10.678.139.000	11.526.388.333	609985531,4	5,29	
20000	19.019.806.000	16.906.988.000	17.516.772.000	17.814.522.000	887878096,8	4,98	
50000	44.917.332.000	40.099.264.000	33.219.688.000	39.412.094.667	4800199305	12,18	
100000							
250000							
							7,82 MW RSD

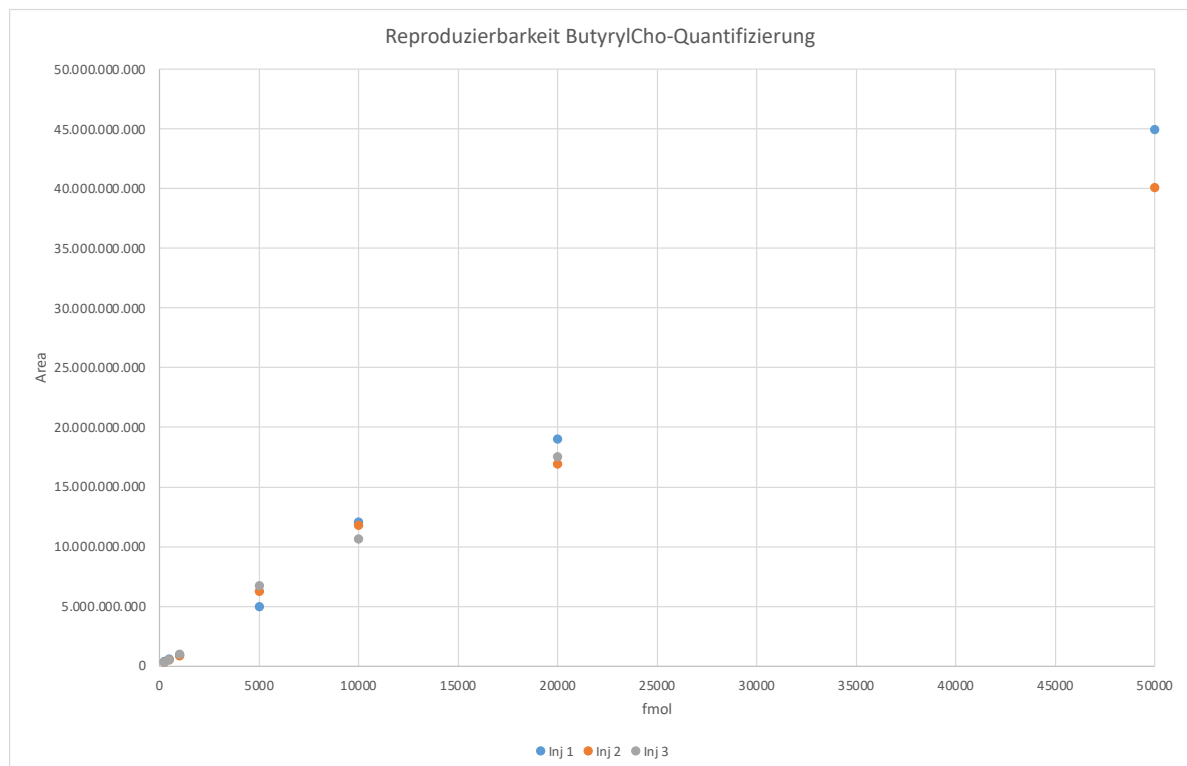


Abbildung 42 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Butyrylcholin

Ergebnisse

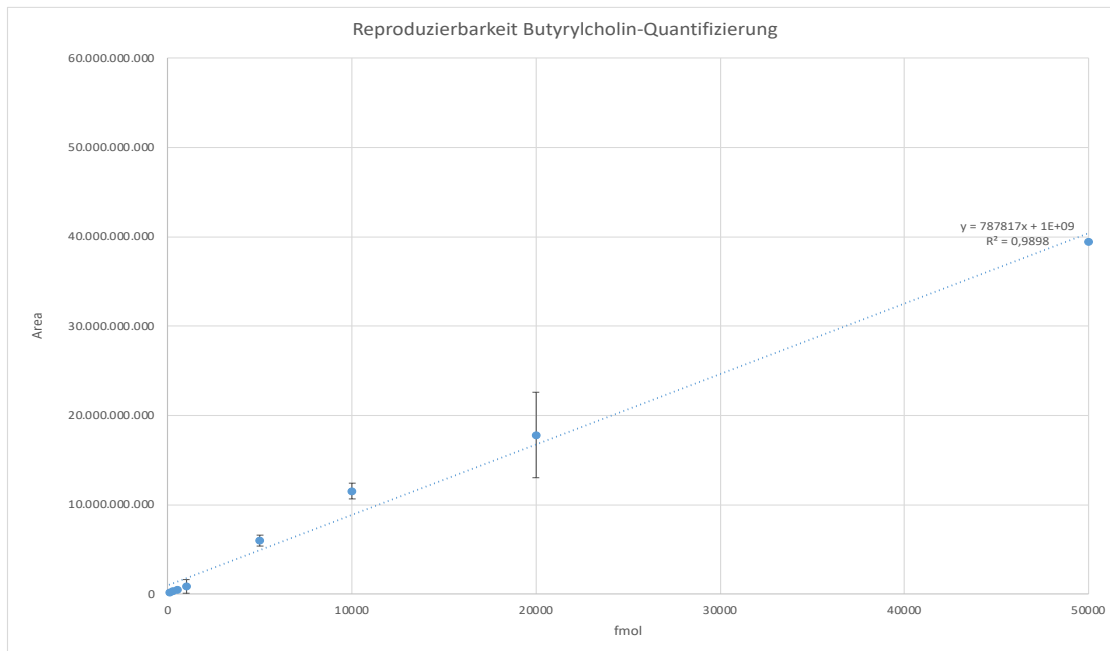


Abbildung 43 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Butyrylcholin

Ergebnisse

Glycerophosphocholin

Es konnte festgestellt werden, dass die LOD bei 1,25 fmol liegt, während eine sichere Quantifizierung ab 5 pmol möglich ist. Der lineare Bereich der Methode erstreckt sich von 5pmol bis 1nmol. Bei weiteren Messungen bestätigte sich das Ergebnis. Bei der dritten Messung wurde eine schlechtere Linearität festgestellt. Im Rahmen der Untersuchung konnte jedoch gezeigt werden, dass der Regressionskoeffizient zwischen 0,9713 und 0,9914 was auf die Güte der Anpassung der linearen Regression an die Messdaten hinweist.

Tabelle 25 Standardabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Glycerophosphocholin

fmol	Inj 1	Inj 2	Inj 3	MW	Stdabw.	RSD	
100							
250							
500							
1000							
5000	396.678.438	390.483.375	330.293.906	372.485.240	29940788	8,04	
10000	409.509.125	368.388.813	382.943.938	386.947.292	17024299,25	4,40	
20000	453.515.031	479.194.594	426.833.031	453.180.885	21377824,33	4,72	
50000	818.644.563	788.563.375	756.742.500	787.983.479	25274737,85	3,21	
100000	1.649.594.125	1.524.684.375	1.582.920.625	1.585.733.042	51032954,56	3,22	
250000	2.852.369.500	2.929.949.500	2.975.145.750	2.919.154.917	50701046,43	1,74	
500000	17.739.948.000	16.708.992.000	16.612.870.000	17.020.603.333	510164954,9	3,00	
1000000	30.329.882.000	30.022.304.000	29.935.892.000	30.096.026.000	169082287,6	0,56	
						3,61	MW RSD

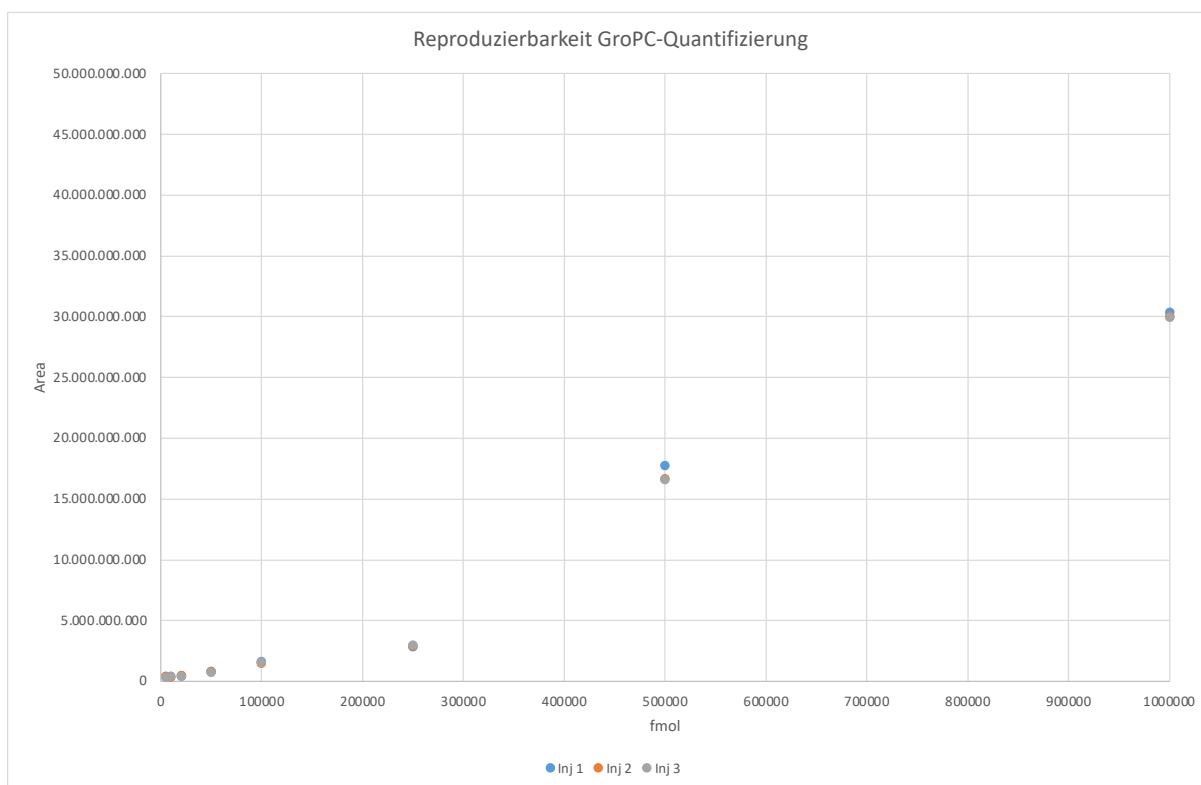


Abbildung 44 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Glycerophosphocholin

Ergebnisse

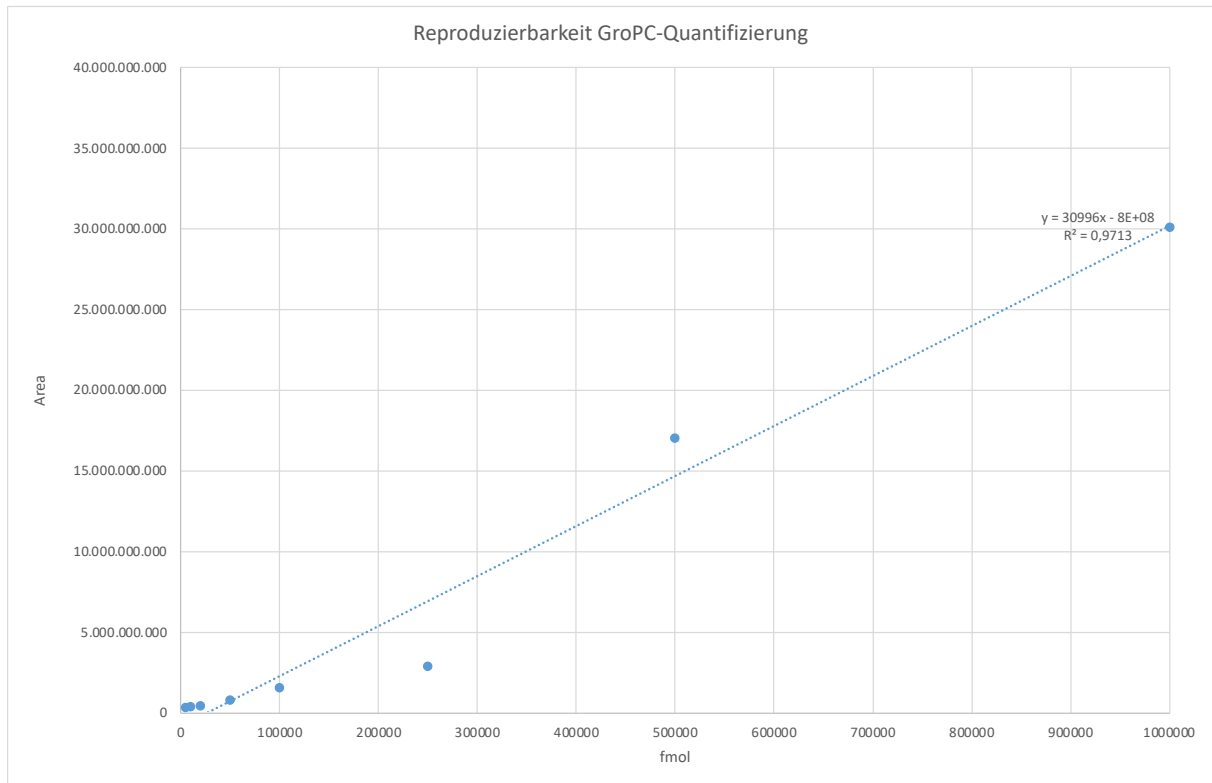


Abbildung 45 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Glycerophosphocholin

Ergebnisse

Phosphocholin

Die Ergebnisse zeigen, dass eine LOD für Phosphocholin bei 1 pmol liegt. Darüber hinaus wurde ein linearer Bereich für die Quantifizierung von 20 pmol bis 1 nmol ermittelt. Die Ergebnisse sind konsistent über alle Versuchstage und belegen die Stabilität und Zuverlässigkeit der gewählten analytischen Methode.

Tabelle 26 Standardabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Phosphocholin

fmol	Inj 1	Inj 2	Inj 3	MW	Stdabw.	RSD	
100							
250							
500							
1000							
5000							
10000							
20000	808.953.750	681.050.625	906.993.813	798.999.396	92509091,17	11,58	
50000	1.439.572.250	1.868.555.250	1.868.813.750	1.725.647.083	202285482,1	11,72	
100000	2.894.043.250	3.764.558.750	3.777.262.750	3.478.621.583	413391838,9	11,88	
250000	7.594.233.500	9.254.426.000	9.675.885.000	8.841.514.833	898587768,1	10,16	
500000	16.737.138.000	20.359.384.000	20.401.172.000	19.165.898.000	1717477397	8,96	
1000000	38.995.672.000	45.093.812.000	44.857.744.000	42.982.409.333	2820695889	6,56	
						10,15	MW RSD

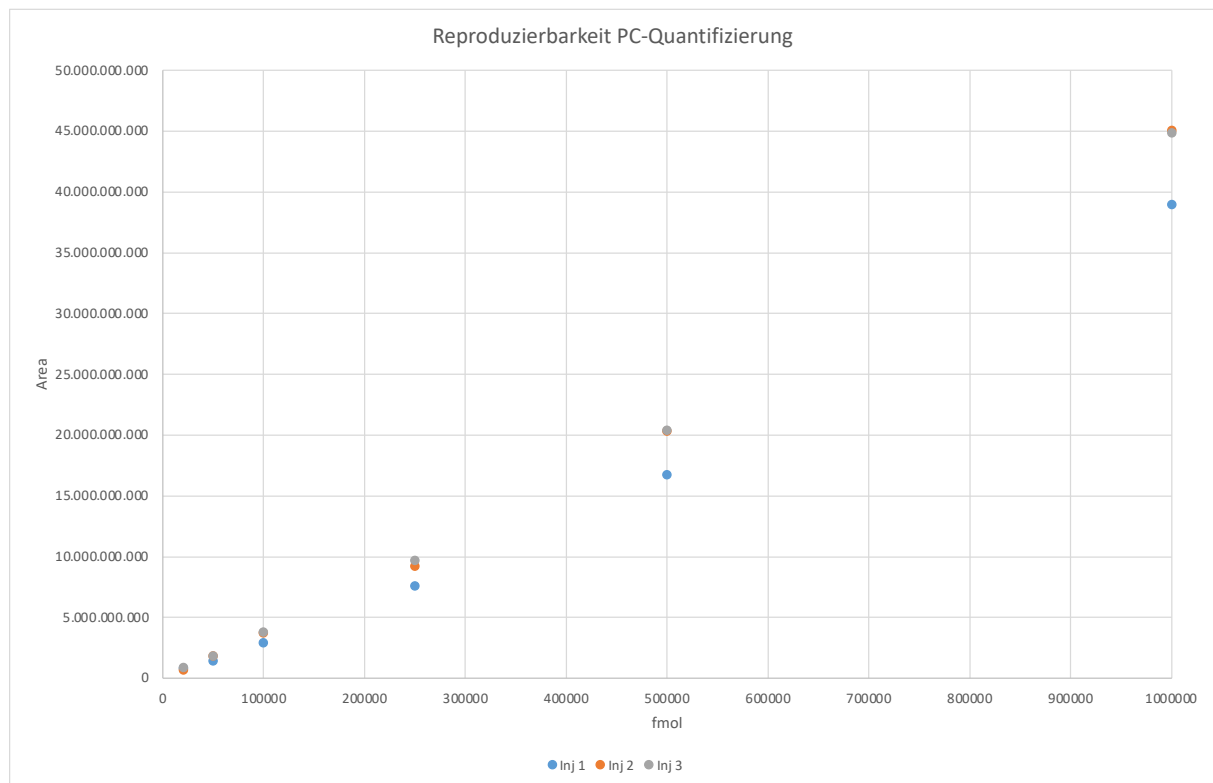


Abbildung 46 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Phosphocholin

Ergebnisse

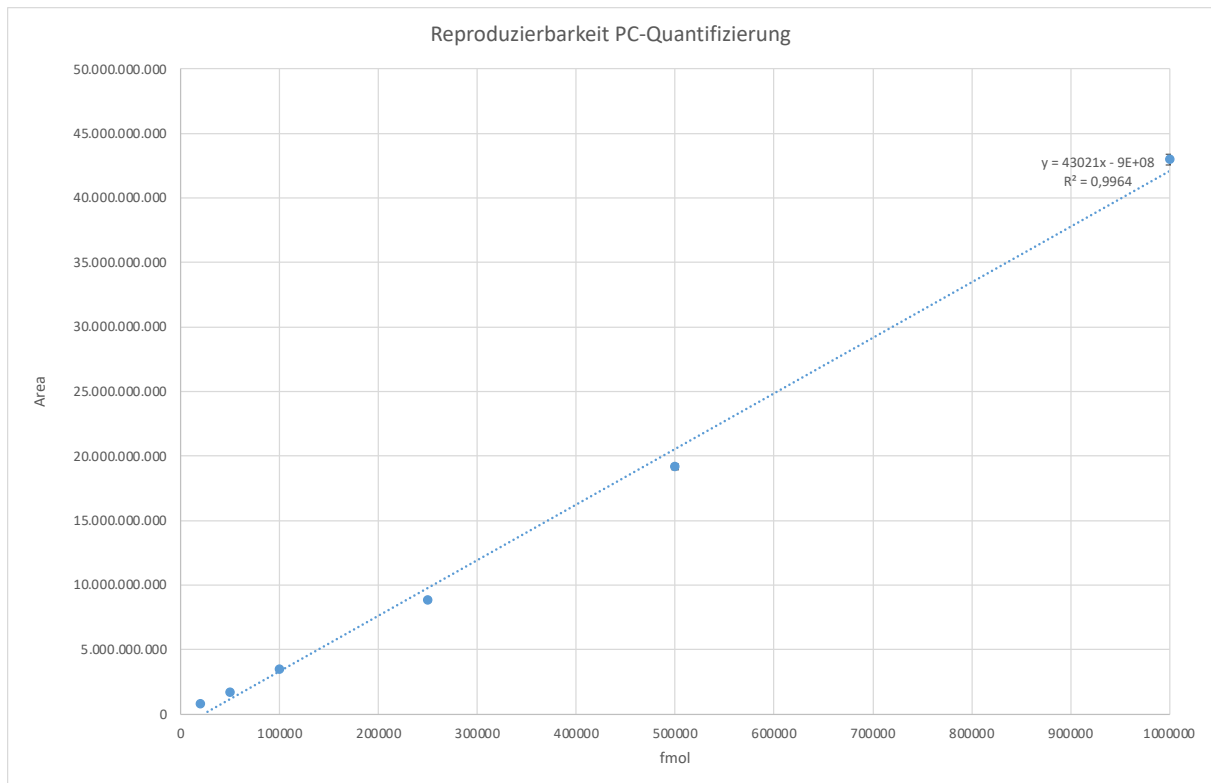


Abbildung 47 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Phosphocholin

Ergebnisse

Dimethylaminoethanol

Die Ergebnisse zeigen eine Nachweisgrenze von 1,25 fmol und eine sichere Quantifizierbarkeit ab 500 fmol. Der lineare Bereich erstreckt sich von 250 fmol bis 20 pmol.

Tabelle 27 Standardabweichungen für die Injektionen jeder Verdünnungsreihe von Dimethylaminoethanol

fmol	Inj 1	Inj 2	Inj 3	MW	Stdabw.	RSD	
100							
250	1.105.853.750	1.065.044.500	937.935.188	1.036.277.813	71506655,13	6,90	
500	1.296.461.250	1.390.432.875	1.350.008.500	1.345.634.208	38488244,07	2,86	
1000	1.657.046.250	1.682.081.500	1.830.561.875	1.723.229.875	76580282,94	4,44	
5000	5.377.924.500	5.655.500.500	5.490.535.500	5.507.986.833	113989826,2	2,07	
10000	10.154.849.000	9.349.814.000	10.499.742.000	10.001.468.333	481821421,3	4,82	
20000	18.108.326.000	16.852.188.000	18.380.990.000	17.780.501.333	665788078,3	3,74	
50000							
100000							
							4,14 MW RSD

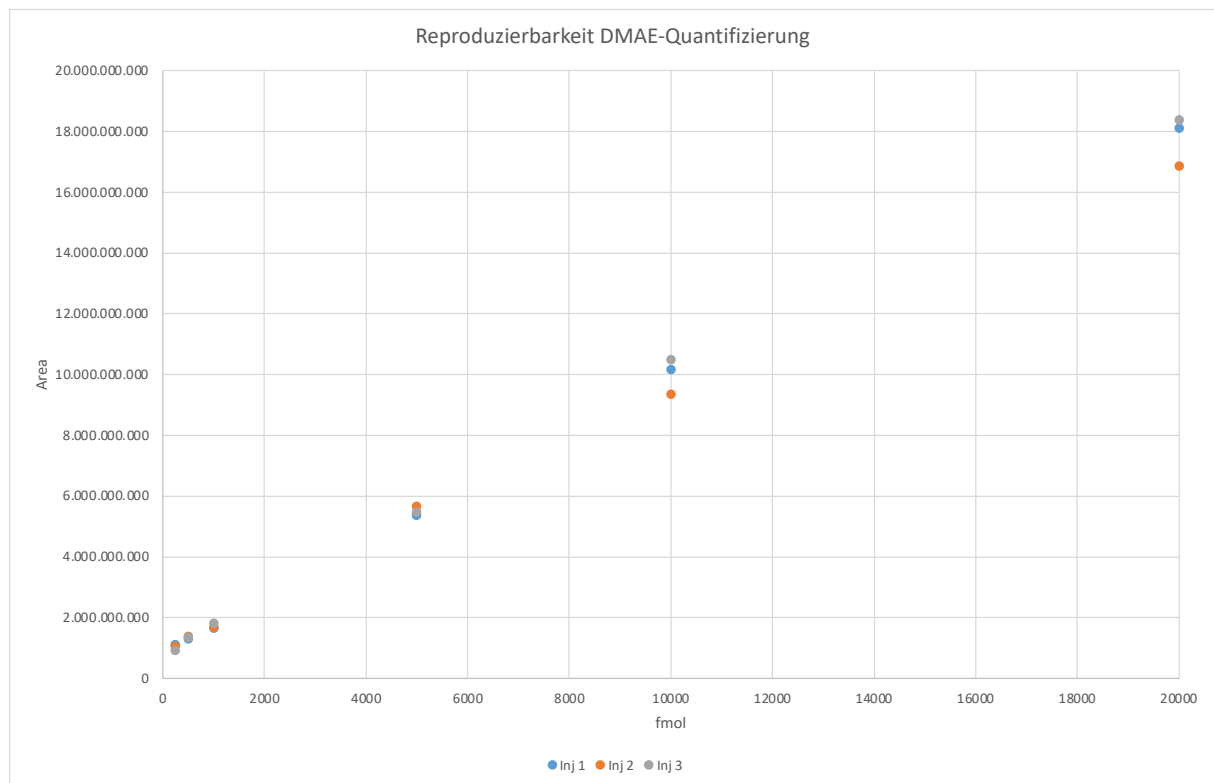


Abbildung 48 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von Dimethylaminoethanol

Ergebnisse

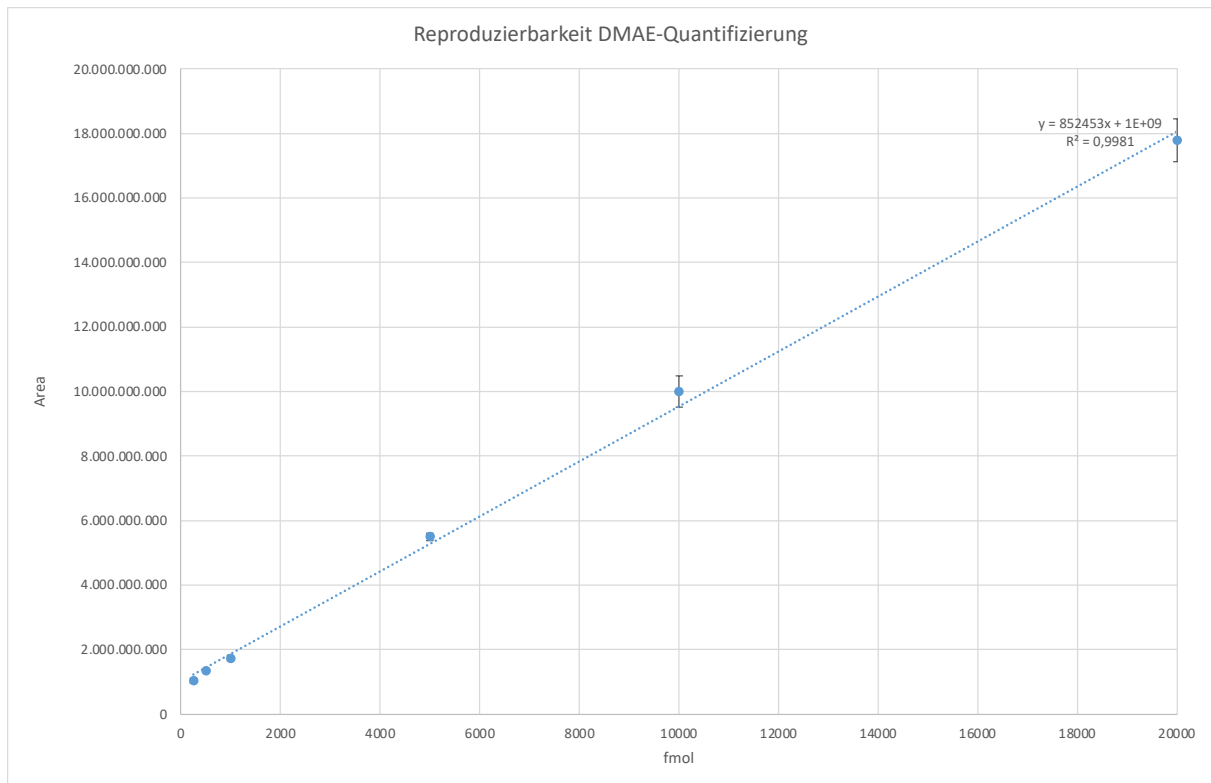


Abbildung 49 Linearer Bereich für die Quantifizierung von Dimethylaminoethanol

Ergebnisse

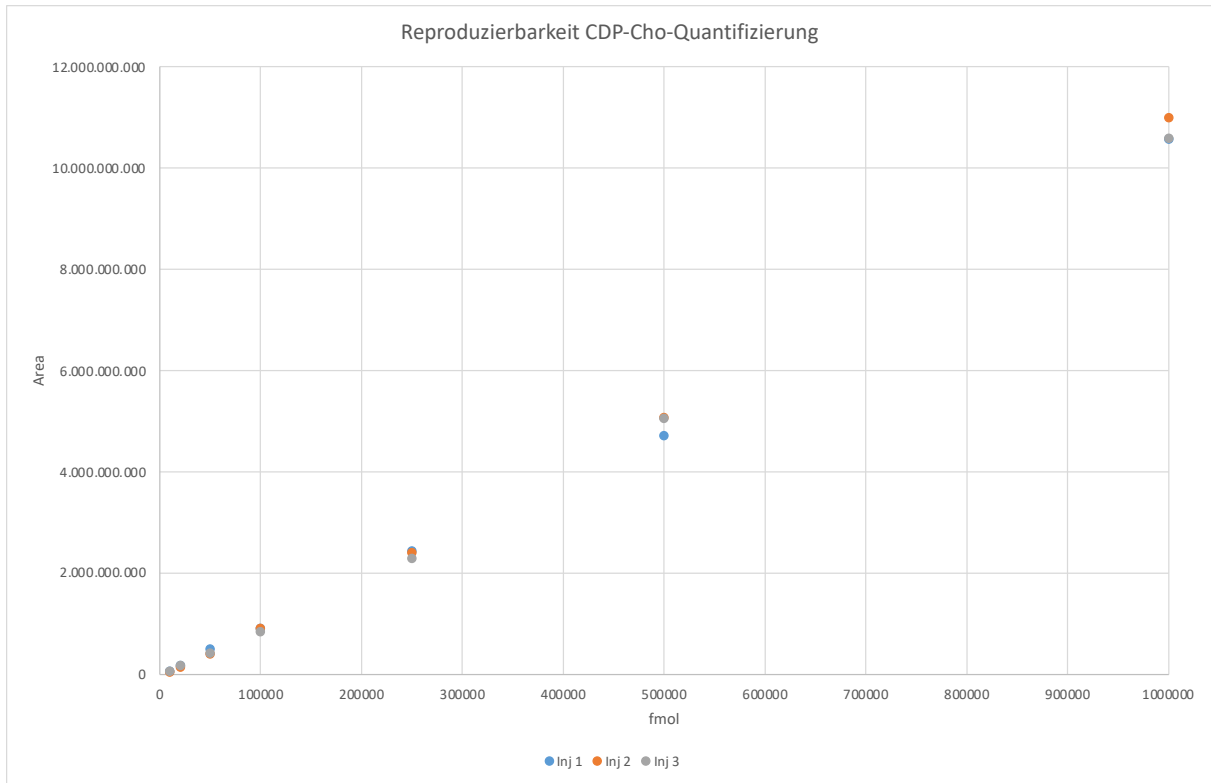


Abbildung 50 Reproduzierbarkeit bei Mehrfachinjektion von CDP-Cholin

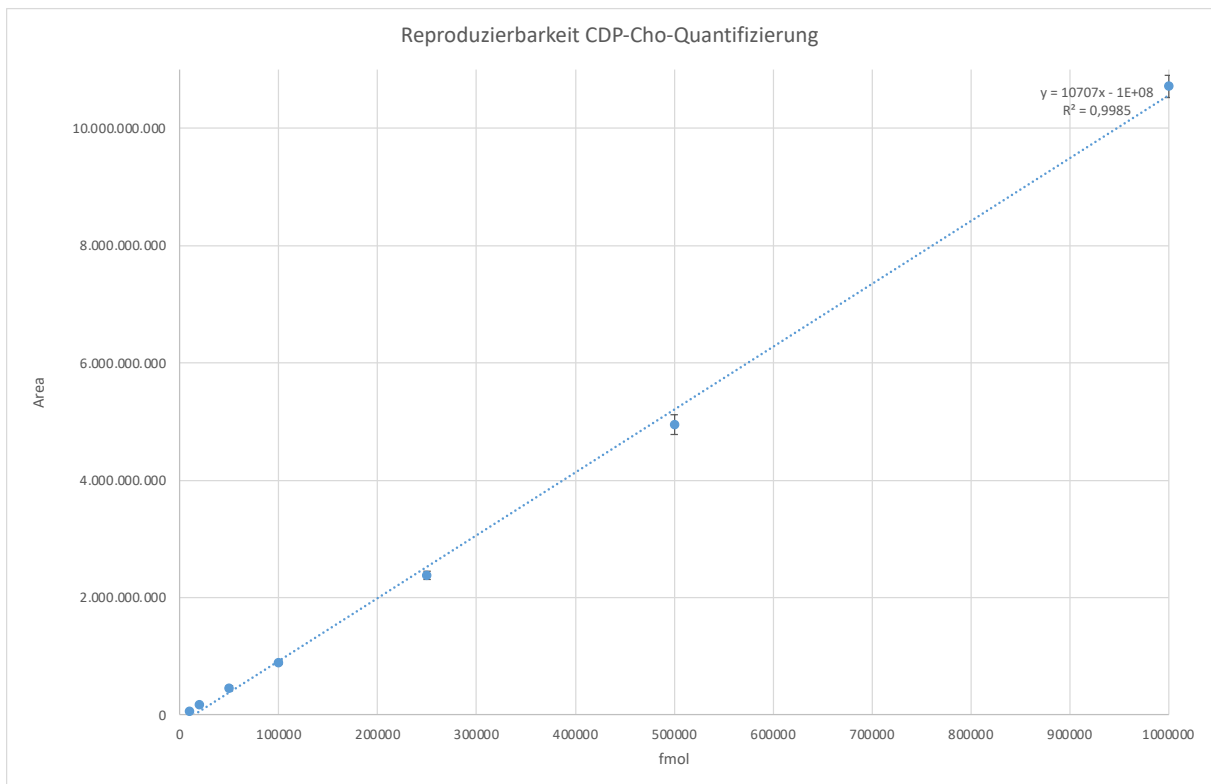


Abbildung 51 Linearer Bereich für die Quantifizierung von CDP Cholin

Zusammenfassung der Ergebnisse:*Tabelle 29 Zusammenfassung der Ergebnisse*

	LOD	Linearität	RSD mittel	[%]
Cholin	100 fmol	250 fmol - 100 pmol	4.81	
Acetylcholin	20 fmol	100 fmol - 100 pmol	3.60	
Butyrylcholin	100 fmol	100 fmol - 50 pmol	7.61	
Dimethylaminoethanol	1.25 fmol	250 fmol - 20 pmol	4.55	
CDP-Cholin	10 pmol	20 pmol - 1 nmol	3.50	
Glycero-Phosphocholin	1.25 fmol	5 pmol - 1 nmol	3.33	
Phosphocholin	10 pmol	20 pmol - 1 nmol	8.69	

Die hier etablierte flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Cholin und ihrer Metabolite stellt damit eine robuste Methode dar, die breite linearen Bereiche und niedrige Nachweisgrenzen (LOD) für die verschiedenen Metabolite aufweist. Die Daten zeigen insbesondere für Dimethylaminoethanol eine niedrige Nachweisgrenze von 1,25fmol und eine hohe Empfindlichkeit. Cholin und Butyrylcholin weisen mit einer LOD von 100fmol eine etwas geringere, jedoch für biologische Systeme ausreichende Sensitivität auf. Acetylcholin zeigt eine LOD von 20 fmol eine höhere Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zu Cholin, was für Studien zur cholinergen Neurotransmission von Vorteil sein könnte. Glycerophosphocholin und CDP Cholin decken einen breiten linearen Bereich für die Quantifizierung bis 1nmol ab.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine innovative Methode entwickelt um Cholin und seine Metabolite mittels flüssigkeitschromatographischer Massenspektrometrie quantitativ zu bestimmen.

Auswahl der Analyte

Die Auswahl von Cholin und seiner Derivate beruht auf mehreren Überlegungen. Zum einen sollte die Methode die umfassende Analyse des Cholinstoffwechsels und seiner vielfältigen Funktionen ermöglichen. Die Analyse kann wertvollen Einblick in physiologische Prozesse, Krankheitsmechanismen liefern. Daraus können therapeutische Interventionen resultieren. Die vielseitigen Funktionen beziehen sich unter anderem auf die Neurotransmission. Die Verfügbarkeit von Cholin ist entscheidend für die Acetylcholinsynthese und der somit verbundenen synaptischen Übertragung im zentralen und peripheren Nervensystem. Insbesondere spielen PC- modifizierte Proteine eine wichtige Rolle im Bereich der Immunantwort und der Pathogenese verschiedener Infektionskrankheiten. Aber auch als Membranbestandteil oder Methylgruppendonator sind Choline essenziell.

Diese Vielseitigkeit zeigt die Informationsvielfalt der gewählten Analyte wieder. Das Verständnis des Cholinstoffwechsels bedarf daher sensitiver und robuster Methoden. Durch die ausgewählten Metabolite sollte zudem eine umfassende Analyse des Cholinmetabolismus ermöglicht werden. Die Methode sollte es auch erlauben, zusätzliche Cholinmetabolite in die Analyse einzubeziehen: Betain, welches auch einen wichtigen Methylgruppendonator darstellt. Sphingomyelin als wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen oder Lysophosphatidylcholin als Abbauprodukt von PC und wichtiges Signalmolekül.

Auswahl der LC-MS Methode

Die Auswahl der Methode beruht auf einer hohen Empfindlichkeit und der Möglichkeit Cholin und seine Metabolite in sehr geringer Konzentration nachzuweisen. Die Methode weist eine hohe Sensitivität und Selektivität auf. Im Rahmen der Untersuchung kann eine simultane Analyse gewährt werden.

Die Vorteile der gewählten LC- MS liegen zum einen in der analytischen Leistungsfähigkeit. Die chromatographische Trennung und die massenspektrometrische Detektion ermöglichen eine gute Sensitivität und Selektivität. Auch lässt sich diese Methode durch Anpassung unterschiedlicher Parameter optimieren. Dazu gehören unter anderen Säulentyp, mobile Phase und Flussrate. Durch eine einfache Probenvorbereitung ist die Gesamtdauer der Analyse verkürzt und potentielle Fehlerquellen minimiert.

Alternative Methoden und ihre Limitation:

Gaschromatographie- Massenspektrometrie

Die Gasphasenchromatographie ist eine etablierte Technik, welche eine gute Reproduzierbarkeit und hohe Trennleistung ermöglicht. Sie zeigt eine gut etablierte MS-Bibliothek, welche die Identifikation unbekannter Verbindungen erleichtert. Aufgrund der erforderlichen Derivatisierung der polaren Cholinverbindungen, wären jedoch zusätzliche Vorbereitungsschritte notwendig. Dies würde zu potentiellen Fehlerquellen führen. Cholin und einiger seiner Metabolite weisen eine thermische Instabilität auf, was zu einer Zersetzung und somit fehlgeschlagener Analyse führen kann. Somit wären der Zeitaufwand und das Risiko von Artefakten zu groß. Auch ist die Gaschromatographie nicht sehr vielversprechend zur Analyse von Cholin und seiner Metabolite, da diese aufgrund der Ladungen nicht verdampfbar sind.

Kapillarelektrophorese- Massenspektrometrie

Die Kapillarelektrophorese ist ein Trennverfahren, das die Analyte basierend auf ihrem Ladungs-Größen Verhältnis in einem elektrischen Feld trennt [79]. Insgesamt ist diese Methode sehr leistungsfähige Methode, jedoch sprechen unterschiedliche Punkte gegen seine Anwendung. Cholin und seine Derivate sind zwar geladen und hydrophil jedoch ähneln sich die die Strukturen sind sich stark. Die Trennung der Substanzen wäre daher schwierig. Trotz permanenter Ladung können Salze und Pufferbestandteile aus der Kappilarelektrophorese die Signale zu stark unterdrücken.

HPLC mit UV- oder Fluoreszenz Detektion

Diese Methode findet durch seine leichte Handhabung und geringeren Kosten oft Anwendung in der Analytik. Jedoch ist die Selektivität und Sensitivität deutlich vermindert. Cholin und seiner Metabolite können meist nicht ohne Derivatisierung analysiert werden. Dies verkompliziert die Analyse diese Analyten.

Mit der stetigen Weiterentwicklung der Massenspektrometrie- Technologie bieten sich natürlich auch neue und noch präzisere Möglichkeiten zur Analyse von Cholin und seiner Metabolite. Die High- Resolution Mass Spectrometry könnte noch präzisere Bestimmungen der Molekulargewichte ermöglichen und die Differenzierung einzelner Metabolite erleichtern. In der Ion Mobility Spectrometry können Moleküle aufgrund ihrer Form und Größe differenziert werden.

Massenspektrometrie: SIR und TIC im Vergleich

Wie bereits in der Auswertung aufgezeigt werden beim SIR gezielt m/z Werte ausgewählt und überwacht. Es wird somit nicht der gesamte Ionenstrom überwacht, sondern ein ausgewähltes Ion wie zum Beispiel Cholin bei einer m/z 104. Die Vorteile bestehen in einer hohen Empfindlichkeit, einer verbesserten Selektivität und Quantifizierung. Der Informationsgehalt, welcher jedoch erfasst wird umfasst nicht das gesamte Ionenspektrum und ist somit nicht für einen umfassenden Überblick geeignet. Außerdem bedarf es vorheriger Kenntnisse der Zielionen, was eine Identifikation von komplexen Proben und unbekanntem Ionen eher einen Nachteil darstellt.

Die TIC zeichnet alle Ionen im Spektrum über die Zeit auf. Somit ist hier eher ein Gesamtüberblick möglich. Die umfassende Datenerfassung ermöglicht die Detektion unbekannter Substanzen. Jedoch ist die Empfindlichkeit einzelner Ionen und somit auch ihre Detektierbarkeit nur begrenzt möglich.

In unseren Untersuchungen zeigten sich unterschiedlich breite Signale vor allem bei der Messung des Phosphocholins. Die Breite des Signals kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen kann die Breite des Signals durch eine unzureichende Fokussierung in der Chromatographiesäule bzw. durch Bildung von Metallionenaddukten kommen.

Massenspektrometrie im Vergleich zu enzymatischen Methoden zur Quantifizierung von Cholin und seiner Derivate

Zur Analyse von Cholin und seiner Metabolite gibt es neben der instrumentellen Analytik mittels Massenspektrometrie in Kopplung mit Flüssigkeitschromatographie auch enzymatische Methoden auf Basis von Cholinoxidase- Reaktionen.

Die enzymatische Reaktion basiert auf der Oxidation von Cholin oder seiner Analyte. Dabei wird Wasserstoffperoxid und ein Betain Aldehyd gebildet. Das Wasserstoffperoxid wird dann unter Verwendung einer Peroxidase und einem geeigneten Chromogen wie 4 Aminoantipyrin zu einem farbigen Produkt umgesetzt. Die Quantifizierung beruht somit auf einer photometrischen Methode [80].

Es wird zwischen zwei verschiedenen Ansätzen unterschieden:

1. Enzymreaktionen ohne Derivatisierung:

Diese einfache und schnelle Methode beruht auf dem Nachweis von Wasserstoffperoxid. Die Methode ist zwar schnell, jedoch stark störanfällig und zu ungenau für die genaue Bestimmung von Cholin und insbesondere seiner Derivate [81].

2. Enzymreaktionen mit Derivatisierung:

Durch die Kopplung der Reaktion mit einem farb- oder floreszenzbildenden Derivatisierungsreagenz wird die Nachweißempfindlichkeit deutlich gesteigert. Jedoch ist die Probenvorbereitung komplexer [82]. Die hier angewandte LC- ESI MS Methode bietet Vorteile hinsichtlich ihrer hohen Empfindlichkeit und Selektivität.

Insbesondere im Kontext einer simultanen Bestimmung von strukturell ähnlichen Metaboliten wie Acetylcholin, Butyrylcholin, Glycerophosphocholin und CDP-Cholin stoßen enzymatische Methoden an ihre Grenzen. Die Massenspektrometrie ermöglicht eine direkte Detektion der Moleküle anhand ihres Masse- zu Ladungs- Verhältnisses (m/z).

In enzymatischen Systemen ist eine interne Kontrolle nur schwer umzusetzen, da isotoopenmarkierte Substrate keine unterschiedlichen Absorptions- oder Fluoreszenzeigenschaften aufweisen.

Methodische Aspekte und deren Validierung

Wahl der stationären Phase:

Die Silicasäule [47, 83] bestehen aus Siliciumdioxid (SiO_2). Der Vorteil besteht darin, dass eine hohe Trennleistung in Bezug auf unpolare und leicht polare Verbindungen erzielt werden kann. Die Stabilität und das Retentionsverhalten sind als gut zu bewerten. Die Silicasäule findet einen vielseitigen Einsatz bei der Analyse von organischen Verbindungen, Umwelt-, und Pharmauntersuchungen. Aufgrund der chemischen Struktur bedarf es jedoch einer etwas basischen mobilen Phase, um den pH- Wert zu stabilisieren und die Hydrolyse der Silikatoberfläche zu verhindern [84].

Diolsäulen [85] gehören zu den polar- modifizierten Silikat- Säulen. Diese sind mit einer Diol- Gruppe (CH_2OH) auf der Oberfläche der Silica – Matrix modifiziert. Diolsäulen weisen eine hohe Polarität auf und somit wird die Trennung von Verbindungen ermöglicht, welche unpolare und polare Eigenschaften besitzen. Auch eignen sie sich gut für hydrophile polare Moleküle, welche häufig bei der Trennung von Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren bestehen. Durch die starke Wechselwirkung der Diol- Gruppe mit polaren Analyten ergibt sich eine verbesserte Trennleistung. Die Stabilität, welche jedoch bei der Silicasäule als gut zu bewerten ist, zeigt sich bei der Diol- Säule eher gering. Cholin und seine Metabolite stellen stark polare Analyte dar und sind zudem noch ionisch geladen bzw. liegen als Zwitterion vor. Es bedarf spezifische Wechselwirkung um eine gute Trennung zu garantieren.

Ein weiterer Punkt für die Säulenauswahl spielt der Innendurchmesser der Säule. Der Innendurchmesser beeinflusst die Trennleistung, den Durchfluss und die Druckverhältnisse während der Analyse. Ein kleinerer Durchmesser führt zu einer höheren Säulenwirkung, da die Proben durch einen engeren Bereich geführt werden. Die Peaks werden schärfer und zeigen eine höhere Trennauflösung. Jedoch ist der Druckaufbau bei kleinem Durchmesser höher, was zu einer Belastung der Pumpe führt. Somit eignen sich kleine Säulen bei kleinen Probenmengen oder Schnelltrennungen. Ein größerer Innendurchmesser bietet eine höhere Kapazität für die Proben. Dies führt zu breiteren Peaks und geringerer Trennauflösung. Somit ist die Wahl einer HPLC- Säule von unterschiedlichen Faktoren abhängig.

Die Entscheidung für eine Silica-basierte Säule beruht auf deren Fähigkeit, polare und zwitterionische Verbindungen effizient zu trennen. Die Auswahl der HPLC- Säule ist

Diskussion

entscheidend für eine effiziente Trennung. Die Wahl der Säule hängt von spezifischen Eigenschaften der zu analysierenden Verbindungen ab. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass eine Silica Säule sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der wichtigsten Cholin-Metabolite liefert [47, 52]. Im Rahmen weiterer Studien wurden auch vermehrt Umkehrphasen-HPLC Säulen verwendet. Hier ist die stationäre Phase unpolar oder hydrophob. Typischerweise bestehen diese Säulen aus Kieselgel, dessen Oberfläche dann aber mit unpolaren Gruppen wie C18(Octadecyl), C8 (Octyl) oder Phenyl modifiziert wurde [48-50]. Cholin und seine Derivate sind jedoch meist geladen, d.h. sie würden auf einer unpolaren Säule kaum retardieren.

Im Rahmen der Untersuchung zeigte sich, dass die hier ausgewählte Säule methodisch und analytisch sehr gut geeignet war. Es konnten für viele Analyte scharfe Peaks dargestellt werden und gute Trennungen der einzelnen Analyte erreicht werden. Durch die spezifischen Eigenschaften der Silica Säule konnten zudem reproduzierbare Retentionszeiten erzielt werden.

Optimierung der mobilen Phase

Im Rahmen der Arbeit ist die Optimierung der mobilen Phase ein zentraler Bestandteil. Da Cholin und seine Metabolite polar und zum Teil zwitterionische Charaktere aufweisen stellt die chromatographische Trennung und der massenspektrometrische Nachweis eine Herausforderung dar. Die Wahl des Laufmittels beeinflusst die Peakform, Retentionszeit und chemische Stabilität der ausgewählten Analyte.

Die stark sauren Laufmittel mit Trifluoressigsäure und Ameisensäure zeigten eher unzureichende Ergebnisse, insbesondere bei Acetylcholin und DMAE. Ameisensäure führte eher zu breiten Peaks. Einige Analyte waren in der Lösung instabil, was vermutlich durch spontane Hydrolyse zum Rückgang der Peakintensität führte.

Ammoniumformiat und Wasser zeigten die besten Trennergebnisse. Der leicht saure pH-Wert ermöglicht eine chemische Stabilität und gute Ergebnisse. Die Ionensuppression ist vermindert und die Peakform optimiert.

Validierung der Methode

Die analytische Empfindlichkeit der Methode wurde anhand der unteren Nachweisgrenze (LOD) und unteren Bestimmungsgrenze evaluiert. Die ermittelten Werte liegen im nanomolaren Bereich, was die hohe Sensitivität der Methode unterstreicht. Konkret können für Cholin und Acetylcholin LOD-Werte von etwa 20 fmol erreicht werden, während Glycerophosphocholin sogar bei 1,25 fmol liegt.

Es wurden Untersuchungen mit Verdünnungsreihen durchgeführt, um den linearen Quantifizierungsbereich zu bestimmen. Der lineare Bereich erstreckt sich jeweils über mehrere Größenordnungen, was eine zuverlässige Quantifizierung in einem weiten Konzentrationsbereich erlaubt. Insbesondere für sehr niedrig konzentrierte Proben ist dies sehr wichtig.

Die relative Standardabweichung (RSD) betrug in den meisten Fällen weniger als 8%. Somit ist eine gute Reproduzierbarkeit der Methode über längere Zeiträume gegeben.

Die Grenze der Sensitivität ist eine Herausforderung für Cholin und seine Metabolite. Auch wenn die Sensitivität der Methode hier sehr hoch ist, kann es insbesondere bei noch geringeren Konzentrationen limitierend sein. Um die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit zu verbessern könnte der Einsatz von isopenmarkierten Derivaten helfen.

Analytische Leistungsparameter im Vergleich mit etablierten Methoden

Zur Untersuchung von Cholin und seiner Metabolite wurden unterschiedliche Methoden entwickelt. Cholin, Betain und Dimethylglycin konnten im Plasma durch die Anwendung einer Normalphasen-Chromatographie- Tandem- Massenspektrometrie Methode bestimmt werden. *Holms. et. al.* zeigen zwar eine gute Methoden auf, jedoch ist diese nur für bestimmte Analyte anwendbar. Auch der Einsatz von radioaktiven Markern wie sie von *Shao X. et al.* zeigt eine Limitation. Die bereits etablierten Methoden wurden miteinander verglichen.

Im Vergleich zu herkömmlichen Methoden zur Quantifizierung von Cholin und seiner Metabolite zeigt die vorgestellte Methode Vorteile in Bezug auf Empfindlichkeit, linearen Bereich und Präzision. Die Methode von Holm et al.[47] zeigt eine Linearität von 0,4-400 $\mu\text{mol/L}$ mit einer Nachweisgrenze von $<300\mu\text{mol/L}$. Andere Studien liefern wertvolle Beiträge bei spezifischen Anwendungen und Methodenentwicklung, jedoch ohne umfassende analytische Parameter (LOD, RSD oder Linearität) [48-53, 86]. Die niedrigen LOD-Werte ermöglichen die Detektion sogar sehr geringfügiger Konzentrationen an Analyten, was im Fall von pathophysiologischen minimalen Veränderungen im Cholin-Stoffwechsel von Bedeutung sein kann.

Limitationen der Methode

Obwohl die Arbeit gute Ergebnisse liefert, bestehen Verbesserungsmöglichkeiten.

Die verwendete Methode basiert auf Stammlösungen von Reinsubstanzen, die eine reproduzierbare und standardisierte Grundlage bietet. Der Einfluss von biologischen Proben, kann jedoch zu unerwünschten Interferenzen führen und zusätzliche Probenvorbereitungsschritte benötigen. In biologischen Proben können verschiedene Bestandteile wie Salze, Proteine und andere Metabolite die Ionisierung der Zielverbindung negativ beeinflussen. Dies kann die Ionisation der Analyten beeinflussen und erschwert die Quantifizierung oder Reproduzierbarkeit der Analysen. Biologische Proben sind komplex und erfordern umfangreiche Vorbereitungsschritte wie Extraktion, Reinigung und Fällung. Diese Schritte können jedoch zu einem Verlust des darin enthaltenen Analyten führen und daher zu Fehlern in der Quantifizierung.

Ein Weiterer Punkt ist die mögliche Fragmentierung der Analyten und der zwitterionische Charakter vieler Cholinmetabolite. Zwitterionen sind durch eine positive und negative Ladung gekennzeichnet. Des Weiteren können Analyte wie Phosphocholin und CDP-Cholin während der Ionisation fragmentieren, was die Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Quantifizierung negativ beeinflussen kann.

Trotz der hohen Empfindlichkeit ist die Nachweisgrenze limitiert. Speziell im Bereich der Anwendung mit biologischen Proben und den damit verbunden niedrigen Konzentrationen könnte die Methode evtl. hier nicht genügend Sensitivität bieten.

Die Entwicklung einer flüssigkeitschromatographisch massenspektrometrischen Methode erfordert teures und spezielles Gerät und umfangreiche Probenvorbereitung. Die Anschaffung und Betriebskosten können die Kosten erheblich erhöhen. In einer ressourcenbegrenzten Umgebung könnte dies den Einsatz erschweren.

Somit zeigen sich daher mehrere Herausforderungen für die Weiterentwicklung der Methodik und Nutzung.

Zukunftsperspektiven

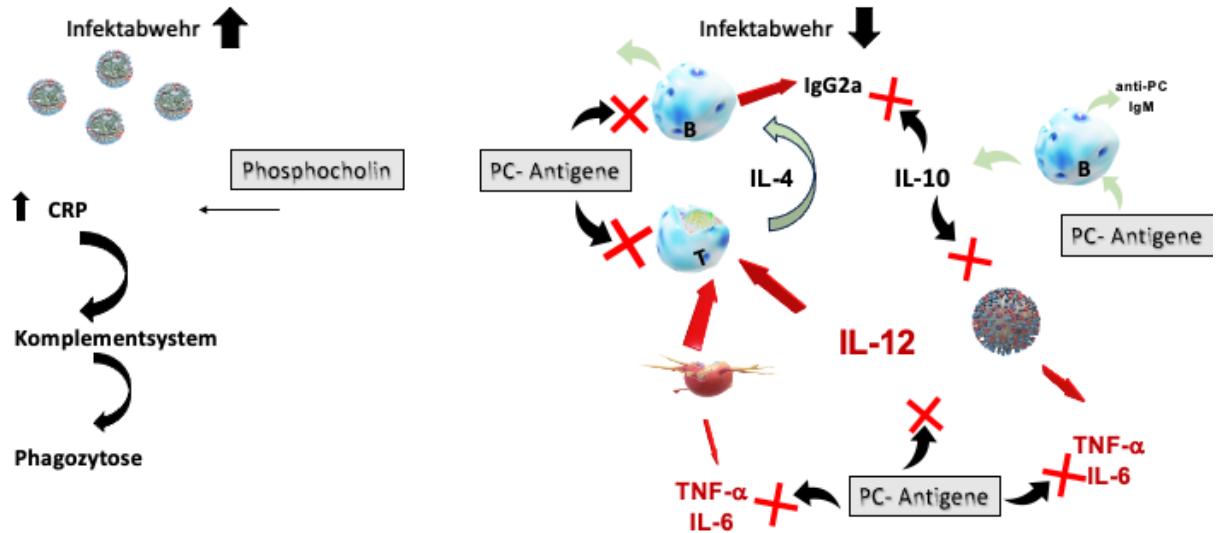


Abbildung 52 Modulation durch PC- Antigene modifiziert nach [87] Goodbridge et al.

Cholin und Cholinmetabolite spielen eine zentrale Rolle für die Immunmodulation[87] bei parasitären Erkrankungen. Die Abbildung stellt eine umfassende Übersicht über die Immunabwehr auf Pathogene dar. Phosphocholin hat zwei unterschiedliche Funktionen. Es kann zum einen die wirtseigene Abwehr unterstützen, indem das C-reaktive Protein daran bindet und damit das Komplementsystem aktiviert wird.

Parasitäre Nematoden können das Immunsystem des Wirts aber auch beeinflussen. Dies kann dazu führen, dass Infektionen persistieren und eine effektive Immunantwort durch den Wirt unterdrückt wird. PC- substituierte Antigene interagieren mit Immunzellen wie B- und T-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen. Somit können entzündungshemmende Signale verstärkt und entzündungsfördernde Signale geschwächt werden[1, 36]. Die Abbildung zeigt, dass PC- haltige Antigene entzündungsfördernde Zytokine wie TNF- α und Interleukin 6 bewirken und gleichzeitig die Freisetzung von Interleukin 10 fördern, einem Schlüsselenzym mit antiinflammatorischen Eigenschaften[88, 89]. Die genaue Detektion und Quantifizierung

Diskussion

von Cholin und seiner Metabolite mittels HPLC-ESI-MS ist entscheidend zur Identifikation dieser immunmodulatorischen Moleküle und der Aufklärung der damit verbundenen Funktion.

Langfristig könnte die Methode auch für die Entwicklung neuer synthetischer PC-analoger Therapeutika/Biomarker-basierter- Diagnoseverfahren eingesetzt werden. Zudem könnte die Methode helfen, Veränderungen im Cholinstoffwechsel zu untersuchen und als Grundlage für individualisierte Therapieansätze zu dienen. Hier sollte insbesondere die Anwendung von komplexeren Proben nochmals genauer quantifiziert werden, damit aus Plasma, Serum oder Gewebe genauere Konzentrationsverläufe und Pathologien detektiert werden können.

Der cholinerge Signalweg hat insbesondere eine wichtige Funktion in der neuronalen Informationsbearbeitung. Acetylcholin als Neurotransmitter spielt sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem eine wichtige Rolle. Im Bereich des kortikalen Netzwerks spielt es eine Rolle im Bereich der Aufmerksamkeit und des Gedächtnisses. Die Fähigkeit Cholin, DMAE, Acetylcholin oder Abbauprodukte zu quantifizieren bietet die Möglichkeit auch intrakortikale Vorgänge genauer zu verstehen. Im Bereich der Neurowissenschaft kann durch die Quantifizierung cholinerg Metabolite neuromodulatorische Zustände genauer verstanden werden. Ein fluktuierender Acetylcholinspiegel korreliert im präfrontalen Kortex mit der Fokussierung und Aufmerksamkeit [90]. Eine Erfassung des genauen Acetylcholinspiegels liefert somit die Grundlage für die Interpretation kortikaler Aktivitätsmuster. Auch im Bereich der Pathophysiologie spielen cholinerge Metabolite und ihre genaue Quantifizierung eine wichtige Rolle. Veränderungen der Konzentration wurden bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer- Demenz beobachtet. Die exakte Analyse könnte zu einem besseren Verständnis führen.

Phosphocholin und CDP- Cholin haben eine wichtige Funktion im Bereich der Membranbiosynthese. Beide dienen als Marker für zelluläre Proliferation und Umbauprozesse in der Membran.

Dies ist insbesondere wichtig für die Onkologie. Tumorzellen weisen oft eine gesteigerte Membranbiosynthese auf. Tumore sind durch eine hohe Teilungsrate gekennzeichnet. Somit kann es zu einer Überexpression der Cholinmetabolite kommen. Insbesondere konnte dies bereits bei Brust-, Prostata und Lungenkarzinomen nachgewiesen werden [91, 92]. Der gesteigerte Zellumsatz geht somit auch mit einer dysregulierten Aktivität verschiedener

Diskussion

Cholinmetabolite einher. Die Bestimmung dieser Metabolite könnte somit wichtige diagnostische Zukunftsperspektiven eröffnen. Somit wäre es möglich die Tumorprogression darzustellen. Zusammenfassend eröffnet die Quantifizierung ein tieferes Verständnis in der Tumorbiologie und kann auch zur weiteren Diagnostik und Therapieentwicklung angewendet werden.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Etablierung einer HPLC-ESI- MS Methode zur Quantifizierung von Cholin und seinen Metabolite.

Es wurde eine geeignete stationäre Phase ausgewählt in Kombination mit einer angepassten mobilen Phase. Diese ermöglichen eine effiziente Trennung der Analyte und eine empfindliche Detektion.

Nach Methodenetablierung und Optimierung wurde die Methode validiert, um die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der quantitativen Bestimmungen zu überprüfen. Die Validierungsdaten zeigen eine hohe Präzision und Sensitivität. Die Standardabweichung lag für alle Analyte unter 8 %. Die Wiederholbarkeit ist somit gegeben. Der Regressionskoeffizient über 0,99 zeigt eine hohe Linearität und damit die analytische Verlässlichkeit.

Die Möglichkeit verschiedenste Cholinmetabolite nachzuweisen und zu quantifizieren, macht diese Methode zu einem vielversprechenden Werkzeug für die Analyse von PC-modifizierten parasitären Antigenen, die eine wichtige Rolle bei der Persistenz von verschiedensten Pathogen spielen. Dies sollte die Aufklärung der Biosynthese diese Antigene deutlich vereinfachen. Weitere Perspektiven liegen darin, den Cholinstoffwechsel in Bezug auf Lebererkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und anderen relevanten Krankheiten weiter aufzuklären. Auch sollte eine Weiterentwicklung der Methode erwogen werden, um eine noch bessere Sensitivität und Spezifität insbesondere in biologischen Proben zu erreichen. Die Anwendung im Bereich der Lebensmittelchemie könnte neue Erkenntnisse über die Rolle von Cholin und seinen Metaboliten in verschiedenen Systemen liefern. Eine Analyse ermöglicht es cholinreiche Nahrung zu eruieren und somit Prozesssysteme, Verdauungsmodelle und metabolische Wirkungssysteme im Menschen besser nachzuvollziehen.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit eine zuverlässige Methode zur Quantifizierung von Cholin und seiner Metabolite. Sie könnte eine Grundlage für künftige Forschungsvorhaben im Bereich der Untersuchung des Cholinstoffwechsels und seiner vielfältigen Bedeutung im Bereich physiologischer und pathologischer Veränderungen dienen.

Summary

This work deals with the development and establishment of an HPLC-ESI-MS method for the quantification of choline and its metabolites.

Initially, the challenges in mass spectrometric analysis are presented. In the methodological part, a suitable stationary phase was selected and a mobile phase was optimized for the separation, identification, and quantification of the analytes. After method establishment and optimization, the method was validated to ensure the reliability and accuracy of the quantitative determinations.

The results show that the method is reproducible and has a high sensitivity for the detection of the analytes. The standard deviation was below 8% for all analytes, and the regression coefficient was above 0.99.

The ability to detect and quantify a wide variety of choline metabolites makes this method an important tool for the analysis of PC-modified parasitic antigens, which play an important role in the persistence of a wide variety of pathogens. This should significantly simplify the elucidation of the biosynthesis of these antigens. Further perspectives lie in identifying choline metabolism in relation to liver diseases, neurodegenerative diseases, and other relevant diseases. Further development of the method should also be considered in order to achieve even better sensitivity and specificity, especially in biological materials. The application in the field of food chemistry could provide new insights into the role of choline and its metabolites in various systems.

In summary, this work provides a reliable method for the quantification of choline and its metabolites. It could serve as a basis for future research projects in the field of choline metabolism and its diverse significance in the area of physiological and pathological aspects.

6. Literatur

1. Lochnit, G., R.D. Dennis, and R. Geyer, *Phosphorylcholine substituents in nematodes: structures, occurrence and biological implications*. Biol Chem, 2000. **381**(9-10): p. 839-47.
 2. Lottspeich, F., *Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins*. Angew Chem Int Ed Engl, 1999. **38**(17): p. 2476-2492.
 3. Thiede, B., et al., *Peptide mass fingerprinting*. Methods, 2005. **35**(3): p. 237-247.
 4. Clark, R.S., H. Bayir, and L.W. Jenkins, *Posttranslational protein modifications*. Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S407-9.
 5. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 837-46.
 6. Stults, J.T. and D. Arnott, *Proteomics*. Methods Enzymol, 2005. **402**: p. 245-89.
 7. Zeisel, S.H. and K.A. da Costa, *Choline: an essential nutrient for public health*. Nutr Rev, 2009. **67**(11): p. 615-23.
 8. Wiedeman, A.M., et al., *Dietary Choline Intake: Current State of Knowledge Across the Life Cycle*. Nutrients, 2018. **10**(10).
 9. Corbin, K.D. and S.H. Zeisel, *Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. **28**(2): p. 159-65.
 10. Sam, C. and B. Bordoni, *Physiology, Acetylcholine*, in *StatPearls*. 2025, StatPearls Publishing
- Copyright © 2025, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
11. Picciotto, M.R., M.J. Higley, and Y.S. Mineur, *Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior*. Neuron, 2012. **76**(1): p. 116-29.
 12. Brown, D.A., *Acetylcholine*. British Journal of Pharmacology, 2006. **147**(S1): p. S120-S126.
 13. Macintosh, F.C., *The distribution of acetylcholine in the peripheral and the central nervous system*. J Physiol, 1941. **99**(4): p. 436-42.
 14. Rassow, J.H., Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer. (2008). *Biochemie Duale Reihe* (2. Auflage ed.): Thieme.
 15. Wessler, I. and C.J. Kirkpatrick, *Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(8): p. 1558-71.
 16. Wessler, I., et al., *Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis*. Life Sci, 2003. **72**(18-19): p. 2169-72.
 17. Kummer, W. and G. Krasteva-Christ, *Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology*. Curr Opin Pharmacol, 2014. **16**: p. 43-9.
 18. Lips, K.S., et al., *Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium*. Eur Urol, 2007. **51**(4): p. 1042-53.
 19. Coelho, A., et al., *Urinary bladder inflammation induces changes in urothelial nerve growth factor and TRPV1 channels*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(7): p. 1691-9.
 20. Andreev, A.A., B.N. Veprintsev, and C.A. Vulfius, *Two-component desensitization of nicotinic receptors induced by acetylcholine agonists in *Lymnaea stagnalis* neurones*. J Physiol, 1984. **353**: p. 375-91.
 21. Chatonnet, A. and O. Lockridge, *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*. Biochem J, 1989. **260**(3): p. 625-34.

22. Guihard, B., et al., *Effect of Rocuronium vs Succinylcholine on Endotracheal Intubation Success Rate Among Patients Undergoing Out-of-Hospital Rapid Sequence Intubation: A Randomized Clinical Trial*. *Jama*, 2019. **322**(23): p. 2303-2312.
23. Liu, J.Y., et al., *The Endogenous Metabolite Glycerophosphocholine Promotes Longevity and Fitness in *Caenorhabditis elegans**. *Metabolites*, 2022. **12**(2).
24. Lopez, C.M., et al., *Effect of a new cognition enhancer, alpha-glycerolphosphorylcholine, on scopolamine-induced amnesia and brain acetylcholine*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1991. **39**(4): p. 835-40.
25. Parnetti, L., et al., *Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re-evaluation?* *J Neurol Sci*, 2007. **257**(1-2): p. 264-9.
26. Scapicchio, P.L., *Revisiting choline alphoscerate profile: a new, perspective, role in dementia?* *Int J Neurosci*, 2013. **123**(7): p. 444-9.
27. Gallazzini, M. and M.B. Burg, *What's New About Osmotic Regulation of Glycerophosphocholine*. *Physiology*, 2009. **24**(4): p. 245-249.
28. Grabitzki, J., et al., *The PCome of *Caenorhabditis elegans* as a prototypic model system for parasitic nematodes: identification of phosphorylcholine-substituted proteins*. *Molecular and biochemical parasitology*, 2008. **161**(2): p. 101-111.
29. Lochnit, G., R. Bongaarts, and R. Geyer, *Searching new targets for anthelmintic strategies: Interference with glycosphingolipid biosynthesis and phosphorylcholine metabolism affects development of *Caenorhabditis elegans**. *Int J Parasitol*, 2005. **35**(8): p. 911-23.
30. Tomasz, A., *Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus**. *Science*, 1967. **157**(3789): p. 694-7.
31. Heise, A., W. Peters, and H. Zahner, *Phosphocholine epitopes in *Eimeria bovis**. *Exp Parasitol*, 1999. **92**(4): p. 279-82.
32. Lovell, T.M., et al., *Identification of a novel mammalian post-translational modification, phosphocholine, on placental secretory polypeptides*. *J Mol Endocrinol*, 2007. **39**(3): p. 189-98.
33. Cipollo, J.F., C.E. Costello, and C.B. Hirschberg, *The fine structure of *Caenorhabditis elegans* N-glycans*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49143-57.
34. Brundish, D.E. and J. Baddiley, **Pneumococcal* C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate*. *Biochem J*, 1968. **110**(3): p. 573-82.
35. Pang, B., et al., *Lipooligosaccharides containing phosphorylcholine delay pulmonary clearance of nontypeable *Haemophilus influenzae**. *Infect Immun*, 2008. **76**(5): p. 2037-43.
36. Grabitzki, J. and G. Lochnit, *Immunomodulation by phosphocholine--biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes*. *Mol Immunol*, 2009. **47**(2-3): p. 149-63.
37. Fisman, M., H. Mersky, and E. Helmes, *Double-blind trial of 2-dimethylaminoethanol in Alzheimer's disease*. *Am J Psychiatry*, 1981. **138**(7): p. 970-2.
38. Gagnani, A., et al., *Dimethylaminoethanol affects the viability of human cultured fibroblasts*. *Aesthetic Plast Surg*, 2007. **31**(6): p. 711-8.
39. Böckmann, K.A., et al., *Different choline supplement metabolism in adults using deuterium labelling*. *Eur J Nutr*, 2023. **62**(4): p. 1795-1807.
40. Böckmann, K.A., et al., *Choline supplementation for preterm infants: metabolism of four Deuterium-labeled choline compounds*. *Eur J Nutr*, 2023. **62**(3): p. 1195-1205.

41. Kennedy, E.P., *The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine, and related compounds*. J Biol Chem, 1956. **222**(1): p. 185-91.
42. Fioravanti, M. and M. Yanagi, *Cytidinediphosphocholine (CDP-choline) for cognitive and behavioural disturbances associated with chronic cerebral disorders in the elderly*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(2): p. Cd000269.
43. Secades, J.J. and G. Frontera, *CDP-choline: pharmacological and clinical review*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1995. **17 Suppl B**: p. 1-54.
44. Schäbitz, W.R., et al., *The effects of prolonged treatment with citicoline in temporary experimental focal ischemia*. J Neurol Sci, 1996. **138**(1-2): p. 21-5.
45. Lochnit, G., et al., *Structural elucidation and monokine-inducing activity of two biologically active zwitterionic glycosphingolipids derived from the porcine parasitic nematode *Ascaris suum**. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 466-74.
46. Friedl, C.H., et al., *Structural elucidation of zwitterionic carbohydrates derived from glycosphingolipids of the porcine parasitic nematode *Ascaris suum**. Biochem J, 2003. **369**(Pt 1): p. 89-102.
47. Holm, P.I., et al., *Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography-tandem mass spectrometry*. Clin Chem, 2003. **49**(2): p. 286-94.
48. Shao, X., et al., *Fully automated preparation of [¹¹C]choline and [¹⁸F]fluoromethylcholine using TracerLab synthesis modules and facilitated quality control using analytical HPLC*. Appl Radiat Isot, 2011. **69**(2): p. 403-9.
49. Stadler, H. and T. Nesselhut, *Simple and rapid measurement of acetylcholine and choline by HPLC and enzymatic-electrochemical detection*. Neurochem Int, 1986. **9**(1): p. 127-9.
50. Pomfret, E.A., et al., *Measurement of choline and choline metabolite concentrations using high-pressure liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry*. Anal Biochem, 1989. **180**(1): p. 85-90.
51. Klein, J., et al., *Free choline and choline metabolites in rat brain and body fluids: sensitive determination and implications for choline supply to the brain*. Neurochem Int, 1993. **22**(3): p. 293-300.
52. Stith, B.J., et al., *Quantification of major classes of *Xenopus* phospholipids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection*. J Lipid Res, 2000. **41**(9): p. 1448-54.
53. Sleight, R. and C. Kent, *Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in cultured chick embryonic muscle treated with phospholipase C*. J Biol Chem, 1980. **255**(22): p. 10644-50.
54. McEntyre, C.J., S. Slow, and M. Lever, *Measurement of plasma free choline by high performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with 1-naphthyl isocyanate*. Anal Chim Acta, 2009. **644**(1-2): p. 90-4.
55. Potter, P.E., J.L. Meek, and N.H. Neff, *Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection*. J Neurochem, 1983. **41**(1): p. 188-94.
56. Kienitz H: Einführung, i.M., Kienitz H, (Hrsg.); Verlag Chemie: Weinheim, 1968.
57. Senko, M.W. and F.W. McLafferty, *Mass spectrometry of macromolecules: has its time now come?* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1994. **23**: p. 763-85.

58. Carini, M., L. Regazzoni, and G. Aldini, *Mass spectrometric strategies and their applications for molecular mass determination of recombinant therapeutic proteins*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011. **12**(10): p. 1548-57.
59. Thomson, J.J., *LVIII. On the masses of the ions in gases at low pressures*. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1899. **48**(295): p. 547-567.
60. Kebarle, P., *A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 2000. **35**(7): p. 804-17.
61. Bruins, A.P., *Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure*. *Mass Spectrometry Reviews*, 1991. **10**(1): p. 53-77.
62. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Bioanalytik*. 1998: Spektrum, Akad. Verlag.
63. Louris, J.N., et al., *Instrumentation, applications, and energy deposition in quadrupole ion-trap tandem mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 1987. **59**(13): p. 1677-1685.
64. Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules*. *Analytical Chemistry*, 1985. **57**(14): p. 2935-2939.
65. Clark, A.E., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology*. *Clin Microbiol Rev*, 2013. **26**(3): p. 547-603.
66. Lloyd R. Snyder, J.J.K.u.J.L.G., P.H.M. Development, and N.Y. Wiley-Interscience, 2nd edition 1997.
67. Michalski, R., *Principles and Applications of Ion Chromatography*. 2016. p. 1-46.
68. Coskun, O., *Separation techniques: Chromatography*. North Clin Istanb, 2016. **3**(2): p. 156-160.
69. Senko, M.W., S.C. Beu, and F.W. McLaffertycor, *Determination of monoisotopic masses and ion populations for large biomolecules from resolved isotopic distributions*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1995. **6**(4): p. 229-33.
70. Vocke, R.D., *Atomic Weights of the Elements 1997*. Pure and Applied Chemistry, 1999. **71**(8): p. 1593-1607.
71. Audi, G. and A.H. Wapstra, *The 1995 update to the atomic mass evaluation*. *Nuclear Physics A*, 1995. **595**(4): p. 409-480.
72. Weidner, S., P. Knappe, and U. Panne, *MALDI-TOF imaging mass spectrometry of artifacts in "dried droplet" polymer samples*. *Anal Bioanal Chem*, 2011. **401**(1): p. 127-34.
73. Fenyo, D., et al., *MALDI sample preparation: the ultra thin layer method*. *J Vis Exp*, 2007(3): p. 192.
74. Schwedt, G., *Analytische Chemie*. zweite ed2008, Weinheim: WILEY-VCH Verlag. p. 405.
75. Samuelsson, J., et al., *Fundamental investigation of impact of water and TFA additions in peptide sub/supercritical fluid separations*. *J Chromatogr A*, 2024. **1732**: p. 465203.
76. Bobály, B., et al., *Characterizing various monoclonal antibodies with milder reversed phase chromatography conditions*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018. **1096**: p. 1-10.

77. Sunarić, S., et al., *Sample pretreatment and HPLC determination of antiplatelet drug ticagrelor in blood plasma from patients with acute coronary syndromes*. Biomed Chromatogr, 2023. **37**(9): p. e5663.
78. Lamy, E., et al., *High-sensitivity quantification of acetylcholine and choline in human cerebrospinal fluid with a validated LC-MS/MS method*. Talanta, 2021. **224**: p. 121881.
79. Schwenzer, A.K., et al., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for protein analyses under native conditions: Current progress and perspectives*. Proteomics, 2024. **24**(3-4): p. e2300135.
80. Loksha, S., et al., *Production of recombinant choline oxidase and its application in betaine production*. 3 Biotech, 2021. **11**(9): p. 410.
81. Fan, F. and G. Gadda, *On the catalytic mechanism of choline oxidase*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(7): p. 2067-74.
82. Rozwadowski, K.L., G.G. Khachatourians, and G. Selvaraj, *Choline oxidase, a catabolic enzyme in Arthrobacter pascens, facilitates adaptation to osmotic stress in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 472-8.
83. Dehasque, M., et al., *Development and Optimization of a Silica Column-Based Extraction Protocol for Ancient DNA*. Genes (Basel), 2022. **13**(4).
84. Staniak, M., et al., *Silica-Based Monolithic Columns as a Tool in HPLC-An Overview of Application in Analysis of Active Compounds in Biological Samples*. Molecules, 2020. **25**(14).
85. Tanaka, H., X. Zhou, and O. Masayoshi, *Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A, 2003. **987**(1-2): p. 119-25.
86. Ishidate, K., R. Matsuo, and Y. Nakazawa, *CDP-choline: 1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase from rat liver microsomes. II. Photoaffinity labeling by radioactive CDP-choline analogs*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1124**(1): p. 36-44.
87. Goodridge, H.S., et al., *Signalling mechanisms underlying subversion of the immune response by the filarial nematode secreted product ES-62*. Immunology, 2005. **115**(3): p. 296-304.
88. Houston, K.M., et al., *Presence of phosphorylcholine on a filarial nematode protein influences immunoglobulin G subclass response to the molecule by an interleukin-10-dependent mechanism*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5466-8.
89. Spiegel, A., et al., *Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and Plasmodium falciparum malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2003. **97**(2): p. 198-9.
90. Parikh, V., et al., *Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales*. Neuron, 2007. **56**(1): p. 141-54.
91. Glunde, K., Z.M. Bhujwala, and S.M. Ronen, *Choline metabolism in malignant transformation*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(12): p. 835-48.
92. Ackerstaff, E., K. Glunde, and Z.M. Bhujwala, *Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells?* J Cell Biochem, 2003. **90**(3): p. 525-33.

Danksagung

Danksagung

Mit dem nun lang ersehnten Abschluss dieser Arbeit geht ein bedeutender Abschnitt zu Ende. Ohne die Unterstützung und Geduld vieler lieber Menschen wäre dies nicht möglich gewesen. Ihnen allen gebührt mein Dank aus ganzen Herzen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Günter Lochnit. Seine außergewöhnliche Geduld, sein unermüdlicher wissenschaftlicher Rat und seine stetige Unterstützung haben mich durch diese doch so lange Zeit getragen. Sein Vertrauen in meine Fähigkeit hat mich motiviert. Für die ständige Begleitung über all die Jahre bin ich ihm mehr als dankbar.

Ebenso möchte ich meinen einzigartigen und liebenswerten Freunden danken, die mich während dieses langen Weges begleitet haben. Mit Geduld und Humor haben sie mich ermutigt, selbst wenn die Dissertation, wie bereits beide Studiengänge, Zeit, Nerven und Ausdauer erfordert haben. Ihr habt mit mir gelitten, mich unterstützt und immer wieder daran erinnert, dass auch mal ein Ende in Sicht ist. Obwohl man das bei mir kaum glauben konnte. Ohne eure unermüdliche Geduld und aufmunternden Worte wäre der Weg noch schwerer gewesen.

Mein tiefster Dank gilt zudem meinen Eltern, die mir stets mit unerschütterlichem Rückhalt zur Seite standen. Euer Vertrauen in mich und eure bedingungslose Unterstützung haben mir stetig Kraft gegeben. In allen Belangen kann ich mich auf Euch verlassen und ich bin froh zu wissen, eine verlässliche Stütze in meinem Leben zu haben.

Diese Arbeit ist auch das Produkt der Geduld, immer wieder suchender und auch wiederkehrender Motivation und das Vertrauen, dass mir von all diesen wunderbaren Menschen entgegengebracht wurde.

Vielen Dank