

**Abschlußbericht**  
**zum Forschungsvorhaben B74**  
**der *Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft*:**

**„Analytik relevanter Markersubstanzen und Charakterisierung  
neuer phosphoglycerid gebundener Hydroxyfettsäuren“.**

Berlin, November 2004

Prof. Dr. R. Tressl

## **Kurzfassung**

Ziel des Vorhabens war in erster Linie die Charakterisierung einer neuen, in polaren Lipiden wie Phospholipiden gebundenen Fraktion von Hydroxyfettsäuren zu charakterisieren. Erstmals konnten durch indirekte Methoden sowie mittels Elektrospray-Massenspektrometrie polare Lipidfraktionen in Malz charakterisiert werden, die Hinweise auf die Struktur dieser polaren, oxygenierten Fettsäuren geben. Darüber hinaus konnte ein Pathway aus einem polaren, Linolsäure haltigen Lipid hin zu einem Enantiomer einer Trihydroxysäure (THOE), konkret der *9S,12S,13S*-Trihydroxy-*10E*-octadecensäure, identifiziert werden. Diesen Pathway nutzen Pflanzen möglicherweise, um sich gegen Pathogene oder Fressfeinde zu verteidigen. Dieser neue Stoffwechselweg ist bisher nicht beschrieben und wird in Kürze in renommierten, internationalen Journalen von uns veröffentlicht werden.

## Hintergrund

Gerste und Malz nehmen eine Schlüsselfunktion beim Eintrag oxygenierter Linolsäuren über die Würze in das Bier ein. Unstrittig ist, dass diese oxxygenierten Fettsäuren die Vorläufersubstanzen der aliphatischen, ungesättigten Aldehyde (Carbonyl) wie z.B. 2*E*-Nonenal sind und diese neben anderen Substanzen die Geschmacksstabilität des fertigen Bieres determinieren. Diese Aldehyde sind somit Folgeprodukte der Linol- und Linolensäureoxidation. Neben allen bisherigen publizierten Arbeiten, die lediglich auf freie Fettsäuren fokussierten, stellten die Ergebnisse von Wackerbauer und Tressl, gefördert im AiF-Vorhaben Nr. 11890N, erstmals eine veresterte, jedoch unpolare Fraktion von Hydroxyfettsäuren vor. Diese Triglyceride sind prinzipiell noch schlechter wasserlöslich als die jeweiligen freien Fettsäuren. Zahlreiche Versuchsreihen, die eine Korrelation zwischen den Gehalten an oxygenierten Fettsäuren in Malz, dem Sauerstoff-Partialdruck während des Maischens, Nonenalpotential, etc. mit der Geschmacksstabilität des fertigen Bieres herzustellen versuchten, waren nicht erfolgreich.

Im Forschungsvorhaben B74 der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft konnte nun erstmals gezeigt werden, dass neben den freien und den als Triacylglycerid gebundenen (veresterten) oxxygenierten Fettsäuren diese interessante Fraktion an Oxylipinen auch in polaren, wasserlöslichen Estern vorliegt, wie z. B. als Phospholipid oder als Glycolipid.

## Methoden

### Gerste / Malz:

Fein gemahlene Gerste bzw. fein gemahlenes Malz wurde mittels Soxhlet-Extraktion mit Pentan entfettet. Um die alkanlöslichen Fettsäuren zu analysieren wurde ein Teil des Pentan-Extraktes verseift (methanolische Kalilauge, 60 °C, 30 min unter N<sub>2</sub>), mittels Diazomethan methyliert und adsorptionschromatographisch aufgereinigt. Der andere Teil des Extraktes wurde nicht verseift, um die freien Fettsäuren quantifizieren zu können.

Nach Entfernen der nicht-polaren Lipide durch Soxhlet-Extraktion, wurden die polaren Lipide durch Verseifen des Filterkuchens (methanolische Kalilauge, 60 °C, 30 min unter N<sub>2</sub>) freigesetzt. Anschließend wurden auch diese methyliert und adsorptionschromatographisch aufgereinigt. Im Filterkuchen vorhandene reduzierende Zucker reagieren unter diesen Bedingungen z.B. zu Tetrosen (Retro-Aldol-Reaktion), die sehr reaktiv sind und zum Teil polymerisieren. Die Verwendung von Isotopenstandards als interne Standards ist daher unerlässlich, um korrekte Analysenwerte zu erhalten. Dies gilt im Besonderen für die sehr reaktiven 9- und 13-Hydroxyoctadecadiensäuren.

### Würze

20 g fein gemahlene Gerste wurde mit 100 ml des entsprechenden Lösungsmittel (Wasser oder Methanol) eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration der Würze wurden die längerkettigen Fettsäuren (auch oxygenierte) mittels Chloroform/Methanol (2:1, v:v) extrahiert, mit Diazomethan methyliert und aufgereinigt.

### Interne Standards

Als interne Standards wurden verwendet:

Heptadecansäure für die nicht oxygenierten Fettsäuren

[13-<sup>18</sup>O<sub>1</sub>]-(*S*)-13-Hydroxy-9*Z*,11*E*-octadecadiensäure für die HODEs

*erythro*-9,10-Dihydroxystearinsäure für die DHOEs

9*R*,10*R*,12*R*-Trihydroxystearinsäure für die THOEs

## **Präparation einer polaren oxygenierten Fraktion aus Malz**

Ein Lipidextrakt aus biologischem Material enthält verschiedene Lipidklassen, die sich hinsichtlich ihrer Polarität teilweise deutlich voneinander unterscheiden. So sind z.B. Retinol- bzw. Cholesterinester sehr unpolare Verbindungen, die in der Umkehrphasenchromatographie (Reversed Phase) intensive Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen. Phospholipide und die teilweise sehr komplexen Glykolipide hingegen sind relativ hydrophil und zeigen vorzugsweise schwache Wechselwirkungen mit Umkehrphasen.

Um Rohlipidextrakte zu chromatographieren sind komplizierte Gradientensysteme nötig, die insgesamt einen großen Polaritätsbereich abdecken, in kritischen Bereichen des Gradienten jedoch nur einen flachen Polaritätsanstieg aufweisen dürfen. Chromatographische Systeme zu entwickeln, mit denen Rohlipidextrakte in einem Lauf in möglichst viele Komponenten aufgetrennt werden können, stellt somit eine komplizierte Aufgabe dar.

Versuche mit Festphasenextraktionssystemen (RP-18-Kartuschen) zur Grobfractionierung von Malzlipiden führte trotz großem Arbeitsaufwand (Studienarbeit) nicht zu dem gewünschten Ergebnis.

Bei weiterführenden Versuchen mit nicht-modifiziertem Kieselgel als stationäre Phase konnten erste Erfolge erzielt werden. Die folgende Methode stellt den momentanen Entwicklungsstand dar:

### **Fraktionierung der Malzlipide**

Die Isolation der polaren Lipide erfolgt mittels adsorptionschromatographischer Fraktionierung mittels nicht-modifiziertem Kieselgel KG 60 (Säulenchromatographie). Folgende Laufmittel kommen zum Einsatz:

- 1) Chloroform
- 2) Aceton
- 3) Chloroform/Methanol (95:5, v:v)
- 4) Chloroform/Methanol (80:20, v:v)
- 5) Chloroform/Methanol (50:50, v:v)
- 6) Methanol

Ein Vergleich des ESI-Massenspektrums eines Methanol-Extraktes aus entfettetem Darmmalz (Soxhlet) ohne weitere Fraktionierung vom November 2002 (Abb. 12) und den Massenspektren nach Aufarbeitung mittels oben beschriebener Methode (Siehe Abb. 13, 14) zeigen den erzielten Fortschritt bezüglich der Aufreinigung und Charakterisierung von polar gebundenen oxygenierten Fettsäuren in Darmmalz.

## **GC/MS Analyse**

Um die 9- und 13-HODE-Me gaschromatographisch zu trennen, wurden diese Monohydroxyfettsäuren-methylester vor der Analyse hydriert.

Sämtliche Hydroxyfettsäuren-methylester wurden als Trimethylsilylether-Derivate ( $\text{Me}_3\text{Si}$ ) analysiert. Damit ergibt sich eine sehr aufwendige Probenvorbereitung mit Methylierung, Adsorptionchromatographie,  $\text{PtO}_2/\text{H}_2$ -Hydrierung sowie Silylierung, bevor die Proben mittels Kapillar Gaschromatographie – Massenspektrometrie analysiert werden können.

Diese Methoden wurden (in Auszügen) während des EBC Symposiums in Dublin (2003) als Posterpräsentation sowie im entsprechenden Tagungsband vorgestellt.

## Ergebnisse

### 9- und 13-Octadecadiensäure (HODE)

Freie und Triacylglycerid veresterte oxygenierte Fettsäuren können seit einiger Zeit analysiert werden. Weiterführend konnte im Rahmen des Forschungsvorhabens B74 eine polare Lipidfraktion isoliert werden, die seinerseits bereits oxygeniert ist.

Diese oxygenierten Fettsäuren zeigen ein zum Teil erheblich anderes Muster als die jeweiligen Triacylglycerid gebundenen.

Nachfolgend sind in den Abbildungen 1-5 die GC- und GC-MS-Analysen einiger Malze exemplarisch dargestellt.

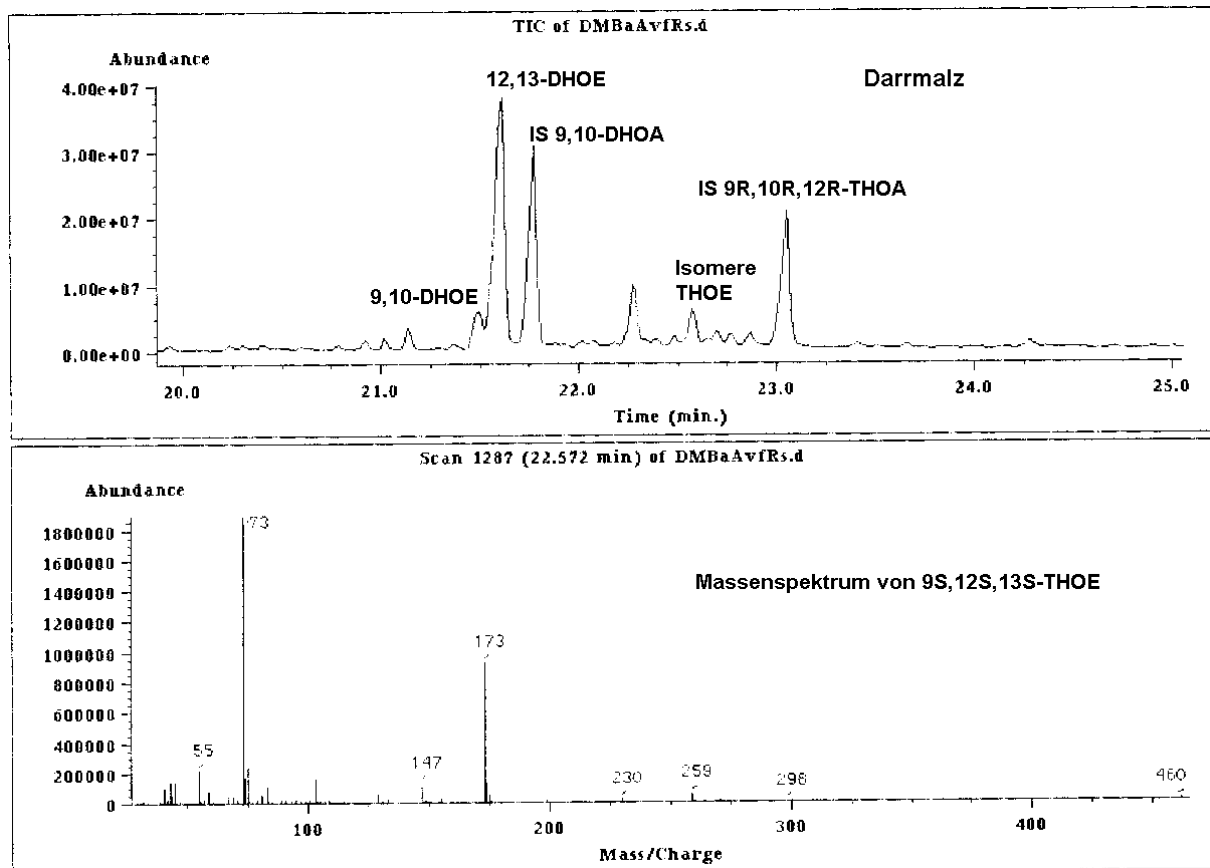


Abb. 1: Hydroxyfettsäuren unpolarer Malz-Lipide (methyliert,silyliert)

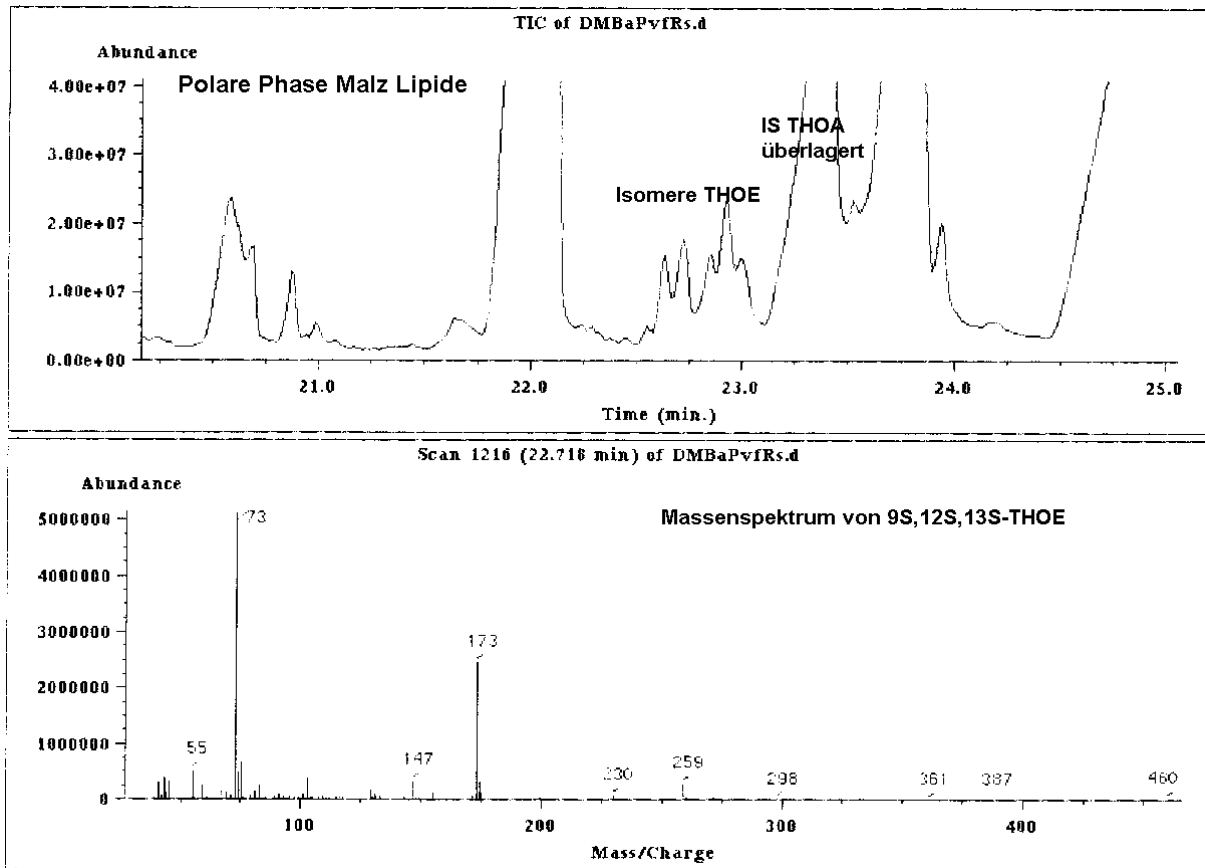


Abb. 2: Hydroxyfettsäuren polarer Malz-Lipide (methyliert,silyliert)



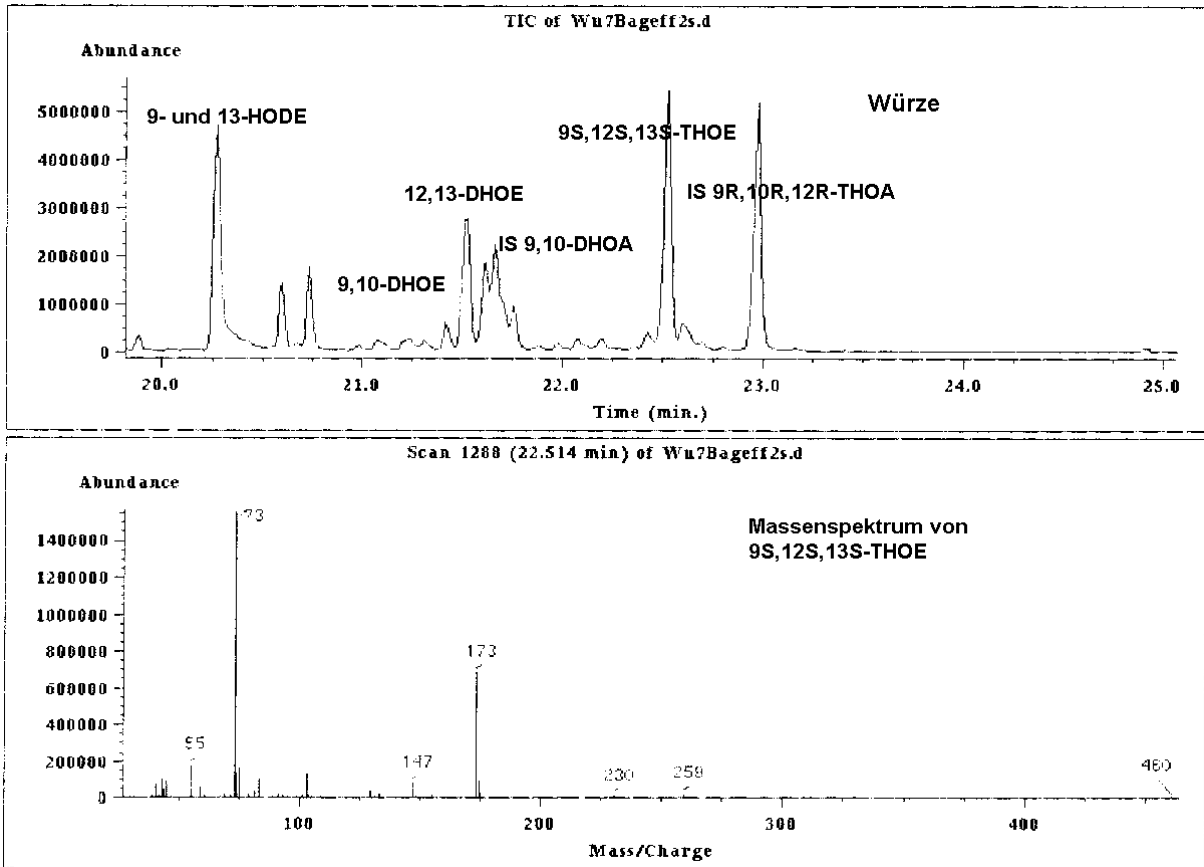


Abb. 3: Hydroxyfettsäuren „Würze“ (Rührversuch mit H<sub>2</sub>O, methyliert,silyliert)

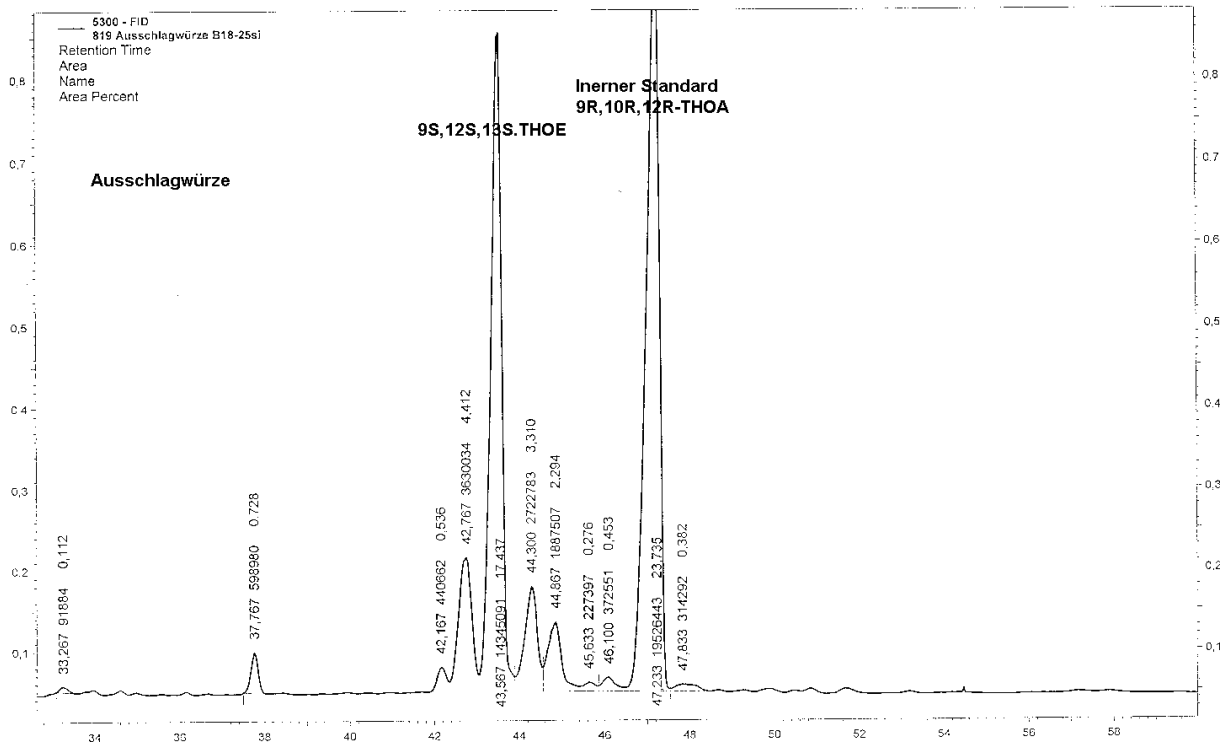


Abb. 4: Trihydroxyfettsäuren Ausschlagwürze

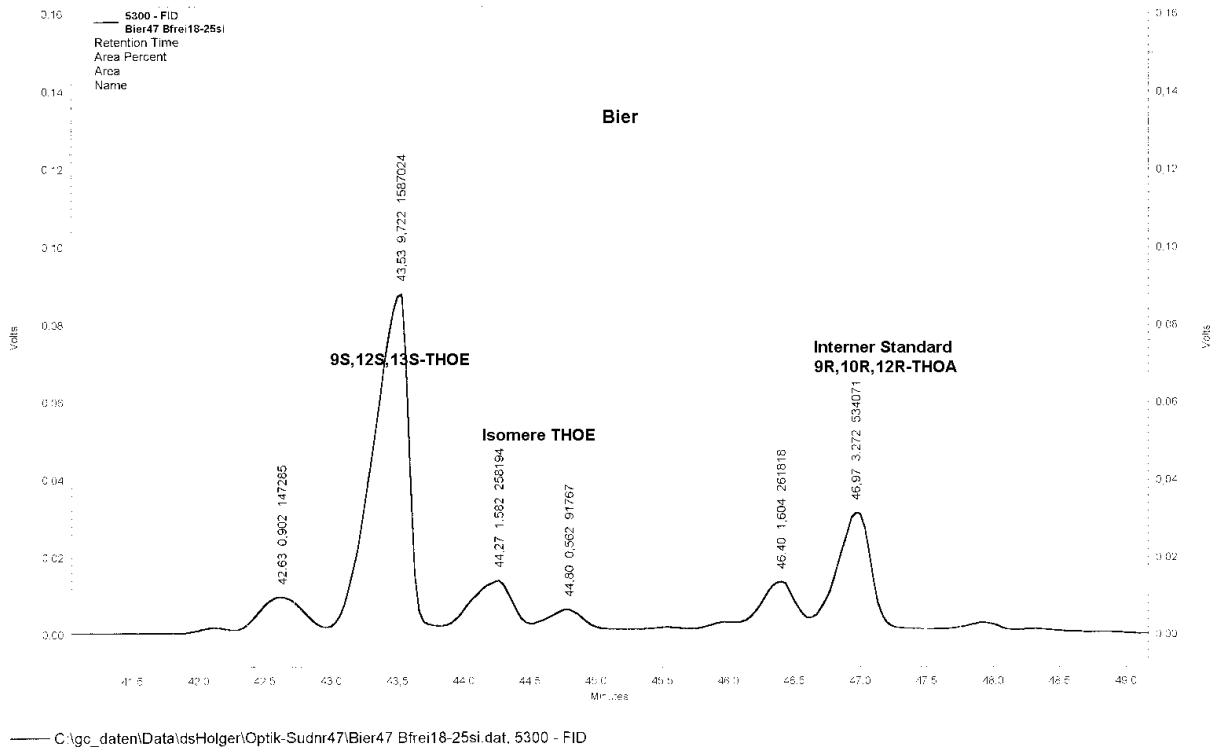


Abb. 5: Trihydroxyfettsäuren Bier

Die Analytik der Enantiomeren HODEs erfolgte mittels Kieselgel-HPLC der jeweiligen Methylester. Die semi-präparativ getrennten regioisomeren 9- und 13-HODE-ME wurden mittels chiraler HPLC analytisch getrennt und quantifiziert.

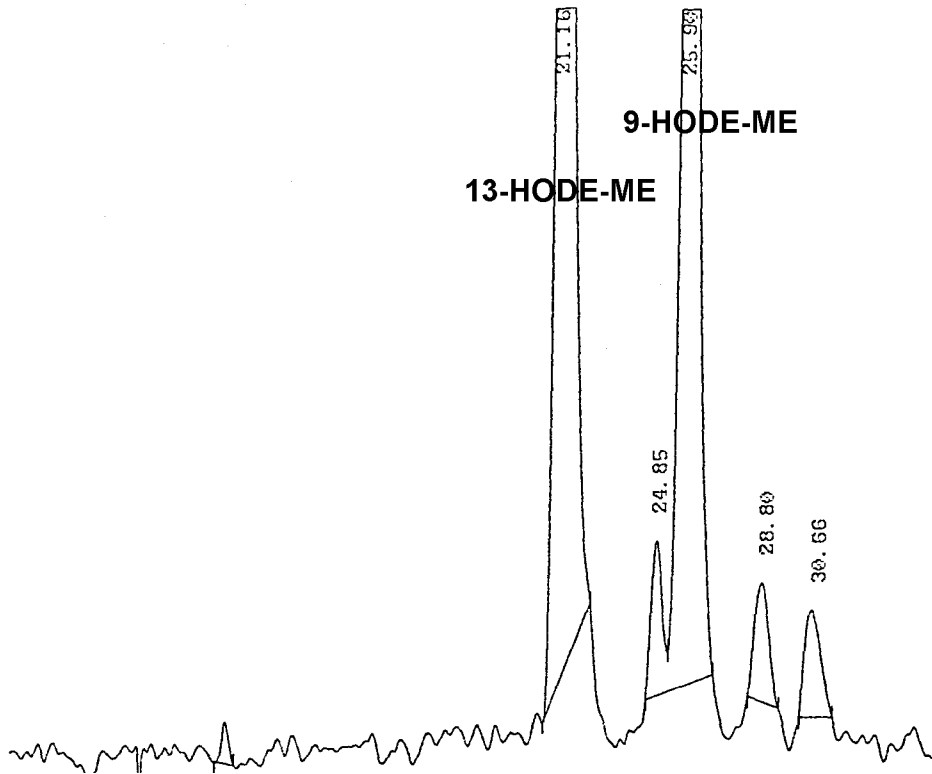


Abb. 6: Trennung der Isomeren 9- und 13-HODE (als Methylester) mittels HPLC

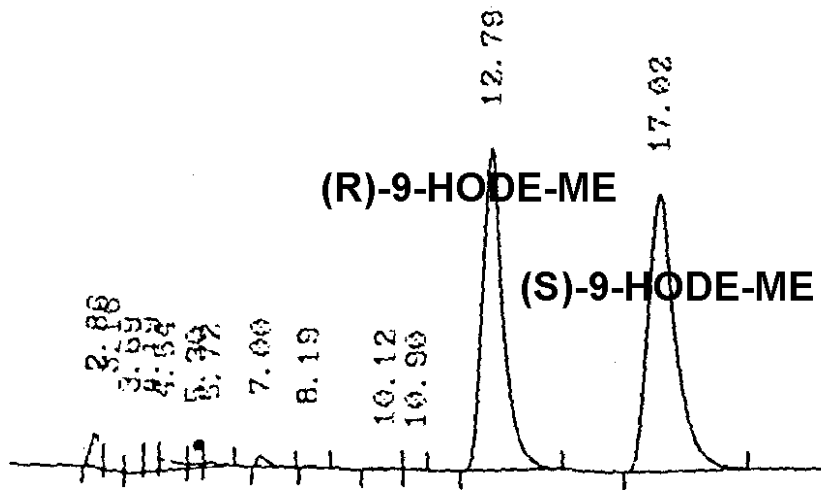


Abb. 7: Trennung der Enantiomeren der 9-HODE (als Methylester) mittels chiraler HPLC

Nachfolgend sind in den Tabellen 1-8 die Gehalte der Monohydroxysäuren in ppm sowie deren Enantiomerenverteilung der entsprechenden Lipidfraktionen aus Gerste, Grünmalz und Malz dargestellt.

| concentration<br>of HODE | 9-HODE |               | 13-HODE |               |
|--------------------------|--------|---------------|---------|---------------|
|                          | [ppm]  | (S) : (R) [%] | [ppm]   | (S) : (R) [%] |
| <b>barley</b>            |        |               |         |               |
| free                     | 4      | 48 : 52       | 3       | 53 : 47       |
| triacyl                  | 36     | 47 : 53       | 60      | 53 : 47       |
| polar                    | 30     | 46 : 54       | 25      | 52 : 48       |
| total                    | 70     | 47 : 53       | 88      | 53 : 47       |
| <b>6days green malt</b>  |        |               |         |               |
| free                     | 18     | 89 : 11       | 43      | 79 : 21       |
| triacyl                  | 53     | 57 : 43       | 147     | 64 : 36       |
| polar                    | 45     | 58 : 42       | 44      | 68 : 32       |
| total                    | 116    | 62 : 38       | 234     | 68 : 32       |
| <b>finished malt</b>     |        |               |         |               |
| free                     | 1      | 58 : 42       | 2       | 53 : 47       |
| triacyl                  | 40     | 47 : 53       | 67      | 60 : 40       |
| polar                    | 30     | 47 : 53       | 50      | 60 : 40       |
| total                    | 71     | 47 : 53       | 119     | 60 : 40       |

Tab. 1: Regio- und Enantiomerenverteilung der Monohydroxyfettsäuren in Gerste, Grünmalz und Darmmalz

| free HODE<br>in green malt              | concentration HODE [ppm] |        |         |                      |
|---|--------------------------|--------|---------|----------------------|
|   | $\Sigma$ HODE            | 9-HODE | 13-HODE | ratio (9- : 13-) [%] |
| total (analyzed in<br>6days green malt) | 61                       | 18     | 43      | 30 : 70              |
| effect of germination                   | + 54                     | + 14   | + 40    | 26 : 74              |
| (S)-HODE                                | + 46                     | + 14   | + 32    | 30 : 70              |
| (R)-HODE                                | + 8                      | 0      | + 8     | 0 : 100              |

Tab. 2: Auswirkung des Keimprozesses auf die Konzentration der freien Monohydroxyfettsäuren

| TG-esterified HODE<br>in green malt     | concentration HODE [ppm] |        |         |                      |
|---|--------------------------|--------|---------|----------------------|
|   | $\Sigma$ HODE            | 9-HODE | 13-HODE | ratio (9- : 13-) [%] |
| total (analyzed in<br>6days green malt) | 200                      | 53     | 147     | 27 : 73              |
| effect of germination                   | + 104                    | + 17   | + 87    | 16 : 84              |
| (S)-HODE                                | + 75                     | + 13   | + 62    | 17 : 83              |
| (R)-HODE                                | + 29                     | + 4    | + 25    | 14 : 86              |

Tab. 3: Auswirkung des Keimprozesses auf die Konzentration der Triacylglycerid gebundenen Monohydroxyfettsäuren

| Polar esterified HODE<br>in green malt  | concentration HODE [ppm] |        |         |                      |
|---|--------------------------|--------|---------|----------------------|
|   | $\Sigma$ HODE            | 9-HODE | 13-HODE | ratio (9- : 13-) [%] |
| total (analyzed in<br>6days green malt) | 89                       | 45     | 44      | 51 : 49              |
| effect of germination                   | + 34                     | + 15   | + 19    | 44 : 56              |
| (S)-HODE                                | + 29                     | + 12   | + 17    | 41 : 59              |
| (R)-HODE                                | + 5                      | + 3    | + 2     | 60 : 40              |

Tab. 4: Auswirkung des Keimprozesses auf die Konzentration der polar gebundenen Monohydroxyfettsäuren

| Total HODE<br>in green malt             | concentration HODE [ppm] |        |         |                      |
|---|--------------------------|--------|---------|----------------------|
|   | $\Sigma$ HODE            | 9-HODE | 13-HODE | ratio (9- : 13-) [%] |
| total (analyzed in<br>6days green malt) | 350                      | 116    | 234     | 33 : 67              |
| effect of germination                   | + 192                    | + 46   | + 146   | 24 : 76              |
| (S)-HODE                                | + 150                    | + 39   | + 111   | 26 : 74              |
| (R)-HODE                                | + 42                     | + 7    | + 35    | 17 : 83              |

Tab. 5: Auswirkung des Keimprozesses auf die Gesamtkonzentration der Monohydroxyfettsäuren

| free HODE     | Concentration HODE [ppm] |               | degradation<br>during kilning [%] |
|---------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|
|               | green malt               | finished malt |                                   |
| (S)-9-HODE    | 16                       | 0,6           | - 96 %                            |
| (R)-9-HODE    | 2                        | 0,4           | - 80 %                            |
| (S)-13-HODE   | 34                       | 1             | - 97 %                            |
| (R)-13-HODE   | 9                        | 1             | - 89 %                            |
| $\Sigma$ HODE | 61                       | 3             | - 95 %                            |

Tab. 6: Auswirkung des Darrprozesses auf die Konzentration der freien Monohydroxyfettsäuren

| TG-esterified HODE | Concentration HODE [ppm] |               | degradation<br>during kilning [%] |
|--------------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|
|                    | green malt               | finished malt |                                   |
| (S)-9-HODE         | 30                       | 19            | - 37 %                            |
| (R)-9-HODE         | 23                       | 21            | - 9 %                             |
| (S)-13-HODE        | 94                       | 40            | - 57 %                            |
| (R)-13-HODE        | 53                       | 27            | - 49 %                            |
| $\Sigma$ HODE      | 200                      | 107           | - 47 %                            |

Tab. 7: Auswirkung des Darrprozesses auf die Konzentration der Triacylglycerid gebundenen Monohydroxyfettsäuren



| polar esterified HODE | Concentration HODE [ppm] |               | degradation<br>during kilning [%] |
|-----------------------|--------------------------|---------------|-----------------------------------|
|                       | green malt               | finished malt |                                   |
| (S)-9-HODE            | 26                       | 14            | - 46 %                            |
| (R)-9-HODE            | 19                       | 16            | - 16 %                            |
| (S)-13-HODE           | 30                       | 30            | ± 0 %                             |
| (R)-13-HODE           | 14                       | 20            | + 43 %                            |
| Σ HODE                | 89                       | 80            | - 10 %                            |

Tab. 8: Auswirkung des Darrprozesses auf die Konzentration der polar gebundenen Monohydroxyfettsäuren

## **9S,12S,13S-Trihydroxy-10E-octadecensäure**

Metabolismusstudien in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass beim Vergleich der Konzentrationen an oxygenierten Fettsäuren in Malz und Bier Monohydroxysäuren (HODE) durch die Hefe metabolisiert werden und stark abnehmen. Dihydroxysäuren (DHOE) werden in geringer Konzentration in Bier gemessen, die Trihydroxysäuren (THOE) und hier ausschließlich das Isomer 9S,12S,13S-Trihydroxy-10E-octadecensäure nimmt dagegen deutlich an Konzentration zu.

Selektive Lipasen setzen während des Maischens gezielt Linolsäure frei. Linolsäure wird anschließend in einer Enzymkaskade zur 9S,12S,13S-Trihydroxy-10E-octadecensäure umgesetzt. Diese Trihydroxysäure akkumuliert auch im fertigen Bier. Durch gezielte Enzym-Inhibierung konnte gezeigt werden, dass die Enzymkaskade, die zur 9S,12S,13S-Trihydroxy-10E-octadecensäure führt, abläuft, sobald geschrotetes Malz mit Wasser in Berührung kommt. Alle Publikationen über Trihydroxysäuren im Stoffwechsel der Pflanzen und teilweise auch Mikroorganismen zeigen, dass diese weitgehend unspezifisch gebildet werden, das heißt die regio- und stereoisomeren THOE zeigten eine annähernde Gleichverteilung.

Die Zuordnung der Konfiguration der 9S,12S,13S-Trihydroxy-10E-octadecensäure erfolgte auf unterschiedliche Weise:

- 1) Enzymatische Synthese von 9S- und 13S-HODE und Transformation der jeweiligen cis-Doppelbindung der HODE's durch OsO<sub>4</sub> in ein erythro-Diol.
- 2) Enzymatische Synthese von 9S- und 13S-HPODE und enzymatische Umlagerung in Epoxyole und Hydrolyse zu threo-Diolen.
- 3) Ozonolytische Spaltung der Doppelbindung der THOE und Zuordnung der 2-Hydroxysebazinsäure-dimethylester mittels chiraler GC.

Auf diese Weise konnten acht der 16 möglichen Isomere der THOE synthetisch dargestellt und die entsprechende Elutionsfolge in der Chromatographie zugeordnet werden.

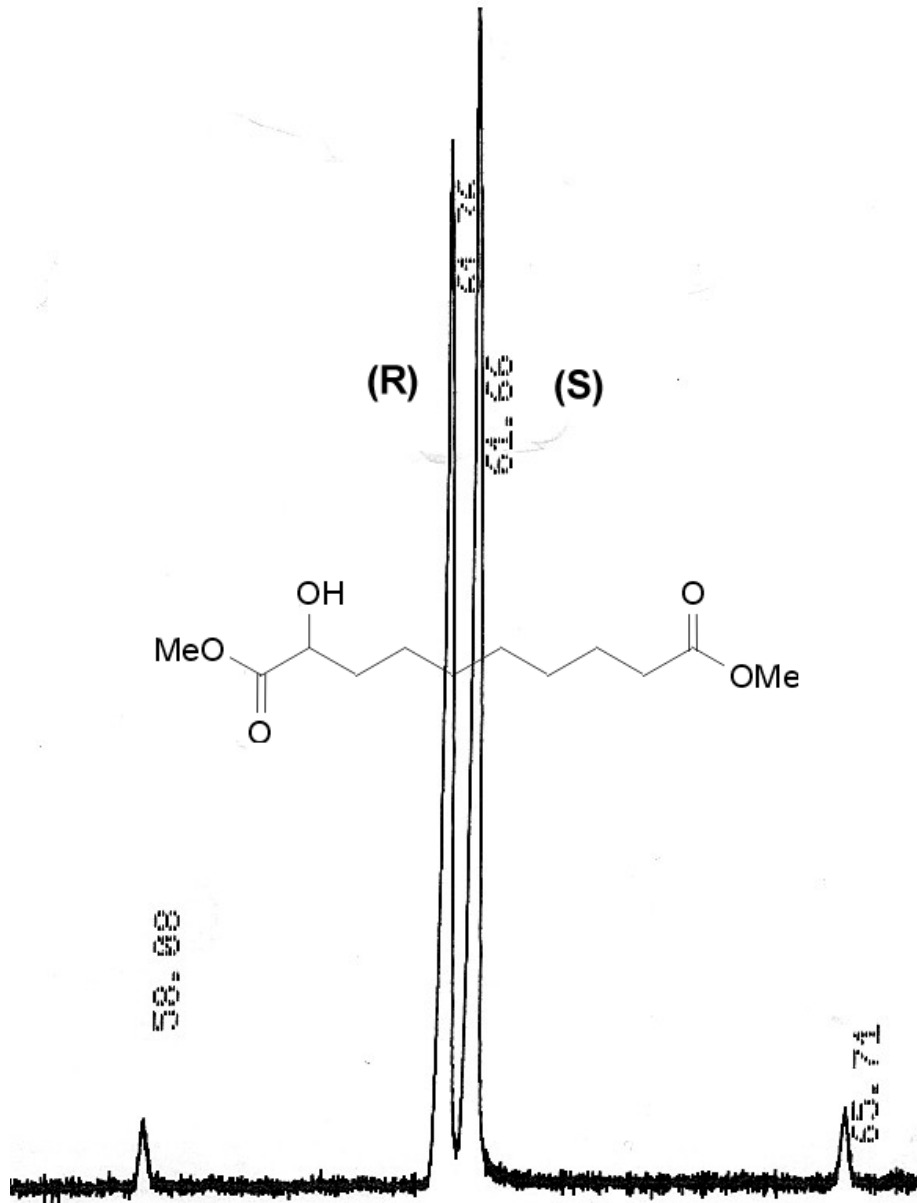


Abb. 8: Trennung von (R)- und (S)-2-Hydroxysebazinsäure-dimethylester mittels chiraler GC (Lipodex E<sup>®</sup>)

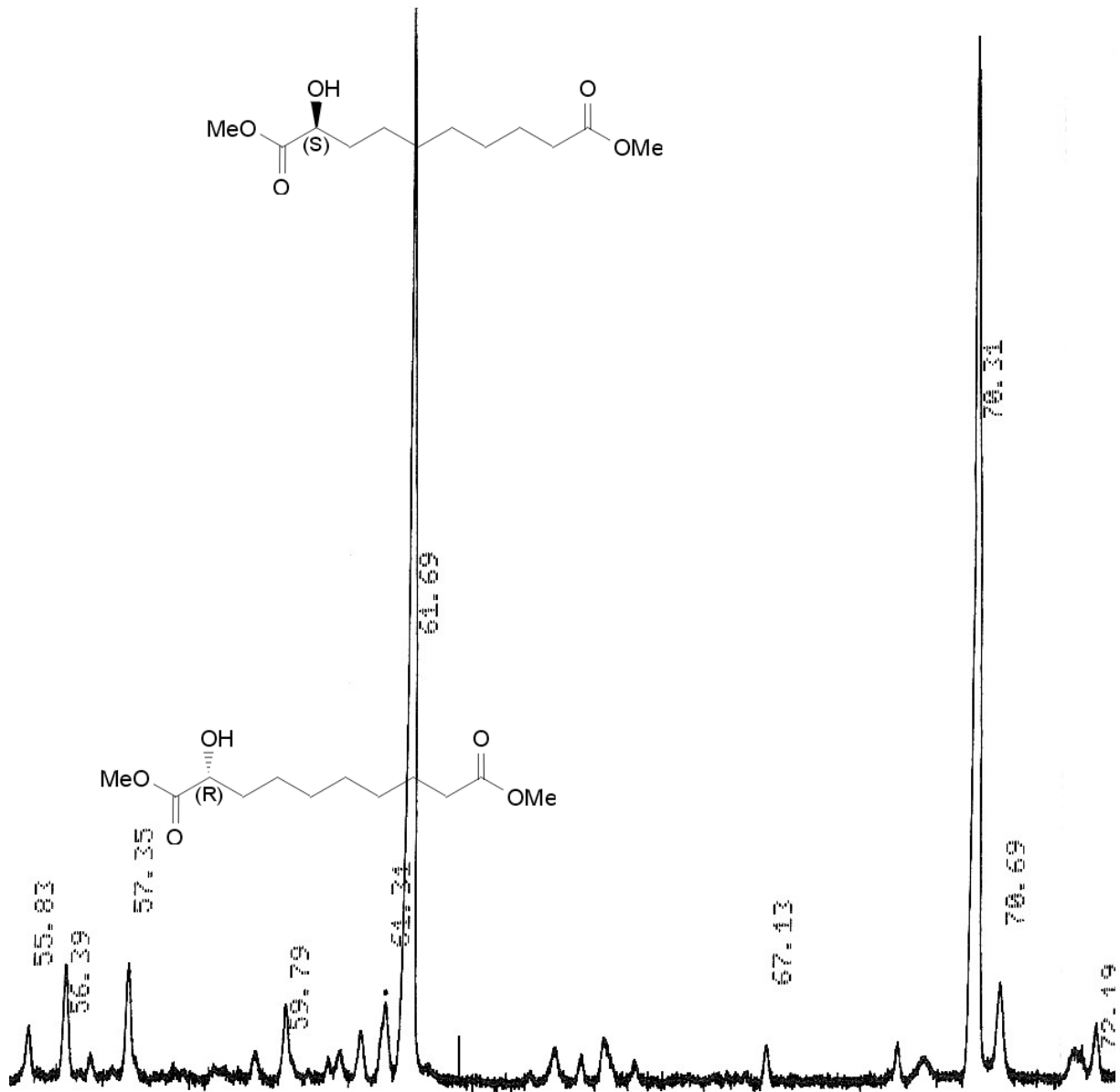


Abb. 9: Trennung von (*R*)- 2-Hydroxysebazinsäure-dimethylester ( $R_T = 61.31$  min) und (*S*)-2-Hydroxysebazinsäure-dimethylester ( $R_T = 31.69$ ) mittels chiraler GC (Lipodex E<sup>®</sup>), gewonnen aus der Ozonolyse der aus Maische isolierten THOE

In Abbildung 10 ist das Protonenresonanzspektrum ( $^1\text{H-NMR}$ ) der (9*R*,10*S*,13*S*)-9,10,13-Trihydroxy-11*E*-octadecensäure gezeigt. Die THOE wurde als Diastereomer synthetisiert und als enantiomerenreine Verbindung durch Chromatographie gewonnen. In der Abb.11 dargestellt ist ebenfalls das zweidimensionale H-H korrelierte (H-H-COSY) NMR Spektrum, das die exakte Wechselwirkung und damit Zuordnung der einzelnen Wasserstoff-Atome des Moleküls ermöglicht. Die komplizierte Technik soll nicht weiter erläutert werden, jedoch aufzeigen, mit welchen Methoden heute Strukturen exakt belegt werden müssen, um eindeutige Zuordnungen treffen zu können.

Die Analytik der Hydroxysäuren konnte in der kritischen Matrix der Würze (reduzierende Zucker) etabliert werden. Dabei wurde, wie bereits angedeutet, ein Lipase → Lipoxygenase → Peroxygenase → Epoxidhydrolase Pathway charakterisiert, der große Mengen an 9*S*,12*S*,13*S*-Trihydroxy-10*E*-octadecensäure (THOE) während des Maischens bildet und in der Würze freisetzt.

Neben diesen grundlegenden Neuerkenntnissen über die Bildung oxygenierter Fettsäuren in Würze konnten standardisierte chemisch-analytische Verfahren zur Unterscheidung von freien Fettsäuren, Triacylglyceriden und polaren (Phospho-) Lipiden etabliert werden. Zusätzlich ist nunmehr die exakte Quantifizierung dieser Oxylipine mittels Isotopenstandards und Gaschromatographie - Massenspektrometrie möglich.

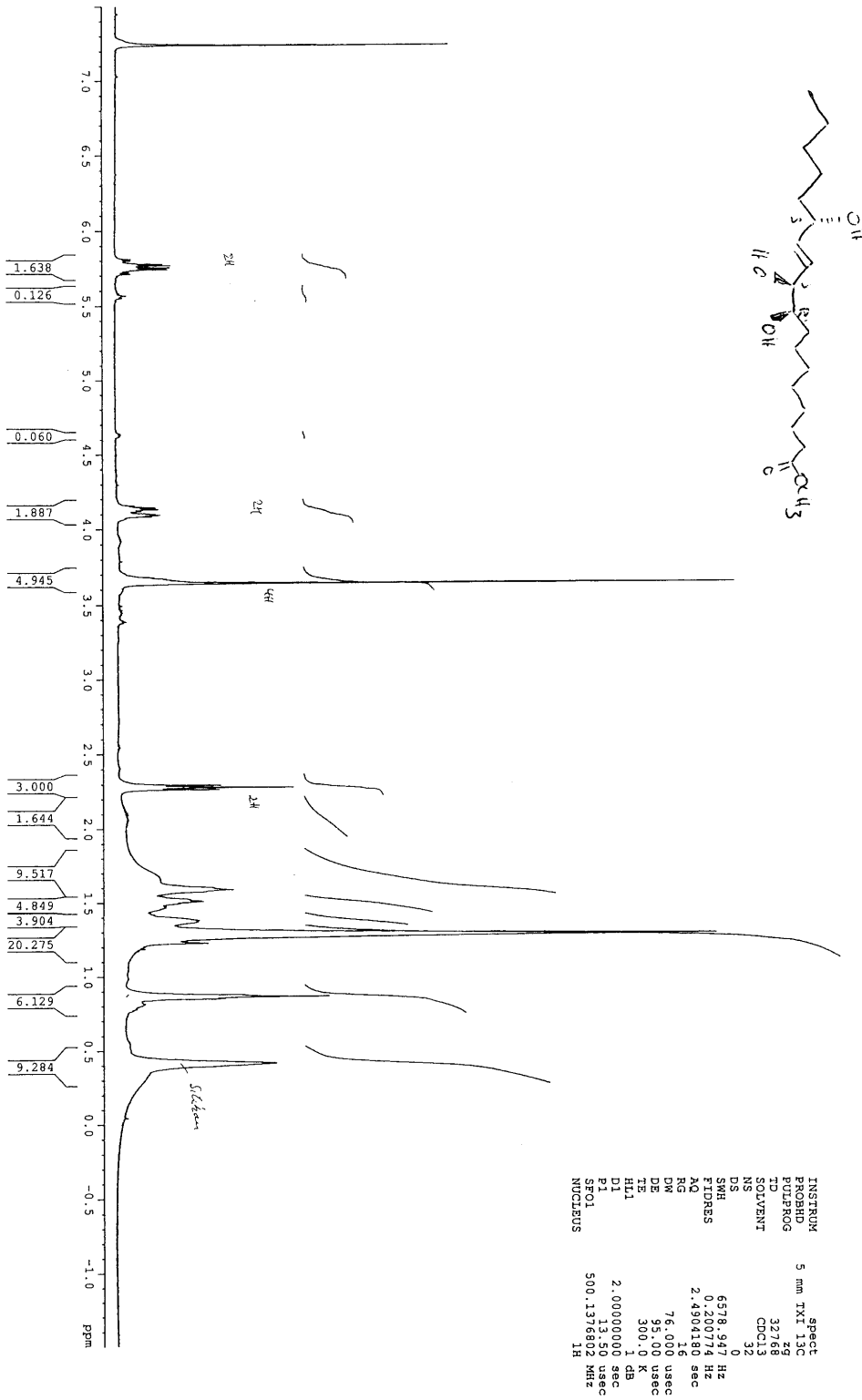


Abb. 10a: (<sup>1</sup>H-NMR) der 9R,10S,13S-Trihydroxy-11E-octadecensäure

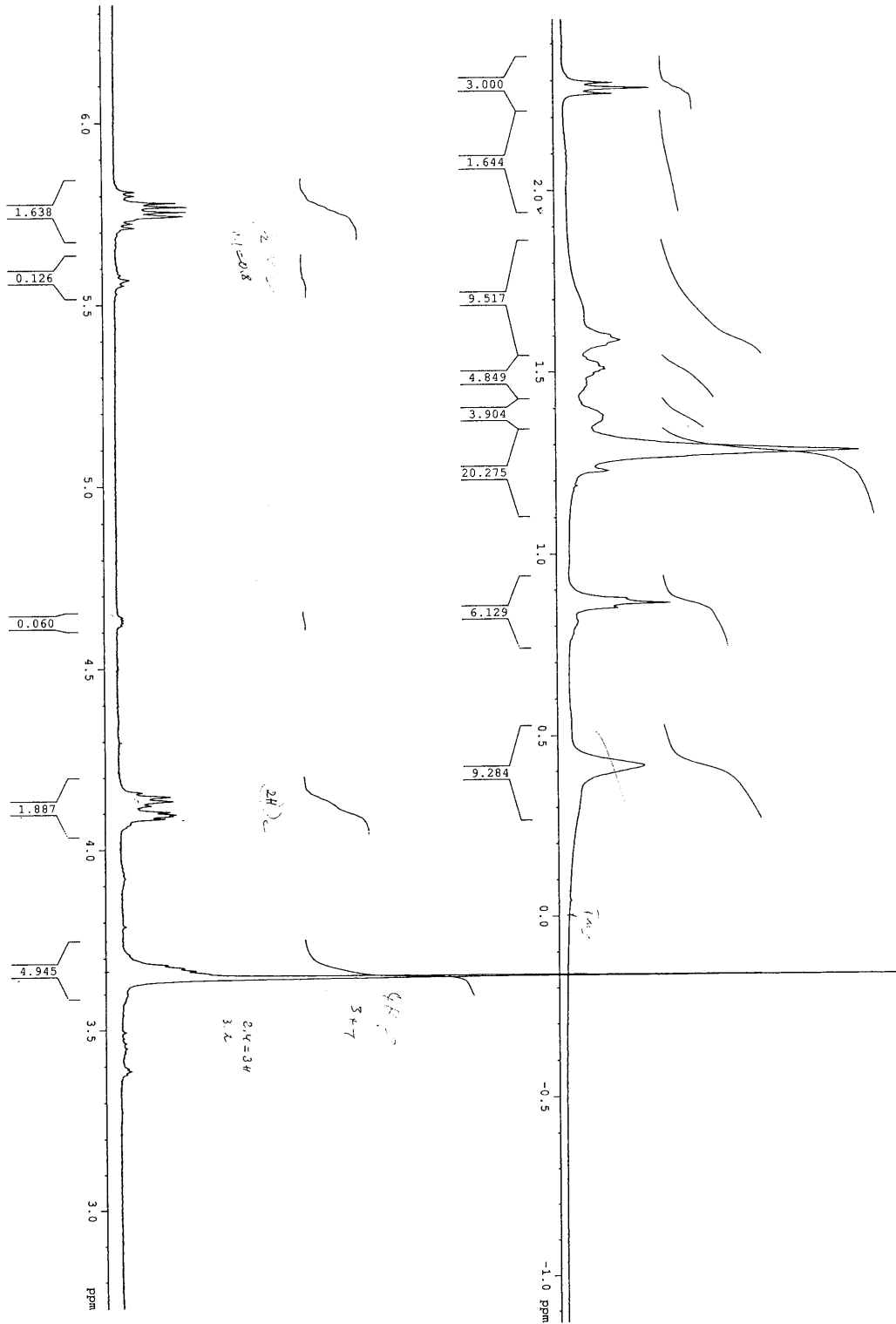


Abb. 10b: ( $^1\text{H-NMR}$ ) der 9R,10S,13STrihydroxy-11E-octadecensäure

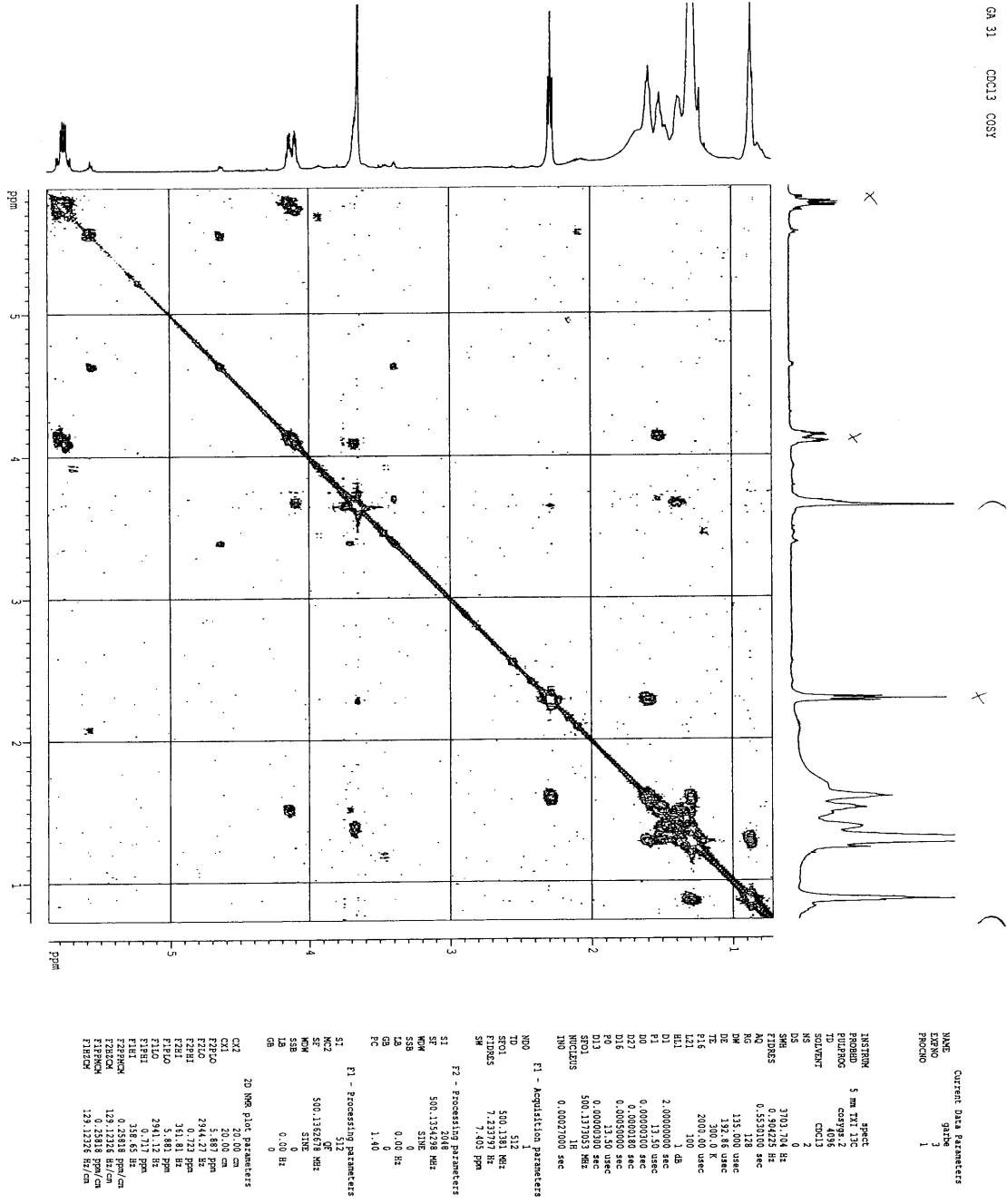


Abb. 11: H,H-COSY-NMR Spektrum der 9R,10S,13S-Trihydroxy-11E-octadecensäure



## Polare Hydroxysäuren

Mono- (HODE), Di- (DHOE) und Trihydroxysäuren (THOE): Einmischen (20 °C) in Wasser (W) bzw. in Methanol (M), Soxhlet Malz (polare Lipide).

| <b>Analyt</b> | <b>Methode</b> | <b>Vollmalz</b><br>[ppm] | <b>Soxhlet Malz</b><br>[ppm] |
|---------------|----------------|--------------------------|------------------------------|
| 9-HODE        | W              | 18                       | 21                           |
| 13-HODE       | W              | 8                        | 12                           |
| 9,10-DHOE     | W              | 0                        | 0                            |
| 12,13-DHOE    | W              | 1                        | 0                            |
| 9,12,13-THOE  | W              | 54                       | 31                           |
| 9,12,13-THOE  | M              | 2                        | 2                            |

**Darren**

Grünmalz → Darmmalz

Analyse der „Polaren Lipide“ (PG), Abtrennung der freien Säuren und Triglyceride durch Soxhlet Extraktion

| Analyt               | Konzentration [ppm] |          | Veränderung (%) |
|----------------------|---------------------|----------|-----------------|
|                      | Grünmalz            | Darmmalz |                 |
| ( <i>S</i> )-13-HODE | 29.9                | 30       | ± 0             |
| ( <i>R</i> )-13-HODE | 14.1                | 20       | + 42            |
| ( <i>S</i> )-9-HODE  | 26.1                | 14.1     | - 46            |
| ( <i>R</i> )-9-HODE  | 18.9                | 15.5     | - 16            |
| □ HODEs              | 89                  | 80       | - 10            |

## **Charakterisierung einer polaren oxygenierten Fraktion aus Malz mittels ESI-MS**

Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ist ein „weiches“ Ionisationsverfahren in Flüssigkeiten, die eine massenspektrometrische Analyse von nicht flüchtigen Verbindungen wie Phospholipiden, Glycolipiden, aber auch von Peptiden und Proteinen erlaubt. Der Vorteil dieses „weichen Ionisationsverfahrens“ beruht auf der Möglichkeit sowohl große Moleküle ( $> 1000$  Da) als auch thermolabile Verbindungen durch „schonende“ Ionisationsverfahren zu analysieren. Beim Ionisationsprozess entstehen dabei Moleküle unterschiedlicher Ladungszahl. Im Vergleich zur GC-MS erschweren Kontaminationen, fehlende Datenbanken und die Problematik, keine Fragmentierungen von Molekül-Ionen zu erhalten die eindeutige Strukturzuordnung erheblich. Dies kann teilweise durch MS-MS-Experimente und damit die Generierung von Tochter-Ionen ausgeglichen werden, was durch Modellexperimente mit „Linaloyl-palmitoyl-phosphatidyl-cholin“ bestätigt werden konnte.

Polare Lipide werden in verschiedene Gruppen eingeteilt, wobei jede Gruppe zahlreiche Einzelvertreter aufweist. Welche polare Vorstufe im Malz vorliegt ist nicht bekannt. Die Phospholipide sind als Membranlipide weit verbreitet. Typische Phospholipide sind in Abb. 15 dargestellt. Neben den Phospholipiden bilden die Glykolipide die zweite große Klasse polarer Lipide. Neben einfach aufgebauten Glykolipiden (Abb. 16), können an ein Lipid-Molekül bis zu 30 Monosaccharid-Einheiten gebunden sein. Weitere Vertreter der Glykolipide sind die Cerebroside, die nur eine Monosaccharid-Einheit tragen (meist D-

Glucose oder D-Galactose), die Sulfatide mit ihren Sulfat-veresterten Monosacchariden und die Ganglioside, die mit (oft verzweigten) Oligosaccharid-Ketten behaftet sind.

Neben der Vielzahl möglicher oxygenierter polarer Lipide und deren leichter Protonierung bei der ESI-MS, kann es auch zu Adduktbildung bei der LC-MS mit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Ionen kommen, welche die Strukturzuordnung wegen verschobener Massen weiter erschweren.

Den Ausschnitt eines ESI-Massenspektrums (gemessen im „Positive Mode“) zeigt Abb. 13. Bei der Masse  $m/z = 758/759$  könnte es sich um ein Phosphatidylcholin (protoniert) bestehend aus der polaren Kopfgruppe, Palmitinsäure und Linolsäure handeln. Das Ion  $m/z = 775$  deutet auf ein oxygeniertes Derivat des Phosphatidylcholin (HODE statt Linolsäure) hin. Die Masse  $m/z = 808$  lässt sich mit einer an Phosphatidylcholin gebundenen THOE erklären.(Abb. 17).

Linolsäure trägt zu über 50% zum Fettsäure-Pool der Gerste bzw. des Darmmalzes bei, daher könnte Phosphatidylcholin auch mit zwei Linolsäuren besetzt sein. Dieses Phospholipid würde protoniert die Masse  $m/z = 783$  liefern.

Die Betriebsart „Negative Mode“ bei der ESI-MS liefert nur negativ geladene Ionen und somit weniger Massenpeaks, da die große Anzahl an protonierten Molekülen nicht analysiert wird (Abb. 14). Die Massenpeaks  $m/z = 884$  bzw.  $m/z = 912$  deuten auf Phosphatidylinositol hin, jeweils besetzt mit einer THOE. Die zweite Fettsäure wäre folglich Palmitin- bzw. Stearinsäure (Abb. 18).

Die MS-MS-Experimente zur Erzeugung von Tochter-Ionen verlangen „größere“ Probenmengen. Dies bedarf einer weiteren Verfeinerung der präparativen Methoden.

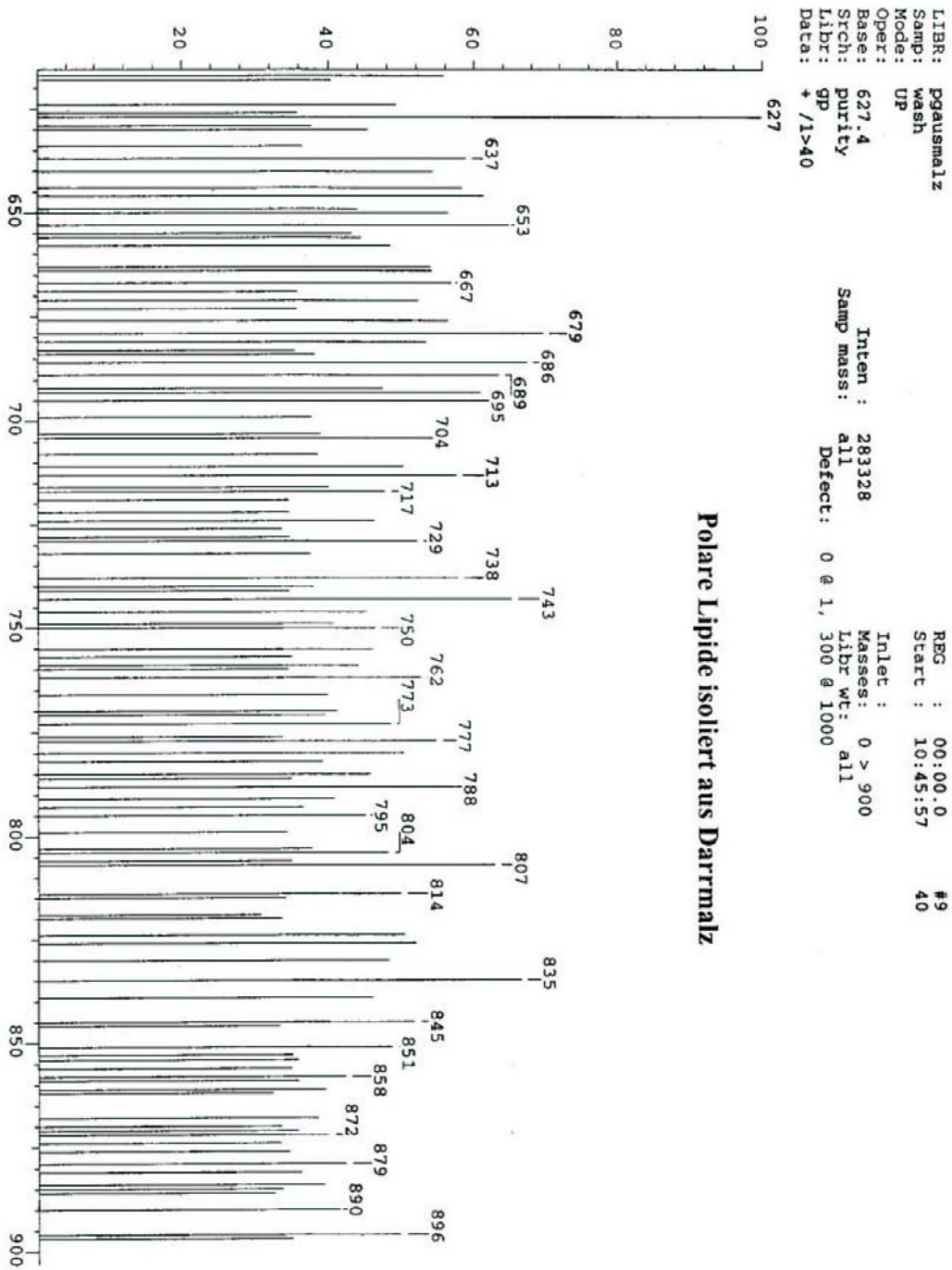


Abb. 12: ESI-Massenspektrum eines Methanol-Extraktes aus entfettetem Darmmalz ohne Fraktionierung

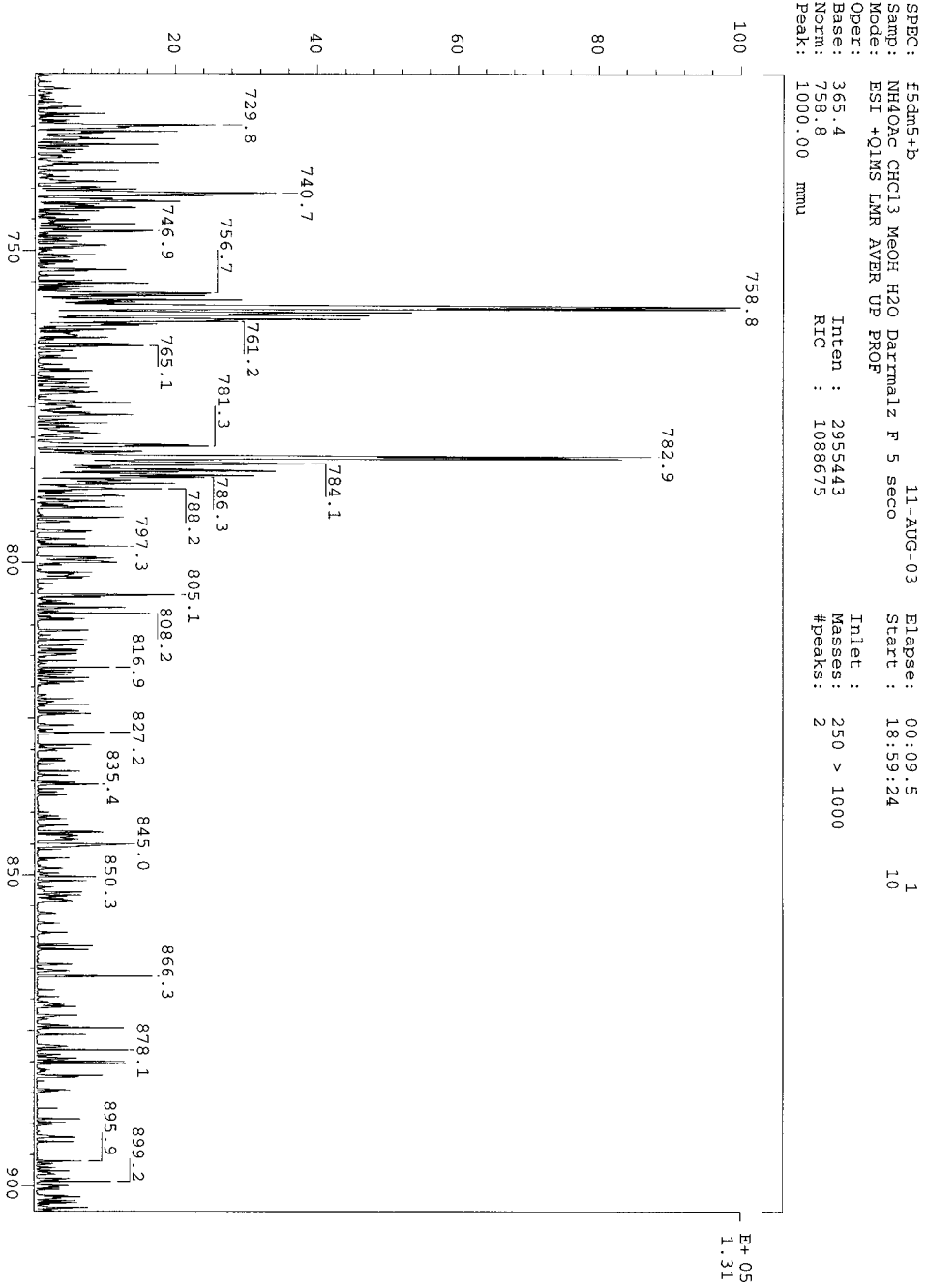


Abb. 13: ESI-Massenspektrum (Positive Mode) von Malzlipiden nach Fraktionierung

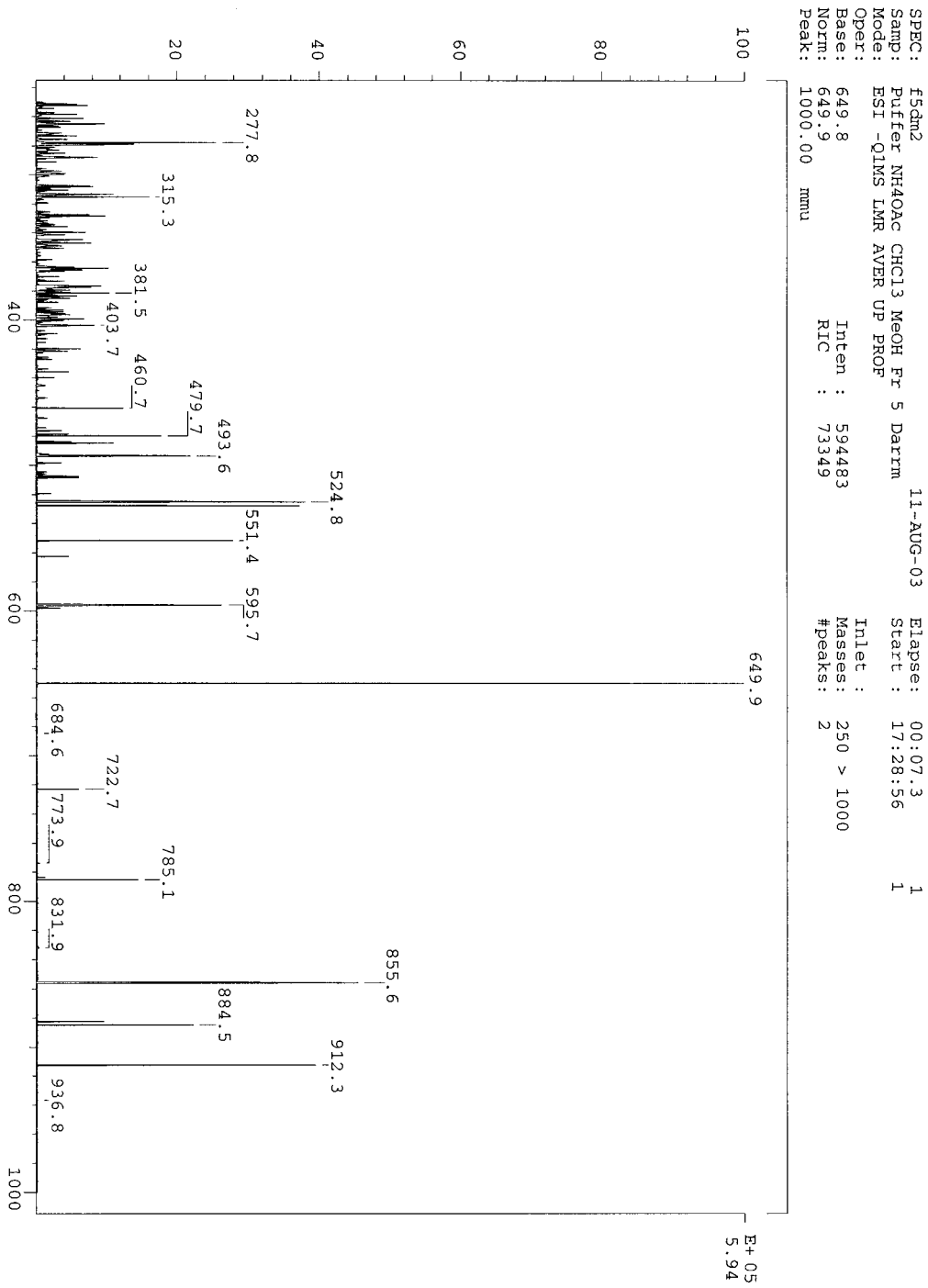
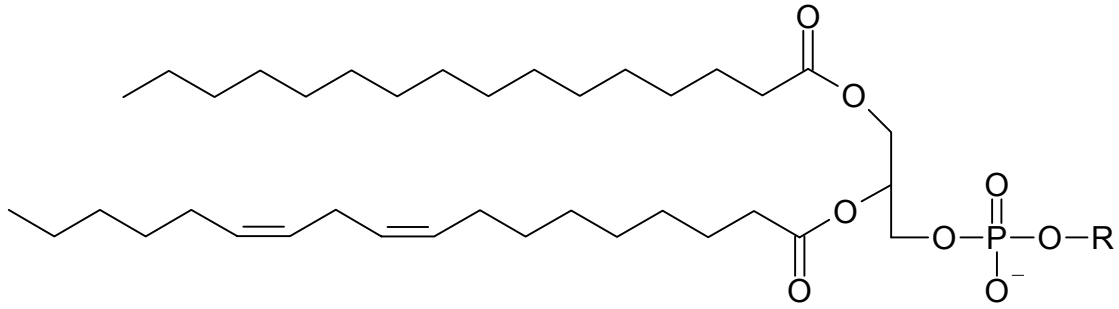


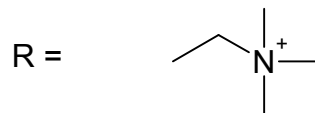
Abb. 14: ESI-Massenspektrum (Negative Mode) von Malzlipiden nach Fraktionierung



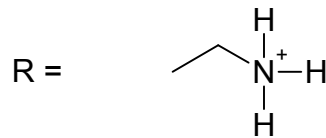
Phosphatidsäure

R = H

Phosphatidylcholine



Phosphatidylethanolamine



Phosphatidylinosite

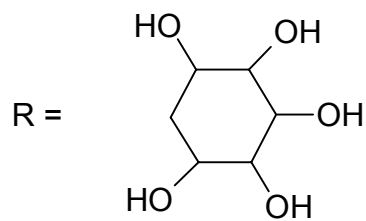


Abb. 15: Verschiedene Klassen von Phospholipiden



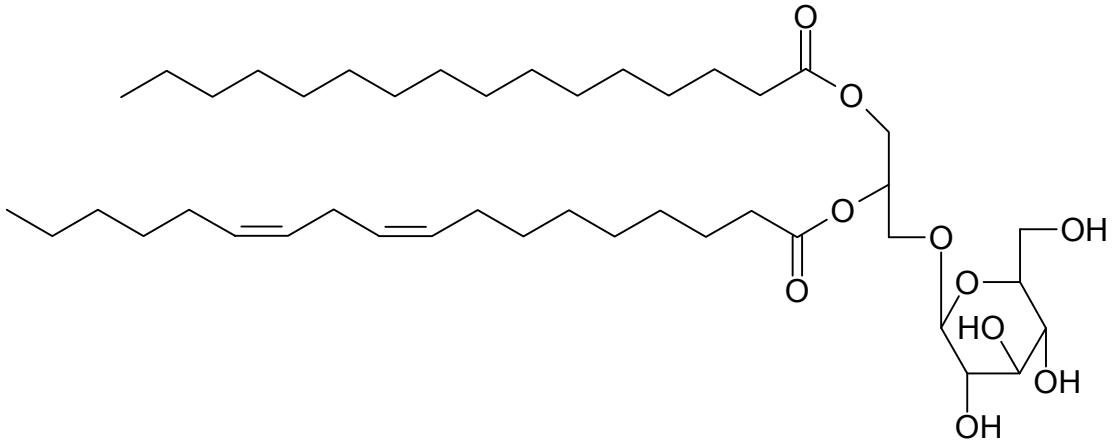
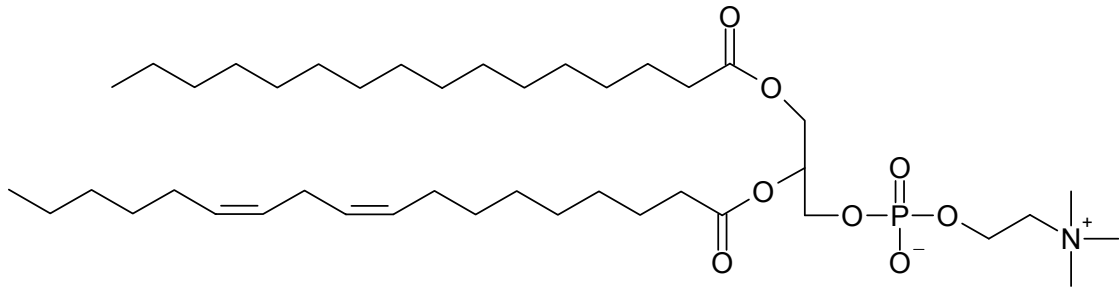
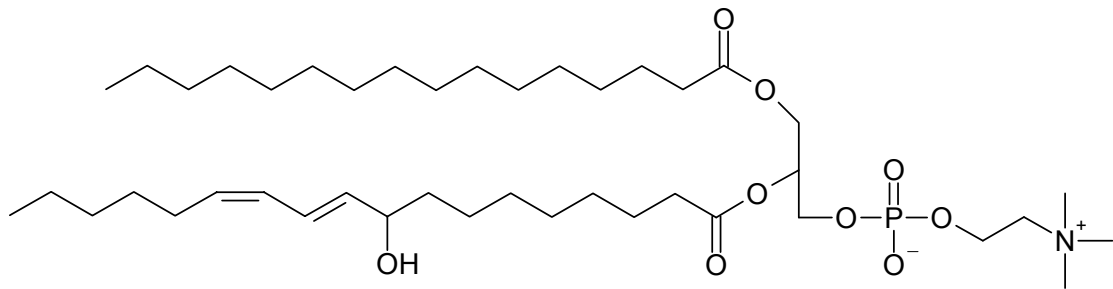


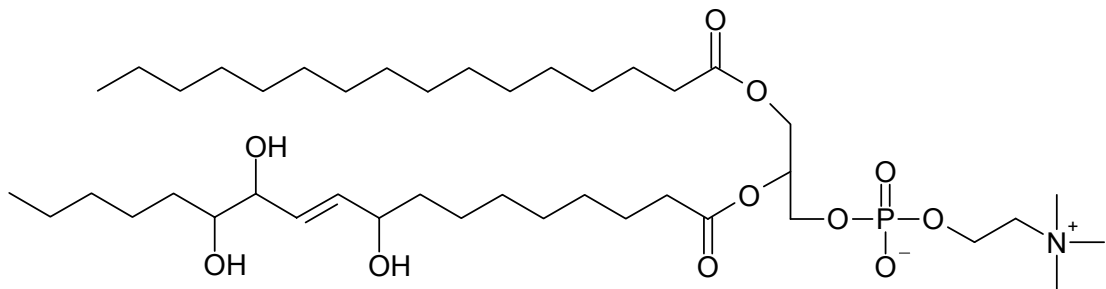
Abb. 16: 1-Palmitoyl-2-linaloyl-3-β-D-glucosyl-glycerol



**MW: 758 + H<sup>+</sup> = 759**



**MW: 774 + H<sup>+</sup> = 775**



**MW: 807+ H<sup>+</sup> =808**

Abb. 17: 1-Palmitoyl-2-linaloyl-phosphatidyl-cholin und oxygenierte Derivate

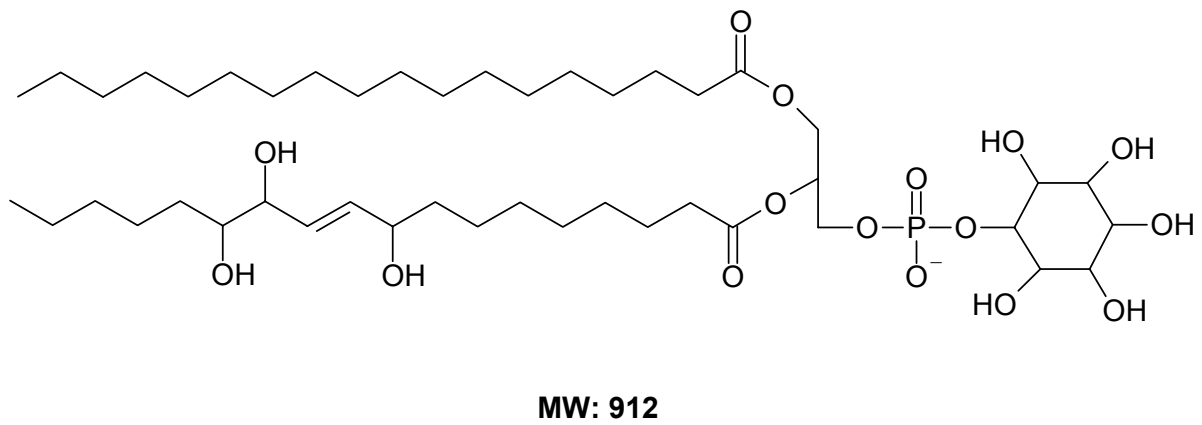
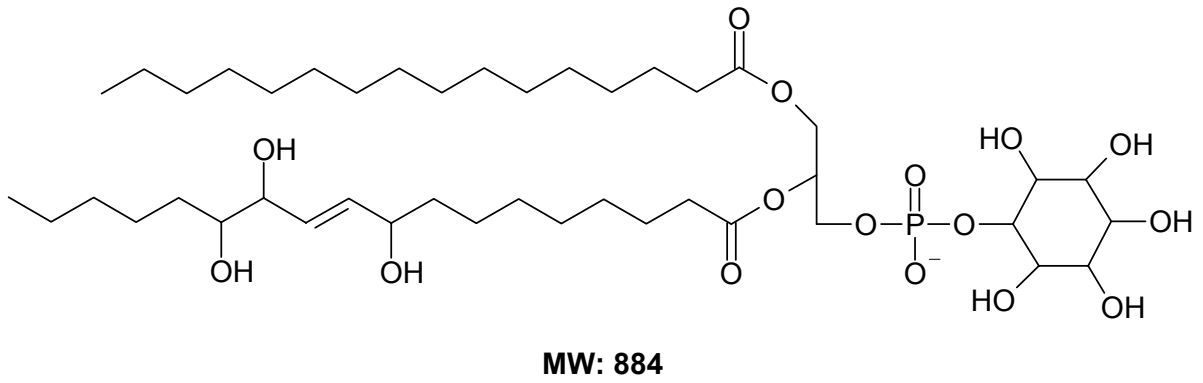
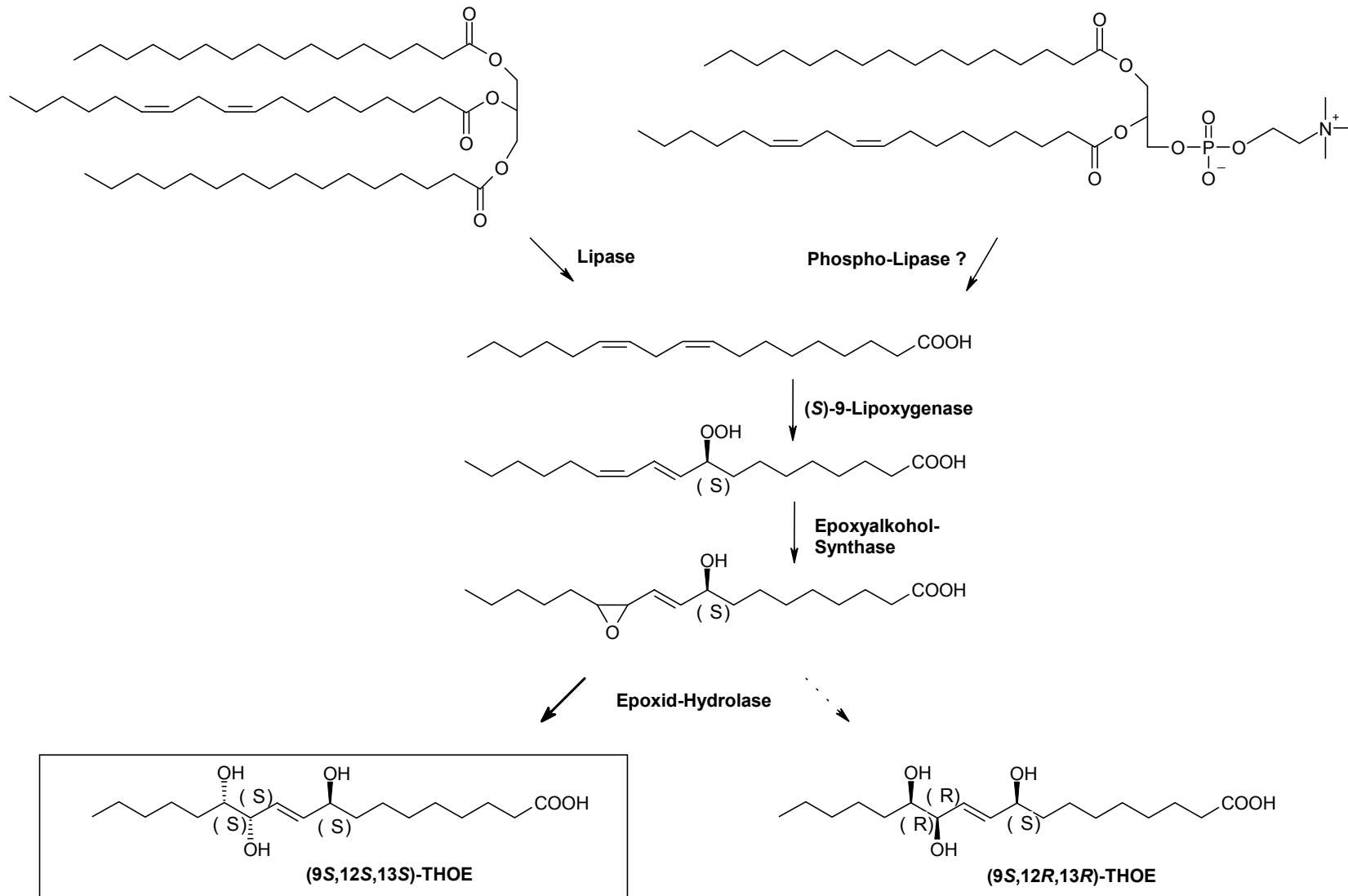
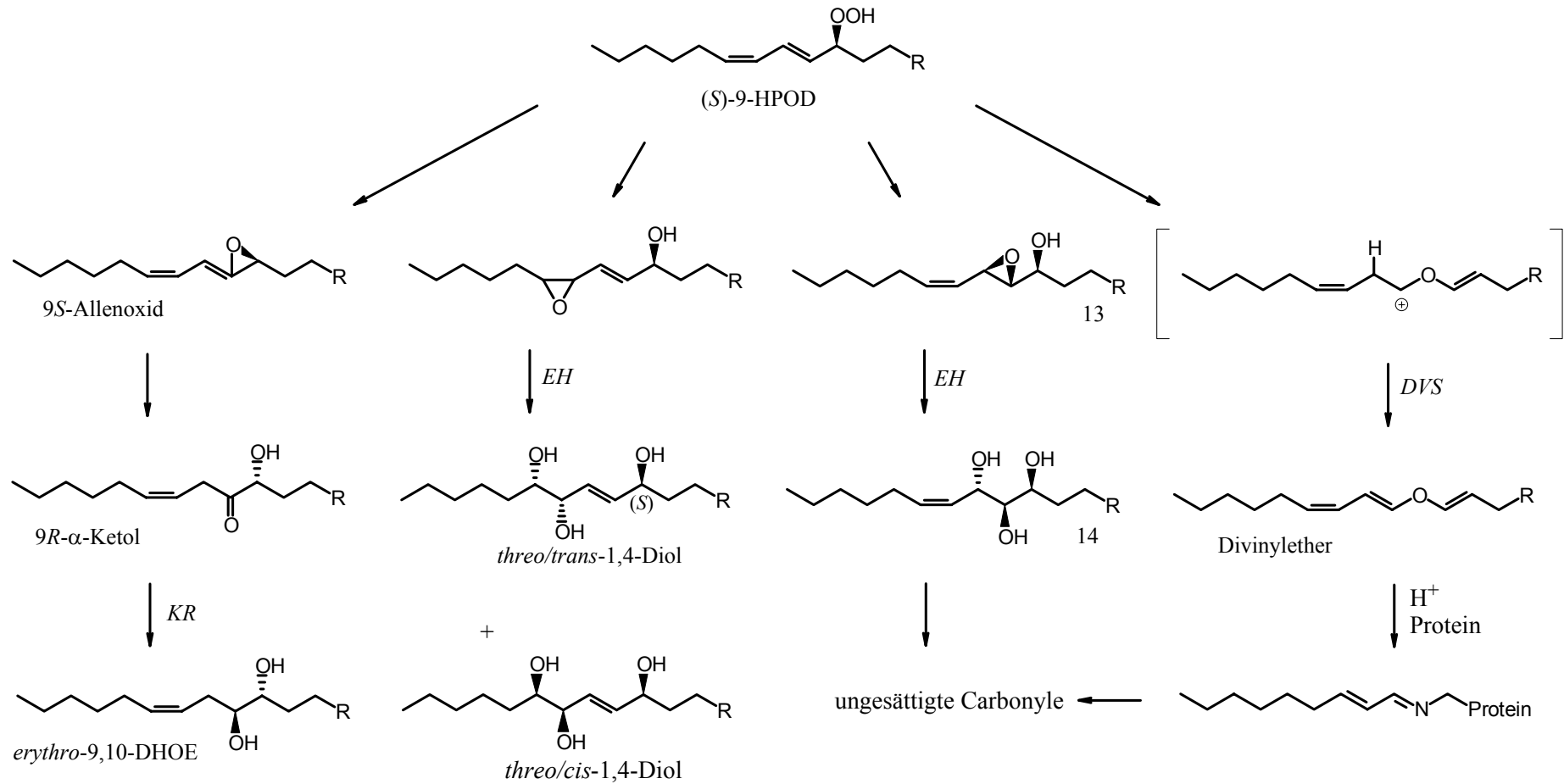


Abb. 18: 1-Palmitoyl-2-(9,12,13-trihydroxy-octade-10E-cenoyl)-phosphatidylinosite und 1-Stearoyl-2-(9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoyl)-phosphatidylinosite



Schema 1) Bildung isomerer THOE aus Lipiden



Schema 2) Abbauege von (S)-9-Hydroperoxy-10E,12Z-octadecadiensäure