

Analytik von Oxylipinen bei unterschiedlichen Ionisationsmethoden und fundamentale Analyse der Fragmentierungsprozesse in der Laser-Ionisation bei Atmosphärendruck

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

vorgelegt von
Stefan Hellhake

Bergische Universität Wuppertal
Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
Lebensmittelchemie, Physikalische und Theoretische Chemie
unter Leitung von
Prof. Dr. Nils Helge Schebb
und
Prof. Dr. Thorsten Benter

Wuppertal, August 2020

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20201127-115516-7

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20201127-115516-7>]

DOI: 10.25926/htjh-p397

[<https://doi.org/10.25926/htjh-p397>]

Erklärung

„Ich versichere, die Arbeit selbstständig verfasst zu haben, nur die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet zu haben, und dass die Dissertation in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung noch keiner anderen Fakultät, keiner Gesamthochschule und keiner anderen wissenschaftlichen Hochschule vorgelegen hat.“

Wuppertal, den

Stefan Hellhake

Danksagungen

Mein Dank gilt meinen Doktorvätern, Herrn **Prof. Dr. Nils Helge Schebb** und Herrn **Prof. Dr. Thorsten Benter** für die Möglichkeit diese Arbeit in Kooperation beider Arbeitskreise durchzuführen. Ich danke für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stetige Unterstützung bei der Umsetzung eigener Ideen.

Ich danke allen, mit denen ich im Laufe der Promotion wissenschaftlich zusammenarbeiten und diskutieren konnte. Diese Arbeit lebt durch ihre hohe Diversität an Themen, zu der jeder einzelne von Euch beigetragen hat. Besonders genannt seien hier **Dr. Sven Meckelmann, Dr. Hendrik Kersten, Dr. Katharina Rund, Benjamin Bogdanski, Ronald Giese, Michael Empl, Laura Kutzer, Nicole Hartung, Dr. Annika Ostermann und Kristina Leitmeier.**

Ebenfalls bedanke ich mich bei allen, die mir durch die nicht immer einfache Zeit der Promotion begleitet haben und mir als Freunde mit Rat und Tat zur Seite standen: **Alexander Haack, Marco Thinius, Christina Polaczek, Walter Wißdorf** und viele andere aus dem Arbeitskreis Physikalische und Theoretische Chemie, außerdem **Nadja Kampschulte, Malwina Mainka, Elisabeth Koch, Dieter Riegel und Claudia Steinhage.**

Ein Dank aus meinem Herzen werde meinem Freund und Kumpanen **Michael Krohn** zuteil. Vielen Dank, dass wir uns zusammen durch die schweren Zeiten des Studiums gequält, aber auch die schönen Seiten zusammen genossen haben! So wie wir beide als ständiges Paar einen bleibenden Eindruck in der BUW hinterlassen haben, hast du an meiner Seite ebenfalls einen bleibenden Eindruck hinterlassen – vielen Dank dafür!

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die es mir möglich gemacht haben diesen Laufweg einzuschlagen: Meiner Freundin **Maryvonne**, die es jeden Tag wieder mit mir aushält und mir immer zur Seite steht. Meinem Vater **Klaus** und meiner Mutter **Elisabeth**, die mich zu dem Menschen gemacht haben der ich bin und mir beigebracht haben, stets freundlich, engagiert und hilfsbereit zu sein. Meinen beiden Brüdern **Marius** und **Christoph**, die wir zusammen ein unschlagbares Trio abgeben!

Abstract

Eicosanoids and other oxylipins play important roles in mediating inflammation and other biological processes. In order to investigate their biological roles, comprehensive analysis methods are required, with which these compounds can be reliably identified and quantified in biological matrices. Very different concentrations and different biological matrices pose enormous challenges for the modern analysis of oxylipins. In the first part of this work, a combination of solid phase extraction, charge switch derivatization, liquid chromatography, ion mobility, mass spectrometry, and bioinformatics was used to developing a novel strategy for the analysis of oxylipins. After developing and characterizing the method, it was applied to the biological matrices of cells, serum, and plasma. The results were compared with current methods of analytics of oxylipins. Subsequently, further derivatization reagents were developed in order to expand the possible analysis spectrum via stable isotope labeled derivatives, derivatives for specific functional groups, or derivatives for other ionization methods such as laser ionization at atmospheric pressure (APLI).

In the second part of the thesis the APLI and the fundamental mechanisms of fragmentation during the ionization process were dealt with. In contrast to laser ionization at low pressure (multi photon ionization, MPI), APLI leads to very little fragmentation of the analytes. Both the quenching of highly excited states and the collision-induced loss of charge of the fragment ions by charge transfer were hypothesized as possible causes. These hypotheses have not been elucidated in the past to the extent that unequivocal conclusions were drawn. Through experiments and calculations with both APLI and MPI, this process was examined in more detail and basic knowledge was provided to clarify the fragmentation pathways.

Kurzzusammenfassung

Eicosanoide und andere Oxylipine spielen wichtige Rollen bei der Vermittlung von Entzündungen und anderen biologischen Prozessen. Für die Untersuchung ihrer biologischen Rollen sind umfassende Analysemethoden erforderlich, mit denen diese Verbindungen in biologischen Matrices zuverlässig identifiziert und quantifiziert werden können. Dabei stellen stark unterschiedliche Konzentrationen und verschiedene biologische Matrices eine große Herausforderung an die moderne Analytik von Oxylipinen dar. Im ersten Teil der Arbeit wurde durch Kombination von Festphasenextraktion, *charge-switch* Derivatisierung, Flüssigchromatographie, Ionenmobilität, Massenspektrometrie und Bioinformatik ein neuer Arbeitsweg zur Analyse von Oxylipinen entwickelt. Nach Ausarbeitung und Charakterisierung der Methode wurde diese für verschiedene biologische Matrices, d.h. Zellen, Serum und Plasma, eingesetzt und die Ergebnisse mit heutigen modernen Methoden der Analytik von Oxylipinen verglichen. Darauf aufbauend wurden weitere Derivatisierungsreagenzien entwickelt, um über stabilisotopen-markierte Derivate, Derivate für spezifische funktionelle Gruppen oder Derivate für andere Ionisationsmethoden wie der Laserionisation bei Atmosphärendruck (APLI), das mögliche Analysenspektrum zu erweitern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die grundlegenden Mechanismen der Fragmentierung während des APLI Ionisationsprozesses beschäftigt. Im Gegensatz zur Laserionisation bei Niederdruck (*multi photon ionisation*, MPI) führt die APLI zu einer sehr geringen Fragmentierung der Analyten. Als mögliche Ursachen dieser Beobachtungen wurden sowohl das Quenching hoch angeregter Zustände, als auch der Verlust der Ladung der Fragmentationen durch Ladungstransfer vermutet, jedoch in Vergangenheit nicht aufgeklärt. Durch Experimente und Berechnungen sowohl mit APLI als auch mit MPI wurde dieser Prozess genauer untersucht und grundlegende Erkenntnisse zur Aufklärung der Fragmentierung diskutiert.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Abbildungsverzeichnis	4
3	Tabellenverzeichnis	7
4	Motivation und Zielsetzung	8
5	Analytik von Oxylipinen per LC-ESI-MS/MS	10
5.1	Einleitung und Theorie	10
5.2	Ergebnisse und Diskussion	16
5.2.1	Einfluss des Eluenten-Modifiers auf die Analyse von Oxylipinen	16
5.2.2	Analyse von Oxylipinen nach <i>charge-switch</i> -Derivatisierung	22
5.2.2.1	Synthese von AMPP	23
5.2.2.2	Optimierung der Derivatisierung	27
5.2.2.3	Analysen per Tripel-Quadrupol-System	29
5.2.2.4	Messungen am IM-QTOF-MS	38
5.2.2.5	Einführung eines Bioinformatik-Arbeitsprozesses	49
5.2.3	Relative Quantifizierung von Oxylipinen	52
5.2.3.1	Synthese von $^2\text{H}_5$ -AMPP	52
5.2.3.2	Analysen am IM-QTOF-MSMS	57
5.3	Experimentelle Methoden	60
5.3.3	Synthese von AMPP	60
5.3.4	Synthese von $^2\text{H}_5$ -AMPP	61
5.3.5	Inkubation von Caco-2-Zellen	61
5.3.6	Festphasen-Extraktion	61
5.3.7	Derivatisierung	62
5.3.8	LC-IM-QTOF-MS(/MS)	63
5.3.9	LC-QqQ-MS (Sciex QTrap 6500)	63
5.4	Massenspektrometer und Flüssigchromatographen	63
5.5	Anhang: Fragmentspektren verschiedener Epoxy-PUFA nach Derivatisierung mit AMPP	66
6	Analysen zum Fragmentierungsprozess bei der Laserionisation und Nutzen für die Analytik von Oxylipinen	72
6.1	Einleitung und Theorie	72
6.2	Ergebnisse und Diskussion	80
6.2.1	Derivatisierung von Alkoholen und Fettsäuren	80
6.2.1.1	Synthese von APS und APOL	80
6.2.1.2	Optimierung der Derivatisierung	84

6.1.1	Derivatisierung von Epoxy-Fettsäuren	88
6.1.1	Derivatisierung von Dihydroxy-Fettsäuren.....	90
6.1.2	Analyse von Resolvinen per APLI	91
6.1.3	Fragmentierung bei APLI	93
6.1.3.1	<i>ab initio</i> -Berechnungen zur Fragmentierung bei der Laserionisation	93
6.1.4	Einfluss des Ionentransfers	96
6.1.5	Einfluss der Linsen-Positionierung.....	100
6.1.6	Einfluss der Leistungsdichte	103
6.1.7	Fragmentierung bei MPI.....	106
6.2	Fazit und Ausblick	109
6.3	Experimente	111
6.3.1	Synthesen und Derivatisierungen	111
6.3.1.1	3-Anthracen-9-yl-propansäure (APS).....	111
6.3.1.2	3-Anthracen-9-yl-propan-1-ol (APOL).....	112
6.3.1.3	Anthracen-9-ol.....	112
6.3.1.4	Anthracen-9-yl-thiol (AT)	112
6.3.1.5	Anthracen-9-yl-boronsäure	113
6.3.2	Fragmentierung bei APLI	113
6.3.3	Fragmentierung bei MPI.....	114
6.3.4	<i>ab initio</i> -Berechnungen.....	115
6.4	Geräte und Materialien	116
6.4.1	NMR	116
6.4.2	Massenspektrometer	116
6.4.3	Lasersysteme.....	116
6.4.4	Flüssigchromatographen.....	118
6	Chemikalien.....	119
7	Software.....	121
8	Literatur	122

1 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ALA	α -Linolensäure
AMF	<i>absorption multistep fragmentation</i>
AMPP	[4-(Aminomethyl)phenyl]pyridiniumchlorid
ARA	Arachidonsäure
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
APLI	<i>atmospheric pressure laser ionization</i>
APOL	3-Anthracen-9-yl-propan-1-ol
APPI	<i>atmospheric pressure photo ionization</i>
APS	3-Anthracen-9-yl-propansäure
AT	Anthracen-9-yl-thiol
CCS	<i>colission cross section</i>
COX	Cyclooxygenase
CV	<i>cone voltage</i>
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DFT	<i>density functional theory</i>
DHA	Docosahexaensäure
DI	Direktinjektion
DIA	<i>distribution of ion acceptance</i>
DIAV	<i>dynamic ion acceptance volume</i>
DIP	<i>direct insertion probe</i>
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMF	Dimethylfuran
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetat
EDC	Ethylendichlorid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i>
EPA	Eicosapentaensäure
ESI	<i>electrospray ionization</i>
EtOH	Ethanol
FA	<i>formic acid</i>

Abkürzungsverzeichnis

FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FIA	<i>flow injection analysis</i>
FE	<i>fragmentation energy</i>
GPR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HAc	<i>acetic acid</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
IM	<i>ion mobility</i>
IS	interner Standard
iTRAQ	<i>isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
IE	Ionisierungsenergie
KOtBu	Kalium-tert-butanolat
LA	Linolsäure
LC	<i>liquid chromatography</i>
LLOQ	<i>lower limit of quantification</i>
LOD	<i>limit of detection</i>
LOX	Lipoxygenase
MeOH	Methanol
MPI	<i>multi photon ionization</i>
MPIS	<i>multi purpose ion source</i>
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
Nd:YAG	<i>Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser</i>
NEAA	<i>non essential amino acids</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
pa	<i>peak area</i>
PAK	polyaromatischer Kohlenwasserstoff
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PG	Prostaglandin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PS	Phosphor-(V)-sulfid
PTP	Dipyridinium-1-yl-pentathiodiphosphonat
PUFA	<i>poly unsaturated fatty acid</i>
QTOF	<i>quadrupole time of flight</i>
QqQ	<i>triple-quadrupole</i>
REMPI	<i>resonance-enhanced multi photon ionization</i>

Abkürzungsverzeichnis

RP	<i>reversed phase</i>
RRKM	Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus
RT	<i>room temperature</i>
sEH	<i>soluble epoxide hydrolase</i>
SPE	<i>solid phase extraction</i>
SPM	<i>specialized pro-resolving mediator</i>
TD-DFT	<i>time-dependent density functional theory</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIC	<i>total ion chromatogram</i>
TPPU	<i>1-(1-propanoylpiperidin-4-yl)-3-(4-trifluoromethoxy)phenyl)urea</i>
Tx	Thromboxan
ULOQ	<i>upper limit of quantification</i>
UV	Ultraviolett
VIS	<i>visible</i>

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur Umsetzung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) Arachidonsäure (ARA),	11
Abbildung 2: Signalintensität von 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) bei unterschiedlichen pH-Werten nach Elektrosprayionisierung im negativen Modus ESI(-).	16
Abbildung 3: Peakfläche von 5 hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) bei unterschiedlichen pH-Werten nach Elektrosprayionisierung im negativen Modus ESI(-).....	17
Abbildung 4: Retentionsverhalten von 5-HETE bei unterschiedlichen pH-Werten im Eluenten.	18
Abbildung 5: Signalintensität von 5-HETE (100 nM) in Abhängigkeit der Pufferkonzentration (logarithmisch skaliert), gemessen per flow injection analysis (FIA) mit einem Fluss von 30 μ L/min und einer Eluentenzusammensetzung von Puffer/ACN (50/50, v/v) bei pH 6. Die Detektion erfolgte per MS/MS am Sciex 3200 QqQ.	19
Abbildung 6: Peakfläche von verschiedenen Hydroxy-PUFA in Abhängigkeit des pH-Wertes nach Elektrosprayionisierung im negativen Modus ESI(-).....	20
Abbildung 7: Direct infusion analysis (DIA) von unterschiedlichen EpETEs mit verschiedenen LC-Additiven.....	22
Abbildung 8: Reaktionsweg zum 4-[Aminomethyl]phenylpyridinium chloride (AMPP, Struktur 6) unter Durchführung einer Zincke-Reaktion und anschließender Abspaltung der Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure.	24
Abbildung 9: High resolution mass spectrometry (HRMS) Analyse des ersten Zwischenproduktes der AMPP-Synthese.....	24
Abbildung 10: HRMS Analyse des Syntheseproduktes 4-[Aminomethyl]phenylpyridinium chloride. Mit 185.1075 Da entspricht die akkurate Masse der Summenformel von AMPP mit $C_{12}H_{13}N_2$. Die Analyse erfolgte per FIA bei ESI(+).	25
Abbildung 11: Massenspektren von AMPP aus unterschiedlichen Syntheseanläufen.....	26
Abbildung 12: Beispielhafte Derivatisierung von 14(15)-EpETrE mit AMPP.	27
Abbildung 13: Umsetzungsverlauf der AMPP-Derivatisierung für 19,20-DiHDPE, 18-HEPE und 14(15)-EpETrE bei 24 °C; 40 °C und 60 °C über 80 Minuten.....	28
Abbildung 14: Signalintensitäten verschiedener EpETrEs bei unterschiedlichen cone voltages (CV).	30
Abbildung 15: Fragmentspektrum einer Verunreinigung aus dem Blindwert der Derivatisierungsreaktion.	31
Abbildung 16: Peakflächenverhältnis zwischen dem derivatisierten Analyt und dem internen Standard (Azure A) bei unterschiedlichen AMPP-Konzentrationen.....	32
Abbildung 17: Retentionszeit von 14(15)-EpETrE und 19(20)-DiHDPE bei unterschiedlichen Mengen SPE-Extraktes von Hühnerplasma und anschließender Derivatisierung mit AMPP.....	33
Abbildung 18: Fragmentspektrum von 14(15)-EpETrE nach Derivatisierung mit AMPP.....	34
Abbildung 19: Fragmentspektrum von 12-HETE und 19(20)-DiHDPE nach Derivatisierung mit AMPP.	35
Abbildung 20: Fragmentspektrum von 11(12)-EpETrE nach Derivatisierung mit AMPP.....	36

Abbildung 21: Fragmentspektren von (Z,Z,Z,Z,E)-18-HEPE (links) und (Z,Z,Z,E,E)-18-HEPE (rechts) nach Derivatisierung mit AMPP.	37
Abbildung 22: Flüssigchromatographische Trennung von 52 Hydroxy-, Dihydroxy- und Epoxy- PUFA der linoleic acid (LA) und α -linoleic acid (ALA) (A), ARA (B), DHA (C) und EPA (D) nach Derivatisierung mit AMPP.	39
Abbildung 23: (A) Ermittelte collision cross sections (CCS) von Epoxy- und Dihydroxy-PUFA der Vorläuferfettsäuren LA, ALA, ARA, DHA und EPA nach Derivatisierung mit AMPP.	42
Abbildung 24: Mögliche räumliche Struktur von 17,18-DiHETE unter Wechselwirkung der vicinalen Diolgruppe mit dem positiv geladenen Stickstoff der AMPP-Gruppe und die daraus resultierende Ringbildung des Moleküls.	43
Abbildung 25: Trennung eines coeluerenden und isobaren Ionenpaars (m/z 479.3332) in humanem Plasma mittels IM-QTOF-MF(/MS).	44
Abbildung 26: Quantifizierung derivatisierter Epoxy-PUFA der ARA in CaCo-2-Zellen inkubiert mit und ohne TPPU, ein sEH-Inhibitor.	45
Abbildung 27: Quantifizierung von Hydroxy- (oben), Dihydroxy- (mitte) und Epoxy- (unten) PUFA in humanen Plasma (links), Serum 1 (mitte) und Serum 2 (rechts)	47
Abbildung 28: Strukturformel von 10-hydroxy-8-octadecenoic acid derivatisiert mit AMPP als möglicher identifizierter Analyt in humanem Blutplasma.	51
Abbildung 29: HRMS Analyse des ersten Zwischenproduktes der ^5H -AMPP-Synthese.	53
Abbildung 30: HRMS Analyse des Syntheseproduktes der ^5H -AMPP-Synthese (oben) im direkten Vergleich zum AMPP (unten).	53
Abbildung 31: Flüssigchromatographische Trennung eines EpETrEs-Standardgemisch 1 μM nach Derivatisierung mit AMPP und $^2\text{H}_5$ -AMPP.	54
Abbildung 32: Peakflächenverhältnis verschiedener EpETrEs zwischen Derivatisierung mit $^2\text{H}_5$ -AMPP und Derivatisierung bei einer 2,4-fachen Menge von $^2\text{H}_5$ -AMPP. Analysiert wurden 10 μL eines 1 μM Standards am Micromass QqQ nach Trennung auf einer Kinetex C8 Säule mit einem angesäuerten Eluenten aus H_2O /Wasser.	55
Abbildung 33: LC-MS/MS Analyse zweier identischer Oxylipinstandards nach Derivatisierung mit AMPP oder $^2\text{H}_5$ -AMPP.	56
Abbildung 34: Fragmentspektrum von 14(15)-EpETrE ohne (links) und mit Derivatisierung mit AMPP (mitte) und $^2\text{H}_5$ -AMPP (rechts).	57
Abbildung 35: Repräsentative relative Quantifizierung verschiedener HEPEs in Caco-2-Zellen mit und ohne TPPU-Inkubation nach $^2\text{H}_5$ -AMPP- und AMPP-Derivatisierung mit paralleler Probenanalyse unter Verwendung eines iTRAQ-ähnlichen Ansatzes	58
Abbildung 36: Jablonski-Diagramm zum [1+1]-REMPI-Prozess und dem ladder-switch-Mechanismus Beispielhaft für Benzen [145, 148].	74
Abbildung 37: Auftragung des Zerfallsrate des Zerfallskanal des Benzen-Ions C_6H_6^+ zu den Fragmenten C_4H_4^+ und C_2H_2 in Abhängigkeit der internen Energie des Ions.	77
Abbildung 38: Syntheseweg zur 3-Anthracen-9-yl-propansäure (APS) ausgehend vom Anthron	81
Abbildung 39: ^1H -NMR (400 Hz) des synthetisierten APS in d_1 -Chloroform mit Zuordnung der Banden.	82

Abbildung 40: Syntheseweg zum 3-Anthracen-9-yl-propan-1-ol (APOL) ausgehend vom APS	82
Abbildung 41: ¹ H-NMR (400 Hz) des synthetisierten APOL in d1-Chloroform mit Zuordnung der Banden.	83
Abbildung 42: Beispielhafte Derivatisierung über Veresterung von Hexanol mit APS (oben) und Hexansäure mit APOL (unten).	83
Abbildung 43: LC-UV Trennung des Derivatisierungsgemisches mit DCC (640 nM), DMAP (140 nM), APOL (280 nM) und Hexansäure (940 nM) direkt nach dem Zusammengeben.	84
Abbildung 44: LC-UV Trennung des Derivatisierungsgemisches mit DCC (640 nM), DMAP (140 nM), APOL (280 nM) und Hexansäure (940 nM) nach 60 Minuten bei RT.	85
Abbildung 45: Umsetzung der Phenylhexansäure (oben) und Bildung des Reaktionsproduktes (unten) aus Phenylhexansäure (0,6 µM) bei der Derivatisierung mit APOL (3,0 µM) mittels DCC (30 µM) und DMAP (4 µM).	86
Abbildung 46: Massenspektren von APS (links) und APOL (rechts).	87
Abbildung 47: Massenspektrum von mit APS derivatisierten Butanol (m/z 306).	87
Abbildung 48: Synthesevorschlag ausgehend vom Anthron zum Anthracen-9-yl-thiol [189].	88
Abbildung 49: Synthesevorschlag zum Anthracen-9-yl-thiol über das Dipyridinium-1-yl-pentathiodiphosphonat und Anthron.	89
Abbildung 50: Massenspektrum von Anthracen-9-yl-thiol (AT).	89
Abbildung 51: BLS.	90
Abbildung 52: Massenspektren von 14,15-DiHETE derivatisiert mit Anthracen-9-yl-boronsäure.	91
Abbildung 53: Strukturformel von Resolvin D1 (7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenoic acid).	92
Abbildung 54: LC-UV-APLI-TOF Analyse von Resolvin D1 (links) und Fluoren (rechts).	92
Abbildung 55: Absorptionsspektrum von Anthracen und Anthracen-9-carbaldehyd nach [201].	94
Abbildung 56: ab initio-Kalkulation des Absorptionsspektrums von APS über Gaussian09.	94
Abbildung 57: Ab-initio Kalkulation der Potentialkurven von Grund- und Anregungszustand von [APS ⁺] entlang der C-C Koordinate des Bindungsbruchs zu m/z 191 (per TD-DFT).	95
Abbildung 58: Anteil des EIC am TIC (links) und absolute EIC (rechts) von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit des Potentials zwischen Capillary Exit und Skimmer 1.	97
Abbildung 59: Anteil des EIC am TIC (links) und absolute EIC (rechts) von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit des Potentials zwischen Skimmer 1 und Hexapol1/Skimmer 2.	97
Abbildung 60: Anteil des EIC am TIC (links) und absolute EIC (rechts) von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit des Potentials zwischen Hexapol1/Skimmer 2 und Hexapol 2 bzw. den Ionenlinsen.	98
Abbildung 61: Zeitintervalle innerhalb eines Pulses am Bruker MircOTOF [206].	99

Abbildung 62: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Transition Time.....99

Abbildung 63: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit von der Entfernung des Brennpunktes des Laserbeams vom MS-Eingang. 101

Abbildung 64: relative EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit von der Entfernung des Brennpunktes des Laserbeams vom MS-Eingang. 101

Abbildung 65: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit von der Entfernung des Brennpunktes des Laserbeams vom MS-Eingang nach Beschädigung des Quarzsglases. 102

Abbildung 66: Beschädigungen des Quarzsglases durch den fokussierten Nd:YAG (links) und KrF* Excimer Laser (rechts) unter dem Vergrößerungsglas..... 103

Abbildung 67: APLI-Massenspektren von APS bei unfokussiertem (links) und fokussiertem (rechts) Laserstrahl. 104

Abbildung 68: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Leistungsdichte des Laserbeams. 105

Abbildung 69: Relative EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Leistungsdichte des Laserbeams. 105

Abbildung 70: Relative EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Leistungsdichte des Laserbeams. 106

Abbildung 71: Absolutes (links) und relatives Massenspektrum (rechts) von APS bei unterschiedlichen Laserleistungen..... 107

Abbildung 72: Skizze des Ionenstrahls im Bruker MicrOTOF. 114

Abbildung 73: Systemumbau des Sektorfeld-MS zur Einführung des Laserstrahls zur MPI 115

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: LC-IM-QTOF-MS(/MS) Parameter für 52 Oxylipine nach Derivatisierung mit AMPP.40

Tabelle 2: Mögliche Identifizierung von 10-hydroxy-8-octadecenoic acid in humanem Blutplasma nach Extraktion und Derivatisierung mittels LC-IM-QTOF-MS(/MS).50

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erworbenen Chemikalien... 119

4 Motivation und Zielsetzung

Die biologischen Funktionen der Oxylipine spielen wichtige Rollen bei vielen physiologischen Prozessen im menschlichen Körper. Dabei sind selten einzelne Oxylipine entscheidend, vielmehr ist das endogene Oxylipinprofil insgesamt zu betrachten. Durch Aufnahme von omega-3 Fettsäuren resultierende Änderungen in diesem Profil und deren physiologische Bedeutung sowie Mechanismen, die einzelne Enzymwege zu modulieren, sind jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Um diese Prozesse besser zu verstehen, ist eine genaue Analytik dieser Lipide wichtig, um Änderungen im Lipidom durch unterschiedliche Einflüsse und Prozesse genau erkennen zu können. Ein vollständig aufgeklärter physiologischer Prozess erlaubt es, eintretende Fehlfunktionen, wie ein physiologischer Mangel oder eine Erkrankung direkt zu erkennen, oder präventiv gegen diese vorzugehen. Die Analytik von Oxylipinen stellt dabei hohe Anforderungen an die Analysemethoden, zum einen durch große Konzentrationsunterschiede von vier Größenordnungen und mehr, als auch durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Analyten, die zum Teil als Regioisomere nur schwer zu unterscheiden sind. Um diese chromatographisch zu trennen, wird oftmals auf eine Flüssigchromatographie-Methode unter sauren Bedingungen zurückgegriffen. Die sauren Bedingungen verhindern ein Deprotonieren der Fettsäuren während der Trennung und vermindert so unerwünschte Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und dem Analyten in geladener Form. Der niedrige pH-Wert im Eluenten vermindert jedoch die Effizienz der Bildung der $[M-H]^-$ -Ionen bei der folgenden Elektrosprayionisation im negativen Modus (ESI(-)). Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich daher mit dem Einfluss dieses Effektes auf die Analyse von Oxylipinen und einer Verbesserung der Analyse durch das Etablieren neuer Techniken. Eine weitere Möglichkeit die verminderte Ionisierungseffizienz durch den niedrigen pH-Wert des Eluenten zu umgehen, ist eine Analyse der Analyten bei ESI(+). Daher wurde eine analytische Methode und Probenaufarbeitung für eine *charge-switch* Derivatisierung entwickelt, um die Oxylipine der ESI(+) zugänglich zu machen. Diese wurde charakterisiert, für verschiedene biologische Matrices getestet und mit anderen etablierten Methoden verglichen. Des Weiteren wurde die bereits bekannte Derivatisierungstechnik um eine Stabilisotopen-markierte Variante des Derivats erweitert und eine Synthesestrategie für diesen Marker entwickelt. Dieser wurde genutzt, um in einem *isobaric tags for relative and absolute quantitation* (iTRAQ)-ähnlichen Ansatz eine relative Quantifizierung von Oxylipinen zu ermöglichen. Abschließend wurde die Methode um einen bioinformatischen Ansatz erweitert, um computergestützt eine Auswertung der Messdaten für den *non-targeted*-Bereich zu schaffen.

Da unter den Oxylipinen auch Analyten wie die Resolvine vertreten sind, die mehrere konjugierte Doppelbindungen in der Fettsäurekette enthalten, besteht bei ausreichender optischer Absorption die Möglichkeit, diese per resonanzverstärkter Mehrphotonenionisation (*resonance enhanced multi photon ionization* (REMPI)) zu ionisieren. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, inwiefern diese Ionisierungsmethode für die Analyse von Oxylipinen geeignet ist. Die Laserionisation bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure laser ionization* (APLI)) stellt eine sensitive und selektive Ionisationsmethode für polyaromatische Analyten dar. Da Oxylipine oft in anspruchsvollen biologischen Proben wie Plasma oder Serum vorkommen, kann die APLI eine sensitive Ionisierungsmethode für diese Analyten darstellen. Daher wurde in einem ersten Versuch untersucht, ob die APLI eine geeignete Ionisationsmethode für die Resolvine darstellt. Ein Großteil der Oxylipine ist der APLI auf Grund der fehlenden, polyaromatischen Struktur allerdings nicht zugänglich. In einem zweiten Schritt wurden daher verschiedene Derivatisierungen untersucht, um Oxylipine der APLI zugänglich zu machen. Hierbei wurde zum einem auf bereits bekannte Derivate zurückgegriffen, um eine universale Derivatisierung aller Oxylipine zu testen. Dazu wurde die Carbonsäuregruppe der Analyte mit einem alkoholischen Derivat verestert, um das benötigte Ionophor in das Molekül einzubringen. Über diese Derivatisierung können in anspruchsvollen Proben mit komplexen biologischen Matrices gezielt Carbonsäuren derivatisiert und analysiert werden. In einem weiteren Schritt wurden Derivatisierungsreagenzien für die Derivatisierung spezifischer funktioneller Gruppen entwickelt, eine Syntheseroute erarbeitet und getestet. Hierbei dienten die bei Oxylipinen häufig vorkommenden Epoxy-Gruppen und vicinalen Diol-Gruppen als Ankerpunkt für das Derivat. Diese Derivatisierungen selektieren die detektierbaren Analyten noch weiter, was zu einer vereinfachten und sensitiveren Analyse für diese Substanzklassen führt. Abschließend wurden grundlegende Arbeiten zur Analyse der Fragmentierungen in der APLI durchgeführt. Wie oben beschrieben, ist durch Laserionisation bei atmosphärischem Druck kaum oder nur wenig Fragmentierung der Analyten zu beobachten. Es ist daher anzunehmen, dass mögliche hoch angeregten ionische Zustände durch Kollision mit dem Hintergrundgas auf das elektronische Grundniveau deaktiviert werden und dadurch eine starke Fragmentierung der Analyten verhindert wird. Bei Berücksichtigung der Zeitskalen dieser Reaktionen sollte es jedoch trotzdem möglich sein, die Ionen bei sehr hohen Leistungsdichten zu fragmentieren. Es stellte sich daher die Frage, ob die Deaktivierung der angeregten ionischen Zustände tatsächlich stattfindet oder aber eine direkte Fragmentierung der Ionen auftritt, die Fragmente allerdings nicht detektiert werden können, weil sie entweder zu klein oder aber zu reaktiv sind, um in den Analysator gelangen zu können. Um Aufschluss zu dieser fundamentalen Frage zu erlangen, wurde eine Kombination aus theoretischen Berechnungen und praktischen Experimenten durchgeführt.

5 Analytik von Oxylipinen per LC-ESI-MS/MS

5.1 Einleitung und Theorie

Oxylipine sind Oxidationsprodukte von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*poly unsaturated fatty acid* (PUFA)), welche enzymatisch Arachidonsäurekaskade oder durch Autoxidation gebildet werden und wichtige Rollen als biologisch aktive Lipidmediatoren einnehmen [1–3]. In Reaktion auf äußere Reize, wie zum Beispiel eine entzündliche Verletzung, werden PUFA und Oxylipine durch Phospholipasen aus Phospholipiden der Zellmembranen freigesetzt und wirken auf Grund ihrer begrenzten Lebensdauer meist entweder auf parakrinem Wege auf benachbarte Zellen oder autokrin auf die produzierende Zelle selbst [4–7]. Viele Oxylipine vermitteln ihre Wirkung dabei über spezifische Membranrezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPR)) oder nukleäre Rezeptoren (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren), welche jeweils eine zentrale Rolle unter anderem in der Biologie der Adipozyten spielen [4, 8]. Aber auch andere Wirkmechanismen auf die Membranionenkanäle, wie dem kalziumsensitiven Kaliumkanal (K_{Ca}), oder auf die intrazellulären Signalübertragungswege, wie dem spezifischen Transkriptionsfaktor NF κ B, sind bekannt [9, 10]. Einige PUFA gehören somit zu den „essentiellen“ Fettsäuren, da sie für eine normale Entwicklung erforderlich sind und ihre endogene Synthese begrenzt ist [11].

Neben der namensgebenden omega-6-Fettsäure Arachidonsäure (ARA, C20:4) stehen ebenfalls die omega-6 Fettsäure Linolensäure (LA, 18:2), sowie die omega-3-Fettsäuren α -Linolensäure (ALA, C18:3), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) und die Docosahexaensäure (DHA, C22:6) der Arachidonsäurekaskade als Edukte zur Bildung dieser Mediatoren zur Verfügung. Die Fettsäuren EPA und DHA erlangten erstmals in den späten 1970er Jahren Aufmerksamkeit, als ein vermindertes Herzinfarktrisiko bei grönländischen Inuit festgestellt wurde, welches mit ihrer stark fisch-lastigen Ernährung und der damit einhergehenden verstärkten Aufnahme von omega-3-Fettsäuren assoziiert wurde [12]. Seither konnte die Aufnahme von omega-3-Fettsäuren mit verschiedenen positiven Effekten auf Arteriosklerose und daraus resultierenden Erkrankungen in Verbindungen gebracht werden [13]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme dieser PUFA einen Einfluss auf verschiedene Mechanismen in der Entzündungsreaktion hat [14]. Bis heute werden diese und weitere Effekte kontrovers diskutiert und viele Fragen zur klinischen Bedeutung der Wirkmechanismen verschiedener Oxylipine sind unbeantwortet [15].

Die Umwandlung der PUFA in der Arachidonsäurekaskade erfolgt, neben der Autoxidation, über drei verschiedene enzymatische Wege: Die Umsetzung über Cyclooxygenasen (COX), Lipoxigenasen (LOX) und Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP). Die daraus gebildeten

primären Produkte können anschließend durch verschiedene Enzyme weiter verstoffwechselt werden und eine Vielzahl an unterschiedlichen Produkten bilden (**Abbildung 1**).

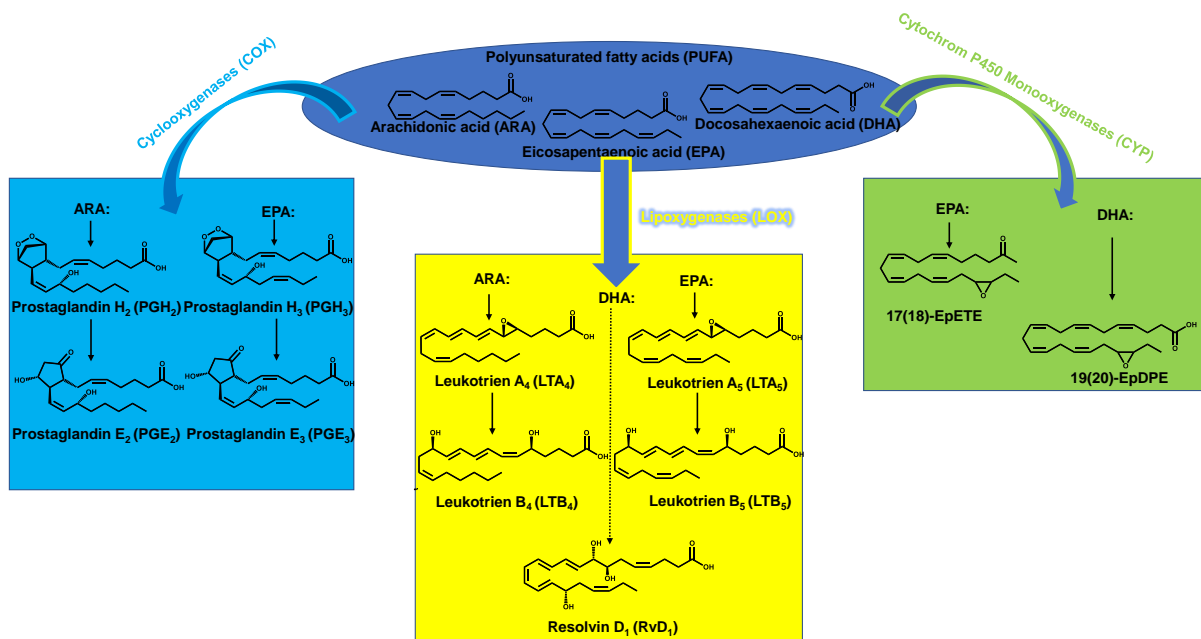


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur Umsetzung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) durch die drei enzymatischen Wege der Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX) und Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP) in der Arachidonsäurekaskade

In einem Zweig dieser Kaskade werden die PUFA durch die COX in verschiedene Prostaglandine (PG) und Thromboxane umgesetzt (siehe blaue Markierung in **Abbildung 1**). Während als Substrat für die COX-1 hauptsächlich die Arachidonsäure fungiert, kann die COX-2 auch sehr effizient andere PUFA wie EPA umsetzen [16, 17]. So kann die ARA durch COX zum Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgesetzt werden, welches über weitere Enzyme zu verschiedenen Serie-2-Prostanoiden wie dem Prostaglandin E₂ (PGE₂) metabolisiert wird und als wichtiger Mediator bei Fieber, Schmerz und Entzündung fungiert [2, 14, 18]. Die Umsetzung von EPA durch die COX führt zu den weniger potenten Serie-3-Prostanoiden wie dem PGE₃, welches unter anderem ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entzündung einnimmt und dort anti-inflammatorisch wirkt [19–21].

Ein weiterer Zweig der Arachidonsäurekaskade beschreibt die Umsetzung der PUFA durch die LOX über die Zwischenstufe der Hydroperoxide zu verschiedenen Leukotrienen (LT) und Lipoxinen, und auch zu einfachen Hydroxy-PUFA (siehe gelbe Markierung in **Abbildung 1**) [22–25]. Beispielhaft hierfür ist die Umsetzung von ARA durch die 5-Lipoxygenase über das Leukotrien A₄ (LTA₄) zum Leukotrien B₄ (LTB₄), welches ebenfalls als wichtiger Mediator in der Entzündung pro-inflammatorisch wirkt [26–28]. Analog zu der ARA kann auch die EPA beispielhaft über diesen Weg metabolisiert werden, was zum LTB₅ führt [29, 30]. Dieses wirkt ähnlich dem LTB₄, ist im direkten Vergleich zu diesem aber deutlich weniger potent [30].

Weitere wichtige Produkte dieses Zweigs der Arachidonsäurekaskade sind zum Beispiel die einfachen Hydroxyfettsäuren *15-Hydroxyeicosatetraenoic acid* (15-HETE) aus ARA oder *5-Hydroxyeicosapentaenoic acid* (5-HEPE) aus EPA [31–33].

Als Mediator hemmt 15-HETE etwa die LTB₄-induzierte Chemotaxis menschlicher Neutrophile [33]. 5-HEPE wirkt unter anderem als potenter Antagonist des GPR 119 und verstärkt somit die glukoseabhängige Insulinsekretion [31].

Mehrfache Hydroxylierung von EPA und DHA kann weiter zu den so genannten spezialisierten pro-auflösenden Mediatoren (*specialized pro-resolving mediators* (SPM)) wie den Resolvinen oder Maresinen führen, eine Gruppe von potenten entzündungsauflösenden Oxylipinen (siehe gelbe Markierung in **Abbildung 1**) [34]. Das Auflösen von Entzündungen wurde lange Zeit für einen passiven Prozess durch die Verdünnung der beteiligten *chemoattractants* gehalten [35]. Neuere Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass es sich hierbei um einen aktiven Prozess handelt, bei dem Oxidationsprodukte der EPA und DHA, wie das Resolvin D1, eine wichtige Rolle spielen [34, 36–38].

Die Umsetzung der PUFA durch verschiedenen CYP führt sowohl zu Hydroxy- als auch Epoxy-Metaboliten der Fettsäuren (siehe grüne Markierung in **Abbildung 1**). So werden sowohl EPA als auch DHA durch CYP der 2C und 2J Familie epoxygeniert, was unter anderem zu den biologisch aktiven Produkten *17(18)-epoxy eicosatetraenoic acid* (17(18)-EpETE) und *19(20)-epoxy docosapentaenoic acid* (19(20)-EpDPE) führt [39]. Beide Oxylipine sind als anti-arrhythmische Mediatoren aktiv und sind damit wichtige Mediatoren im kardiovaskulärem System [40, 41]. Die primären Metabolite der CYP-Umsetzung können über verschiedene Enzyme zu weiteren, biologisch aktiven Metaboliten verstoffwechselt werden. So können die Epoxy-PUFA durch die löslichen Epoxidhydrolasen (*soluble epoxide hydrolase*, sEH) in weniger chemisch reaktive Metabolite mit erhöhter Wasserlöslichkeit und anderer biologischer Aktivität umgewandelt werden [42, 43]. Die aus der ARA durch CYP gebildete *14(15)-epoxy eicosatrienoic acid* (14(15)-EpETrE) kann so zum Beispiel durch die sEH zur *14,15-dihydroxy eicosatrienoic acid* (14,15-DiHETrE) metabolisiert werden [44, 45]. Es wird vermutet, dass 14(15)-EpETrE zusammen mit den anderen Regioisomeren der EpETrEs unter anderem regulierende vaskuläre Funktionen ausübt und vasodilatorisch, anti-inflammatorisch und antioxidativ wirkt [46]. Durch das Metabolisieren in die biologisch weniger aktiven DiHETrEs hat die sEH somit aktiv Einfluss auf vaskuläre, kardiale, pulmonale und renale Prozesse [42, 46–48]. Um diese physiologischen Prozesse und die Wirkung der sEH genauer zu untersuchen, kann unter anderem die Enzymaktivität der sEH mit verschiedenen Inhibitoren unterdrückt werden. Bekannte und genutzte Inhibitoren für die sEH sind zum Beispiel *12-(3-adamantan-1-yl-ureido)-dodecanoic acid butyl ester*, *1-adamantan-3-(5-(2-(2-ethylethoxy)ethoxy)pentyl)urea* oder *1-(1-propanoylpiperidin-4-yl)-3-(4-trifluoromethoxy)phenyl)urea* (TPPU) [49–51]. Das zuletzt genannte TPPU wird dabei oftmals auf Grund seiner guten

Wirksamkeit, Pharmakokinetik und biologischen Aktivität genutzt [52–55]. Mit einer Inhibitionskonstante K_i von 0.9 ± 0.1 nM im niedrigen, nanomolaren Bereich und langsamer Dissoziationskonstante $K_{off} = 10.5 * 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ gehört das TPPU zu den sehr potenten Inhibitoren für die humane sEH [54, 55].

Oxylipine können in unterschiedlichen Gewebetypen gefunden werden [5]. Dies führt zu einer großen Breite an Probenmaterialien die für die Oxylipinanalytik genutzt werden. Zellen verschiedener Gewebe sind dabei sehr selektiv bezüglich der Bildung einiger Oxylipine. So wird das Thromboxan A₂ (TxA₂) hauptsächlich in Blutplättchen produziert, während das Endothel die Hauptquelle für das Prostaglandin I₂ (PGI₂) ist [5]. Neben *in vivo* Studien stehen der Wissenschaft unterschiedliche Zellmodelle für *in vitro* Untersuchungen zur Verfügung, um den Einfluss von und auf Oxylipine zu untersuchen. Ein geeignetes, oft genutztes Modell ist neben der humanen Leberkrebs-Zelllinie Hep G2 das CaCo-2-Modell (Carcinoma Colon) [56, 57]. Die Zellen der Dickdarmtumor-Zelllinie bilden einen epithelartigen Monolage, die durch Schlussleisten eng verbunden ist und somit die Barriere des Gastrointestinaltraktes nachstellt. So können sowohl Forschungen zur Resorption im Gastrointestinaltrakt nachgestellt werden, als auch die Veränderung des Lipidoms durch unterschiedliche Einflüsse untersucht werden. Weitere oft genutzte Probenmatrices sind etwa Blut-Serum oder -Plasma [58].

Die unterschiedlichen Oxidationsmöglichkeiten der verschiedenen PUFA resultieren in einer großen Anzahl strukturell zum Teil sehr unterschiedlicher oder sehr ähnlicher Oxylipine. Diese strukturelle Diversität, zusammen mit Konzentrationen im sub-nanomolaren-Bereich bis hin zum mikromolaren-Bereich in biologischen Proben stellt eine große Herausforderung an moderne analytische Methoden für Oxylipine dar [5, 59, 60]. Die zu erfassenden biologischen Proben sind oft flüssig oder umfassen flüssige Extrakte, weshalb sich zusammen mit dem hohen Dampfdruck der Oxylipine die Flüssigchromatographie als erste Trenndimension anbietet. Auf Grund ihrer Polarität lassen sich Oxylipine sehr gut auf Umkehrphasen-Chromatographiesäulen trennen, weshalb die Analyse von Oxylipinen in aktuellen Studien üblicherweise über Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (engl. *reversed phase liquid chromatography*, RP-LC) erfolgt [61–64]. Während der RP-LC-Trennung können deprotonierte Oxylipine dabei die Trennung der Analyten verschlechtern, indem unter anderem die negativ geladenen Ionen vermehrt mit der (polaren) mobilen Phase und weniger mit der unpolaren stationären Phase wechselwirken. Ebenfalls kann es zu unerwünschten Wechselwirkungen der ionischen Strukturen mit ungeschützten Silanol-Gruppen der Festphase kommen. Dies kann zu asymmetrischen Peakformen wie Vorlauf (engl. *fronting*) oder Nachlauf (engl. *tailing*) der Analyten führen, welches die Trennung deutlich erschwert [65]. Für eine optimale chromatographische Trennung der Oxylipine wird daher ein saurer Modifier in Form einer flüchtigen Säure wie Ameisensäure oder Essigsäure für den Eluenten verwendet, um die

Fettsäuren und ihre Derivate wähen der Trennung in ihrer nicht-dissoziierten Form zu halten [59, 60, 64, 66].

In Kombination mit RP-LC bietet sich für die Oxylipine im Anschluss eine Ionisierung per Elektrosprayionisation (ESI) bei negativer Polarität als sanfte Ionisationsmethode an. Da die Oxylipine in ihrer nicht-veresterten Form weiterhin die saure Carboxygruppe des Fettsäurevorläufers tragen, können diese bei ESI(-) durch die Abspaltung des Protons an der Carbonsäuregruppe einfach zum $[M-H]^-$ ionisiert werden [5, 67]. Bei der ESI(-) kommt es dann durch das angelegte elektrische Feld zu einer Ladungsanreicherung der negativ geladenen Ionen am Meniskus der Kapillare unter Ausbildung eines Taylor-Konus [68]. Im Folgenden kommt es zur Destabilisierung des Meniskus und zur Ausbildung eines flüssigen Sprays mit geladenen Tröpfchen. Die positiven Gegenionen im Eluenten erfahren eine elektrochemische Entladung an der Kapillaroberfläche oder durch die negativen Ionen in Lösung. Die Anwesenheit der positiven Ionen des sauren Eluenten hemmt dabei die Bildung der negativen Analytionen während des Ionisationsprozesses [69–71].

Die Kombination von Chromatographie und Massenspektrometrie hat sich als geeignet erwiesen, verschiedene Oxylipin-Isomere in unterschiedlichen biologischen Proben empfindlich und selektiv zu identifizieren und zu quantifizieren [5, 72–74]. Da die Gruppe der Oxylipine strukturell aber sehr ähnliche Moleküle wie unterschiedliche Regioisomere beinhaltet, ist eine einfache Analyse per Massenspektrometrie (MS) nicht ausreichend, um die unterschiedlichen Analyte unterscheiden zu können. Daher wird heutzutage auf tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) zurückgegriffen. Als Analysator wird üblicherweise ein *triple quadrupole* (QqQ) genutzt. Dieser bietet den Vorteil von hohen Transmissionsraten und hoher Effizienz bei günstiger Anschaffung und einfacher Bedienung im Vergleich zu etwa Sektorfeld-Massenspektrometern [75]. Die $[M-H]^-$ können hierbei im zweiten Quadrupol kollisionsinduziert aktiviert werden, was bei entsprechenden Parametern zur Fragmentierung der Oxylipin-Ionen führt. Aus dem Fragmentspektrum können spezifische Produktionen genutzt werden, um eine sensitive Analyse per *multiple reaction monitoring* (MRM) zu ermöglichen [76]. Durch die Auswahl spezifischer Transitionen ist es modernen QqQ-Systemen so möglich, über hundert Analyte in einem Analyseprotokoll zu erfassen [41, 64, 67]. Die Detektion fragmentierter Oxylipine ermöglicht es weiterhin, einen Rückschluss auf die Position der funktionellen Gruppen auf dem Kohlenstoffrückgrat der Vorläufer-PUFA zu ziehen. Somit können unterschiedliche Regioisomere, welche ansonsten als isobare Analyte kaum zu trennen sind, unterschieden werden. Neben einigen spezifischen Fragmenten die bei dem Zerfall der Oxylipine entstehen, werden ebenfalls unspezifische Fragmente gebildet, welches bei der Auswahl der Transition nach chromatographischer Trennung beachtet werden muss [5, 77].

Einen Nachteil, den die Nutzung von MRM-Methoden mit einem QqQ mit sich bringt, ist die limitierte Auswertung der Analyte in Retroperspektive. Durch die zuvor definierten spezifischen Transitionen können auch nur diese erfasst werden, wodurch andere Transitionen und Analytionen nicht detektiert werden und diese auch im Nachhinein nicht analysiert werden können.

Neben dem QqQ können auch andere Geräte, die eine Quadrupol-Kollisionszelle mit einem TOF (QTOF) oder Orbitrap-Analysator kombinieren, zur Quantifizierung von Oxylipine mit MS (bzw. MS/MS) genutzt werden. Diese erlauben das vollständigen Erfassen der Fragmentspektren im *targeted*-Ansatz, was das erneute Auswerten der Proben in Retroperspektive ermöglicht [5].

Eine weitere, mögliche Trenndimension bei der Analyse von Oxylipinen bietet zudem die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS). Diese bietet den Vorteil, dass neben der Ladung, die Größe bzw. die räumliche Struktur der Analyte die Mobilität durch das Driftgas bestimmt [78]. Die unterschiedliche Positionierung der funktionellen Gruppen auf der Kohlenstoffkette der Oxylipine und die dadurch resultierenden Unterschiede in der Struktur der Oxylipine erlauben es so, Regioisomere über ihre Ionenmobilität zu unterscheiden [79]. Die Ionenmobilität bietet daher neben der Chromatographie eine zusätzliche Trenndimension und erlaubt eine verbesserte Trennung von Isomeren. Zusammen mit den MS/MS-Daten und den hoch aufgelösten Massen der QTOF-MS bietet es somit ein sehr leistungsfähiges Werkzeug zur selektiven Identifizierung von Analyten [80, 81]. In den letzten Jahren hat sich daher die Ionenmobilität-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (IM-QTOF-MS) als neues Werkzeug für die *non-targeted*-Analyse entwickelt [79, 82, 83].

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Einfluss des Eluenten-Modifiers auf die Analyse von Oxylipinen

Im ersten Schritt der Arbeit wurde der Einfluss des pH-Wertes des Eluenten auf die Quantifizierung der Oxylipine per LC-MS/MS untersucht. Da die benötigten sauren Bedingungen bei der flüssigchromatographischen Trennung zu einer Verminderung der Ionisationseffizienz im Negativmodus führen, ist ein Anstieg der Analytsignale mit erhöhten pH-Wert zu erwarten. Ein ausreichend großer Anstieg stellt somit eine Möglichkeit zur verbesserten Analyse von Oxylipinen dar, indem die Ionisationseffizienz über das Einstellen des pH-Wertes nach der Trennung auf der LC-Säule (*post-column*) verbessert wird. Mögliche technische Umsetzungen ließen sich somit während einer Messung (*on-line*) realisieren.

Für das erste Experiment wurden verschiedene Eluenten für die flüssigchromatographische Trennung eingesetzt und auf einen definierten pH-Wert zwischen pH 4 bis pH 10 eingestellt. Da für die anschließende Untersuchung am Massenspektrometer ein flüchtiger Puffer benötigt wurde, wurde auf Ammoniumacetat zurückgegriffen. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte im wässrigen Teil des Eluenten mit Essigsäure oder Ammoniak. Der pH-eingestellte Puffer wurde mit Acetonitril (ACN) gemischt (50/50 v/v) und nach Zugabe von *5-Hydroxyeicosatetraenoic acid* (5-HETE, 100 nM) anschließend per Direktinfusion (30 µL/min) in das Massenspektrometer gegeben. Die resultierenden Signalintensitäten sind in **Abbildung 2** dargestellt.

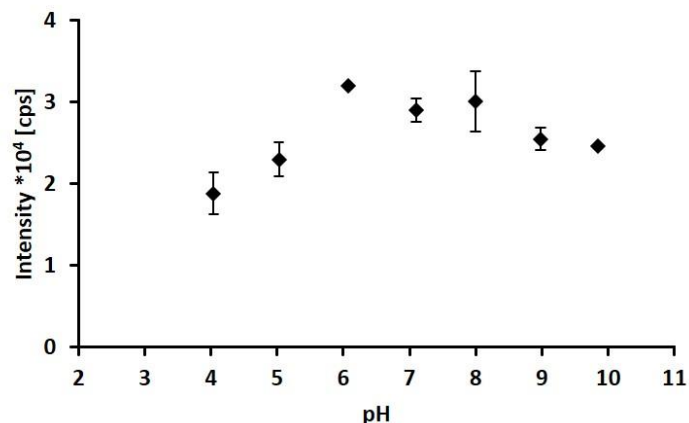


Abbildung 2: Signalintensität von *5-Hydroxyeicosatetraenoic acid* (5-HETE) bei unterschiedlichen pH-Werten nach Elektrosprayionisierung im negativen Modus ESI(-). Analytzugabe 100 nM in Puffer/ACN (50/50 v/v) erfolgte per Direktinfusion bei 30 µl/min und Detektion per MS/MS am Sciex API 3200 QqQ.

Einleitung und Theorie

Es ist zu sehen, dass vom sauren pH-Wert mit pH 4 bis zu pH 6 die Signalintensität des 5-HETE ansteigt. Über pH 7 und pH 8 scheint sie anschließend leicht abzufallen und sich auf einem Plateau zu halten, bis es bis zu einem pH-Wert von 10 wieder absinkt. Der Anstieg im sauren Bereich war durch die pH-Änderung wie oben beschrieben zu erwarten. Eine Verminderung der Signalintensität im alkalischen Bereich könnte auf die vermehrte Zugabe von Ammoniak zurückzuführen sein, wodurch es durch die hohe Ionenstärke zu Ionensuppression kommen könnte [84].

Anschließend wurde das Experiment durch einen auf ein LC-System inklusive Säule übertragen. Da die genutzte LC-Säule bis zu einem maximalen pH-Wert von pH 8 ausgelegt war, wurde bis zu diesem Wert getestet. Unter isokratischen Bedingungen mit Puffer/ACN (50/50; v/v) 300 μ L/min wurde ein Standard von 5-HETE 100 nM flüssigchromatographisch getrennt, per ESI(-) ionisiert und mit einem QqQ detektiert. Bei unterschiedlichen pH-Werten des Puffers als Teil des Eluenten ergaben sich die folgenden Intensitäten für des Analyten (**Abbildung 3**):

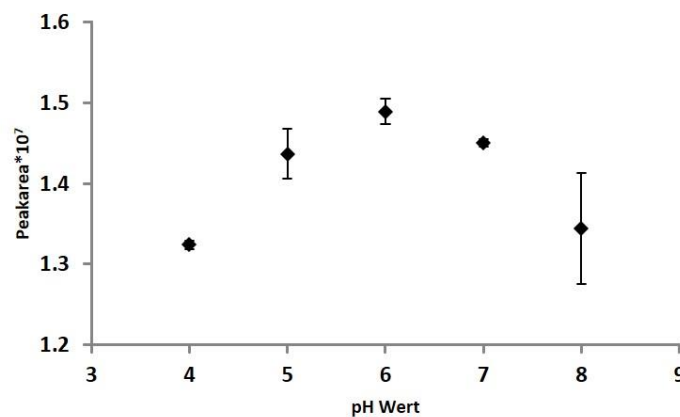


Abbildung 3: Peakfläche von *5 hydroxyeicosatetraenoic acid* (5-HETE) bei unterschiedlichen pH-Werten nach Elektrosprayionisierung im negativen Modus ESI(-). 10 μ L Analytzugabe 100 nM in Puffer/ACN (50/50 v/v) erfolgte per Flüssigchromatographen (HPLC) über eine C8 Kinetex Säule (2.6 μ m, 100 x 2.1 mm, 100 Å) bei Puffer/ACN (50/50 v/v) 300 μ L/min und Detektion per MS/MS am Sciex 3200 QqQ

Analog zur Direktinfusion konnte der gleiche Verlauf der Signalintensität auch per LC-MS/MS beobachtet werden. Das Maximum der Signalintensität liegt bei pH 6, in den sauren und neutral/alkalischen Bereich fällt das Signal ab. Neben der Veränderung der Signalintensität konnte weiterhin eine Veränderung der Retentionszeiten während der

flüssigchromatographischen Trennung beobachtet werden. So resultierten für 5-HETE die folgenden Retentionszeiten bei unterschiedlichen pH-Werten:

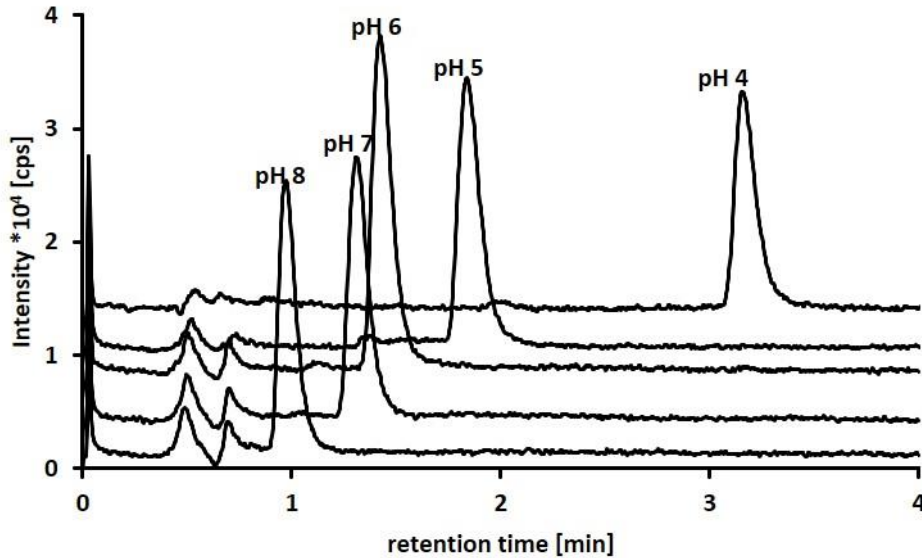


Abbildung 4: Retentionsverhalten von 5-HETE bei unterschiedlichen pH-Werten im Eluenten. 10 μL Analytzugabe 100 nM in Puffer/ACN (50/50 v/v) erfolgte per Flüssigchromatographen (HPLC) über eine C8 Kinetex Säule (2.6 μm , 100 x 2.1 mm, 100 Å) bei 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ Puffer/ACN (50/50 v/v) und Detektion per MS/MS am Sciex 3200 QqQ

Wie am Beispiel von 5-HETE zu sehen ist, führt ein alkalischerer pH-Wert zur früheren Elution des Analyten. Durch den erhöhten pH-Wert liegen die Fettsäuren während der Trennung zum Teil in ihrer deprotonierter Form vor, was zu verringerten unpolaren Wechselwirkungen mit der stationären Phase führt und dadurch die Retentionszeit verkürzt [71, 85]. Der größte Sprung in dieser Retentionszeitänderung ist zu erwarten, wenn der pH-Wert des Eluenten die Säurekonstante (pK_S -Wert) des Analyten übertrifft [71]. Dieser Sprung ist in **Abbildung 4** zwischen pH 4 und pH 5 zu sehen. Als Metabolit der Arachidonsäure ($\text{pK}_\text{S} = 4.8$) deckt sich dies mit dem zu erwartenden pK_S -Wert für 5-HETE. Im Gegensatz zu anderen Analyten, bei denen nach vollständiger Protonierung ab einem gewissen pH-Wert keine Veränderung der Retentionszeit zu erkennen ist [85], trifft dies für 5-HETE nicht zu und bis pH 8 ist eine stetige Verkürzung der Retentionszeit zu sehen. Die Verringerung der Retentionszeiten der Analyten kann so bei komplexen Proben mit vielen Analyten dazu führen, dass bei höheren pH-Werten und ansonsten gleichbleibenden chromatographischen Parametern keine chromatographische Trennung erreicht werden kann.

Anschließend wurde der Einfluss der Pufferkonzentration auf das Analytsignal untersucht. Es wurde erwartet, dass mit steigender Pufferkonzentration die Intensität des Analytsignals

abnimmt, da es zu Ionensuppressionen kommen kann. Es wurden Ammoniumacetatlösungen unterschiedlicher Konzentrationen eingesetzt und der pH-Wert auf pH 6 eingestellt, da dies sich zuvor als Optimum zeigte. Nach Verdünnen mit ACN (50/50; v/v) und Zugabe von 5-HETE wurden die Lösungen per *flow injection analysis (FIA)* gemessen.

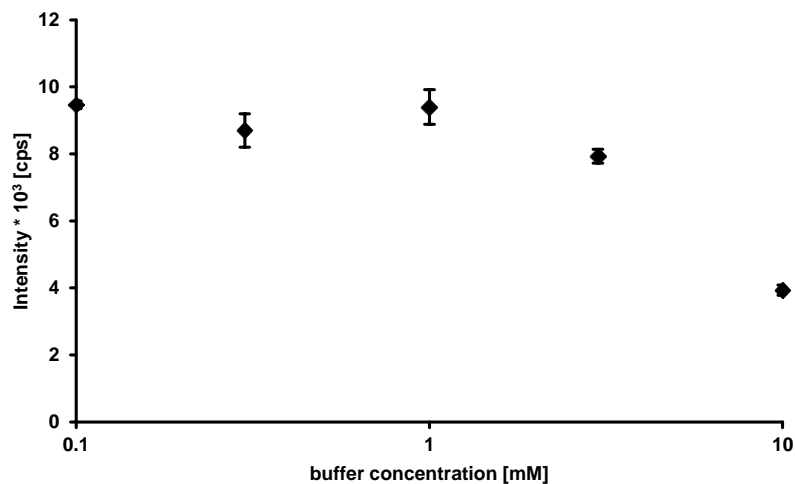


Abbildung 5: Signalintensität von 5-HETE (100 nM) in Abhängigkeit der Pufferkonzentration (logarithmisch skaliert), gemessen per flow injection analysis (FIA) mit einem Fluss von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einer Eluentenzusammensetzung von Puffer/ACN (50/50, v/v) bei pH 6. Die Detektion erfolgte per MS/MS am Sciex 3200 QqQ.

In **Abbildung 5** ist zu erkennen, dass das Analytsignal bei Konzentrationen >1 mM stark abnimmt ($> 50\%$ Verlust an Signalintensität). Zu begründen ist dies mit der erhöhten Ionenkonzentration, was zu Ionensuppressionen führt [84]. Unterhalb 1 mM hat die Konzentration des Puffers nur wenig Einfluss auf die Intensität des Analytsignals. Eine zu hohe Konzentration an Eluent-Modifizier kann daher ebenfalls zu einer Verschlechterung der Sensitivität führen. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass für 1 mM und niedrigere Konzentrationen keine Verschlechterung der Analyse stattfindet.

Um das Verhalten verschiedener Analyten auf die pH-Wert-Änderung zu untersuchen, wurde das LC-MS/MS Experiment mit einem Gemisch aus verschiedenen Hydroxy-PUFA (1 μM) wiederholt. Da das Maximum der Signalintensität bei pH 6 zu finden war, wurde bis zu einem pH-Wert von pH 7 analysiert:

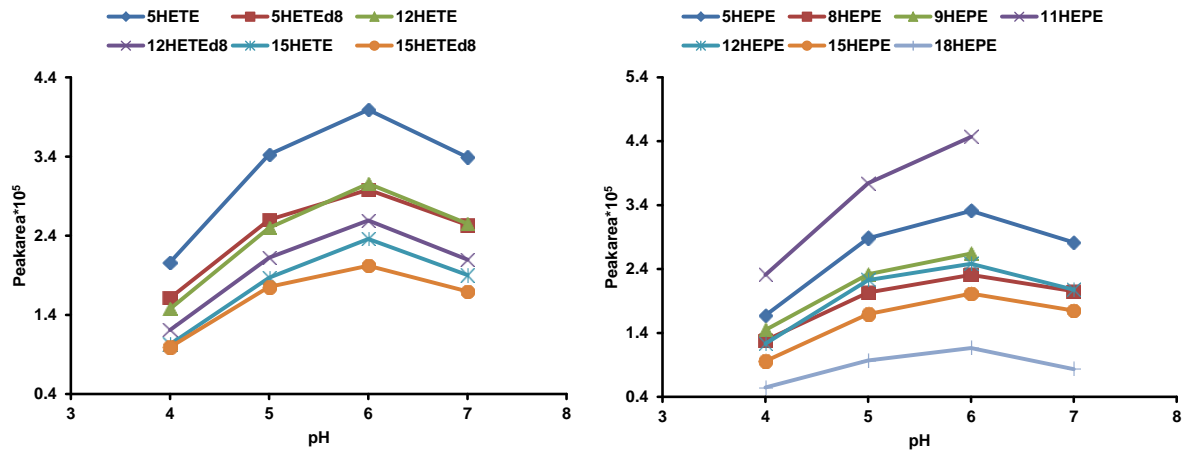


Abbildung 6: Peakfläche von verschiedenen Hydroxy-PUFA in Abhängigkeit des pH-Wertes nach Elektrosprayionisierung im negativen Modus ESI(-). 10 µL Analytzugabe 100 nM in Puffer/ACN (50/50 v/v) erfolgte per Flüssigchromatographen (HPLC) über eine C8 Kinetex Säule (2.6 µm, 100 x 2.1 mm, 100 Å) bei 300 µL/min Puffer/ACN (50/50 v/v) und mit Detektion per MS/MS am Sciex 3200 QqQ.

Auch in **Abbildung 6** ist zu erkennen, dass die Intensität der Analytsignale mit steigendem pH-Wert des Puffers von pH 4 bis zu pH 6 zunimmt. Anschließend fällt die Intensität wieder ab. Mit niedrigerem pH-Wert des Eluenten steigt die Konzentration bzw. die Aktivität des vorhandenen Ammoniums im wässrigen Ammoniumacetat-Puffer. Als positiv geladene Spezies stehen sie als Gegenanion in direkter Konkurrenz zur Bildung der negativen Ionen der Oxylipine bei der Ionisation mit ESI(-) [86]. Die abfallende Peakfläche der Analyten bei niedrigeren pH-Werten lässt sich damit beschreiben. Auffällig ist die Abnahme des Analytsignals zum neutralen Bereich von pH 6 zu pH 7. Für diesen Bereich sollte die Analytintensität weiter zunehmen, da durch Verminderung zusätzlichen Kationen im Eluenten die Ionisation weniger gehemmt sein sollte. Eine Vermutung für dieses Phänomen liegt in der Definition des pH-Wertes und der Durchführung des Experimentes. Der pH-Wert ist definitionsgemäß nur auf rein wässrige Lösungen beschränkt, da es auf dem Logarithmus des Gleichgewichtsprozesses der Autoionisierung von Wasser basiert [87]. Allerdings ist die Protonenaktivität auch auf andere Lösemittel übertragbar, bei der praktischen Durchführung ist dann allerdings ein korrektes Kalibrieren der Elektrode zu beachten [88]. Bei der Durchführung im Experiment wurde der pH-Wert im wässrigen Medium eingestellt und anschließend der organische Anteil hinzugegeben. Der pH-Wert wurde daher nicht im wässrig/organischem Eluenten eingestellt, weshalb die resultierende Aktivität der H₃O⁺-Ionen von dem eingestellten pH-Wert leicht abweichend sein könnte. Dies lässt sich als Grund vermuten, dass sich die Peakflächen bereits vor pH 7 wieder verringern.

Insgesamt lassen sich die Peakflächen der Analyten bei einer Änderung des pH-Wertes von pH 4 auf das Optimum von pH 6 im Eluenten um den Faktor zwei verbessern. In **Abbildung 4**

konnte gezeigt werden, dass der pK_S -Wert von 5-HETE analog zur Arachidonsäure zwischen pK_S 4-5 liegt und somit in den Bereich der schwachen Säuren fällt. Auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit ist zu erwarten, dass ein Großteil der Oxylipine in diesen Bereich fällt. Zwar lässt sich die Ionisierungseffizienz saurer Analyte über der pH-Wert beeinflussen, allerdings hat dies bei schwachen Säuren nur einen geringen Einfluss [70], was zu der nur geringfügigen Verbesserung bei höheren pH-Werten für die Oxylipine führt. Diese Verbesserung ist nicht groß genug, um eine nach-Säulen-Anpassung des pH-Wertes zu begründen. Durch diese würde es zu einer erneuten Verdünnung des Eluenten kommen, welches den Gewinn der pH-Wertänderung mehr als kompensiert. Ein zu hoher pH-Wert führt außerdem wiederum zu einer Verschlechterung der Signalintensität (**Abbildung 6**), vermutlich durch eine erhöhte Ionensuppression [84]. Eine Umstellung des Eluenten auf den entsprechenden pH-Wert statt einer Einstellung hinter der Säule ist ebenfalls keine Option, da dies die flüssigchromatographische Trennung der Analyte deutlich verschlechtert (**Abbildung 4**). Daher wurde eine Änderung des pH-Wertes für eine verbesserte Analyse nicht weiterverfolgt.

Neben dem pH-Wert wurde der Einfluss unterschiedlicher Modifier auf die Ionisationseffizienz untersucht. Üblicherweise finden Ameisensäure und Essigsäure Verwendung als flüchtige Modifier in der flüssigchromatographischen Trennung von Oxylipinen [5]. Vor kurzem wurde beschrieben, dass Ammoniumfluorid als Additiv für verschiedene Analyten eine Verbesserung der Sensitivität erbrachte [89]. Für eine Anwendung auf Oxylipine wurden verschiedene Oxylipine unter Zusatz von Essigsäure (0.5 mM), Ammoniumfluoride (0.5 mM), und ein Gemisch mit Ammoniumfluoride und Essigsäure (je 0.25 mM) gemessen.

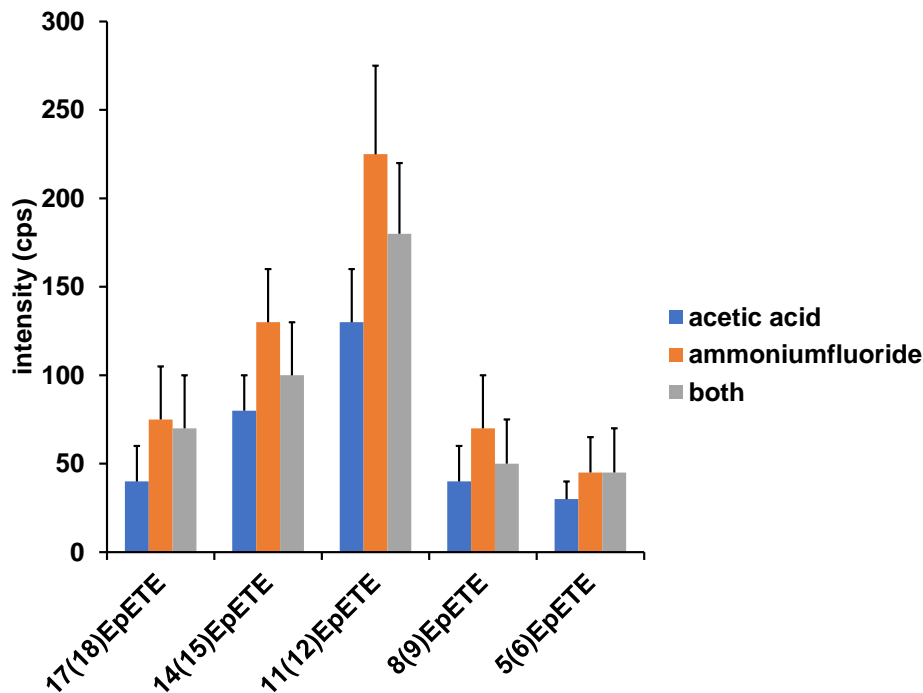


Abbildung 7: *Direct infusion analysis* (DIA) von unterschiedlichen EpETEs mit verschiedenen LC-Additiven. Injiziert wurden 100 nM EpETEs in H₂O/ACN (50/50: v/v) mit unterschiedlichen Additiven (0.5 mM) bei 30 μ L/min. Ionisation erfolgte per ESI(-) und Detektion per MS/MS am Sciex 3200 QqQ

Wie in **Abbildung 7** zu sehen ist, führt der Zusatz von Ammoniumfluorid zu höheren Signalintensitäten als die Nutzung reiner Essigsäure. So steigt das Signal für 11(12)-EpETE um ~60%. Fraglich ist allerdings die Belastung des Massenspektrometers durch das Ammoniumfluorid. Da bisher keine Langzeit-Experimente über die dauerhafte Belastung eines Massenspektrometers mit Ammoniumfluorid existieren und die Verbesserung übersichtlich war, wurde von einer dauerhaften Nutzung des Additivs abgesehen.

5.2.2 Analyse von Oxylipinen nach *charge-switch*-Derivatisierung

Die Ionisierung von Oxylipinen mit ESI(-) wird wie oben beschrieben, durch die Anwesenheit der positiven Ionen im angesäuerten Eluenten gehemmt. Eine Möglichkeit um dies zu umgehen, ist die Einführung einer permanenten positiven Ladung in den Analyten per *charge-switch* Derivatisierung. Diese erlaubt es, die Analyse auch bei ESI(+) durchzuführen und somit die Hemmung bei der Ionisierung durch den Eluent-Modifier zu Umgehen. Ein erster Test und Vergleich verschiedener Derivatisierungsreagenzien für die Analyse wurde im Hause bereits durchgeführt [90]. Dort erwies sich 4-[Aminomethyl]-Phenylpyridiniumchlorid (AMPP) als geeignetes Derivat für Fettsäuren, weshalb die Synthese des Derivats etabliert wurde.

Anschließend wurde eine Analyseverfahren für Oxylipine unter Nutzung des Derivats ausgearbeitet und genauer charakterisiert.

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind veröffentlicht und unter [91] ebenfalls zu finden.

5.2.2.1 Synthese von AMPP

Die Synthese des AMPP erfolgte im ersten Schritt durch eine Zincke-Reaktion, welche die Herstellung von Pyridiumverbindungen aus Pyridinen beschreibt (**Abbildung 8**) [92–94]. Ausgehend vom Pyridin (1) und 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (2) wird dabei in 16 Stunden unter Hitze das entsprechende Zincke-Salz *N*-2,4-Dinitrophenyl-pyridiumchlorid (3) hergestellt. Anschließend wird das Salz (3) mit zwei Äquivalenten 4-[(*N*-Boc)-amino-methyl]-anilin (4) als primäres Amin in EtOH/Pyridin (3:1) unter Hitze umgesetzt. Dabei addiert das primäre Amin zunächst an die 2-Position des *N*-2,4-Dinitrophenyl-pyridiumchlorid (3), welches nach Deprotonierung zur Öffnung des Pyridin-Rings führt. Anschließend führt die Substitution desamins aus dem vorherigen Pyridin mit einem weiteren Äquivalent des eingesetztenamins zur Positionierung an der gewünschten Stelle. Im Weiteren verläuft die Reaktion als Umkehr des bisherigen Reaktionsverlaufes, durch Ringschluss und Abspaltung des ersten Äquivalentes desamins in 2-Position. Dies führt zum 4-[(*N*-Boc)-Amino-methyl]phenyl-pyridiniumchlorid (5). Im letzten Schritt der Synthese erfolgt anschließend die Abspaltung der *N*-Boc-Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure in Dichlormethan (DCM), was zum gewünschten Produkt 4-[Aminomethyl]phenyl-pyridiniumchlorid (AMPP, 6) führt (**Abbildung 8**).

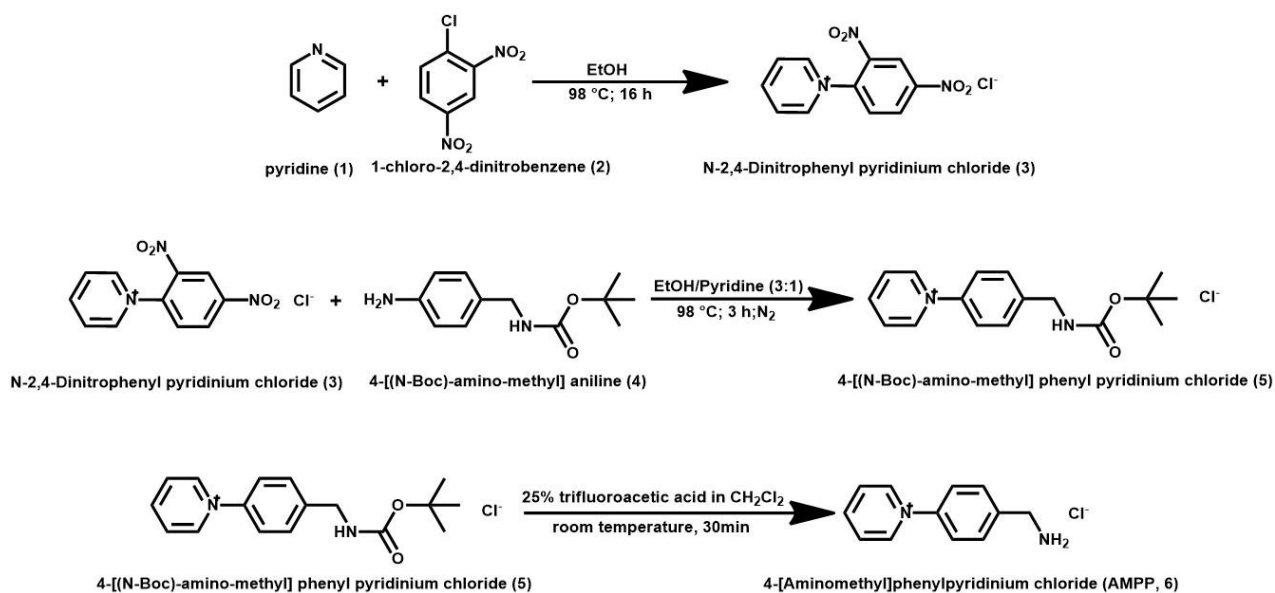


Abbildung 8: Reaktionsweg zum 4-[Aminomethyl]phenyl-pyridiniumchlorid (AMPP, Struktur 6) unter Durchführung einer Zincke-Reaktion und anschließender Abspaltung der Schutzgruppe durch Trifluoressigsäure.

Die Durchführung der Synthese wurde am ersten Zwischenschritt unterbrochen und das Zwischenprodukt per HRMS untersucht, welches mit der exakten Masse von 246.0514 Da zum gewünschten Produkt $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4$ zuzuordnen war (**Abbildung 9**). Es wurden 786.5 mg des Zwischenproduktes synthetisiert, was bei einem Einsatz von 0.344 mL Pyridin einer Ausbeute von 80% entspricht. Anschließend wurde die Synthese wie beschrieben fortgeführt.

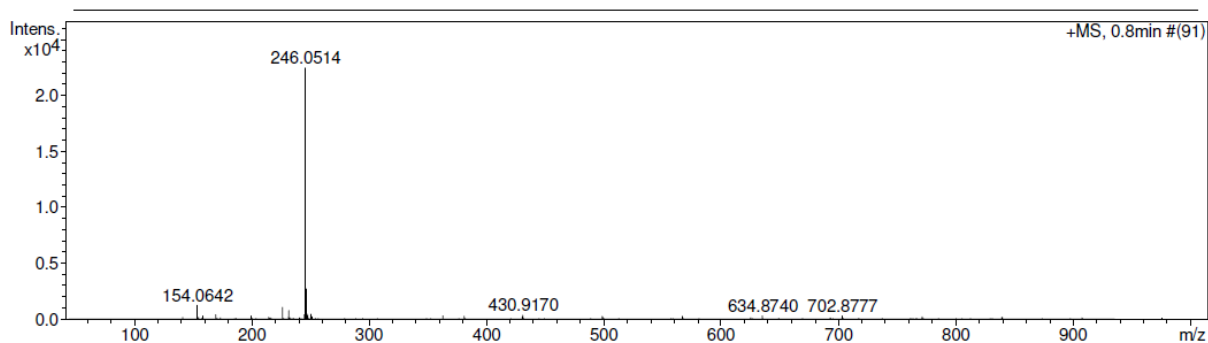


Abbildung 9: High resolution mass spectrometry (HRMS)-Analyse des ersten Zwischenproduktes der AMPP-Synthese. Mit 246.0514 Da entspricht die akkurate Masse der Summenformel von N-2,4-Dinitrophenyl-pyridiniumchlorid mit $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4$. Die Analyse erfolgte per FIA bei ESI(+).

Der letzte in der Literatur beschriebenen Schritt, das Entfernen des Lösemittels und Trocknen des Produktes nach dem Behandeln mit Trifluoressigsäure, ließ sich in der folgenden Synthese nur schwer umsetzen. Statt eines trockenen, braunen Pulvers hatte sich ein brauner, harziger Feststoff gebildet. Es wurde vermutet, dass Reste der Trifluoressigsäure noch in dem Produkt vorhanden waren und somit kein sauberes AMPP als Chlorid gewonnen

werden konnte. Um die Trifluoressigsäure als Gegenion zu verdrängen wurde ein zusätzlicher Schritt eingeführt, in dem das Produkt in konzentrierter Salzsäure aufgenommen wurde. Anschließend wurde es erneut ausgeschüttelt und getrocknet. So konnten 578.3 mg eines gelben Pulvers gewonnen werden (78% Ausbeute). Die Farbe wich stark von dem in der Literatur beschriebenen braunen Feststoff ab. Untersuchungen per HRMS und ein massenspektrometrischer Vergleich der vorherigen Synthesen im Haus konnten aber bestätigen, dass es sich bei dem Syntheseprodukt um reines AMPP handelte (**Abbildung 10** und **Abbildung 11**).

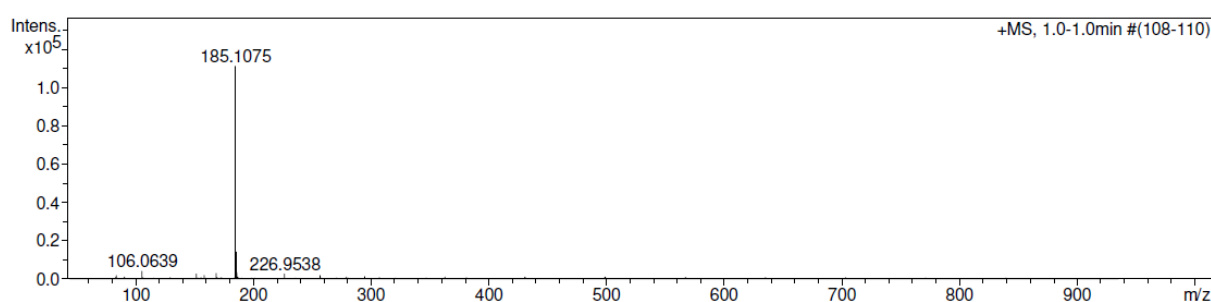


Abbildung 10: HRMS Analyse des Syntheseproduktes 4-[Aminomethyl]phenylpyridiniumchlorid. Mit 185.1075 Da entspricht die akkurate Masse der Summenformel von AMPP mit $C_{12}H_{13}N_2$. Die Analyse erfolgte per FIA bei ESI(+).

Mit einer exakten Masse von 185.1075 Da war Produkt der erwarteten Summenformel von AMPP mit $C_{12}H_{13}N_2$ zuzuordnen (**Abbildung 10**). **Abbildung 11** zeigt die Massenspektren des Produkts der ersten Synthese im Haus und der selbst durchgeführten Synthese [90]. Es ist zu sehen, dass beide Spektren nahezu identisch sind und das $[M^+]$ des AMPP mit m/z 185 und die Fragmenten m/z 169 und 106 klar zu erkennen sind. Das Verhältnis der Ionen zueinander ist ebenfalls nahezu identisch, bis auf das Ion mit m/z 129, welches nicht direkt der Fragmentierung von AMPP zugeordnet werden konnte. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Nebenprodukt oder Verunreinigung, welche in der zuletzt durchgeführten Synthese geringfügig verstärkt auftritt. Bei einer Ausbeute von 78 % konnte das AMPP somit erfolgreich synthetisiert werden.

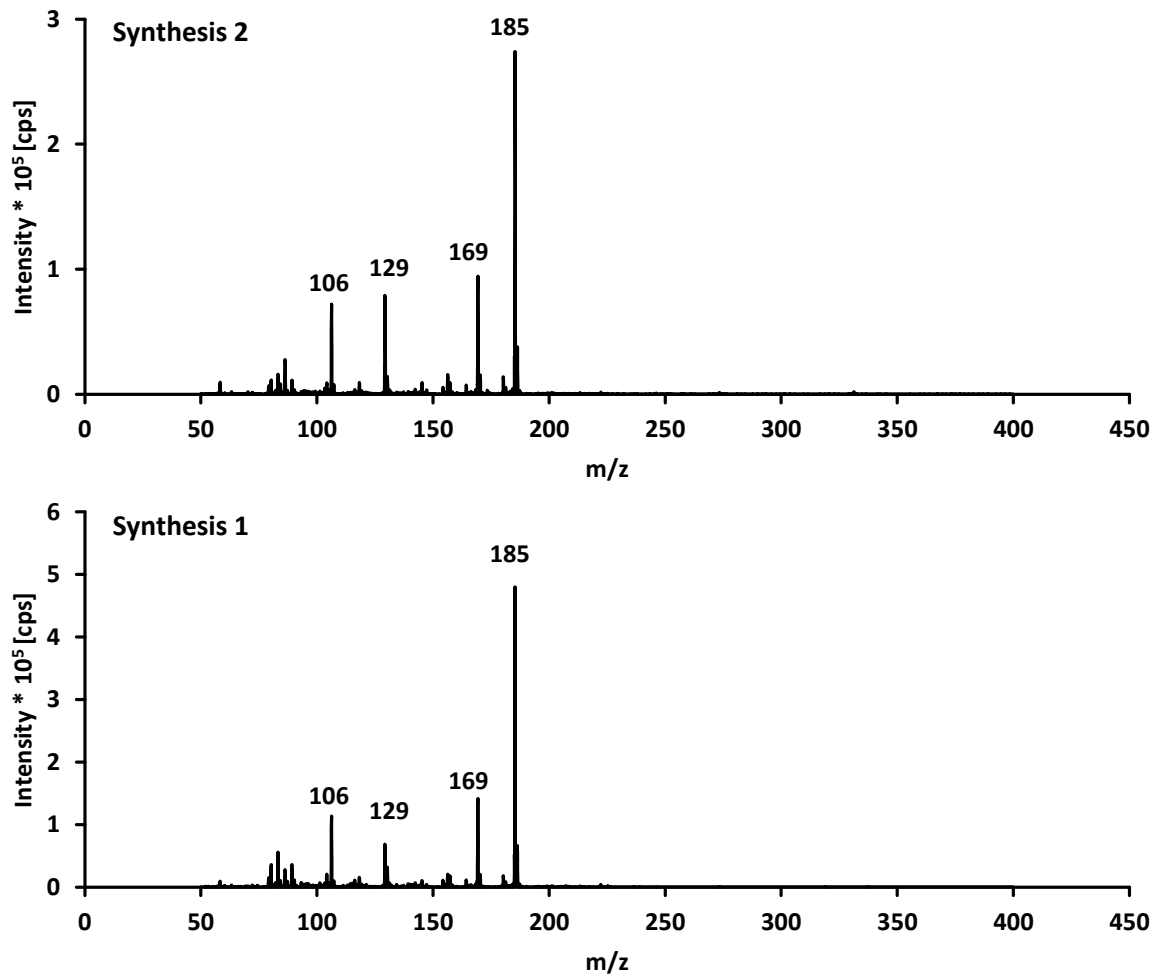


Abbildung 11: Massenspektren von AMPP aus unterschiedlichen Syntheseanläufen. Oben dargestellt die für die Arbeit durchgeführte Synthese 2, unten dargestellt die vorherige Synthese durch [90] im Vergleich. Die Analyse erfolgte per FIA 10 μ L 1 μ M AMPP in ACN/H₂O (50/50; v/v) bei 300 μ L/min am Micromass QqQ.

5.2.2.2 Optimierung der Derivatisierung

Im Anschluss an die Synthese konnte das AMPP zur Derivatisierung genutzt werden. Die Derivatisierung einer Fettsäuren mit AMPP führt zum entsprechenden Carbonsäureamid wie in **Abbildung 12** beispielhaft für 14(15)-EpETrE dargestellt ist.

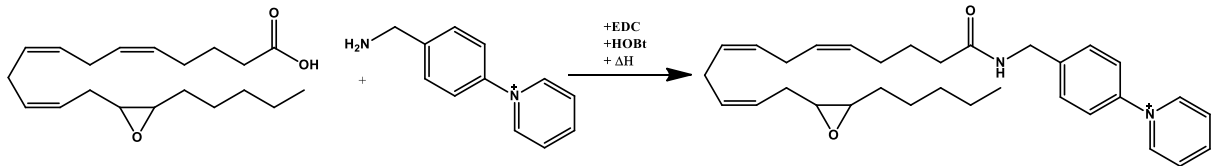


Abbildung 12: Beispielhafte Derivatisierung von 14(15)-EpETrE mit AMPP.

Bei Oxylipinen handelt es sich um stark oxidationsempfindliche Analyte. Daher wurde angestrebt, die Derivatisierungsbedingungen so sanft wie möglich zu wählen, um eine Oxidation der Analyte gering zu halten. Um verschiedene Derivatisierungsbedingungen zu testen wurde eine Plasmaprobe (Huhn) mit *19,20-dihydroxy-docosapentaenoic acid* (19,20-DiHDPE), *18-hydroxy-eicosapentaenoic acid* (18-HEPE) und 14(15)-EpETrE angereichert und bei 24 °C (RT), 40 °C und 60 °C über 80 Minuten einer Derivatisierung unterzogen. Die Analyten deckten drei wichtige Gruppen der Oxylipine, die Hydroxy-, Dihydroxy-, und Epoxy-Derivate, ab. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein Aliquot als Probe entnommen und per LC-MS/MS an einem QqQ untersucht.

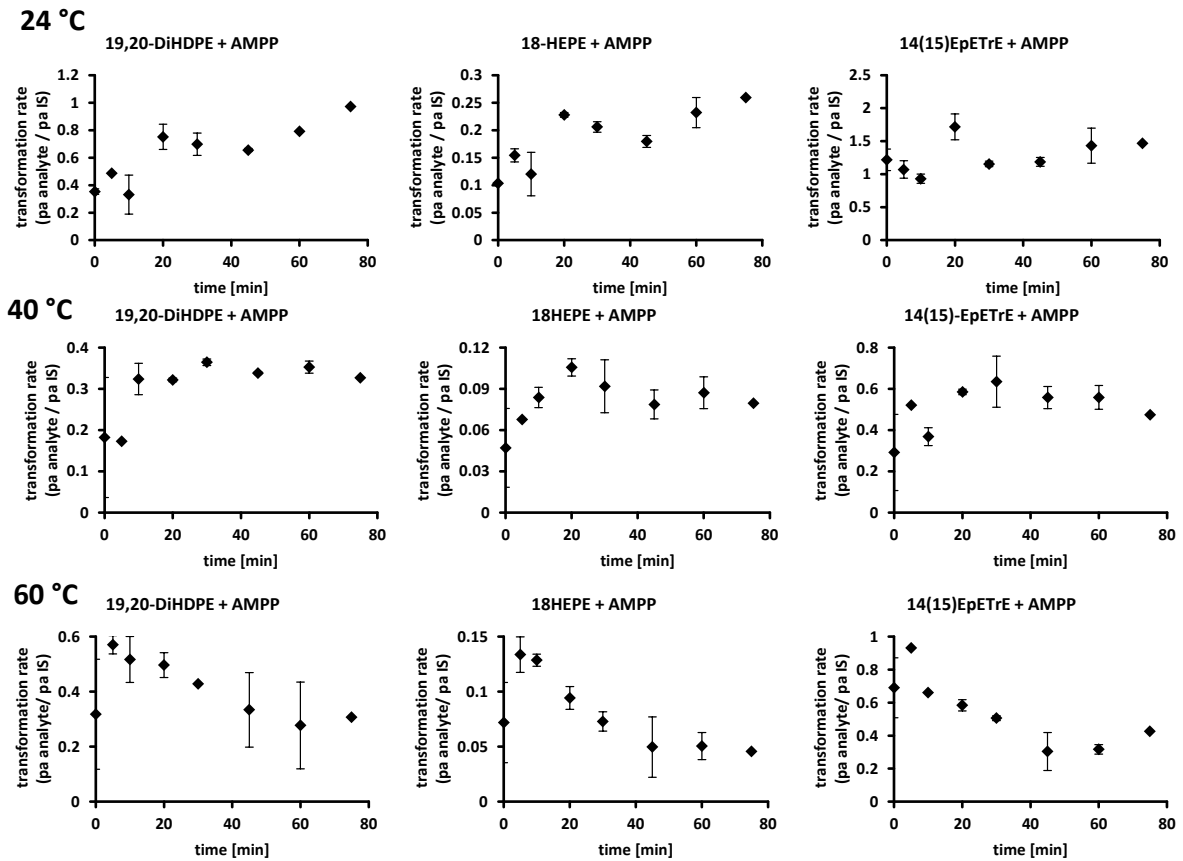


Abbildung 13: Umsetzungsverlauf der AMPP-Derivatisierung für 19,20-DiHDPE, 18-HEPE und 14(15)-EpETrE bei 24 °C; 40 °C und 60 °C über 80 Minuten. Aufgetragen sind die Peakflächen des Analyten gegen den internen Standard Azure A. Derivatisiert wurden 1 μ M Lösung der Analyten, davon wurden jeweils 10 μ L Aliquot für die MS/MS-Analyse per FIA bei 300 μ L/min H_2O/ACN (50/50; v/v) am Micromass QqQ herangezogen.

Abbildung 13 zeigt für alle drei Analyten einen stetigen Anstieg des Umsetzungsgrades bei Raumtemperatur (24 °C). Die Derivatisierung ist aber vermutlich auch nach 80 Minuten noch nicht abgeschlossen. Da angestrebt wurde, die Inkubationszeit möglichst gering zu halten, wurde ein Umsetzen bei Raumtemperatur verworfen. Bei einer Derivatisierung von 60 °C zeigt sich ab 10 Minuten, dass die Signalintensität der derivatisierten Analyten sinkt. Bei dieser Temperatur scheint es zu einer Verminderung der Konzentration an Analyten zu kommen. Es kann daher vermutet werden, dass die Analyten über einen längeren Zeitraum bei diesen Temperaturen nicht stabil sind. Daher wurde auch von einer Derivatisierung bei diesen Bedingungen Abstand genommen. Die Umsetzung bei 40 °C hingegen zeigt nach etwa 20 Minuten ein konstantes Signal der derivatisierten Analyten. Dies ist ein praktikabler Zeitraum und die Analyten scheinen hier nicht thermisch zersetzt zu werden. Eine Umsetzung bei 40 °C von 20 Minuten schien daher am geeignetsten für die Umsetzung mit AMPP, weshalb im Folgenden darauf zurückgegriffen wurde.

5.2.2.3 Analysen per Tripel-Quadrupol--System

Im nächsten Schritt wurde eine LC-MS/MS-Analysenmethode für die derivatisierten Oxylipine entwickelt. Mit der Derivatisierung wurden die Analyten strukturell verändert, weshalb eine Untersuchung der geeigneten Transitionen für eine MS/MS-Analyse nötig war. Ebenfalls war eine Ausarbeitung einer chromatographischen Methode und ein Anpassen der Parameter des Massenspektrometers notwendig, da diese sich im Vergleich zum underivatisierten Analyten unterscheiden könnten. Für die Analyse der Derivatisierungsprodukte am Waters QqQ wurden im ersten Schritt die einzelnen Geräteparameter für die einzelnen Stoffgruppen optimiert. Dazu wurden Standards der einzelnen Substanzen per FIA in das Gerät gegeben und der jeweilige Parameter zwischen den Läufen angepasst. Wie in **Abbildung 14** zu sehen ist, variieren die optimalen Parameter auch innerhalb einer Stoffgruppe stark. So liegt beispielhaft das Optimum der *cone voltage* für 14(15)-EpETrE bei 90 V, während es bei 5(6)-EpETrE mit 30 V deutlich niedriger ist. Für die in **Tabelle 1** aufgeführten Analyte wurden daher die *capillary voltage*, *cone voltage*; *extractor voltage* und *collision voltage* analytspezifisch optimiert. Da die restlichen Parameter nicht innerhalb eines Laufs geändert werden konnte, wurden diese so optimiert, dass sie für einen Großteil der Analyten aus im Optimum befanden (siehe Kapitel **Material und Methoden**).

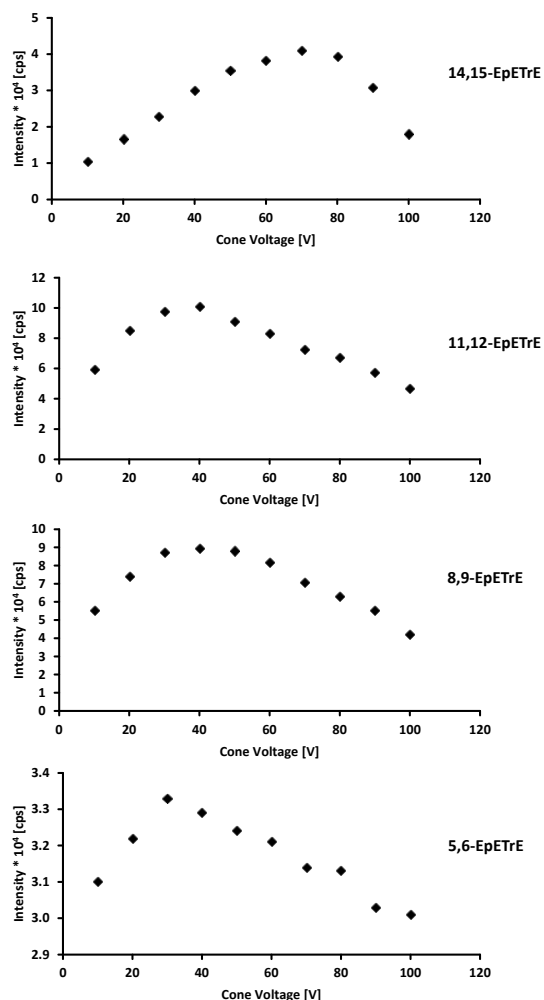


Abbildung 14: Signalintensitäten verschiedener EpETrEs bei unterschiedlichen *cone voltages* (CV). Analysiert wurde am Micromass QqQ per FIA bei 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50/50; v/v) von 10 μL des derivatisierten Standardgemisches von mit jeweils 1 μM Analyt.

Ein großer Vorteil, der sich bei der ersten Nutzung der AMPP-Derivatisierung hier bereits zeigte, ist das Erhalten eines Fragmentspektrums, welches Fragmente über den kompletten Massenbereich liefert. Für underivatisierte Oxylipine liefert das Fragmentspektrum hauptsächlich Fragmente im Bereich $m/z > 250$. Somit liefert das Spektrum der derivatisierten Oxylipine mehr Information zur Strukturaufklärung im Bereich der *non-targeted*-Analyse. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Yang et al, welche zeigen konnten, dass *charge-switch*-Derivatisierung zu mehr strukturellen Informationen, wie der Position von Doppelbindungen, führen kann [95]. So können einfach erste Informationen über unbekannte Substanzen erhalten werden, wie sich im Folgenden zeigte: Nach der Optimierung der Gerätemethode wurde eine Blindprobe ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50/50; v/v)) derivatisiert und analysiert, um mögliche unerwünschte Verunreinigungen aus den verwendeten Materialien und dem Derivatisierungsprozess zu finden. Bei der chromatographischen Auftrennung der Probe

konnten mehrere Peaks ermittelt werden, welche als Verunreinigungen aus dem Derivatisierungsprotokoll hervorgingen. Eine Analyse der Fragmentspektren dieser Verunreinigungen zeigte, dass alle die Ionen m/z 183 und m/z 169 aufwiesen. Dies sind spezifische Fragmentionen, die aus der Derivatisierung mit AMPP resultieren [90]. Bei den Verunreinigungen musste es sich daher um Carbonsäuren handeln. Die ausgeprägten Fragmentspektren konnten infolge dessen zu einer teilweisen Aufklärung der Analyten genutzt werden, Beispielhaft für einen der Analyten gezeigt (**Abbildung 15**).

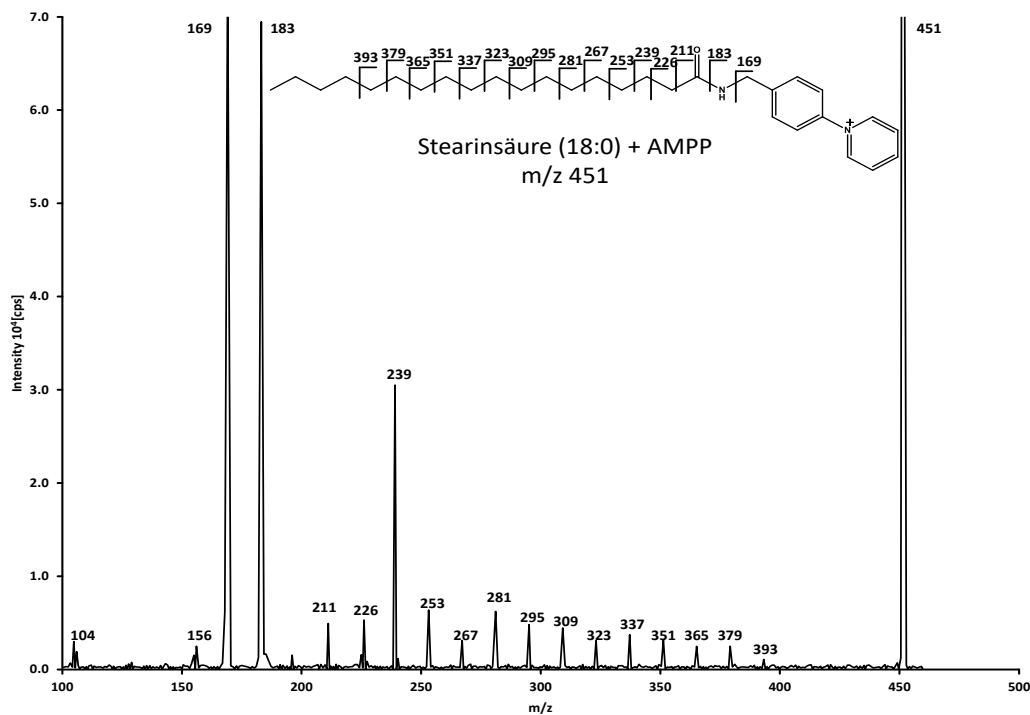


Abbildung 15: Fragmentspektrum einer Verunreinigung aus dem Blindwert der Derivatisierungsreaktion. Auf Grund des Fragmentierungsmusters konnte die Verunreinigung als Stearinsäure identifiziert werden. Analysiert wurde am Micromass QqQ per FIA bei 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50/50; v/v) von 10 μL eines derivatisierten Blindwertes.

Abbildung 15 zeigt das Spektrum eines der Verunreinigungen, welches auf Grund des Fragmentspektrums als Stearinsäure vermutet werden konnte. Ebenso wurden Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Pentadecansäure und Myristinsäure als mögliche Verunreinigungen gefunden. Diese Fettsäuren sind vermutlich während des Pipettierprozesses in die Proben gelangt. So werden langkettige Fettsäureamide zum Teil als „*slip agent*“ zur Oberflächenbehandlung von Polymer-Pipettenspitzen verwendet, welches beim Anfertigen der Proben anschließend zu Verunreinigungen geführt haben könnte [96].

Da Oxylipine in vielen verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen, muss die Derivatisierung robust für eine große Anzahl unterschiedlicher Proben und Analytkonzentrationen sein. Um Sicherzustellen, dass alle Bestandteile der Proben

derivatisiert werden, wurde mit einem großen Überschuss an AMPP während der Derivatisierung gearbeitet. Während Oxylipine als Analyten im nM- μ M-Bereich zu erwarten waren [97], wurde AMPP als Derivatisierungsreagenz in mM-Konzentrationen verwendet. Für die spätere Anwendung an humanem Plasma wurde für Hühnerblutplasma der ausreichende Überschuss an AMPP ermittelt. Dafür wurde das Hühnerblutplasma nach dem Standardprotokoll per SPE aufgearbeitet und anschließend mit unterschiedlichen Mengen AMPP derivatisiert. In **Abbildung 16** ist zu erkennen, dass auch eine Nutzung der fünffachen Konzentration mit 225 mM AMPP abweichend vom Standardprotokoll mit 45 mM AMPP zu keiner Änderung der Signalintensitäten der Analyten führt. Somit ist davon auszugehen, dass ausreichend AMPP im Überschuss vorhanden war, um alle Analyten im Plasma zu derivatisieren.

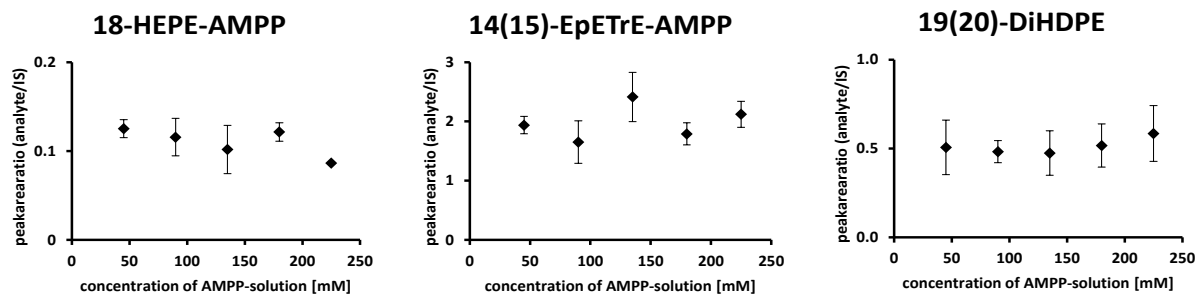


Abbildung 16: Peakflächenverhältnis zwischen dem derivatisierten Analyt und dem internen Standard (Azure A) bei unterschiedlichen AMPP-Konzentrationen. Analysiert wurden die Analyte in Hühnerplasma nach SPE und anschließender Derivatisierung und Analyse am Micromass QqQ.

Nach den ersten Untersuchungen von biologischer Proben nach der SPE von Hühnerblutplasma wurde festgestellt, dass, die Retentionszeiten der Analyten abhängig von der Menge des für die Derivatisierung genutzten SPE-Extrakts waren. Dies war nicht zu erwarten, da das organische Lösemittel, in dem der Extrakt gelöst war, für die Derivatisierung komplett eingeengt und für die Derivatisierung und anschließende Analyse stets in dem gleichem Volumen Flüssigkeit mit der gleichen Zusammensetzung aufgenommen wurde. So sollte die Polarität des Injektionsvolumens unabhängig der genutzten Menge an SPE-Extrakt konstant bleiben und somit auch keinen Einfluss auf die Retentionszeit der Analyten haben.

Abbildung 17 zeigt beispielhaft für 14(15)-EpETrE und 19,20-DiHDPE, dass dies nach der Derivatisierung mit AMPP nicht der Fall war und für die Plasmaproben die Retentionszeiten in Abhängigkeit der genutzten Menge SPE-Extraktes standen.

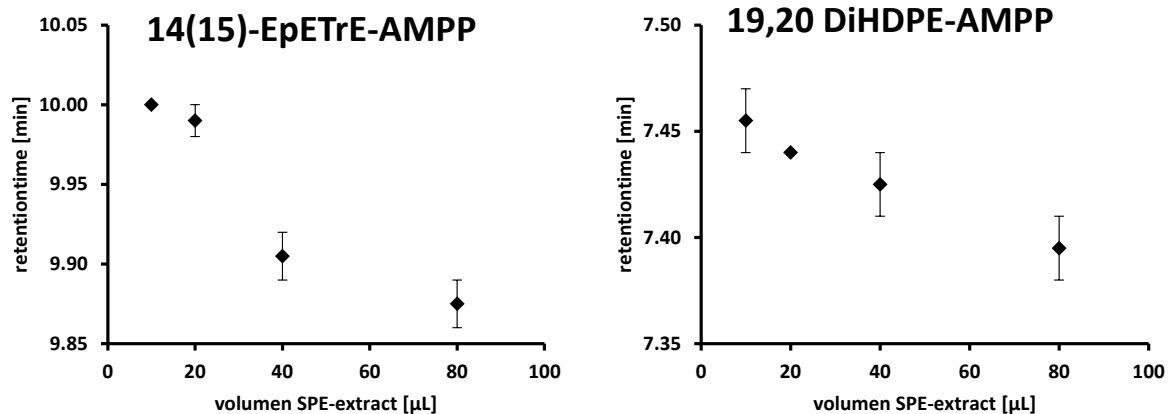


Abbildung 17: Retentionszeit von 14(15)-EpETrE und 19(20)-DiHDPE bei unterschiedlichen Mengen SPE-Extrakt von Hühnerplasma und anschließender Derivatisierung mit AMPP. Analysiert wurden jeweils 10 µL der Lösung nach Derivatisierung am Waters-QqQ auf einer C8 Kinetex Säule (2.6 µm, 100 x 2.1 mm, 100 Å) mit einem angesäuerten Eluenten aus H₂O/ACN.

Für 14(15)-EpETrE schwankte die Retentionszeit um > 1%. Dieser Effekt kann zu Problemen führen, wenn bei Analysen mit schwankenden Volumen aus den SPE-Extrakten gearbeitet wird. Wenn im *scheduled multiple reaction monitoring* die Retentionszeitfenster für die einzelnen Transitionen zu schmal gewählt werden, kann es dazu kommen, dass die Analyten außerhalb dieses Fensters eluieren. Weiterhin kann sich die Verschiebung der Retentionszeiten die Zuordnung der Analyten erschweren: Sofern die Quantifizierung über eine externe Kalibrierung von Analytstandards erfolgt, sind diese nicht von dieser Verschiebung betroffen und es kann auf Grund der unterschiedlichen Retentionszeiten zu Problemen bei der Zuordnung kommen. Mit einem authentischen internen Standard für jeden Analyten kann dieses Problem umgangen werden, welche für diese Methode allerdings nicht zur Verfügung standen. Um diese Probleme zu umgehen, sollte die Menge an genutztem SPE-Extrakt nicht variiert werden. Für die Qualifizierung und Quantifizierung der Proben bietet sich ein Standardadditionsverfahren an, um identische Verschiebung der Retentionszeiten zwischen Kalibrierung und Proben zu haben. Wodurch dieser Effekt hervorgerufen wird, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Ein unterschiedlicher Verbrauch der Derivatisierungsreagenzien ist möglich, was zu einer Veränderung der Polarität im Injektionsvolumen führen könnte. Durch eine Zugabe dieser im starken Überschuss sollte dieses allerdings verhindert werden. Eine weitere Möglichkeit sind Matrixbestandteile im SPE-Extrakt, die durch die Extraktion nicht entfernt werden und durch Nutzung unterschiedlicher Mengen dieses Extrakt zu einer Veränderung in der Polarität des Injektionsvolumen führen. Ein weniger polares Injektionsvolumen bei größerer Menge Extraktionsvolumens könnte

insgesamt dann dazu führen, dass sich die Retentionszeiten der Analyten bei mehr Extrakt verringert.

Im Folgenden wurden von 52 Analyte die Fragmentierungsspektren aufgenommen und charakteristische Transitionen für weitere Analysen ausgewählt. Insgesamt lässt sich beobachten, dass für mit AMPP derivatisierte Oxylipine, Fragmente über den ganzen Massenbereich des Analyten im Spektrum zu sehen sind (**Abbildung 18**). Dies erlaubt es, eine maximale Information zur Strukturaufklärung aus den Massenspektren zu erhalten.

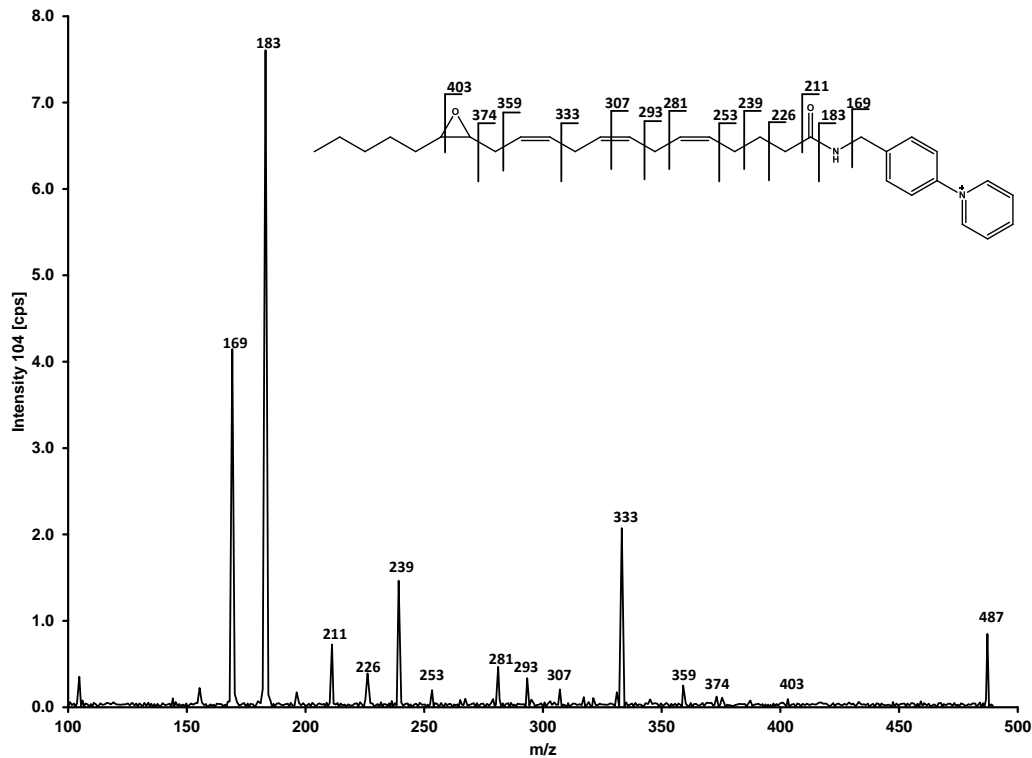


Abbildung 18: Fragmentspektrum von 14(15)-EpETrE nach Derivatisierung mit AMPP. Analysiert wurden 10 μL eines 1 μM Standards am Micromass QqQ nach Trennung auf einer Kinetex C8 Säule mit einem angesäuerten Eluenten aus $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

Im Vergleich zu den Analysen ohne Derivatisierung bleibt der Fragmentierungsmechanismus für Hydroxy- und Dihydroxy-PUFA gleich: mit und ohne Derivatisierung ist jeweils die α -Spaltung an der Hydroxygruppe das spezifischste und intensivste Fragment, welches für die MRM-Analysen genutzt werden kann. Beispielhaft ist dies für 19(20)-DiHDPE in **Abbildung 19** zu sehen. Somit lassen sich die Transitionen von Methoden ohne Derivatisierung auf eine Methode mit Derivatisierung unter Berücksichtigung der zusätzlichen Masse übertragen.

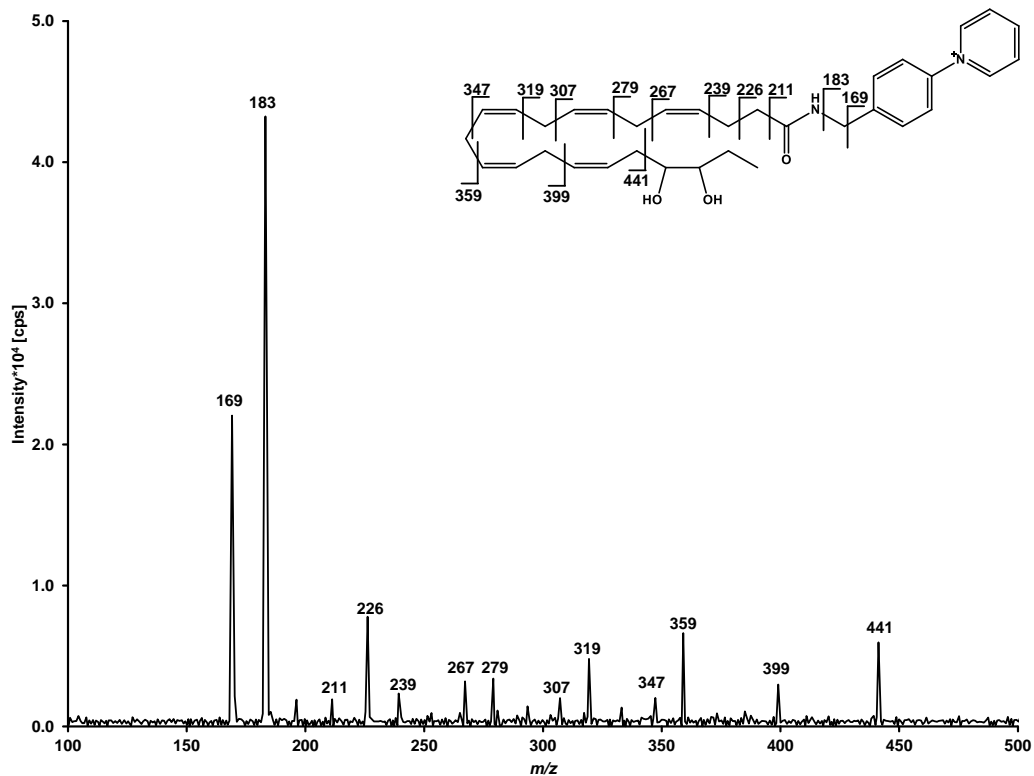


Abbildung 19: Fragmentspektrum 19(20)-DiHDPE nach Derivatisierung mit AMPP. Analysiert wurden 10 μL eines 1 μM Standards am Micromass QqQ nach Trennung auf einer Kinetex C8 Säule mit einem angesäuerten Eluenten aus $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

Für die Epoxy-PUFA lassen sich die Transitionen allerdings nicht direkt übertragen. Für die Epoxy-Gruppe lassen sich sowohl mit als auch ohne Derivatisierung verschiedene Fragmentierungsmechanismen beobachten, welche zu unterschiedlichen spezifischen Fragmenten führen. Zu einem findet ebenfalls eine α -Spaltung statt, beidseitig möglich in Richtung der Carboxy-Gruppe oder in Richtung der Kohlenstoffkette. Zum anderen kann eine Aufspaltung der Epoxy-Gruppe beidseitig zum Sauerstoffatom stattfinden [98, 99]. Beispielhaft lassen sich alle vier Fragmentierungsmechanismen bzw. die dazugehörigen Fragmente im Fragmentspektrum von 11(12)-EpETrE finden (**Abbildung 20**): die α -Spaltungen mit m/z 333 und 375 und die Aufspaltung der Epoxy-Gruppe mit m/z 347 und 363. Da die Intensität dieser Produkte für die unterschiedlichen Epoxy-PUFA schwanken und auch unterschiedlich zwischen den Analysen mit und ohne AMPP-Derivatisierung war, konnten die Transitionen nicht einfach übernommen werden. Daher wurden sie für die Analyten einzeln bestimmt.

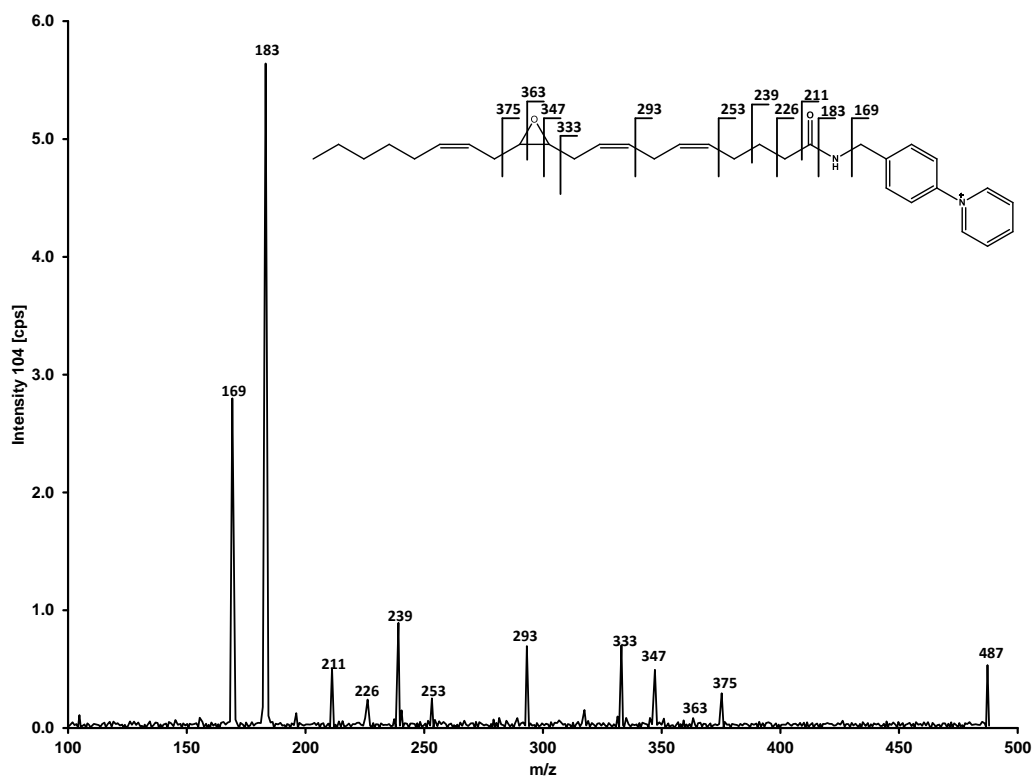


Abbildung 20: Fragmentspektrum von 11(12)-EpETrE nach Derivatisierung mit AMPP. Analysiert wurden 10 μL eines 1 μM Standards am Micromass QqQ nach Trennung auf einer Kinetex C8 Säule mit einem angesäuerten Eluenten aus $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$.

Ein positiver Effekt, der bei der Derivatisierung von Oxylipinen mit AMPP beobachtet werden konnte, ist die Möglichkeit der Unterscheidung verschiedener Isobare. Im Zuge einer Kooperation mit dem Arbeitskreis Organische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal wurde sowohl 18-HEPE in seiner natürlichen Konfiguration (18-*hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapenta-enoic acid* ((*Z,Z,Z,Z,E*)-18-HEPE)), als auch als unnatürliches Isobar (18-*hydroxy-5Z,8Z,11Z,14E,16E-eicosapentaenoic acid* ((*Z,Z,Z,E,E*)-18-HEPE) synthetisiert [100]. Während die Isobare in der Fragmentierung ohne Derivatisierung keine Unterschiede zeigten, konnte eine Differenzierung anhand des Fragmentspektrums nach Derivatisierung mit AMPP vorgenommen werden, wie in **Abbildung 21** zu sehen ist. Während es beim unnatürlichen (*Z,Z,Z,E,E*)-18-HEPE zu einer klassischen α -Spaltung an der Hydroxygruppe kommt, welches zu dem Fragment m/z 425 führt, ist das Fragment des (*Z,Z,Z,Z,E*)-18-HEPE mit m/z 427 um zwei Dalton größer. Der genauere Prozess der Fragmentierung konnte nicht nachvollzogen werden. Möglich ist aber eine Umlagerung der Doppelbindung und zwei Wasserstoffatomen im Zuge der Fragmentierung. Dieser Unterschied reichte allerdings aus, um beide Isobare zu unterscheiden, welches zusätzliche Vorteile der Derivatisierung verdeutlicht.

Analysen per Tripel-Quadrupol--System

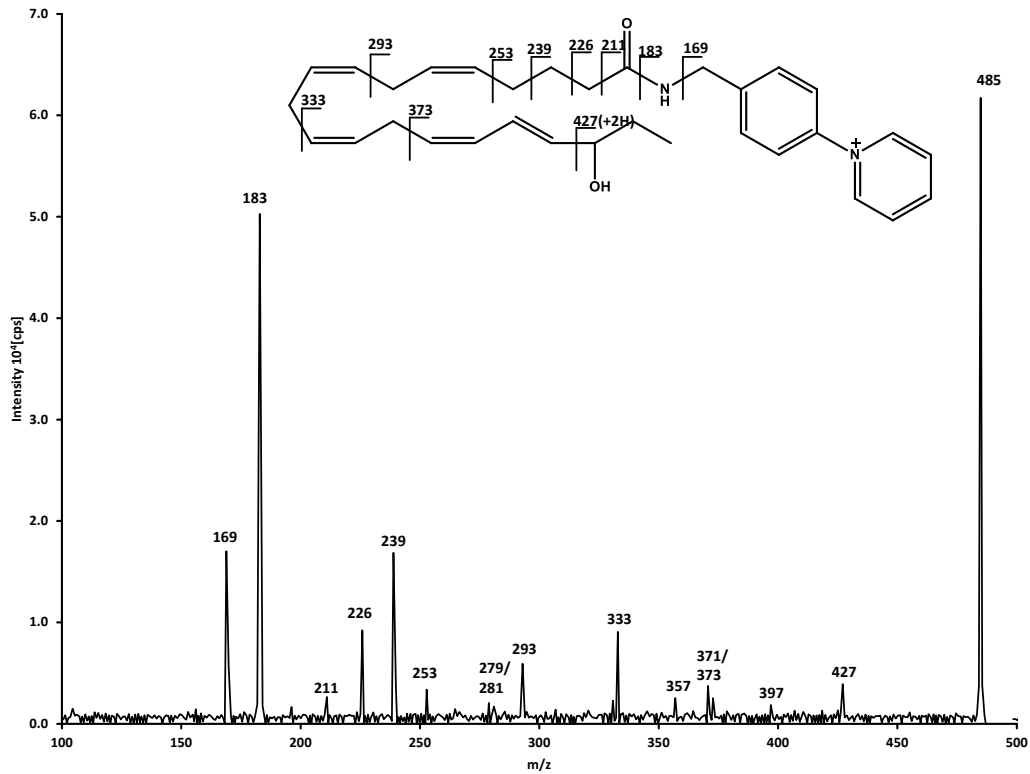


Abbildung 21: Fragmentspektren von *(Z,Z,Z,Z,E)*-18-HEPE (**oben**) und *(Z,Z,Z,E,E)*-18-HEPE (**unten**) nach Derivatisierung mit AMPP. Analysiert wurde am Sciex 3200 QqQ per FIA bei 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (50/50; v/v) von 10 μL des jeweiligen derivatisierten Standards 500 nM.

5.2.2.4 Messungen am IM-QTOF-MS

Um die Sensitivität der Methode weiter zu erhöhen, wurde die Derivatisierung mit AMPP mit der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie gekoppelt. Wie oben beschrieben erlaubt die IM eine Trennung nach der Struktur bzw. räumlichen Größe der Ionen. Diese zusätzliche Trennstufe soll genutzt werden, um die Analyte besser von Verunreinigungen zu trennen, aber auch, um strukturell ähnliche Oxylipine besser unterschieden zu können. Dabei wurde das IM-QTOF-MS im alternierenden Frame Modus (*alternating frame mode*) betrieben (MS(/MS)), bei dem es bei jedem Frame zwischen Null-Fragmentierung-Modus (*zero fragmentation mode*) und starke-Fragmentierung-Modus (*high fragmentation mode*) wechselt. Dies erlaubt es, jedem Spektrum eines $[M^+]$ (Null-Fragmentierung-Modus) ein Fragmentspektrum (starke-Fragmentierung-Modus im nächsten Frame) bei der entsprechenden Driftzeit zuzuordnen. Nach Entwicklung der Methode konnte diese auf verschiedene relevante, biologische Matrices angewendet werden, die typischerweise für die Analyse von Oxylipinen genutzt werden. Diese umfassten Humanplasma, -serum und CaCo-2-Zellen. Die so erzielten quantitativen Ergebnisse wurden mit einer sensitiven LC-ESI(-)-QqQ-MS Methode ohne Derivatisierung verglichen, die üblicherweise für die Analyse von Oxylipinen genutzt wird [64, 66]. Darüber hinaus wurde ein neuartiger bioinformatischer Arbeitsprozess geschaffen, welcher die computerunterstützte Analyse neuer, unbekannter Oxylipine vereinfacht.

Die flüssigchromatographische Methode wurde am Waters QqQ mit einer Shimadzu LC entwickelt und anschließend auf das LC-IM-QTOF-MS(/MS) mit einer Agilent LC übertragen. Für die Trennung wurde eine Säule mit Umkehrphase (C8, Kinetex) verwendet und ein binärer Gradient aus Acetonitril und Wasser genutzt. Zum Ansäuern des Eluenten wurde Essigsäure verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte eine Trennung von 52 Hydroxy-, Dihydroxy- und Epoxy-PUFA in weniger als 22 Minuten erreicht werden (**Abbildung 22**). Das Auswerten der Daten erfolgte über die Software „Skyline-daily“ [101–103]. Die Peakbreiten auf halber Höhe betragen zwischen 0.03 min für 11-HETE und 0.37 min für 17(18)-EpETE. Die Dihydroxy-PUFA eluierten auf Grund ihrer hohen Polarität am frühesten, mit $t_R = 7.40$ min für 12,13-DiHODE und $t_R = 12.34$ min für 5,6-DiHETrE. Die Hydroxy-PUFA eluierten zwischen $t_R = 10.95$ min für 18-HEPE und $t_R = 17.06$ min für 5-HETE. Die Epoxide verweilten mit $t_R = 12.39$ min für 15(16)-EpODE und $t_R = 18.95$ für 5(6)-EpETrE am längsten auf der Trennsäule. Die Retentionszeiten aller Analyten sind in **Tabelle 1** zu finden. Trennpaare, die chromatographisch nicht getrennt werden konnten, wurden anschließend auf Grund ihrer unterschiedlichen Ionenmobilität getrennt. So coeluierten 8,9-EpETrE und 10,11-EpDPE (beide t_R 18.28 min), können aber auf Grund ihrer unterschiedlichen Driftzeiten getrennt werden. Nur 8-HEPE und 12-HEPE (t_R 11.25 min) verblieben durch ähnliche Ionenmobilität

als kritisches Trennpaar. Um die Verschleppung zwischen den Probenläufen zu untersuchen, wurden nach jedem Kalibrierstandard der höchsten Konzentration und in späteren Versuchen nach jeder sechsen biologischen Probe Blindwerte aus organischem Lösemittel injiziert. Dabei konnte keine Verschleppung der Analyten beobachtet werden.

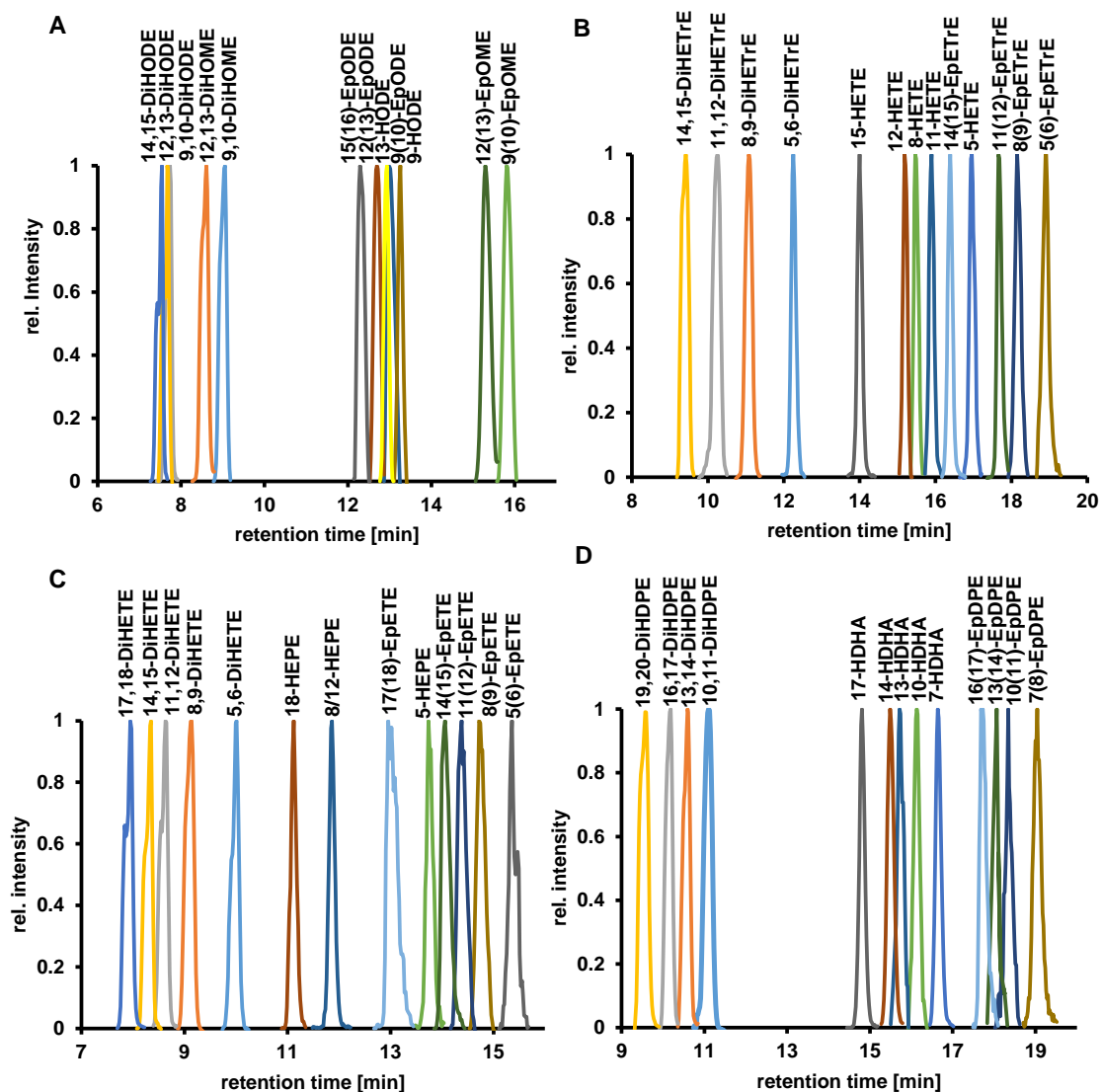


Abbildung 22: Flüssigchromatographische Trennung von 52 Hydroxy-, Dihydroxy- und Epoxy- PUFA der *linoleic acid* (LA) und α -*linoleic acid* (ALA) (A), ARA (B), DHA (C) und EPA (D) nach Derivatisierung mit AMPP. Gezeigt sind die *extractet ion chromatograms* (EIC) gefiltert nach Driftzeit und m/z für die selektivste Ionenspezies nach Tabelle 1. Trennung wurde durchgeführt auf einer C8 Kinetex Säule (2.6 μ m, 100 x 2.1 mm, 100 Å) mit einem angesäuerten Eluenten aus H₂O/Wasser. Die Detektion erfolgte am IM-QTOF-MS/MS.

Tabelle 1: LC-IM-QTOF-MS(/MS) Parameter für 52 Oxylipine nach Derivatisierung mit AMPP. Aufgeführt sind die Transitionen für $[M^+]$ und ein spezifisches Fragmention, die Retentionszeit t_R , die Driftzeit t_D , die daraus resultierende *collision cross section* (Ω) in N_2 , *limit of detection* (LOD), *lower limit quantification* (LLOQ) und *upper limit of quantification* (ULOQ), sowie aus der Kalibriergeraden resultierende R^2 . Fett gezeigt sind die Ionen die für folgenden Analysen genutzt wurden. Mit * markiert: höchster/niedrigster Punkt der Kalibrierung.

Analyte	$[M^+]$	fragment ion	t_R [min]	t_D [ms]	Ω [\AA^2]	LOD [nM]	LLOQ [nM]	ULOQ [nM]	R^2
9,10-DiHOME	481.3430	369.2178	9.06	27.11	216.8	0.6	1.5	292	0.9867
12,13-DiHOME	481.3430	351.2436	8.63	27.18	217.4	0.8	2.0	402	0.9957
9,10-DiHODE	479.3273	369.2178	7.74	27.06	216.4	0.5	0.5	1256*	0.9987
12,13-DiHODE	479.3273	351.2436	7.40	26.38	211.0	0.2	0.9	434*	0.9816
15,16-DiHODE	479.3273	391.2749	7.49	26.20	209.6	0.6	1.4	1435*	0.9895
5,6-DiHETrE	505.3430	313.1552	12.34	27.50	219.6	4.7	12	1183*	0.9958
8,9-DiHETrE	505.3430	295.1810	11.14	27.79	221.9	0.9	2.3	467	0.9873
11,12-DiHETrE	505.3430	335.2123	10.28	27.94	223.1	1.5	3.7	749	0.9966
14,15-DiHETrE	505.3430	375.2436	9.48	27.57	220.2	2.4	5.9	1176*	0.9950
5,6-DiHETE	503.3274	313.1552	10.02	27.08	216.3	0.2	0.3	16*	0.9743
8,9-DiHETE	503.3274	295.1810	9.17	27.41	218.9	4.0	7.9	396	0.9974
11,12-DiHETE	503.3274	335.2123	8.81	27.54	220.0	1.0	9.9	497	0.9780
14,15-DiHETE	503.3274	375.2436	8.36	27.27	217.8	7.0	14	701	0.9990
17,18-DiHETE	503.3274	415.2749	7.98	26.66	212.9	1.8	4.6	914	0.9930
10,11-DiHDPE	529.3430	321.1967	11.13	28.33	226.0	1.2	6.2	3083*	0.9986
13,14-DiHDPE	529.3430	361.2280	10.63	28.19	224.9	0.9	4.3	2161*	0.9959
16,17-DiHDPE	529.3430	401.2593	10.23	28.05	223.7	0.7	3.4	1710*	0.9963
19,20-DiHDPE	529.3430	441.2906	9.62	27.60	220.2	7.1*	7.1	1419*	0.9956
9(10)-EpOME	463.3325	339.2073	15.89	26.71	213.8	0.8	3.8	376	0.9935
12(13)-EpOME	463.3325	363.2436	15.38	26.66	213.4	0.7	3.6	359	0.9949
9(10)-EpODE	461.3168	339.2073	13.19	26.41	211.5	1.1	5.4	535	0.9984
12(13)-EpODE	461.3168	363.2436	12.79	26.24	210.1	0.5	1.2	243	0.9937
15(16)-EpODE	461.3168	389.2593	12.39	26.15	209.4	1.5	3.7	740	0.9958
5(6)-EpETrE	487.3325	283.1447	18.95	27.18	217.3	6.3	63	626*	0.9324
8(9)-EpETrE	487.3325	307.1810	18.27	27.18	217.3	3.6	14	357*	0.9991
11(12)EpETrE	487.3325	347.2123	17.79	27.24	217.8	6.2	25	615*	0.9992
14(15)-EpETrE	487.3325	333.1967	16.35	26.98	215.7	0.4	2.0	195	0.9952
8(9)-EpETE	485.3168	307.1810	14.85	26.81	214.4	1.7	4.2	833	0.9874
11(12)-EpETE	485.3168	347.2123	14.51	26.66	213.2	2.2	5.5	552	0.9934
14(15)-EpETE	485.3168	387.2436	14.20	26.75	213.9	2.7*	2.7*	1347	0.9594
17(18)-EpETE	485.3168	413.2593	13.17	26.65	213.1	3.9*	3.9*	968	0.9988
10(11)-EpDPE	511.3325	363.2073	18.45	27.79	221.9	1.8	4.6	919	0.9717
13(14)-EpDPE	511.3325	402.2307	18.16	27.76	221.6	1.2	3.0	302	0.9792
16(17)-EpDPE	511.3325	413.2593	17.85	27.68	221.0	1.3	3.3	662	0.9985
19(20)-EpDPE	511.3325	399.2436	16.65	27.61	220.4	2.8	7.0	1119	0.9874
9-HODE	463.3325	339.2064	13.33	26.80	214.5	1.0*	1.0*	100	0.9730
13-HODE	463.3325	363.2449	12.95	26.81	214.6	1.0*	1.0*	100	0.9574
5-HETE	487.3325	283.1596	17.06	27.07	216.4	10.0	20	500*	0.9969
8-HETE	487.3325	295.1765	15.61	27.24	217.8	2.0	10	500*	0.9438
9-HETE	487.3325	335.2133	14.99	27.37	218.8	2.0	10	500*	0.9839
11-HETE	487.3325	345.1758	15.95	27.28	218.1	1.0	2.0	500*	0.9304
12-HETE	487.3325	347.2091	15.33	27.50	219.8	2.0	10	500*	0.9829
15-HETE	487.3325	363.3346	14.03	27.14	217.0	2.0	10	500*	0.9751
20-HETE	487.3325	333.1954	11.93	26.74	213.8	2.0	10	500*	0.9881
5-HEPE	485.3168	283.1582	13.82	26.45	211.5	2.0	10	500*	0.9979
8-HEPE	485.3168	295.1815	12.48	26.82	214.4	1.0	2.0	500*	0.8995
12-HEPE	485.3168	375.2058	12.48	27.15	217.1	1.0	2.0	500*	0.9961
15-HEPE	485.3168	333.1957	11.90	26.74	213.8	1.0	2.0	500*	0.9805
18-HEPE	485.3168	439.3329	10.95	25.98	207.7	1.0*	1.0*	500*	0.9908
7-HDHA	511.3325	280.1516	16.72	27.38	218.6	1.0	2.0	500*	0.9632
11-HDHA	511.3325	361.1898	16.21	27.91	222.8	1.0*	1.0*	500*	0.9985
14-HDHA	511.3325	401.2270	15.67	27.83	222.2	2.0	10	500*	0.9842

Als signifikantestes Ion konnte im Null-Fragmentierungs-Modus das $[M]^+$, also der durch die Derivatisierung geladene Analyt, für die meisten Analyte beobachtet werden. Ebenfalls konnte die charakteristische Abspaltung und Fragmentierung des AMPP-Derivats mit m/z 183 und 169 beobachtet werden. Andere, für ESI typische Addukte mit H^+ , Na^+ , K^+ oder der neutrale Verlust von Wasser konnten nicht mit signifikanter Intensität erfasst werden. Bei einer Frequenz von 2.1 Frames/s für den alternierenden Frame Modus ergaben sich > 15 Datenpunkte pro Peak, welches eine hinreichende Genauigkeit bei der Peakflächenbestimmung erlaubte [104]. Für die Kalibrierung ergab sich eine Linearität von >0.98 (R^2) für alle Analyte bei einer Genauigkeit von > 0.75 für alle Datenpunkte. Das Detektionslimit (*limit of detection*(LOD)) mit Signal/Rauschen > 3 reichte von 0.2 nM für 12,13-DiHODE und 5,6-DiHETE bis zu 10 nM für 5-HETE (entspricht einer Säulenkonzentration von 1.0-50 pg). Das untere Quantifizierungslimit (*lower limit of quantification* (LLOQ)) mit Signal/Rauschen > 9 reichte von 0.3 nM für 5,6-DiHETE bis zu 63 nM für 5(6)-EpETrE (entspricht einer Säulenkonzentration von 1.0-315 pg). Die LODs und LLOQs liegen damit in der gleichen Größenordnung wie in zuvor veröffentlichte Methoden [62, 64, 105]. Unterschiede der LODs und LLOQs einzelner Analyte im Vergleich zu anderen Methoden können mit der Art des genutzten Standards begründet sein. Hartung et al. konnten zeigen, dass für nicht-zertifizierte Oxylin-Standards die angegebene Konzentration zum Teil erheblich von den nominalen Konzentrationen abweichen [106]. Da die in dieser Methode genutzten Standards ebenfalls nicht zertifiziert sind, könnte dies einen Einfluss auf die bestimmten LODs und LOQs haben und Unterschiede zu anderen Methoden erklären. Das obere Quantifizierungslimit (*upper limit of quantification* (ULOQ)) ergab sich für die meisten Analyte bei 400-1500 nM durch eine Detektorsättigung bei höheren Konzentrationen. Der kleine lineare Arbeitsbereich von etwa 3 Dekaden ist typisch und einer der Nachteile eines Flugzeit-Analysators [107].

Für alle 52 derivatisierten Analyte wurde die Ionenmobilitäts-Trennung untersucht und charakterisiert. Die für die Analyte spezifischen Driftzeiten und daraus bestimmten CCS sind ebenfalls in **Tabelle 1** zu finden. Die Ionenmobilitäten wurden sowohl in Verbindung mit der Vorläufer-PUFA als auch mit der Position der funktionellen Gruppe ausgewertet (**Abbildung 23**). Die CCS erhöht sich dabei mit der Länge der Vorläufer-PUFA, wobei die Derivate der DHA (C_{22}) als längste, untersuchte PUFA die höchsten CCS mit 218.6 Å² bis 226.0 Å² besitzen. ARA (C_{20}) und EPA (C_{20}) weisen zwar die gleiche Kettenlänge auf, dennoch haben die Derivate der EPA im Durchschnitt geringere CCS mit 207.7 Å² und 219.7 Å² im Gegensatz zu den ARA-Derivaten mit 213.8 Å² und 223.1 Å². Die Werte für Derivate der ALA schwankten zwischen 209.4 Å² und 216.4 Å². Damit liegen die CCS der derivatisierten Oxyline in dem zu erwartenden Bereich und etwas höher als die der underivatisierten Analyte, welche zum Beispiel mit 190.2–199.0 Å² für DHA-Derivate ebenfalls in Stickstoff als Driftgas beschrieben

sind [108]. Die höheren Werte lassen sich durch die Derivatisierung und damit verbundene größere, molekulare Struktur begründen. Die leicht erhöhten CCS von EPA im Vergleich zu ARA lassen sich mit der erhöhten Anzahl an Doppelbindungen und somit einer geringeren Sättigung begründen. So konnte Kyle et al. für einfach ungesättigte Fettsäuren zeigen, dass diese höhere CCS besitzen als ihre gesättigten Äquivalente [109]. Auch Zhang et al. konnten diese Korrelation zwischen Sättigung und CCS für C₁₈ Fettsäuren zeigen mit C_{18:3} (170.5 Å²), C_{18:2} (171.3 Å²), C_{18:1} (172.4 Å²) und C_{18:0} (173.7 Å²) [110]. Der Unterschied in den Derivaten auf Grund ihrer Vorläuferfettsäure lassen sich so nutzen, um unbekannte Analyte in der *non-targeted*-Analyse durch ihre Ionenmobilität einer Vorläuferfettsäure zuzuordnen und somit erste Informationen über den Analyten zu erhalten.

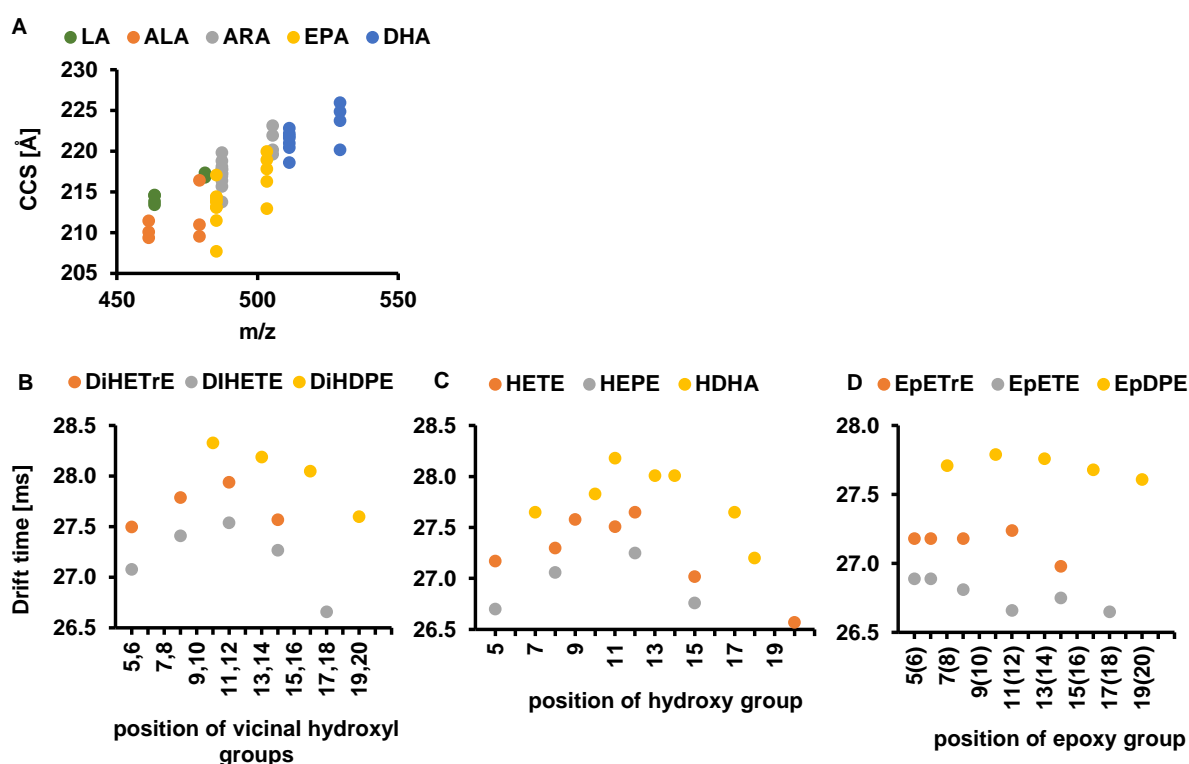


Abbildung 23: (A) Ermittelte *collision cross sections* (CCS) von Epoxy- und Dihydroxy-PUFA der Vorläuferfettsäuren LA, ALA, ARA, DHA und EPA nach Derivatisierung mit AMPP. Driftzeiten der Regioisomere der Hydroxy- (B), Dihydroxy- (C) und Epoxy- (D) PUFA der ARA, EPA und DHA nach Derivatisierung als Funktion der Position ihrer funktionellen Gruppe in der Kohlenstoffkette der Fettsäure. Gezeigt sind die Driftzeiten ermittelt für das [M⁺].

Bei der Betrachtung der Driftzeit in Abhängigkeit der Position der funktionellen Gruppe an dem Kohlenstoffgerüst zeigt sich ein auffälliges Muster (**Abbildung 23**). Für Hydroxy- und Dihydroxy-PUFA steigt die Driftzeit anfangs mit der Entfernung der funktionellen Gruppe zur Carbonsäure-Gruppe. Zwischen der Position C10 und C12 findet die Driftzeit dann ein Maximum und sinkt anschließend wieder mit größerer Entfernung Carbonsäure-Gruppe. Der Anstieg der Driftzeit mit der Entfernung zur Carbonsäure-Gruppe und damit zur AMPP-Gruppe

scheint sinnvoll, da die funktionelle Gruppe mit erhöhtem Abstand zur großen AMPP-Gruppe mehr Einfluss auf die Molekülstruktur hat und somit die Driftzeit ansteigt. Das anschließende Absinken der Driftzeit könnte durch einen Ringschluss begründet sein, der zwischen der positiven Ladung der AMPP-Gruppe und der funktionellen Gruppe stattfindet. Ähnliche Ringschlüsse sind etwa für LTB₄ beschrieben; so vermuten Di Giovanni et al. nach Ionenmobilitäts-Messungen und theoretischen Berechnungen, dass beim LTB₄ eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem C5-Hydroxy-Proton und dem Carboxylat-Anion aufgebaut wird und so die gefaltete Struktur stabilisiert [111]. Diese gefaltete Struktur zeigt wiederum eine geringere CCS als ihre offene Struktur [111, 112]. Ähnliches könnte bei den hier gezeigten Experimenten zu Grunde liegen. Mit höherer Entfernung der interagierenden funktionellen Gruppe zur AMPP-Gruppe sinkt die Länge der verbleibenden aliphatischen Kohlenstoffkette, welches vermutlich zu einer Verkleinerung der dreidimensionalen Struktur und somit zu einer kleineren CCS führt. Eine mögliche geometrische Struktur dieser Auffaltung für ARA aus unterschiedlichen Blickwinkeln ist in **Abbildung 24** dargestellt.

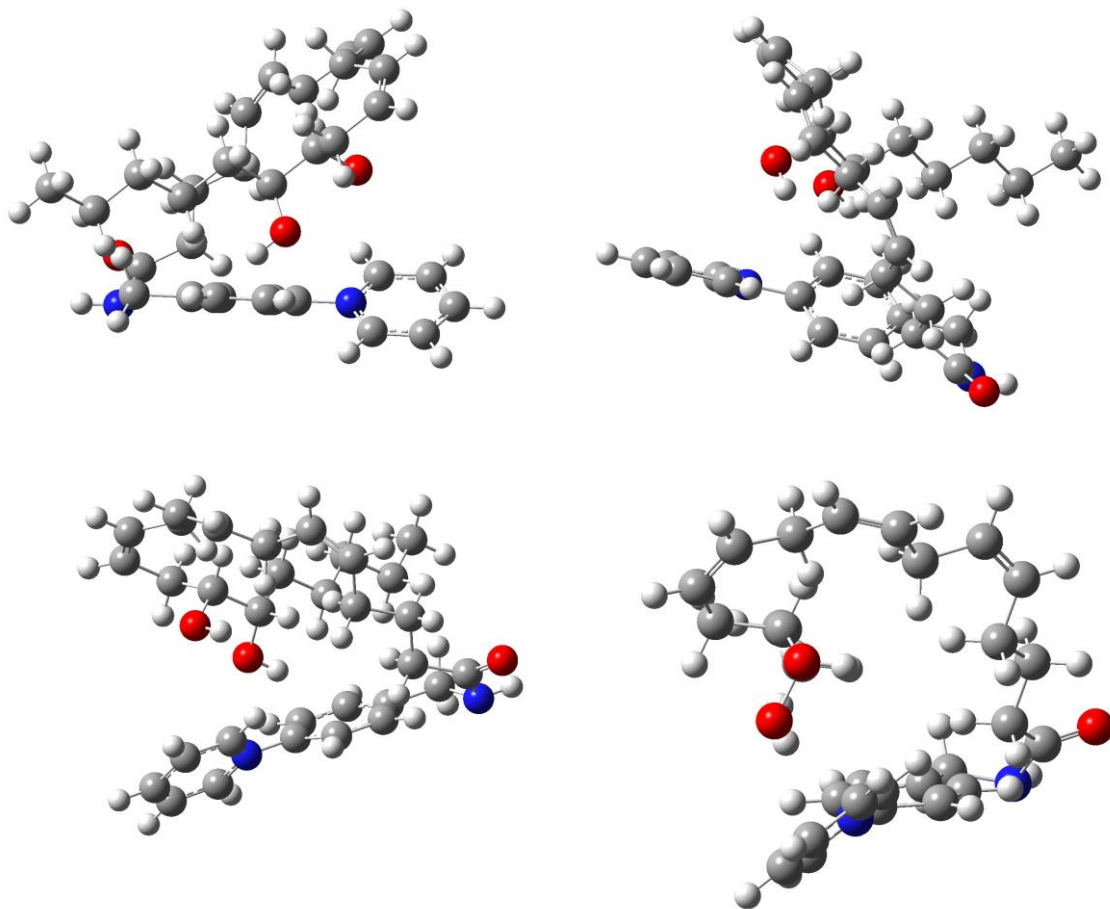


Abbildung 24: Mögliche räumliche Struktur von 17,18-DiHETE unter Wechselwirkung der vicinalen Diolgruppe (Sauerstoff in rot) mit dem positiv geladenen Stickstoff (blau) der AMPP-

Gruppe und die daraus resultierende Ringbildung des Moleküls. Darstellung erfolgte in GaussView 6.0.16 [113].

Die zusätzliche Trenndimension der Ionenmobilität ermöglichte es ebenfalls, in der Chromatographie coeluiierende Substanzen auf Grund ihrer unterschiedlichen Ionenmobilität zu trennen, wie es in einer anderen Arbeit bereits gezeigt wurde [114]. Ein Beispiel in dieser Methode für humanes Plasma ist in **Abbildung 25** gezeigt. Hier coeluiieren zwei unbekannte Analyten mit identischer hochaufgelöster Masse (479.3332 Da) zeitgleich bei $t_R = 9.6$ Minuten. In einer üblichen Trennmethode für eine *non-targeted* Analyse mit flüssigchromatographischer Trennung und Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie ohne IM-Trennung wäre es nicht möglich, diese Substanzen zu differenzieren.

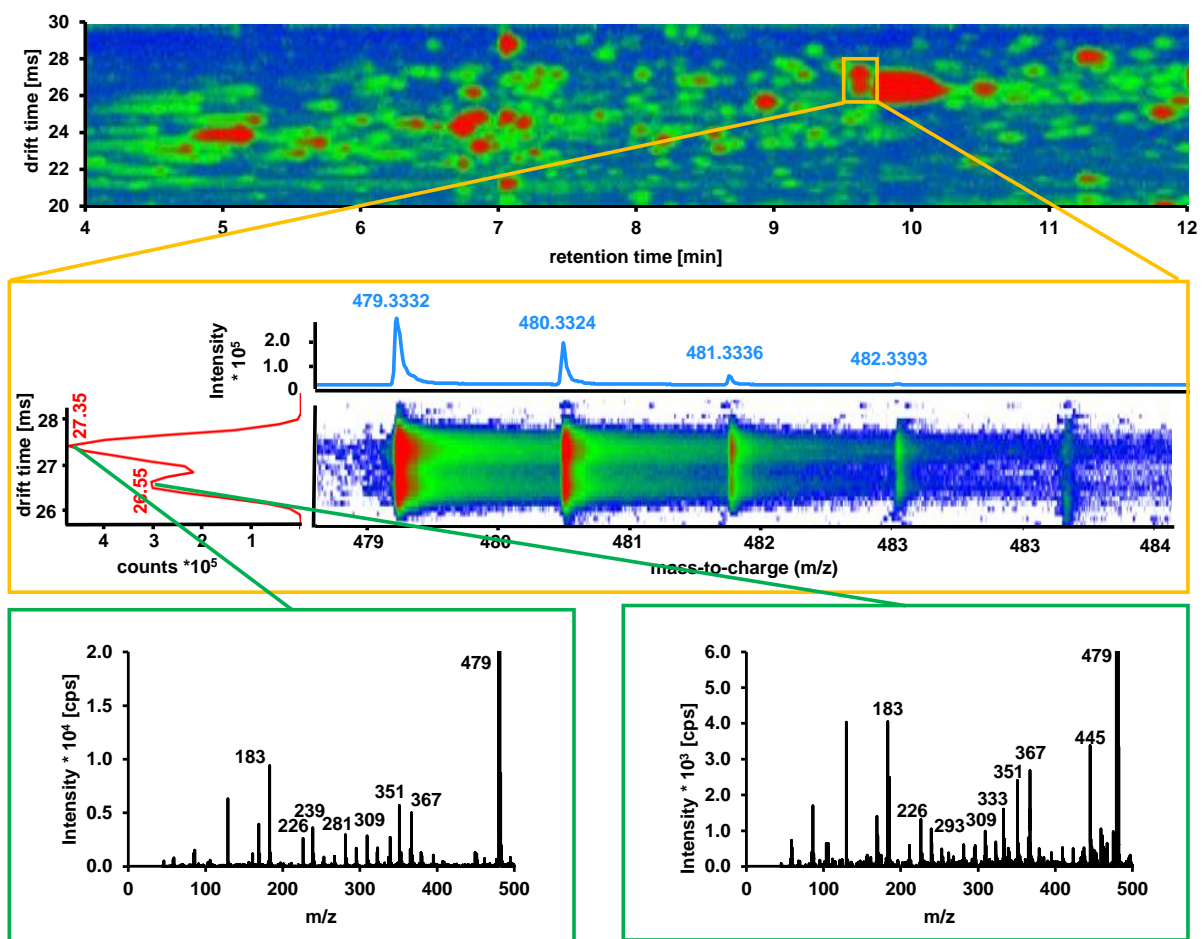


Abbildung 25: Trennung eines coeluiierenden und isobaren Ionenpaars (m/z 479.3332) in humanem Plasma mittels IM-QTOF-MF(/MS). **Oben:** chromatographische Trennung als 2D-*heatmap* mit zwei coeluiierenden Analyten bei 9.6 Minuten. **Mitte:** Driftzeitspektrum bei 9.6 Minuten für die beiden Analyten mit Drifzeiten von 26.55 und 27.35 ms. **Unten:** MS/MS-Spektrum beider Analyten erhalten durch den *alternating frame* Modus. Analysiert wurden 10 μ L humanes Plasma nach Extraktion und Derivatisierung.

Über ihre unterschiedlichen Driftzeiten mit $t_D = 27.35$ ms und $t_D = 26.55$ ms lassen sich beide Substanzen in dieser Methode über ihre Ionenmobilität trennen. Anhand der hochaufgelösten Masse mit 479.3332 Da lässt sich unter Berücksichtigung des AMPP-Derivats die Summenformel $C_{30}H_{43}O_3N_2$ für den Analyten ableiten. Dies entspricht einer doppelt oxygenierten Fettsäure mit einer C_{18} -Kettenlänge und zwei Doppelbindungen. Sowohl die Retentionszeit als auch die Driftzeit der Substanzen lassen in Kombination mit der Summenformel auf eine kurzkettige Dihydroxy-PUFA schließen.

Nach Ausarbeitung der analytischen Methode und Aufstellen der externen Kalibrierung wurde die Methode anschließend für unterschiedliche, biologische Anwendungen getestet und mit bisher genutzten Methoden verglichen. In einem ersten Ansatz wurden CaCo-2-Zellen neben einer Kontrollgruppe (Dimethylsulfoxid, DMSO) mit unterschiedlichen Mengen TPPU (*N*-[1-(1-oxopropyl)-4-piperidinyl]-*N'*-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-urea) inkubiert. TPPU ist ein potenter Inhibitor der löslichen Epoxid-Hydrolase (*soluble epoxid hydrolase* (sEH)). Durch die Hemmung dieses Enzyms war zu erwarten, dass ein Teil der Abbauwege der Epoxy-PUFA blockiert werden und somit der Gehalt an Epoxy-PUFA in Abhängigkeit der TPPU-Konzentration in diesen Proben erhöht sein sollte [42, 51]. Nach Inkubation der Zellen wurden diese pelletiert, in PBS sonifiziert und das Homogenat per SPE aufgearbeitet, analog zu den Standards derivatisiert und mit LC-IM-QTOF-MS(/MS) untersucht. Ein Beispiel für den Gehalt der EpETrEs in den CaCo-2-Zellen ist in **Abbildung 26** dargestellt.

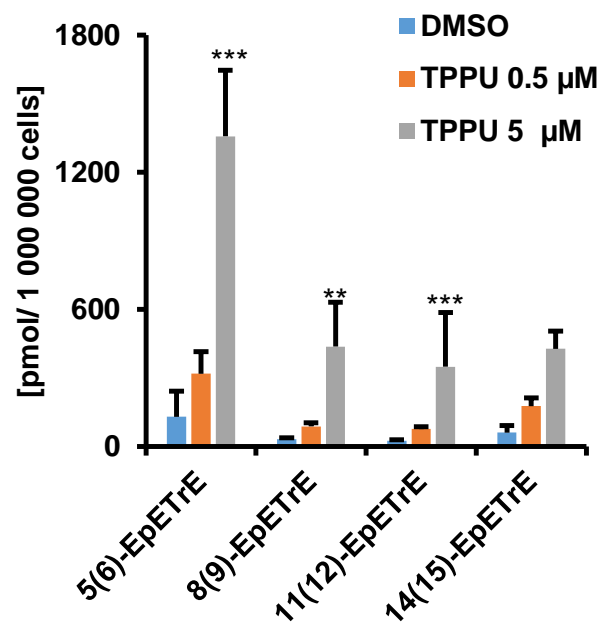


Abbildung 26: Quantifizierung derivatisierter Epoxy-PUFA der ARA in CaCo-2-Zellen inkubiert mit und ohne TPPU, ein sEH-Inhibitor. Gezeigt ist der Mittelwert + SD ($n = 3$, ANOVA gefolgt von Dunnett's post hoc test $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

Es ist zu erkennen, dass nach Zugabe von 5 μM TPPU die Konzentrationen von 5(6)-EpETrE, 8(9)-EpETrE und 11(12)-EpETrE gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht sind. Auch 14(15)-EpETrE folgt diesem Trend, zeigt aber keinen signifikanten Unterschied. Bei Zugabe von TPPU 0.5 μM scheint dieser Trend ebenfalls vorhanden zu sein, die Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe sind allerdings nicht signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass mit einer geringeren Aktivität von TPPU der Gehalt an Epoxy-PUFA in den Proben steigt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Studien gefunden werden. So haben Ostermann et al. einen signifikanten Anstieg des 14(15)-EpETrE/ 14,15-DiHETrE Verhältnisses im Plasma nach oraler Administration von TPPU in Mäusen gezeigt [51]. In weiteren Studien bei denen mit CaCo-2-Zellen gearbeitet wurde, blieb der Gehalt der EpETrEs unter dem LOD mit 6.2 nM [115]. Die Ergebnisse demonstrieren die Eignung der entwickelten LC-IM-QTOF-MS(/MS) Methode in Kombination mit der *charge-switch* Derivatisierung für komplexe biologische Matrices.

In einem weiteren Schritt wurde die Methode für die Bestimmung von Oxylipinen in humanem Plasma und Serum angewendet und nach Quantifizierung die Ergebnisse mit einer sensitiven LC-ESI(-)-QqQ-MS-Methode ohne Derivatisierung verglichen, wie sie üblicherweise für die Quantifizierung von Oxylipinen genutzt wird [64, 116]. Die Konzentrationen der einzelnen Oxylipine sind im Vergleich der beiden Methoden in **Abbildung 27** dargestellt. Die Ergebnisse der Quantifizierung nach Derivatisierung per LC-IM-QTOF-MS(/MS) sind insgesamt konsistent zu den Ergebnissen des Standardprotokolls und Quantifizierung per LC-QqQ-MS [63, 66]. Die Konzentrationen der Analyten in den unterschiedlichen Proben sind in derselben Größenordnung und das relative Verhältnis der Regioisomere ist vergleichbar. Die Ergebnisse liegen ebenfalls in der Größenordnung, wie sie auch von Quehenberger et al. in hydrolysiertem Plasma mit einem QqQ mit ESI(-) gefunden wurden [117]. Bei genauerer Betrachtung weisen die meisten Hydroxy-PUFA in den Messungen am LC-IM-QTOF-MS(/MS) ähnliche Konzentration im Vergleich zu den Werten am LC-QqQ-MS auf, jedoch mit einzelnen Ausnahmen: Niedrigere Konzentrationen konnten für 9-HODE und 13-HODE für alle Proben beobachtet werden. Für Dihydroxy- und Epoxy-PUFA sind die Konzentrationen per LC-IM-QTOF-MS(/MS) leicht gegenüber der anderen Methode erhöht: So ließ sich dort beispielsweise 315 ± 60 nM 9(10)-EpODE bestimmen, während am LC-ESI(-)-QqQ-MS nur 6.2 ± 0.6 gefunden werden konnte.

Messungen am IM-QTOF-MS

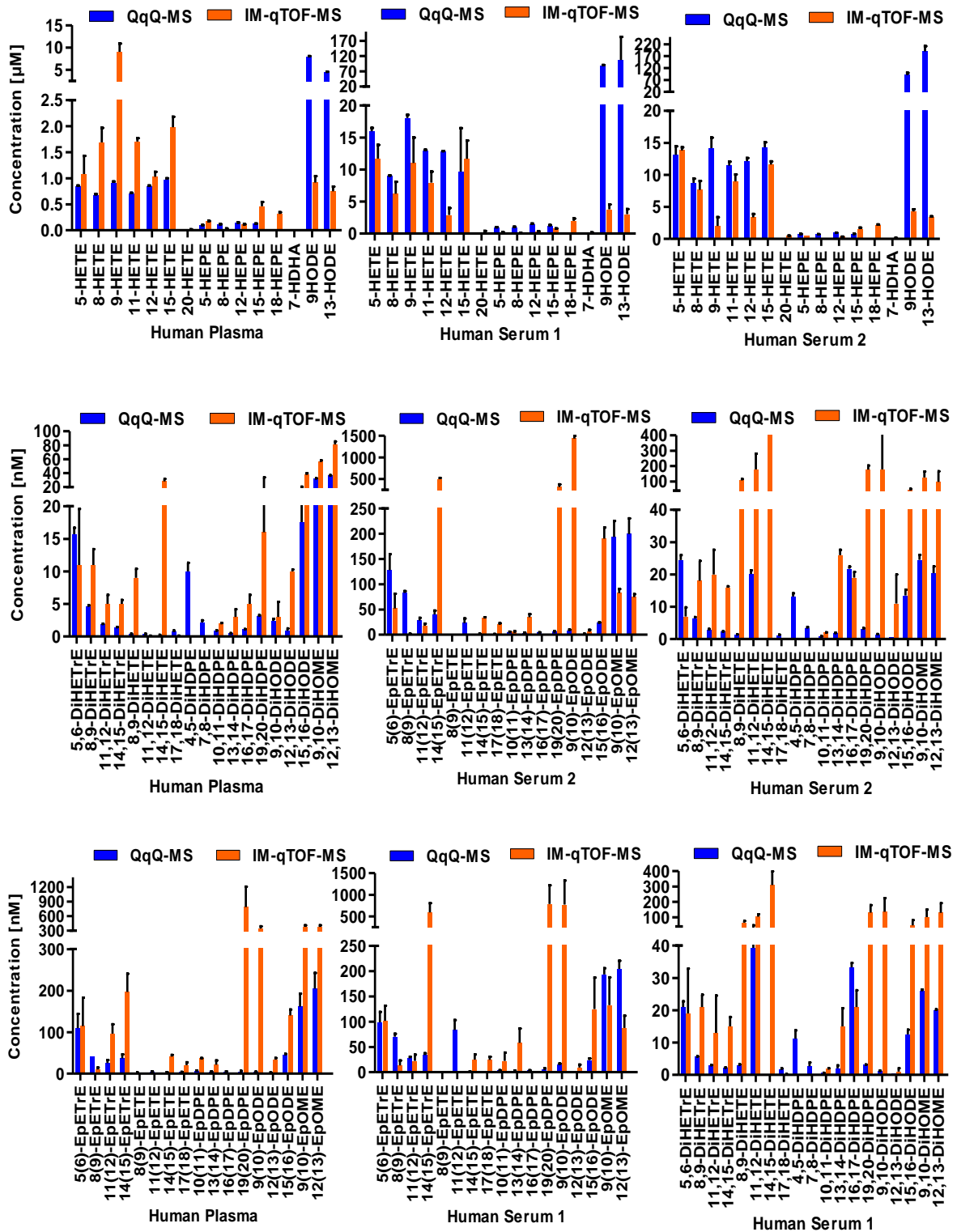


Abbildung 27: Quantifizierung von Hydroxy- (**oben**), Dihydroxy- (**mitte**) und Epoxy- (**unten**) PUFA in humanem Plasma (links), Serum 1 (**mitte**) und Serum 2 (**rechts**) nach Extraktion und Derivatisierung mittels LC-IM-QTOF-MS/(MS) (**orange**) im Vergleich zu einer LC-QqQ-MS Methode ohne Derivatisierung (**blau**). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=3).

Durch das Einbringen der permanenten Ladung (AMPP-Derivat) sind die derivatisierten Analyte weniger anfällig für Unterschiede in der Ionisierungseffizienz, da sie bereits eine Ladung tragen. Durch diese geringere Anfälligkeit kann es bei der Quantifizierung mittels externer, matrixfreier Kalibrierung zu scheinbar überhöhten Messwerten kommen, sofern kein authentischer interner Standard verwendet wird [118, 119]. Einige Analyte, wie 19,20-DiHDPE, zeigen deutlich erhöhte Konzentrationen bei der Analyse am LC-IM-QTOF-MS(/MS). Ein möglicher Grund hierfür kann die zusätzliche Trenndimension der Ionenmobilität darstellen, wodurch Analyt und Matrix noch weiter getrennt werden. Dies kann für einige Analyten zu diesen scheinbar stark erhöhten Messwerten führen [82, 109]. Diese Unterschiede gilt es abschließend zu untersuchen, um die Hypothesen, die zu den Unterschieden führen, zu verifizieren. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass die entwickelte Methode biologisch wichtige quantitative Oxylin-Gehalte erfassen kann und dabei vergleichbar zu den jetzigen genutzten, sensitiven LC-QqQ-MS-Methoden ist. Ein großer Vorteil, den die LC-IM-QTOF-MS(/MS) Methode dabei mit sich bringt, ist das Erfassen der MS und MS/MS Daten unbekannter Substanzen. So ist es möglich, bereits gemessene Proben auch in der Retrospektive nach neuen Oxylinen zu analysieren, welches bei der Nutzung des *scheduled selected reaction monitoring* an einem QqQ Instrument nicht möglich ist.

5.2.2.5 Einführung eines Bioinformatik-Arbeitsprozesses

Neben der *targeted*-Analyse von Oxylipinen wurde die Methode der Derivatisierung mit AMPP und anschließender Analyse per LC-IM-QTOF-MS(/MS) für den *non-targeted*-Bereich getestet. Dazu wurde eine computergestützte automatisierte Auswertung entworfen, um die großen Mengen an Daten über die Bioinformatik auf relevante Analyte zu reduzieren. Das zuvor analysierte, humane Plasma wurde dazu in einem weiteren Schritt der *feature*-Analyse über die Agilent Mass Profiler Professional Software unterzogen. Bei diesem Arbeitsprozess vergleicht die Software die molekularen Merkmale (*feature*) wie m/z , Retentionszeit und Driftzeit der unbekannt Analyte zwischen den Proben und stellt Gemeinsamkeiten zusammen. Allerdings nimmt es dabei keine Rücksicht auf die MS/MS-Daten, die im Zuge des alternierenden Frame Modus erfasst werden. Um dies zu ermöglichen, wurden die Daten jeder einzelnen Probe in dem Dateiformat *compound exchange format (cef)* extrahiert und in ein Python-Skript eingelesen. Dieses in dieser Arbeit programmierte Skript filterte anschließend die MS/MS-Daten aller Substanzen auf das Vorhandensein der spezifischen Fragmente, welche durch die Abspaltung des AMPP-Derivates (m/z 169.0 und 183.1 bei einer Genauigkeit von 0.1 Da) definiert wurden. Da die Derivatisierung eine Kopplung an der Carbonsäuregruppe darstellt, konnten die Substanzen somit auf Carbonsäuregruppe-tragende reduziert werden, was für alle Fettsäuren, Oxylipine und weitere Eicosanoide zutrifft. Aus insgesamt 4137 Substanzen, die ursprünglich in den humanen Plasma-Proben gefunden wurden, konnten diese so auf etwa 1200 Carbonsäuren reduziert werden. In einem nächsten Schritt wurden die Proben dann miteinander verglichen, jetzt unter Berücksichtigung der MS/MS-Daten. Eine Substanz wurde dann als in allen drei Proben vorhandener Analyt erkannt, wenn das m/z des $[M^+]$ mit einer Genauigkeit von 0.1 Da, seine Retentionszeit mit einer Genauigkeit von 0.2 Minuten und seine CCS mit einer Genauigkeit von 2.5 Å übereinstimmt. Da die vorhergehenden Analysen gezeigt haben, dass die CCS für die derivatisierten Oxylipine bei etwa 200-220 Å liegt, entspricht dies einem Fehler von < 1%. Des Weiteren mussten 80% der 25 intensivsten Fragmente bei einer Genauigkeit von 0.1 Da übereinstimmen. Auf diesen Weg wurden von den etwa 1200 Carbonsäuren 285 als gemeinsame Analyten erkannt. Ein Beispiel für die Werte eines gemeinsamen Analyten ist in **Tabelle 2** gezeigt.

Tabelle 2: Mögliche Identifizierung von *10-hydroxy-8-octadecenoic acid* in humanem Blutplasma nach Extraktion und Derivatisierung mittels LC-IM-QTOF-MS(/MS). Gezeigt ist die *feature-ID* und die dazugehörigen akkuraten Massen des Präkursorions, Retentionszeit, Driftzeit und CCS in N₂ für den Analyten in drei identischen Blutplasmaproben. Fett gezeigt sind die spezifischen Fragmente des Moleküls nach **Abbildung 28**.

feature ID	Plasma1-547	Plasma2-562	Plasma3-565
<i>m/z</i> [M ⁺]	465.3454	465.3472	465.3462
intensity	268569	232190	291112
retention time [min]	15.31	15.42	15.21
drift time [ms]	26.85	26.89	26.98
CCS Ω [Å]	233.06	233.48	234.42
<i>m/z</i> fragment 1	-	156.1460	-
<i>m/z</i> fragment 2	-	159.0880	-
<i>m/z</i> fragment 3	169.0862	169.0842	169.0881
<i>m/z</i> fragment 4	183.0893	183.0882	183.0909
<i>m/z</i> fragment 5	226.1078	226.1064	226.1092
<i>m/z</i> fragment 6	239.1159	-	239.1170
<i>m/z</i> fragment 7	-	-	254.1406
<i>m/z</i> fragment 8	267.1468	-	267.1480
<i>m/z</i> fragment 9	-	-	307.1808
<i>m/z</i> fragment 10	316.2620	-	-
<i>m/z</i> fragment 11	335.1722	-	335.1754
<i>m/z</i> fragment 12	352.2830	352.2802	-
<i>m/z</i> fragment 13	-	413.3243	-
<i>m/z</i> fragment 14	-	421.2935	-
<i>m/z</i> fragment 15	423.3098	423.3086	-
<i>m/z</i> fragment 16	435.3093	435.3084	435.3124
<i>m/z</i> fragment 17	-	451.3294	-
<i>m/z</i> fragment 18	463.3313	-	463.3328

Die so erhaltenen Daten können genutzt werden, um den Strukturvorschlag des unbekanntes Analyten als *10-hydroxy-8-octadecenoic acid*, ein mögliches Autoxidationsprodukt der Ölsäure, zu unterstützen. Die akkurate Masse von 465.3454 Da für diese Substanz ist äquivalent zu der für das mit AMPP derivatisierte Oxylin berechneten. Die Retentionszeit von 15.3 Minuten und die Driftzeit von 26.9 ms befinden sich in dem zu erwartenden Zeitfenster für Hydroxy-PUFA. Zusätzlich kann das Fragmentspektrum durch die zu erwartenden Fragmentierungen des Analyten beschrieben werden (**Abbildung 28**). So ist ein Fragmention bei *m/z* 352 zu sehen, welches der α -Spaltung an der Hydroxylgruppe der *10-hydroxy-8-octadecenoic acid*, entspricht.

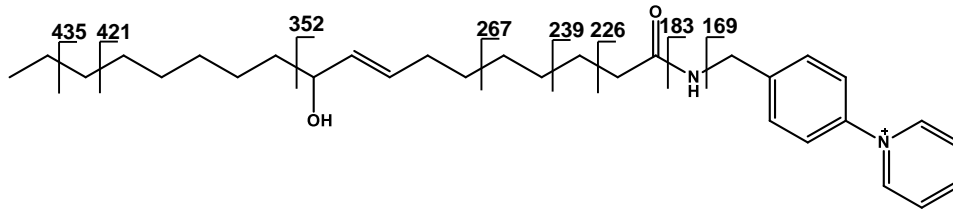


Abbildung 28: Strukturformel von *10-hydroxy-8-octadecenoic acid* derivatisiert mit AMPP als möglicher identifizierter Analyt in humanem Blutplasma. Dargestellt sind die vorgeschlagenen Fragmentierungen, die zu den entsprechenden Fragmentionen in Tabelle 2 führen.

Dies zeigt das Potential des entworfenen *non-targeted*-Arbeitsablaufes, um neue Einblicke in die Struktur unbekannter Oxylipine zu bekommen. Durch die Derivatisierung mit AMPP können die MS/MS-Daten genutzt werden, um die große Datenmenge auf die relevanten Substanzen zu reduzieren. Die Analyse per LC-IM-QTOF-MS(/MS) und der automatisierte Vergleich verschiedener Proben erlaubt es, spezifische Parameter wie m/z des $[M^+]$, Retentionszeit, Driftzeit und das Fragmentspektrum für die einzelnen Substanzen sensitiv zu erfassen und dadurch Gemeinsamkeiten in den Proben zu finden. So konnten etwa ein Drittel der gefundenen Substanzen im humanen Plasma als Carbonsäuren identifiziert werden. Der Vergleich zwischen den Proben reduzierte die Substanzen dann auf 285 gemeinsame Analyten in allen drei Proben, die für weitere Untersuchungen relevant sind. Die Fragmentspektren zusammen mit den hochaufgelösten Massen und dem spezifischen Abspalten des AMPP-Derivats ermöglichen anschließend eine erste Strukturanalyse für diese Analyten. Poad et al. konnten vor kurzem eine ähnliche Methode vorstellen, bei der sie mit AMPP derivatisierte Fettsäuren durch Ozon dissoziierten und auch hier die spezifische Abspaltung von AMPP nutzten um Kettenlänge und Sättigungsgrad zu bestimmen [120]. Die hier dargestellte Methode geht somit einen ähnlichen Weg, automatisiert allerdings einige Arbeitsschritte zur Bestimmung der Analyten in einem *non-targeted*-Ansatz. Das LC-IM-QTOF-MS(/MS) gibt dazu den Vorteil einer weiteren Trenndimension neben der Flüssigchromatographie über die Ionenmobilität. Diese steht im direkten Zusammenhang mit der räumlichen Form des Moleküls und erhöht somit weiter die Spezifität dieser Methode, da unbekannte Moleküle über ihre CCS zugeordnet werden können.

5.2.3 Relative Quantifizierung von Oxylipinen

In einem weiteren Schritt wurde eine Synthese zur isotoopenmarkierten Form des AMPP entworfen und durchgeführt. Ziel war es, ein Derivat zu gewinnen, welches für einen iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*)-ähnlichen Ansatz genutzt werden kann. So können zwei Proben unterschiedlich derivatisiert werden, eine mit dem nicht markierten und die andere mit dem isotoopenmarkierten Derivat, und anschließend gemeinsam in einem Durchgang analysiert werden. Der Unterschied in der Masse der Derivate erlaubt es, gleiche Analyte in beiden Proben zu unterscheiden und somit beide Proben getrennt auszuwerten, obwohl sie gemeinsam gemessen worden sind. Darüber hinaus ist es auch möglich, beide Proben direkt miteinander zu vergleichen. So können Unterschiede durch einzelne Messdurchläufe verhindert werden und sowohl bekannte als auch unbekannte Analyten in den Proben relativ zueinander verglichen werden.

5.2.3.1 Synthese von $^2\text{H}_5$ -AMPP

Die Synthese des isotoopenmarkierten AMPP wurde möglichst einfach gehalten. Erste Überlegungen führten zu einer ^{13}C -markierten Form des AMPP. Diese Derivate haben gegenüber dem ^2H -markierten Formen den Vorteil, dass sie stabiler sind: So kann Deuterium bei zu aufwendigen Probenaufarbeitungen zum Teil durch Wasserstoff ausgetauscht werden, wenn ungünstige Bedingungen gewählt werden. Da die Edukte für eine ^{13}C -markierten Form des AMPP kostenintensiv sind, wurde für den ersten Versuch eine ^2H -markierte Form entworfen und synthetisiert. Die einfachste Möglichkeit hierfür war es, dass Pyridin in der AMPP-Synthese durch $^2\text{H}_5$ -Pyridin auszutauschen. Dieses ist als Lösemittel für die NMR-Analytik kommerziell und relative kostengünstig erhältlich. Außerdem besitzt es fünf ^2H -Atome, so dass das markierte Derivat gut vom 5 Da leichteren Derivat zu unterscheiden ist. Eine geringere Massendifferenz hätte durch die natürliche Isotopierung ansonsten zu keiner eindeutigen Unterscheidung in der Analyse führen können.

Als erstes Zwischenprodukt konnten 470 mg (1.68 mmol) des *N*-2,4-Dinitrophenyl- $^2\text{H}_5$ -pyridiniumchlorid gewonnen und per HRMS erfolgreich bestätigt werden (**Abbildung 29**).

Synthese von 2H5-AMPP

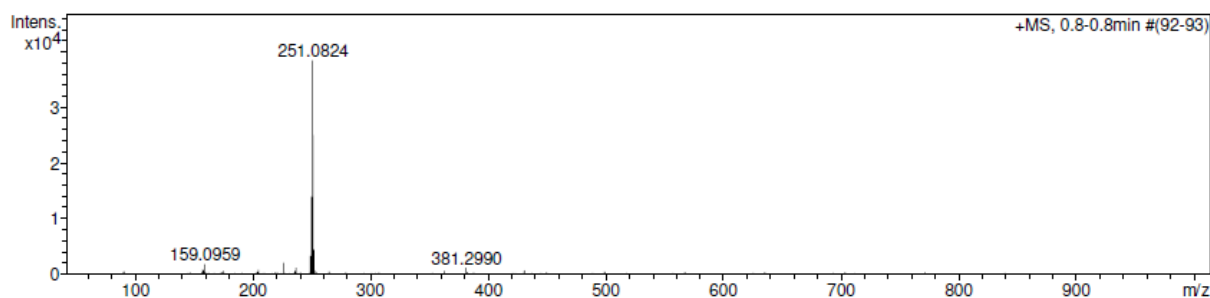


Abbildung 29: HRMS Analyse des ersten Zwischenproduktes der ⁵H-AMPP-Synthese. Mit 251.0824 Da entspricht die akkurate Masse der Summenformel von *N*-2,4-Dinitrophenyl-⁵H-pyridiumchloride mit C₁₁H₃D₅N₃O₄. Die Analyse erfolgte per FIA bei ESI(+).

Anschließend wurde die Synthese analog zur AMPP-Synthese weitergeführt. Die HRMS-Analyse des Syntheseproduktes bestätigte das erfolgreiche Synthetisieren des ²H₅-AMPP (**Abbildung 30**). Die exakte Masse lässt auf die gewünschte Strukturformel mit C₁₂H₈D₅N₂ schließen. Das Signal *m/z* 190.1382 ist dabei auch das Hauptsignal im Spektrum und nur wenige, sehr kleine weitere Peaks sind zu erkennen, was auf ein sauberes Produkt schließen lässt.

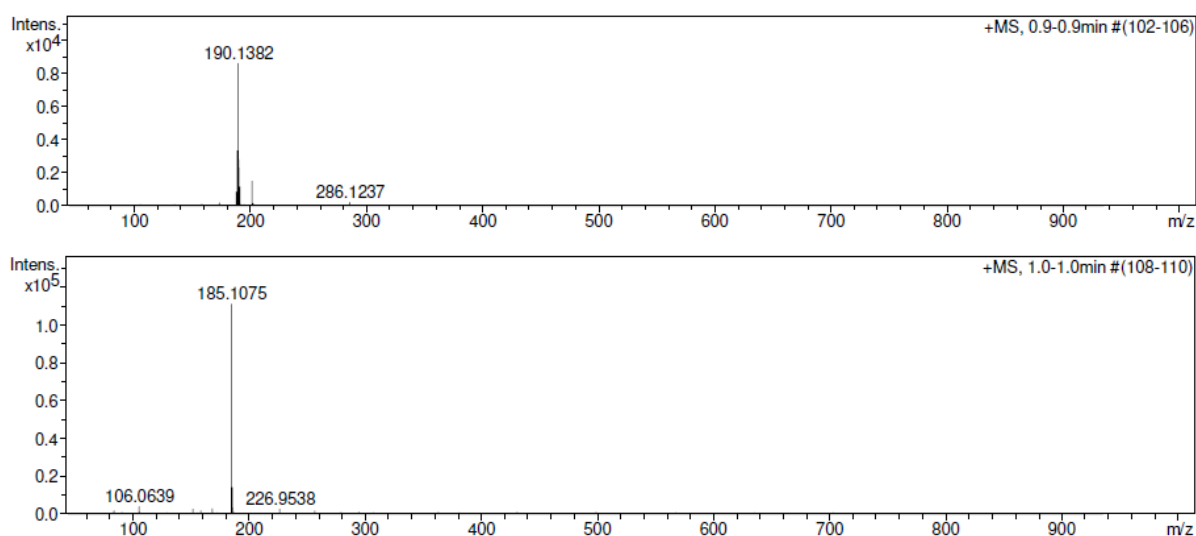


Abbildung 30: HRMS Analyse des Syntheseproduktes der ⁵H-AMPP-Synthese (**oben**) im direkten Vergleich zum AMPP (**unten**). Mit 190.1382 Da entspricht die akkurate Masse der Summenformel von ⁵H-AMPP mit C₁₂H₈D₅N₂. Die Analyse erfolgte per FIA bei ESI(+).

Im nächsten Schritt wurde die Verbindung zur Derivatisierung verschiedener Analyte und anschließende Untersuchung per LC-QqQ getestet. Erste Auffälligkeit hier war die Veränderung der Retentionszeiten. Die mit ²H₅-AMPP derivatisierten Analyte eluierten deutlich früher von der Säule als ihre Analoga (**Abbildung 31**). So wurde für 14(15)-EpETrE derivatisiert mit AMPP eine Retentionszeit von *t_R* = 7.8 Minuten erreicht, während das mit ²H₅-AMPP derivatisierte 14(15)-EpETrE eine Retentionszeit von *t_R* = 7.2 Minuten erreichte.

Synthese von 2H5-AMPP

Dies war allerdings nicht ungewöhnlich, da auch bei vorherigen Messungen mit isotopenmarkierten Standards gleiches beobachtet werden konnte.

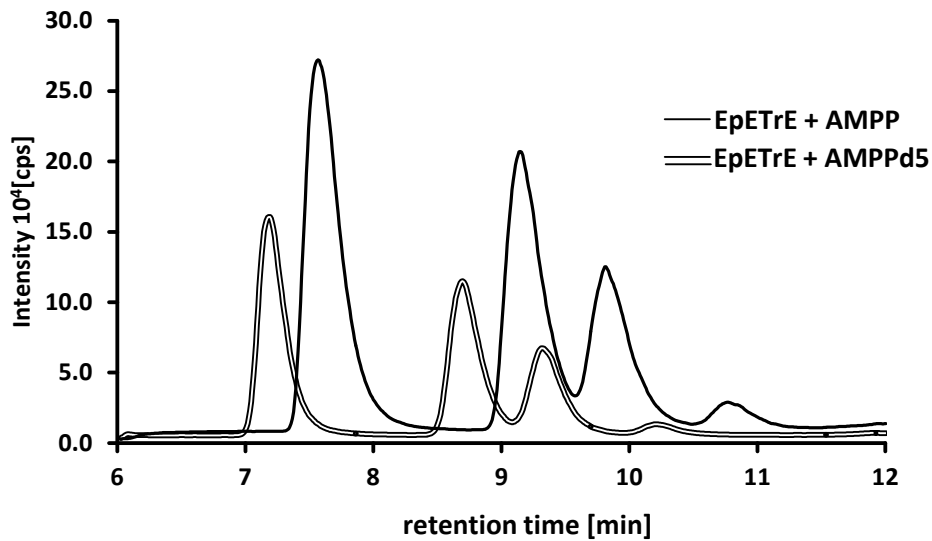


Abbildung 31: Flüssigchromatographische Trennung eines EpETrEs-Standardgemisch 1 µM nach Derivatisierung mit AMPP und ²H₅-AMPP. Getrennt wurde auf einer C8 Kinetex Säule (2.6 µm, 100 x 2.1 mm, 100 Å) bei Puffer/ACN (50/50 v/v) 300 µL/min und Detektion am Micromass QqQ nach ESI(-).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Unterschied in den Markern einen Einfluss auf die Derivatisierung und die Quantifizierung hat. Dazu wurde ein Gemisch aus AMPP und ²H₅-AMPP in einem Stoffmengenverhältnis 1:1 gemischt und anschließend ein Standard von Oxylipinen analysiert. Allerdings zeigte sich, dass die Peakflächen der mit AMPP derivatisierten Analyten deutlich größer waren als die der mit ²H₅-AMPP derivatisierten Analyten. Gründe hierfür könnten zum einen ein unterschiedliches Ansprechverhalten am Detektor sein, was auf Grund der kleinen Unterschiede in der Struktur der Ionen jedoch nicht zu erwarten war. Weitere Gründe könnten sowohl Unterschiede in der Derivatisierungsreaktion sein, die jedoch ebenfalls nicht so groß sein sollten. Es wird daher vermutet, dass verschiedene Reinheiten der Syntheseprodukte zu dem beobachteten Unterschied führten. Um das ²H₅-AMPP für eine relative Quantifizierung in einem iTRAQ-ähnlichem Ansatz zu nutzen, sollte das Ansprechverhalten nach Derivatisierung im Optimalfall in einem Verhältnis 1:1 liegen. Daher wurde die Lösung ²H₅-AMPP, welche für weitere Derivatisierung genutzt wurde, aufkonzentriert, um diesen Effekt zu erreichen. **Abbildung 32** zeigt, dass nach einer Aufkonzentrierung um die 2.4-fache Stoffmenge ein Peakflächenverhältnis von 1:1 für die EpETrEs erreicht werden konnte.

Synthese von $2H_5$ -AMPP

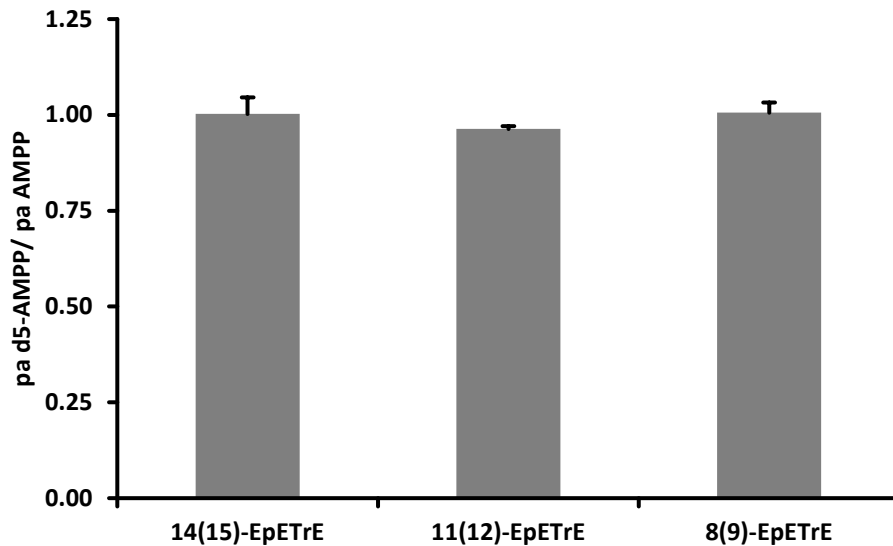


Abbildung 32: Peakflächenverhältnis verschiedener EpETrEs zwischen Derivatisierung mit 2H_5 -AMPP und Derivatisierung bei einer 2.4-fachen Menge von 2H_5 -AMPP. Analysiert wurden 10 μ L eines 1 μ M Standards am Micromass QqQ nach Trennung auf einer Kinetex C8 Säule mit einem angesäuerten Eluenten aus H_2O /Wasser.

Dies wurde durch weitere Messungen eingehender überprüft. Dazu wurde ein Standardgemisch aus 18-HEPE, 19,20-DiHDPE und 14(15)-EpETrE als Stellvertreter für die Hydroxy-, Dihydroxy- und Epoxy-PUFA und Azure A als interner Standard mit sowohl AMPP, als auch 2H_5 -AMPP unter gleichen Bedingungen derivatisiert. Anschließend wurden beide Proben sowohl einzeln gemessen, als auch zusammen in einer parallelen Messung. **Abbildung 33** zeigt, dass es nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen und parallelen Messungen gibt. Die unterschiedlich derivatisierten Analyten scheinen sich daher bei der Analyse nicht zu beeinflussen. Auch ein Vergleich der Analyten zwischen den Derivatisierungen bringt zufriedenstellende Ergebnisse: Die Unterschiede zwischen den Derivatisierungen sind für 18-HEPE und 19,20-DiHDPE gering und scheinen somit ebenfalls keinen Einfluss auf die Quantifizierung zu haben. Für 14(15)-EpETrE weichen die Werte stärker voneinander ab, liegen allerdings noch innerhalb der gleichen Größenordnung.

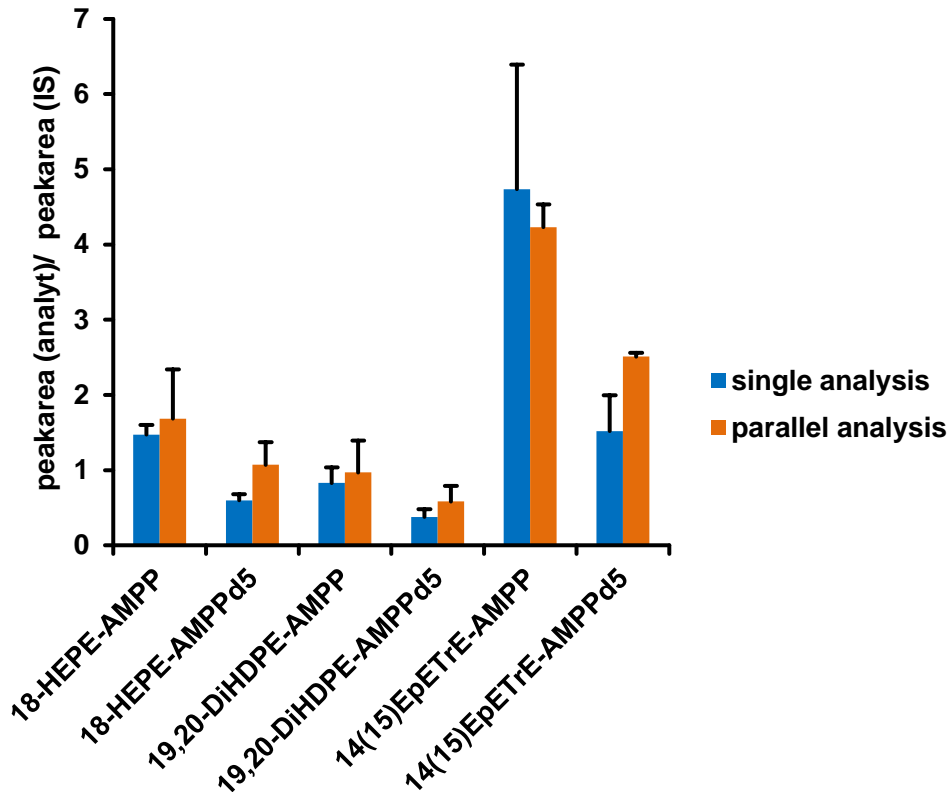


Abbildung 33: LC-MS/MS Analyse zweier identischer Oxylipinstandards nach Derivatisierung mit AMPP oder $^2\text{H}_5$ -AMPP. Gezeigt sind das Peakflächenverhältnis zum internen Standard Azure A bei paralleler und einzelner Analyse der Proben. Analysiert wurde auf einer C8 Kinetex Säule (2.6 μm , 100 x 2.1 mm, 100 \AA) bei Puffer/ACN (50/50 v/v) 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ und Detektion am Micromass QqQ nach ESI(-).

Am LC-QqQ wurde dann das Fragmentierungsverhalten der Analyten untersucht, um Unterschiede zwischen den Derivaten aufzudecken. Für das AMPP blieb es für die Fragmentierungen entlang der Fettsäurekette zum Erhalten der AMPP-Gruppe am Fragmentation. Daher war zu erwarten, dass ein identisches Fragmentierungsmuster mit jeweils 5 Da Unterschied zwischen den mit AMPP und $^2\text{H}_5$ -AMPP derivatisierten Analyten zu finden sein sollte. **Abbildung 34** zeigt, dass die Analyten wie erwartet fragmentieren und es zum identischen Fragmentspektrum mit jeweils 5 Da Unterschied zwischen den Analyten kommt. Somit können für weitere Analysen die Transitionen aus den Methoden mit AMPP direkt auf die Analyse mit $^2\text{H}_5$ -AMPP übertragen werden.

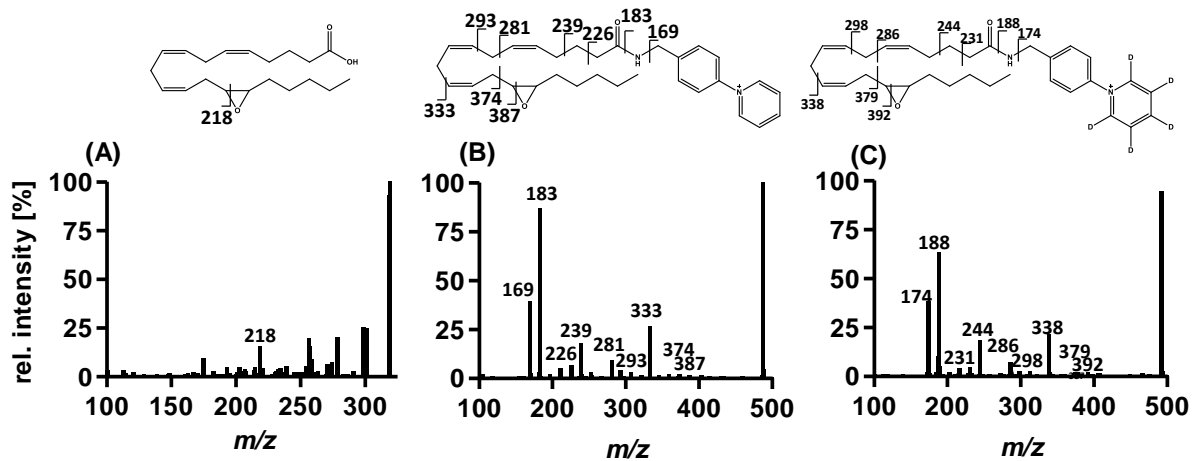


Abbildung 34: Fragmentspektrum von 14(15)-EpETrE ohne (**links**) und mit Derivatisierung mit AMPP (**mitte**) und $^2\text{H}_5$ -AMPP (**rechts**). Analyse erfolgte für eine Probe von 10 μL 1 μM per FIA am Micromass QqQ in ACN/ H_2O (50/50; v/v) bei 300 $\mu\text{L}/\text{min}$.

5.2.3.2 Analysen am IM-QTOF-MSMS

Mit LC-IM-QTOF-MS(/MS) wurde anschließend der iTRAQ-ähnliche Ansatz zur relativen Quantifizierung verschiedener Oxylipine getestet und durchgeführt. Dazu wurden Proben von mit TPPU behandelten CaCo-2-Zellen mit $^2\text{H}_5$ -AMPP und die entsprechende Kontrollgruppe mit AMPP derivatisiert. Beide Proben wurden vereint und anschließend mit LC-IM-QTOF-MS(/MS) analysiert. Die individuell gemessenen Proben wurden über die externe Kalibrierung ausgewertet, während bei der gemeinsamen Messung die Verhältnisse direkt zwischen den Analyten in den Proben bestimmt wurde. Um Unterschiede im Ansprechverhalten am Detektor durch die Derivatisierungen zu umgehen, wurde $^2\text{H}_4$ -9-HODE als interner Standard genutzt. Ein Beispiel für diese relative Quantifizierung ist **Abbildung 35** zu sehen.

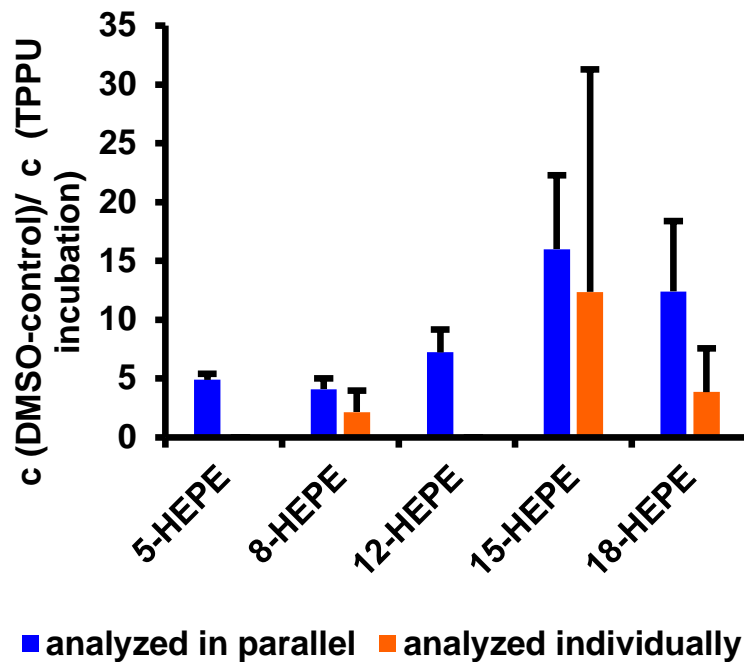


Abbildung 35: Repräsentative relative Quantifizierung verschiedener HEPEs in Caco-2-Zellen mit und ohne TPPU-Inkubation nach $^2\text{H}_5$ -AMPP- und AMPP-Derivatisierung mit paralleler Probenanalyse unter Verwendung eines iTRAQ-ähnlichen Ansatzes im Vergleich zur individuellen Quantifizierung der Analyten durch externe Kalibrierung (Mittelwert \pm SD, $n = 3$). 5-HEPE und 12-HEPE lagen bei der individuellen Quantifizierung unterhalb des LLOQ.

In Bezug auf die Standardabweichungen der Messwerte, zeigen beide Methoden ähnliche Verhältnisse zwischen der Kontrollgruppe und den mit TPPU behandelte Zellen. Für 8-HEPE beträgt das Verhältnis 4.1 ± 0.7 für die parallele Analyse und 2.1 ± 1.5 für die individuelle Analyse. Biologisch interessant ist das Verhalten der Hydroxy-PUFA. Eine Hemmung der sEH sollte eigentlich keinen direkten Einfluss auf den Gehalt an Hydroxy-PUFA in den Zellen haben. Sowohl in dieser, als auch in vorherigen Messungen konnte allerdings ein Anstieg der Konzentrationen der Hydroxy-PUFA bei Hemmung der sEH beobachtet werden. Es lässt sich daher vermuten, dass weitere Stoffwechselwege oder Enzyme durch das TPPU beeinflusst werden, welches zu diesem Effekt führt. Obwohl iTRAQ vorwiegend in der Proteomik genutzt wird [121–123], konnte das Konzept in einem ersten Ansatz auf die Analyse von Oxylipinen übertragen werden. Lamos et al. zeigten bereits zuvor den Vorteil der Isotopenmarkierung für die relative Quantifizierung von Fettsäuren in hydrolysiertem Ei-Fett, wobei die ESI(+)-Ionisationseffizienz nach LC-Trennung auf einer Umkehrphase unter sauren Bedingungen deutlich erhöht werden konnte [124]. Die gemeinsame Analyse zweier Proben und der Verzicht auf externe Kalibrierung bringen enorme Zeitersparnisse gegenüber individuellen Analysen. Außerdem können Unterschiede zwischen zwei Messungen somit komplett umgangen werden. Die Derivatisierung mit $^2\text{H}_5$ -AMPP liefert somit ein einfaches Tool zur Verbesserung

Analysen am IM-QTOF-MSMS

der Quantifizierung in komplexen, biologischen Matrices und kann neue Einblicke in z.B. die Bildung bisher unbekannter Oxylipine liefern.

5.3 Experimentelle Methoden

5.3.3 Synthese von AMPP

Für die Synthese von AMPP wurden 4 mmol Pyridin (0.344 mL) in einem Dreihalskolben mit 4.6 mL EtOH verrührt und anschließend 4 mmol 1-chloro-2,4-dinitrobenzol (0.810 g) hinzugegeben. Das Gemisch wurde bei 98 °C für 16 Stunden unter Rückflusskühlung und Stickstoffatmosphäre gekocht. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das EtOH bei 40 °C am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurück gebliebene *N*-2,4-Dinitrophenyl-pyridinium-chlorid wurde anschließend in einer kleinen Menge EtOH umkristallisiert, was zu einem gelben fein kristallinen Produkt führte. So konnten 787 mg des ersten Zwischenproduktes gewonnen werden, was einer Ausbeute von 80% entspricht. Eine Bestätigung des Produktes erfolgte über Schmelzpunktbestimmung (189 °C, Lit. 190°C) und HRMS (**Abbildung 9**). Das *N*-2,4-Dinitrophenyl-pyridinium-chlorid wurde anschließend in 14 mL EtOH/Pyridin (3/1; v/v) in einem Dreihalskolben gelöst. Nach der Zugabe von 6.72 mmol 4-[(*N*-Boc)-amino-methyl]-anilin wurde das Gemisch erneut bei 98 °C unter Rückflusskühlung unter Stickstoffatmosphäre für drei Stunden erhitzt. Danach wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und durch tropfenweise Zugabe von 140 mL Wasser das 2,4-Dinitroanilin als Nebenprodukt gefällt. Das 2,4-dinitroaniline wurde über einen Faltenfilter abfiltriert und die übrige Lösung am Rotationsverdampfer bei 40°C zu einer braunen, öligen Lösung von 4-[(*N*-Boc)-Amino-methyl]-phenyl-pyridinium-chlorid aufkonzentriert. 22.4 mL Trifluoressigsäure (25 % in DCM) wurden anschließend vorsichtig hinzugegeben und über 30 Minuten bei Raumtemperatur abreagieren lassen, bevor die Lösung erneut am Rotationsverdampfer unter gleichen Bedingungen aufkonzentriert wurde. Um restliche Edukte aus dem Synthesegemisch zu entfernen, wurde es zweimal mit 5 mL Toluol versetzt und abrotiert. Das Produkt wurde in der minimalen Menge heißem EtOH gelöst und auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor es mit Diethylether versetzt wurde, bis das Produkt als Feststoff ausfiel. Die Lösung wurde über Nacht bei -20 °C gelagert und das gelb-braune AMPP anschließend durch Membranfiltrierung abgetrennt. Um die verbleibende Trifluoressigsäure zu verdrängen, wurde das Produkt in 10 mL konzentrierter HCl aufgenommen und in Diethylether ausgeschüttelt. Nach Abrotieren des Diethylethers, erneuter Aufnahme in heißem EtOH und weiterem Verfahren wie oben beschrieben, konnten so 578 mg des gelben Produktes gewonnen werden (78% Ausbeute). Die Reinheit des Produktes wurde anschließend per HRMS und NMR überprüft.

5.3.4 Synthese von $^2\text{H}_5$ -AMPP

Die Synthese des $^2\text{H}_5$ -AMPP wurde analog zu der oben beschriebenen Synthese von AMPP durchgeführt und das Pyridin dabei durch $^2\text{H}_5$ -Pyridin ersetzt.

5.3.5 Inkubation von Caco-2-Zellen

Die CaCo-2 Zellen wurden in DMEM angereichert mit 20% FBS, 100 IU/mL Penicillin/100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) kultiviert. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 5% CO_2 in einem befeuchteten Brutschrank gehalten. Für die sEH-Inhibition wurden etwa 80 000 Zellen auf eine 6-well plate (TPP, Trasadingen, Schweiz) gepflanzt und für 10 Tage inkubiert. Anschließend wurde jedes well (2 mL Medium) entweder mit 0.05% DMSO (Kontrollgruppe), 0.5 μM oder 5 μM TPPU behandelt. Nach einer Inkubation von weiteren 48 Stunden wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst. Nach Zentrifugation (500 \times g, 5 Minuten) wurde das Zellpellet erneut in 1 mL PBS gelöst und die Zellzahl bestimmt. Die übrigen Zellen wurden erneut zentrifugiert (15 000 \times g, 10 Minuten) bevor der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -80 °C für weitere Analysen tiefgefroren wurde.

5.3.6 Festphasen-Extraktion

Die Extraktion von humanem Plasma, Serum und Zellen wurde durch Anionenaustausch-Festphasen-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 100 μL Plasma/ Serum mit 400 μL Isopropanol versetzt und mit 150 μL internem Standard versetzt (150 nM $^2\text{H}_{11}$ -11,12-DiHETrE und $^2\text{H}_4$ -9-HODE). Für Zellen wurden etwa $1\text{-}5 \times 10^5$ Zellen in 150 μL MeOH und 150 μL MeOH aufgenommen, mit zwei 3 mm Edelstahlkugeln versetzt und für 5 Minuten bei 5 Hz in einer Kugelmühle aufgeschlossen. Zur Präzipitation der Proteine wurden die Lösungen für 30 Minuten bei -80 °C gelagert. Nach Zentrifugation (15,000 \times g bei 4 °C für 10 Minuten) wurden 100 μL KOH (1.5 M in MeOH/ H_2O ; 75/25; v/v) zugegeben und die Lösung bei 60 °C für 60 Minuten inkubiert, um die veresterten Oxylipine zu hydrolysieren. Im Anschluss wurde die Lösung mit 40 μL 50% HAc/ H_2O (50/50; v/v) auf einen pH-Wert < 6 angesäuert.

Für die Extraktion wurde die Säule (Bond Elut Certify II SPE cartridge 200 mg, 3 mL, Agilent, Waldbronn, Germany) mit 2 mL 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{HAc}$ (pH 6) konditioniert. Die Probe wurde anschließend mit 2 mL Puffer verdünnt auf die Säule gegeben und mit 2 mL Wasser und 2 mL Wasser/MeOH (50/50, v/v) gewaschen und anschließend getrocknet. Die Elution der Probe erfolgte mit 2 mL EA/n-Hexan (75/25; v/v) und die organische Phase wurde in einem Glasrohr aufgefangen, welches zuvor mit 6 μL 30% Glycerol in MeOH versehen wurde. Anschließend

Derivatisierung

wurde die Probe in einer Vakuum-Zentrifuge über 60 Minuten getrocknet und anschließend zur Derivatisierung verwendet.

Für die Vergleichsanalysen am Sciex 6500 QTRAP wurden die SPE nach [64, 116] durchgeführt. In Kürze:

Das humane Plasma wurde über Bond Elut Certify II Festphasen (200 mg, 3 mL, Agilent, Waldbronn, Germany) extrahiert. Dazu wurden 10 µL IS und 10 µL Antioxidantien (0.2 mg/mL BHT und EDTA, 100 µM Indomethacin, 100 µM sEH Inhibitor *trans-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoic acid* (*t*-AUCB) in MeOH/Wasser (50/50, v/v) zu 500 µL humanem Plasma gegeben. Die Proteine wurden durch Zugabe von 1400 µL eiskaltem MeOH und Lagerung bei -80 °C für mindestens 30 Minuten präzipitiert. Nach Zentrifugation (10 min, 4 °C, 20 000xg) wurde der Überstand mit 100 µL KOH (1.5 M in MeOH/water; 75/25; v/v) versetzt und die Lösung bei 60 °C für 60 Minuten inkubiert, um die veresterten Oxylipine zu hydrolysieren. Im Anschluss wurde die Lösung mit 40 µL 50% HAc auf einen pH-Wert < 6 angesäuert. Die Probe wurde im Stickstoffstrom auf ein Volumen von < 1 mL eingedampft. Anschließend wurde dieser mit 2 mL 0.1 M Na₂HPO₄/HAc (pH 5.5) verdünnt und mit HAc auf pH 6 eingestellt. Die Festphase wurde mit je einem Säulenvolumen EA/*n*-Hexan (75/25, v/v) mit 1% HAc, MeOH und 0.1 M Na₂HPO₄/HAc (pH 5.5) in Wasser/MeOH (95/5, v/v) konditioniert. Danach wurde die Probe auf die Festphase gegeben und mit 3 mL Wasser und 3 mL Wasser/MeOH (50/50, v/v) gewaschen. Nach Trocknung mit Stickstoff für eine Minute wurden die Analyten mit 2 mL 75/25 (v/v) EA/*n*-Hexan mit 1% HAc in Glasröhrchen eluiert, welche 6 µL 30% Glycerol in MeOH enthielten. Die aufgefangenen Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt (1 mbar, 30 °C, 45-60 min). Der Rückstand wurde in 50 µL MeOH mit 40 nM *1-(1-(ethylsulfonyl)piperidin-4-yl)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl) urea* als IS2 aufgenommen, zentrifugiert (10 min, 4 °C, 20,000xg) und für die Analyse verwendet.

5.3.7 Derivatisierung

Zur Derivatisierung der biologischen Proben wurde der SPE-Extrakt nach Eindampfen in 25 µL ACN/DMF (5/1; v/v) und 25 µL EDC 640 mM in Wasser aufgenommen und in ein Glasvial überführt. Anschließend wurden 25 µL 45 mM AMPP oder ²H₅-AMPP und 25 µL 20 mM 1-Hydroxybenzotriazol hinzugefügt und die Lösung für 40 Minuten bei 40 °C inkubiert. Die derivatisierte Probe wurde anschließend bei -80 °C gelagert und nach auftauen direkt für die Analyse verwendet.

5.3.8 LC-IM-QTOF-MS(/MS)

Die flüssigchromatographische Trennung zur IM-QTOF-MS(/MS)-Analyse wurde ein Agilent 1290 Infinity LC System verwendet. Die Trennung erfolgte mit einer Kinetex C8 (2.6 µm, 100 × 2.1 mm, 100 Å) unter Nutzung eines binären Gradienten aus Solvent A: ACN/water/FA (5/95/0.1; v/v/v) und Solvent B: ACN/water/FA (95/5/0.1; v/v/v). Bei 300 µl/min und 50 °C verlief der Gradient wie folgt: 0-1 min isokratisch 15% B, 1-2 min linear von 15% zu 32% B, 6-21 min linear von 32% zu 40% B, 21 -22 min linear von 40% zu 100% B, 22-26 min isokratisch 100% B, anschließend wurde die Säule für 9 min bei 15% B rekonditioniert.

5.3.9 LC-QqQ-MS (Sciex QTrap 6500)

Die Analyse am Sciex 6500 QTrap erfolgte nach [64, 116] wie folgt:

Nach SPE wurde die Probe in 50 µL Methanol aufgenommen und 5 µL der Probe durch einen HTS xT-PAL Autosampler in das LC-MS-System injiziert. Das Probenrack wurde dazu auf 4 °C temperiert. Die flüssigchromatographische Analyse erfolgte an einem Agilent 1290 Infinity LC-System auf einer Zorbax Eclipse Plus C18 RP Säule (2.1 x 150 mm; 1.8 µm Partikelgröße) vorgeschaltet mit einem *inline filter* (Agilent 1290 infinity II in-line filter; 3 µm) und Vorsäule (Phenomex SecurityGuard Ultra C18; 2.1 x 2 mm) bei 40 °C. Als mobile Phase wurden 0.1% HAc in Wasser als Solvent A und 800/150/1 (v/v/v) ACN/MeOH/HAc als Solvent B genutzt. Zur Trennung wurde der folgende Gradient bei einem Fluss von 300 µL/ min verwendet: 0-1.0 min isokratisch 25% B, 1.0-1.5 min linear von 25% B auf 30% B, 1.5-10.0 min linear von 35% B auf 53% B, 10.0-19.5 min linear von 53% B auf 68% B, 19.5-24.5 min linear von 68% B auf 95% B, 24.5-27.0 min isokratisch 95% B, 27.0-27.1 min linear von 95% B auf 25% B und anschließender Rekonditionierung für 3.4 min. Die Detektion erfolgte auf einem Sciex 6500 QTRAP System bei ESI(-).

5.4 Massenspektrometer und Flüssigchromatographen

Micromass Quattro LC Massenspektrometer Triple Quadrupole System und ESI-Quelle (Waters GmbH, Helfmann-Park 10, 65760 Eschborn) kombiniert mit einer Shimadzu LC-10-AD HPLC, Shimadzu DGU-14A Degaser, Shimadzu CTO-AS Säulenofen und HTS Pal Autosampler

Parameter: Source Temp: 130 °C; Desolvation Temp: 400 °C; Nebuliser: 97 L (N₂)/ h; Desolvation: 751 L/ hr (N₂); Capillary: 3.0 kV; Cone: 40 V; Extractor 5 V; RF Lens: 0.2 V; LM Resolution 1: 12.5; HM Resolution 1: 12.5; Ion Energy 1: 0.5; Entrance: 2; Collision: 11; Exit: 2; LM Resolution 2: 12.5; HM Resolution 2: 12.5; Ion Energy 2: 3.0; Multiplier: 500; Source ID: 1.44 V; Analyser-Pen: 4.4 V; Spare Pirani: 2.0 V; Source Pen.: 1.8 V; RF-Gen1 DC1 53.1; RF Gen DC2 -52.4; Recified RF1: -1.2; RF Operate1: 1.8; RF Gen2 DC1 -1500.7; RF Gen2 DC2 7.7; Recified RF2: -0.6; RF Operate2 1.8; Dynode 4.1; Phosphor 8.1; MS2 Filter Energy - 7.0; Gas Cell Body: -0.9

Agilent 6560 IM-QTOF-MS (Agilent Technologies Inc; 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, United States) ausgerüstet mit einer *dual jet stream ion source*. Gekoppelt wurde das System mit einem Agilent 1290 Infinity LC System

Parameter: Drift Tube Gas: N₂; Polarity: positive; MS Abs. threshold: 1; MS Rel. Threshold (%): 0; MS/MS Abs. threshold: 5; MS/MS Rel. Threshold: 0.01; Gas Temp 325 °C; Drying Gas: 12 L/min; Nebulizer: 30 psi; Sheath Gas Temp: 275 °C; Steath Gas Flow: 9 L/ min; VCap: 2500 V; Nozzle Voltage: 1250 V; Fragmentor 325 V; Oct 1 RF Vpp 700 V; Min Range *m/z* 45; Max Range *m/z* 1700; Frame Rate: 2.1 Frames/ s; IM Transient Rate: 7 IM Transients/ Frame; Max Drift Time: 60 ms; TOF Transient Rate: 500 Transients/ IM Transients; Trap Fill Time: 3000 µs; Trap Release Time: 250 µs; Fragmentation: Frame 2 Ramped: Drift Time 10-50 ms/ Collision Energy 10-59; Ref. Mass *m/z* 121.05873, *m/z* 922.009798; Ref. Detection Window 20 ppm; Ref. Minimum Height: 5000 counts; Chrom: TIC; Expt Type: MS; Offset: 15; Y-Range:10000000; High Pressure Funnel Delta: 150 V; High Pressure Funnel RF: 150 V; Trap Funnel Delta: 180 V; Trap Funnel RF: 150 V; Trap Funnel Exit: 10 V; Trap Entrance Grid Low: 97 V; Trap Entrance Grid Delta: 10 V; Trap Entrance: 91 V; Trap Exit: 90 V; Trap Exit Grid 1 Low: 88.4 V; Trap Exit Grid 1 Delta 4 V; Trap Exit Grid 2 Low: 87.8 V; Trap Exit Grid 2 Delta: 8.5 V; IM Drift Tube Entrance Voltage 1700 V; Drift Tube Exit Voltage: 250 V; Rear Funnel Entrance: 240 V; Rear

Funnel RF: 150 V; Rear Funnel Exit: 43 V; IM Hex Delta: -8 V; IM Hex RF 600 V; IM Hex Entrance: 41 V; IM Hex Delta Delta: 0 V; Collision Cell Delta Delta: 0 V; IBC Delta Delta: 0 V

Sciex 6500 QTRAP (SCIEX; Landwehrstrasse 54; 64293 Darmstadt; Deutschland) ausgerüstet mit einer ESI-Ionenquelle und gekoppelte an ein Agilent 1290 Infinity LC System; Die Versorgung durch Nullluft erfolgte durch einen UHP-300-ZA-S-E *zero air* Generator (Parker Hannifin GmbH; Pat-Parker-Platz 1; 41564 Kaarst; Deutschland)

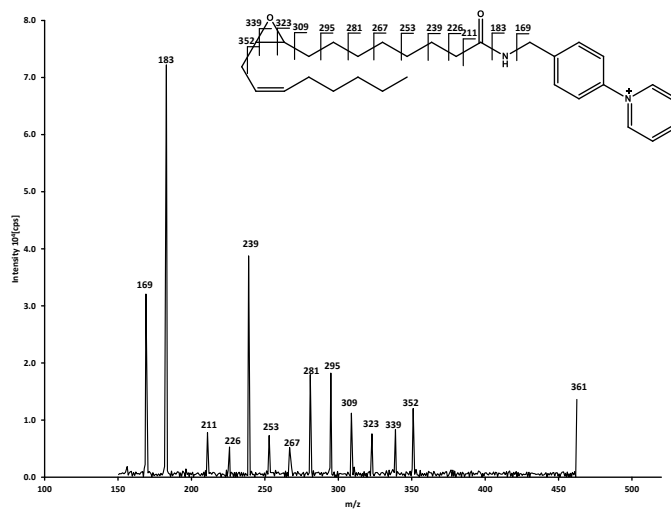
Parameter: Ion-spray voltage: -4500 V; curtain gas (N₂): 35 psi; nebulizer gas (gas 1, zero air): 60 psi; drying gas (gas 2, zero air): 60 psi bei 475 °C. Sprayer-Offset: 0.250 cm vertikal und 0.550 cm horizontal; electrode protrusion: ~1 mm. Die Detektion erfolgte im scheduled selected reaction monitoring mode (SRM) mit Stickstoff als Kollisionsgas ("high", 12 psi). detection window: ±22.5 s; cycle time: 0.4 s. Analytspezifische Parameter sind in [64, 116] aufgeführt.

Sciex API 3200 QqQ (SCIEX; Landwehrstrasse 54; 64293 Darmstadt; Deutschland) ausgerüstet mit einer ESI-Ionenquelle und gekoppelte an ein Agilent 1200 LC System inklusive VWR L-7514 mobile Degaser und Knauer K-500 HPLC Pumpe als Hintergrundfluss der Ionenquelle; Die Versorgung durch *zero air* erfolgte durch einen *zero air* Generator.

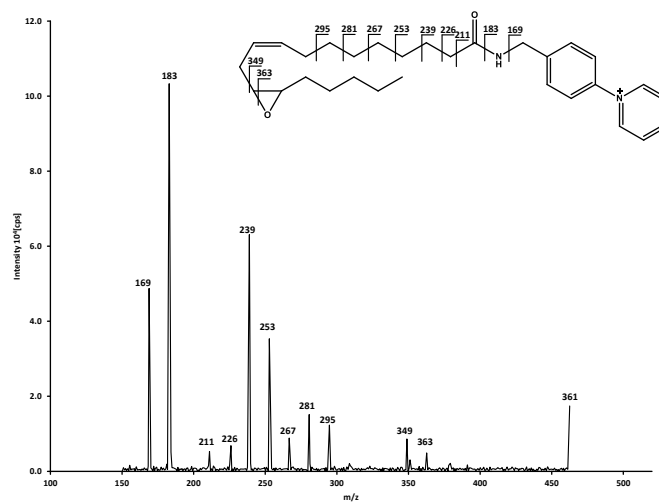
Parameter: Ion-spray voltage: 3000 V; curtain gas (N₂): 20 psi; nebulizer gas (gas 1, zero air): 60 psi; drying gas (gas 2, zero air): 55 psi bei 600 °C. Sprayer-Offset: 5.20 vertikal und 5.11 horizontal; Die Detektion erfolgte im scheduled selected reaction monitoring mode (SRM) mit Stickstoff als Kollisionsgas ("high"). Analytspezifische Parameter für 18-HEPE: declustering potential: 90 V; entrance potential: -5 V; cell entrance potential: -25 V; collision energy: 45 V; cell exit potential: 7.5 V.

5.5 Anhang: Fragmentspektren verschiedener Epoxy-PUFA nach Derivatisierung mit AMPP

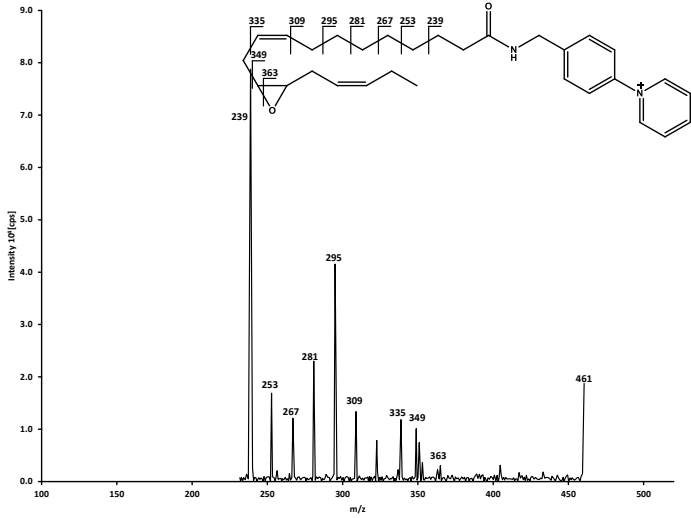
9(10)-EpOME



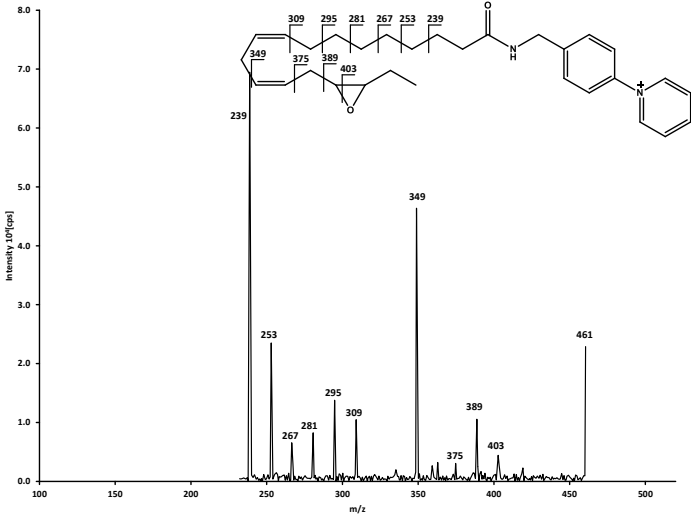
12(13)-EpOME



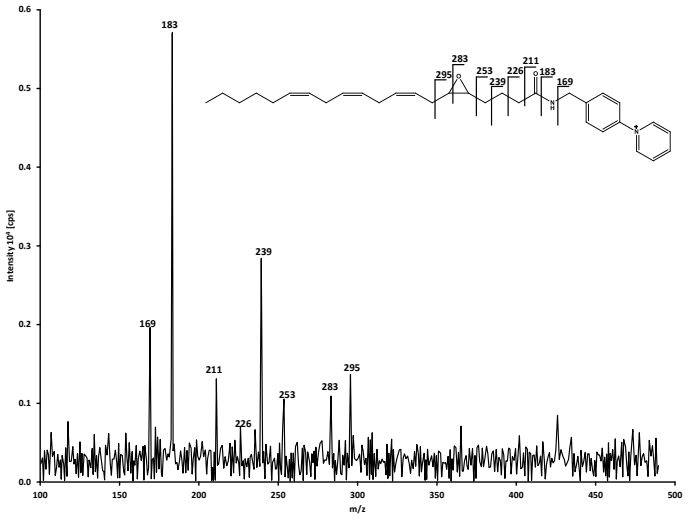
12(13)-EpODE



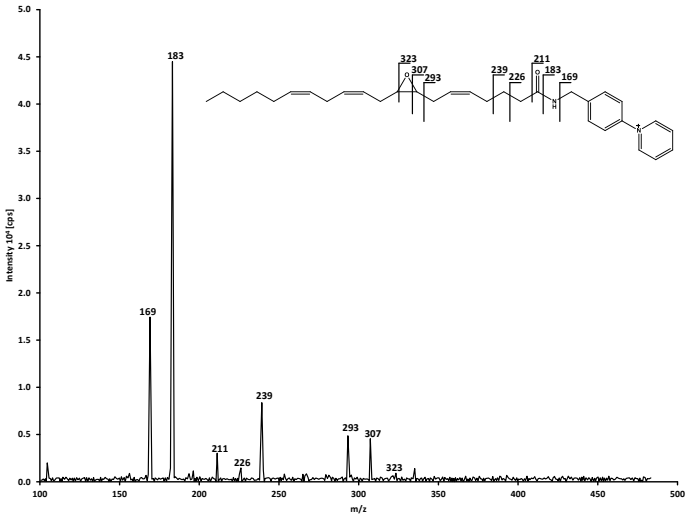
15(16)-EpODE



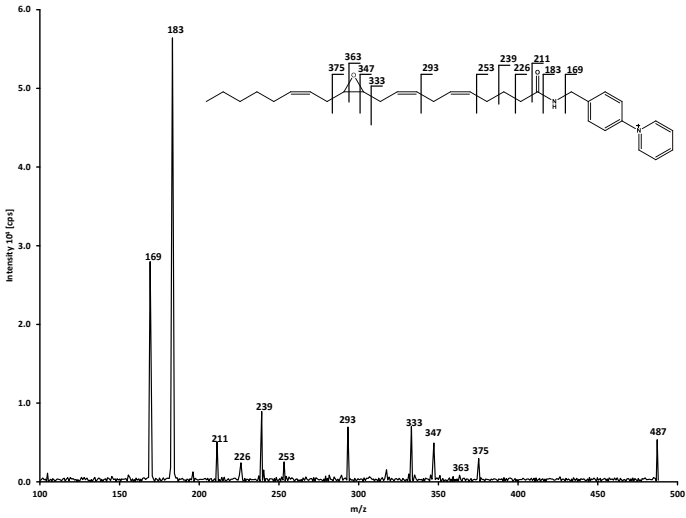
5(6)-EpETrE



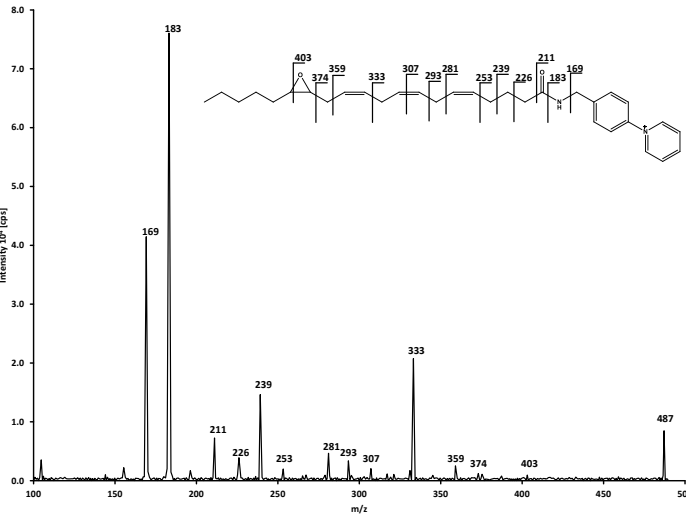
8(9)-EpETrE



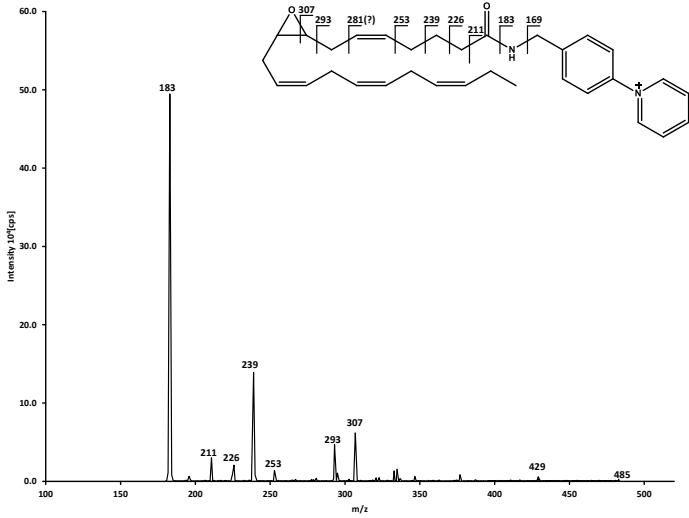
11(12)-EpETrE



14(15)-EpETrE



8(9)-EpETE



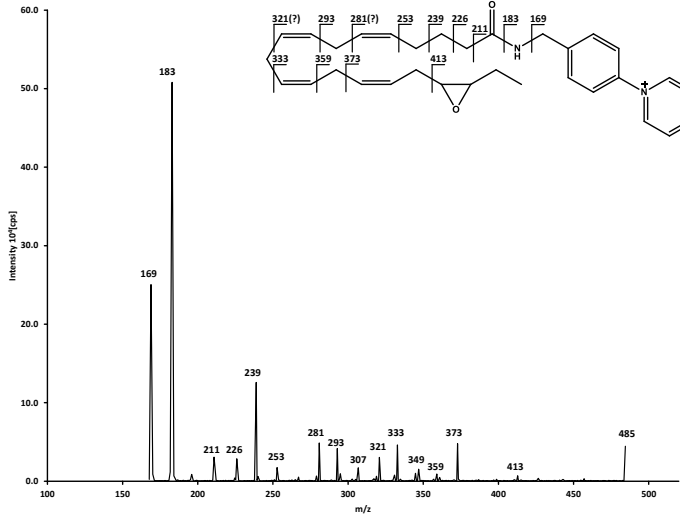
11(12)-EpETE



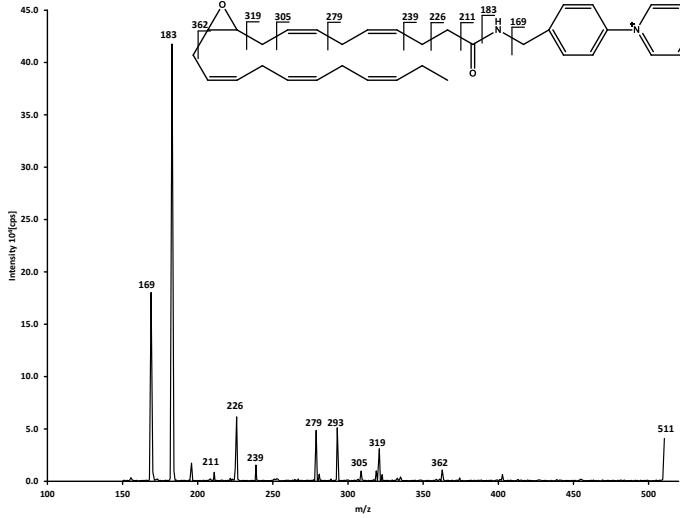
14(15)-EpETE



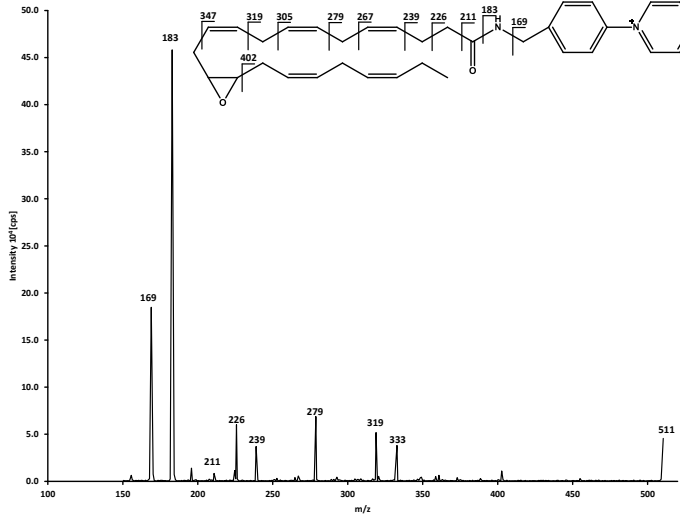
17(18)-EpETE



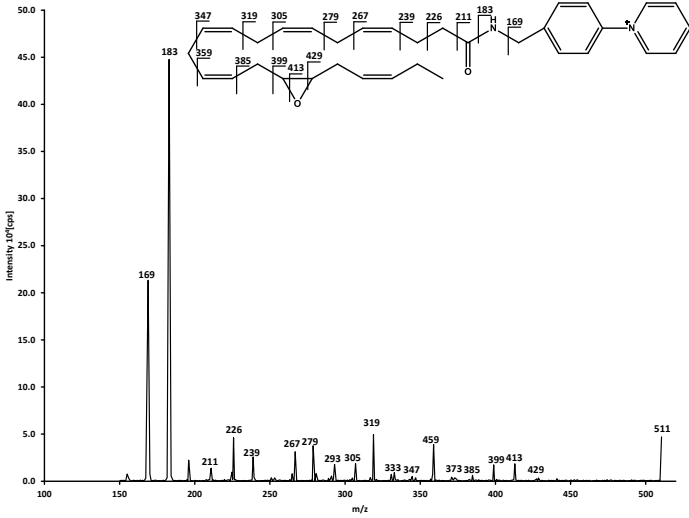
10(11)-EpDPE



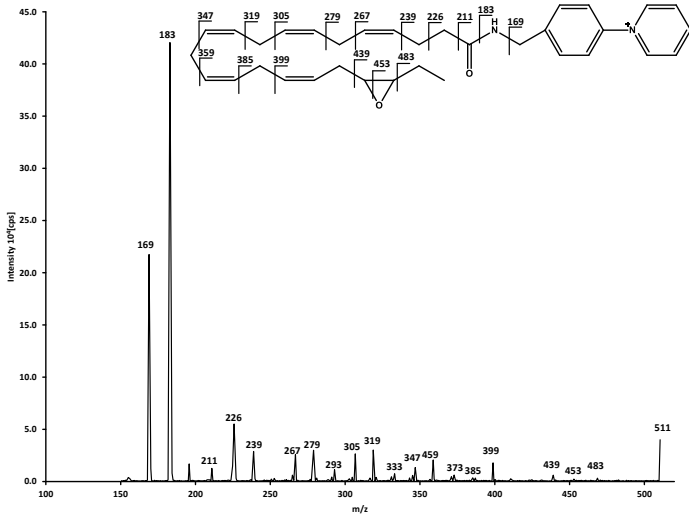
13(14)-EpDPE



16(17)-EpDPE



19(20)-EpDPE

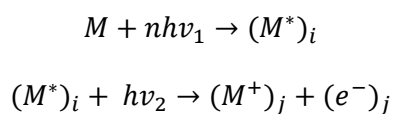


6 Analysen zum Fragmentierungsprozess bei der Laserionisation und Nutzen für die Analytik von Oxylipinen

6.1 Einleitung und Theorie

Für die Massenspektrometrie stehen verschiedene Ionisationsmethoden zur Verfügung, um eine große Bandbreite an Analyte erfassen zu können. Neben den üblichen Methoden, die in der Oxylipin-Analytik verwendet werden, wie ESI(-), gehört die resonanzverstärkte Mehrphotonenionisation (*resonance enhance multiphoton ionization* (REMPI)) bei Niederdruck und die Laserionisation bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure laser ionization* (APLI)) zu den Methoden, welche bisher nach unserem Wissen in der Oxylipin-Analytik nicht angewendet werden.

REMPI ist eine sehr selektive und sensitive Ionisationsmethode basierend auf der Aufnahme von Energie durch Photonen, welche durch einen Laser erzeugt werden [125–128]. Der Unterschied zu der weiter verbreiteten APPI liegt darin, dass von den vom Laser erzeugten Photonen mindestens zwei absorbiert werden müssen, um eine Ionisierung des Moleküls hervorzurufen. Die Ionisierung eines Moleküls wird begünstigt, wenn die Energie der Photonen in Resonanz mit einem stabilen, elektronisch angeregten Zustand steht und die aufgenommene Energie der ersten n Photonen bei einem $[n+m]$ -Prozess somit lange genug gespeichert werden kann, um durch die Aufnahme weiterer Energie durch weitere Photonen die nötige Ionisationsenergie des Moleküls zu überschreiten. Ist dies möglich, wird von Resonanzverstärkung gesprochen [129, 130]. So kann der REMPI-Prozess bei Ionisation durch zwei Laser bei unterschiedlichen Frequenzen (ν_1, ν_2) wie folgt beschrieben werden:



Dabei stellt M das Molekül im elektronischen Grundzustand dar, $(M^*)_i$ den resonanten angeregten Zustand und $(M^+)_j$ das ionisierte Molekül nach der Emission von Photoelektronen [129]. Dabei werden immer mindestens zwei Photonen benötigt, um die Ionisierungsenergie (IE) zu erreichen (REMPI 1+1). REMPI ist jedoch nicht auf einen zwei-Photonen-Prozess beschränkt, auch drei (REMPI 2+1), vier (REMPI 3+1) oder mehr Photonen können für eine Ionisierung genutzt werden [131, 132]. REMPI kann bei Niederdruck (10^{-1} - 10^{-8} mbar) stattfinden, wobei die gasförmige Probe in den Niederdruckraum expandiert wird. Der dabei entstehende Gasstrahl kann als Überschallstrahl (*jet*) ausgebildet sein. Bei der Expansion wird die innere Energie der Moleküle in kinetische Energie umgewandelt, wodurch die Analyten eine adiabatische Abkühlung bis auf wenige Kelvin (5-50 K) erfahren, ohne zu kondensieren

und liegen anschließend bei großer mittlerer freier Weglänge interaktionsfrei in energiearmen Grundzuständen im Gasraum vor [130, 133–136]. Das Vorliegen der Moleküle in diesen gut definierten, energiearmen Zuständen ermöglicht die Absorption eines Photons einer definierten Wellenlänge für den diskreten, vibronischen Zustand des elektronisch angeregten Moleküls und die Speicherung dieser Energie bis zum Aufnehmen weiterer Photonen [127, 137]. Da das erste Photon diese Zustände „treffen“ muss, stellt die Wellenlänge des ersten Photons eine analytisch spezifische Größe in der REMPI dar und erlaubt dadurch sogar die Unterscheidung von Isomeren [137, 138]. Je geringer die Abkühlungsgrad der Moleküle in der Expansion ist, desto breiter werden die Absorptionsbanden und desto unspezifischer wird die Ionisation durch die Absorption des ersten Photons [135, 139]. Da unterschiedliche Wellenlängen unterschiedliche resonante Übergangszustände treffen können, ist es möglich, ein Molekül bei unterschiedlichen Wellenlängen mit REMPI zu ionisieren. Durch die Nutzung eines durchstimmbaren Lasers kann so ein spezifisches Spektrum erstellt werden, welches darstellt, bei welchen Wellenlängen es zu einer Ionisation des Moleküls kommt (REMPI-Spektrum) [140]. Die Wellenlänge des zur Ionisation führenden Photons hat in der Regel keinen signifikanten Einfluss auf die Spezifität der Ionisation, da seine Absorption schnell zur Ionisation führt und kein stabiler Übergangszustand erreicht werden muss [126, 140, 141]. Neben der Wellenlänge spielt die Lebensdauer der resonanten angeregten Zustände einen entscheidenden Faktor bei der Ionisierung der Moleküle. Je größer die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit zur Absorption eines zweiten Photons, welches zur Ionisation führt, bevor der angeregte Zustand durch Fluoreszenz, Phosphoreszenz oder Stoß deaktiviert wird. Üblicherweise wird eine Lebensdauer des angeregten resonanten Zustands von > 100 ps benötigt, um eine effiziente Ionisation zu ermöglichen [139]. Die Ionenproduktionsrate hängt sehr stark von der Anzahl nichtresonanter Schritte zur Erreichung des stabilen (resonanten) Zwischenzustands, sowie der Anzahl nichtresonanter Schritte zur Erlangung des Ionisationskontinuums ab. So ist ein (2+2) REMPI Prozess in der Regel um viele Größenordnungen weniger effizient, als ein (1+1) Prozess. Da übliche UV-Lampen keine ausreichende Leistungsdichte ($> 1 \text{ MW/cm}^2$) erzeugen, kommen für die REMPI Laser zum Einsatz [142, 143]. Die benötigte Leistungsdichte ist dabei abhängig von dem REMPI Prozess, um mit steigender Anzahl an nicht-resonanten Schritten (etwa (3+1) REMPI) die ausreichende Aufnahme von Photonen während der „Lebenszeit“ der Übergangszustände zu gewährleisten [143]. In dieser Notation werden die zwei nicht resonanten Zustände des ersten Schrittes als „virtuell“ bezeichnet, d.h. sie bestehen aus Molekül plus Photon. Die Lebensdauer solcher Zustände sind in der Größenordnung der Flugzeit des Photons durch das molekulare System, d.h. femto Sekunden.

Prinzipiell stellt die REMPI bei etwa 10^6 W/cm^2 eine sanfte Ionisationsmethode dar, welche es sogar erlaubt fragile Systeme wie Komplexe, stabilisiert durch van-der-Waals Kräfte oder

Wasserstoffbrückenbindungen, zu untersuchen [144, 145]. Durch Erhöhung der Leistungsdichte des Laserpulses auf etwa 10^9 W/cm^2 oder höher ist es möglich eine Fragmentierung der Ionen hervorzurufen, welche bis zum Zerfall hin zum ionisierten Atom führen kann [141, 144, 146, 147]. Dabei unterscheidet sich das Fragmentspektrum qualitativ sehr stark von den Fragmentierungen, die durch Elektronenionisation (EI) oder nicht-resonante MPI hervorgerufen werden [147, 148]. Diese Fragmentierung steht im direkten Zusammenhang mit der Anzahl der absorbierten Photonen und der dadurch aufgenommenen Energie. So zeigen sowohl Experimente als auch Simulationen, dass für Benzen die Aufnahme von drei Photonen (9.5 eV bei 391.4 nm) hauptsächlich zum ionisierten $[M^+]$ führt, wohingegen die Aufnahme von 10 Photonen (32 eV bei 391,4 nm) zum Zerfall bis hin zum C^+ führt [147, 149]. Diese unimolekulare Zerfallskaskade läuft auf einer Zeitskala von etwa 10 – 100 ps ab. Innerhalb eines Laserpulses (hier 1-10 ns) steigt bei steigender Aufnahme von Photonen die Dissoziationsrate des Moleküls, wodurch der unimolekulare Zerfall ab einer Grenzenergie in direkter Konkurrenz zur Aufnahme weiterer Photonen steht. Dadurch kann das Molekül auf der „Leiter“ der Anregung nicht beliebig weit nach oben wandern und zerfällt zu primären Fragmenten welchen eine neue „Leiter“ zur Verfügung steht, welche sie durch Aufnahme von Photonen nach oben steigen können, bis sie wiederum zu sekundären Fragmenten zerfallen („ladder switch“; **Abbildung 36**) [150–152].

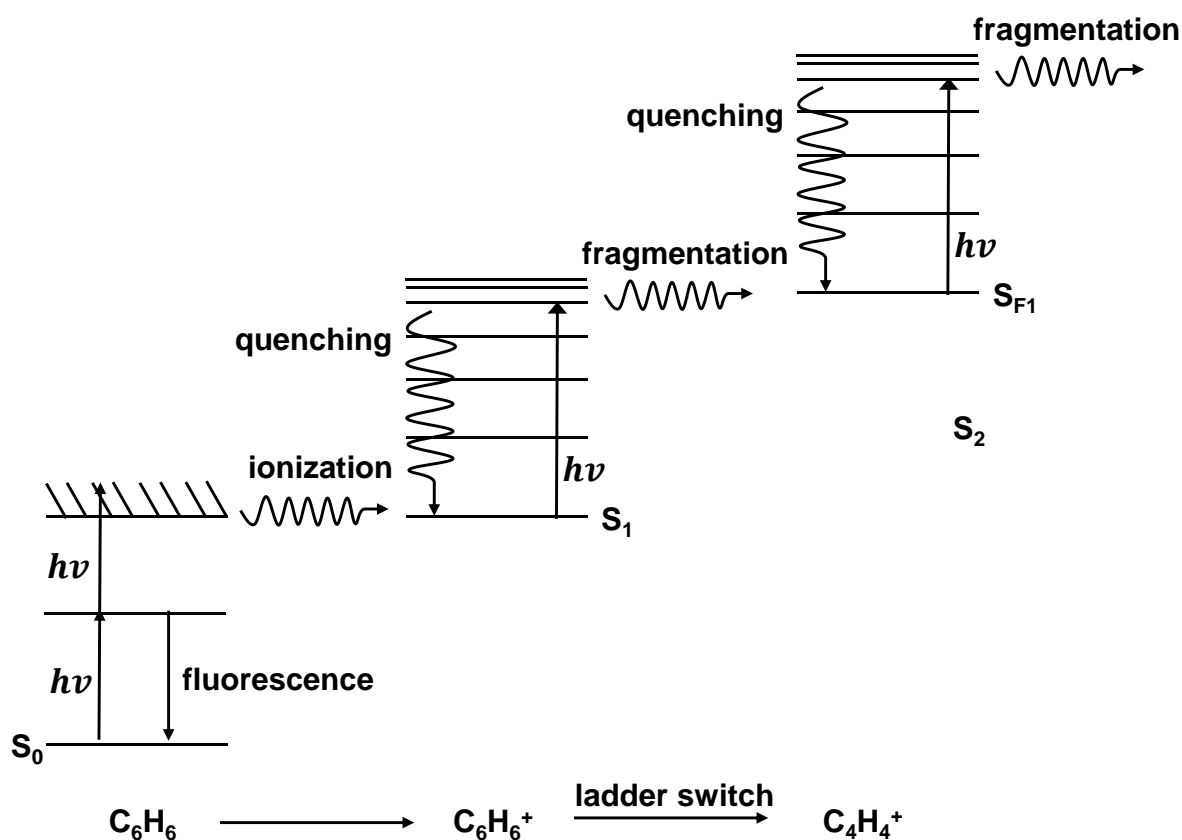


Abbildung 36: Jablonski-Diagramm zum [1+1]-REMPI-Prozess und dem *ladder-switch*-Mechanismus Beispielhaft für Benzen [150, 153].

Je höher der Anstieg der Dissoziationsrate ist, desto niedriger liegt der Umschlagspunkt der Anregungsleiter. Dieser *ladder switch* hat einen großen Einfluss auf das resultierende Fragmentspektrum, da die möglichen Fragmentierungswege eingeschränkt werden und die Bildung sekundärer Fragmente begünstigt wird [147]. Bei der mehrstufigen-Absorptions-Fragmentierung (*absorption multistep fragmentation* (AMF)) wird im Gegensatz dazu die gesamte Energie komplett aufgenommen und anschließend zerfällt das Molekül mehrstufig, wobei die primären Fragmente das Spektrum dominieren [154, 155].

Durch die Selektivität des REMPI-Prozesses stellt diese Ionisationsmethode eine sehr spezifische Methode dar, welche hauptsächlich für aromatische Verbindungen genutzt wird [125, 137, 139, 156, 157]. Aber auch kleine Moleküle wie CO, NO oder H₂ können per REMPI analysiert werden [158–161]. Diese Selektivität stellt zu einem ein Vorteil der Methode dar, da gezielt Analyte in komplexen Proben ohne chromatographische Trennung analysiert werden können, indem durch Variation der Wellenlänge diese gezielt ionisiert werden. Dies führt zu sehr spezifischen Spektren, da keine oder kaum Matrixbestandteile ionisiert und detektiert werden. Außerdem kann die „Härte“ der Ionisation über die Leistungsdichte des Lasers gesteuert werden: von einer sanften Ionisation bei geringen Leistungsdichten bis hin zur kompletten Fragmentierung des Analyten bei hohen Leistungsdichten. Die Spezifität stellt aber auch zugleich einen Nachteil dar, da nicht jeder Analyt per REMPI analysiert werden kann. Außerdem muss die Resonanzwellenlänge bekannt sein oder untersucht werden, bei der sich das Molekül einem REMPI-Prozess zugänglich ist und ein entsprechender Laser bei für diese Wellenlänge zur Verfügung stehen. Bei der Expansion der Probe in einen Gasraum mit Niederdruck kommt es auch zu einer starken Vergrößerung des Probenvolumens. Kann ein Laser nicht diesen kompletten Bereich mit seinem Strahl abdecken, geht Ionisationseffizienz verloren. Insgesamt stellt die REMPI dennoch eine sehr effiziente Ionisationsmethode dar, bei den bis zu 10 % der bestrahlten Moleküle ionisiert werden können [137, 162].

Neben der Durchführung der REMPI bei Niederdruck kann dieser Prozess ebenfalls bei Atmosphärendruck in Luft-/Stickstoffatmosphäre durchgeführt werden. In diesem Fall wird von Laserionisation bei Atmosphärendruck (APLI) gesprochen [163, 164]. Der Unterschied in den Druckbedingungen der beiden Methoden führt zu einem Unterschied der rovibronischen Energieverteilung im Grundzustand der Moleküle [143]. Durch die fehlende Expansion der Probe werden die Moleküle nicht adiabatisch abgekühlt, sodass die Absorptionsbanden im Vergleich zur REMPI im Niederdrucksystem durch überlappende, angeregte rotatorische und vibronische Zustände sehr breit bleiben [165]. Dadurch bedingt sinkt die Selektivität der Ionisation deutlich, da die Anregung des elektronischen Grundzustands in den angeregten Übergangszustand durch Photonen aus einem breiten Wellenlängenbereich realisiert werden

kann. Dies ermöglicht aber auch die Ionisation einer breiten Analytklasse durch die Nutzung festfrequenter Hochleistungslaser [142, 163]. Als Lasersysteme können zum Beispiel KrF-, XeCl- oder ArF-Excimerlaser (KrF* 246 nm; XeCl* 308 nm; ArF* 193 nm) oder frequenzvervierfachte Nd:YAG Laser (Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat, 266 nm) eingesetzt werden [142, 166]. Diese bieten den Vorteil, dass weder übliche Lösemittel, welche in der HPLC als mobile Phase genutzt werden, noch die in AP-Ionisationsquellen vorhandenen Gase keine erreichbaren elektronisch angeregten Zustände bei diesen Wellenlängen besitzen und somit bei der APLI nicht mit ionisiert werden [167].

Ein großer Unterschied zwischen der APLI und REMPI bei Niederdruck ist die Fragmentierung der Ionen. Wie oben beschrieben, ist es im Niederdruckraum möglich, über entsprechende Leistungsdichten die Moleküle bis zum atomisierten Ion zu fragmentieren. In der APLI ist dies hingegen bei gleichen oder höheren Leistungsdichten nicht zu beobachten [163, 168–170]. Erste Arbeiten hierzu lassen vermuten, dass hochangeregte ionische Zustände durch Kollisionen mit dem Hintergrundgas deaktiviert werden, und somit keine oder nur verminderte Fragmentierung stattfindet [168, 170]. Vergleicht man allerdings die Dissoziationsraten bei entsprechend hohen Energieniveaus mit den Stoßzahlen der Ionen bei Atmosphärendruck, so sollten Fragmentierungen trotzdem möglich sein, da sie in den gleichen Größenordnungen ablaufen. So lässt sich die unimolekulare Dissoziationsrate $k_{uni}(E^*)$ für den Zerfall eines Ions bei der Energie E^* über die Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie (RRKM-Theorie) approximieren [171–174]:

$$(1) \quad k_{uni}(E^*) = d_{rxn} \frac{N_s^\ddagger(E^\ddagger)}{h\rho_s^*(E^*)}$$

Die Summe der Zustände N_s für den Übergangszustand mit den Energien E bis $E + dE$ lässt sich unter Vernachlässigung der Rotationszustände grob wie folgt beschreiben:

$$(2) \quad N_s(E) = \frac{1}{s!} \frac{E^s}{\prod_{l=1}^s \hbar\omega_l}$$

Dabei stellt s die Vibrationsanzahl, E die interne Ionenenergie, \hbar das reduzierte plancksche Wirkungsquantum und ω_l die Frequenz der Schwingung dar. Analog dazu ergibt sich die Zustandsdichte für den Reaktanden $\rho_s(E)$ mit:

$$(3) \quad \rho_s(E) = \frac{1}{(s-1)!} \frac{E^{s-1}}{\prod_{l=1}^s \hbar\omega_l}$$

Zu beachten ist, dass die Summe der Zustände im Übergangszustand und die Zustandsdichte des Reaktanden bei unterschiedlichen Energien zu berechnen sind. Betrachten wir beispielsweise den Zerfallskanal des Benzen-Ions $C_6H_6^+$ zu den Fragmenten $C_4H_4^+$ und C_2H_2 , so ergibt sich in (1) für die Entartung des Reaktionskanals $d_{rxn} = 6$. Für den Übergangszustand lässt sich die Summe der Zustände $N_s(E)$ in (2) und für das Molekül die Dichte der Zustände $\rho_s(E)$ in (3) über die Normalfrequenzen bei verschiedenen Energien E berechnen [175–178]. Für die Dissoziationsrate dieses Zerfallskanals ergibt sich so für die Aufnahme mehrerer Photonen eines KrF-Excimer-Lasers (246 nm, 4,9 eV pro Photon) die folgende Verteilung (**Abbildung 37**).

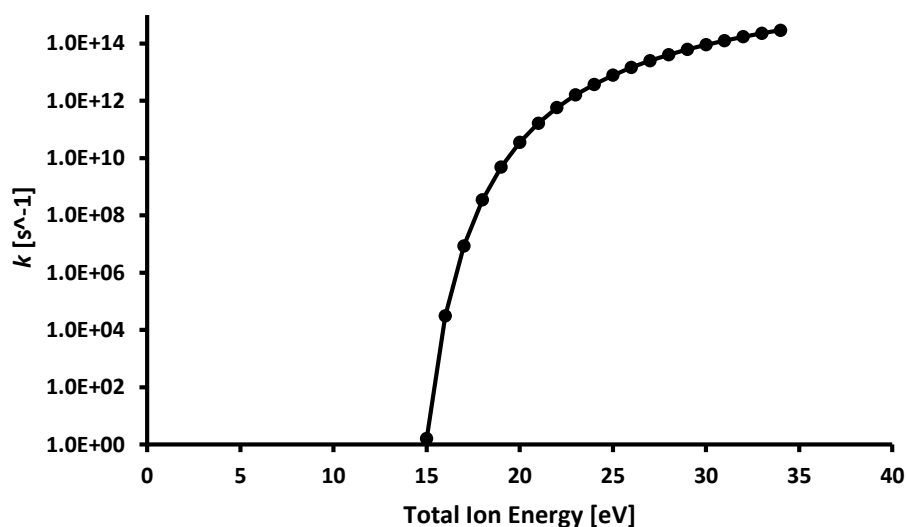


Abbildung 37: Auftragung des Zerfallsrate des Zerfallskanal des Benzen-Ions $C_6H_6^+$ zu den Fragmenten $C_4H_4^+$ und C_2H_2 in Abhängigkeit der internen Energie des Ions.

In **Abbildung 37** ist mit der logarithmischen Auftragung der Zerfallsrate ein exponentieller Anstieg mit steigender interner Energie zu sehen. Ein Zerfall über diesen approximierten Kanal ist erst ab 15 eV interner Energie zu sehen, da diese Energie gerade ausreicht um die Ionisierungsenergie IE (9,25 eV) und die Aktivierungsenergie E_0 für die Dissoziation (4,22 eV) für diesen Kanal zu überwinden.

Im direkten Vergleich dazu lässt sich die Stoßrate für Benzen (A) in Stickstoff (B) über die Teilchendichte $\frac{N_B}{V}$, den Stoßquerschnitt σ_{AB} und relative Geschwindigkeit \bar{v}_{rel} abschätzen [179]:

$$Z_{A^*B} = \frac{N_B}{V} * \sigma_{AB} * \bar{v}_{rel}$$

Bei Atmosphärendruck und 300 K liegt die Stoßzahl dabei bei etwa 10^9 - 10^{10} s^{-1} . Vergleicht man die Stoßrate mit der Dissoziationsrate, so liegt die Dissoziationsrate vom Benzen bei der Aufnahme von drei Photonen (14,7 eV bei 248 nm) mit $\sim 1 \text{ s}^{-1}$ noch deutlich unterhalb der Stoßrate bei Atmosphärendruck [175, 177, 178]. Bei der Aufnahme von vier Photonen (19,6 eV bei 248 nm) liegt die Dissoziationsrate mit 10^{10} s^{-1} schon in der gleichen Größenordnung und steigt mit der Aufnahme weiterer Photonen noch darüber hinaus. Nach der Aufnahme von etwa sechs Photonen liegt die Dissoziationsrate dieses Zerfalls schon bei 10^{14} s^{-1} und damit mehrere Größenordnungen über der Stoßrate. Allerdings handelt es sich dabei nur um grobe Approximationen, da zum Beispiel die Rotationszustände nicht berücksichtigt werden und auch nur ein einziger Zerfallskanal in Betracht gezogen wurde. Sie zeigen jedoch, dass für hohe Leistungsdichten eine Fragmentierung der Ionen in Frage kommen sollte.

Der apparative Aufbau einer APLI-Quelle lässt sich im Gegensatz zur REMPI bei Niederdruck deutlich einfacher realisieren, da während oder vor der Ionisation keine Expansion in den Niederdruckraum stattfindet. Ein wichtiger Faktor während der APLI ist dabei die Verteilung des Ionenakzeptanzvolumens (*distribution of ion acceptance volume* (DIAV)). Dieses stellt das Volumen dar, in dem nach der Ionisation ein Großteil der Ionen durch fluid- und elektrodynamische Prozesse in das Massenspektrometer geleitet und somit erfassbar werden [180–182]. Je nach Ionenquelle kann dieses Volumen durch unterschiedliche Bauweise, Gasflussraten und elektrischen Potentialverläufen stark variieren. Für eine Bruker APCI-Quelle oder die in dieser Arbeit genutzten Mehrzweck-Ionenquelle (*multi purpose ionization source* (MPIS)) gekoppelt an ein Bruker MicrOTOF beträgt die auf die Laserstrahlachse projizierte Fläche des DIAV etwa 40 mm^2 . Da der verwendete Excimer-Laser eine Strahlfläche von etwa 50 mm^2 besaß, war die genaue Ausrichtung des Lasers in der APLI Quelle von untergeordneter Bedeutung, um eine möglichst hohe Ionisationseffizienz zu ermöglichen [166]. Durch die fehlende Expansion bei der APLI ist die Analytkonzentration im Ionisationsvolumen deutlich größer, was wiederum die Ionisationseffizienz und damit die Sensitivität der Methode verbessert. So bleibt die APLI weiterhin selektiv für zum Beispiel einfache, polyzyklische oder polymere Kohlenwasserstoffe (PAKs) und gilt hier als sehr spezifische Ionisationsmethode [169, 183–186].

Um auch andere Analyte der APLI zugänglich zu machen, wurden verschiedene Ionisationsmarker entwickelt, um sie als Derivatisierungsreagenzien für die APLI zu nutzen [187–190]. Diese bestehen zumeist aus den drei Bestandteilen Ionophor, Spacer und Ankergruppe [187, 188]. Das Ionophor dient zur Ionisation des Moleküls und besteht meist aus einem polyaromatischen Grundgerüst. Dies gewährleistet eine ausreichende Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge des Lasers und bietet stabile resonante Übergangszustände für den REMPI-Prozess. Der Spacer trennt das Ionophor von der Ankergruppe und dem

Einleitung und Theorie

derivatisierten Analyten ab und kann zum Beispiel aus einer einfachen Kohlenwasserstoffkette bestehen. Dadurch soll der intramolekulare „Abfluss“ elektronischer Energie aus den polyaromatischen Gruppen vermindert und die Ionenausbeute der APLI möglichst unabhängig des Analyten gehalten werden. Die Ankergruppe ist diejenige Gruppe, welche über eine kovalente Bindung an den Analyten gekoppelt wird. So können Alkohole mit einer Carbonsäure als Ankergruppe verestert werden oder umgekehrt [187, 188].

6.2 Ergebnisse und Diskussion

6.2.1 Derivatisierung von Alkoholen und Fettsäuren

Oxylipine sind auf Grund ihrer Struktur nicht der APLI zugänglich. Daher bedarf es einer Derivatisierung, um eine Analyse per APLI zu ermöglichen. Analog zum AMPP aus Kapitel 5.2.2 wurde eine Derivatisierung an der Carbonsäuregruppe der Oxylipine angestrebt, da dies ein Derivatisieren aller Oxylipine erlaubt und somit alle der Ionisationsmethode zugänglich gemacht werden können. Da neben der Carbonsäuregruppe die Oxylipine über weitere, spezifische funktionelle Gruppen verfügen, wie Hydroxy- oder Epoxy-Gruppen, wurde angestrebt spezifische Derivate für diese Gruppen zu entwerfen. Dies ermöglicht es, nur eine spezifische Gruppe von Oxylipinen zu erfassen und somit etwa Überschneidungen mit anderen Analyten zu umgehen.

6.2.1.1 Synthese von APS und APOL

Um unterschiedliche Stoffklassen der APLI zugänglich zu machen, wurden verschiedene Marker synthetisiert, die Derivatisierung optimiert und anschließend in der APLI getestet. Diese Marker stellten ebenfalls die Grundlage für die methodischen Untersuchungen der Fragmentierung innerhalb der APLI, der REMPI bei Niederdruck als auch des Ionentransfers dar. In einem ersten Schritt wurde der für die Derivatisierung von Alkohol bereits bekannte APLI-Marker 3-Anthracen-9-yl-propansäure (APS) synthetisiert. In der Literatur sind zwei verschiedene Synthesewege für das Reagenz beschrieben: Die erste Synthese wird mit einer Wittig-Reaktion von 9-Anthraldehyd und 4-Carbomethoxybenzyltriphenylphosphoniumbromid durchgeführt [187, 191]. Das Zwischenprodukt wird anschließend hydrolysiert und die zuvor entstandene Doppelbindung reduziert. Alternativ ist eine Synthese ausgehend vom Anthron beschrieben [187, 192]. Dieses wird über Kaliumtertbutanolat (KO^tBu) deprotoniert und anschließend an Acrylnitril nukleophil addiert, welches zu dem entsprechenden Nitril als Zwischenprodukt führt. Dieses wird im sauren Milieu hydrolysiert und die verbleibende Keto-Gruppe über Zink reduziert (**Abbildung 38**).

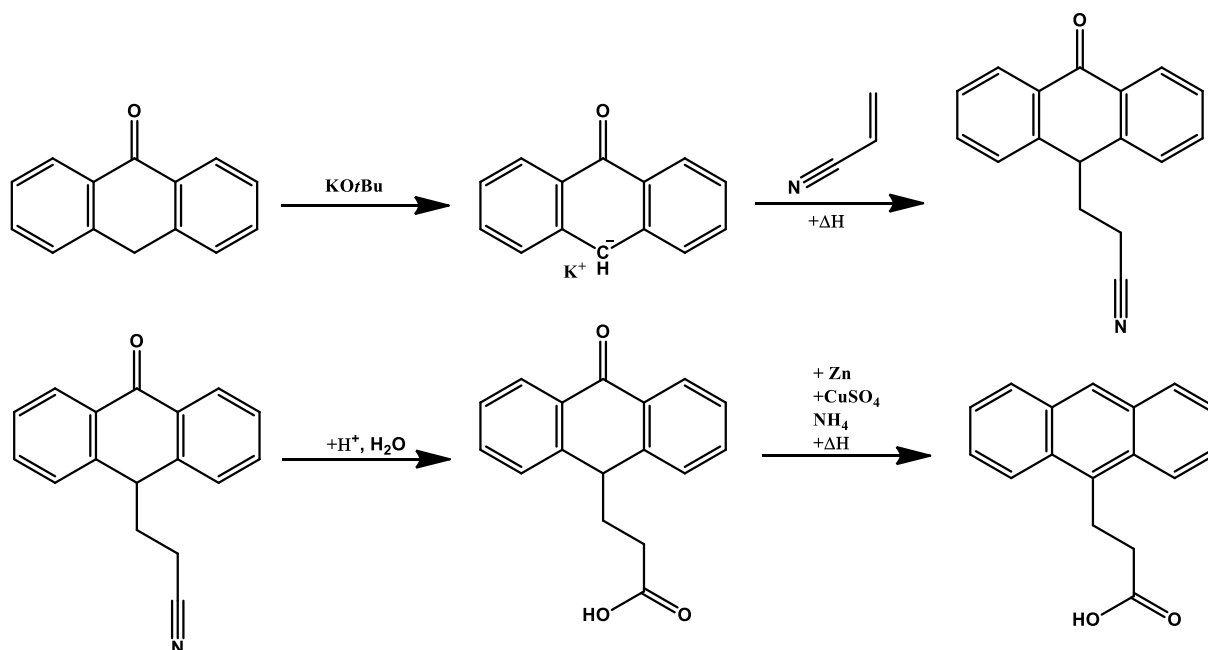


Abbildung 38: Syntheseweg zur 3-Anthracen-9-yl-propansäure (APS) ausgehend vom Anthron modifiziert nach [192].

Da die zweite Variante einfacher in der Umsetzung ist, wird auf diese zurückgegriffen. Auf diesem Weg konnten aus 10,11 g Anthron, 2,05 g des Produktes als gelbe Kristalle gewonnen werden, was einer Ausbeute von 16 % entspricht. Die Reinheitskontrolle erfolgte über H-NMR und zeigte ein sauberes Produkt (**Abbildung 39**). Dieser Marker kann anschließend genutzt werden, um Alkohole über *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Dimethylaminopyridin (DMAP) zu derivatisieren und sie so der APLI zugänglich zu machen.

Synthese von APS und APOL

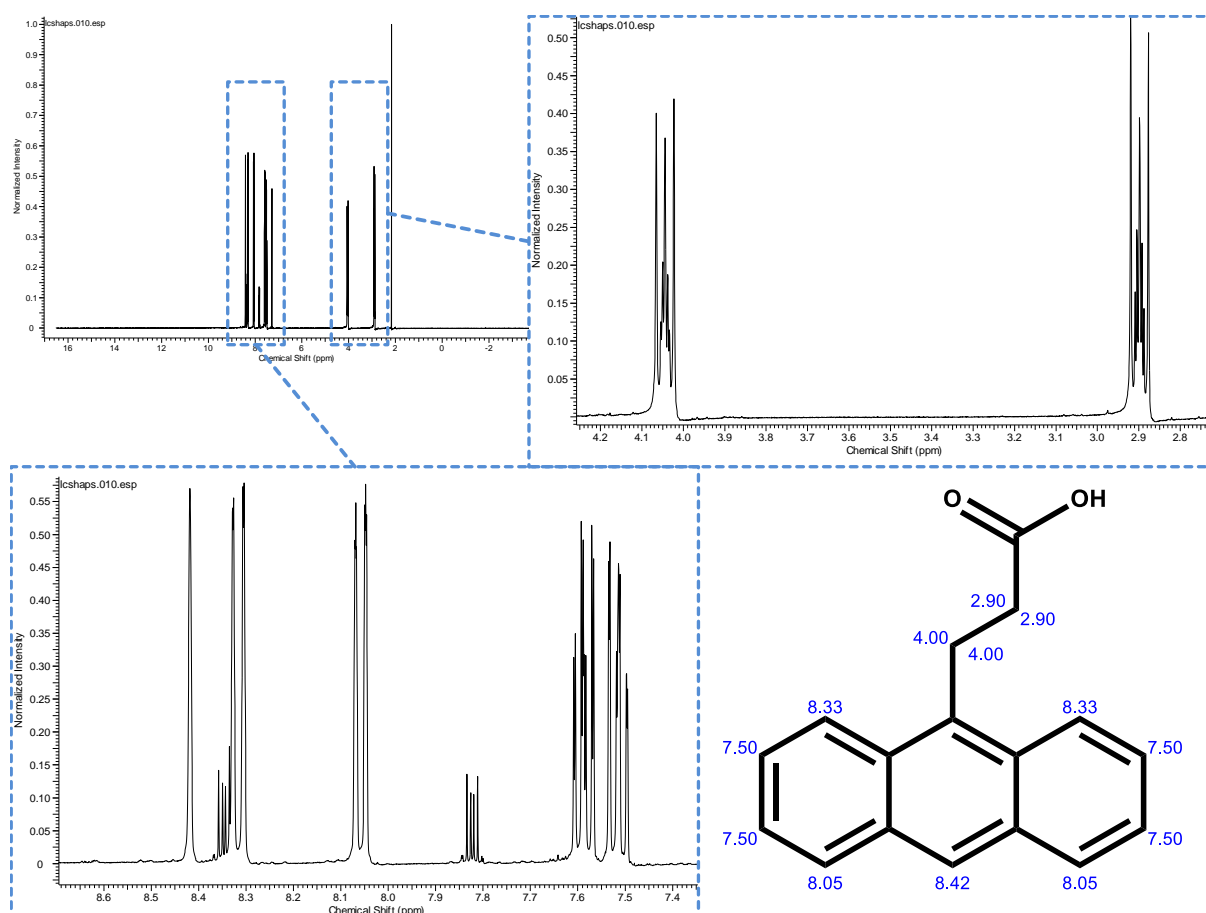


Abbildung 39: $^1\text{H-NMR}$ (400 Hz) des synthetisierten APS in d_1 -Chloroform mit Zuordnung der Banden

Das APS kann weiterhin mit LiAlH_4 reduziert werden, um den entsprechenden Alkohol 3-Anthracen-9-yl-propan-1-ol (APOL) zu gewinnen (**Abbildung 40**) [187, 193].

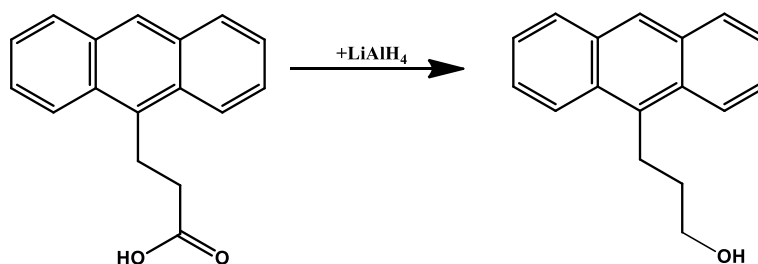


Abbildung 40: Syntheseweg zum 3-Anthracen-9-yl-propan-1-ol (APOL) ausgehend vom APS [187, 193].

Dieser Marker kann als Alkohol genutzt werden, um Carbonsäuren zu derivatisieren und so der APLI zugänglich zu machen. Aus 530 mg APS konnten nach Aufreinigung 120 mg des APOL als hellgelbe Kristalle gewonnen werden, was einer Umsetzung von 24 % entspricht. Die Reinheitskontrolle erfolge ebenfalls per H-NMR (**Abbildung 41**).

Synthese von APS und APOL

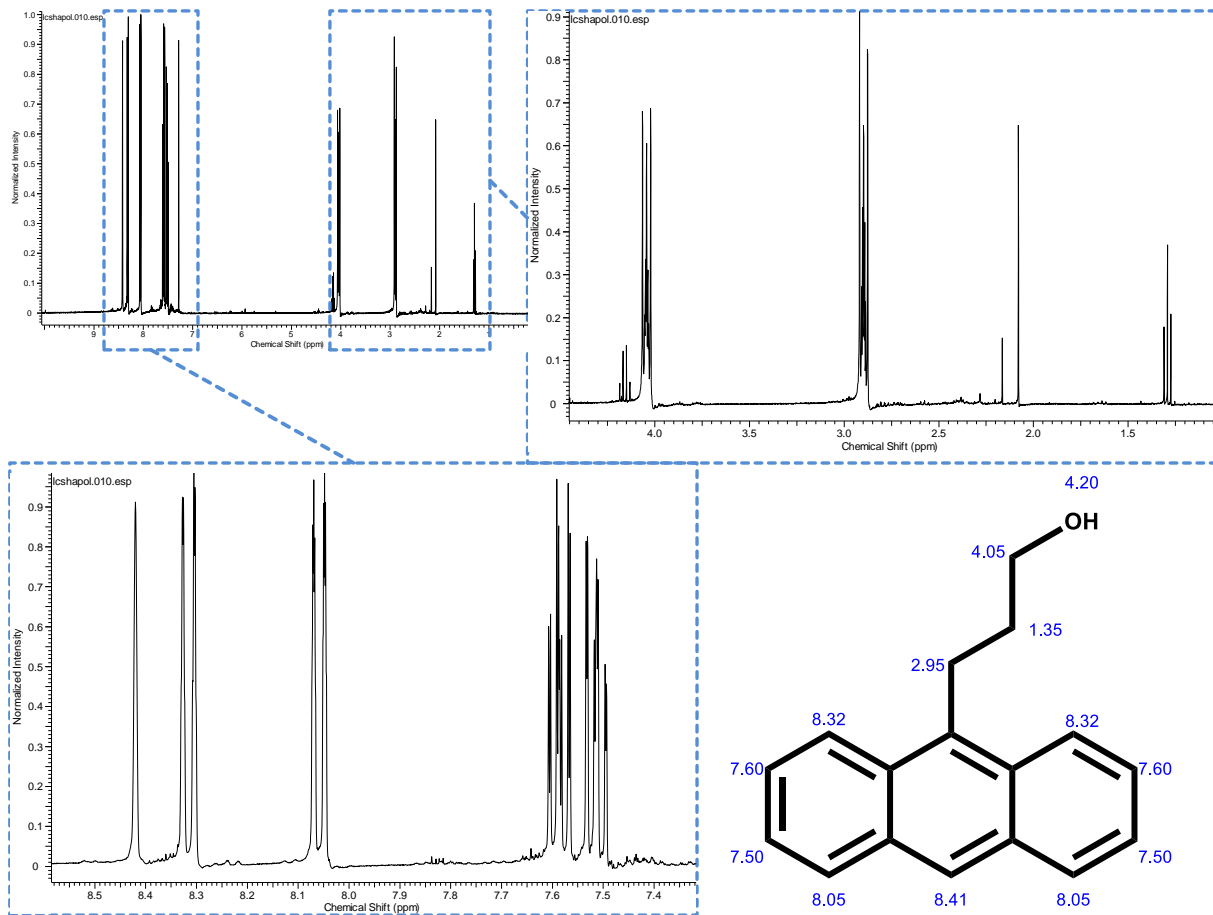


Abbildung 41: ¹H-NMR (400 Hz) des synthetisierten APOL in d₁-Chloroform mit Zuordnung der Banden

Die Derivatisierung der Carbonsäure kann mit dem Alkohol als Derivatisierungsreagenz bzw. umgekehrt erfolgen (**Abbildung 42**).

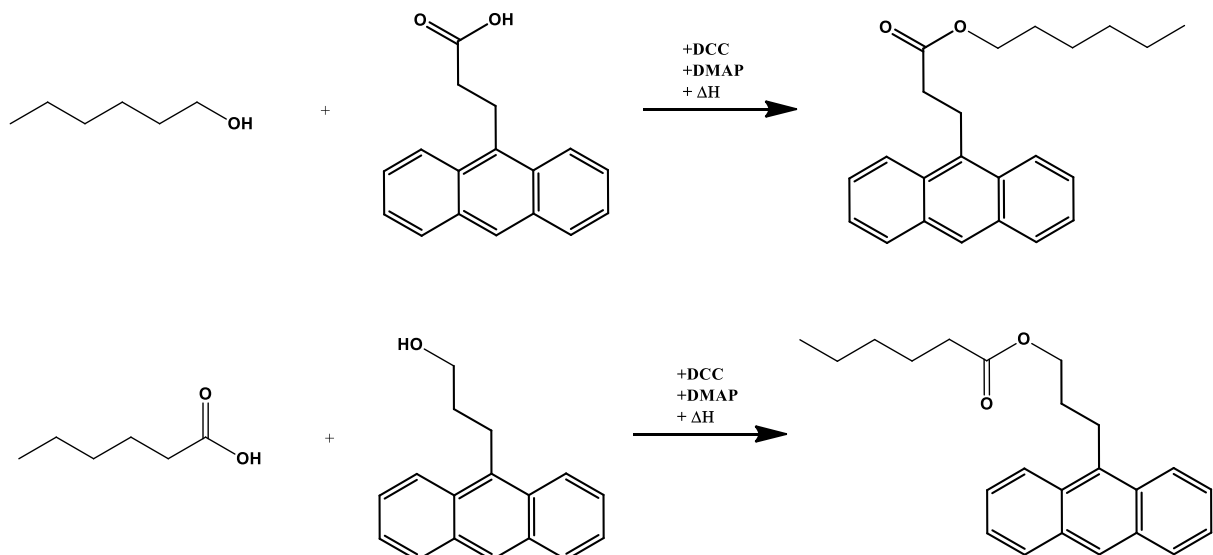


Abbildung 42: Beispielhafte Derivatisierung über Veresterung von Hexanol mit APS (**oben**) und Hexansäure mit APOL (**unten**).

6.2.1.2 Optimierung der Derivatisierung

Um die Derivatisierung von Oxylipinen mit APOL in der Routineanalytik durchzuführen, wurde eine Optimierung der Derivatisierungsbedingungen durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde eine LC-UV Methode entwickelt, um die Umsetzung der Reaktionsedukte zu den Produkten verfolgen zu können. Dafür wurde eine einfache und schnelle Trennung der Substanzen in unter 20 Minuten angestrebt. Als Grundlage dafür wurde eine RP-18 Säule verwendet und ein Gradient aus ACN und H₂O entwickelt. **Abbildung 43** zeigt die Trennung der Edukte bei mit dem optimierten Gradienten. Für die Zuordnung der Peaks wurden diese aufgefangen und per HRMS untersucht. Es konnten alle Edukte bis auf DMAP zugeordnet und klar getrennt werden. Da DMAP nur in sehr geringen Konzentrationen (140 nM) als Hilfsbase zugegeben wird, ist eine parallele Detektion per LC-UV bei deutlich höheren Konzentrationen der anderen Analyten (640 nM) nur schwer möglich.

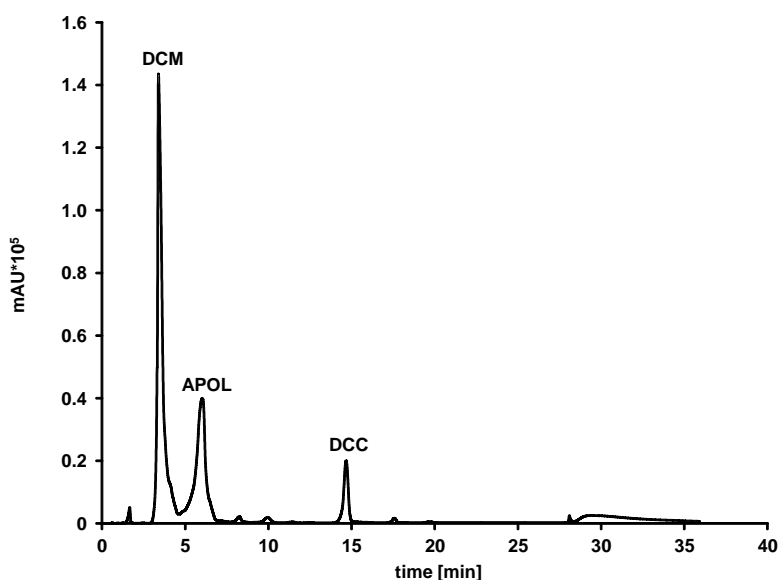


Abbildung 43: LC-UV Trennung des Derivatisierungsgemisches mit DCC (640 nM), DMAP (140 nM), APOL (280 nM) und Hexansäure (940 nM) direkt nach dem Zusammengeben. Trennung der Analyte über einen ACN/H₂O-Gradienten mit %B: 0 min 60%; 15 min 95%, 25 min 95%, 26 min 60%; Injektionsvolumen 10 µl; Flussrate: 1 mL/min. Detektion bei 210 nm.

Abbildung 44 zeigt die Auftrennung nach der Umsetzung von Hexansäure mit APOL unter Hilfe von DCC und DMAP unter gleichen chromatographischen Bedingungen. Zwei neue Peaks mit $t_R = 10$ min und $t_R = 17$ min sind klar zu erkennen. Eine Analyse per HRMS ordnet P1 klar dem Derivatisierungsprodukt zu, während Peak 2 nicht zugeordnet werden konnte. Das DCC wurde in der Reaktion komplett verbraucht, während vom APOL noch deutliche Mengen zu erkennen sind.

Optimierung der Derivatisierung

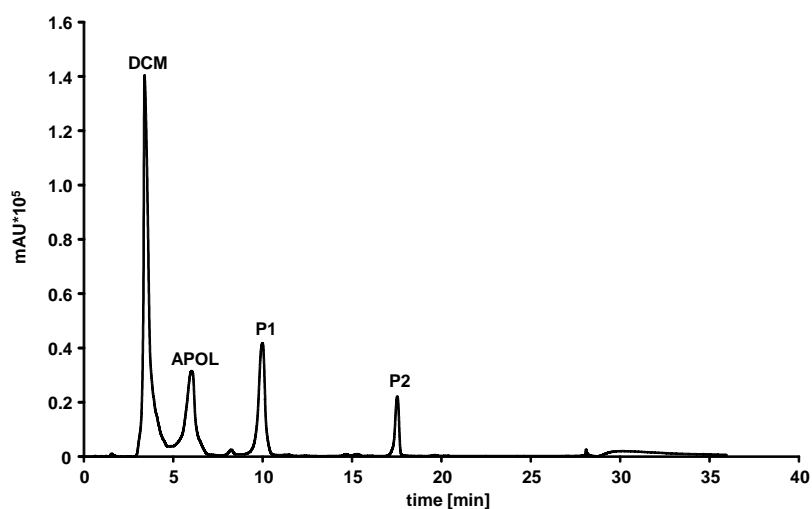


Abbildung 44: LC-UV Trennung des Derivatisierungsgemisches mit DCC (640 nM), DMAP (140 nM), APOL (280 nM) und Hexansäure (940 nM) nach 60 Minuten bei RT. Trennung der Analyte über einen ACN/H₂O-Gradienten mit %B: 0 min 60%; 15 min 95%, 25 min 95%, 26 min 60%; Injektionsvolumen 10 µl; Flussrate: 1ml/min. Detektion bei 210 nm.

Nach Entwicklung der chromatographischen Methode, wurde der Derivatisierungsverlauf in Abhängigkeit der Zeit bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Für die Derivatisierung wurde das APOL im hohen Überschuss zugegeben, um eine spätere Derivatisierung biologischer Proben bei unbekanntem Mengen von Carbonsäuren nachzubilden. Gewünscht war eine Derivatisierung unter möglichst sanften Bedingungen, um eine Oxidation und Abbau reaktiver Oxylipine zu unterbinden. Bei 24 °C (RT), 40 °C und 60 °C wurde die Reaktion jeweils 150 Minuten beobachtet. Klar zu erkennen ist, dass die Reaktion bei RT und auch nach 150 Minuten noch keinen klaren Abschluss zeigt, da sowohl das Edukt noch nicht komplett umgesetzt ist (**Abbildung 45**), als auch die Peakfläche des Produktes weiterhin einen Anstieg zeigt. Bei 40 °C zeigt die Derivatisierung nach 60 Minuten einen fast abgeschlossenen Umsatz, bei dem das Edukt komplett verbraucht ist und die Entstehung der Produkte sich auch bis 150 Minuten nicht signifikant ändert. Eine Derivatisierung bei 60 °C zeigt zwar eine schnelle Umsetzung der Carbonsäure, allerdings bei einer schlechten Reproduzierbarkeit (hohen Standardabweichungen), als auch einen Abfall der Derivatisierungsprodukte nach 40 Minuten. Eine Durchführung der Reaktion bei RT und 60 °C zeigen sich daher als ungeeignet, da eine Umsetzung bei RT zu lange dauert, welches sowohl in der praktischen Durchführung ungünstig ist, als auch den Oxylipinen unter realen Bedingungen einer sehr langen Zeit dem Luftsauerstoff aussetzen würde und so Oxidationen fördern würde. Bei 60 °C ist die Reaktion zwar schnell abzuschließen, allerdings sind die Reaktionsprodukte bei dieser Temperatur scheinbar nicht stabil genug und zerfallen schnell wieder zu anderen Produkten. Unter Berücksichtigung möglichst kurzer Reaktionszeiten wurde daher für spätere Derivatisierungen auf eine Durchführung bei 40 °C für 60 Minuten zurückgegriffen. Da die Derivatisierung von

Optimierung der Derivatisierung

Alkoholen mit APS identisch abläuft, wurde hier ebenfalls auf die gleichen Bedingungen zurückgegriffen.

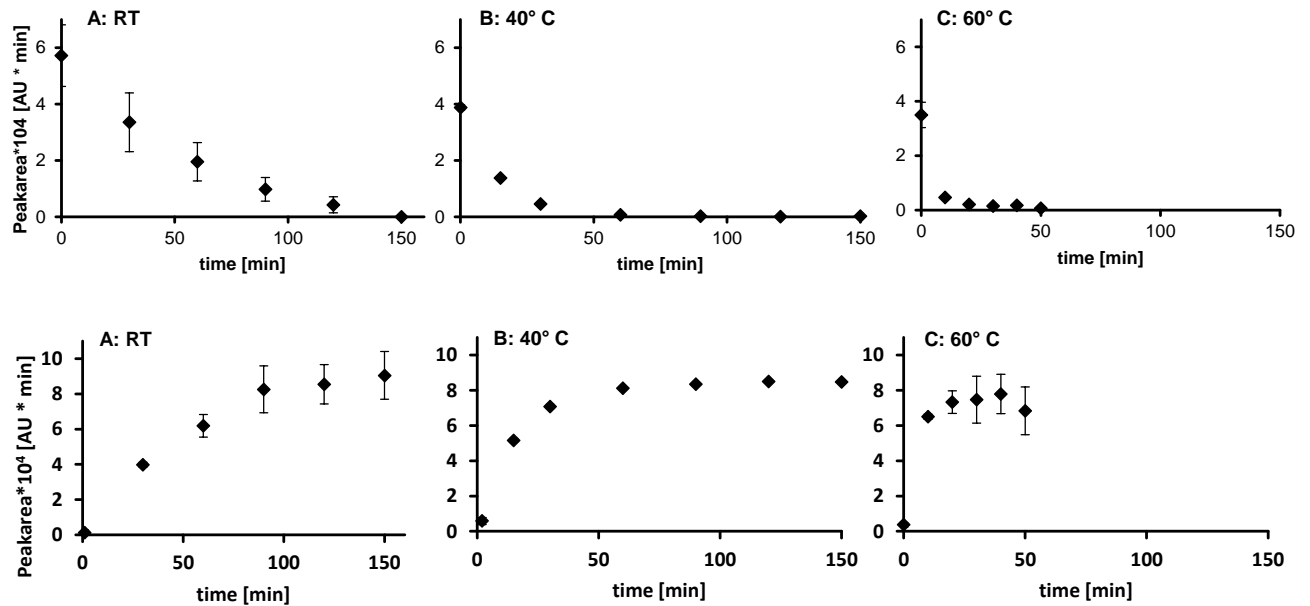


Abbildung 45: Umsetzung der Phenylhexansäure (**oben**) und Bildung des Reaktionsproduktes (**unten**) aus Phenylhexansäure ($0,6 \mu\text{M}$) bei der Derivatisierung mit APOL ($3,0 \mu\text{M}$) mittels DCC ($30 \mu\text{M}$) und DMAP ($4 \mu\text{M}$). Die Umsetzung erfolgte bei RT (A), 40°C (B) und 60°C (C). In unterschiedlichen Zeitintervallen erfolgte eine Probenentnahme und Analyse per LC-UV mit: Eluent A: ACN/ H_2O /AA 5/95/0,1 (v,v,v), Eluent B 95/5/0,1(v,v,v). Gradient %B: 0 min 50%, 10 min 95%, 15 min 95%, 16 min 50%. Injektionsvolumen $10 \mu\text{L}$; Flussrate: 1 mL/min . Detektion bei 210 nm

Anschließend wurden beide Marker (APS und APOL) in der APLI getestet um ihre Reinheit zu bestimmen. Beide Marker wurden in DCM gelöst und am Bruker MicrOTOF per Direktinfusion injiziert. Die Ionisierung erfolgte in der MPIS mit einem Atlex KrF-Excimer Laser. **Abbildung 46** zeigt die erzeugten Massenspektren der beiden Substanzen. Klar zu erkennen ist der $[\text{M}^+]$ -Peak beider Marker mit m/z 250 (APS) und 236 (APOL), als auch einige Fragmentierungsprodukte (m/z 204, 191 und 178). Eine erfolgreiche Synthese und Ionisierbarkeit per APLI ist somit gegeben.

Optimierung der Derivatisierung

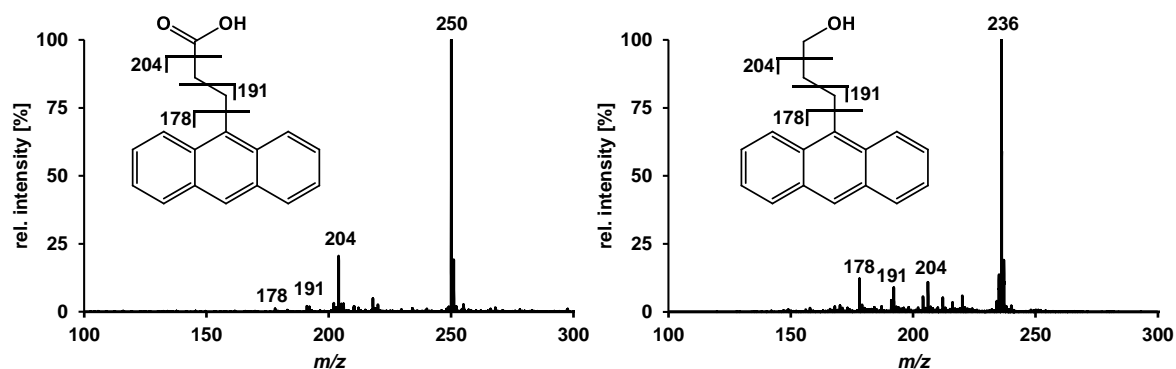


Abbildung 46: Massenspektren von APS (links) und APOL (rechts). Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ von jeweils 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser bei 6 mJ. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Anschließend wurden beide Marker nach Derivatisierung charakterisiert. Dafür wurde APS unter den oben genannten Bedingungen mit Butanol derivatisiert. Auch nach Derivatisierung sind die Produkte per APLI ionisierbar und das $[\text{M}^+]$ -Signal stellt das Hauptsignal im Spektrum dar (**Abbildung 47**).

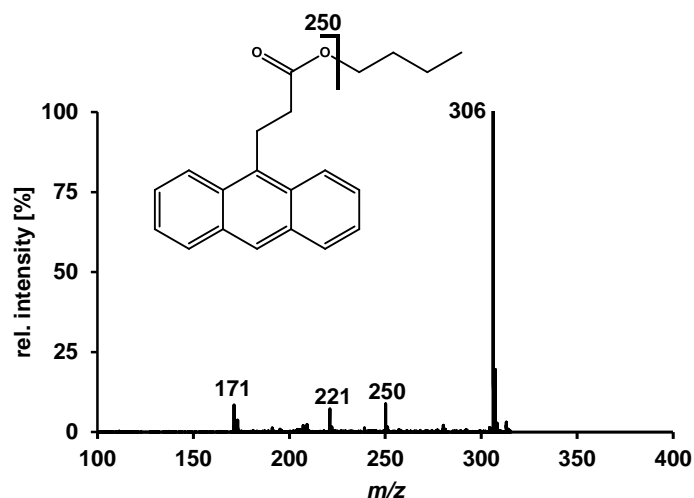


Abbildung 47: Massenspektrum von mit APS derivatisierten Butanol (m/z 306). Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ von jeweils 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser bei 6 mJ bei fokussiertem Laserstrahl.

Ebenfalls wurde versucht, ein Marker ohne Spacer zu synthetisieren, um den Einfluss des Spacers auf die Fragmentierung zu untersuchen. Ausgehend vom Anthron wurde dafür eine Synthese des Anthracen-9-ol durch Reduzierung durch LiAlH_4 in trockenem THF angestrebt. Als Produkt konnte ein weißes kristallines Pulver gewonnen werden. Die HRMS-Daten ließen allerdings nicht auf das gewünschte Produkt schließen. Auch Veränderungen der

Synthesebedingungen führte zu keinem besseren Ergebnis, weshalb dieser Versuch aufgegeben wurde.

6.1.1 Derivatisierung von Epoxy-Fettsäuren

Um verschiedene Stoffklassen der APLI zugänglich zu machen, wurden weitere Marker auf der Basis von Anthracen mit unterschiedlichen Ankergruppen entwickelt. Bei Epoxiden sind in der Literatur Derivatisierungen über Thiol-Gruppen bekannt [194, 195]. Da mit Anthron bereits ein Edukt für solche Synthesen zur Verfügung stand, wurde eine Synthese basierend auf dieser Verbindung entworfen (**Abbildung 48**).

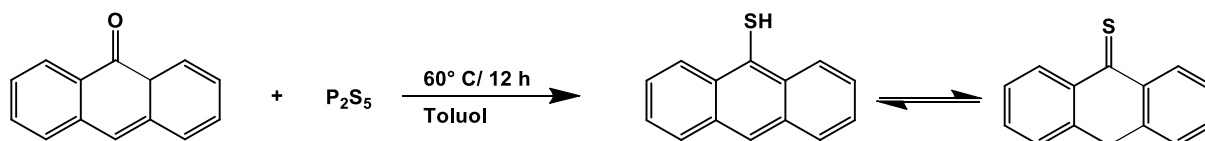


Abbildung 48: Synthesevorschlag ausgehend vom Anthron zum Anthracen-9-yl-thiol [194].

Analog zu einer ähnlich beschriebenen Reaktion, wurde Anthron mit Phosphor-(V)-Sulfid (PS) umgesetzt, wodurch ein Austausch des Carbonylsauerstoffs mit einem Schwefelatom zum entsprechenden Thion erfolgen sollte, welches sich laut Literatur in das Thiol umformen sollte, da es die energetisch günstigere Form ist. Die in der Literatur beschriebene Aufreinigung durch Umkristallisation des Thiols in n-Hexan erwies sich allerdings als schwierig, da das gelbe Syntheseprodukt nicht löslich war [194]. So wurde versucht 0,5 g des Produktes in 200 ml siedendem Hexan zu lösen, was zwar zu einer gelben Färbung der organischen Phase führte, allerdings ein Großteil des Feststoffes ungelöst blieb. Die organische Phase wurde heiß filtriert und abgekühlt, allerdings konnte kein Ausfall eines umkristallisierten Produktes festgestellt werden. Nach einrotieren des organischen Lösemittels konnten 50 mg (10%) eines gelb-orangen Feststoffes mit unangenehmem Geruch gewonnen werden. Eine Kontrolle des Schmelzpunktes mit $150-153^\circ C$ zeigte allerdings, dass dieser deutlich über dem in der Literatur beschriebenen Wert von $91^\circ C$ lag und die Synthese somit nicht erfolgreich war. Die Synthese wurde mehrmals wiederholt, dabei das Umkristallisieren in Aceton und DCM durchgeführt und die Synthese unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um eine Oxidation während der Reaktion zu verhindern. Auch diese Varianten erbrachten allerdings keinen Erfolg. Eine genauere Untersuchung des Syntheseproduktes per DC zeigte, dass das Syntheseprodukt aus unterschiedlichen Substanzen bestand, welche sichtbar bei der Schmelzpunktbestimmung unterschiedliche Schmelzpunkte und Farben zeigten (gelb/orange/rot). Daher wurde das Gemisch säulenchromatographisch aufgereinigt und die Fraktionen aufgefangen. Eine der Fraktionen konnte als Anthracen-9-yl-thiol (AT) identifiziert werden, die Ausbeute lag allerdings bei $< 1\%$. Daher wurde die Synthese unter modifizierten

Derivatisierung von Epoxy-Fettsäuren

Bedingungen durchgeführt, bei der das PS zuvor mit Pyridin umgesetzt wird (**Abbildung 49**) [196].

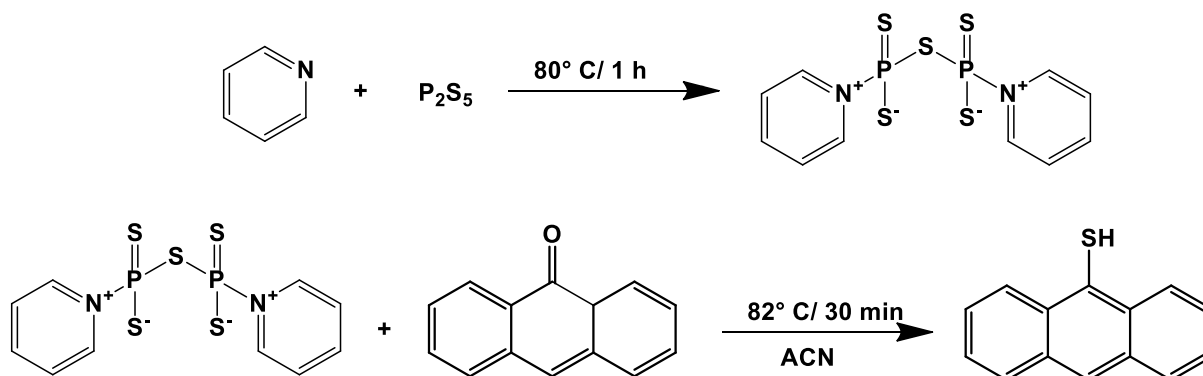


Abbildung 49: Synthesevorschlag zum Anthracen-9-yl-thiol über das Dipyridinium-1-yl-pentathiodiphosphonat und Anthron.

Es wird beschrieben, dass bei dieser Methode Phosphor-(V)-Sulfid wesentliche Vorteile gegenüber dem vorherig beschriebenen Syntheseweg bringt, da es eine höhere thermische Stabilität besitzt und die Umsetzung so bei höheren Temperaturen und damit schneller erfolgen kann [196]. Des Weiteren ist ein Zerfall zu wasserlöslichen Produkten beschrieben, wodurch bei Kontakt mit Wasser kein H_2S entsteht. Die Synthese erfolgte mit den gleichen Edukten wie die Vorherige. In einem ersten Schritt wurde das PS mit Pyridin umgesetzt um nach Filtrieren das kristalline Dipyridinium-1-yl-pentathiodiphosphonat (PTP) zu gewinnen. Dieses wurde anschließend zusammen mit Anthron bei $60^\circ C$ in Acetonitril umgesetzt. Nach Aufreinigung konnten so 0,5 g (27% Ausbeute) des Anthracen-9-yl-thiol gewonnen werden.

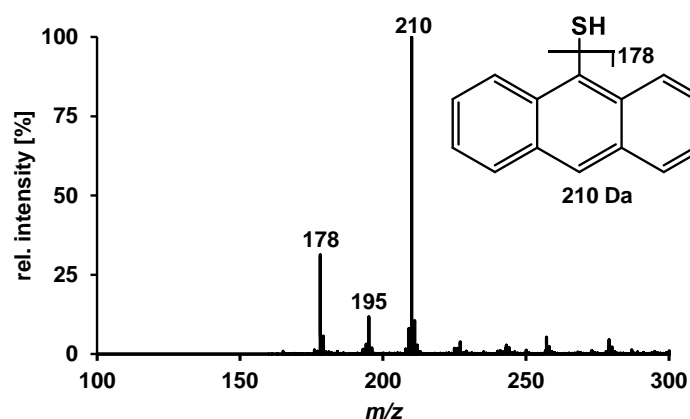


Abbildung 50: Massenspektrum von Anthracen-9-yl-thiol (AT). Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei $30 \mu L/min$ von $1 \mu M$ Lösungen in ACN in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserstrahl. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

In **Abbildung 50** ist das Massenspektrum des Syntheseproduktes zu sehen, welches per

Derivatisierung von Dihydroxy-Fettsäuren

APLI-TOF aufgenommen wurde. Klar zu erkennen ist der $[M^+]$ -Peak mit m/z 210 welcher das Spektrum dominiert, sowie das Fragment unter Abspaltung der Thiolgruppe mit m/z 178. Nicht zuzuordnen ist der Peak mit m/z 195. Er lässt auf ein protoniertes Anthron schließen, welches allerdings unter diesen Umständen nicht entstehen sollte [197]. Anschließende Versuche den Marker als Derivatisierungsreagenz für Epoxy-PUFA nach in der Literatur beschriebenen Derivatisierungsreaktionen scheiterten jedoch [197].

6.1.1 Derivatisierung von Dihydroxy-Fettsäuren

Eine weitere Gruppe der innerhalb der Oxylipine stellen die Diole dar, welche durch vicinale Hydroxygruppen charakterisiert sind. Eine Möglichkeit der spezifischen Derivatisierung von vicinalen Hydroxygruppen ist über die Veresterung mit Boronsäuren beschrieben [198–201].

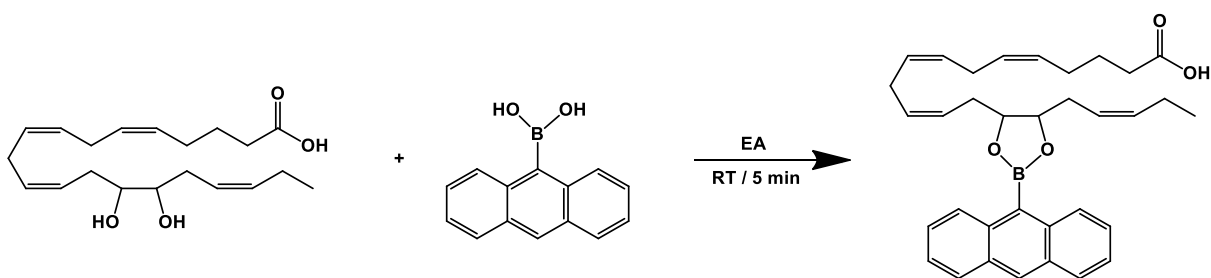


Abbildung 51:BLS

Die Veresterung kann unter wasserfreien Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt werden und findet unter anderem Anwendung in der Analyse von Zuckern **Abbildung 51** [202–204]. Um per Derivatisierung die Diole der APLI zugänglich zu machen wurde auf ein Anthracen-Gerüst als Ionophor zurückgegriffen, welches an Position 9 eine Boronsäure-Gruppe als Ankergruppe trägt. Als Testsubstanz wurde 14,15-DiHETE mit der Anthracen-9-yl-boronsäure verestert und per APLI-TOF analysiert.

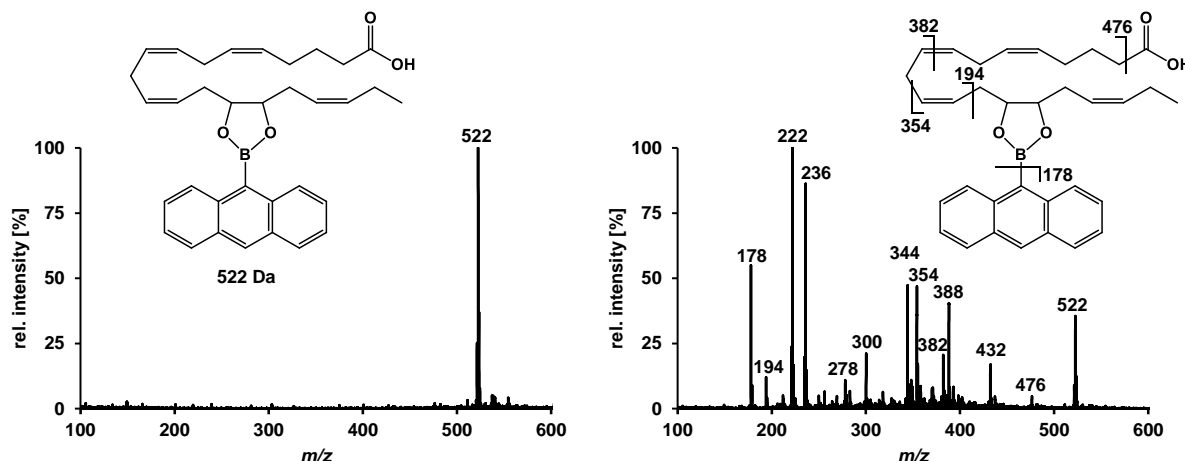


Abbildung 52: Massenspektren von 14,15-DiHETE derivatisiert mit Anthracen-9-ylboronsäure. Links ohne Fokussierung des Laserstrahls und optimierten Transferbedingungen für m/z 450-550. Rechts bei fokussiertem Laserstrahl und gemittelt über optimierten Transfereinstellungen von m/z 50-550. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ von jeweils 1 μM Lösungen in ACN in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Die Analyse per Direktinfusion lieferte für das derivatisierte Oxylin ein klares $[\text{M}^+]$ -Peak bei m/z 522 (**Abbildung 52**). Durch Erhöhung der Leistungsdichte des Lasers und Anpassung des Ionentransfers auf niedrigere Massen konnte ein unterschiedlich ausgeprägtes Fragmentspektrum erhalten werden (**Abbildung 52**). Einige primäre charakteristische Fragmente wie m/z 178 (Abspaltung des Ionophors) und m/z 476 (Abspaltung von CO_2) lassen sich direkt im Spektrum finden. Auch hier lässt sich wie bei den anderen derivatisierten Oxylinen ein Fragment finden, welches einer Spaltung der Position einer Doppelbindung entspricht, welches vermutlich eine Umlagerung der Doppelbindung beinhaltet. Weitere Peaks lassen sich sekundären Fragmenten zuordnen, wie der kombinierten Abspaltung des Ionophors und CO_2 (m/z 300). Da das derivatisierte Oxylin viele Möglichkeiten für sekundäre Fragmentierungen enthält, war eine weitere Identifizierung der Fragmente nur spekulativ und wurde daher nicht weiter aufgeführt. Insgesamt bleibt aber klar zu sehen, dass die Derivatisierung der vicinalen Diol-Gruppe mit dem Boronsäure-Derivat erfolgreich war und der Analyt sicher identifiziert werden konnte. Die Derivatisierung bleibt bei Raumtemperatur vergleichsweise einfach und schnell. Da diese Ester allerdings gegenüber Hydrolyse bei Feuchtigkeit und Oxidation anfällig sind, empfiehlt sich eine Derivatisierung direkt vor der Analyse [205].

6.1.2 Analyse von Resolvinen per APLI

Die APLI benötigt für eine erfolgreiche Ionisation ein entsprechendes Chromophor, etwa ein polyaromatisches System, um über die Absorption der entsprechenden Energie zu einer Ionisation zu führen. Die meisten mehrfach ungesättigten Fettsäuren und ihre Metaboliten

weisen zwar eine größere Anzahl von Doppelbindungen auf, welche in den meisten Fällen allerdings isoliert vorliegen, wodurch eine ausreichende Absorption der Lichtwellen um 250 nm nicht gegeben ist und somit keine direkte Ionisierung erzielt werden kann.

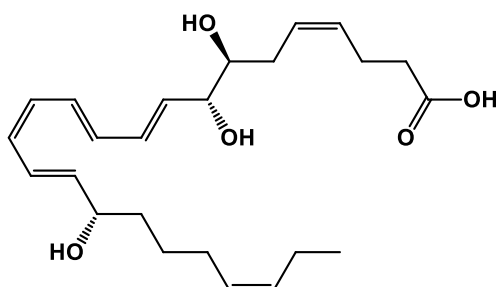


Abbildung 53: Strukturformel von Resolvin D1 (*7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosaehaenoic acid*).

Einige Verbindungen, zum Beispiel das Resolvin D1, weisen allerdings ein größeres konjugiertes Doppelbindungssystem auf (**Abbildung 53**). Es wurde daher getestet, ob eine ausreichende Absorption vorliegt, um den Analyten direkt und ohne Derivatisierung zu ionisieren. Dazu wurden 10 μL einer 500 nM Resolvinlösung in einen 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ Fluss von ACN/ H_2O injiziert. Dem Injektionsport wurde direkt ein UV-Detektor nachgeschaltet um die Anwesenheit der Analyten zu verifizieren, bevor diese im Anschluss per APLI ionisiert und per MS-TOF analysiert wurden.

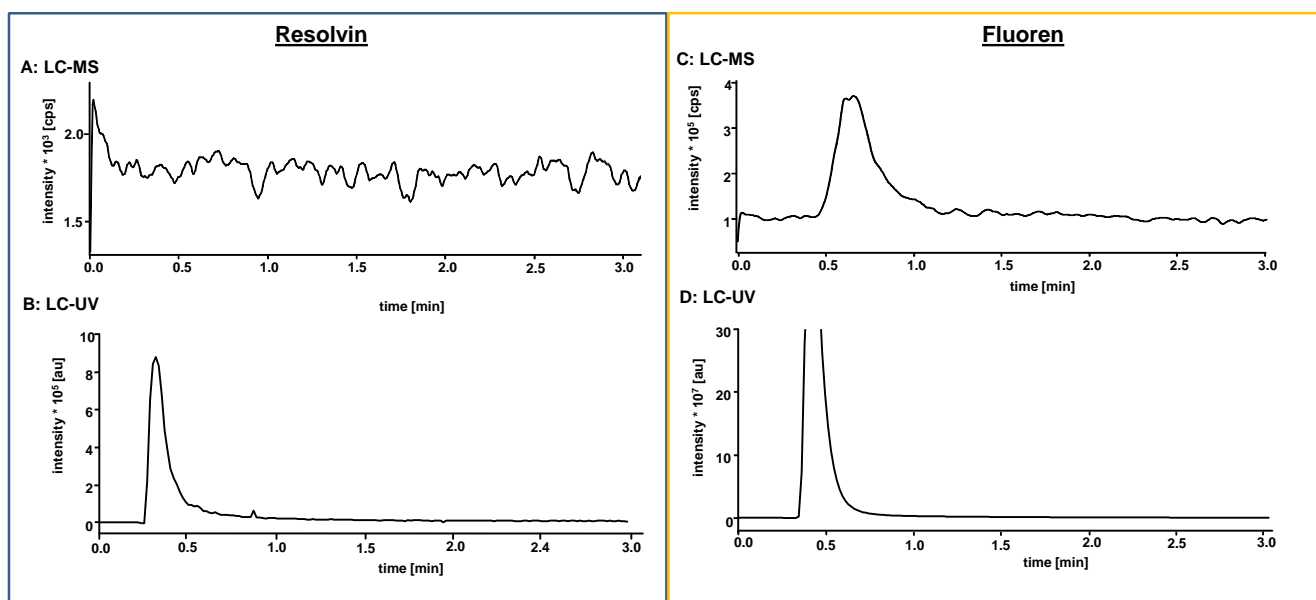


Abbildung 54: LC-UV-APLI-TOF Analyse von Resolvin D1 (links) und Fluoren (rechts). Oben dargestellt die TIC des Bruker MicroTOF, unten die UV-Absorption bei 210 nm. Injiziert wurden 100 μL von jeweils 1 μM Lösungen in DCM in 300 $\mu\text{M}/\text{min}$ ACN.

Analog zur der Resolvinlösung wurde eine Fluorenlösung als Kontrolllösung analysiert. Für beide Lösungen lässt sich nach Injektion bei 0.4 Minuten ein klarer Peak durch den UV-Detektor erkennen (**Abbildung 54**). Die Fluorenlösung führt anschließend zu einem klaren

Fragmentierung bei APLI

Analytpeak nach 0.6 Minuten. Bei der Resolvinlösung konnte auch nach mehreren Ansätzen bei unterschiedlichen Parametern für Ionisierung und Transfer kein Analyt detektiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass keine ausreichende Absorption vorliegt um auch bei hohen Leistungsdichten die Ionisierungsenergie zu überwinden und somit das Molekül zu ionisieren. Eine direkte Analyse von Resolvin D1 per APLI ist daher nicht möglich.

6.1.3 Fragmentierung bei APLI

Bei der Laserionisation gibt es zwischen der Fragmentierung bei Atmosphärendruck und der Fragmentierung bei Niederdruck große Unterschiede. So konnten die vorherigen Experimente zeigen, dass bei APLI zwar eine Fragmentierung der Analyte stattfindet und spezifische Fragmente gebildet werden, die Fragmentierung insgesamt allerdings nicht so stark ausfällt, wie sie im Niederdruckbereich zu erwarten ist. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden im ersten Schritt einige theoretische Berechnungen für die genutzten Derivatisierungsmarker durchgeführt und später mit weiteren experimentellen Daten für diese Moleküle verglichen.

6.1.3.1 *ab initio*-Berechnungen zur Fragmentierung bei der Laserionisation

Durch die Synthesen der Derivate zur Derivatisierung standen verschiedene Substanzen zur Verfügung, um die Fragmentierung innerhalb der APLI genauer zu untersuchen. Für die Untersuchungen wurde daher auf das APS zurückgegriffen, da es in großen Mengen einfach zu synthetisieren war und charakteristische Fragmente bei der Fragmentierung lieferte. Um den Fragmentierungsprozess während der APLI zu charakterisieren, wurden einige *ab initio* Berechnungen durchgeführt, um die primäre Fragmentierung des APS zum Fragment m/z 191 besser zu verstehen. Die Berechnung der optimierten Geometrien für APS, [APS⁺] sowie den beiden Hauptprodukten der Fragmentierung m/z 191 und das dazugehörige neutrale Fragment erfolgte per Dichtefunktionaltheorie (*density functional theory*, DFT) mit der Modell-Chemie ω B97X-D/def2-TZVPP (Funktional/Basissatz). Die so berechneten Geometrien wurden genutzt, um die ersten 20 angeregten Zustände für diese Moleküle/Ionen per zeitabhängigem Dichtefunktional (TD-DFT) zu berechnen. Daraus resultierten die entsprechenden UV-VIS Absorptionsspektren. Bei den Berechnungen wurde sich auf die entsprechenden Singulett/Dublett-Zustände beschränkt, da andere Multiplizitäten durch spinverbotene Übergänge zu sehr geringen Absorptionsquerschnitten führen und somit vernachlässigt werden konnten.

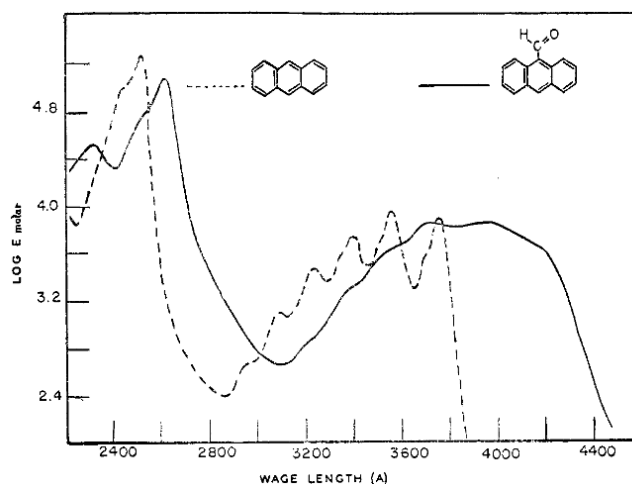


Abbildung 55: Absorptionsspektrum von Anthracen und Anthracen-9-carbaldehyd nach [206].

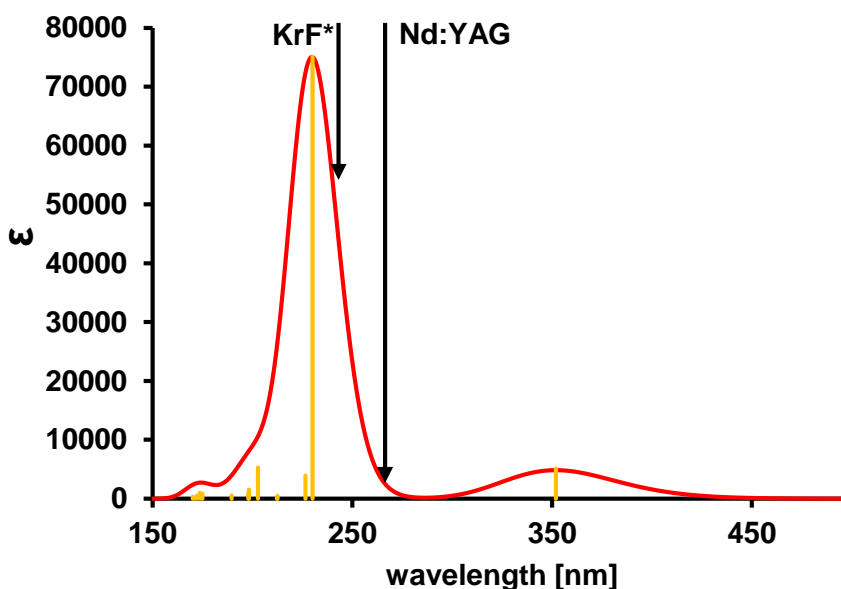


Abbildung 56: *ab initio*-Kalkulation des Absorptionsspektrums von APS mit Gaussian09

In **Abbildung 55** ist das Absorptionsspektrum für Anthracen und Anthracen-9-carbaldehyd nach Literatur dargestellt [206]. In **Abbildung 56** ist das berechnete Absorptionsspektrum zu sehen. Ein Vergleich zeigt eine gute Übereinstimmung der Spektren mit ihrer maximalen Absorption bei etwa 240 nm sowohl beim Literaturwert für Anthracen und Anthracen-9-carbaldehyd als auch bei dem berechneten Spektrum für APS. Da bei allen Molekülen das Anthracen-Grundgerüst der größte Einflussfaktor für die Absorption von Photonen dieser Wellenlänge ist, war dies zu erwarten und bestätigt das Ergebnis der Berechnung. Unterschiede lassen sich zu einem mit der leicht veränderten Struktur des Restes, als auch

durch die nur grobe Berechnung erläutern. Aus dem Absorptionsspektrum des APS lässt sich trotzdem schließen, dass die Wellenlänge des Excimer-Lasers deutlich besser für die Untersuchungen geeignet ist, da er mit seiner KrF-Mischung Licht bei 248 nm emittiert. Somit liegt er deutlich näher am Absorptionsmaximum des Analyten, als der Nd:YAG mit 266 nm. Dies einen entsprechend großen Einfluss auf die Aufnahme der Photonenenergie und die daraus resultierende Ionisierung und Fragmentierung. Trotzdem liefert der Nd:YAG sehr gute und vergleichbare Ergebnisse bei den Experimenten, da sein Strahl eine bessere Kohärenz und vor allem viel kleinere Strahldivergenz besitzt und dadurch deutlich größere Leistungsdichten erreicht werden können, wodurch die der Nachteil der niedrigeren Absorption der Wellenlänge negiert wird.

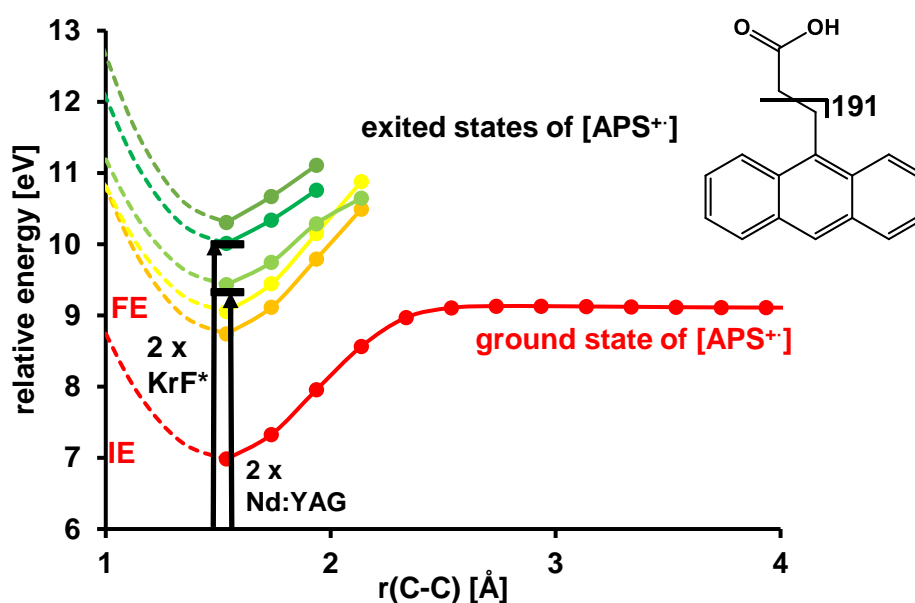


Abbildung 57: Ab-initio Berechnung der Potentialkurven von Grund- und Anregungszustand von $[APS^+]$ entlang der C-C Koordinate des Bindungsbruchs zu m/z 191 (per TD-DFT). Dargestellt ebenfalls die IE (7.4 eV) und FE (9.1 eV) sowie die 2-Photonen-Energie des Nd:YAG- und KrF*-Lasersystems.

In **Abbildung 57** sind die berechneten Potentialkurven für die C-C-Bindung gezeigt, welche zu der charakteristischen Fragmentierung des Analyten zum Fragment m/z 191 führen. Die Berechnung der Zustandsfunktionen erfolgte per *relaxed energy surface scan* für $[APS^+]$ und seine angeregten Zustände für die untersuchte C-C-Bindung. Daraus ablesen lässt sich mit 6.9 eV die Energie die benötigt wird, um das APS zu Ionisieren (IE), welche in guter Übereinstimmung und leicht unter der Ionisierungsenergie von Anthracen mit etwa 7.4 eV liegt [207–209]. Ebenfalls konnte die Energie berechnet werden, die mindestens benötigt wird, um diese Bindung zu dissoziieren. Diese Fragmentierungsenergie (FE) liegt bei 9.1 eV. Anhand der Wellenlänge der Laser lässt sich die Anzahl der Photonen berechnen, die mindestens benötigt wird, um diese Energie zu erreichen. So reichen bei beiden genutzten Lasersystemen

zwei Photonen aus, um die Fragmentierungsenergie zu erreichen, was auf einen [1+1] REMPI-Prozess schließen lässt. Mit 9.3 eV aus zwei Photonen liegt die Energie des Nd:YAG nur knapp über der FE, während der Excimer mit 10.0 eV für zwei Photonen deutlich über der FE liegt. Eine Fragmentierung durch Absorption zweier Photonen ist somit bei Verwendung des Nd:YAG unwahrscheinlicher als beim Excimerlaser, wenn man bedenkt, dass die absorbierte Energie gesammelt in diese Bindung gebracht werden muss. Da die interne Energie somit niedriger ist, wird ebenfalls die Zerfallsrate geringer sein, wie in **Abbildung 37** zu Beginn berechnet wurde. Beide Systeme bieten allerdings mehr als ausreichend Energie, um im Zuge eines [1+1] REMPI-Prozesses die IE von 6.9 eV zu erreichen. Die Berechnungen lassen vermuten, dass für beide Laser eine Fragmentierung des APS auch bei Atmosphärendruck in Frage kommt, da die Energie von zwei Photonen bereits ausreicht, um die FE zu überschreiten und liefern somit eine gute erste Charakterisierung des Reaktionssystems. Eine Möglichkeit zur Unterstützung dieser Hypothese wären weitere RRKM-Rechnungen, um so zu überprüfen, ob die unimolekulare Dissoziationsrate $k_{uni}(E^*)$ bei den entsprechenden Energien in der Größenordnung der Deaktivierungsrate ist, welches im Zuge dieser Arbeit aber nicht durchgeführt wurde.

6.1.4 Einfluss des Ionentransfers

Um die durch den Ionentransfer stoßinduzierte Fragmentierung innerhalb des MS von der direkten Fragmentierung des Ionisierungsprozesses zu unterscheiden, wurden zuvor systematische Untersuchungen zur Fragmentierung während des Ionentransfers im Bruker MicrOTOF gemacht. Das genutzte MicrOTOF besitzt innerhalb des Transfers mehrere Druckstufen, um den Atmosphärenruck der Ionenquelle auf bis zu $5 \cdot 10^{-6}$ mbar zu reduzieren. In der ersten Druckstufe zwischen dem *capillary exit* und *skimmer 1* beträgt der Druck etwa 4 mbar, was einer Reduktion der Teilchendichte auf etwa 10^{17} Teilchen pro cm^3 entspricht. Bei diesen Bedingungen sind energiereiche Stöße wahrscheinlich, wodurch es innerhalb der Druckstufe zu CID kommen kann. Hinter dem *skimmer 1* beträgt der Druck noch $5 \cdot 10^{-1}$ mbar, was einer Teilchendichte von etwa 10^{16} Teilchen cm^{-3} entspricht. Bei diesen Bedingungen nimmt die Zahl der Stöße zwar ab, die durchschnittliche Energie der Stöße jedoch zu, da die erhöhte mittlere freie Weglänge eine erhöhte Beschleunigungszeit liefert. In der folgenden Druckstufe zwischen *skimmer 2* und den Ionisationslinsen wird der Druck auf $5 \cdot 10^{-4}$ mbar reduziert (10^{13} Teilchen cm^{-3}). Wie zuvor ist die Anzahl der Stöße hier noch geringer, allerdings noch energiereicher. Um im Analysenmodus eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen, ist über den Ionentransfer hinweg eine hohe Spannungsdifferenz angelegt, um die Ionen entsprechend zu Beschleunigen und zu Fokussieren. Für die Untersuchung des Transfers wurde APS 1 μM per Direktinfusion injiziert bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Unter konstanten und sanften APLI-

Einfluss des Ionentransfers

Bedingungen wurde ionisiert und anschließend der Transfer an den verschiedenen Stufen variiert (**Abbildung 58**).

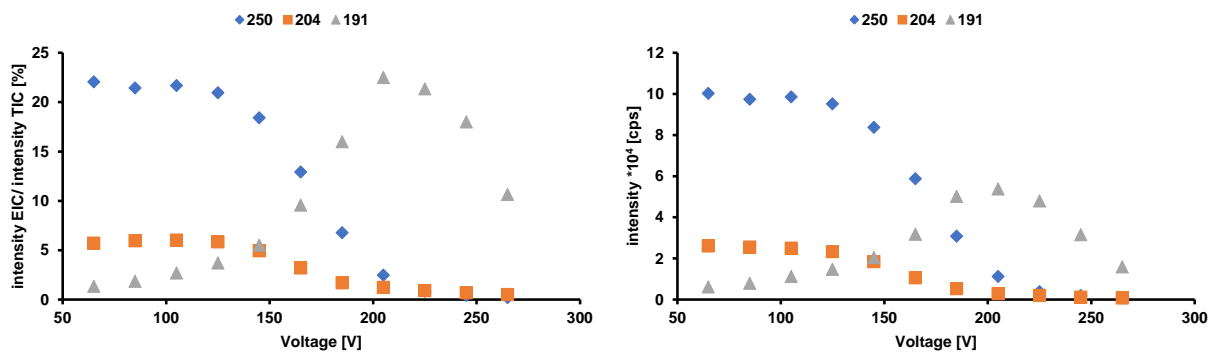


Abbildung 58: Anteil des EIC am TIC (links) und absolute EIC (rechts) von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit des Potentials zwischen Capillary Exit und Skimmer 1. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

In der ersten Transferstufe ist eine klare Änderung der Analytsignale zwischen 50 V und 300 V zu erkennen. Das $[\text{APS}^+]$ mit m/z 250 stellt bei 60 V das Hauptsignal dar, die Fragmente m/z 191 und 204 liegen nur gering vor. Beim Erhöhen der Spannungsdifferenz ist zu sehen, dass bei über 100 V die Signalstärke des $[\text{APS}^+]$ und des Fragments m/z 204 zurückgeht und die Signalstärke des Fragments m/z 191 erhöht wird. Da dies ein paralleler Effekt ist, ist davon auszugehen, dass dies auf stoßinduzierte Fragmentierung des APS zurückzuführen ist. Dabei ist davon auszugehen, dass m/z 204 ebenfalls zu m/z 191 weiterfragmentiert. Ab etwa 160 V kommt es dann zu zum Wechsel im Hauptsignal: das Fragment m/z 191 stellt nun den größten Anteil am TIC dar, während das $[\text{APS}^+]$ deutlich abgesunken ist. Ab etwa 200 V ist schließlich kaum noch ein $[\text{M}^+]$ oder des ersten Fragment m/z 204 zu sehen und die einzige Analytspezies stellt das Fragment m/z 191 dar.

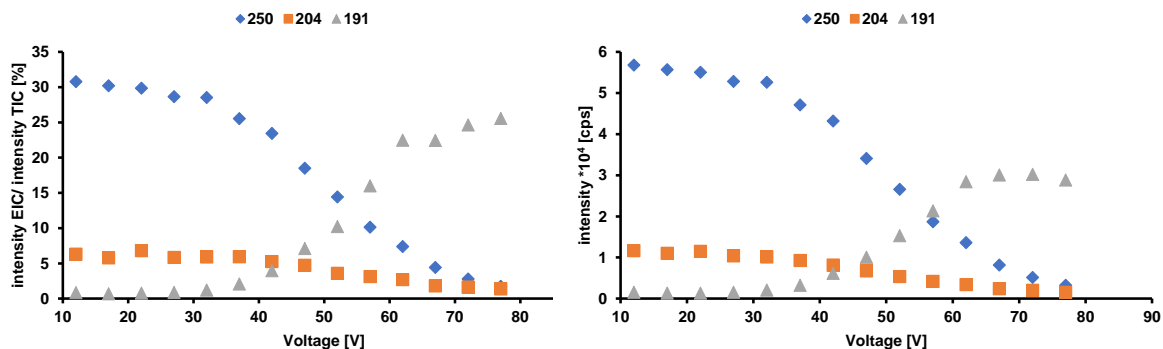


Abbildung 59: Anteil des EIC am TIC (links) und absolute EIC (rechts) von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit des Potentials zwischen Skimmer 1 und Hexapoll/Skimmer 2. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$

einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Die Untersuchung der zweiten Druckstufe, welche den ersten Hexapol enthält, zeigt ein analoges Verhalten zur vorherigen Druckstufe (**Abbildung 59**). Die Signale sind hier bis etwa 30 V stabil, bei höheren Spannungen kommt es zu einem Abfall des Signals des $[\text{APS}^+]$ und des ersten Fragments m/z 204, während das Fragment m/z 191 stetig ansteigt. Bei etwa 55 V kommt es zum Wechsel des Hauptsignals und ab etwa 70 V ist kaum noch $[\text{APS}^+]$ zu sehen. Deutlich geringer sind die Spannungen, bei dem dieser Effekt im Vergleich zur ersten Druckstufe beobachtet werden kann. Durch den Unterschied im Druck um den Faktor 10 zwischen den beiden Druckstufen, ist die mittlere freie Weglänge in der zweiten Druckstufe deutlich erhöht, wodurch eine geringere Beschleunigungsspannung ausreicht um die gleiche Menge kinetischer Energie zu erhalten und in den Stoß zu bringen. Dieser Effekt lässt sich ebenfalls in der dritten Druckstufe erkennen (**Abbildung 60**). Die Signale sind bis etwa 15 V stabil, der Wechsel findet bei etwa 25 V statt und der komplette Signalabfall des $[\text{APS}^+]$ bei 40 V womit die Spannung wieder deutlich geringer sind als in der vorherigen Druckstufe.

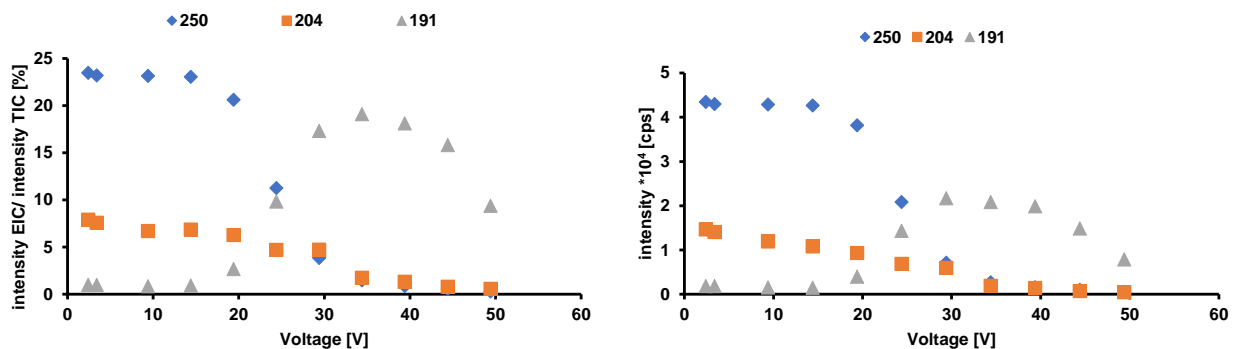


Abbildung 60: Anteil des EIC am TIC (links) und absolute EIC (rechts) von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit des Potentials zwischen Hexapol1/Skimmer 2 und Hexapol 2 bzw. den Ionenlinsen. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Weitere Experimente zur Untersuchung von weiteren Stoffklassen (reines APOL, Butanol derivatisiert mit APS oder Buttersäure derivatisiert mit APOL) sind in der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Benjamin Bogdanski zu finden [210]. Über die Untersuchung des Transfers konnte zu einem gezeigt werden, dass die CID einen wichtigen Aspekt bei der Fragmentierung von Molekülen während des Transfers spielen kann. In Abhängigkeit der mittleren freien Weglänge in den einzelnen Druckstufen kann über eine entsprechende Spannung ein breites Produktspektrum, von fast nur $[\text{M}^+]$ bis hin zur kompletten Fragmentierung der $[\text{M}^+]$ erreicht werden. Für spezifische Untersuchung der vorgeschalteten

Einfluss des Ionentransfers

Fragmentierung in der APLI ist daher darauf zu achten, die Transferbedingungen konstant und möglichst sanft zu halten.

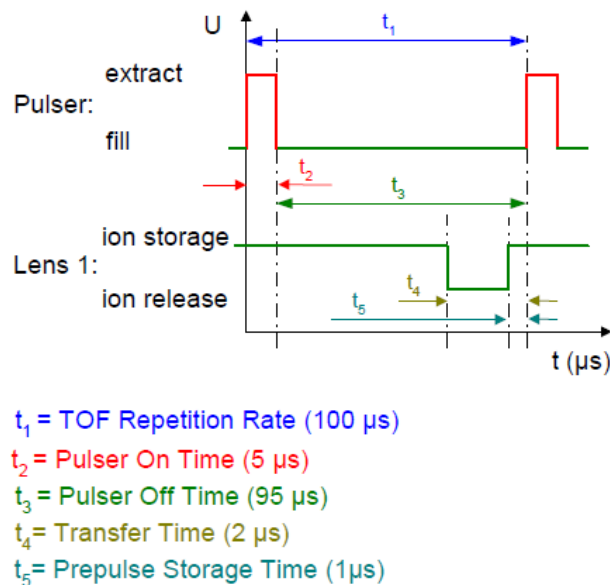


Abbildung 61: Zeitintervalle innerhalb eines Pulses am Bruker MicroTOF [211].

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor während des Ionentransfers am Bruker MicroTOF in das Flugrohr ist die Transferzeit „transfer time“ (**Abbildung 61**). Dieser Parameter beschreibt den Zeitpunkt, an dem die ersten Ionen in das Flugrohr eingelassen werden und stellt damit das obere Limit für hohe Massen dar [211]. Je höher die Transferzeit gesetzt wird, desto höher ist das obere Massenlimit der transferierten Ionen. Die Wahl der entsprechenden Zeitlänge hat daher ein Einfluss auf das Erfassen der $[M^+]$ und Fragmentionen, die während des Ionisierungsprozesses und des Transfers entstehen. Für das APS wurde daher das Spektrum bei einer variierten Transferzeit aufgenommen und die EIC in **Abbildung 62** dargestellt.

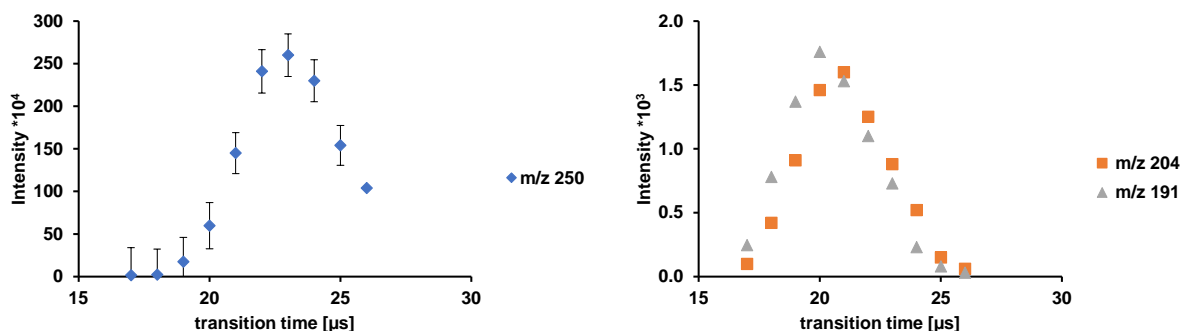


Abbildung 62: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Transition Time. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicroTOF.

Einfluss der Linsen-Positionierung

Es ist klar zu erkennen, dass das Optimum für das $[M^+]$ bei einer Transferzeit von $23,5 \mu\text{s}$ liegt, wohingegen das Optimum für die Fragmentationen bei $20,0 \mu\text{s}$ liegt. Problematisch ist, dass das jeweilige andere Ion bei der entsprechenden Transferzeit nur noch sehr gering erfasst wird. Dies kann zu einer hohen Fehlerquelle bei der Auswertung von Fragmentierungsreaktionen führen, wenn die Transferzeit nur für eine der Transition optimiert wird und andere nicht berücksichtigt werden. So werden diese im Anschluss nicht korrekt transferiert und beim Spektrum nicht miterfasst. Für weitere Versuche wurde die Transferzeit auf $22,0 \mu\text{s}$ gesetzt, da hier der beste Kompromiss zwischen dem Transfer der $[M^+]$ und Fragmentationen zu erkennen ist.

6.1.5 Einfluss der Linsen-Positionierung

Um die Leistungsdichte des Laserstrahls bei den Experimenten zu erhöhen, wurde dieser mit einer Linse fokussiert. Ein weiterer wichtiger Faktor beim Betrachten der Fragmentierung während der APLI stellt daher die Positionierung der Linse dar. So führt eine Fokussierung des Lasers zu einer Veränderung des Strahldurchmesser und somit der Leistungsdichte über den gesamten Strahl hinweg. In Abhängigkeit der Positionierung der Linse zum DIAV der MPIS, kann die Erzeugung von Ionen und Fragment somit beeinflusst werden. Um diesen Effekt zu analysieren, wurde die Linse verschoben um den Brennpunkt in verschiedene Bereiche der MPIS zu bringen. Als Maß wurde dafür die Distanz des Brennpunktes zum Einlass des MS-TOF auf orthogonaler Ebene gemessen. In **Abbildung 63** ist zu erkennen, dass mit geringerem Abstand des Brennpunktes zum MS-Einlass, die gesamte Ionenausbeute sinkt. Zwar ist der leistungsdichteste Bereich hier minimal vom Einlass entfernt, allerdings befindet er sich außerhalb des DIAV. Da das DIAV den Bereich darstellt, aus dem ein Großteil der Ionen stammt welche in das MS gelangen, stellt eine Positionierung des Brennpunktes außerhalb des DIAV daher keine optimalen Bedingungen dar. Mit steigender Entfernung zum MS-Einlass, wird der Brennpunkt weiter ins DIAV verschoben und die Ionenausbeute steigt. Zwar ist in diesem Fall das bestrahlte Volumen innerhalb des DIAV am geringsten, scheint aber durch die deutlich erhöhte Leistungsdichte übertroffen zu werden.

Einfluss der Linsen-Positionierung

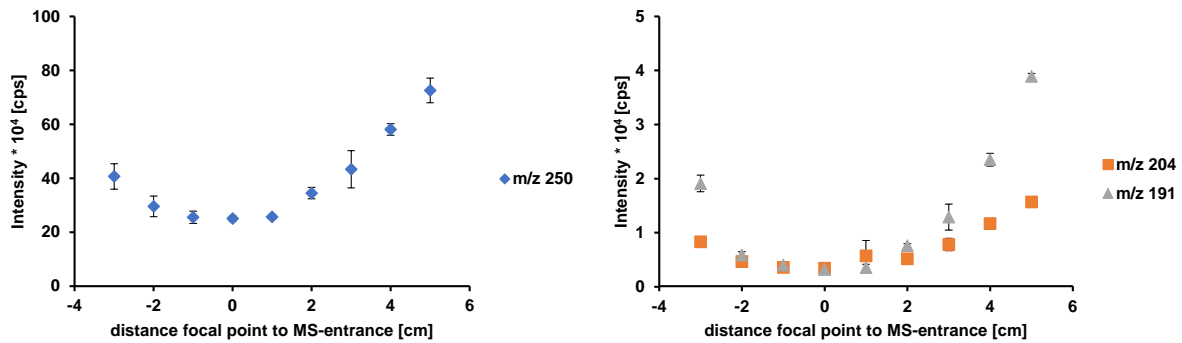


Abbildung 63: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit von der Entfernung des Brennpunktes des Laserbeams vom MS-Eingang. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Dass dieser Effekt der zurückgehenden $[\text{APS}^+]$ nur gering mit der verstärkten Fragmentierung zusammenhängt, ist in **Abbildung 63** rechts zu sehen. Analog zu dem $[\text{APS}^+]$ sinkt die Signalstärke der Fragmente mit Näherung des Brennpunktes zum MS-Einlass. Somit findet hier keine signifikant verstärkte Fragmentierung statt, sodass der Verlauf des Signals des $[\text{APS}^+]$ auf die Ionenausbeute zurück zu führen ist.

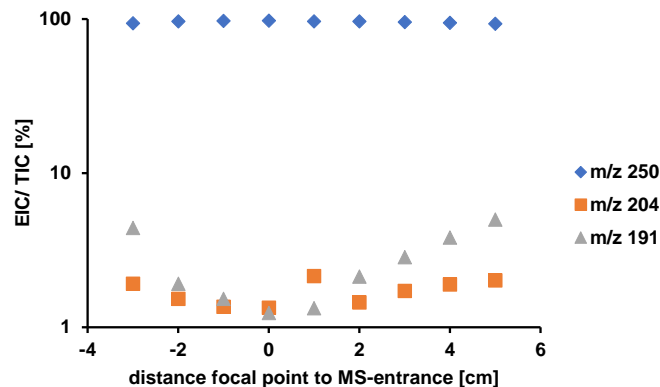


Abbildung 64: relative EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit von der Entfernung des Brennpunktes des Laserbeams vom MS-Eingang. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Um dennoch den Effekt der Entfernung des Brennpunktes zur Fragmentierung des Analyten zu untersuchen, wurden die relativen Analytsignale zum TIC aufgetragen (**Abbildung 64**). Zu erkennen ist, dass der Anteil des $[\text{APS}^+]$ am TIC immer über 90 % liegt und somit nur wenig durch die Fragmentierung beeinflusst wird. Allerdings ist auch zu erkennen, dass eine leichte Steigung des Fragments m/z 191 zu sehen ist, wenn der Brennpunkt in den Bereich des DIA verschoben wird. Durch die Erhöhung der Leistungsdichte innerhalb des DIA scheint es daher zu einer leichten Verstärkung der Fragmentierung zu kommen.

Einfluss der Linsen-Positionierung

Charakteristisch bei allen Untersuchungen sowohl mit dem Nd:YAG als auch dem Excimer, ist der leichte Anstieg des ersten Fragmentes bei 1 cm positivem Abstand, unabhängig vom Analyten. Ebenfalls auffällig war eine Anomalie der Signalstärken und Fragmentierung, die auftrat, wenn der Brennpunkt des fokussierten Lasers bei hoher Leistung längere Zeit auf das Quarzglasfenster, welches zum Einlass des Lasers in die MPIS genutzt wurde, gerichtet war. In diesen Fällen kam es dazu, dass das Signal des Fragmentions m/z 191 teilweise deutlich höher als das $[M^+]$ anstieg. **Abbildung 65** zeigt diesen Effekt: Bei einem Linsenabstand von -5 cm bis 0 cm ist eine starke Fragmentierung zu sehen, nachdem der Brennpunkt längere Zeit auf dem Fenster lag. Sobald der Brennpunkt weit genug vom Fenster entfernt ist (>0 cm), kommt es wieder zu dem üblichen Verlauf.

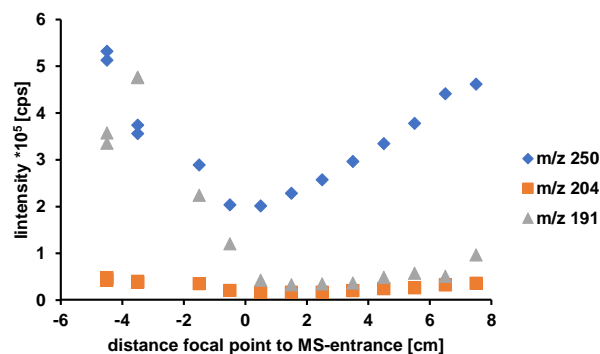


Abbildung 65: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit von der Entfernung des Brennpunktes des Laserbeams vom MS-Eingang nach Beschädigung des Quarzglases. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 μ L/min einer 1 μ M Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei 6 mJ bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Parallel zu diesem Effekt konnte eine Beschädigung des Quarzglases beobachtet werden (**Abbildung 66**). Auf der linken Seite ist das Glas nach Bestrahlung mit dem Excimer zu sehen, rechts nach Bestrahlung durch dem Nd:YAG. Die Unterschiede im Schaden lassen sich auf die Strahlungsqualität der Lasersysteme zurückführen: Der Strahl des Excimer-Lasers ist divergenter und im Durchmesser deutlich größer, was zu den größeren „Kratern“ in der linken Abbildung führt. Die Divergenz des Nd:YAG ist deutlich geringer und der Strahlendurchmesser auch kleiner, wodurch sich der Schaden als „Tunnel“ äußert.

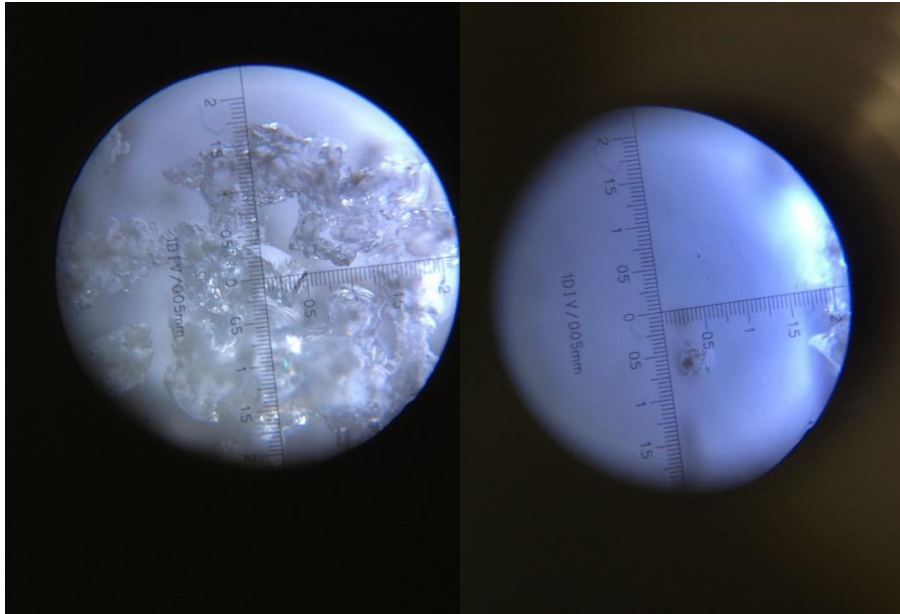


Abbildung 66: Beschädigungen des Quarzglases durch den fokussierten KrF* Excimer Laser (rechts) und den fokussierten Nd:YAG (links) unter dem Vergrößerungsglas.

Es lässt sich vermuten, dass es bei Bestrahlung durch den fokussierten Laser, bei hohen Leistungsdichten auf dem Glas (-5 bis 0 cm Distanz), zu Oberflächeneffekten auf dem Glas kommt. Hierbei könnten reaktive Spezies von dem Glas abplatzen und in die Gasphase gelangen und dort anschließend mit dem Analyten kollidieren, wodurch es zu einer verstärkten Fragmentierung des Analyten kommt. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass bei geringeren Leistungsdichten, welche auf das beschädigte Glas gerichtet sind (0 – 6 cm Distanz), dieser Effekt nicht zu erkennen ist.

6.1.6 Einfluss der Leistungsdichte

Für die Untersuchung der Fragmentierung während der APLI wurden einige Vereinfachungen/ Annahmen gemacht, um einheitliche Angaben zu Laserleistungsdichten und Bestrahlungsflächen zu machen. Zu einem wird der Laser als idealer Strahler betrachtet, welcher eine konstante Leistungsdichte über die Bestrahlungsfläche und konstante Energie über die komplette Pulsbreite hat und identisch zum Fokuspunkt ist. Es wurde weiter angenommen, dass die Bestrahlungsfläche einem perfekten Kreis entspricht. Aus zuvor angefertigten Arbeiten kann die DIA, die effektive Ionisierungsfläche, mit $40 \pm 5 \text{ mm}^2$ abgeschätzt werden [180, 181]. Weitere Messungen zeigten, dass die in der Quelle herrschenden Strömungen eine hufeisen-ähnliche Verteilung der Ionen vor dem *sprayshield* bewirkt [182]. Um einen Vergleich zwischen fokussierten und unfokussierten Bedingungen treffen zu können, wurde für die DIA eine Kugelform mit einem Durchmesser von 7 mm angenommen. Um eine laserinduzierte Fragmentierung zu analysieren, wurde APS als Analyt

Einfluss der Leistungsdichte

eingesetzt und unter fokussierten und unfokussierten Bedingungen analysiert.

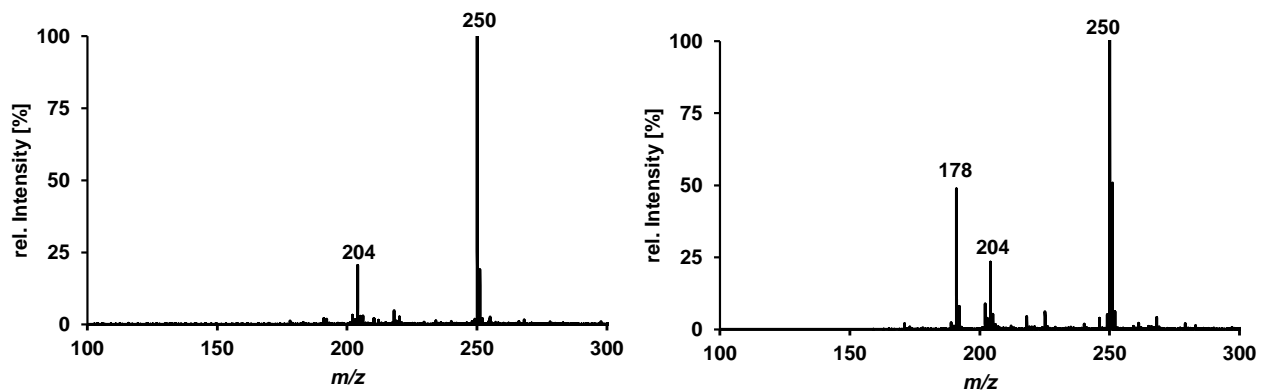


Abbildung 67: APLI-Massenspektren von APS bei unfokussiertem (links) und fokussiertem (rechts) Laserstrahl. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ von jeweils 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte einem Atlex KrF* Excimer Laser bei 6 mJ. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

In **Abbildung 67** ist links das Massenspektrum von APS bei unfokussierten Bedingungen zu sehen, dabei ist das $[\text{APS}^+]$ das Hauptsignal, neben dem ersten Fragment mit m/z 204. Bei einer Fokussierung des Laserstrahls zu $0,17 \text{ GW}/\text{cm}^3$ sinkt zwar die Bestrahlungsfläche stark, dennoch ist eine Erhöhung der Signalintensität des $[\text{M}^+]$ zu sehen. Neben dem Fragment m/z 204 ist nun auch das Fragment n/z 191 zu erkennen. Durch die erhöhte Leistungsdichte kommt es dadurch zu einer verstärkten Ionisierung des $[\text{M}^+]$, ebenfalls lässt sich erkennen, dass durch erhöhte Leistungsdichte eine verstärkte Fragmentierung der Moleküle induziert wird.

Um die Abhängigkeit der Fragmentierung von der Leistungsdichte des KrF* Excimerlaserstrahls weiter zu analysieren, wurde bei konstanter Fokussierung die Laserenergie von 0,1 mJ bis 7,5 mJ erhöht, um dadurch die Leistungsdichte zwischen $0,17 \text{ GW}/\text{cm}^3$ und $1,3 \text{ GW}/\text{cm}^3$ zu erhöhen. Im ersten Ansatz wurden dabei die Ionenausbeuten in Abhängigkeit der Laserleistung betrachtet. Dieser Zusammenhang zwischen Ionenausbeuten und Laserleistung lässt sich mit einem kinetischen Modell beschreiben [212]. Dabei kann der Einfluss der Leistung in einen 1+1 REMPI-Prozess von unabhängig bis maximal quadratisch eingehen. Experimentell kann der Zusammenhang aus der Steigung der doppelt logarithmischen Auftragung von Signalintensität und Laserleistung ermittelt werden. In **Abbildung 68** ist zu sehen, dass für niedrige Leistungsdichten ein linearer Zusammenhang zwischen Intensität und Leistungsdichte gegeben ist. Allerdings ist für hohe Leistungsdichten zu erkennen, dass der lineare Zusammenhang verloren geht, und somit eine Sättigung des resonanten Zwischenzustands vorhanden ist. In diesem Fall ist die Absorptionsrate der Photonen gleich der induzierten Fluoreszenzrate im bestrahlten Teilchenensemble. Durch diesen Umstand kann die Ionenmenge nur noch maximal linear mit der Leistungsdichte steigen.

Einfluss der Leistungsdichte

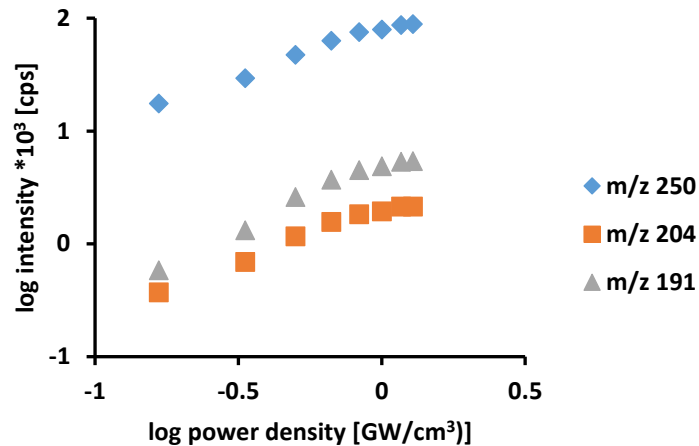


Abbildung 68: Absolute EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Leistungsdichte des Laserstrahls. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei fokussiertem Laserstrahl. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicroTOF.

In Analogie zur Ionenausbeute verhält sich der Fragmentierungsgrad des Analyten (**Abbildung 69**). So kann für niedrige Leistungsdichten ein Anstieg der Fragmentierung zum Fragment m/z 191 mit ansteigender Leistungsdichte beobachtet werden (0.01-0.5 GW/cm^{-3}). Weitere Verstärkung der Leistungsdichte führt anschließend zu keiner erhöhten Fragmentierung. Auffällig hier ist, dass die Sättigung der Ionenausbeute bei einer höheren Leistungsdichte eintritt, als die Sättigung der Fragmentierung. Es ist daher zu vermuten, dass beide Effekte auf unterschiedliche Effekte innerhalb des Systems zurückzuführen sind.

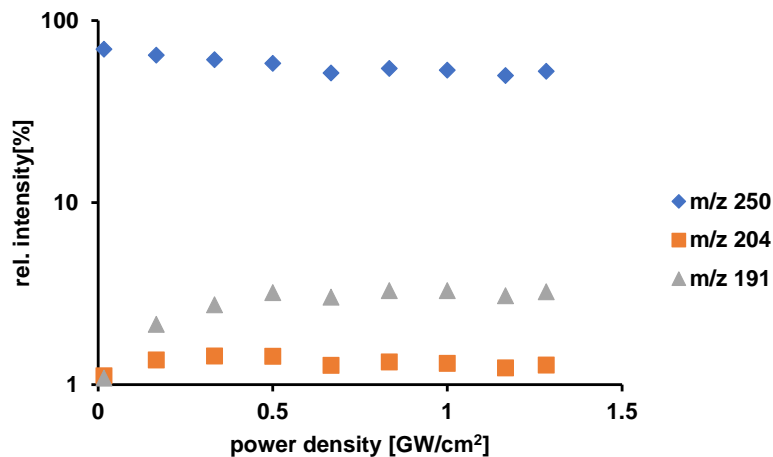


Abbildung 69: Relative EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Leistungsdichte des Laserbeams. Probenzufuhr erfolgte per

Fragmentierung bei MPI

Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei fokussiertem Laserstrahl. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF.

Neben dem KrF* Excimer Lasersystem wurde ebenfalls ein Nd:YAG Laser genutzt, um die Abhängigkeit der Fragmentierung zur Leistungsdichte zu untersuchen. Zwar kann das System nur etwas geringere Pulsenergien liefern, auf Grund der deutlich besseren Strahlenqualität kann allerdings eine höhere Leistungsdichte erzeugt werden. Bei einer Leistungsdichte von 5,3 bis 8,3 GW/cm^2 lässt sich erkennen, dass eine weitere Erhöhung der Leistungsdichte zu keiner weiteren Erhöhung der Fragmentierung führt (**Abbildung 70**).

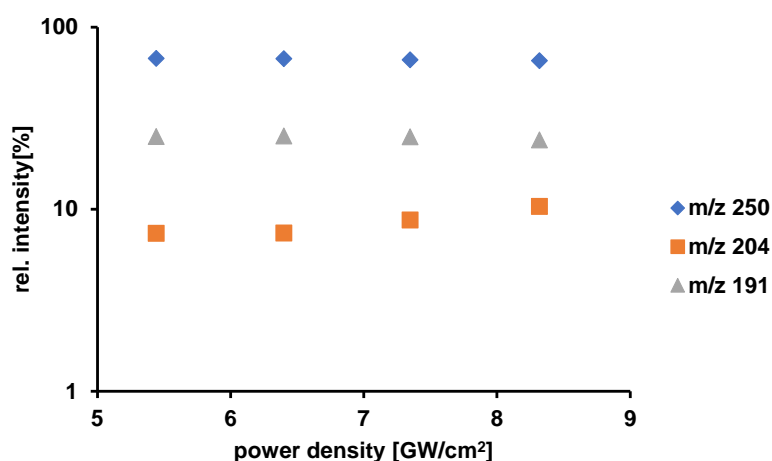


Abbildung 70: Relative EIC von APS (m/z 250) sowie den primären Fragmenten m/z 204 und 191 in Abhängigkeit der Leistungsdichte des Laserbeams. Probenzufuhr erfolgte per Direktinfusion bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Nd:YAG 266 nm bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte mit dem Bruker MicrOTOF

Wie zuvor scheint auch hier die Fragmentierung durch Erhöhung der Leistungsdichte nicht verstärkt zu werden. Wie beschrieben lässt sich daher vermuten, dass einer der Kanäle, welcher zu Fragmentierung der Analyte führt, hier gesättigt ist und somit keine verstärkte Fragmentierung eintritt.

6.1.7 Fragmentierung bei MPI

Neben den Untersuchungen zur Fragmentierung bei Atmosphärendruck wurde ebenfalls untersucht, wie der Analyt sich bei Laserionisation im Niederdruckbereich verhält. Wie zuvor beschrieben war zu erwarten, dass auf Grund der fehlenden Stöße mit dem Hintergrundgas weniger Energie aus dem Analyten abgegeben werden kann und es bei entsprechender Leistungsdichte somit zu einer stärkeren Fragmentierung kommt. Dazu wurden Untersuchungen an einem Sektorfeld-Massenspektrometer mit durchgeführt. Der instrumentelle Aufbau zum Einbringen des Laserstrahls ist im Kapitel Material und Methoden

Fragmentierung bei MPI

zu finden. Um den Analyten in die Gasphase zu bringen, wurde die Probe in der *direct insertion probe* (DIP) erhitzt und verdampft. In **Abbildung 71** sind die erhaltenen Spektren bei unterschiedlichen Leistungsdichten zu sehen.

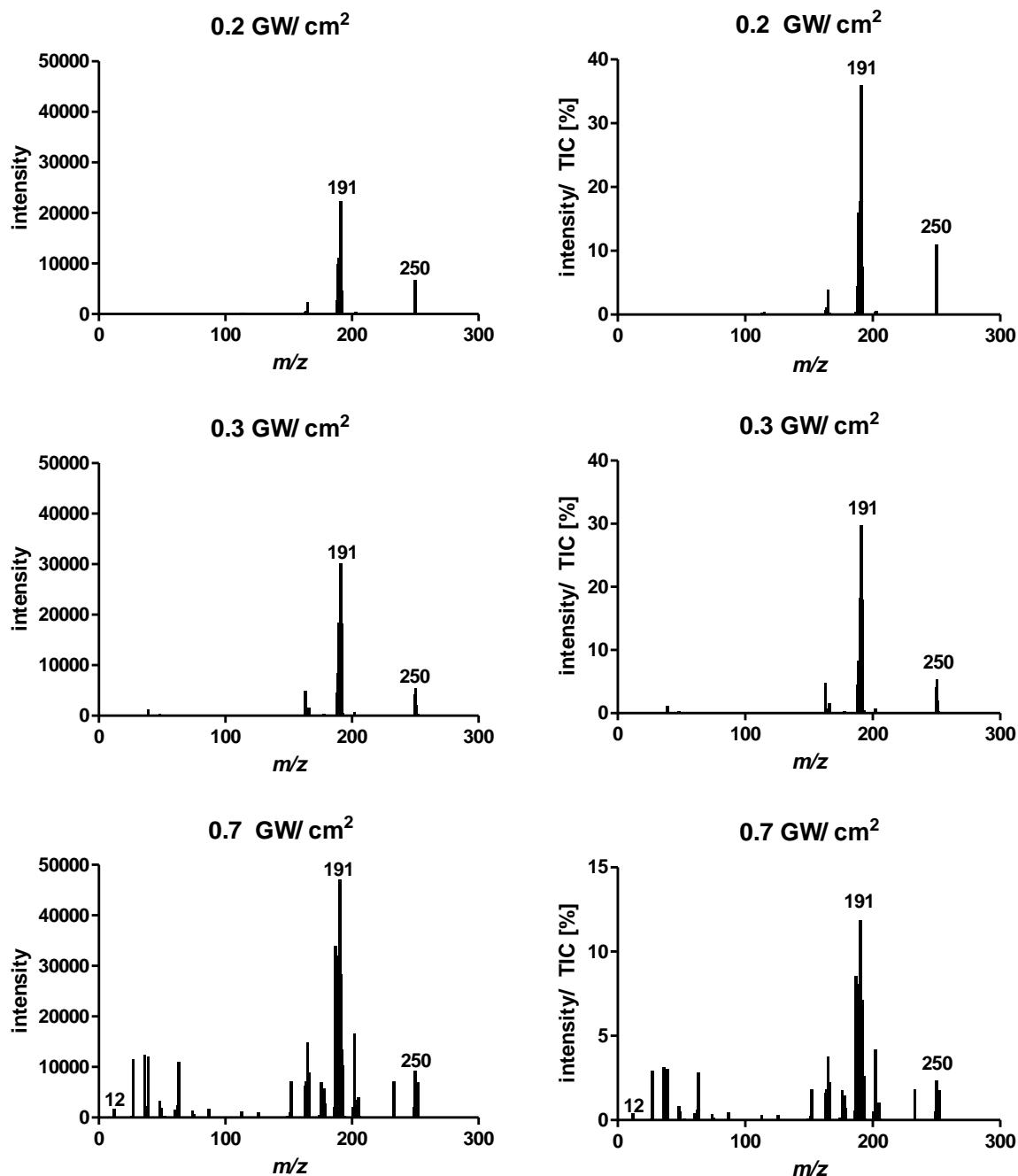


Abbildung 71: Absolute Signalintensitäten (links) und relative Signalintensitäten zum TIC (rechts) in Massenspektren von APS bei unterschiedlichen Laserleistungen. Probenzufuhr erfolgte per DIP bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ einer 1 μM Lösungen in DCM in die MPIS. Ionisation erfolgte per APLI mit einem Atlex KrF* Excimer Laser 246 nm bei fokussiertem Laserbeam. Detektion erfolgte am Sektorfeld-MS.

Klar zu erkennen ist, dass auch bei geringen Leistungsdichten von 0.2 GW/cm^2 bereits das Fragment m/z 191 das im TIC dominierende Signal ist, während das $[\text{APS}^+]$ mit m/z 250

Fragmentierung bei MPI

deutlich schwächer zu sehen ist. Wird die Leistungsdichte auf 0.3 GW/ cm^2 und anschließend auf 0.7 GW/ cm^2 erhöht, sinkt die Signalstärke beider Ionen und neue Signale bei niedrigeren m/z sind zu sehen. Insbesondere bei 0.7 GW/ cm^2 ist ein ausgeprägtes Fragmentspektrum bis zum reinen Kohlenstoff C^+ mit m/z 12 zu sehen. Wie in der Literatur beschrieben, ist es demnach möglich, bei entsprechender Leistungsdichte, eine Fragmentierung des Analyten bis zu seinen Grundbausteinen zu erlangen [141, 144, 147]. Weiterhin erkennt man die große Stabilität des intakten aromatischen Systems (m/z 191).

6.2 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Derivate entwickelt, um über eine Derivatisierung die Analyse von Oxylipinen per APLI möglich zu machen. Dabei können zum einen universelle Marker wie das APS genutzt werden, um alle Carbonsäuren zu derivatisieren und per APLI während der Analyse zu ionisieren. Außerdem können einzelne funktionelle Gruppen als Anker für Derivatisierungen genutzt werden, um spezifische Gruppen von Analyten zu analysieren. So können einfache Hydroxide über das APOL oder vicinale Diole über die Anthracen-9-ylboronsäure der APLI zugänglich gemacht werden. Die Matrixbestandteile in biologischen Proben wie Plasma oder Gewebeproben beinhalten kaum Analyten, welche ohne Derivatisierung der APLI zugänglich sind. Über gezielte Derivatisierung der Oxylipine wird es ermöglicht, ein erhöhtes Grundrauschen und die Ionenunterdrückung durch Matrixbestandteile zu umgehen. Für eine direkte Analyse von Resolvin D1, welches ein größeres konjugiertes Doppelbindungssystem besitzt, reicht die Absorption allerdings nicht aus um es der APLI zugänglich zu machen.

Es wurden fundamentale Untersuchungen zu der Fragmentierung in der APLI gemacht. Die APLI zählt zu den sanften Ionisationsmethoden, bei der auch bei hohen Leistungsdichten von mehreren GW/cm^2 nur geringe Fragmentierung zu beobachten ist. Im direkten Kontrast dazu ist es bei REMPI im Niederdruck möglich, die Analyten bei diesen Leistungsdichten bis zu ihren atomaren Bestandteilen zu zerlegen. Als Grund für die geringe Fragmentierung wurde die Stoßdeaktivierung hoch angeregter ionischer Zustände vermutet. Erste *ab initio*-Berechnungen lassen vermuten, dass bei hohen Leistungsdichten die zur Fragmentierungsrate führende Dissoziationskonstante bei der Aufnahme von mehr als vier Photonen und Einbringen dieser Energie in die entsprechende Bindung, über die Größenordnung der Stoßrate hinaus geht. Somit ist es in der Theorie möglich, dass eine stärkere Fragmentierung stattfindet als vermutet. Um diese Theorie sicher zu stützen, sind allerdings weitere und genauere Berechnungen von Nöten, um Dissoziationskonstanten und Deaktivierungsraten genauer zu erfassen. Das fehlende Auftreten der kleineren Fragmente könnte wiederum durch stoßinduzierte Ladungsübertragung mit dem Hintergrundgas begründet sein. Um dies genauer zu untersuchen, wurde im ersten Schritt das genutzte Analysensystem genauer charakterisiert und gezeigt, dass der Transfer in der Ionenoptik einen wichtigen Einfluss auf die Fragmentierung der Ionen hat und möglichst „sanft“ gehalten werden muss, um die Fragmentierung während der APLI von den Transportphänomenen zu unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass auch in der APLI die Stärke der Fragmentierung von der Leistungsdichte abhängig ist. Allerdings ist das Ausmaß im Gegensatz zu der REMPI bei Niederdruck begrenzt. So konnte gezeigt werden, dass die

Fazit und Ausblick

Fragmentierung für APS bei APLI ab einer Leistungsdichte von etwa 0.5 GW/cm^2 eine Sättigung erreicht und bei geringer Fragmentierung diese auch bei höheren Leistungsdichten nicht weiter ansteigt. Im Gegensatz dazu war der Analyt bei REMPI im Niederdruck bei gleichen Leistungsdichten bis hin zum C^+ zu fragmentieren. Die Ausbeute des $[\text{APS}^+]$ nähert sich in der APLI bei hohen Leistungsdichten einem Grenzwert, was für eine Sättigung der beteiligten Zwischenzustände spricht. Da es anschließend kein Anstieg der Fragmente zu erkennen gibt, ist ein Quenching der höher angeregten Zustände durch Stöße möglich. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass ein kritischer Zerfallskanal auf der Leiter so schnell wird, dass das Höherpumpen in andere Zustände nicht mehr gelingt. Zwar konnte die Abwesenheit der kleineren Fragmente nicht sicher gezeigt werden, allerdings wäre bei verstärkter Fragmentierung ein Zusammenbrechen des $[\text{APS}^+]$ -Signals zu erwarten, wie es im stoßfreien Raum auch der Fall ist. So können theoretisch bei entsprechender Energieaufnahme die Dissoziationsraten die Stoßraten übertreffen. Bei der Größe der Analyten scheint die Wahrscheinlichkeit, entsprechend viel Energie in eine Bindung einzubringen, aber gering zu sein. So kann auch bei der Absorption mehrerer Photonen die Energie in unterschiedliche Rotations- und Schwingungszustände verteilt werden, wodurch es nicht unmittelbar zum Bruch der Bindungen kommt und die aufgenommene Energie über Stöße abgegeben werden kann. Daher bleibt eine verstärkte aber nicht sichtbare Fragmentierung bei der APLI unwahrscheinlich.

6.3 Experimente

6.3.1 Synthesen und Derivatisierungen

6.3.1.1 3-Anthracen-9-yl-propansäure (APS)

In einem 1 L Dreihalskolben bestückt mit einem Magnetrührer, Rückflusskühler und Tropftrichter wurden 2,51 g Kalium in 140 mL trockenem *tert*-Butanol unter Argon-Atmosphäre gelöst, sodass eine klare Flüssigkeit entstand. 10,11 g Anthron wurden hinzugegeben, woraufhin sich die Lösung braun verfärbte. Nach dem Lösen des Anthrons wurden 3,65 mL Acrylnitril gelöst in 20 mL trockenem *tert*-Butanol tropfenweise zu der Lösung gegeben. Aus der roten Lösung fiel ein dunkler Niederschlag aus. Die Suspension wurde für 2 h unter Rückfluss bis zum Siedepunkt erhitzt. Anschließend wurden 5,5 mL konzentrierte Salzsäure gelöst in 110 mL Wasser unter Raumentwicklung und gelber Verfärbung tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde die Synthese über Nacht unterbrochen. Etwa 150 mL der Lösung wurden am folgenden Tag abdestilliert, worauf sich ein braunes Öl als Rückstand bildete. Anschließend wurden 50 mL Wasser zugegeben. Etwa 150 ml wässrige Phase wurde abdekantiert, das braune Öl mit 50 mL konzentrierter Salzsäure versetzt und 2 h unter Rückfluss bis zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur entstand ein brauner Feststoff. Die Synthese wurde für eine weitere Nacht unterbrochen. 180 mL einer 25% wässrigen Ammoniaklösung, 125 mL Wasser, 29,84 g Zinkstaub und 1,13 g einer 3 M Kupfersulfatlösung wurden am nächsten Tag zugegeben. Die Suspension wurde 5 h lang unter Reflux erhitzt. Die zu Beginn mehrphasige und mehrfarbige (braun/gelb/weiß/blau) Lösung färbte sich über diese Zeit von braun über rot zu gelb. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und einmal mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Lösung mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Ein gelbes Öl, welches sich über Nacht verfestigte, schied sich ab. Der Feststoff wurde abfiltriert und in Eisessig umkristallisiert. Die blassen, gelben Kristalle wurden mit 5 mL Methanol gewaschen und im Vakuum bei 60 °C über sieben Tage getrocknet. So wurden 2,05 g der 3-Anthracen-9-yl-propansäure (APS) als gelbes Pulver gewonnen. Die Charakterisierung des Syntheseproduktes erfolgte per HRMS und NMR.

¹H NMR 400 MHz, CDCl₃ δ = 8,41 (s, 1H, Ar-H), 8,32 (d, 2H, Ar-H), 8,05 (d, 2H, Ar-H), 7,45-7,65 (m, 4H, Ar-H), 4,10-3,95 (m 2H)

Schmelzpunkt: 195-197 °C

Zur Optimierung der Derivatisierungszeit wurde Hexansäure mit APOL derivatisiert und analysiert. Dazu wurden 4.22 nmol Hexansäure, 1.26 nmol APOL, 3.20 nmol DCC und

1.55 nmol DMAP in 0.45 mL DCM bei 37 °C inkubiert. Die Derivatisierungszeit wurde mit 10, 20, 30, 40, 60 Minuten angepasst. Anschließend erfolgte die Trennung per LC-UV und das Auswerten der relativen Konzentration über die Peakfläche.

6.3.1.2 3-Anthracen-9-yl-propan-1-ol (APOL)

500 mg APS wurden in einem mit Argon gespülten Dreihalskolben gegeben und 10 mL getrocknetes THF zugetropft. Nach Lösen des APS wurden 82.5 mg LiAlH_4 in 2 mL THF zugegeben und kontrolliert abreagiert. Nach Zugabe von 2,5 ml Wasser wurde die Lösung dreimal mit je 17,5 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit NaCl gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Nach filtrieren wurde das Lösemittel einrotiert und ein harzartiger weißer Rückstand bildete sich. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (40 g Kieselgel, EA/Hexan 1:2, Rf 4.6). Der Rückstand bildete ein braunes Öl, welches sich beim Erkalten zu 26,7 mg Feststoff verfestigte. Die Charakterisierung des Syntheseproduktes erfolgte per HRMS und NMR.

6.3.1.3 Anthracen-9-ol

In einem 1 L Dreihalskolben im Eisbad wurden 500 mg Anthron in 12,0 mL trockenes THF unter Reflux gelöst. Anschließend 0,1 g LiAlH_4 in 3 ml trockenes THF hinzugegeben und für 24 h gerührt. Anschließend wurden 15 mL 10 % HCl in H_2O hinzugegeben und je dreimal ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit NaCO_3 gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Es bildeten sich weiße Kristalle. Die Charakterisierung des Syntheseproduktes erfolgte per HRMS.

6.3.1.4 Anthracen-9-yl-thiol (AT)

In einem 150 mL Rundkolben wurden 5,50 g P_2S_5 in 50 mL, mit Natriumsulfat getrocknetem Pyridin, unter Stickstoffatmosphäre und magnetischem Rühren gelöst und anschließend 2 h bei 80 °C unter Rückfluss und magnetischem Rühren erhitzt. Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen und die sich gebildeten gelblichen Kristalle wurden abfiltriert und mit getrocknetem Methanol gewaschen. Nach Trocknen im Exsikkator wurden auf diese Weise 6,24 g (66 %) des gelblichen PTP als Feststoff erhalten. (Schmelzpunkt: 166-170 °C)

In einem 100 mL Rundkolben wurden 3,5 g PTP in 20 ml, mit Natriumsulfat getrocknetem, Acetonitril, unter Stickstoffatmosphäre und magnetischem Rühren, gelöst. Im Anschluss wurden 1,77 g Anthron der Lösung hinzugegeben und ebenfalls gelöst. Die Lösung wurde anschließend unter Rückfluss für 2 h, unter magnetischem Rühren, bis zum Sieden erhitzt.

Anthracen-9-yl-boronsäure

Während dieses Zeitraums fiel ein weißer Feststoff aus. Anschließend wurden etwa 10 mL Acetonitril aus der Suspension abrotiert. Daraufhin wurden 20 mL VE-Wasser hinzugegeben, woraufhin weiterer gelber Feststoff ausfiel. Der Feststoff wurde abfiltriert und in einen Rundkolben mit 40 mL VE-Wasser gegeben. Nach 15 Minuten unter magnetischem Rühren wurde der Feststoff abfiltriert und mit etwas Methanol gewaschen. Nach dem Trocknen im evakuierten Exsikkator wurden auf diese Weise 0,5 g (27%) AT als gelber Feststoff erhalten. Die Charakterisierung des Syntheseproduktes erfolgte per NMR.

¹H NMR 400 MHz, CDCl₃ δ= 8,70 (s, 1H, Ar-H), 8,40 (d, 2H, Ar-H), 8,05 (d, 2H, Ar-H), 7,45-7,65 (m, 4H, Ar-H), 2,0 (s 1 H)

Schmelzpunkt 93-95 °C

Für die Derivatisierung wurden 500 µL einer 10 mM Anthracen-9-yl-thiol Lösung in DCM mit 500 µL einer 40 mM EpETE-Isomerengemisch in DCM in einem Braunglasvial vermischt und anschließend für 1 h bei 100 °C im Heizblock belassen. Das erhaltene Gemisch wurde anschließend für die Direktinfusion genutzt.

6.3.1.5 Anthracen-9-yl-boronsäure

Die Derivatisierung von Diolen erfolgte mit kommerziell erhältlicher Anthraceneboronsäure. 13.19 mg Anthracen-9-yl-boronsäure wurden in 10 mL Ethylacetat gelöst (5.9 mM) und anschließend ein Aliquot von 1 ml weiter mit 9 ml EA verdünnt (0.59 mM). 200 µL einer 500 nM EpETrE-Isomerengemisch wurden unter einem Stickstoffstrom eingedampft und anschließend in 800 µL der Anthracenboronsäure-Lösung aufgenommen. Nach 5 Minuten an Raumtemperatur erfolgte die direkte Infusion in die MPIS mit anschließender Ionisierung per APLI und Detektion am MikroTOF

6.3.2 Fragmentierung bei APLI

Die Untersuchungen zur Fragmentierung bei der APLI fanden am Bruker MicroTOF statt. Dieses wurde ausgestattet mit der *multi purpose ionization source*, welches die Ionisation per APLI ermöglicht. Die Probe wird dabei über eine Spritzenpumpe (30 µL/min) oder Flüssigchromatographen (Beckman Coulter HPLC, 300 µL/min) zugegeben und über einen Nebulizer zerstäubt. Zur Ionisation wurden entweder ein KrF*-Excimerlaser (248 nm) oder blitzlichtgepumpter vierfachverdoppelter Nd:YAG Laser (266 nm) verwendet.

Für die Untersuchungen des Ionentransfers wurde eine 10 µM Lösung von APS in DCM verwendet und am MicroTOF untersucht. Dafür wurde die Lösung per Direktinfusion in die MPIS gegeben (30 µL/min). Die Ionisation erfolgte mit dem KrF* Excimerlaser ohne

Fragmentierung bei MPI

Fokussierung des Laserstrahls. Zur Untersuchung des Einflusses der Potentiale in der ersten Druckstufe wurden die Spannungsdifferenz zwischen *capillary exit* und *skimmer 1* von 65 V bis 265 V in 20 V Schritten erhöht. Für die zweite Druckstufe wurde das Potential des *skimmer 1* zu *hexapole 1* von 12 V bis 77 V in 5 V Schritten erhöht und ebenfalls die Vorstufe entsprechend mit angepasst. Für die dritte Druckstufe wurde das Potential zwischen *skimmer 2* und *hexapole 2* zwischen 4.4 V und 49.4 V in 5 V Schritten untersucht und ebenfalls die Vorstufen jeweils mit angepasst.

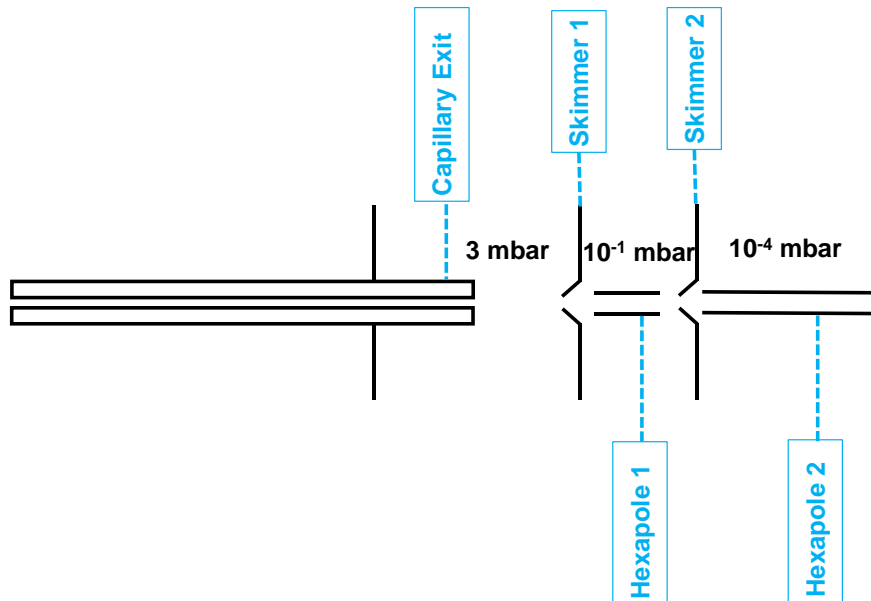


Abbildung 72: Skizze des Ionenstrahltransfers im Bruker MicrOTOF.

Die Untersuchungen der Linseposition erfolgte ebenfalls am MicrOTOF mit einer 1 μM Lösung APS in DCM welche per Direktinfusion (30 $\mu\text{L}/\text{min}$) in die MPIS gegeben wurde. Der Laserstrahl beider Lasersysteme wurde mit einer Quarzglaslinse mit 10 cm Brennweite in die MPIS fokussiert. Die Position der Linse und somit des Brennpunktes wurde dabei über eine optische Bank variiert.

Zur Untersuchung der Leistungsdichte wurde der Brennpunkt der Linse auf 4 cm Entfernung zum MS-Einlass eingestellt. APS wurde unten gleichen Bedingungen wie oben beschrieben in die MPIS gegeben und die Laserleistung des KrF* Excimer- und Nd:YAG Lasers variiert.

6.3.3 Fragmentierung bei MPI

Für die Untersuchung der Fragmentierung der MPI am Sektorfeld-MS wurde ein Quelleneinlass für den Laser entworfen. Analog zur MPIS sollte die Einführung des Lasers orthogonal zum Ionenstrahl erfolgen, um die Ionisation auf den vorderen Transferbereich zu beschränken und somit die Versuchsbedingungen zur APLI vergleichbar zu halten. Dazu

ab initio-Berechnungen

wurde ein Flansch mit Quarzglasfenster konstruiert und auf die linke Quellenseite geschraubt, auf der sonst der GC-Einlass sitzt. Für eine sichere Einführung des Laserstrahls in die Quelle wurde die Abdeckung um ein Rohr bis zum Laser erweitert, in dem auf unterschiedlichen Distanzen zur Quelle die Quarzglaslinse positioniert werden konnte. In der Quelle wurde die Einspannung für die GC-Säule entfernt um die Öffnung für den Laser zu vergrößern. Zum Beschleunigen und Fokussieren der Ionen in das Sektorfeld wurden die üblichen EI-Quellen Potentiale verwendet, allerdings für die APLI-Experimente die Filamente nicht eingeschaltet.

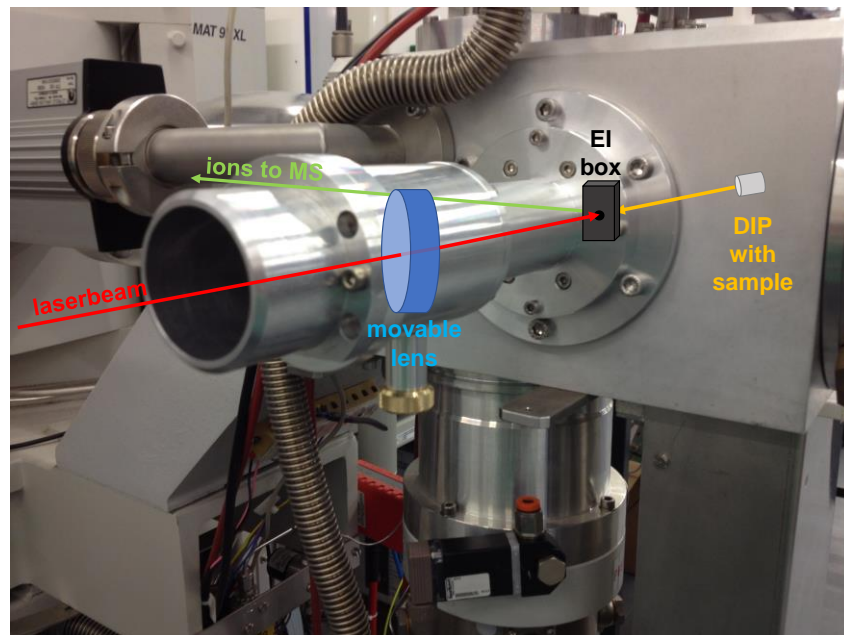


Abbildung 73: Systemumbau des Sektorfeld-MS zur Einführung des Laserstrahls zur MPI Versuche, den Analyten als Flüssigkeit in den Referenzgas-Einlass zuzugeben und dort zu verdampfen, stellten sich als nicht erfolgreich heraus. Daher wurde einige Kristalle des APS per *direct insertion probe* direkt in die Quelle gegeben und mit Hilfe dieser verdampft. Erste Versuche mit EI bei veränderter Verdampfungstemperatur zeigte eine vollständige Verdampfung des Analyten bei etwa 160 °C.

6.3.4 *ab initio*-Berechnungen

Die Durchführung der ab initio Berechnungen erfolgen mit dem Programmpaket Gaussian 09 [213]. Die Berechnung der optimierten Geometrien erfolgte per Dichtefunktionaltheorie (*density functional theory*, DFT). Dafür wurden ω B97XD/def2-TZVPP als Funktional und Basissatz genutzt [214, 215]. Die so berechneten Geometrien wurden genutzt, um die ersten 20 angeregten Zustände für diese Moleküle/Ionen per zeitabhängigem Dichtefunktional (TD-DFT) unter Nutzung des gleichen Funktionals/Basissatzes zu berechnen. Die Berechnung der

Potentialkurven und die vertikale Anregungsenergie für die untersuchte C-C Bindung welche zu dem Fragment m/z 191 führt, erfolgte per *relaxed energy surface scan* für [APS⁺].

6.4 Geräte und Materialien

6.4.1 NMR

Bruker Advance III 600 (Basisfrequenz (¹H): 600,13 MHz) 5 mm Breitband-Invers-Messkopf mit automatischer Frequenzabstimmung, Bruker BioSpin GmbH Silberstreifen 4, 76287 Rheinstetten, Deutschland

Bruker Advance III 600 (Basisfrequenz (¹H): 400,13 MHz) mit 5 mm Breitband-BBFO-Messkopf mit automatischer Frequenzabstimmung Bruker BioSpin GmbH Silberstreifen 4, 76287 Rheinstetten, Deutschland

6.4.2 Massenspektrometer

Finnigan Sektorfeld-MS MAT 95 XP mit *direct insertion probe* (DIA) und hauseigener Lasereinlass für MPI, Thermo Finnigan MAT GmbH, Barkhausenstr. 2, 28197 Bremen, Deutschland

Parameter: Vorvacuum Source: $\sim 1.7 \cdot 10^{-2}$ mbar, Analyzer $\sim 3.5 \cdot 10^{-2}$ mbar, Inlet $7.2 \cdot 10^{-2}$ mbar; Source: $\sim 1.0 \cdot 10^{-6}$ mbar. Magnet: *field controlled, small mass range* (250.0 amu); Polarität: Positiv; ESA 763.8000 Volt; Source 4779.0 V (EI) / 0 V (MPI); Scan Type: magnetic; Scan Function: Exponential; Range: 185.0-255.0 Da; Scan Rate: 71.75 s/d; Interscan Time 0.20 s; Scan duration: 10.000 s; Link Mass 250.0 amu; Resolution 400; Scan Cycle Time 20.200 s; sample frequency 0.103 kHz

Bruker MicroTOF, orthogonal beschleunigendes Flugzeitmassenspektrometer mit Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland

Parameter: Vacuum: $\sim 1.25 \cdot 10^{-6}$ mbar; Flight Tube: 8608 V; Decelerator: 1694 V; Reflector 1694 V; TOF 2000 V

6.4.3 Lasersysteme

ATL Atlex 300 KrF* Excimer Laser ($\lambda = 248$ nm), Laserenergie 0.1-8.5 mJ, Pulslänge 2-5 ns, Frequenz: 100 Hz, ATL Lasertechnik GmbH, Burger Str. 28, 42929 Wermelskirchen, Deutschland

Lasersysteme

Spectron Blitzlicht-gepumpter vierfach verdoppelter Nd:YAG Laser ($\lambda = 266 \text{ nm}$), Laserenergie 1-2.5 mJ, Pulsbreite 5 ns, GSI Group Inc, Swift Valley, Rugby, CV21 1QN England.

6.4.4 Flüssigchromatographen

Waters Alliance System Waters 2695 *Separation Modul*, Waters 2487 *Dual λ Absorbance Detector*. Waters GmbH, Helfmann-Park 10, 65760 Eschborn, Deutschland.

Beckmann Coulter System Gold 125 Solvent Module, System Gold 168 UV-VIS Detector, Datenauswertung: 32-Karat Software, Beckman Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B 13, 47807 Krefeld, Deutschland

6 Chemikalien

Für die an der Bergischen Universität Wuppertal durchgeführten Arbeiten wurden die folgenden kommerziell erworbenen Chemikalien verwendet. Abweichend davon sind die Experimente die außerhalb der Universität liefen, wie die Zellkultur und die Messungen am IM-QTOF-MS.

Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erworbenen Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Chloroform Dichlormethan Essigsäure Ethylacetat Hexan Isopropanol Methanol
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	1-chloror-2,4-dinitrobenzene 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid 1-Hydroxybenzotriazol 2,4-Dinitroannilin ² H ₅ -Pyridin Acrylnitril Anthracenenboronsäure Butanol Dicyclohexylcarbodiimid Dimethylaminopyridin Dimethylformamid Ethylacetat Fluorene Humanes Blutplasma Humanes Blutserum Kieselgel 60 Natriumsulfat Phenylhexansäure Phosphopentasulfid Pyridin Seesand Tetrahydrofuran
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Ammoniumacetat Butanol di-Natriumhydrogenphosphat Hexansäure Iod Kaliumtertbutanolat

Chemikalien

	Kupfersulfat Natriumcarbonat Zink (Staub)
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Ammoniak Glycerin Kaliumhydroxid Salzsäure Toluol
Fluka (Honeywell Inc) Morris Plains, United States	Ammoniumfluoride Azure A
VWR International GmbH, Hannover, Deutschland	Acetonitril Diethylether
Acros Organics (Thermo Fisher Scientific Inc) Oberhausen, Deutschland	4-[(N-Boc)-aminomethyl]anniline Antraquinone Kalium Lithiumaluminiumhydroxid Pyridin-d5 Zink (Granulat)
abcr GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Anthraceneboronsäure
Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, United States	² H ₅ -Chloroform
Chemsolute (Th. Geyer GmbH & Co. KG) Renningen, Deutschland	Ethanol
Alfar Aesar (Thermo Fisher (Kandel) GmbH) Kandel, Deutschland	Anthron
Cayman Chemical, Ann Arbor, United States	Resolvin D1 und andere Oxylipin-Standards
BioIVT (Seralab), Huissen, Niederlande	Humanes Blutserum

7 Software

Analyst control Software 1.6.2 (SCIEX, Darmstadt; Deutschland).

Gaussian 09, Revision C.01 (Gaussian Inc., Wallingford, United States) [213].

GaussView 6.0.16 (Gaussian Inc., Wallingford, United States) [113].

GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, United States)

Laser Control Version 3.13 (ATL Lasertechnik, Wermelskirchen, Deutschland)

MassLynx (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)

Microsoft **Excel** 2016; Microsoft **Word** 2016; Microsoft **PowerPoint** 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, United States)

MAT95InstCtrl Application 2.0 SP4 (Thermo Electron Corporation, Waltham, United States)

MicrOTOF control Version 1.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland)

Multiquant 2.1.1 (SCIEX, Darmstadt; Deutschland).

IM-MS Browser B.08.00, MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies, Santa Clara, United States).

Agilent **Mass Profiler Professional** version 8.1.153.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, United States).

Python (Python Software Foundation, <https://www.python.org>).

Skyline-daily (64-bit) 4.1.1.18179 (MacCross Lab Software, University of Washington, Seattle, Washington) [101–103].

8 Literatur

1. Buczynski MW, Dumlao DS, Dennis EA (2009) Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res* 50(6):1015–1038
2. Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294(5548):1871–1875
3. Mosblech A, Feussner I, Heilmann I (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem* 47(6):511–517
4. Barquissau V, Ghandour RA, Ailhaud G, Klingenspor M, Langin D, Amri E-Z, Pisani DF (2017) Control of adipogenesis by oxylipins, GPCRs and PPARs. *Biochimie* 136:3–11
5. Gladine C, Ostermann AI, Newman JW, Schebb NH (2019) MS-based targeted metabolomics of eicosanoids and other oxylipins: Analytical and inter-individual variabilities. *Free Radic Biol Med*
6. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145–182
7. O'Donnell VB, Murphy RC (2017) Directing eicosanoid esterification into phospholipids. *J Lipid Res* 58(5):837–839
8. Bosviel R, Joumard-Cubizolles L, Chinetti-Gbaguidi G, Bayle D, Copin C, Hennuyer N, Duplan I, Staels B, Zanoni G, Porta A, Balas L, Galano J-M, Oger C, Mazur A, Durand T, Gladine C (2017) DHA-derived oxylipins, neuroprostanes and protectins, differentially and dose-dependently modulate the inflammatory response in human macrophages: Putative mechanisms through PPAR activation. *Free Radic Biol Med* 103:146–154
9. Meves H (2008) Arachidonic acid and ion channels: an update. *Brit J Pharmacol* 155(1):4–16
10. Brooks JD, Musiek ES, Koestner TR, Stankowski JN, Howard JR, Brunoldi EM, Porta A, Zanoni G, Vidari G, Morrow JD, Milne GL, McLaughlin B (2011) The fatty acid oxidation product 15-A3t-isoprostane is a potent inhibitor of NFκB transcription and macrophage transformation. *J Neurochem* 119(3):604–616
11. Plourde M, Cunnane SC (2007) Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab* 32(4):619–634
12. Dyerberg J, Bang HO (1978) Dietary fat and thrombosis. *Lancet* 1(8056):152
13. Mozaffarian D, Wu JHY (2011) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol* 58(20):2047–2067
14. Calder PC (2015) Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 1851(4):469–484
15. Weylandt KH, Serini S, Chen YQ, Su H-M, Lim K, Cittadini A, Calviello G (2015) Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: The Way Forward in Times of Mixed Evidence. *Biomed Res Int* 2015:143109
16. Vecchio AJ, Simmons DM, Malkowski MG (2010) Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 285(29):22152–22163

Literatur

17. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, Yuan C, Warnock M, Schmaier AH, Yokoyama C, Smyth EM, Wilson SJ, FitzGerald GA, Garavito RM, Sui DX, Regan JW, Smith WL (2007) Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem* 282(31):22254–22266
18. Gabbs M, Leng S, Devassy JG, Monirujjaman M, Aukema HM (2015) Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. *Adv Nutr* 6(5):513–540
19. Yang P, Jiang Y, Fischer SM (2014) Prostaglandin E3 metabolism and cancer. *Cancer Lett* 348(1):1–11
20. Smith WL (2005) Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr Opin Cell Biol* 17(2):174–182
21. Yang P, Chan D, Felix E, Cartwright C, Menter DG, Madden T, Klein RD, Fischer SM, Newman RA (2004) Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E(3) from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells. *J Lipid Res* 45(6):1030–1039
22. Samuelsson B (1979) Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes: formation and biological roles. *Harvey Lect* 75:1–40
23. Archambault A-S, Turcotte C, Martin C, Provost V, Larose M-C, Laprise C, Chakir J, Bissonnette É, Laviolette M, Bossé Y, Flamand N (2018) Comparison of eight 15-lipoxygenase (LO) inhibitors on the biosynthesis of 15-LO metabolites by human neutrophils and eosinophils. *PLoS ONE* 13(8):e0202424
24. Henderson WR, Harley JB, Fauci AS (1984) Arachidonic acid metabolism in normal and hypereosinophilic syndrome human eosinophils: generation of leukotrienes B₄, C₄, D₄ and 15-lipoxygenase products. *Immunology* 51(4):679–686
25. Feltenmark S, Gautam N, Brunnström A, Griffiths W, Backman L, Edenius C, Lindbom L, Björkholm M, Claesson H-E (2008) Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *P Natl Acad Sci USA* 105(2):680–685
26. Crooks SW, Stockley RA (1998) Leukotriene B₄. *Int J Biochem Cell B* 30(2):173–178
27. Kim N, Luster AD (2007) Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. *Sci World J* 7:1307–1328
28. Toda A, Yokomizo T, Shimizu T (2002) Leukotriene B₄ receptors. *Prostag Oth Lipid M* 68-69:575–585
29. Goldman DW, Pickett WC, Goetzl EJ (1983) Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B₅ (LTB₅) derived from eicosapentaenoic acid. *Biochem Bioph Res Co* 117(1):282–288
30. Terano T, Salmon JA, Moncada S (1984) Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₅. *Prostagl* 27(2):217–232
31. Kogure R, Toyama K, Hiyamuta S, Kojima I, Takeda S (2011) 5-Hydroxy-eicosapentaenoic acid is an endogenous GPR119 agonist and enhances glucose-dependent insulin secretion. *Biochem Bioph Res Co* 416(1-2):58–63

Literatur

32. Powell WS, Gravel S, Gravelle F (1995) Formation of a 5-oxo metabolite of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and its effects on human neutrophils and eosinophils. *J Lipid Res* 36(12):2590–2598
33. Ternowitz T, Fogh K, Kragballe K (1988) 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) specifically inhibits LTB₄-induced chemotaxis of human neutrophils. *Skin Pharmacol* 1(2):93–99
34. Serhan CN (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510(7503):92–101
35. Tabas I, Glass CK (2013) Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* 339(6116):166–172
36. Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee C-H, Yang R, Petasis NA, Serhan CN (2010) Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *P Natl Acad Sci USA* 107(4):1660–1665
37. Serhan CN (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol* 177(4):1576–1591
38. Serhan CN, Chiang N, van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8(5):349–361
39. Roman RJ, Alonso-Galicia M (1999) P-450 Eicosanoids: A Novel Signaling Pathway Regulating Renal Function. *News Physiol Sci* 14:238–242
40. Bazinet RP, Layé S (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15(12):771–785
41. Ostermann AI (2017) Dissertation: Development of instrumental analytical methods for the investigation of Omega-3 fatty acid induced effects on the fatty acid and oxylipin pattern. Faculty of Mathematics and Natural Sciences; University of Wuppertal
42. Newman JW, Morisseau C, Hammock BD (2005) Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 44(1):1–51
43. Seidegård J, Ekström G (1997) The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Persp* 105 Suppl 4:791–799
44. Moghaddam M (1996) Novel metabolic pathways for linoleic and arachidonic acid metabolism. *BBA-Gen Subjects* 1290(3):327–339
45. Nüsing RM, Schweer H, Fleming I, Zeldin DC, Wegmann M (2007) Epoxyeicosatrienoic acids affect electrolyte transport in renal tubular epithelial cells: dependence on cyclooxygenase and cell polarity. *Am J Physiol-Renal* 293(1):F288-98
46. Spiecker M, Liao JK (2005) Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch Biochem Biophys* 433(2):413–420
47. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL (2004) Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 43(1):55–90
48. Zhao X, Imig JD (2003) Kidney CYP450 enzymes: biological actions beyond drug metabolism. *Curr Drug Metab* 4(1):73–84

Literatur

49. Schmelzer KR, Kubala L, Newman JW, Kim I-H, Eiserich JP, Hammock BD (2005) Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. *P Natl Acad Sci USA* 102(28):9772–9777
50. Goswami SK, Wan D, Yang J, Trindade da Silva CA, Morisseau C, Kodani SD, Yang G-Y, Inceoglu B, Hammock BD (2016) Anti-Ulcer Efficacy of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor TPPU on Diclofenac-Induced Intestinal Ulcers. *J Pharmacol Exp Ther* 357(3):529–536
51. Ostermann AI, Herbers J, Willenberg I, Chen R, Hwang SH, Greite R, Morisseau C, Gueler F, Hammock BD, Schebb NH (2015) Oral treatment of rodents with soluble epoxide hydrolase inhibitor 1-(1-propanoylpiperidin-4-yl)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)urea (TPPU): Resulting drug levels and modulation of oxylipin pattern. *Prostag Oth Lipid M* 121(Pt A):131–137
52. Rose TE, Morisseau C, Liu J-Y, Inceoglu B, Jones PD, Sanborn JR, Hammock BD (2010) 1-Aryl-3-(1-acylpiperidin-4-yl)urea inhibitors of human and murine soluble epoxide hydrolase: structure-activity relationships, pharmacokinetics, and reduction of inflammatory pain. *J Med Chem* 53(19):7067–7075
53. Ulu A, Appt S, Morisseau C, Hwang SH, Jones PD, Rose TE, Dong H, Lango J, Yang J, Tsai HJ, Miyabe C, Fortenbach C, Adams MR, Hammock BD (2012) Pharmacokinetics and in vivo potency of soluble epoxide hydrolase inhibitors in cynomolgus monkeys. *Brit J Pharmacol* 165(5):1401–1412
54. Wan D, Yang J, McReynolds CB, Barnych B, Wagner KM, Morisseau C, Hwang SH, Sun J, Blöcher R, Hammock BD (2019) In vitro and in vivo Metabolism of a Potent Inhibitor of Soluble Epoxide Hydrolase, 1-(1-Propionylpiperidin-4-yl)-3-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)urea. *Front Pharmacol* 10:464
55. Lee KSS, Liu J-Y, Wagner KM, Pakhomova S, Dong H, Morisseau C, Fu SH, Yang J, Wang P, Ulu A, Mate CA, Nguyen LV, Hwang SH, Edin ML, Mara AA, Wulff H, Newcomer ME, Zeldin DC, Hammock BD (2014) Optimized inhibitors of soluble epoxide hydrolase improve in vitro target residence time and in vivo efficacy. *J Med Chem* 57(16):7016–7030
56. Nakama A, Kuroda K, Yamada A (1995) Induction of cytochrome P450-dependent monooxygenase in serum-free cultured Hep G2 cells. *Biochem Pharmacol* 50(9):1407–1412
57. Usami M, Komurasaki T, Hanada A, Kinoshita K, Ohata A (2003) Effect of γ -linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition* 19(2):150–156
58. Schuchardt JP, Ostermann AI, Stork L, Fritsch S, Kohrs H, Greupner T, Hahn A, Schebb NH (2017) Effect of DHA supplementation on oxylipin levels in plasma and immune cell stimulated blood. *Prostag Leukotr Ess* 121:76–87
59. Willenberg I, Ostermann AI, Schebb NH (2015) Targeted metabolomics of the arachidonic acid cascade: current state and challenges of LC-MS analysis of oxylipins. *Anal Bioanal Chem* 407(10):2675–2683

60. Dumlao DS, Buczynski MW, Norris PC, Harkewicz R, Dennis EA (2011) High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acylethanolamines. *Biochim Biophys Acta* 1811(11):724–736
61. Yang J, Schmelzer K, Georgi K, Hammock BD (2009) Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 81(19):8085–8093
62. Strassburg K, Huijbrechts AML, Kortekaas KA, Lindeman JH, Pedersen TL, Dane A, Berger R, Brenkman A, Hankemeier T, van Duynhoven J, Kalkhoven E, Newman JW, Vreeken RJ (2012) Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Anal Bioanal Chem* 404(5):1413–1426
63. Ostermann AI, Willenberg I, Schebb NH (2015) Comparison of sample preparation methods for the quantitative analysis of eicosanoids and other oxylipins in plasma by means of LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 407(5):1403–1414
64. Rund KM, Ostermann AI, Kutzner L, Galano J-M, Oger C, Vigor C, Wecklein S, Seiwert N, Durand T, Schebb NH (2018) Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs. *Anal Chim Acta* 1037:63–74
65. LoBrutto R, Jones A, Kazakevich YV, McNair HM (2001) Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes. *J Chromatogr A* 913(1-2):173–187
66. Ostermann AI, Willenberg I, Weylandt KH, Schebb NH (2015) Development of an Online-SPE–LC–MS/MS Method for 26 Hydroxylated Polyunsaturated Fatty Acids as Rapid Targeted Metabolomics Approach for the LOX, CYP, and Autoxidation Pathways of the Arachidonic Acid Cascade. *Chromatographia* 78(5-6):415–428
67. Murphy RC, Axelsen PH (2011) Mass spectrometric analysis of long-chain lipids. *Mass Spectrom Rev* 30(4):579–599
68. Taylor GI (1964) Disintegration of water drops in an electric field. *P Roy Soc Lond A Mat* 280(1382):383–397
69. Liigand J, Kruve A, Leito I, Girod M, Antoine R (2014) Effect of mobile phase on electrospray ionization efficiency. *J Am Soc Mass Spectr* 25(11):1853–1861
70. Henriksen T, Juhler RK, Svensmark B, Cech NB (2005) The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *J Am Soc Mass Spectr* 16(4):446–455
71. Peri-Okonny UL (2001) Dissertation: Effects of Eluent pH and Different Types of Acidic Modifiers on the Retention and Electrospray Ionization Efficiency of Basic Analytes in LC-ESIMS., South Orange, New Jersey
72. Puppolo M, Varma D, Jansen SA (2014) A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. *Journal of Chromatography B* 964:50–64
73. Thakare R, Chhonker YS, Gautam N, Nelson A, Casaburi R, Criner G, Dransfield MT, Make B, Schmid KK, Rennard SI, Alnouti Y (2018) Simultaneous LC-MS/MS analysis of eicosanoids and related metabolites in human serum, sputum and BALF. *Biomedical Chromatography* 32(3):e4102

Literatur

74. Kingsley PJ, Marnett LJ (2007) LC-MS-MS Analysis of Neutral Eicosanoids. In: Brown HA (ed) *Lipidomics and bioactive lipids. Specialized analytical methods and lipids in disease*, vol. 433, pp 91–112
75. Chhabil Dass (2007) Tandem Mass Spectrometry. In: Dass C (ed) *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J, pp 132–133
76. Kondrat RW, McClusky GA, Cooks RG (1978) Multiple reaction monitoring in mass spectrometry/mass spectrometry for direct analysis of complex mixtures. *Anal Chem* 50(14):2017–2021
77. Newman JW, Watanabe T, Hammock BD (2002) The simultaneous quantification of cytochrome P450 dependent linoleate and arachidonate metabolites in urine by HPLC-MS/MS. *J Lipid Res* 43(9):1563–1578
78. Kanu AB, Dwivedi P, Tam M, Matz L, Hill HH (2008) Ion mobility-mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 43(1):1–22
79. Hinz C, Liggi S, Mocciaro G, Jung SM, Induruwa I, Pereira MCDA, Bryant CE, Meckelmann SW, O'Donnell VB, Farndale RW, Fjeldsted JC, Griffin JL (2019) A comprehensive UHPLC ion mobility QTOF method for profiling and quantification of eicosanoids, other oxylipins and fatty acids. *Anal Chem* 91(13):8025–8035
80. Valentine SJ, Kulchania M, Barnes CAS, Clemmer DE (2001) Multidimensional separations of complex peptide mixtures: a combined high-performance liquid chromatography/ion mobility/time-of-flight mass spectrometry approach. *Int J Mass Spectrom* 212(1-3):97–109
81. Williamson LN, Bartlett MG (2007) Quantitative liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 21(6):567–576
82. Paglia G, Kliman M, Claude E, Geromanos S, Astarita G (2015) Applications of ion-mobility mass spectrometry for lipid analysis. *Anal Bioanal Chem* 407(17):4995–5007
83. Hines KM, May JC, McLean JA, Xu L (2016) Evaluation of Collision Cross Section Calibrants for Structural Analysis of Lipids by Traveling Wave Ion Mobility-Mass Spectrometry. *Anal Chem* 88(14):7329–7336
84. Furey A, Moriarty M, Bane V, Kinsella B, Lehane M (2013) Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta* 115:104–122
85. Twitchett PJ, Moffat AC (1975) High-pressure liquid chromatography of drugs. *J Chromatogr A* 111(1):149–157
86. Tang L, Kebarle P (1993) Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal Chem* 65(24):3654–3668
87. Covington AK, Bates RG, Durst RA (1985) Definition of pH scales, standard reference values, measurement of pH and related terminology (Recommendations 1984). *Pure Appl Chem* 57(3):531–542
88. Rondinini S, Mussini PR, Mussini T (1987) Reference value standards and primary standards for pH measurements in organic solvents and water + organic solvent mixtures of moderate to high permittivities. *Pure Appl Chem* 59(11):1549–1560

89. Pesek JJ, Matyska MT (2015) Ammonium fluoride as a mobile phase additive in aqueous normal phase chromatography. *J Chromatogr A* 1401:69–74
90. Meckelmann SW, Hellhake S, Steuck M, Krohn M, Schebb NH (2017) Comparison of derivatization/ionization techniques for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxylipins. *Prostag Oth Lipid M* 130:8–15
91. Hellhake S, Meckelmann SW, Empl MT, Rentmeister K, Wißdorf W, Steinberg P, Schmitz OJ, Benter T, Schebb NH (2020) Non-targeted and targeted analysis of oxylipins in combination with charge-switch derivatization by ion mobility high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 412(23):5743–5757
92. Zincke T, Weißpfenning G (1913) Über Dinitrophenylisochinoliniumchlorid und dessen Umwandlungsprodukte. *Liebigs Ann Chem* 396(1):103–131
93. Zincke T, Heuser G, Möller W (1904) I. Ueber Dinitrophenylpyridiniumchlorid und dessen Umwandlungsproducte. *Liebigs Ann Chem* 333(2-3):296–345
94. Zincke T (1904) Ueber Dinitrophenylpyridiniumchlorid und dessen Umwandlungsproducte. *Liebigs Ann Chem* 330(2):361–374
95. Yang K, Diltthey BG, Gross RW (2013) Identification and quantitation of fatty acid double bond positional isomers: a shotgun lipidomics approach using charge-switch derivatization. *Anal Chem* 85(20):9742–9750
96. Watson J, Greenough EB, Leet JE, Ford MJ, Drexler DM, Belcastro JV, Herbst JJ, Chatterjee M, Banks M (2009) Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips. *J Biomol Screen* 14(5):566–572
97. Willenberg I, Rund K, Rong S, Shushakova N, Gueler F, Schebb NH (2016) Characterization of changes in plasma and tissue oxylipin levels in LPS and CLP induced murine sepsis. *Inflamm Res* 65(2):133–142
98. Feng Y, Chen B, Yu Q, Li L (2019) Identification of Double Bond Position Isomers in Unsaturated Lipids by m-CPBA Epoxidation and Mass Spectrometry Fragmentation. *Anal Chem* 91(3):1791–1795
99. Brown P, Kossanyi J, Djerassi C (1966) Mass spectrometry in structural and stereochemical problems—CXVIII. *Tetrahedron* 22:241–267
100. Jübermann M (2018) Dissertation: Totalsynthese von 18-HEPE und unnatürlichen Hydroxy-PUFAs. Faculty of Mathematics and Natural Sciences; University of Wuppertal
101. Henderson CM, Shulman NJ, MacLean B, MacCoss MJ, Hoofnagle AN (2018) Skyline Performs as Well as Vendor Software in the Quantitative Analysis of Serum 25-Hydroxy Vitamin D and Vitamin D Binding Globulin. *Clin Chem* 64(2):408–410
102. Pino LK, Searle BC, Bollinger JG, Nunn B, MacLean B, MacCoss MJ (2020) The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics. *Mass Spectrom Rev* 39(3):229–244
103. Schilling B, Rardin MJ, MacLean BX, Zawadzka AM, Frewen BE, Cusack MP, Sorensen DJ, Bereman MS, Jing E, Wu CC, Verdin E, Kahn CR, MacCoss MJ, Gibson BW (2012) Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted

- ion chromatograms in skyline: application to protein acetylation and phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* 11(5):202–214
104. Dyson N (1999) Peak distortion, data sampling errors and the integrator in the measurement of very narrow chromatographic peaks. *J Chromatogr A* 842(1-2):321–340
 105. Giménez-Bastida JA, Shibata T, Uchida K, Schneider C (2017) Roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in the biosynthesis of hemiketals E2 and D2 by activated human leukocytes. *FASEB J* 31(5):1867–1878
 106. Hartung NM, Mainka M, Kampschulte N, Ostermann AI, Schebb NH (2019) A strategy for validating concentrations of oxylipin standards for external calibration. *Prostag Oth Lipid M* 141:22–24
 107. Rousu T, Tolonen A (2012) Comparison of unit resolution SRM and TOF-MS at 12,000 mass resolution for quantitative bioanalysis of 11 steroids from human plasma. *Bioanalysis* 4(5):555–563
 108. Kyle JE, Aly N, Zheng X, Burnum-Johnson KE, Smith RD, Baker ES (2018) Evaluating lipid mediator structural complexity using ion mobility spectrometry combined with mass spectrometry. *Bioanalysis* 10(5):279–289
 109. Kyle JE, Zhang X, Weitz KK, Monroe ME, Ibrahim YM, Moore RJ, Cha J, Sun X, Lovelace ES, Wagoner J, Polyak SJ, Metz TO, Dey SK, Smith RD, Burnum-Johnson KE, Baker ES (2016) Uncovering biologically significant lipid isomers with liquid chromatography, ion mobility spectrometry and mass spectrometry. *Analyst* 141(5):1649–1659
 110. Zhang F, Guo S, Zhang M, Zhang Z, Guo Y (2015) Characterizing ion mobility and collision cross section of fatty acids using electrospray ion mobility mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 50(7):906–913
 111. Di Giovanni JP, Barkley RM, Jones DNM, Hankin JA, Murphy RC (2018) Tandem Mass Spectrometry and Ion Mobility Reveals Structural Insight into Eicosanoid Product Ion Formation. *J Am Soc Mass Spectr* 29(6):1231–1241
 112. Shvartsburg AA, Hudgins RR, Dugourd P, Jarrold MF (1997) Structural Elucidation of Fullerene Dimers by High-Resolution Ion Mobility Measurements and Trajectory Calculation Simulations. *J Phys Chem A* 101(9):1684–1688
 113. Dennington R, Keith TA, Millam JM GaussView, . Semichem Inc., Shawnee Mission, KS
 114. Bowman AP, Abzalimov RR, Shvartsburg AA (2017) Broad Separation of Isomeric Lipids by High-Resolution Differential Ion Mobility Spectrometry with Tandem Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectr* 28(8):1552–1561
 115. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta J-P, Rousset P, Chêne G, Guigné C, Tercé F, Vanner S, Vergnolle N, Bertrand-Michel J, Dubourdeau M, Cenac N (2013) LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 932:123–133
 116. Kutzner L, Rund KM, Ostermann AI, Hartung NM, Galano J-M, Balas L, Durand T, Balzer MS, David S, Schebb NH (2019) Development of an Optimized LC-MS Method

- for the Detection of Specialized Pro-Resolving Mediators in Biological Samples. *Front Pharmacol* 10
117. Quehenberger O, Dahlberg-Wright S, Jiang J, Armando AM, Dennis EA (2018) Quantitative determination of esterified eicosanoids and related oxygenated metabolites after base hydrolysis. *J Lipid Res* 59(12):2436–2445
118. Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC (2010) Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217(25):3929–3937
119. Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH (2010) Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* 24(21):3103–3108
120. Poad BLJ, Marshall DL, Harazim E, Gupta R, Narreddula VR, Young RSE, Duchoslav E, Campbell JL, Broadbent JA, Cvačka J, Mitchell TW, Blanksby SJ (2019) Combining Charge-Switch Derivatization with Ozone-Induced Dissociation for Fatty Acid Analysis. *J Am Soc Mass Spectr* 30(10):2135–2143
121. Aggarwal K, Choe LH, Lee KH (2006) Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic* 5(2):112–120
122. Cong Y-S, Fan E, Wang E (2006) Simultaneous proteomic profiling of four different growth states of human fibroblasts, using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry. *Mech Ageing Dev* 127(4):332–343
123. Hardt M, Witkowska HE, Webb S, Thomas LR, Dixon SE, Hall SC, Fisher SJ (2005) Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva: quantitative analysis of native peptides using iTRAQ reagents. *Anal Chem* 77(15):4947–4954
124. Lamos SM, Shortreed MR, Frey BL, Belshaw PJ, Smith LM (2007) Relative quantification of carboxylic acid metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry using isotopic variants of cholamine. *Anal Chem* 79(14):5143–5149
125. Clark A, Ledingham KWD, Marshall A, Sander J, Singhal RP (1993) Attomole detection of nitroaromatic vapours using resonance enhanced multiphoton ionization mass spectrometry. *Analyst* 118(6):601
126. Johnson PM (1980) Molecular multiphoton ionization spectroscopy. *Appl Opt* 19(23):3920–3925
127. Boesl U, Zimmermann R, Weickhardt C, Lenoir D, Schramm K-W, Kettrup A, Schlag EW (1994) Resonance-enhanced multi-photon ionization: a species-selective ion source for analytical time-of-flight mass spectrometry. *Chemosphere* 29(7):1429–1440
128. Antonov VS, Letokhov VS (1981) Laser multiphoton and multistep photoionization of molecules and mass spectrometry. *Appl Phys* 24(2):89–106
129. Hüfner S (2007) Very High Resolution Photoelectron Spectroscopy. *Lecture Notes in Physics*, vol. 715. Springer, Berlin, Heidelberg

130. Zimmermann R, Boesl U, Heger H-J, Rohwer ER, Orthner EK, Schlag EW, Kettrup A (1997) Hyphenation of gas chromatography and resonance-enhanced laser mass spectrometry (REMPI-TOFMS): A multidimensional analytical technique. *J High Resol Chromatog* 20(9):461–470
131. Bishenden E, Haddock J, Donaldson DJ (1991) Resonance-enhanced multiphoton ionization (REMPI) measurement of atomic chlorine($2P_{3/2}$ and $2P_{1/2}$) produced in the photolysis of chlorine dioxide (OCIO) from 355 to 370 nm. *J Phys Chem* 95(6):2113–2115
132. Li L, Wang XT, Li XN, Xie XB (1992) The (3+1) REMPI spectrum of CS₂ in the 62000–65000 cm⁻¹ region. *Chem Phys* 164(2):305–309
133. Appel MF, Short LC, Benter T (2004) Development of medium pressure laser ionization, MPLI. Description of the MPLI ion source. *J Am Soc Mass Spectr* 15(12):1885–1896
134. Scoles G (ed) (1992) Atomic and molecular beam methods, vol. 1. Oxford Univ. Press, New York
135. Hopkins JB, Powers DE, Smalley RE (1980) Vibrational relaxation in jet-cooled alkyl benzenes. I. Absorption spectra. *J Chem Phys* 72(9):5039–5048
136. Levy DH (1980) Laser Spectroscopy of Cold Gas-Phase Molecules. *Annu Rev Phys Chem* 31(1):197–225
137. Boesl U (2000) Laser mass spectrometry for environmental and industrial chemical trace analysis. *J Mass Spectrom* 35(3):289–304
138. Grotemeyer J, Boesl U, Walter K, Schlag EW (1986) A general soft ionization method for mass spectrometry: Resonance-enhanced multi-photon ionization of biomolecules. *Org Mass Spectrom* 21(10):645–653
139. Zimmermann R, Heger HJ, Yeretzian C, Nagel H, Boesl U (1996) Application of Laser Ionization Mass Spectrometry for On-line Monitoring of Volatiles in the Headspace of Food Products: Roasting and Brewing of Coffee. *Rapid Commun Mass Sp* 10(15):1975–1979
140. Sin CH, Tembreull R, Lubman DM (1984) Resonant two-photon ionization spectroscopy in supersonic beams for discrimination of disubstituted benzenes in mass spectrometry. *Anal Chem* 56(14):2776–2781
141. Proch D, Rider DM, Zare RN (1981) Unimolecular fragmentation kinetics by multiphoton ionization. *Chem Phys Lett* 81(3):430–434
142. Lubman DM (1990) Lasers and mass spectrometry. Oxford series on optical sciences. Oxford University Press, New York
143. Mönnikes R (2009) Dissertation: Kopplung einer MPLI-Quelle an ein Flugzeitmassenspektrometer und Entwicklung von Ionisationslabeln für die GC-Anwendung, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Wuppertal
144. Boesl U, Neusser HJ, Schlag EW (1981) Isotope selective soft multiphoton ionization and fragmentation of polyatomic molecules. *J Am Chem Soc* 103(17):5058–5060
145. Dessent CEH, Müller-Dethlefs K (2000) Hydrogen-Bonding and van der Waals Complexes Studied by ZEKE and REMPI Spectroscopy. *Chem Rev* 100(11):3999–4022

146. Parker DH, Bernstein RB (1982) Multiphoton ionization-fragmentation patterns of alkyl iodides. *J Phys Chem* 86(1):60–66
147. Zandee L, Bernstein RB (1979) Laser ionization mass spectrometry: Extensive fragmentation via resonance-enhanced multiphoton ionization of a molecular benzene beam. *J Chem Phys* 70(5):2574–2575
148. Seaver M, Hudgens JW, Decorpo JJ (1980) ArF excimer laser multiphoton-ionization mass spectrometry of organic molecules. *Int J Mass Spectrom* 34(1-2):159–173
149. Silberstein J, Levine RD (1980) Fragmentation patterns in multiphoton ionization: a statistical interpretation. *Chem Phys Lett* 74(1):6–10
150. Dietz W, Neusser HJ, Boesl U, Schlag EW, Lin SH (1982) A model for multiphoton ionisation mass spectroscopy with application to benzene. *Chem Phys* 66(1-2):105–127
151. Boesl U, Neusser HJ, Schlag EW (1980) Visible and UV multiphoton ionization and fragmentation of polyatomic molecules. *J Chem Phys* 72(8):4327–4333
152. Boesl U, Neusser HJ, Schlag EW (1982) Secondary excitation of ions in a multiphoton mass spectrometer. *Chem Phys Lett* 87(1):1–6
153. Neusser HJ, Kühlewind H, Boesl U, Schlag DEW (1985) Unimolecular Decay of Polyatomic Ions Prepared by Multi-Photon Ionization. *Berich Bunsen Gesell* 89(3):276–281
154. Rebentrost F, Kompa KL, Ben-Shaul A (1981) A statistical model for the fragmentation of benzene by multiphoton ionization. *Chem Phys Lett* 77(2):394–398
155. Rebentrost F, Ben-Shaul A (1981) On the fragmentation of benzene by multiphoton ionization. *J Chem Phys* 74(6):3255–3264
156. Li A, Uchimura T, Tsukatani H, Imasaka T (2010) Trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography-mass spectrometry based on nanosecond multiphoton ionization. *Anal Sci* 26(8):841–846
157. Zimmermann R, Heger HJ, Kettrup A, Nikolai U (2000) Direct observation of the formation of aromatic pollutants in waste incineration flue gases by on-line REMPI-TOFMS laser mass spectrometry. *Fresen J Anal Chem* 366(4):368–374
158. Baeza-Romero MT, Blitz MA, Goddard A, Seakins PW (2012) Time-of-flight mass spectrometry for time-resolved measurements: Some developments and applications. *Int J Chem Kinet* 44(8):532–545
159. Frost MJ (2004) 3 Optical studies of ion–molecule reactions. *Annu Rep Prog Chem* 100:29–72
160. Pastel RL, Sausa RC (1996) Detection of NO and NO₂ by (2 + 2) resonance-enhanced multiphoton ionization and photoacoustic spectroscopy near 454 nm. *Appl Opt* 35(21):4046–4052
161. Garnica RM, Appel MF, Eagan L, McKeachie JR, Benter T (2000) A REMPI method for the ultrasensitive detection of NO and NO₂ using atmospheric pressure laser ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 72(22):5639–5646
162. Lubman DM, Kronick MN (1982) Mass spectrometry of aromatic molecules with resonance-enhanced multiphoton ionization. *Anal Chem* 54(4):660–665

Literatur

163. Constapel M, Schellenträger M, Schmitz OJ, Gäb S, Brockmann KJ, Giese R, Benter T (2005) Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 19(3):326–336
164. Lubman DM, Kronick MN (1982) Plasma chromatography with laser-produced ions. *Anal Chem* 54(9):1546–1551
165. Heger HJ, Zimmermann R, Dorfner R, Beckmann M, Griebel H, Kettrup A, Boesl U (1999) On-Line Emission Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons down to pptv Concentration Levels in the Flue Gas of an Incineration Pilot Plant with a Mobile Resonance-Enhanced Multiphoton Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal Chem* 71(1):46–57
166. Kersten H, Lorenz M, Brockmann KJ, Benter T (2011) Evaluation of the performance of small diode pumped UV solid state (DPSS) Nd:YAG lasers as new radiation sources for atmospheric pressure laser ionization mass spectrometry (APLI-MS). *J Am Soc Mass Spectr* 22(6):1063–1069
167. Cappiello A (ed) (2007) *Advances in LC-MS instrumentation*, 1. ed. *Journal of chromatography library*, vol. 72. Elsevier, Amsterdam
168. Kolaitis L, Lubman DM (1986) Atmospheric pressure ionization mass spectrometry with laser-produced ions. *Anal Chem* 58(9):1993–2001
169. Schiewek R, Schellenträger M, Mönnikes R, Lorenz M, Giese R, Brockmann KJ, Gäb S, Benter T, Schmitz OJ (2007) Ultrasensitive determination of polycyclic aromatic compounds with atmospheric-pressure laser ionization as an interface for GC/MS. *Anal Chem* 79(11):4135–4140
170. Lubman DM (1984) Temperature dependence of plasma chromatography of aromatic hydrocarbons. *Anal Chem* 56(8):1298–1302
171. Marcus RA, Rice OK (1951) The Kinetics of the Recombination of Methyl Radicals and Iodine Atoms. *J Phys Chem* 55(6):894–908
172. Marcus RA (1952) Unimolecular Dissociations and Free Radical Recombination Reactions. *J Chem Phys* 20(3):359–364
173. Rosenstock HM, Wallenstein MB, Wahrhaftig AL, Eyring H (1952) Absolute Rate Theory for Isolated Systems and the Mass Spectra of Polyatomic Molecules. *P Natl Acad Sci USA* 38(8):667–678
174. Paranjothy M, Sun R, Kumar Paul A, Hase WL (2013) Models for Intrinsic Non-RRKM Dynamics. Decomposition of the SN2 Intermediate Cl—CH₃Br. *Z Phys Chem* 227(9-11)
175. Baer T, Willett GD, Smithc D, Phillipsd JS (1979) The dissociation dynamics of internal energy selected C₆H₆⁺. *J Chem Phys* 70(9):4076–4085
176. Shimanouchi T (1972) Tables of molecular vibrational frequencies. Consolidated volume I. *J Phys Chem Ref Data*:1–160
177. Nemeth GI, Selzle HL, Schlag EW (1993) Magnetic ZEKE experiments with mass analysis. *Chem Phys Lett* 215(1-3):151–155
178. Chewter LA, Sander M, Müller-Dethlefs K, Schlag EW (1987) High resolution zero kinetic energy photoelectron spectroscopy of benzene and determination of the ionization potential. *J Chem Phys* 86(9):4737–4744

179. Houston PL (2012) *Chemical Kinetics and Reaction Dynamics*. Dover Books on Chemistry. Dover Publications, Newburyport
180. Lorenz M (2010) Dissertation: Räumlich und zeitlich aufgelöste Photoionisierung als Werkzeug zur Charakterisierung von Atmosphärendruckionenquellen in der Massenspektrometrie, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Wuppertal
181. Lorenz M, Schiewek R, Brockmann KJ, Schmitz OJ, Gäb S, Benter T (2008) The distribution of ion acceptance in atmospheric pressure ion sources: spatially resolved APLI measurements. *J Am Soc Mass Spectr* 19(3):400–410
182. Wißdorf W, Lorenz M, Brockmann K, Benter T (2019) Systematic Ion Source Parameter Assessment by Automated Determination of the Distribution of Ion Acceptance (DIA) Using APLI. *J Am Soc Mass Spectr* 30(7):1262–1275
183. Dohmann JF, Thiäner JB, Achten C (2019) Ultrasensitive detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal and harbor water using GC-APLI-MS. *Mar Pollut Bull* 149:110547
184. Thiäner JB, Richter-Brockmann S, Achten C (2018) Analysis of 6- and 7-ring PAH and other non-EPA PAH by atmospheric pressure laser ionization - mass spectrometry (APLI-MS) in environmental certified reference materials NIST 1941b, NIST 1649b, BAM CC013a and IRMM BCR 535. *J Chromatogr A* 1581-1582:91–99
185. Stader C, Beer FT, Achten C (2013) Environmental PAH analysis by gas chromatography-atmospheric pressure laser ionization-time-of-flight-mass spectrometry (GC-APLI-MS). *Anal Bioanal Chem* 405(22):7041–7052
186. Große Brinkhaus S, Thiäner JB, Achten C (2017) Ultra-high sensitive PAH analysis of certified reference materials and environmental samples by GC-APLI-MS. *Anal Bioanal Chem* 409(11):2801–2812
187. Deibel E (2014) Dissertation: Synthese und Anwendung neuer Ionisationsmarker für die APLI-(TOF)MS, Applied Analytical Chemistry, University of Duisburg-Essen
188. Schiewek R (2008) Dissertation: Entwicklung einer Multi-Purpose Ionenquelle für die AP-MS sowie Design und Anwendung von APLI-Ionisationslabeln, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Wuppertal
189. Schiewek R, Mönnikes R, Wulf V, Gäb S, Brockmann KJ, Benter T, Schmitz OJ (2008) A universal ionization label for the APLI-(TOF)MS analysis of small molecules and polymers. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(51):9989–9992
190. Deibel E, Klink D, Schmitz OJ (2015) New derivatization strategies for the ultrasensitive analysis of non-aromatic analytes with APLI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 407(24):7425–7434
191. Arjunan P, Shymasundar N, Berlin KD, Najjar D, Rockley MG (1981) Syntheses of selected ϵ -(2- or 9-anthryl)alkanoic acids and certain esters - carbon-13 spin-lattice relaxation time measurements of methyl 5-(2-anthryl)pentanoate and methyl 7-(2-anthryl)heptanoate. *J Org Chem* 46(3):626–629
192. Daub GH, Doyle WC (1952) The Monocyanoethylation of Anthrone. An Improved Synthesis of β -(9-Anthranlyl)-propionic Acid and β -(9,10-Dihydro-9-anthranlyl)-propionic Acid 1. *J Am Chem Soc* 74(17):4449–4450

Literatur

193. Andrews SP, Ladlow M (2003) Convenient preparation and use of a new analytical construct for the analysis and development of solid-phase chemistries. *J Org Chem* 68(14):5525–5533
194. TAMANO M, AOYAMA M, KOKETSU J (1985) Reactions of 9-anthracenethiol with trivalent phosphorus compounds. *NIPPON KAGAKU KAISHI*(4):731–734
195. Curphey TJ (2002) Thionation with the reagent combination of phosphorus pentasulfide and hexamethyldisiloxane. *J Org Chem* 67(18):6461–6473
196. Kingi N, Bergman J (2016) Thionation of Tryptanthrin, Rutaecarpine, and Related Molecules with a Reagent Prepared from P₄S₁₀ and Pyridine. *J Org Chem* 81(17):7711–7716
197. Newman JW, Hammock BD (2001) Optimized thiol derivatizing reagent for the mass spectral analysis of disubstituted epoxy fatty acids. *J Chromatogr A* 925(1-2):223–240
198. Brooks CJW, Maclean I (1971) Cyclic n-Butylboronates as Derivatives of Polar Bifunctional Groups for Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci* 9(1):18–24
199. Eisenberg F (1971) Cyclic butaneboronic acid esters: novel derivatives for the rapid separation of carbohydrates by gas-liquid chromatography. *Carbohyd Res* 19(1):135–138
200. Wood PJ, Siddiqui IR (1974) Characterisation of boronic esters of arabinose and xylose. *Carbohyd Res* 33(1):97–104
201. Kuivula HG, KEOUGH AH, SOBOCZENSKI EJ (1954) Areneborates from diols and polyols. *J Org Chem* 19(5):780–783
202. Foster AB, Haines AH, Inch TD, Randall MH, Webber JM (1965) 1,3:2,4-di-O-benzylidene-l-arabinitol and observations on some related cyclic phenylboronates. *Carbohyd Res* 1(2):145–155
203. Pailer M, Fenzl W (1961) Borheterocyclen, 1. *Mitt. Monatsh Chem* 92(6):1294–1299
204. Anthony GM, Brooks CJW, Maclean I, Sangster I (1969) Cyclic Boronates as Derivatives for Gas Chromatography. *J Chromatogr Sci* 7(10):623–631
205. LETSINGER RL, HAMILTON SB (1960) Organoboron Compounds. XII. Heterocyclic Compounds from Benzeneboronic Acid 1. *J Org Chem* 25(4):592–595
206. Jones RN (1947) The Ultraviolet Absorption Spectra of Anthracene Derivatives. *Chem Rev* 41(2):353–371
207. Hager JW, Wallace SC (1988) Two-laser photoionization supersonic jet mass spectrometry of aromatic molecules. *Anal Chem* 60(1):5–10
208. Klasinc L, Kovac B, Gusten H (1983) Photoelectron spectra of acenes. Electronic structure and substituent effects. *Pure Appl Chem* 55(2):289–298
209. Stahl D, Maquin F (1984) Charge-stripping mass spectrometry of molecular ions from polyacenes and molecular orbital theory. *Chem Phys Lett* 108(6):613–617
210. Benjamin Bogdanski (2017) Wissenschaftliche Abschlussarbeit : Charakterisierung der Fragmentierung von Markern für die APLI-MS, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Wuppertal

211. Bruker Corporation MicrOTOF User Manual, 40 Manning Road, Billerica, MA 01821
212. Zakheim DS, Johnson PM (1980) Rate equation modelling of molecular multiphoton ionization dynamics. *Chem Phys* 46(3):263–272
213. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox (2010) Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian Inc., Wallingford CT
214. Weigend F, Ahlrichs R (2005) Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys Chem Chem Phys* 7(18):3297–3305
215. Chai J-D, Head-Gordon M (2008) Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys Chem Chem Phys* 10(44):6615–6620