

Synthese und Anwendung neuer Ionisationsmarker für die APLI-(TOF)MS

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
– Doktor der Naturwissenschaften –
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Eduard Deibel

geboren in Kant (Kirgisien)

Angewandte Analytische Chemie der
Universität Duisburg-Essen

2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2010 bis März 2013 im Arbeitskreis von Prof. Dr. O. J. Schmitz zunächst im Arbeitskreis Analytische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal und später im Arbeitskreis Angewandte Analytische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 06.06.2014

Gutachter: Prof. Dr. O. J. Schmitz

Prof. Dr. T. C. Schmidt

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. E. Sumfleth

Hiermit versichere ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbst durchgeführt und eigenständig verfasst habe. Ich habe keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die Arbeit wurde weder in dieser noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Universität eingereicht.

Ich habe weder in diesem noch einem anderen Fach ein gescheitertes Promotionsverfahren durchlaufen.

Essen, den 07.03.2014

Eduard Deibel

Danksagung

Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Oliver J. Schmitz für die interessante Fragestellung und die engagierte, freundliche und persönliche Betreuung. Ich bedanke mich sehr herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die vielen Anregungen und Diskussionen zu meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thorsten C. Schmidt danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Frau Prof. Dr. Elke Sumfleth für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Prof. Dr. Thorsten Benter möchte ich dafür danken, dass ich in seinen Laboratorien arbeiten durfte. Darüber hinaus war er stets hilfsbereit und hat immer gute Anregungen für die Forschung gegeben und Antworten auf wissenschaftliche Fragen parat gehabt.

Prof. Dr. Hans-Willi Kling möchte ich dafür danken, dass ich zum Ende meiner Promotion sowohl seine Labore nutzen durfte als auch einen Büroplatz in seinem Arbeitskreis zu Verfügung gestellt bekommen habe.

Besonderer Dank gilt Dennis Klink. Er war von Anfang bis Ende meiner Promotion mein wichtigster Ansprechpartner wenn es um die APLI, das Massenspektrometer, die GC oder irgendein anderes Gerät ging. Darüber hinaus waren unsere Diskussionen immer witzig und produktiv. Für seine Hilfsbereitschaft, Anregungen und Ideen bin ich ihm sehr dankbar.

Dr. Lukas Hyzak danke ich für sein Engagement mich zum Sport zu bewegen. Ganz besonders dankbar bin ich ihm für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Marcel Druschler danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Roman Dück und Dr. Victoria Elsner bin ich für die Hilfestellung bei zahlreichen HPLC-Problemen dankbar.

Frau Sonja Krieger bin ich für die Messung der präzisen Massen der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen dankbar.

Frau Ina Ebersbach und Herrn Patrick Schlenger bin ich für ihre Hilfe während ihrer Master- bzw. Bachelorarbeit dankbar. Die Betreuung hat mir sehr viel Spass bereitet und wichtige Erkenntnisse für meine Forschung hervorgebracht.

Herrn Bernd Wallmichrath danke ich für die Bearbeitung meiner Bestellungen und seine hilfsbereite und freundliche Art.

Herrn Nils Wienand, Frau Alexandra von Trotha, Dr. Matthias Albers, Dr. Duxin Li, Dr. Marc Constapel, Herrn Ralf Radon und Frau Sabrina Laun danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. Klaus Brockmann danke ich für seine Hilfe, seine freundliche Art und für seine kreativen und zielführenden Problemlösungen.

Den Kollegen aus der Physikalischen Chemie der Universität Wuppertal danke ich für die Hilfe bei zahlreichen praktischen Problemen.

Frau Jane Hübner danke ich für die Übersetzung russischsprachiger wissenschaftlicher Artikel.

Herrn Ronald Giese danke ich für die CAD-Bilder der MPIS und die ständige Weiterentwicklung unserer Geräte.

Herrn Andreas Siebert danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal danke ich für die vielen Kleinteile, die ich mir dort abholen durfte, und die Werkstücke, die dort für unseren Arbeitskreis angefertigt wurden.

Ich danke auch meinen Freunden und Studienkollegen aus Marburg. Trotz der Entfernung habe ich immer auf ihre Freundschaft und Hilfe bauen können.

Natürlich danke ich meiner Mutter und meinen Geschwistern für die Geduld und die aufmunternden Worte in der Zeit meines Studiums und der Promotion. Ohne ihren Rückhalt, ihre Geduld und Hilfe wäre ich nicht da wo ich jetzt bin.

Zum Schluss danke ich der DFG für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

(PyS)₂	2,2'-Dipyridyldisulfid
[M]⁺	Molekülkation
[M+H]⁺	Molekülkation mit addiertem Proton
[M-H]⁺	Molekülkation mit subtrahiertem Proton
μ	Präfix, Mirco (10 ⁻⁶)
2'-dA-3'-MP	2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat
2'-dC-3'-MP	2'-Desoxycytidine-3'-monophosphat
2'-dU-5'MP	2'-Desoxyuridine-5'-monophosphat
AA	Acrylsäure
AM	Anthracen-9-ylmethanol
AMAA	Anthracen-9-ylmethoxyessigsäure
APA	3-(9-Anthryl)-propylamin
APA*HCl	3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorid
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APLI	Atmospheric Pressure Laser Ionization
APol	3-(9-Anthryl)-propanol
APPI	Atmospheric Pressure Photo Ionization
APS	3-(Anthracen-9-yl)propansäure
APS-Cl	3-(Anthracen-9-yl)propansäurechlorid
APS-NHS	3-(9-Anthryl)-propionsäure-2,5-dioxo-pyrrolidinylester
AQC	6-Aminoquinolin- <i>N</i> -hydroxysuccimidylcarbamat
bar	bar (Druckeinheit)

BODIPY-FL-EDA	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>S</i> -indacen-3-propionylethylendiamin-hydrochlorid
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CDI	<i>N,N'</i> -Carbodiimidazol
CI	Chemische Ionisation
CID	Collusion Induced Dissociation
CRM	Charged Residue Mechanism
Cy	Cyclohexyl
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DA-APLI	Dopant-Assisted-APLI
DA-APPI	Dopant-Assisted-APPI
DAD	Dioden Array Detector
DAMA	9-Diazomethylantracen
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DI	Direktinjektion
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	<i>N,N'</i> -Disuccimidylcarbonat
EC	Elektroneneinfang
ECD	Elektroneneinfangdetektor (engl. Electron Capture Detection)
EDC*HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EtOH	Ethanol

GC	Gaschromatographie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPP	Hydroxypropylpyridin
hν	Photon
IEM	Ion Evaporation Mechanism
k	Präfix, Kilo (10^3)
K	Kelvin
kHz	Frequenteinheit, (1000 s^{-1})
KOtBu	Kaliumtertbutanolat
L	Liter
LC	Flüssigchromatography
m	Präfix, Milli (10^{-3})
M	mol/L
<i>m/z</i>-Verhältnis	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MAA	Methacrylsäure
MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization
MCP	Microchannel Plate Detector
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethansulfonsäure
mol	Stoffmenge ($6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
MPIS	Multipurpose Atmospheric-Pressure Ion Source
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer

n	Präfix, Nano (10^{-9})
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NHS-C	2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat
Nm	Nanometer
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-butanon
NP-C	4-Nitrophenyl-3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat
OTos	Tosylation
p	Präfix, Pico (10^{-12})
p	Druck
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PFB	Pentafluorobenzoylchlorid
PHB	Pyridylhydroxybutanol
POB	Pyridyloxobutanol
PPh₃	Triphenylphosphin
Q	Quadrupol
REMPI	Resonance-enhanced Multi Photon Ionization
rf	Radiofrequenz
RP-HPLC	Reversed Phase-HPLC
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Spd	Spermidin
Spn	Spermin
TFL	Transferline
TIC	Total Ion Current
ToF-MS	Time-of-Flight-Massenspektrometer

TosCl	Tosylchlorid
TSA	Toluol-4-sulfonsäure-3-(9-anthryl)-propylester
UV	Ultraviolett
V	Volt
VUV	Vakuum-UV
λ	Wellenlänge

Im Laufe dieser Arbeit werden Derivatisierungsprodukte über die Abkürzung des Markers verbunden mit einem Bindestrich mit der Abkürzung des Analyten benannt.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
2 Theorie	3
2.1 Massenspektrometrie.....	3
2.1.1 Quadrupol-MS.....	4
2.1.2 Time-of-Flight-Massenspektrometrie	5
2.1.3 Das micrOTOF	6
2.2 Ionisationsmethoden.....	8
2.2.1 Elektrospray Ionisation	10
2.2.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionization	12
2.2.3 Elektronenstoß-Ionisation	14
2.2.4 Chemische Ionisation	16
2.2.5 Elektroneneinfang-Ionisation	17
2.2.6 Atmospheric Pressure Photo Ionization	18
2.2.7 Resonance-enhanced Multi Photon Ionization.....	21
2.2.8 Atmospheric Pressure Laser Ionization.....	23
2.3 Chromatographische Trennmethode n	27
2.4 Multipurpose Ion Source, Transferline und Laser	29
2.5 Derivatisierungsreaktionen in der Analytik	32
3 Problemstellung und Zielsetzung	41
4 Ergebnisse und Diskussion.....	43
4.1 Fragmentierungsproblematik von APLI-Markern.....	43
4.2 Synthesen neuer APLI-Marker.....	49
4.2.1 3-(Anthracen-9-yl)propansäure (APS).....	49
4.2.2 3-(Anthracen-9-yl)propansäurechlorid (APS-Cl)	52
4.2.3 3-(9-Anthryl)-propionsäure-2,5-dioxo-pyrrolidinylester (APS-NHS).....	53
4.2.4 3-(9-Anthryl)-propanol (APol).....	54
4.2.5 3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorid.....	55
4.2.6 Toluol-4-sulfonsäure-3-(9-anthryl)-propylester (TSA).....	57
4.3 Derivatisierung und Analyse von Alkoholen	58
4.3.1 Analyse des HPP	59
4.3.2 Analyse des 6:2- und des 8:2-FTOHs	67
4.4 Derivatisierung und Analyse von Carbonsäuren.....	70

4.4.1	Derivatisierung und Analyse einer Carbonsäuremischung	71
4.4.2	Derivatisierung und Analyse von Acrylsäure und Methacrylsäure.....	75
4.5	Derivatisierung und Analyse von Aminen	77
4.5.1	Analyse eines Propylaminstandards.....	77
4.5.2	Analyse von Spermin und Spermidin.....	78
4.6	Weitere Ergebnisse.....	85
4.6.1	Derivatisierung von Nukleotiden	85
4.6.2	Derivatisierung von Aldehyden und Isocyanaten	87
4.6.3	Carbamine als funktionelle Gruppe bei APLI-Markern.....	88
4.6.4	Einsatz eines DPSS-Lasers.....	90
5	Experimenteller Teil.....	93
5.1	Chemikalien	93
5.2	Geräte	95
5.3	Experimentelle Parameter	97
5.3.1	Experimentelle Daten zu Abbildung 20	97
5.3.2	Experimentelle Daten zu Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41	97
5.3.3	Experimentelle Daten zu Abbildung 43 (Zersetzung des APS-HPP)	98
5.3.4	Experimentelle Daten zu den Abbildung 44 und Abbildung 45	98
5.3.5	Experimentelle Daten zu Abbildung 48	99
5.3.6	Experimentelle Daten zu Abbildung 50	100
5.3.7	Experimentelle Daten zu Abbildung 52	101
5.3.8	Experimentelle Daten zu Abbildung 54	101
5.3.9	Experimentelle Daten zu Abbildung 56	102
5.3.10	Experimentelle Daten zu Abbildung 57	103
5.3.11	Experimentelle Daten zu Abbildung 59	104
5.3.12	Experimentelle Daten zu Abbildung 61	104
5.3.13	Experimentelle Daten zu Abbildung 64	105
5.3.14	Experimentelle Daten zu Abbildung 66	106
5.3.15	Experimentelle Daten zu Abbildung 67	107
5.3.16	Experimentelle Daten zu Abbildung 70	107
5.3.17	Experimentelle Daten zu Abbildung 73	108
5.4	Synthesevorschriften	109
5.4.1	Anthracen-9-ylmethoxyessigsäure AMAA.....	109
5.4.2	3-(9-Anthryl)-propionsäure	110
5.4.3	3-(9-Anthryl)-propionsäurechlorid.....	111
5.4.4	3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorid.....	112

5.4.5 3-(9-Anthryl)-propionsäure-2,5-dioxo-pyrrolidinylester	114
5.4.6 3-(9-Anthryl)-propanol.....	115
5.4.7 Toluol-4-sulfonsäure-3-(9-anthryl)-propylester	116
5.4.8 4-Nitrophenyl-3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat.....	117
5.4.9 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat	118
6 Ausblick und Zusammenfassung	121
6.1 Ausblick	121
6.2 Zusammenfassung.....	122
7 Literatur	125
8 Lebenslauf	153

1 Einleitung

Das Bearbeiten immer komplexerer analytischer Fragestellungen stellt Forscher und Gerätehersteller vor immer neue Aufgaben. Die Entwicklung neuer analytischer Methoden oder die Verbesserung bereits etablierter Techniken ermöglicht Analytikern weltweit die Beantwortung zahlreicher Fragestellungen, welche vor einigen Jahren noch als unlösbar galten.

Dabei werden in allen Bereichen der Analytischen Chemie Fortschritte gemacht. Die zwei großen Gebiete der Analytik, die Stofftrennung und die Detektion von Analyten, insbesondere in Form der Massenspektrometrie (MS), haben in den letzten Jahren enorme Entwicklungen vorgenommen. Die Einführung zweidimensionaler chromatographischer Methoden hat z.B. die Komplexität einiger Proben in vollem Umfang erst erkennen lassen [1]. Moderne Massenspektrometrie erleichtert oder ermöglicht dabei die Aufklärung von Molekülstrukturen in Proben unbekannter Zusammensetzung [2].

Neben dem verwendeten Massenspektrometer spielt bei der massenspektrometrischen Analyse von Proben die Ionisationsmethode eine wichtige Rolle. Die eingesetzte Ionisationsart ist entscheidend, welche der Probenbestandteile der Analyse mittels MS überhaupt zugänglich werden [3]. Deshalb wird an immer mehr Ionisationsmethoden geforscht. Dabei spielen zwei Kriterien eine Rolle: Zum einen ist die Ionisationsausbeute und damit die Sensitivität der Ionisationsmethode wichtig, zum anderen ist die Frage der universellen Anwendbarkeit der Methode entscheidend [4].

Um hochempfindliche Ionisationsmethoden anwenden zu können, müssen die untersuchten Analyten oft ganz bestimmte Moleküleigenschaften aufweisen [5].

In dieser Arbeit werden neue Ionisationsmarker entwickelt und vorgestellt, welche nach der Derivatisierung der Analyten den Einsatz der ultrasensitiven Ionisationstechnik, Atmosphärendruck Laserionisation (APLI) erlauben.

2 Theorie

In diesem Kapitel werden die wichtigsten theoretischen Grundlagen für diese Arbeit diskutiert bzw. erläutert. Zunächst wird auf die Massenspektrometrie als analytisches Werkzeug eingegangen und anschließend gängige Ionisationsmethoden vorgestellt. Die Diskussion der Vor- und Nachteile wird zeigen, dass die APLI eine sinnvolle Ergänzung zu den bereits etablierten Ionisationsmethoden darstellt. Darauf folgt eine kurze Einführung in die wichtigsten analytischen Trennmethode (GC und HPLC) und deren Kopplung an die APLI. Anschließend wird das Prinzip der Derivatisierungsreaktionen in der Analytik erläutert und das Konzept der Derivatisierung mit Hilfe von Ionisationsmarkern auf die APLI übertragen.

2.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie hat sich zu dem wichtigsten Detektorsverfahren der modernen Analytik von organischen Molekülen entwickelt. Der Vorteil gegenüber anderen Detektoren ist die häufig deutlich bessere Sensitivität und insbesondere die Bereitstellung weiterer Molekülinformationen, welche zur Strukturaufklärung genutzt werden können.

Bei der Massenspektrometrie werden Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) getrennt und detektiert. Durch den Einsatz präziser Massenspektrometer ist es möglich, über die exakt gemessene Masse, die Elementzusammensetzung von Molekülen zu bestimmen. Darüber hinaus bieten Fragmentspektren und der Einsatz moderner Datenbanken die Möglichkeit, Verbindungen zu identifizieren [6-15].

Die am häufigsten eingesetzten Massenspektrometer sind das Quadrupol (Q) und das Time-of-Flight-Massenspektrometer (ToF-MS). Mehrpolssysteme mit sechs oder acht Polen, welche für die Fokussierung von Ionen eingesetzt werden, sind Modifikationen des Quadrupols. Da nur Mehrpolssysteme und das ToF-MS in dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät zum Einsatz kommen, wird auch nur darauf eingegangen. Neben diesen beiden Konzepten gibt es weitere Möglichkeiten zur Bestimmung von m/z -Verhältnissen von Ionen. Aber auch Kombinationen mehrerer dieser Baugruppen können vorteilhaft sein. Zum einen können mehrere Quadrupole oder andere Mehrpole hintereinander geschaltet werden, zum anderen können Mehrpole auch mit einem ToF-MS in einem Gerät verbaut werden, um die Vorteile der einzelnen Bauelemente zu vereinen.

2.1.1 Quadrupol-MS

Das Quadrupol-MS wurde erstmals 1953 beschrieben [16] und ist aus zwei sich gegenüber liegenden Stabpaaren aufgebaut. Alternierend wird eine Gleichspannung unterschiedlicher Polarität angelegt, wobei die gleiche Spannung auf den sich gegenüberliegenden Stäben anliegt. Dieser Gleichspannung wird eine Wechsellspannung mit einer Radiofrequenz (rf) überlagert. Die Massenselektion ist eine Funktion der angelegten Spannungen sowie der Radiofrequenz und resultiert in der Selektion ganz bestimmter m/z -Verhältnisse [6,17,18]. Bei dem Quadrupol-Massenanalysator werden nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnissen auf einer stabilen Flugbahn gehalten. Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines Quadrupols. Quadrupole können als Massenfilter, Kollisionszellen und Ionenlinsen eingesetzt werden [10,19]. Die Vorteile des Quadrupols sind der niedrige Preis, die kompakte Bauweise, die Robustheit und die vergleichsweise einfache Instandhaltung. Ionen können bis zu einer Masse von ca. 4000 Da untersucht werden.

In Abbildung 1 hat das blaue Kation eine stabile Flugbahn und wird durch den Quadrupol geführt. Das grüne Kation hat eine instabile Flugbahn, trifft einen der Stäbe, wird neutralisiert und von den Pumpen als Neutralteilchen abgesaugt.

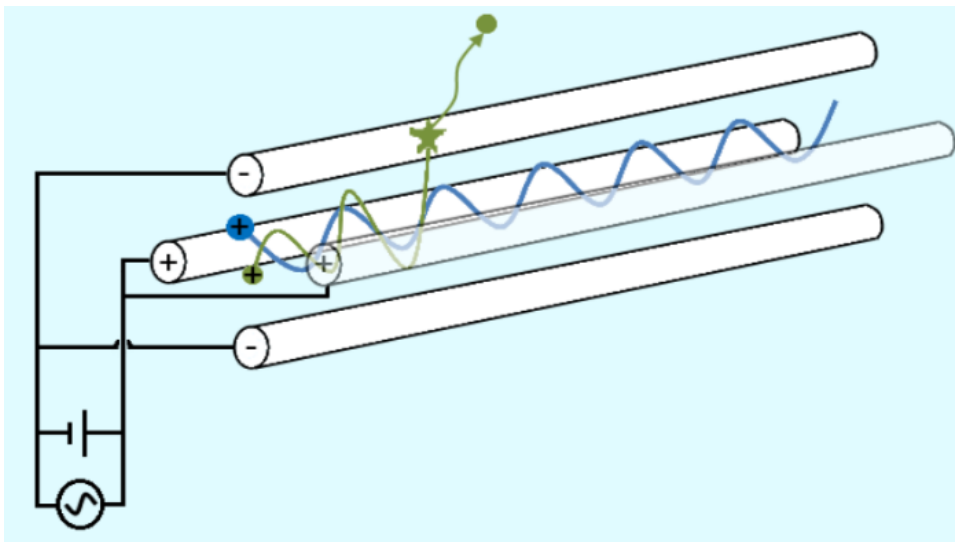


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Quadrupols nach [17,18,20,21]. Der vierte Stab wurde bei der Darstellung aufgrund der Übersichtlichkeit transparent dargestellt.

Der Einsatz von sechs bzw. acht Polen ist auch möglich. Diese Bauteile werden als Hexapol bzw. Octapol bezeichnet und werden ausschließlich als Ionenlinsen zur Fokussierung von

Ionenstrahlen eingesetzt. Ihre fokussierende Wirkung ist dem des Quadrupols überlegen, jedoch können diese nicht als Massenfiter verwendet werden [6].

2.1.2 Time-of-Flight-Massenspektrometrie

In der ToF-Massenspektrometrie wird die Flugzeit der Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen nach einem definierten Beschleunigungspuls gemessen. Dieses Prinzip zur Untersuchung von Ionenmassen wurde erstmals 1946 von Stephens vorgestellt [6,22,23]. Der Puls, der die Zeitmessung startet, überträgt die gleiche kinetische Energie auf jede Ionenladung. Da nach dem Puls alle Ionen mit gleicher Ladung die gleiche kinetische Energie aufweisen, unterscheiden sich unterschiedlich schwere Ionen in ihrer Geschwindigkeit und weisen eine von dem m/z -Verhältnis abhängige Driftzeit zum Detektor auf [11]. Dieser Massenanalysator eignet sich besonders gut zu Kopplung mit gepulsten Ionisationsquellen, welche auf definierten Startpunkten basieren, wie z.B. die Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization (MALDI), bei der ein gepulster Laser zur Ionisation eingesetzt wird und dieser gleichzeitig als Startsignal für die Zeitmessung dient [6]. Ionisationsmethoden, die einen kontinuierlichen Ionenstrom liefern, sind nicht direkt für das ToF-MS geeignet. Hier muss der kontinuierliche Ionenstrom zunächst in einen gepulsten Ionenstrom umgewandelt werden. Dies geschieht mittels eines Pushers, welcher den ankommenden Ionenstrom senkrecht zur ursprünglichen Bewegungsrichtung der Ionen in das Flugrohr beschleunigt [20]. Alle in die Driftstrecke beschleunigten Ionen erreichen nach gegebener Zeit den Detektor. Somit ist die Analyse auch von Ionen mit sehr hohem Molekulargewicht möglich [11]. Das ToF-MS eignet sich zur simultanen Aufnahme des gesamten Massenbereichs. Die Datenaufnahmerate liegt üblicherweise bei 10 kHz [24]. Moderne Time-of-Flight Massenspektrometer erreichen Auflösungen von mehr als 10000 [20], welche häufig erst durch den Einsatz eines Reflektrons erzielt werden können. Ein Reflektron besteht aus mehreren Ringscheiben, welche auf immer höheren elektrischen Potentialen liegen und so einen Ionenspiegel bilden. Die Ionen dringen in das Reflektron ein, werden durch das angelegte Potential abgebremst und in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt. Das Umlenken der Ionen hat zwei Vorteile. Zum einen kann so die Flugstrecke der Ionen erheblich verlängert werden, weswegen eine höhere Auflösung möglich wird. Zum zweiten werden Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis, aber leicht unterschiedlicher kinetischer Energie, die sich aus der Energieverteilung vor dem Beschleunigungspuls ergibt, am Detektor fokussiert. Die Ionen mit höherer kinetischer Energie dringen tiefer in das Reflektron ein und legen so eine geringfügig längere Strecke zurück, sodass ihre Flugzeit zum Detektor die

2 Theorie

gleiche ist, wie die der Ionen mit etwas geringerer kinetischer Energie [20,25]. Eine schematische Darstellung des ToF-MS ist in Abbildung 2 gegeben.

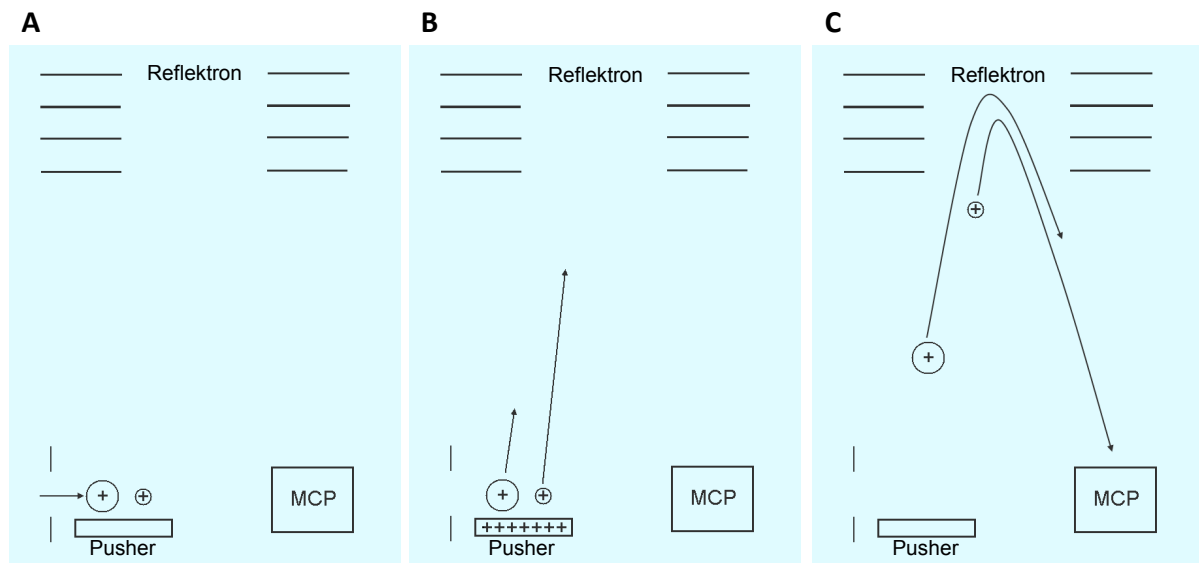


Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines ToF-MS nach [20,25]. A: Einlass der Ionen in die Flugröhre. B: Beschleunigung der Ionen durch den Pusher. C: Richtungsänderung der Ionen im Reflektoron und Auftreffen des leichteren Ions am MCP (MCP: Microchannel Plate).

2.1.3 Das microOTOF

Das in dieser Arbeit eingesetzte Massenspektrometer ist ein microOTOF von der Firma Bruker Daltonics. Der Aufbau des microOTOFs ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die hier verwendete Multipurpose Atmospheric-Pressure Ion Source (MPIS) [26] wird später vorgestellt und ist daher nicht in Abbildung 3 gezeigt. Nach der Ionisation werden die Ionen über anliegende Spannungen auf dem Sprayshield und dem Anfang der Transferkapillare, bestehend aus Glas mit metallbeschichteten Enden, in das Massenspektrometer transportiert. Es besteht die Möglichkeit, der Ionenbewegung am Kapillareingang einen geheizten Stickstoffstrom entgegen zu richten. Dieses sogenannte Drying Gas ist insbesondere für das Trocknen des Eluats aus der Flüssigchromatographie, also das Entfernen von Lösungsmitteln, gedacht.

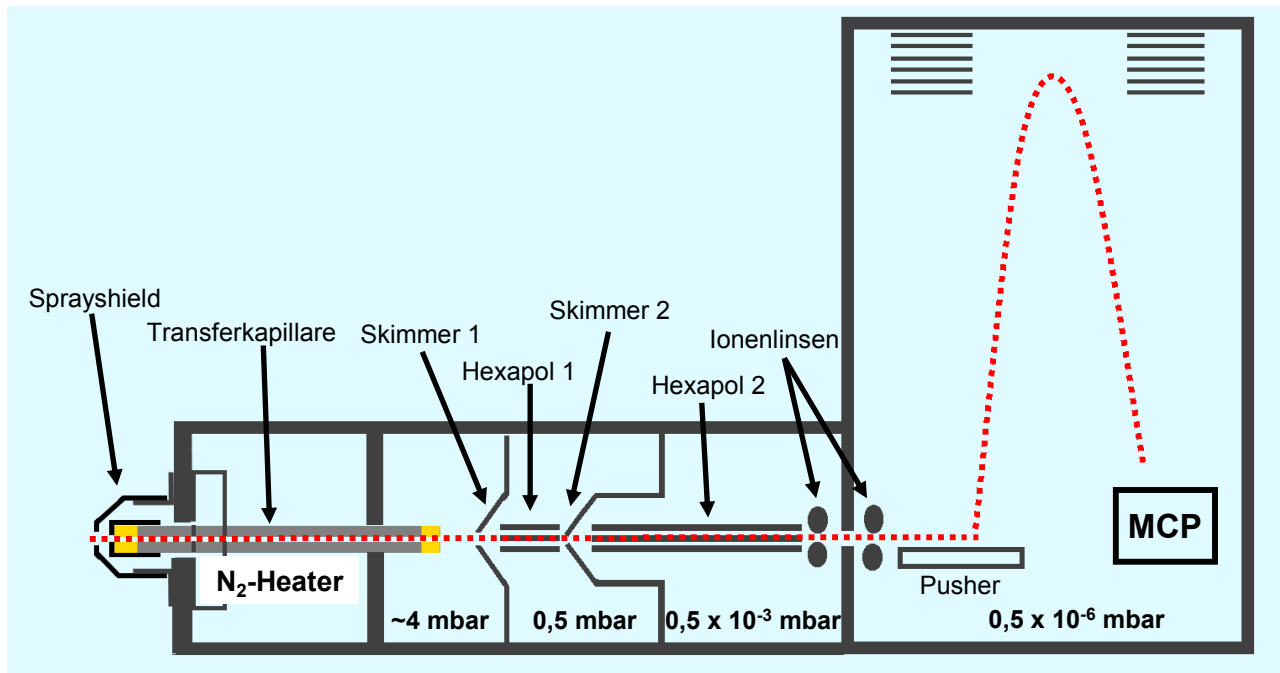


Abbildung 3: Aufbau des microOTOFs von Bruker Daltonics nach [27]. Der Weg der Ionen ist rot eingezeichnet.

Nach dem Passieren der Transferkapillare befinden sich die Ionen in der ersten differentiellen Pumpstufe. Dort herrscht ein Druck von ca. 4 mbar. Das Ende der Transferkapillare ist auf ein Potential von ca. 200 V eingestellt und beschleunigt die Ionen in Richtung des ersten Skimmers. Wird eine ausreichend große Potentialdifferenz zwischen dem Kapillarausgang und dem ersten Skimmer angelegt, kommt es durch den noch ausreichend hohen Druck zu genügend Stößen mit den noch vorhandenen Gasteilchen, sodass es zu Fragmentierungen kommen kann. Dieser Fragmentierungsmechanismus wird als Collision Induced Dissociation (CID) bezeichnet und kann eingesetzt werden, um eine Strukturinformation der Analyten zu erhalten [28,29]. Die Druckdifferenz zwischen der ersten und der zweiten differentiellen Druckstufe saugt alle gasförmigen Teilchen in Richtung des kleineren Drucks. Nach dem ersten Skimmer herrscht ein Druck von ca. 0,5 mbar. Anschließend werden die Ionen von einem Hexapol fokussiert und in Richtung des zweiten Skimmers transferiert. Ungeladene Teilchen werden dabei nicht fokussiert und passieren den zweiten Skimmer nicht. Nach dem zweiten Skimmer werden die Ionen von einem weiteren Hexapol in Richtung des Flugrohrs im Massenspektrometer geleitet. Der Druck in der dritten differentiellen Pumpstufe beträgt ca. $0,5 \times 10^{-3}$ mbar. Vor dem Eintritt der Ionen in die Flugröhre werden diese nochmals über Ionenlinsen fokussiert. Nach dem Eintritt in die Flugröhre und dem Passieren einer weiteren Ionenlinse befinden sich die Ionen im Pushersystem. Der Pusher beschleunigt

2 Theorie

die Ionen gepulst und orthogonal zu ihrer bisherigen Flugrichtung in die Flugröhre hinein. Dieser Schritt ist wichtig, um aus dem kontinuierlichen Ionenstrom diskrete Ionenpakete zu erzeugen. Die Ionen werden in Richtung des Reflektrons mit einem definierten elektrischen Potential beschleunigt. Nach dem Eindringen in das Reflektron wird die Bewegungsrichtung der Ionen um fast 180° geändert. Anschließend treffen die Ionen auf den Detektor. In diesem Fall ist es ein MCP-Detektor (engl. Microchannel Plate Detector). Dieser besteht aus einer Glasplatte, in der sich Millionen kleiner Kanäle, beschichtet mit einem halbleitenden Material, befinden. Der Durchmesser eines solchen Kanals ist ca. $5\text{-}10\ \mu\text{m}$, während die Länge etwa $0,5\text{-}0,8\ \text{mm}$ beträgt. Die Kanäle stehen unter Spannung und wirken beim Auftreffen von Ionen als Elektronenvervielfältiger. MCPs detektieren Ionen über einen hohen dynamischen Bereich und die Sättigungseffekte am Detektor sind vernachlässigbar klein. Darüber hinaus bieten diese Detektoren eine hohe Zeitauflösung und ermöglichen so die exakte Zeitmessung zwischen Startsignal des Pushers und dem Auftreffen der Ionen am Detektor [6,10,27].

2.2 Ionisationsmethoden

Um Analyten massenspektrometrisch untersuchen zu können, müssen diese zunächst ionisiert werden. Die Ionisation der zu untersuchenden Moleküle ist häufig einer der sensitivitätsbestimmenden Schritte [30-32]. Zur Analyse von Molekülen, welche sich in der flüssigen Phase befinden, werden häufig die Elektrosprayionisation (ESI), die Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) und die Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI) eingesetzt [8]. ESI, APCI und APPI werden nach der Polarität der zu untersuchenden Substanzen ausgewählt und klassifiziert. ESI wird für polare und ionische Verbindungen eingesetzt. APCI und APPI finden Anwendung bei mittel- bis unpolaren Molekülen [8,32,33]. Die Grenzen der einzelnen Ionisationsmethoden sind dabei fließend und hängen von der Gesamtstruktur der Analyten ab. Abbildung 4 stellt den Einsatzbereich der genannten Ionisationsmethoden bezüglich der Polarität und Molekülmasse dar.

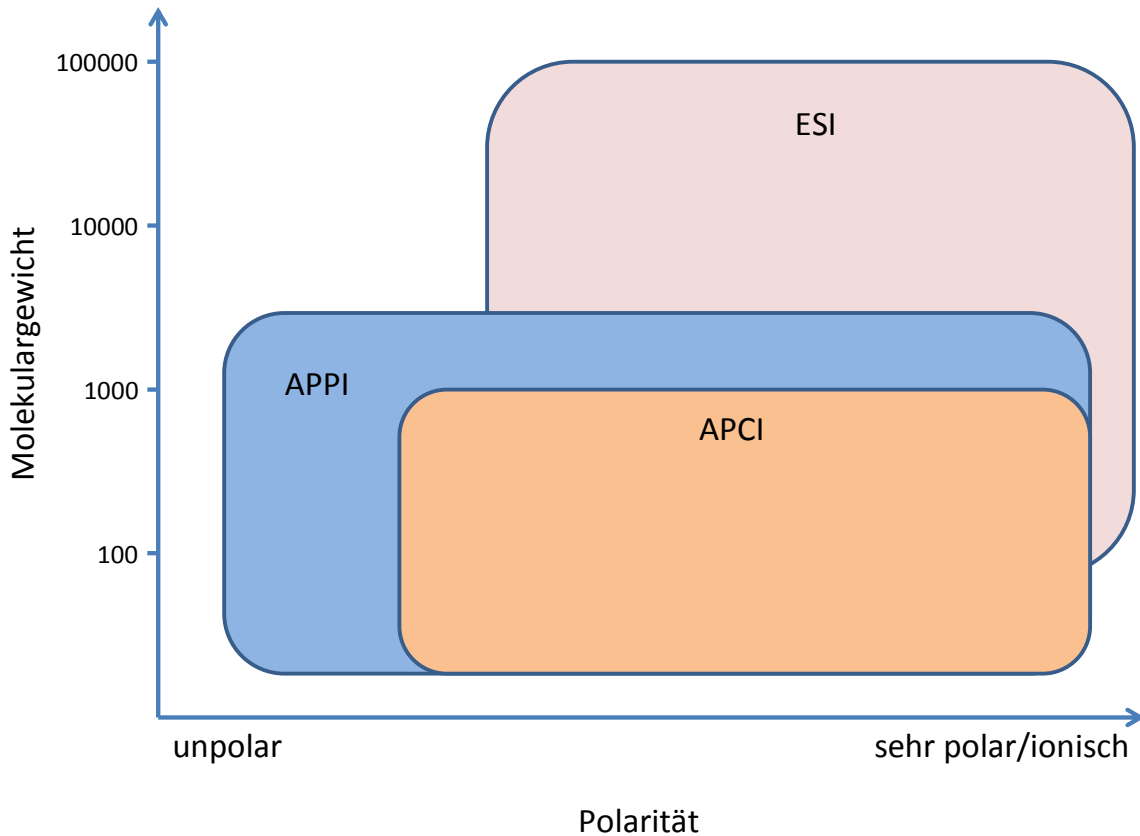


Abbildung 4: Einteilung von Atmosphärendruckionisationsmethoden nach Polarität und Molekulargewicht der Analyten nach [3].

Bei der Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie kommen häufig die Elektronenstoß-Ionisation (EI; engl.: Electron Impact) sowie die chemische Ionisation (CI; engl.: Chemical Ionization) unter reduziertem Druck zum Einsatz. Dies ist aufgrund der geringen Massenflüsse in der Gaschromatographie möglich [34]. Für die Ionisation unter Atmosphärendruck wird nach gaschromatographischer Trennung meistens die APCI eingesetzt [35].

Der Elektroneneinfang (EC; engl. Electron Capture), die Resonance-enhanced Multi Photon Ionization (REMPI) und die Atmospheric Pressure Laser Ionization (APLI) sind den zuvor genannten Ionisationstechniken im Hinblick auf die Sensitivität überlegen. Allerdings sind diese Ionisationsmethoden nicht universell einsetzbar. Die Analyten müssen ganz bestimmte Moleküleigenschaften aufweisen um durch die drei letztgenannten Ionisationsmethoden ionisiert zu werden. Mit der APLI lassen sich z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) um zwei bis drei Größenordnungen empfindlicher nachweisen als mit den zuvor genannten universellen Ionisationsarten [4,26,36]. Im Folgenden werden sowohl die gängigsten als auch die empfindlichsten Ionisationsmethoden vorgestellt. In diesem Kapitel wird dargestellt, warum die APLI eine sinnvolle Ergänzung zu den bereits

etablierten und weit verbreiteten Ionisationsmethoden ist. Die Liste der hier diskutierten Ionisationsmethoden ist nicht vollständig. Es wird lediglich eine kleine Auswahl an Ionisationsmethoden, welche für diese Arbeit relevant erscheint, diskutiert.

2.2.1 Elektrospray Ionisation

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde 1984 von Yamashita und Fenn zur Erzeugung von Gasphasenionen eingeführt [10,25]. Bei dem ESI-Prozess werden mittel- bis sehr polare Verbindungen ionisiert. Die Analytionen entstehen in der kondensierten Phase und werden anschließend in die Gasphase überführt. Dazu werden polare Lösungsmittel, oft wässrige bzw. alkoholische Lösungen der Analyten, welche häufig auch Salze enthalten, durch eine Stahlkapillare gepumpt [32]. Zwischen dieser Kapillare und dem Einlass des Massenspektrometers wird eine Hochspannung (2-8 kV) angelegt. Wird die Kapillare als Anode geschaltet, so wird dort ein Teil der Anionen aus der Lösung neutralisiert. Der in der Lösung verbleibende Überschuss an Kationen sammelt sich am Rand der Lösung. Es entsteht der sogenannte Taylor-Kegel (engl. Taylor cone). Von diesem reißen große, positiv geladene Tropfen ab und werden in Richtung Kathode beschleunigt. Die Tropfen verlieren über Trocknungsprozesse Lösemittelmoleküle. Zur Unterstützung des Trocknungsprozesses werden häufig geheizte Gasströme eingesetzt [8,37]. Die Tropfen werden mit der Zeit kleiner, ihre Oberflächenladungsdichte steigt und es kommt zu Coulombexplosionen, bei welchen kleinere Tropfen entstehen. Diese werden ebenfalls getrocknet und zerfallen weiter bis die Tropfendurchmesser im Bereich von Nanometern liegen. Dann kommt es zu einer Anlagerung von Ladungsträgern und anschließend werden die Analytionen in die Gasphase überführt [3,10,25]. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 5 gegeben.

Der Mechanismus zur Freisetzung der Analytionen aus den Tropfen in die Gasphase ist nicht vollständig verstanden. Es werden zwei Modelle angenommen. Der erste Mechanismus wird Charged Residue Mechanism (CRM) genannt. Dabei wird angenommen, dass die Coulomb Explosionen die Tröpfchen so lange verkleinern bis nur noch ein Analytmolekül mit seinen verbleibenden Ladungen pro Tropfen vorhanden ist. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 6 oben dargestellt. Der zweite Mechanismus wird Ion Evaporation Mechanism (IEM) genannt. Dabei wird davon ausgegangen, dass ab einer bestimmten kritischen Oberflächenladung und Größe Analytionen aus den Tropfen emittiert werden. So wird die Oberflächenladung des verbleibenden Tropfens reduziert. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 6 unten dargestellt [37-39].

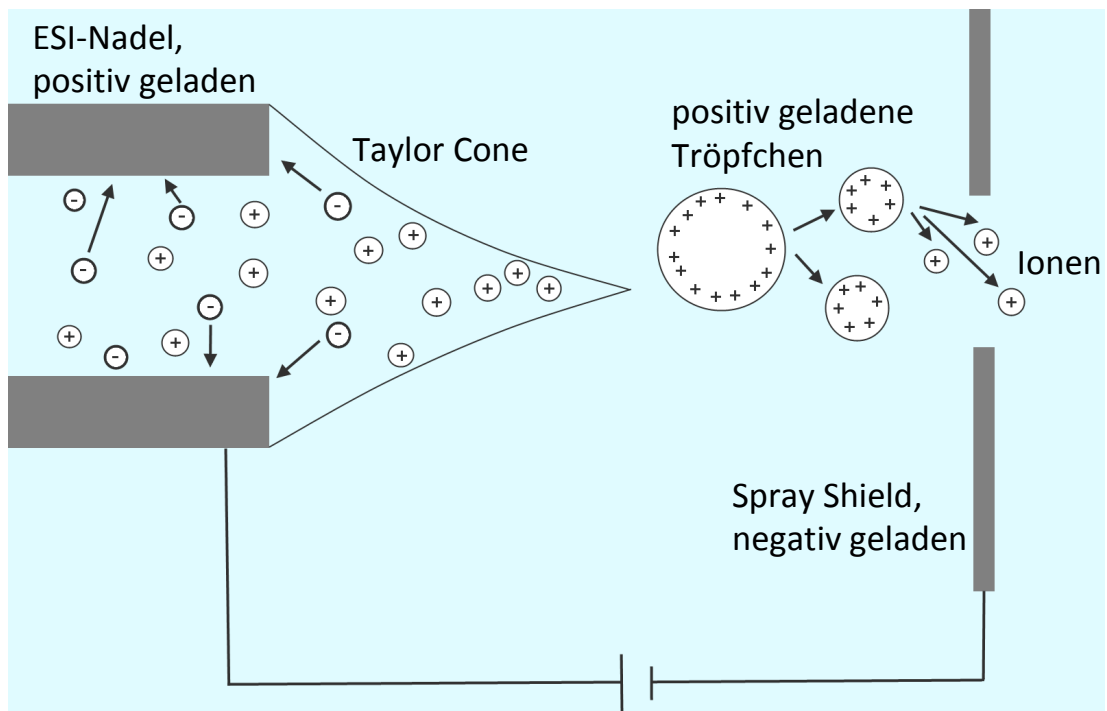


Abbildung 5: Schematische Darstellung des ESI Prozesses nach [6,25,37].

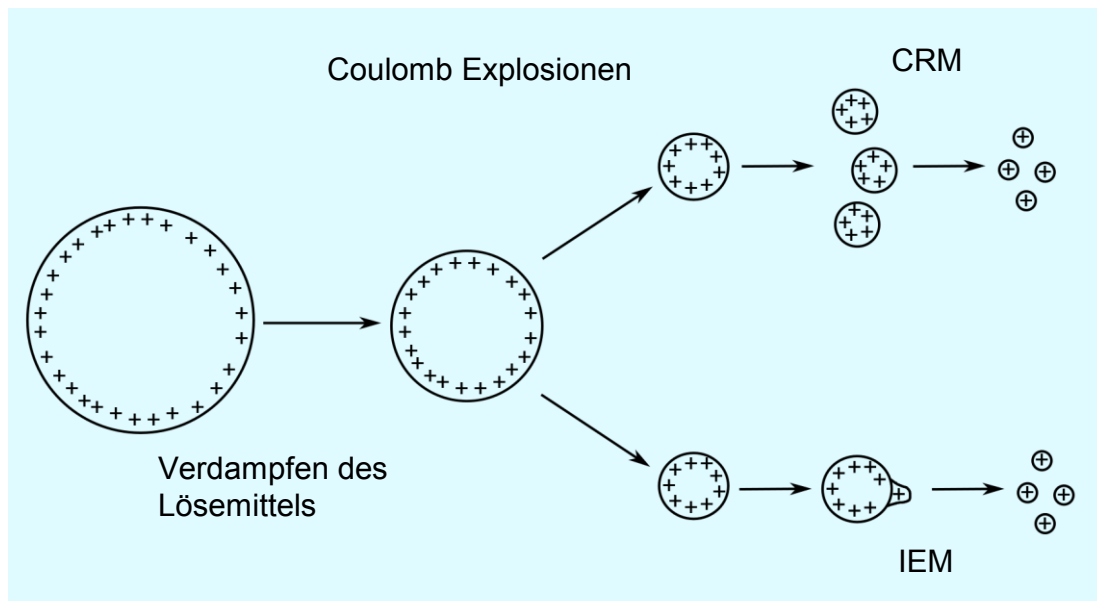


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Mechanismen des Übergangs der Ionen aus der kondensierten Phase in die Gasphase beim ESI-Prozess nach [37].

ESI kann sowohl im positiven als auch im negativen Modus betrieben werden. Abhängig von der Polarität der angelegten Spannung werden Kationen bzw. Anionen in die Gasphase freigesetzt. Darüber hinaus ist die ESI in der Lage, mehrfach geladene Ionen zu erzeugen, wodurch es möglich ist, Moleküle mit sehr hohen Massen zu untersuchen [25,32]. Weiter ist die ESI eine weiche Ionisationsmethode, bei der es nur wenig Zerfallsreaktionen der Ionen

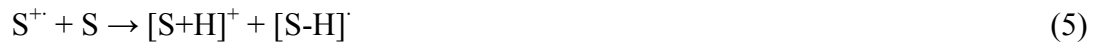
gibt [4,6]. Die Abwesenheit hoher Temperaturen zum Verdampfen des Lösungsmittels schont die Analyten [11,40]. Die größten Nachteile sind die Ionensuppression und die Strukturabhängigkeit der Ionisationsausbeute. Schon kleine Unterschiede in der Molekülstruktur können die Ionisationsausbeute drastisch ändern [41]. Ebenfalls ist die Ionisationsausbeute abhängig von dem verwendeten Lösungsmittel und weiteren Lösungsmittelzusätzen oder Matrixbestandteilen [8,32,37,42]. Die Salzkonzentration und -art einer Lösung spielt hier eine entscheidende Rolle [17,42]. Bei Gradientenelution in der HPLC führt dieser Umstand abhängig von der Retentionszeit der Analyten, durch die sich verändernde Obeffächenspannung, zu unterschiedlichen Ionisationsbedingungen. Diese Problematik erfordert für die Quantifizierung von Analyten oft Stabilisotopen markierte Standards [7,32,43-45]. ESI -Ionisationsquellen unterliegen der Limitierung auf kleine Flüsse. Dieses ist erforderlich, um das Elektrospray zu generieren oder zu verbessern [46]. Deshalb ist es oft notwendig, einen Split vor der Ionisationsquelle zu installieren, um nicht den gesamten Fluss aus der HPLC der Ionisation zuzuführen.

2.2.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionization

Die am zweithäufigsten eingesetzte Ionisationsmethode ist die Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) [47], diese wurde erstmals in den 1970ern eingeführt [32]. Die Ionisation findet in der Gasphase statt, wodurch es möglich ist, gasförmige, und nach einem Verdampfungsschritt, auch flüssige und feste Proben zu untersuchen [48,49]. Hierin liegt einer der Hauptunterschiede zur ESI, welche auf flüssige Proben beschränkt ist. Verglichen mit der ESI ist die APCI auch weniger anfällig für Salze und andere Bestandteile der Matrix [50]. APCI findet Anwendung zur Ionisation von eher unpolaren Molekülen, welche sich nicht in Lösung, sondern nur in der Gasphase ionisieren lassen [17]. Da die APCI in der Gasphase stattfindet, ist sie bei flüssigen Probeaufgaben, nicht wie die ESI, unabhängiger vom Lösemittel [32]. Der Nachteil ist, dass Proben, welche in Lösung vorliegen, vor der Ionisation beim Verdampfen thermisch belastet werden, wobei die Temperaturen teilweise weit über 400 °C liegen [10,11,17]. Darüber hinaus beschränkt die Notwendigkeit einer gasförmigen Probe die Analytgröße und –polarität.

Der Mechanismus der APCI beruht auf der chemischen Reaktion von Primärionen mit den Analytmolekülen, wobei die Analyten häufig protoniert oder deprotoniert werden [47]. Die für die Ionisation der Analyten notwendigen Primärionen werden über eine Coronaentladung an einer Nadel, an welcher eine Hochspannung anliegt, generiert. An der Spitze der Nadel werden Elektronen emittiert, die aus den umliegenden Gasmolekülen Ionen erzeugen. Es

2 Theorie



S: Lösemittelmolekül (H₂O; MeOH; MeCN; etc.)

M: Analyt

Die Bildung der thermodynamisch stabilsten Produkte führt zur Ionensuppression von nicht stark sauren bzw. nicht stark basischen Analyten. Amine unterdrücken z.B. die Protonierung von weniger basischen Verbindungen [17]. Da die Analyten um die Ladungsträger konkurrieren und nur die reaktivsten Spezies ionisiert werden, können komplexe Proben nur schwer oder gar nicht auf alle Bestandteile hin untersucht werden [3]. Manchmal kommt es zur Reduktion von Doppelbindungen und damit zu einer detektierten Masse, die um zwei Dalton erhöht ist. Dieses erschwert die Auswertung von Massenspektren [50].

Die Abwesenheit von mehrfach geladenen Ionen ist ein weiterer entscheidender Unterschied zur ESI. Bereits einfach geladene Ionen stoßen weitere Ionen gleicher Ladung ab, weswegen keine Mehrfachladungen generiert werden können [47]. Verglichen mit der ESI lässt die APCI deutlich höhere Probenflüsse zu. Es sind Flüsse von bis zu 2 mL/min möglich. Die zulässigen Flüsse in der ESI liegen um ein Vielfaches darunter. Dies bedeutet, dass bei Verwendung der APCI der Fluss aus der Chromatographie nicht gesplittet werden muss und so höhere Probenmengen in die Ionenquelle eingebracht werden können [10,53]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die APCI am besten für kleine (100 – 2000 Da [8]) und relativ stabile Moleküle eingesetzt werden kann [32]. Die APCI ergänzt die ESI bei der Analyse flüssiger Proben, da hier andere Molekülcharakteristiken für die Ionisation ausschlaggebend sind. So spielt bei der APCI z.B. die Gasphasenacidität bzw. -basizität eine entscheidende Rolle. Bei der ESI ist es die Basizität bzw. Acidität in Lösung.

2.2.3 Elektronenstoß-Ionisation

Die Elektronenstoß-Ionisation (EI; engl. Electron Impact oder Electron Ionization) ist eine Ionisationsart, welche unter Hochvakuum, also bei ca. 10⁻⁷ bis 10⁻⁵ mbar, betrieben wird [54]. Diese stellt die am häufigsten eingesetzte Ionisationsart zur Kopplung mit der

Gaschromatographie dar [8]. Dabei wird die gasförmige Probe mit Elektronen mit einer Energie von meistens 70 eV beschossen [6,11,55]. Diese Elektronen werden in einer Glühkathode erzeugt und in einem elektrischen Feld beschleunigt, sodass diese orthogonal zur Bewegungsrichtung der Analytmoleküle auf diese treffen. Dabei werden Elektronen aus den beschossenen Molekülen geschlagen, wodurch diese anschließend positiv geladen sind [6]. Die hohe Stoßenergie führt zu einer starken Fragmentierung der gebildeten Ionen. In den meisten Fällen wird sogar kein Signal für das Molekülion detektiert, sondern nur für die Fragmentionen. Es werden kinetisch kontrollierte Fragmentmuster erzeugt, welche auch auf unterschiedlichen Geräten reproduzierbar sind [10]. Das Fragmentmuster kann zur Identifikation und Strukturaufklärung von Molekülen eingesetzt werden [13,15]. Diese Ionisationsmethode ist für organische Verbindungen universell einsetzbar [9]. Problematisch ist, dass sich die Signalintensität auf viele Fragmente verteilt, sodass die Empfindlichkeit dieser Methode sinkt [56,57]. Die Interpretation von Spektren unbekannter Verbindungen ist schwierig, da in vielen Fällen nur Teilmassen aber nicht die Molekülmasse gemessen werden können [57].

Darüber hinaus ist die EI nur für kleine flüchtige Moleküle einsetzbar, da diese zur Ionisation im Vakuum in der Gasphase vorliegen müssen [6,25]. Die Probe kann der Ionenquelle auf unterschiedliche Weise zugeführt werden. Die Analyten können über einen Gaschromatographen, über das Abnehmen der Gasphase einer Verbindung mit ausreichendem Dampfdruck oder, bei festen Proben, über eine geheizte Schubstange in die Ionenquelle eingebracht werden [58]. Da die EI-Fragmentdatenbanken eine Identifizierung zahlreicher Verbindungen zulassen, ist die Kopplung der Flüssigchromatographie an die EI von Interesse und kann über das Particle-Beam Interface realisiert werden [59]. Eine Aufgabe flüssiger Proben wurde auch über eine Kopplung zur nanoHPLC realisiert [60-62]. Abbildung 8 zeigt den schematischen Aufbau einer EI-Quelle.

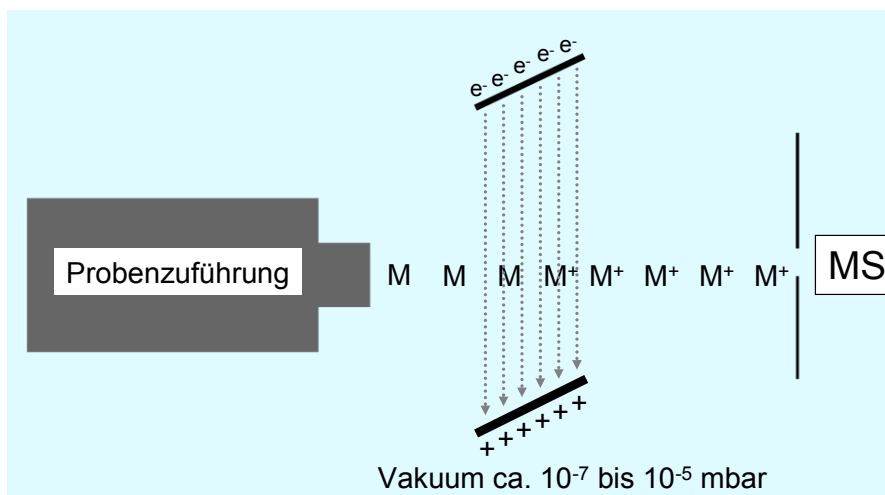
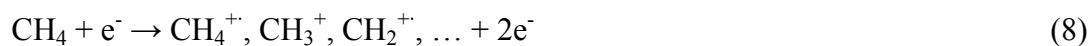


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer EI-Quelle nach [63].

2.2.4 Chemische Ionisation

Die Chemische Ionisation (CI) ist eine sanftere Ionisationsmethode als die EI und wird ebenfalls bei geringen Drücken durchgeführt. Mit der CI lassen sich häufig Molekülonen generieren und detektieren. Damit ist es möglich, die molare Masse fragiler Analyten zu bestimmen [54]. Der Druck in der Ionenquelle ist dabei deutlich höher als der in der EI-Quelle. Sonst sind beide Ionenquellen aber sehr ähnlich aufgebaut. In der CI-Quelle wird ein Reaktandgas zugegeben, welches den Druck auf etwa 0,1 – 2,5 mbar erhöht. Als Reaktandgas kommen häufig Methan oder Isobutan zum Einsatz [58,64,65]. Der primäre Ionisationsmechanismus ist dabei der gleiche wie bei der EI. Die Reaktandgase liegen aber in einem tausendfachen Überschuss vor und werden daher bevorzugt ionisiert. Anschließend finden Gasphasenreaktionen zwischen den gebildeten Reaktandgasen und den Analyten statt, wobei die wahrscheinlichsten Reaktionen die Protonierung und der Ladungstransfer sind. Gleichungen 8 - 12 zeigen einige mögliche Reaktionen am Beispiel des Methans als Reaktandgas [66,67]. Auf mögliche ungeladene Radikale wird in den folgenden Gleichungen nicht eingegangen.



M: Analyt

Die CI kann zur Erzeugung sowohl positiver als auch negativer Ionen eingesetzt werden. Der Zusatz von chloriertem Reaktandgas ermöglicht weitere Ionisationsmechanismen [68,69]. Wie diese kurze Zusammenfassung zeigt, ist der APCI-Mechanismus dem der CI sehr ähnlich. Der größte Unterschied besteht in der Anzahl der Stöße, die die Ionen nach ihrer Bildung erfahren. Dies gilt sowohl für die Primär- als auch für die Analytionen. Darüber hinaus ist die Zusammensetzung des Reaktandgases bei der APCI deutlich komplexer. In der CI ist die Gaszusammensetzung definiert.

2.2.5 Elektroneneinfang–Ionisation

Eine Variante der APCI bzw. der CI ist die Elektroneneinfang-Ionisation (EC; engl. Electron Capture). Diese Methode zeichnet sich durch ihre enorme Selektivität und Sensitivität gegenüber elektronenaffinen Verbindungen aus. Die Elektroneneinfang-Ionisation gehört zu den empfindlichsten analytischen Methoden überhaupt [5,70]. Die Ionisation erfolgt über den Einfang von energiearmen Elektronen, wobei die Analytionen anschließend negativ geladen sind. Entweder sind diese Ionen stabil und es handelt sich um den nicht-dissoziativen Mechanismus (Gleichung 13), oder die Ionen zerfallen nach dem dissoziativen Mechanismus (Gleichung 14) [5,71,72].



M: Analyt

A: Fragment 1

B: Fragment 2

e^- : Energiearmes Elektron

Der nicht-dissoziative Mechanismus ist üblicherweise empfindlicher [72]. Die benötigten Elektronen niedriger Energie werden, wie in der CI, nach Gleichung 8 generiert. Die aus der Glühkathode emittierten energiereichen Elektronen schlagen aus dem Reaktandgas thermische Elektronen mit sehr niedriger Energie heraus [67,72]. Das Reaktandgas ist auch für die Abkühlung, und den damit verbundenen Energieverlust der Elektronen und der Ionen durch Stöße zuständig [5,67]. Die EC-Ionisation funktioniert auch unter APCI-Bedingungen bei denen ebenfalls Elektronen niedriger Energie nach Gleichung 1 generiert werden können [70,73,74]. Vor dieser Entdeckung wurde die Flüssigchromatographie über ein Moving-Belt-Interface an die Niederdruckionenquelle gekoppelt, um die EC auch für die

flüssige Darreichungsform der Proben zugänglich zu machen [75,76]. Der Ionenquellenaufbau entspricht bei der Ionisation unter vermindertem Druck dem der CI [67] und unter Atmosphärendruck dem der APCI [74,77].

Die Selektivität dieser Ionisationsmethode stellt einen entscheidenden Vorteil dar. Zwar ist diese nicht so universell einsetzbar wie die bereits vorgestellten Ionisationsmethoden, doch bringt dieses auch Vorteile mit sich. So zeigen z.B. halogenierte Verbindungen eine starke Elektronenaffinität, während nicht halogenierte Verbindungen nicht ionisiert werden und deshalb selten stören [5,78]. Moleküle, welche keine natürliche Elektronenaffinität zeigen, können derivatisiert werden, um diese für die Analyse mittels EC-MS zugänglich zu machen [79-86].

Die EC ist eine sehr sensitive Ionisationsmethode, es wird sogar von Ionisationsausbeuten von nahezu 100% berichtet. Die sich daraus ergebenden detektierbaren Mengen Analyt liegen teilweise im zeptomolaren Bereich (10^{-21} mol) [5,87]. Aufgrund der Sensitivität eignet sich die EC-MS besonders gut für die Targetanalytik im Spurenbereich [82,84,88-91].

Problematisch bei dieser Methode ist, dass nicht nur ausschließlich der EC Ionisationsmechanismus stattfindet. Die Ionisationskaskade beginnt nicht direkt am Analyten und es laufen neben der EC auch andere Ionisationsmechanismen ab. Bedingt durch den Aufbau der Ionenquelle und durch den Mechanismus zur Elektronenbildung können weitere Ionisationsreaktionen ablaufen [5,70]. Ionen werden auch durch den EI bzw. CI-Mechanismus generiert und sorgen so für ein hohes Untergrundsignal. Weiter werden durch einige Verbindungsklassen die zur Ionisation benötigten Elektronen eingefangen, ohne, dass dieses zu einer effizienten Ionisation führt, sodass die Ionisationsausbeute nach dem EC-Mechanismus reduziert wird. Dieses führt zu kleineren Analytsignalen. Diese beiden Umstände erfordern eine Probenvorbereitung zur Entfernung möglichst vieler Bestandteile der Matrix [5,92]. Die Reproduzierbarkeit von Analysen auf verschiedenen Geräten leidet unter der unterschiedlichen Geometrie der Ionenquellen. Reaktionen mit der Wandoberfläche spielen eine große Rolle für die Fragmentierung und die Lebensdauer der erzeugten Ionen [5]. Kontaminationen der Ionenquelle stellen bei dieser empfindlichen Methode ebenfalls ein Problem dar [93].

2.2.6 Atmospheric Pressure Photo Ionization

Die Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI) ist die dritte weit verbreitete Ionisationsmethode unter Atmosphärendruck. Diese wurde im Jahre 2000 entwickelt [10,94], um, anders als bei der APCI, Moleküle aus der Gasphase direkt ionisieren zu können [47].

Darüber hinaus sollten der Massenspektrometrie sehr unpolare Moleküle zugänglich gemacht werden [32]. Die Ionisation erfolgt durch Photonen, welche die nötige Energie liefern. Häufig werden Kryptonlampen eingesetzt, um die benötigten Photonen im Vakuum-UV (VUV) zu liefern. Diese Lampen generieren Photonen mit der Wellenlänge 123,9 nm (10.03 eV) und 116,5 nm (10.64 eV) [4,94]. Der Aufbau der Ionenquelle ähnelt sehr stark dem der APCI [94]. Die Analytlösung wird verdampft und anschließend in der Gasphase ionisiert. Hier wird die Coronanadel allerdings durch eine VUV-Lampe ersetzt [10]. Der Aufbau einer APPI-Quelle ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

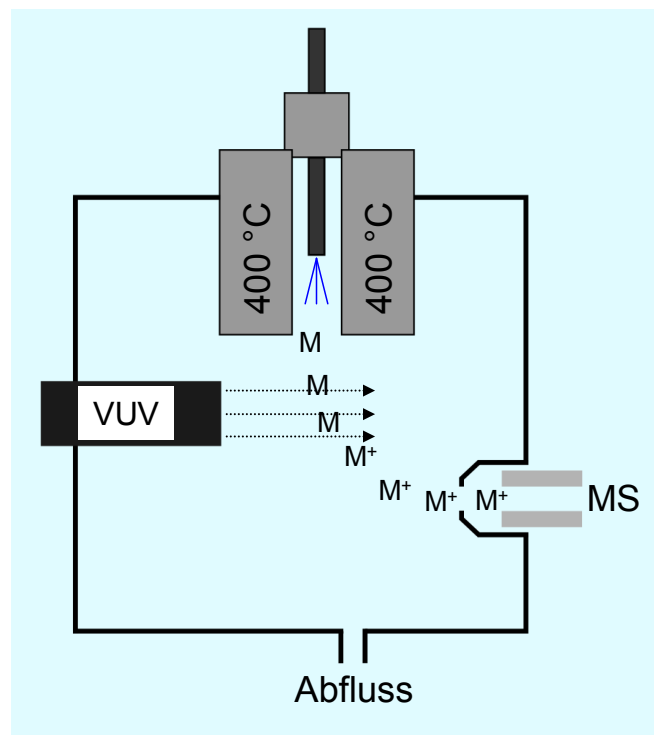


Abbildung 9: Aufbau einer APPI-Quelle.

Wie in der APCI kommt es bei der APPI bedingt durch Stöße im Atmosphärendruckbereich zur Ausbildung der thermodynamisch stabilsten Ionen. Der primäre Ionisationsmechanismus besteht hauptsächlich aus der Absorption des Photons und dem dadurch bedingten Verlust eines Elektrons [4]. Moleküle mit niedrigeren Ionisationspotentialen als die Energie der angebotenen Photonen lassen sich durch APPI ionisieren. Typischerweise sind es Aromaten oder Moleküle, welche Doppelbindungen aufweisen [33]. Gängige Lösemittel, wie Wasser, Acetonitril, Methanol, Chloroform sowie Dichlormethan und Gase, wie Sauerstoff und Stickstoff, welche in der Quelle anwesend sind, haben Ionisationsenergien, welche über 10.64 eV liegen, und werden deshalb nicht von den Photonen ionisiert [94].

2 Theorie

Dennoch eignen sich nicht alle dieser Lösemittel für den Einsatz in der APPI. Acetonitril z.B. hat bei den eingesetzten Wellenlängen einen hohen Absorptionsquerschnitt und verschlechtert deshalb die Ionisationsausbeute [95]. Dimere einiger Lösemittel, wie Methanol, lassen sich im Gegensatz zu ihren Monomeren dennoch ionisieren. Andere Lösemittel, wie Isopropanol, Toluol, Tetrahydrofuran, Aceton und Hexan, lassen sich von den bei der APPI anwesenden Photonen direkt ionisieren [3,94,95]. Diese Auflistung zeigt, dass bei einer direkten Ionisation der Analyten nicht jedes Lösemittel einsetzbar ist. Der Überschuss der direkt ionisierbaren Lösemittel absorbiert zu viele Photonen. Die Eindringtiefe der Photonen beträgt in einer APPI-Quelle üblicherweise weniger als 5 mm [96]. Dieser Umstand wird in der Dopant Assisted APPI (DA-APPI) ausgenutzt, um Analytionen indirekt zu erzeugen. Dafür werden zunächst Lösemittelmoleküle ionisiert, welche anschließend mit den Analyten stoßen und dabei ihre Ladung transferieren [3,94]. Bei den dabei stattfindenden Ionisationsmechanismen spielen die Ionisationsenergien sowie die Protonenaffinitäten der Dopantmoleküle und der Analyten eine Rolle [94]. Aufgrund der ausgeprägten Molekulation-Gasphasenchemie kann hier von photoinduzierter APCI gesprochen werden [3]. Mit der (DA-)APPI lassen sich sowohl Kationen als auch Anionen generieren [3].

Die APPI weist manchmal eine höhere Sensitivität als die APCI oder ESI auf [10,70], meistens liegen die Nachweisgrenzen jedoch im gleichen Bereich. Es gibt aber auch Beispiele, in denen z.B. die ESI der APPI überlegen ist. Z.B. ist dies für eine Reihe ausgesuchter pharmazeutischer Produkte der Fall [97]. Dieses ist wieder mit der starken Abhängigkeit der Ionisationsausbeute von der Molekülstruktur und der Polarität der Analyten zu erklären. Die Ionensuppression ist bei der APPI geringer als bei den anderen Atmosphärendruckionisationsmethoden [98].

Eine Vielzahl möglicher Ionisationsmechanismen und die unterschiedliche Reaktivität verschiedener Dopanten und Lösemittel erschweren das Auswerten der Massenspektren [98]. Neueste Untersuchungen von Benter *et al.* zum Ionisationsmechanismus der (DA-)APPI haben gezeigt, dass die Ionisation in der (DA-)APPI über die Bildung von protonierten Wasserclustern abläuft. Insbesondere nach der Ionisation des Dopanten bilden sich Wassercluster um den geladenen Dopanten, welche anschließend über Clusterwachstum und Stöße den ursprünglich ionisierten Dopanten deprotoniert verlieren. Zurück bleiben protonierte Wassercluster. Diese protonierten Wassercluster können alle Bestandteile der Gasphase über Ligandenaustauschreaktionen oder über Clusterwachstum aufnehmen. Anschließend werden die im Cluster befindlichen Analyten protoniert und der Cluster durch Stöße im Massenspektrometer zerstört. So bleiben lediglich die protonierten Analyten für die

massenspektrometrische Untersuchung zurück. Die folgenden Reaktionsgleichungen (15 - 20) zeigen die häufigsten Ionisationsreaktionen für die (DA-)APPI im positiven Ionisationsmodus (nach [99]).



M: Analytmolekül

$h\nu$: Photon

D: Dopant (z.B. Toluol)

2.2.7 Resonance-enhanced Multi Photon Ionization

Die Resonance-enhanced Multi Photon Ionization (REMPI) ist eine sehr empfindliche und selektive Ionisationsmethode [100]. Die Ionisation wird, wie in der APPI, über die Absorption von Photonen realisiert. Allerdings sind hier mindestens zwei Photonen notwendig, um die erforderliche Ionisationsenergie aufzubringen [101]. Die Energie des ersten Photons muss für die Zeit bis zur Absorption des zweiten Photons zwischengespeichert werden, was als Resonanz bezeichnet wird [102].

In der REMPI wird die Ionisation im Vakuum oder bei stark reduziertem Druck durchgeführt. Dazu wird die gasförmige Probe ins Vakuum expandiert. Durch die Expansion werden die Analyten bis auf wenige Kelvin (3 – 50 K) [102-104] abgekühlt und liegen in hoch definierten, energiearmen Energiezuständen vor [103]. Die Absorption des ersten Photons erfolgt nur, wenn der Analyt einen diskreten vibronischen Zustand besitzt, in welchem die Energie dieses Photons gespeichert werden kann. Durch die definierten Energiezustände der Analyten im Grundzustand sind die möglichen absorbierbaren Wellenlängen vorgegeben [105]. Die Absorption des zweiten Photons ionisiert den Analyten, indem ein Elektron das Molekül verlässt. Dieser Prozess läuft ab, wenn die Summe der Energie aus erstem und zweitem Photon größer ist als das Ionisationspotential des Analyten [102]. Die Wellenlänge des ersten Photons stellt hierbei eine analytspezifische Größe dar und erlaubt sogar die Unterscheidung zwischen Isomeren [105].

2 Theorie

Darüber hinaus ist auch die Lebensdauer des angeregten Zustands entscheidend für eine effiziente Ionisation [106]. Die von UV-Lampen erzeugte Photonenzahl mit der benötigten Wellenlänge reicht für einen Zweiphotonenprozess nicht aus. Daher kommen ausschließlich Laser zum Einsatz. Fragmentierung und sogar das Atomisieren der Analyten ist bei extrem hohen Laserleistungen möglich [104,107].

Die Abkühlung der Analyten ist ein entscheidender Faktor für die Selektivität. Je weniger die Analyten gekühlt werden, desto breiter werden ihre Absorptionsbanden und desto unspezifischer wird die Absorption des ersten Photons [106].

Die REMPI ist nicht nur auf zwei Photonen beschränkt. Die eingesetzten Photonen müssen auch nicht die gleiche Wellenlänge besitzen [108]. Allerdings ist die sogenannte (1+1)REMPI, bei der zwei Photonen der gleichen Wellenlänge für die Ionisation eingesetzt werden, die wahrscheinlichste und apparativ einfachste Form, sodass im Rahmen dieser Arbeit nicht auf weitere Möglichkeiten der REMPI eingegangen werden soll [108].

Abbildung 10 zeigt eine vergleichende, schematische Darstellung der Ionisationsmechanismen der APPI und der REMPI.

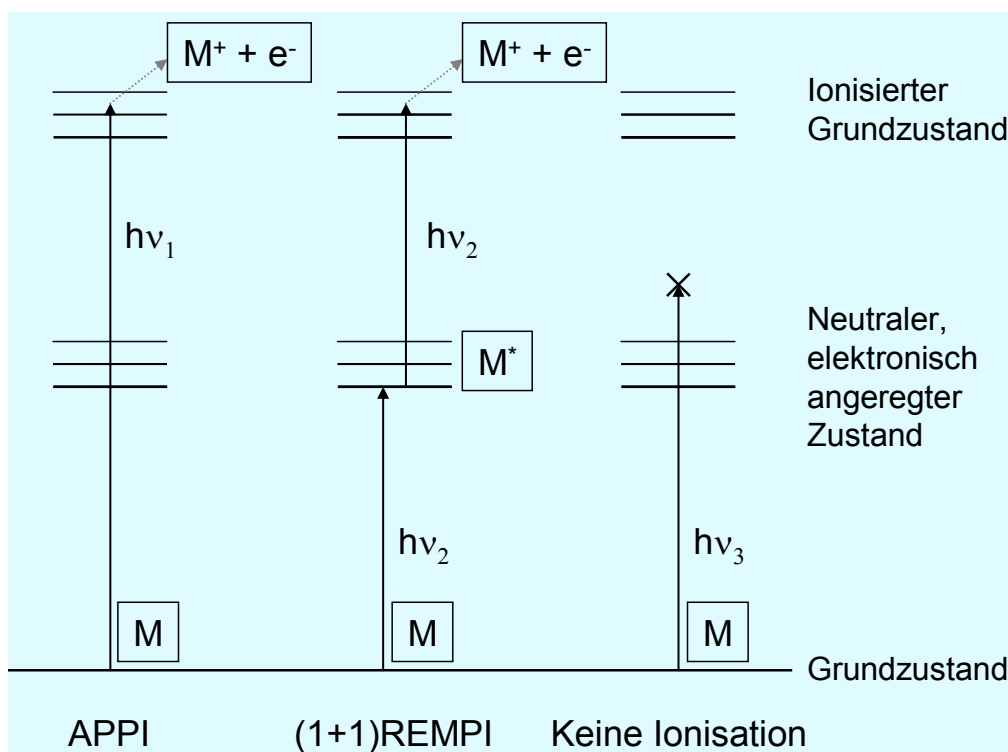


Abbildung 10: REMPI-Ionisationsmechanismus nach [102,105,109]. M: Analyt; M^* : elektronisch angeregter Analyt; $h\nu_x$: Photon mit der Energie x.

Die REMPI ist eine sehr sanfte Ionisationsmethode, mit der sogar fragile Systeme wie van-der-Waals-Komplexe generiert bzw. untersucht werden können [101,108]. Die wichtigsten

Vertreter der mittels REMPI ionisierbaren Verbindungen stellen aromatische Verbindungen [108,110-112], kleine Gasmoleküle, wie CO, NO und NO₂ [24,109,113] und polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane dar [114,115].

Die Limitierung der REMPI liegt in der Selektivität. Zum einen können nicht alle Analyten mit dieser Methode ionisiert werden, zum anderen müssen die zu untersuchenden Analyten charakterisiert und ihre Resonanzwellenlänge bekannt sein. Durch die Expansion ins Vakuum wird das den Analyten zur Verfügung stehende Volumen extrem vergrößert. Das vom Laser bestrahlte Volumen ist jedoch deutlich kleiner als das Volumen des Expansionsbereichs. Dadurch werden bei weitem nicht alle zu ionisierenden Moleküle vom Laserlicht erfasst. Je weiter von der Düse entfernt ionisiert wird, desto mehr Empfindlichkeit geht verloren [103]. Darüber hinaus werden große und teure durchstimmbare Laser benötigt, um die erforderlichen Wellenlängen mit ausreichender Photonendichte zu erzeugen. Versuche, bei denen die Analyten nicht zu sehr abgekühlt werden, sind auf gasförmige kleine Moleküle beschränkt [103].

Es wurden REMPI-Label für die Derivatisierung von kleinen aliphatischen Aminen und Aldehyden vorgestellt, mit denen diese Verbindungen mittels REMPI der Massenspektrometrie zugänglich gemacht wurden. Diese Methode wurde aufgrund der Notwendigkeit der gasförmigen Probenzuführung nicht für größere Verbindungen durchgeführt [116]. In der Literatur lassen sich keine Beispiele für eine flüssige Probenzuführung finden. Feste Proben wurden nach Laserablation von einer Oberfläche mittels REMPI ionisiert und untersucht [117]. Diese Methode ermöglichte sogar die REMPI-Analyse von Nukleotiden, welche mit Anthracen derivatisiert wurden [118]. Es gibt wenige Beispiele in der Literatur bei denen REMPI auch bei mittlerem oder Atmosphärendruck in einer Inertgasatmosphäre durchgeführt wird [57,119-121]. Eine routinemäßige Anwendung der REMPI bei höheren Drücken wurde bisher nicht etabliert.

2.2.8 Atmospheric Pressure Laser Ionization

Die Atmospheric Pressure Laser Ionization (APLI) ist eine an der Bergischen Universität Wuppertal entwickelte Ionisationsmethode [4]. Bei der APLI handelt es sich im Prinzip um den REMPI-Prozess bei Atmosphärendruck in einer Luft-/Stickstoffatmosphäre. Die Selektivität und Sensitivität der REMPI bleibt größtenteils erhalten. Bei Drücken um 1 bar sind die Analyten durch die fehlende Expansion ins Vakuum nicht gekühlt. Diese werden bei der Probenzuführung durch einen Gaschromatographen oder einen heißen Verdampfer sogar geheizt, die molekularen Schwingungen werden so nicht unterbunden. Dadurch ist ihre

2 Theorie

Energie nicht genau definiert und unterliegt einer breiten Verteilung. Das Energieniveau des angeregten Zustands ist ebenfalls nicht definiert und erstreckt sich über einen breiten Bereich. Dadurch werden die Absorptionsbanden der Moleküle sehr breit und es werden keine energetisch hoch definierten Photonen mehr benötigt. Der Übergang von dem elektronischen Grundzustand in den angeregten Übergangszustand kann mit Photonen aus einem relativ breiten Wellenlängenbereich realisiert werden. Dadurch lassen sich UV-Laser, welche bei 248 bzw. 266 nm Licht emittieren, sehr effizient zur Ionisation einsetzen [4,30,30,119]. Diese Ionisationsmethode ist immer noch sehr selektiv für aromatische Verbindungen, da nur diese den für die Ionisation benötigten angeregten Übergangszustand mit einer ausreichenden Lebensdauer aufweisen. Dieser ist mit der eingesetzten Photonenenergie (ca. 5 eV) erreichbar [4,122]. Allerdings ist die Unterscheidung von Isomeren nicht mehr möglich. Es unterscheidet sich lediglich die Ionisationsausbeute. Der Mechanismus ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

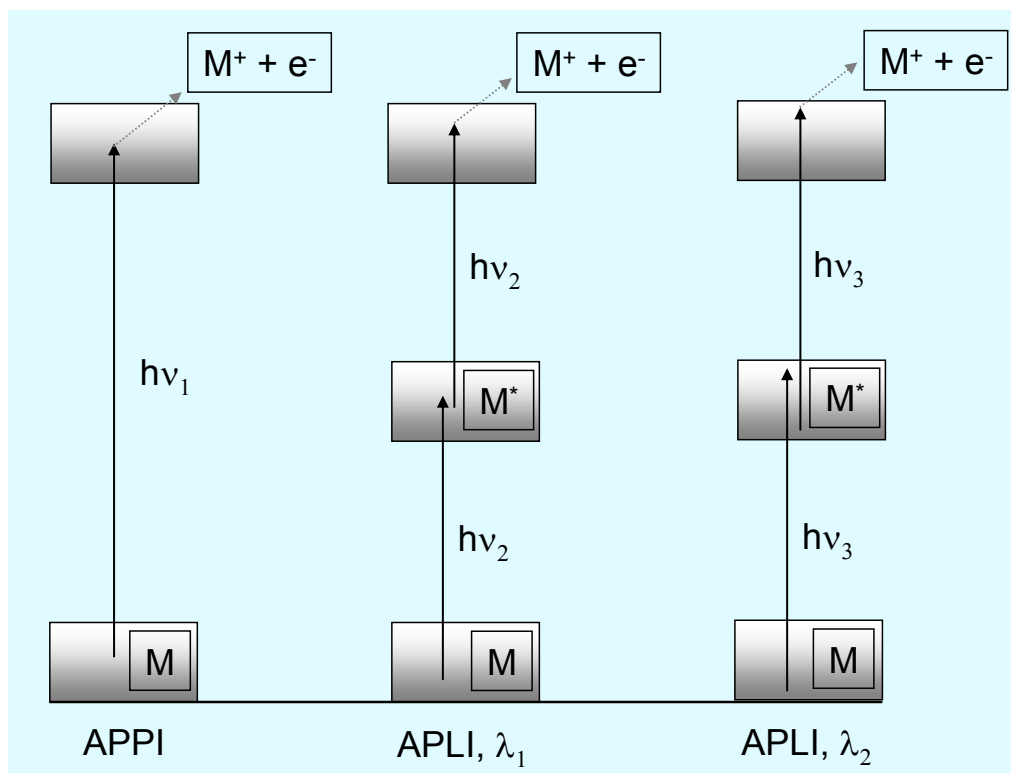


Abbildung 11: Schematische Darstellung des APLI-Ionisationsmechanismus. M: Analyt; M^{*}: elektronisch angeregter Analyt; λ_x : Wellenlänge x; $h\nu_x$: Photon mit der Energie x.

Die Selektivität lässt die Analyse komplexer Proben, wie Erdölfraktionen, auf ihre aromatische Zusammensetzung ohne aufwendige Probenvorbereitung zu [123-125]. Anders als die REMPI lässt sich die APLI sehr leicht mit den gängigsten Trennmethode koppeln.

Die Kopplungen zur Gaschromatographie, Flüssigchromatographie und Kapillarelektrochromatographie wurden bereits realisiert [26,33,126]. Verglichen mit der ESI, APCI und APPI lässt sich die APLI nicht nach der Polarität der Analyten einordnen. Hier ist einzig die Anwesenheit des Übergangszustandes notwendig. Die APLI ist eine sehr sanfte Ionisationsmethode, bei der Fragmentierungsreaktionen bedingt durch den Ionisationsprozess vernachlässigbar sind. Wird Laserlicht einer Wellenlänge von ca. 250 nm mit der richtigen Energiedichte eingesetzt, ist (1+1)REMPI der einzig mögliche Ionisationsmechanismus, sodass APLI extrem selektiv und sensitiv für aromatische Verbindungen ist. Anders als in der APPI absorbieren die meisten in der HPLC eingesetzten Lösemittel das Laserlicht nicht und haben damit keinen Einfluss auf den Ionisationsmechanismus [4,26,33,36].

Verglichen mit der APPI ist die APLI eine Methode, welche für geeignete Analyten ein korrektes Abbild der Probe liefert. Bei der APPI werden apolare Moleküle zwar universeller ionisiert, doch es kommt dabei auch zu Oxidationsreaktionen der generierten Ionen in der Gasphase, sodass die detektierten Molekülmassen kein Abbild der Probenbestandteile mehr darstellen müssen. In der APPI werden Oxidationen mit in der Ionenquelle vorhandenen Radikalen erklärt. Es werden durch die energiereichen Photonen Gase wie Sauerstoff angeregt und Wasser zu Radikalen gespalten. Diese Spezies nehmen an Gasphasenreaktionen teil und verfälschen das Massenspektrum der Probe [96,123]. Bei der APLI (mit emittierten Wellenlängen > 240 nm, [127]) wurden diese Oxidationsreaktionen bisher nicht beobachtet, es kommt zwar ebenfalls zu Gasphasenreaktionen, dies ist aber nur durch die zahlreichen Stöße nach der Ionisation bei Atmosphärendruck bedingt [128]. Bisher wurden nur Wasserstoffabstraktion bzw. -addition, abhängig vom Analyten und der Matrix, beobachtet [26,36,125].

Der Aufbau der Ionenquelle entspricht dem der APCI bzw. der APPI. Es wird lediglich die Coronanadel bzw. die VUV-Lampe entfernt und dafür ein Quarzglasfenster für das Laserlicht eingefügt. Die Probe wird entweder über einen Gaschromatographen oder über einen geheizten Zerstäuber gasförmig in die Quelle eingebracht. Die Analyten werden in der Gasphase ionisiert und über elektrische Felder oder fluiddynamisch in das Massenspektrometer transportiert.

Es hat sich gezeigt, dass die APLI weniger anfällig ist für die Parameter der Probenzuführung. Bei der ESI [47], APCI und der APPI hängt die Ionisationsausbeute vom Fluss und der Temperatur des Sprayers ab. Die APLI scheint darauf nicht zu reagieren [123]. Die APLI ist auch unabhängig von der Zusammensetzung der mobilen Phase. Ein Vorteil der APLI gegenüber anderen Ionisationsmethoden ist weiter, dass der Ort der Ionisation frei wählbar ist.

2 Theorie

Durch das Ausrichten des Lasers kann die optimale Position für die Erzeugung der Ionen gewählt werden. Diese Optimierung ist bei den anderen Ionisationsarten nicht möglich [129]. Zudem lässt sich der Laserstrahl in eine ESI-Quelle einkoppeln, so lassen sich simultan zwei Ionisationsmechanismen gleichzeitig realisieren. Mit einer solchen Kombination lassen sich neben der ESI, die polare Analyten ionisiert, auch apolare aromatische Analyten, welche von der ESI nicht erfasst werden, mittels APLI in einem Analysenlauf untersuchen [33]. Eine Kombination aus APCI und APLI wurde ebenfalls demonstriert [26]. Der Vorteil der APLI gegenüber der EI und EC ist die Stabilität der gebildeten Ionen, diese zeigen bei der APLI keine durch die Ionisation induzierten Fragmentierungsreaktionen. Außerdem lässt sich ein Massenspektrometer, welches eine AP-Ionenquelle besitzt, leicht mit angeschlossener LC oder GC und der APLI koppeln. Spektrometer mit einer EI- bzw. CI-Quelle sind nicht ohne weiteres mit einer LC koppelbar.

Die APLI ist allen hier vorgestellten Ionisationsmethoden in Bezug auf die Einfachheit des Ionisationsmechanismus überlegen. Es findet nur Ionisation über den REMPI-Prozess statt. Dieses macht das System berechenbar und die Massenspektren leicht interpretierbar. Darüber hinaus können sowohl gasförmige als auch flüssige Proben zugeführt werden. Im Vergleich zur EC ist die APLI etwas weniger sensitiv, allerdings ist die Kopplung mit der LC einfacher. Die APLI ist bis auf die REMPI und die EC allen hier vorgestellten Ionisationsmethoden im Hinblick auf die Sensitivität überlegen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die APLI eine wertvolle Ergänzung zu den bereits etablierten Ionisationsmethoden darstellt [130].

Um den Einsatzbereich der APLI auch auf nicht-aromatische Analyten auszuweiten, wurden Ionisationsmarker vorgestellt, welche sich kovalent an die zu untersuchenden Analyten addieren lassen [122,131]. Weiterhin wurde die Dopant-Assisted-APLI (DA-APLI) mit Toluol als Dopant eingeführt. Dabei wird, wie in der DA-APPI, eine ionisierbare Verbindung in die Ionenquelle eingebracht. Über die Ionisation des Toluols durch den Laser und anschließenden Ionenmolekülreaktionen lassen sich auch nicht aromatische Verbindungen indirekt über die APLI ionisieren [4,26]. Dieses Phänomen der Gasphasenreaktionen hat sich jedoch auch als Problem bei komplexen Matrices herausgestellt. Die ionisierten Analyten dienen dort als Dopanten und ionisieren nicht aromatische Verbindungen, was zu einem Intensitätsverlust der Analytsignale führen kann [132]. Generell kommt es in Ionenquellen, in denen die Ionen nach ihrer Bildung viele Stöße erfahren, zu Konkurrenzreaktionen um die generierten Ladungen. In AP-Quellen werden meistens die thermodynamisch stabilsten Ionen beobachtet. Dies liegt an der Möglichkeit der Ionen, mit anderen Gasphasenteilchen zu interagieren [50,133]. Die Ionensuppression und die Dopant-Assisted-Technik kann als

gleicher Effekt angesehen werden, im ersten Fall ist dieser unerwünscht, im zweiten ist er hingegen gewollt. Aus diesem Grund ist, bei einer direkten Ionisation durch die APLI, eine chromatographische Abtrennung der Analyten von anderen Probenbestandteilen häufig unerlässlich.

2.3 Chromatographische Trennmethode

Die Stofftrennung spielt in der Analytik eine wichtige Rolle, wobei die Chromatographie dabei zu den wichtigsten Methoden zählt. Chromatographie wird eingesetzt, um Stoffe möglichst rein detektieren zu können. Bei selektiven Detektoren wie den Massenspektrometern, welche Stoffe über deren Massen unterscheiden können, wird die Chromatographie eingesetzt, um Interferenzen zwischen den Analyten, wie z.B. die Ionensuppression, zu beseitigen oder zu reduzieren. Es können auch Isobare bzw. Isomere getrennt und einzeln detektiert werden. Ebenso ist es wichtig, Verbindungen kleiner Konzentration von Verbindungen mit großer Konzentration zu trennen. Die großen Signale der stark konzentrierten Analyten würden die der schwach konzentrierten Analyten überdecken [14].

Bei der Chromatographie handelt es sich um ein physikalisch-chemisches Trennverfahren. Die Trennung beruht auf der wiederholten Verteilung der Stoffe zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Befindet sich der Analyt in der mobilen Phase, wird dieser mit der Geschwindigkeit der mobilen Phase transportiert. Befindet sich der Analyt in oder auf der stationären Phase, wird dieser nicht bewegt. Die Verteilung zwischen den Phasen ist dabei abhängig von den Moleküleigenschaften des Analyten. So passieren Stoffe mit verschiedenen Eigenschaften eine gegebene stationäre Phase aufgrund unterschiedlich starken Wechselwirkungen unterschiedlich schnell. Die Retentionszeit eines Analyten ist bei einem gegebenen chromatographischen System eine molekulspezifische Größe. So können Moleküle teilweise auch ohne spezifischen Detektor über den Vergleich mit Standards identifiziert werden [63].

Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) und die Gaschromatographie (GC) stellen die wichtigsten Vertreter der chromatographischen Trennmethode dar [134]. Bei der HPLC ist die mobile Phase flüssig, während in der GC eine gasförmige mobile Phase verwendet wird. Dies resultiert in fundamental unterschiedlichen Trennmechanismen und Einsatzgebieten. In der HPLC ist die Adsorption, in der GC ist der Dampfdruck der Verbindung der entscheidende Faktor für die Retention. Die HPLC ist sowohl für kleine und große, als auch für polare und apolare Analyten geeignet. Die GC hingegen ist beschränkt auf

2 Theorie

flüchtige und thermisch stabile Verbindungen [54,134]. Abbildung 12 zeigt einen Überblick der Einsatzgebiete der HPLC sowie der GC, gekoppelt mit einem MS als Detektor, und einige typische Analytklassen und deren Zuordnung zu den für sie möglichen chromatographischen Methoden. Die gezeigten Grenzen sind nicht klar definiert und können über chemische Derivatisierung erweitert werden.

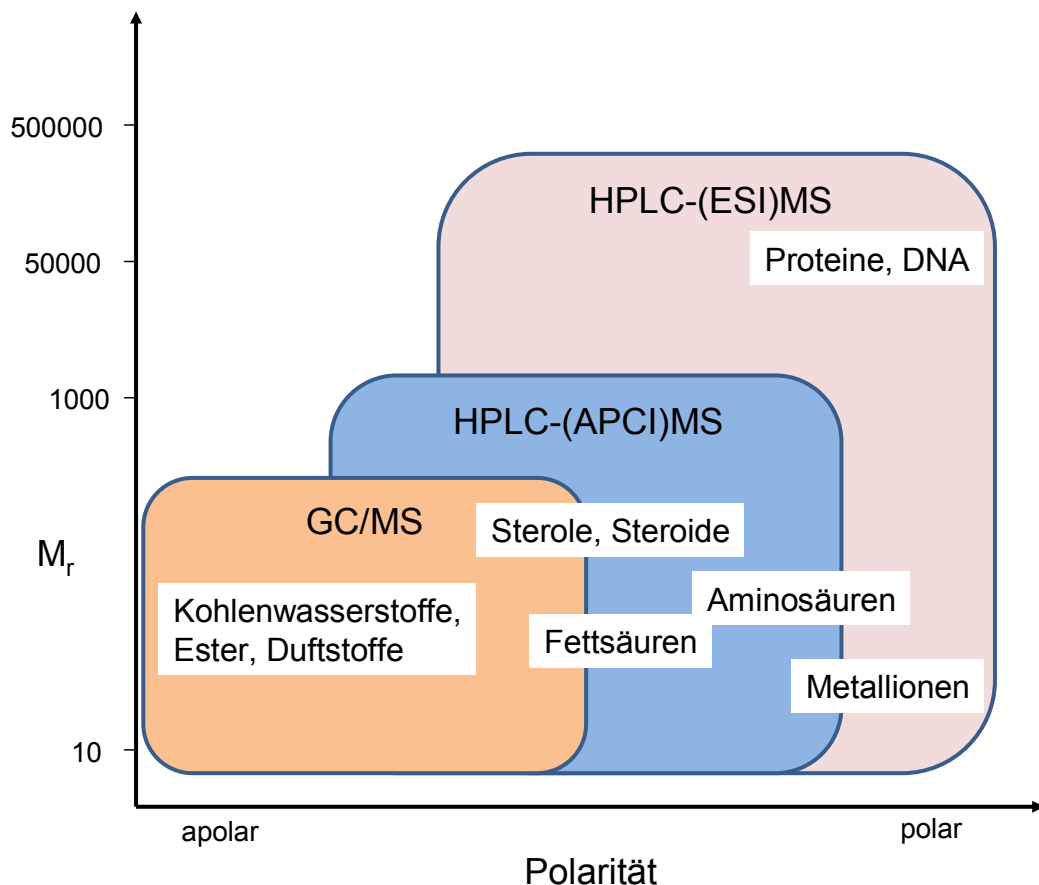


Abbildung 12: Überblick der Einsatzgebiete der HPLC und der GC nach [15].

Über die Wahl der stationären und der mobilen Phase in der HPLC lässt sich das System an die Anforderungen der Probe sehr gut anpassen. Die Kombination mit der die meisten analytischen Trennungen durchgeführt werden können, besteht aus einer hydrophoben stationären und einer hydrophilen mobilen Phase. Diese Konfiguration wird Reversed Phase-HPLC (RP-HPLC) genannt [134]. Um apolare Analyten zu eluieren, wird die Zusammensetzung der mobilen Phase über die Zeit verändert. Die Polarität der mobilen Phase wird derjenigen der stationären Phase angepasst, sodass nach Möglichkeit alle Substanzen von der Säule eluiert werden [135]. Diese Methode wird Gradientenelution genannt. Es gibt auch die Möglichkeit, den pH-Wert über Puffer anzupassen oder mit der Zeit zu ändern, um

die Löslichkeit der Analyten in der mobilen Phase und damit ihre Elutionsgeschwindigkeit zu erhöhen [14,32].

In der GC wird die Elutionskraft des als mobile Phase eingesetzten Gases über die Temperatur gesteuert. Es kommen heutzutage häufig hydrophob belegte Kapillarsäulen zum Einsatz, durch welche das Trägergas über einen Druckgradienten transportiert wird [136]. Eine Erhöhung der Temperatur hat eine Erhöhung des Dampfdruckes der Analyten zur Folge und erhöht dadurch deren Konzentration in der mobilen Phase und somit auch deren Geschwindigkeit auf der Trennstrecke [137].

In der HPLC werden Flüsse bis zu mehreren mL/min für die mobile Phase verwendet [135]. In der GC sind es einige mL/min Gas [138]. Dieser Umstand stellt unterschiedliche Anforderungen an die Kopplung mit einem Massenspektrometer dar. Während die GC aufgrund der geringen Massenflüsse sehr leicht sowohl an AP-Quellen [26,34,49,126] als auch an Niederdruckquellen gekoppelt werden kann, ist die HPLC nur über einen größeren apparativen Aufwand in Verbindung mit Niederdruckquellen einsetzbar [59-62,75,76]. Somit eignen sich, bis auf die ESI, alle oben beschriebenen Ionisationsmethoden für die GC. Für die HPLC sind nur Kopplungen mit der ESI, der APCI, der APPI, der APLI und der EC, als Variation der APCI, leicht realisierbar. Die GC zeichnet sich durch die hohe Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Trennleistung aus [54], während sich die HPLC durch einen weiten Anwendungsbereich über nahezu alle Analytklassen auszeichnet. Die Methodenentwicklung für die GC ist häufig einfacher, da der Freiheitsgrad der Zusammensetzung der mobilen Phase fehlt. Bei gegebener Trennsäule sind bei der HPLC viele Lösemittelkombinationen bei einem weiten pH-Bereich als mobile Phase denkbar, in der GC werden standardmäßig Helium, Wasserstoff oder Stickstoff als Trägergas eingesetzt. Somit muss in der GC lediglich das Temperaturprogramm ausgearbeitet werden.

2.4 Multipurpose Ion Source, Transferline und Laser

In diesem Kapitel wird auf die in dieser Arbeit verwendete Ionenquelle, die Multipurpose Ion Source (MPIS), eingegangen. Dabei soll der Aufbau der gesamten Messapparatur erläutert werden. Die MPIS wurde von Schiewek et al. im Jahre 2008 vorgestellt [26,131]. Diese besteht aus einem würfelförmigen Metallgehäuse, welches an fünf der sechs Seiten Öffnungen aufweist. Abbildung 13 zeigt das Design der Ionenquelle in der HPLC- bzw. der GC-Konfiguration.

Eine der Öffnungen ist für den Anschluss an das Massenspektrometer gedacht. Oben ist die Aufnahme für den APCI-Heater, welcher für das Versprühen und Verdampfen der flüssigen

2 Theorie

Phase eingesetzt wird. Auf der gegenüberliegenden Seite des Massenspektrometers befindet sich eine Öffnung für die Transferline der GC (GC-TFL). Orthogonal zu der Achse MS-GC-TFL sind zwei Öffnungen für den Laserstrahl vorhanden, welche jeweils mit einem Quarzglasfenster versehen sind. Beide Fenster können verschlossen werden, sodass der Laserstrahl von beiden Seiten eingekoppelt werden aber nicht auf der anderen Seite wieder austreten kann. Die Metallabdeckungen der Fenster enthalten jeweils eine Keramik, welche beim Auftreffen des Laserstrahls fluoresziert. Hierüber kann die Position des Lasers reproduzierbar eingestellt werden. Abweichend zu der von Schiewek et al. vorgestellten Quelle besaß die in dieser Arbeit verwendete Quelle eine temperaturgesteuerte Heizung. Diese wurde von Dennis Klink, Bergische Universität Wuppertal, als Weiterentwicklung der Quelle verbaut.

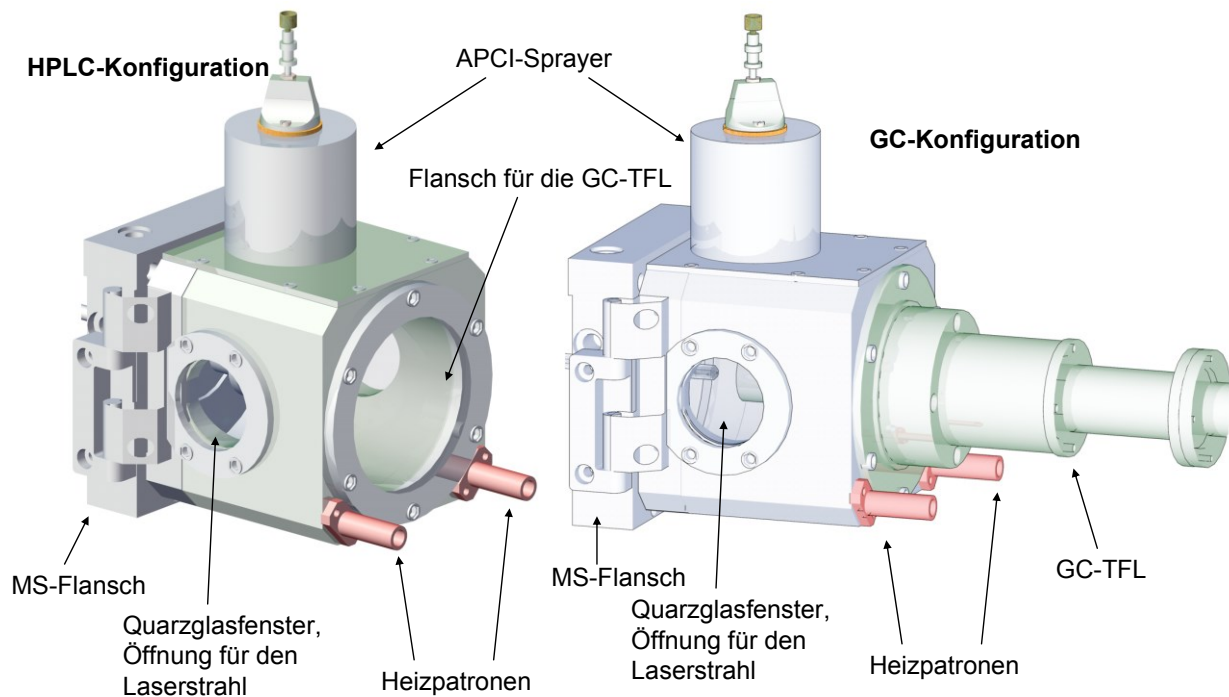


Abbildung 13: Aufbau der MPIS in der HPLC- bzw. der GC-Konfiguration. Abbildungen der Quelle sind von Ronald Giese, Bergische Universität Wuppertal, angefertigt worden.

Es ist möglich den APCI-Sprayer durch eine ESI-Nadel zu ersetzen. Die Corona-Nadel kann gegenüber dem Quarzglasfenster anstatt der Metallplatte mit der eingebauten Keramik angebracht werden. So ist die MPIS schnell für die gängigsten Atmosphärendruckionisationsmethoden umrüstbar [26].

Der in dieser Arbeit eingesetzte Laser ist ein KrF*-Excimer-Laser, der UV-Licht der Wellenlänge 248 nm emittiert. Der Laser kann eine maximale Pulsenergie von 18 mJ und eine maximale Repetitionsrate von 300 Hz liefern. Die Pulsdauer beträgt dabei 4-6 ns. Der Querschnitt des Lasers hat eine Fläche von 24 mm² [139]. Der Laser hat die Maße 54 cm x 47 cm x 37 cm [140].

Ein Excimer-Laser ist ein Zweiniveausystem, bei dem durch die Bildung angeregter Edelgas-Halogenid-Komplexe die erforderliche Besetzungsinversion realisiert wird. Bei dem hier verwendeten Laser werden über eine Hochspannungsentladung KrF*-Komplexe erzeugt. Durch spontane Emission wird, wie bei Drei- oder Vierniveaulasern, die Emission induziert und die Komplexe zerfallen. Das emittierte UV-Licht kann über ein Fenster ausgekoppelt werden [141-143]. Anschließend wird das Licht über einen beweglichen Spiegel in die Ionenquelle gelenkt. Aus Arbeitsschutzgründen wurde der gesamte Weg des Laserlichts in ein Rohr aus Aluminium gekleidet. Ein schematischer Versuchsaufbau ist in Abbildung 14 gezeigt.

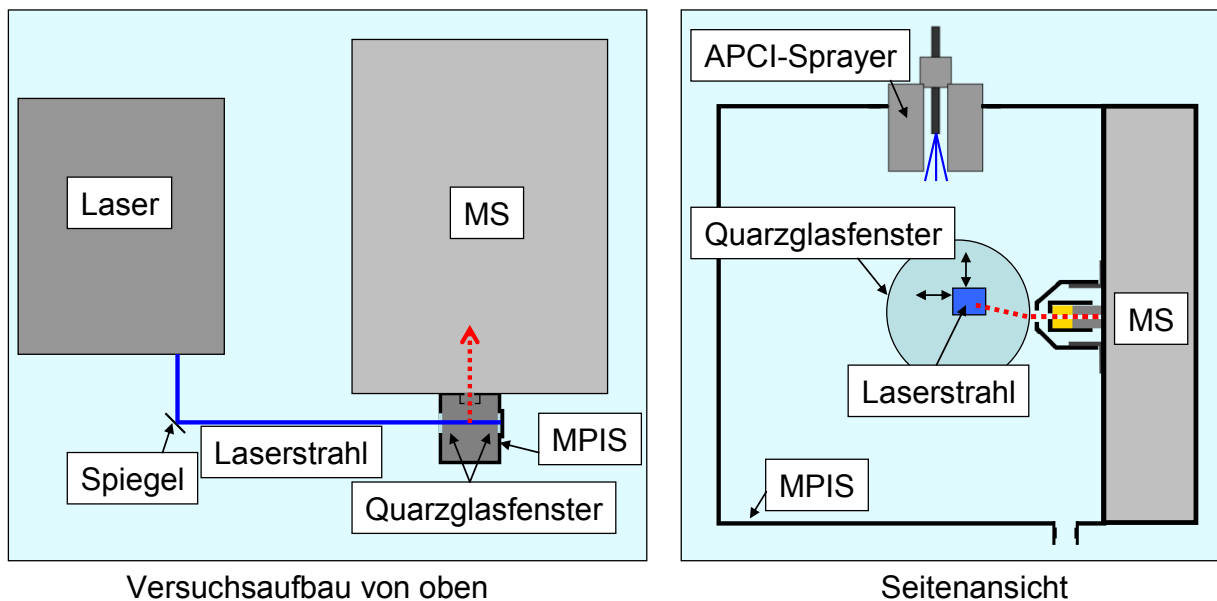


Abbildung 14: Schematischer Versuchsaufbau für die HPLC-Konfiguration. Laserstrahl ist blau dargestellt. Die Ionen sind rot angedeutet.

Flüssige Proben werden über den APCI-Sprayer verdampft und anschließend mit dem Laser bestrahlt. So lassen sich die Kopplung zur HPLC und eine Direktinjektion (DI) über eine Spritze mit einer Spritzenpumpe realisieren.

Die GC wird über eine geheizte Transferline (TFL) angebunden. Die TFL stellt den Übergang für die GC-Säule aus dem GC-Ofen bis zur Strahlfläche des Lasers dar. Die Transferline lässt

sich auf max. 350 °C heizen. Der Ausgang der GC-Säule wird ca. 0,5 mm aus der TFL geschoben und ragt so direkt ins Laserlicht. Zusätzlich wird die Säule mit 0,5 L/min heißem Stickstoff, dem Sheathgas, aus zwölf Düsen umspült. Die Temperatur der TFL in den in dieser Arbeit durchgeführten GC-Messungen wurde auf 332 °C eingestellt. Die TFL ist ca. 30 cm lang, dies bedeutet, dass die letzten 30 cm der GC-Säule isotherm bei 332 °C geheizt werden. Der Rest der Trennsäule durchläuft das Temperaturprogramm des Gaschromatographen. Da das Massenspektrometer ca. 130 L/h Gas ansaugt, wird über den APCI-Verdampfer die Gasbilanz ausgeglichen. Der Gaszufluss zu der offenen AP-Quelle sollte über dem Gasabfluss gehalten werden, um ein Überlaufen der Quelle zu gewährleisten und Kontaminationen durch die Raumluft zu vermeiden. In Abbildung 15 ist ein schematischer Aufbau der GC-Konfiguration gezeigt.

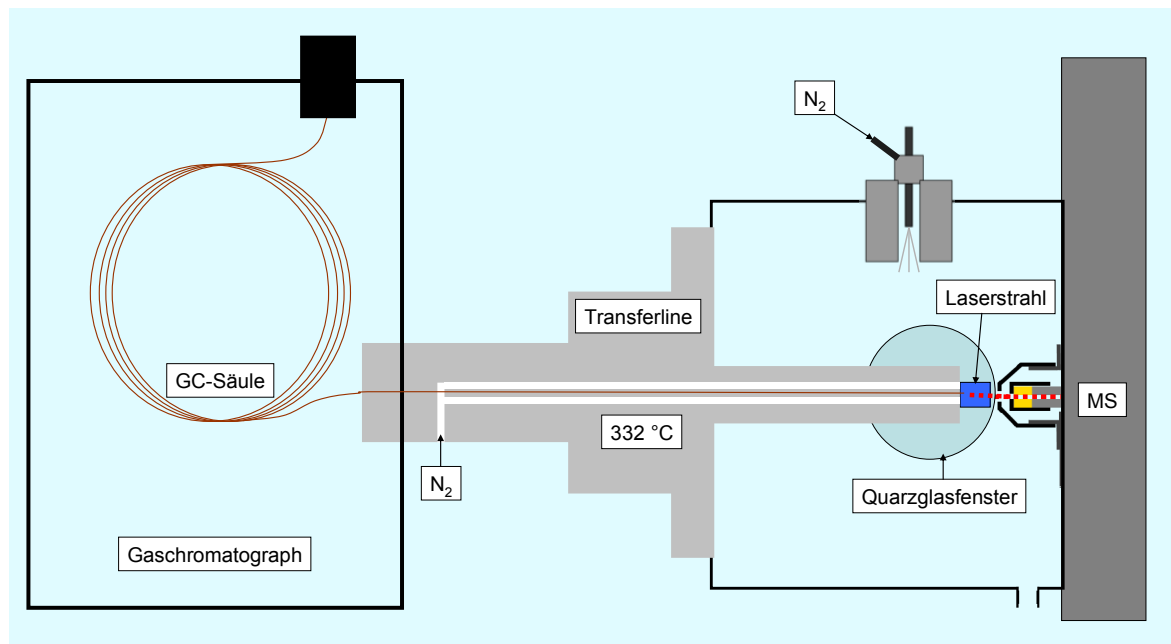


Abbildung 15: Schematischer Versuchsaufbau der GC-Konfiguration. Die gebildeten Ionen sind rot dargestellt.

2.5 Derivatisierungsreaktionen in der Analytik

Derivatisierungsreaktionen werden in der Analytik zahlreich eingesetzt, wobei der Analyt chemisch verändert wird, um ihn so einer Analyse besser zugänglich zu machen. Es gibt drei Derivatisierungsprinzipien: Die Vorsäulenderivatisierung, die On-Column-Derivatisierung und die Nachsäulenderivatisierung.

Bei der Nachsäulenderivatisierung wird der Analyt nach der chromatographischen Trennung derivatisiert, um ihn ausschließlich einer bestimmten Detektionsart zugänglich zu machen.

Bei der On-Column-Derivatisierung in der GC wird der Analyt mit dem Derivatisierungsreagenz gleichzeitig in den Injektor gegeben, wo dann die Derivatisierung stattfindet [144]. Dieses dient der Dampfdruckerhöhung, verbessert die Trennung und die Detektion. Bei der Vorsäulenderivatisierung ist der Derivatisierungsschritt ein Teil der Probenvorbereitung. Hier wird der Analyt chemisch verändert, um verschiedene Ziele zu erreichen. So kann die Derivatisierung die Probenvorbereitung erleichtern, die chromatographische Trennung verbessern oder mit einer bestimmten Trenntechnik erst realisieren und/oder die Detektion verbessern oder ermöglichen [144-146]. Als letzter wichtiger Punkt sei noch erwähnt, dass die Vorsäulenderivatisierung ein selektiver Schritt sein kann, sodass nur die Analyten oder nur störende Matrixbestandteile derivatisiert werden. Dieses kann dazu führen, dass Matrixeffekte beseitigt werden oder nur bestimmte Analyten einer Detektionsart zugänglich werden [147]. Häufig wird mehr als nur ein Ziel mit Derivatisierungsreaktionen erreicht. So lässt sich z.B. manchmal neben verbesserter Sensitivität für eine Ionisationsmethode auch gleichzeitig eine bessere Trennung erreichen [148-150]. Im Folgenden werden einige wichtige Anwendungsgebiete für Derivatisierungsreaktionen aufgeführt und die Bedeutung des Konzepts der Derivatisierung herausgearbeitet.

Wie in Kapitel 2.4 erwähnt, ist die GC nur für flüchtige Verbindungen einsetzbar. Viele Verbindungsklassen aus der Natur und dem Alltag wie z.B. Fettalkohole, Phenole, Fettsäuren, Zucker, Fettsäureamide, Lipide, Thiole, Aminosäuren, Steroide und Opiate sind für die Analyse mit der GC nicht geeignet, da diese häufig zu niedrige Dampfdrücke aufweisen oder nicht unzersetzt verdampfbar sind. Eine gängige Methode, um die Polarität solcher Verbindungen abzusenken und so den Dampfdruck zu erhöhen, besteht in der Silylierung der polaren Gruppen [151,152]. Acetylierung und Alkylierung dieser Verbindungsklassen sind ebenfalls Möglichkeiten, die Polarität herabzusetzen [153-155]. Tabelle 1 zeigt gängige Derivatisierungsreaktionen zum Absenken der Polarität von Analyten für die GC. Derivatisierungsreaktionen lassen sogar die Analyse von Ionen wie Nitrit (NO_2^-) mittels GC zu [156]. Durch Vorsäulenderivatisierungen kann das Einsatzgebiet der GC enorm erweitert werden.

Tabelle 1: Beispiele für Derivatisierungsreaktionen in der GC nach [151,153,154]. R: Alkylrest

Funktionelle Gruppe	Silylierung	Acetylierung	Alkylierung
-OH	-O-SiR ₃	-O-COR	-O-R
-COOH	-COO-SiR ₃	-COOCOR	-COOR
-NH ₂	-NH-SiR ₃	-NH-COR	-NHR; -NR ₂

In der HPLC werden häufig UV- oder Fluoreszenz-Detektoren eingesetzt. Viele organische Moleküle wie z.B. Aminosäuren, Carbonsäuren und Zucker besitzen aber keine oder nur unzureichend chromophore Gruppen und können deshalb nicht oder nur sehr schlecht über UV- bzw. Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden [157]. Derivatisierungsreaktionen sind in der Lage, Chromophore an sehr viele verschiedene funktionelle Gruppen zu binden und so die Detektion über optische Methoden zu ermöglichen.

Häufig wird bei Derivatisierungsreaktionen die Nucleophilie bzw. die Elektrophilie von funktionellen Gruppen am Analyten ausgenutzt. Die in dieser Arbeit untersuchten funktionellen Gruppen und deren Derivatisierungen werden in Kapitel 4 diskutiert. Derivatisierungsreagenzien können bereits aktiviert vorliegen und direkt mit dem Analyten reagieren [158-170] oder müssen erst über geeignete Kopplungsreagenzien an den Analyten kovalent gebunden werden [171-177]. Abbildung 16 zeigt die schematische Darstellung des Derivatisierungsprozesses bei dem z.B. ein Chromophor oder eine andere Moleküleigenschaft wie z.B. ein Ionisationslabel an den Analyten addiert wird.

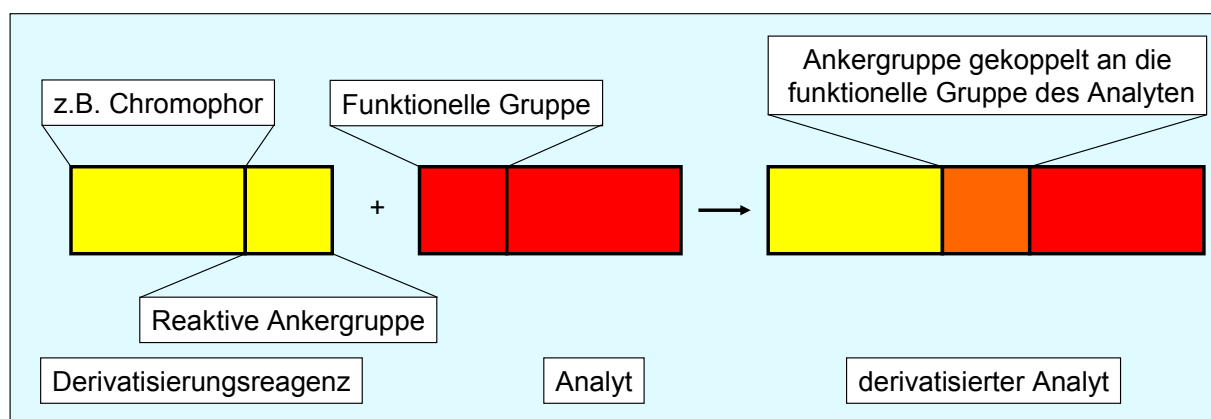


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Derivatisierungsprozesses nach [178]. Dieses Prinzip ist nicht auf Chromophore beschränkt.

Nach der Derivatisierung zeigen viele Analyten ein besseres chromatographisches Verhalten. Dies trifft für die oben bereits erwähnten Derivatisierungsreaktionen für die GC zu [155]. Viele Label haben diesen Effekt aber auch in der HPLC [148-150,179]. So lässt sich z.B. für die Fluoreszenzdetektion, je nach verwendetem achiralen Marker, die Trenneffizienz von Aminosäuren auf chiralen stationären Phasen in der HPLC verbessern [180].

Um einen Sensitivitätsgewinn in der Massenspektrometrie zu erzielen, können leicht ionisierbare Gruppen an die Analyten addiert werden. Dadurch wird in den meisten Fällen die Ionisationsausbeute deutlich erhöht bzw. die Ionisation überhaupt erst ermöglicht. Es gibt z.B. REMPI-Marker, welche diese Ionisationsart für nicht aromatische Analyten erst zugänglich machen [116,118]. Für die EC als Spezialform der APCI und die EC unter reduziertem Druck gibt es eine ganze Reihe von Anwendungen, bei denen Derivatisierungsreaktionen die Ionisation erst möglich machen. In den hier zitierten Quellen werden polyfluorierte Ionisationslabel addiert, um den Ionisationsmechanismus über die EC zu ermöglichen [5,71,72,74,79-82,84-88,92,93,181-183]. Bei der ESI wird häufig über Derivatisierung eine Steigerung der Ionisationsausbeute erzielt oder ein Polaritätswechsel, vom negativen in den positiven Ionisationsmodus oder umgekehrt, ermöglicht. So können z.B. Interferenzen mit der Probenmatrix umgangen werden. Dazu werden polare oder ionische Label an die Analyten angebracht [184-189]. In der MALDI werden ebenfalls Derivatisierungsreagenzien eingesetzt, welche einerseits die Ionisation erleichtern, andererseits das Molekulargewicht der Analyten deutlich erhöhen und so bei der Analyse niedermolekularer Verbindungen Interferenzen mit der Matrix verhindern und Ionensuppression vermeiden [190-192]. Für die APPI gibt es ebenfalls Anwendungsbeispiele für Ionisationslabel. So haben sich z.B. Trimethoxyarene als gute APPI-Ionisationslabel erwiesen [193].

Viele Label oder Derivatisierungsstrategien sind universell einsetzbar. So zeigt z.B. das 6-Aminoquinolin-*N*-hydroxysuccinimidylcarbammat (AQC) (**1**) sehr gute UV-Absorption, besitzt die Fähigkeit zur Fluoreszenz und ist leicht ionisierbar [148], was sowohl bei der Trennung mit der Kapillarelektrophorese [148] als auch bei der Massenspektrometrie mit der MALDI [190] und der ESI vorteilhaft ist. So kann eine Probe derivatisiert und anschließend mit mehreren Methoden besser als die native Form der Analyten untersucht werden.

Ein weiteres wichtiges Beispiel für Derivatisierungsreaktionen ist die Trennung von Enantiomeren. Da zwei Enantiomere identische physikalische und chemische Eigenschaften haben, lassen sich diese nur über die unterschiedlichen Wechselwirkungen zu einem chiralen Selektor trennen. Werden Enantiomere jedoch mit einem enantiomerenreinen Derivatisierungsreagenz zur Reaktion gebracht, werden Diastereomere gebildet.

2 Theorie

Diastereomere weisen unterschiedliche physikalische sowie chemische Eigenschaften auf und lassen sich deshalb über konventionelle chromatographische Methoden trennen [194].

Einige Analyten sind sehr reaktiv und können das Trennsystem schnell verschleifen. So können Analyten z.B. die Trennsäulen beschädigen. Eine kontrollierte Reaktion mit Derivatisierungsreagenzien kann dieses verhindern und eine zuverlässige und verschleißarme Analyse zulassen. So ist das Adamsit, ein Kampfstoff, sehr aggressiv für GC-Säulen, lässt sich aber nach Derivatisierung problemlos analysieren [179].

Derivatisierungsreaktionen können das Chromatogramm auch deutlich vereinfachen, indem Analyten, wie z.B. Zucker, die als verschiedene Isomere vorliegen, zu einem Derivatisierungsprodukt überführt werden und so nur ein Signal im Chromatogramm ergeben [195].

Da Derivatisierungsreaktionen immer einen Mehraufwand durch zusätzliche Arbeitsschritte bedeuten, erhöhen diese den Preis und den Schwierigkeitsgrad der Analysen. Fehler bei der Derivatisierung können das Analysenergebnis stark verfälschen. Weitere Nachteile sollen im Folgenden kurz angesprochen werden.

Die Nachsäulenderivatisierung führt über das Zusetzen des Reagenzes und der Durchmischung mit diesem zur Bandenverbreiterung und damit zur Verschlechterung der Trennung [63]. Bei Vorsäulenderivatisierungsreaktionen muss beachtet werden, dass unterschiedliche funktionelle Gruppen unter Umständen mehrere Derivatisierungsschritte erforderlich machen [196]. So wird bei Aminosäuren häufig zunächst die Säurefunktion verestert und die Aminfunktion anschließend acetyliert, um beide polaren funktionellen Gruppen in weniger polare zu überführen [197].

Da Analyte trotz ähnlicher Struktur und gleicher funktioneller Gruppen unterschiedliche Reaktionsausbeuten zeigen, müssen die Reaktionsbedingungen häufig angepasst oder optimiert werden. Dieses führt zu einem erheblichen Mehraufwand bei der Methodenentwicklung [190,198]. Häufig können nicht alle theoretisch zur Verfügung stehenden Derivatisierungsreagenzien eingesetzt werden. Diese können z.B. ungeeignet für die Probenmatrix sein oder nicht geeignet für das zu Verfügung stehende Analysensystem. Dann muss erst das für das analytische Problem geeignete Label gesucht werden. Bei der Fülle zur Verfügung stehender Derivatisierungsreagenzien kann das ein zeit- und kostspieliges Unterfangen werden [158].

Experimentelle Randbedingungen wie der Einsatz von Ultraschall, Mikrowellen oder Wärme können die Reaktionszeit verringern, bringen aber weitere Parameter mit, die optimiert werden müssen [199-202]. Einige Reaktionen sind abhängig vom Lösemittel. Die Wahl des

richtigen Mediums kann essentiell für die Reaktionsausbeute und damit den gesamten analytischen Prozess sein [203]. Sogar die Wahl der richtigen Reaktionsgefäße kann Einfluss auf die Derivatisierungsreaktion haben [204].

Wasser stellt als Nukleophil häufig ein Problem dar und muss entweder entfernt werden oder es wird ein deutlich größerer Überschuss an Derivatisierungsreagenz benötigt und die Probenmatrix dadurch zusätzlich belastet [82,195,205,206]. Reaktionsnebenprodukte oder überschüssiges Derivatisierungsreagenz können Probleme für die Analyse mit sich bringen. Diese müssen dann entfernt werden. Bei diesem Schritt besteht dann die Gefahr, auch Teile des derivatisierten Analyten zu verlieren oder andere Fehler zu begehen [206-209].

Einige Derivatisierungsreaktionen ergeben nicht nur ein Produkt. So führt die Derivatisierung von Carbonylgruppen mit Methoxyamin oder mit Hydroxylamin mit anschließender Methylierung zu *E/Z*-Isomeren [195,210].

Die Fluoreszenz mancher Marker hängt von vielen Faktoren ab. So ist die Fluoreszenzausbeute auch von dem eingesetzten Lösemittel abhängig. So kann es passieren, dass bei Gradientenelution nicht alle Analyten gleich gute Nachweisgrenzen aufzeigen, obwohl die Derivatisierungsausbeuten ähnlich sind [207]. Darüber hinaus sind nicht alle Analyten in ihrer Fluoreszenzquantenausbeute gleich. Für eine Quantifizierung muss dann mit Korrekturfaktoren gearbeitet werden [211].

Ähnliche Reaktivitäten von funktionellen Gruppen müssen berücksichtigt werden. So müssen z.B. primäre Amine derivatisiert werden bevor selektiv sekundäre Amine gelabelt werden können [212].

Das Konzept der Derivatisierung lässt sich auch für die APLI anwenden. Schiewek et al. haben das Anthracen-9-ylmethoxyessigsäure (AMAA) (**2**), Anthracen-9-ylmethanol (AM) (**3**) und das 9-Diazomethylantracen (DAMA) (**4**) als Derivatisierungsreagenzien für die APLI vorgestellt. Mit diesen Reagenzien war die Derivatisierung von Alkoholen, Aminen und Säuren möglich [122]. Abbildung 17 zeigt die Reaktionsgleichungen der APLI-Label mit den verschiedenen funktionellen Gruppen.

Das AMAA (**2**) wurde aufgrund seiner leichten Synthese als Ionisationsmarker ausgewählt. Es ist über eine Substitutionsreaktion von Anthracen-9-ylmethanol (**3**) mit Bromessigsäure (**8**) nach Deprotonierung durch Natriumhydrid (**9**) zugänglich. Die Etherfunktion wurde von Schiewek als wichtiger Bestandteil der Molekülstruktur angesehen, welcher die Löslichkeit verbessern sollte [131].

Das AM (**3**) und das DAMA (**4**) sind käuflich zu erwerben und waren deshalb leicht zugänglich.

2 Theorie

Schiewek hat in seiner Dissertation auch die Voraussetzungen für die Einsetzbarkeit eines Ionisationslabels für die APLI beschrieben. Der Marker braucht ein Ionophor, so wird der Molekülteil genannt, in dem die Ionisation stattfinden kann. Die zweite Bedingung für einen Marker ist eine reaktive Ankergruppe, an welcher der Analyt kovalent gebunden werden kann. Diese beiden Funktionen müssen über einen Spacer verbunden werden. Der Spacer erfüllt mehrere Aufgaben. Erstens soll der sterische Einfluss des Ionophors auf die Derivatisierungsreaktion über den Spacer verringert werden und zweitens soll die Ionisationsausbeute des Ionophors trotz unterschiedlich gebundener Analyten gleich sein. Der Spacer sorgt für eine immer gleiche chemische Umgebung des Ionophors, sodass sich die Energie des Grundzustands und die des angeregten Zustands nicht mit dem Analyten verändert [131].

Die Vorteile dieser Marker sind die selektive Ionisation nach Derivatisierung von speziellen funktionellen Gruppen, die analytunabhängige Ionisationsausbeute und die hohe Sensitivität der APLI, die so auf nicht aromatische Analyten ausgeweitet wurde. Die analytunabhängigen Ionisationsausbeuten haben den Vorteil, dass keine mit Stabilisotopen markierten Standards eingesetzt werden müssen, sobald Standards vorliegen, welche nicht in der Probe enthalten sind und die gleichen Derivatisierungsausbeuten wie die Analyten aufweisen. Dieses wurde am Beispiel von natürlich vorkommenden Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen demonstriert. Als interner Standard wurde eine Fettsäure mit ungerader Anzahl an C-Atomen eingesetzt [122].

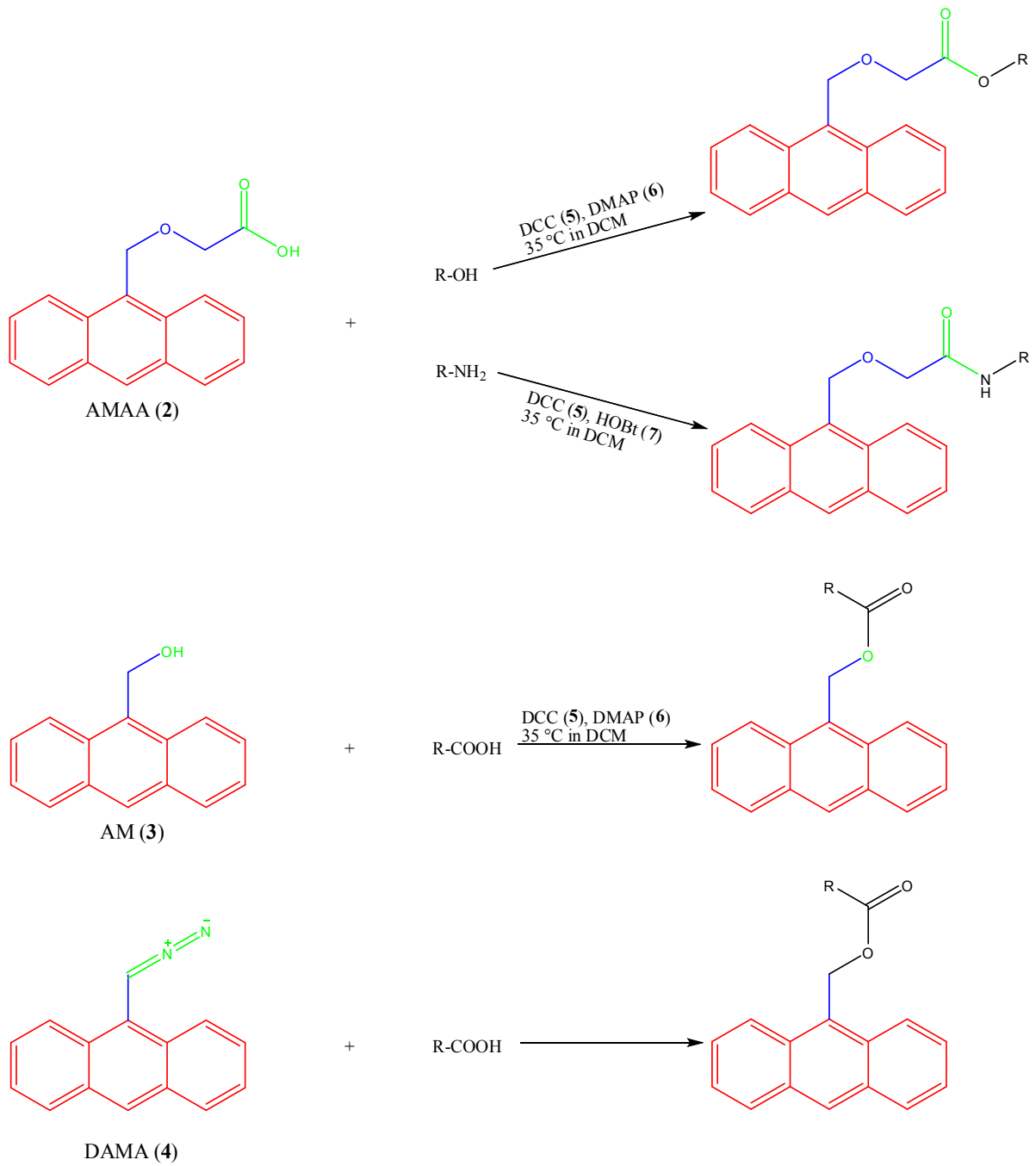


Abbildung 17: APLI Marker nach Schiewek et al. [122]. DCC: *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (5); DMAP: 4-(Dimethylamino)pyridin (6); HOBt: 1-Hydroxybenzotriazol (7); DCM: Dichlormethan; rot: Ionophor; blau: Spacer; grün: Ankergruppe.

3 Problemstellung und Zielsetzung

Die Einführung der APLI und deren Kopplung an die GC und HPLC erweiterte das Feld der Ionisationsmethoden um eine ultrasensitive aber auch selektive Ionisationsart für polycyclische und aromatische Verbindungen. Eine so einfache und dabei sensitive Ionisationsmethode stand bis dahin nicht zu Verfügung. Wie keine andere Ionisationsmethode bietet die APLI einzigartige Möglichkeiten, wie z.B. die Wahl des Ionisationsortes in der Ionenquelle oder den einfachen und gemeinsamen Einsatz neben anderen Ionisationstechniken.

Erste Versuche haben den Einsatz einiger weniger Ionisationsmarker demonstriert. Allerdings entsprachen nicht alle der gezeigten Marker den Anforderungen, welche ein APLI-Label laut Schiewek aufweisen muss, um eine analytunabhängige Ionisation zu ermöglichen [131]. GC-Versuche mit auf Anthracen basierenden APLI-Labeln wurden bislang nicht durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war der Einsatz der bereits bekannten Label zur Derivatisierung von Analyten in komplexer Matrix.

Zudem sollte der Pool der zur Verfügung stehenden APLI-Label erweitert und für die wichtigsten funktionellen Gruppen jeweils mehrere APLI-Label synthetisiert und deren Funktion nachgewiesen werden. Dabei sollten die neuen APLI-Label eine Spacerlänge mit mindestens drei Kohlenstoffatomen aufweisen, um eine Ionisation - unabhängig von dem eingesetzten Analyten - zu ermöglichen.

Der Einsatz der neuen APLI-Label sollte neben der HPLC auch für die GC etabliert werden und die Nachweisgrenzen für derivatisierte Analyten sollten bei der GC-APLI im pM-Bereich liegen.

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt. Als erstes wird die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Label erörtert. Danach wird die Syntheseroute dieser neuen Label vorgestellt und anschließend werden Beispiele für Derivatisierungsreaktionen der wichtigsten funktionellen Gruppen gezeigt. Daraufhin wird auf negative Ergebnisse eingegangen und Derivatisierungsreaktionen vorgestellt, die nicht funktioniert haben. Zum Schluss wird der Einsatz eines kleinen und preiswerten Festkörperlasers erprobt und diskutiert.

4.1 Fragmentierungsproblematik von APLI-Markern

Dieser Abschnitt überschneidet sich in gewissem Maße mit dem Abschnitt 4.3. Hier wird auf Ergebnisse vorgegriffen, um auf eine Problematik aufmerksam zu machen, welche es zu lösen gab.

Im ersten Teil dieser Dissertation sollten DNA-Addukte, welche sich vom Nicotin ableiten, untersucht werden (siehe auch Abschnitt 4.3). Das Pyridyloxobutanol (POB) (**10**) und das Pyridylhydroxybutanol (PHB) (**11**) sind primäre Alkohole. Nach saurer Hydrolyse der DNA und anschließender Extraktion mit Dichlormethan, wird das POB vor der Analyse üblicherweise mit Pentafluorobenzoylchlorid (PFB) (**12**) derivatisiert und anschließend mittels GC-EC-MS analysiert [82]. Abbildung 18 zeigt die Strukturen der Analyten, des Derivatisierungsreagenzes und des Derivatisierungsprodukts.

Im Laufe dieser Arbeit werden Derivatisierungsprodukte über die Abkürzung des Markers verbunden mit einem Bindestrich mit der Abkürzung des Analyten abgekürzt. Dabei wird bei der Bezeichnung nicht berücksichtigt, dass sowohl der Marker als auch der Analyt Molekülteile (hier z.B. das H^+ beim POB (**10**) und das Cl^- beim PFB (**12**)) verlieren können (vgl. Abbildung 18).

4 Ergebnisse und Diskussion

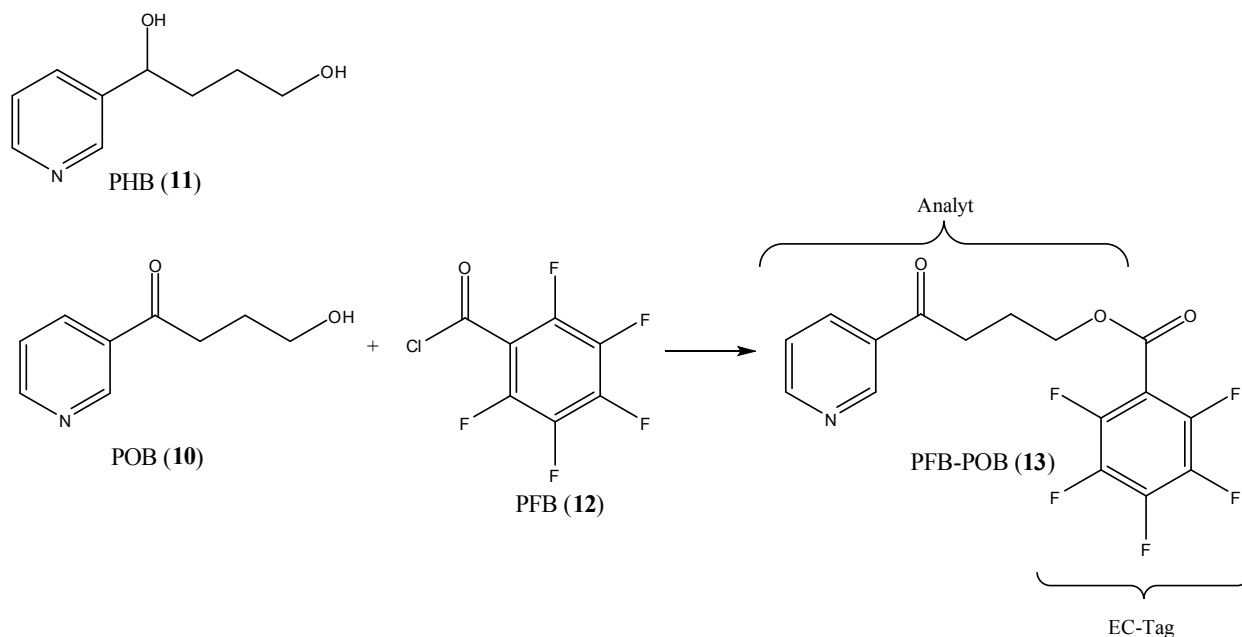


Abbildung 18: Strukturen von POB (10), PHB (11), PFB (12) und dem Derivatisierungsprodukt PFB-POB (13).

Das POB (10) und das PHB (11) sollten, nach jeweiliger Derivatisierung, mittels APLI untersucht, und damit die Leistungsfähigkeit der APLI demonstriert werden.

Obwohl die ersten Ergebnisse von Schiewek et al. zu Derivatisierungsreaktionen für die APLI sehr vielversprechend waren, wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass die Label von Schiewek zwei entscheidende Nachteile haben. Die aus PHB bzw. POB und AMAA gebildeten AMAA-PHB (14) und AMAA-POB (15) waren nicht bzw. nur sehr schlecht GC-gängig. Vermutlich kam es bedingt durch das kovalent gebundene Pyridin zur Zersetzung der derivatisierten DNA-Addukte im Injektor. Da das AMAA-Octanol ohne Probleme mittels GC-APLI-(ToF)MS analysiert werden konnte [213] und die Derivatisierungsprodukte des POB (10) und PHB (11) mittels LC-ESI-MS nachgewiesen werden konnten, wurde hier auf ein analytspezifisches Problem der GC-APLI-(ToF)MS bei der Analyse der beiden DNA-Addukte geschlossen. Das zweite Problem stellte die Instabilität der derivatisierten DNA-Addukte nach der Ionisation mittels APLI dar. Für weiterführende Untersuchungen wurde ein Modellanalyt, das Hydroxypropylpyridin (HPP) (16), genutzt. Das HPP (16) ähnelt strukturell dem POB (10) bzw. dem PHB (11), ist aber um ein Vielfaches preiswerter und einfacher zu beschaffen. Abbildung 19 zeigt die Strukturen des HPP (16), den eingesetzten Marker AMAA (2) und das Derivatisierungsprodukt AMAA-HPP (17). Das AMAA-HPP (17) war ebenfalls nicht GC-gängig.

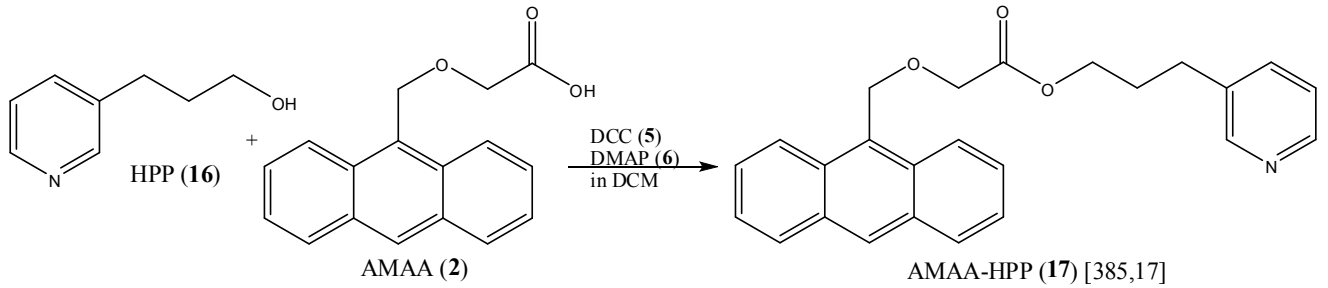


Abbildung 19: Struktur des HPP (16) und des AMAA-HPP (17).

Nachdem die GC-APLI für diese Substanzen nicht geeignet war, wurde die LC-APLI zur Analyse eingesetzt. Aber auch bei den LC-APLI-(ToF)MS Analysen des AMAA-HPP (17) konnte eine starke Fragmentierung, insbesondere im Spacer des AMAAs (2), beobachtet werden (Abbildung 20).

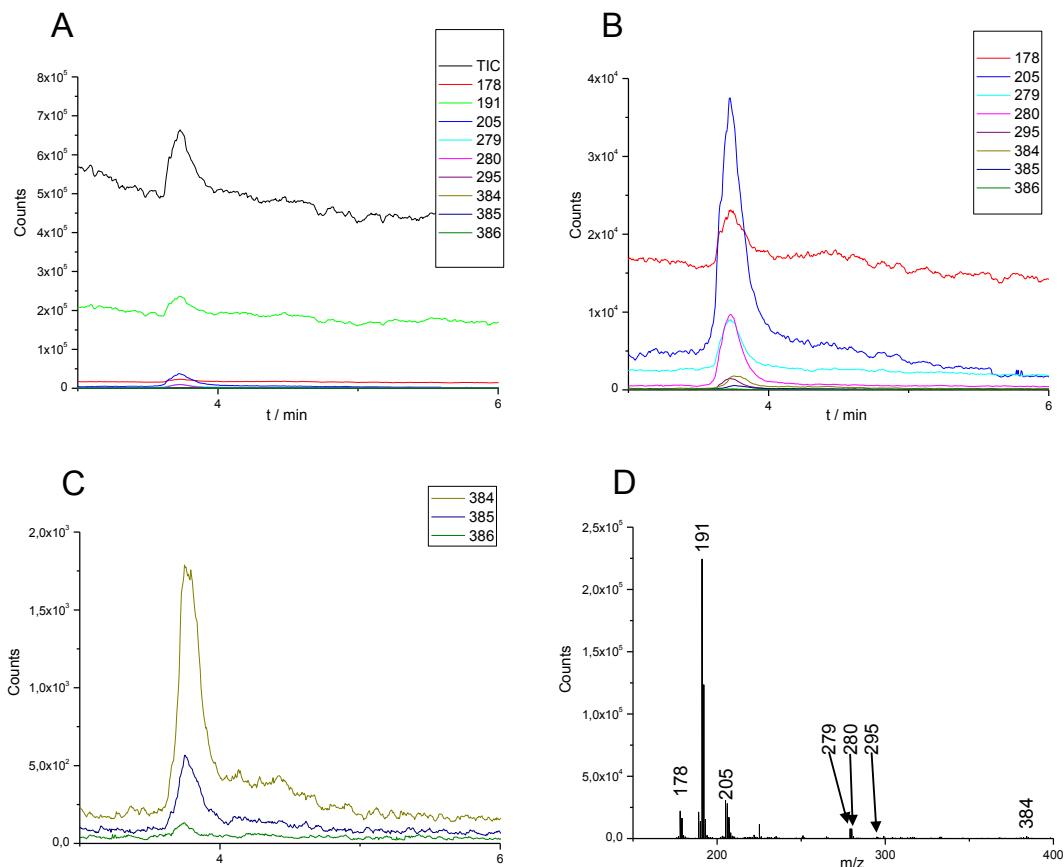


Abbildung 20: HPLC-APLI-(ToF)MS-Analyse von AMAA-HPP (17). A: Dargestellt sind der TIC, die extrahierten Analytmassen $[M-H]^+$, M^+ , $[M+H]^+$ und die Massenspuren der Fragmente; B: Dargestellt sind die extrahierten Analytmassen $[M-H]^+$, M^+ , $[M+H]^+$ und die Massenspuren aller Fragmente (bis auf die des 191er-Fragments (Fragment 2, Abbildung 21)); C: extrahierte Analytmassen $[M-H]^+$, M^+ , $[M+H]^+$; D: Massenspektrum des chromatographischen AMAA-HPP (17)-Peaks.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die intensivsten Fragmentensignale wurden für die Massen 191 Da und 205 Da detektiert. Abbildung 21 zeigt die möglichen Strukturen der detektierten Fragmentmassen und die dazugehörigen Signalfächen. Es wird ersichtlich, dass nur ca. 2% des ionisierten Analyten als $[M-H]^+$, M^+ und $[M+H]^+$ zum Detektor gelangen. Der Rest der ionisierten Moleküle fragmentiert. Weiter ist zu sehen, dass der Bindungsbruch bevorzugt auf einer der beiden Seiten des Ethersauerstoffs in β -Position zum Anthracen stattfindet.

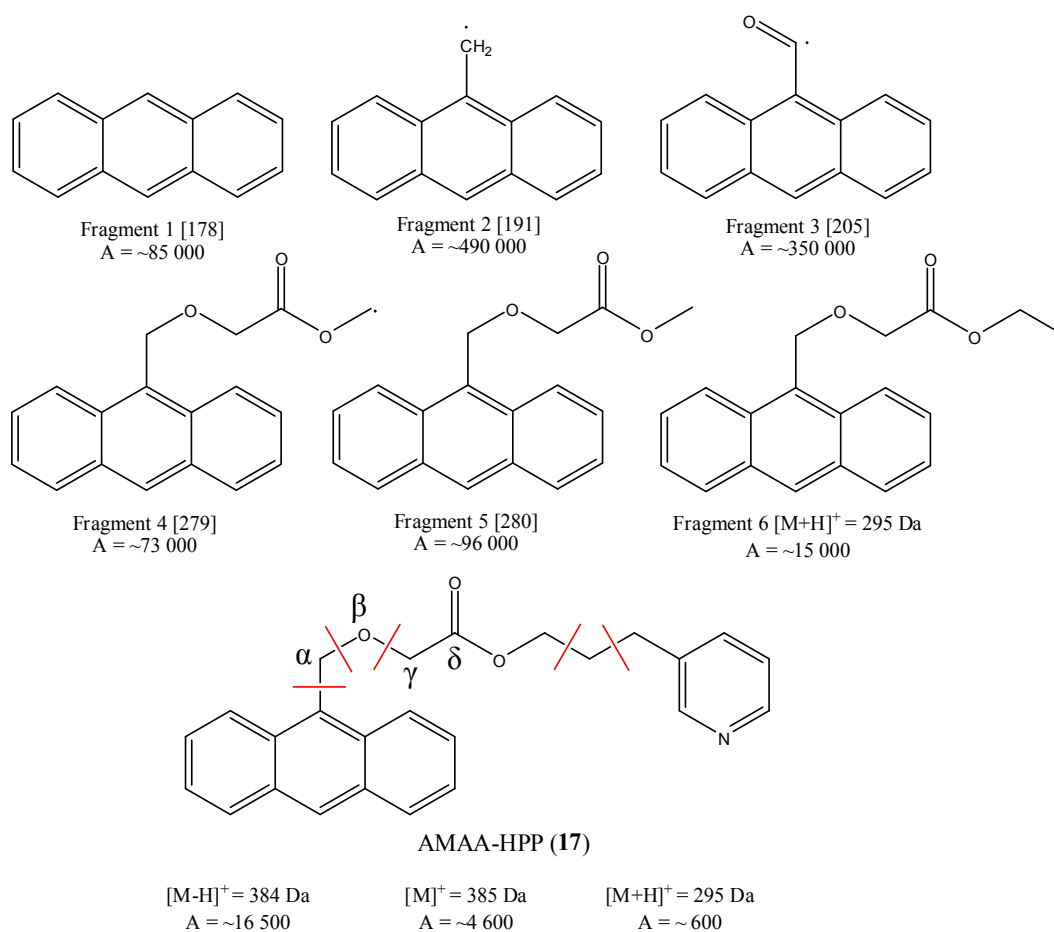


Abbildung 21: Mögliche Fragmentstrukturen der detektierten Massen des AMAA-HPPs (17). Die Nominalmasse der Fragmente ist in eckigen Klammern angegeben. A: Peakfläche des detektierten Signals. Die roten Striche zeigen die Stellen der Bindungsbrüche. Die griechischen Buchstaben bezeichnen die Position im Molekül ausgehend von dem aromatischen Ionophor.

Da die APLI eine Ionisationsmethode unter Atmosphärendruck ist, kommt es nach der Ionisation zu einer Reihe von Stößen zwischen dem Ion und den Gasmolekülen der Ionenquelle. Dabei brechen die vermutlich schwächsten Bindungen.

Nach der Ionisation wird das Ionophor stark elektronenziehend. Der Sauerstoff in β -Position besitzt eine hohe Elektronegativität und reduziert die Elektronendichte in den Bindungen zu

seinen Nachbaratomen. So ist die Bindung zwischen der α - und β -Position elektronenarm und dadurch labil. Es überrascht deshalb nicht, dass diese Bindung leicht bricht (vgl. Abbildung 22). Die gebildeten Produkte sind darüber hinaus in der Gasphase relativ stabil und begünstigen so den Bindungsbruch. Es entsteht das positiv geladene Fragment 2 (Abbildung 21), welches die Ladung über Mesomerie stabilisieren kann. Kationen von aromatischen Verbindungen sind bekannt und in der Literatur beschrieben [214-216]. Das auf der anderen Seite gebildete Sauerstoffradikal ist ebenfalls stabil. In verschiedenen Publikationen sind Alkylsauerstoffradikale beobachtet und untersucht worden [217,218]. Der Bindungsbruch zwischen β - und γ -Position ist ähnlich zu erklären. Der Sauerstoff in β -Position ist auch in diesem Szenario elektronenziehend und erniedrigt die Elektronendichte der Bindung zum Kohlenstoff in γ -Position. Die Esterfunktion in δ -Position ist eine elektronenziehende Gruppe und besitzt einen ausgeprägten $-I$ -Effekt [219]. Dadurch wird auch die Elektronendichte des Kohlenstoffs in γ -Position beeinflusst und seine Elektronegativität erhöht. Dieses destabilisiert die Bindung zwischen β - und γ -Position, sodass diese leicht brechen kann. Damit die beobachtete Masse des Fragments mit den m/z -Verhältnis von 205 Da erklärt werden kann, muss es bei der Fragmentierung zu einer Wasserstoffeliminierung kommen. Abbildung 22 zeigt die möglichen Fragmentierungsmechanismen für diese zwei dominanten Bindungsbrüche.

Die stoßinduzierte Eliminierung von Wasserstoffatomen aus aromatischen Verbindungen ist ebenfalls beschrieben worden [220]. Ob es sich um die in Abbildung 22 dargestellten Mechanismen handelt, kann hier nicht beantwortet werden. Es wurden keine weiteren Untersuchungen dazu durchgeführt. Die beobachteten Massen lassen die angenommenen Reaktionen aber plausibel erscheinen. Die vorgestellten zwei Fragmentierungsreaktionen sind für ca. 75% der beobachteten Bindungsbrüche im derivatisierten Analytmolekül verantwortlich.

4 Ergebnisse und Diskussion

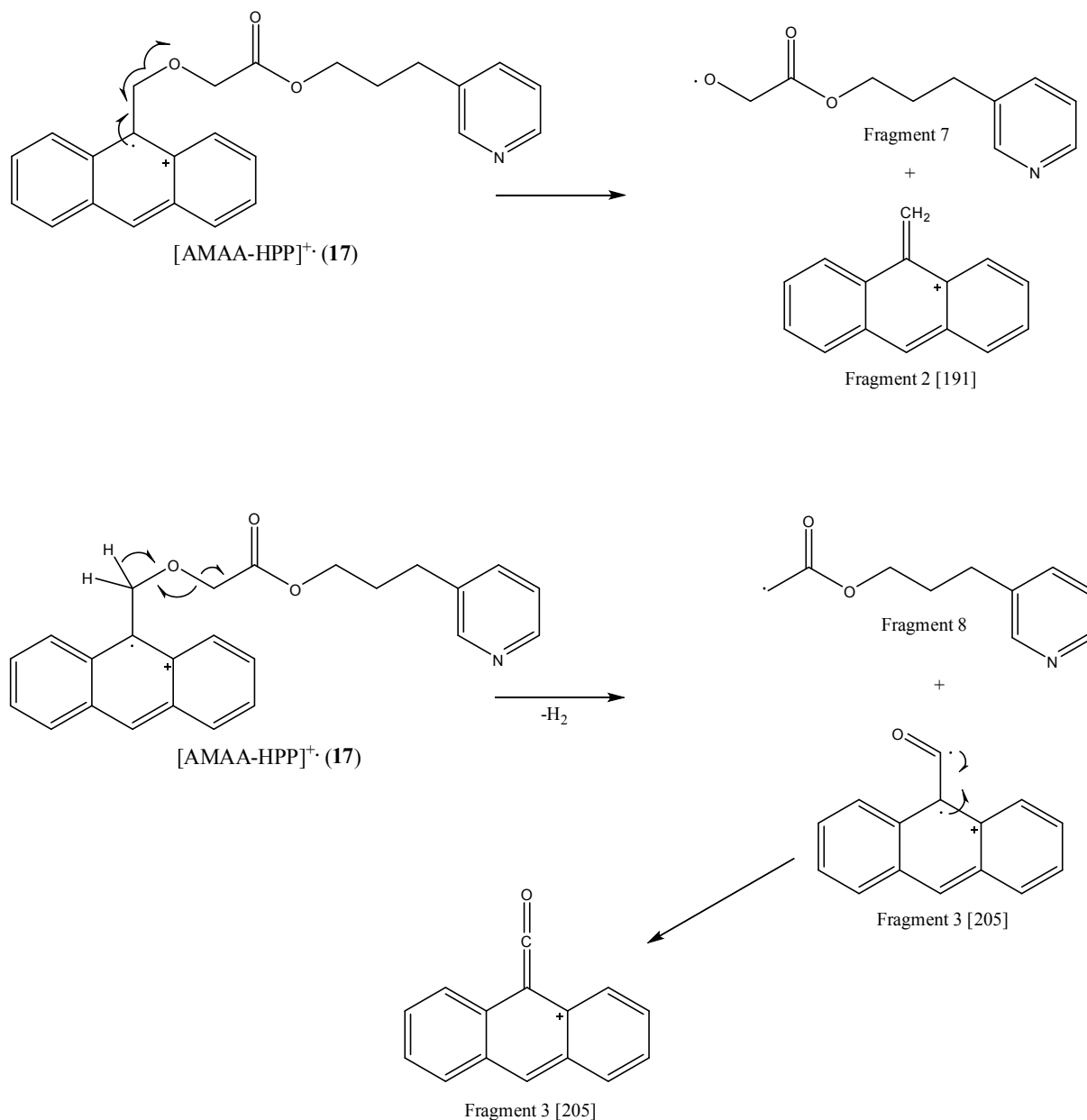


Abbildung 22: Vorgeschlagene Mechanismen für die zwei wichtigsten Fragmentierungsreaktionen (vgl. Abbildung 21).

Da der Sauerstoff in β -Position bei der Fragmentbildung offensichtlich eine wichtige Rolle spielt, wurde beschlossen diesen aus dem APLI-Label zu entfernen.

Die nach der Eliminierung des Ethersauerstoffs verbleibende Spacerlänge von zwei CH₂-Gruppen und der Ankergruppe sollte ausreichend sein, um die Ionisationsausbeute analytunabhängig zu belassen [131]. Die Struktur des neuen Markers 3-(Anthracen-9-yl)propansäure (APS) (18) ist in Abbildung 23 dargestellt.

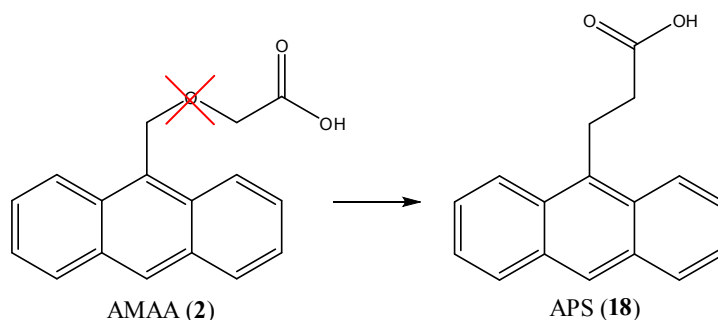


Abbildung 23: Struktur des neuen Markers APS (18).

Dennis Klink und Valerie Derpmann, beide Bergische Universität Wuppertal, haben Untersuchungen zu den Fragmentierungsreaktionen der Marker APS (18) und AMAA (2) durchgeführt. Dabei wurden beide Marker nach DCC (5)-Aktivierung, DMAP (6) als Katalysator, mit Methanol (MeOH) umgesetzt. Sowohl das AMAA-MeOH (19) als auch das APS-MeOH (20) wurden thermisch verdampft und mittels APLI ionisiert. Beide Ionen konnten unter stoßfreien Bedingungen ohne Fragmentierung detektiert werden. Unter CID-Bedingungen zeigte das APS-MeOH (20) keine Fragmentierung, das AMAA-MeOH (19) fragmentierte sehr stark zu Fragment 2 (vgl. Abbildung 22). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Fragmentierung auf Stöße zurückgeführt werden kann. Die eigentliche Ionisation verläuft, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, sanft und ohne Fragmentierungsreaktionen.

4.2 Synthesen neuer APLI-Marker

In diesem Kapitel wird auf die Synthese des neuen APLI-Markers APS (18) eingegangen. Zunächst werden mögliche Synthesevorschriften diskutiert und anschließend Unterschiede bzw. Besonderheiten der hier vorgestellten Synthesevorschrift im Vergleich zu der literaturbekannten Synthese genannt. Anschließend werden weitere Marker, welche sich von dem APS (18) ableiten, vorgestellt und ihre Synthese erläutert. Die genauen Synthesevorschriften sind in Kapitel 5.4 zu finden.

4.2.1 3-(Anthracen-9-yl)propansäure (APS)

In der Literatur sind zwei Syntheserouten für das APS (18) beschrieben. Die erste Synthese wird über eine Wittig-Reaktion zwischen 9-Anthraldehyd (21) und 4-Carbomethoxybenzyltriphenylphosphoniumbromid (22) mit anschließender Hydrolyse des Esters und Reduktion der neu gebildeten Doppelbindung realisiert [221]. Der Wittigester (23) konnte in dieser Arbeit in einem E/Z-Verhältnis von ca. 95/5 hergestellt werden. Die

4 Ergebnisse und Diskussion

Hydrolyse des Wittigesters (**23**) ergab die Wittigsäure (**24**) in guter Ausbeute. Die Reduktion der Doppelbindung im Spacer der Wittigsäure (**24**) ergab schließlich das gewünschte Produkt APS (**18**). Abbildung 24 zeigt das Reaktionsschema für diese Syntheseroute.

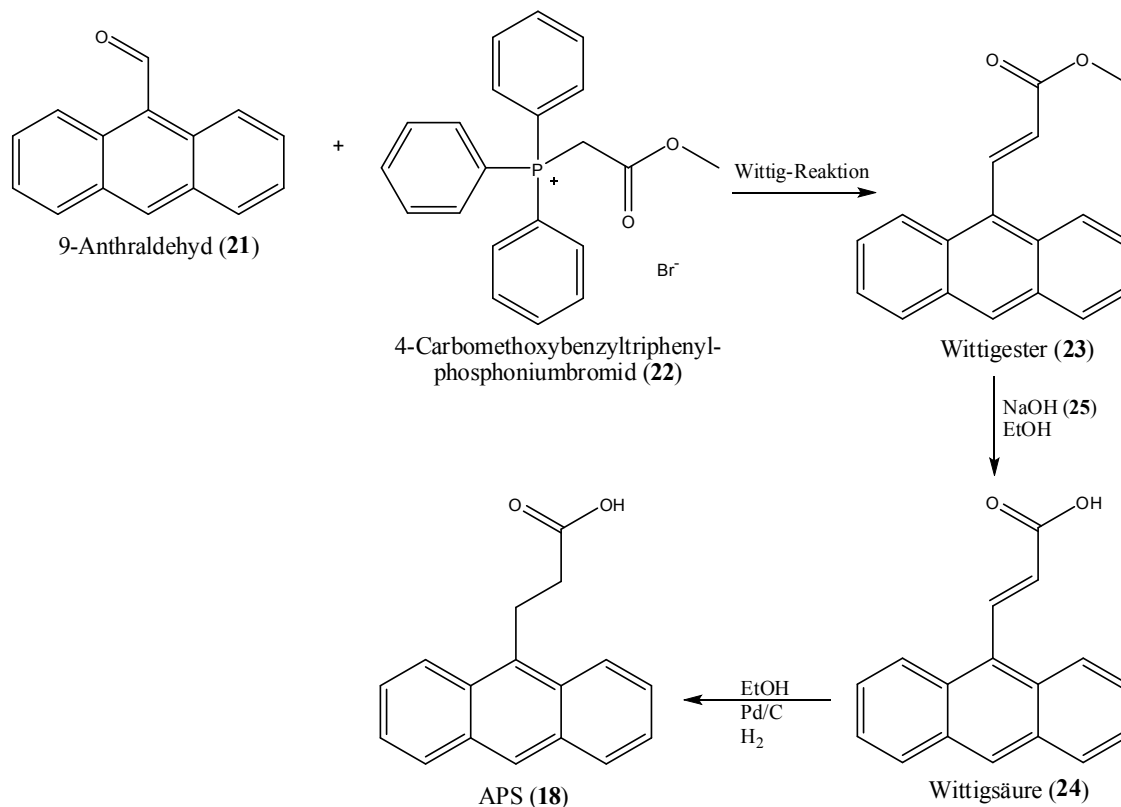


Abbildung 24: Reaktionsschema für die Bildung von APS (**18**) mittels Wittig-Reaktion. EtOH: Ethanol

Die Literatur enthält keine Angaben zu der Aufreinigung des Produkts. Diese stellte sich als sehr schwierig heraus. Bei der Reduktion der Wittigsäure (**24**) kam es zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Das Anthracen wurde ebenfalls teilweise reduziert. Auf der anderen Seite war der Umsatz der Doppelbindung zur Einfachbindung nicht vollständig, sodass die Reaktionslösung viele Komponenten enthielt die nur sehr schwer mit einer präparativen säulenchromatographischen Trennung aufgearbeitet werden konnten. Versuche, die Reduktion vor der Hydrolyse durchzuführen, brachten leider keine Vereinfachung der Aufarbeitung. Diese Synthesestrategie stellte sich aufgrund der Aufarbeitung des Zielmoleküls als sehr umständlich heraus. Zudem war das Handhaben eines Autoklaven, der unter Wasserstoffdruck von mehreren bar stand, gefährlich, sodass eine andere Syntheseroute bevorzugt wurde. Der zweite Syntheseweg ging vom Anthron (**26**) aus [222]. Nach der Deprotonierung durch Kaliumtertbutanolat ($\text{KO}t\text{Bu}$) (**27**) konnte das Anthron (**26**) an Acrylnitril (**28**) nukleophil addiert werden. Nach saurer Hydrolyse des Nitrils und der

Reduktion des Anthrons durch Zink zum Anthracen, konnte die Säure APS (**18**) synthetisiert werden. Der Syntheseweg ist in Abbildung 25 dargestellt.

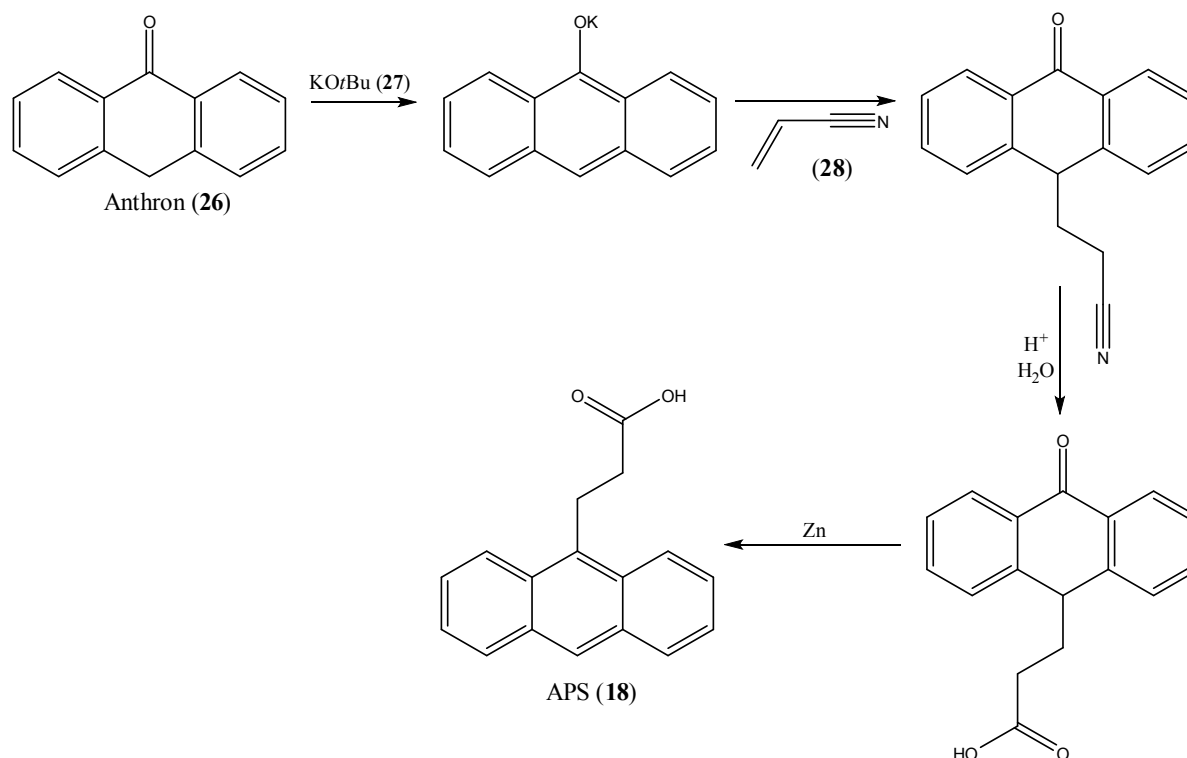


Abbildung 25: Syntheseroute für das APS (**18**) ausgehend vom Anthron (**26**) nach [222].

Diese Synthese konnte ohne Probleme nachgestellt werden. Der letzte Schritt der Aufarbeitung stellte eine Umkristallisation aus konzentrierter Essigsäure dar. Die so gewonnenen Kristalle enthielten große Mengen eingelagerter Essigsäure. Diese wurde durch mehrfaches Mörsern, Waschen mit Aceton und Trocknen, bei erhöhter Temperatur im Vakuum, quantitativ entfernt. Das publizierte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von APS (**18**) enthält einen Fehler. Dort wird das Signal der Methylgruppe der Essigsäure dem aciden Proton der APS (**18**) zugeordnet. Dieses gilt es bei der Auswertung des NMR-Spektrums zu bedenken [223,224].

APS (**18**) hat als Ankergruppe eine Carbonsäure. Diese kann nach Aktivierung über Carbodiimid-Reagenzien wie DCC (**5**) oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC*HCl) (**29**) als Elektrophil reagieren. Dadurch eignet sich das APS (**18**) als Label für Nukleophile wie Amine und Alkohole. Amine werden bei dieser Reaktionsführung aufgrund ihrer höheren Nukleophilie - im Vergleich zu Alkoholen - bevorzugt. Der Derivatisierungsmechanismus für das Labeln von Nukleophilen mit APS (**18**) ist in Abbildung 26 gezeigt. Die Reaktionsbedingungen dieser Derivatisierungsreaktion sind mild.

4 Ergebnisse und Diskussion

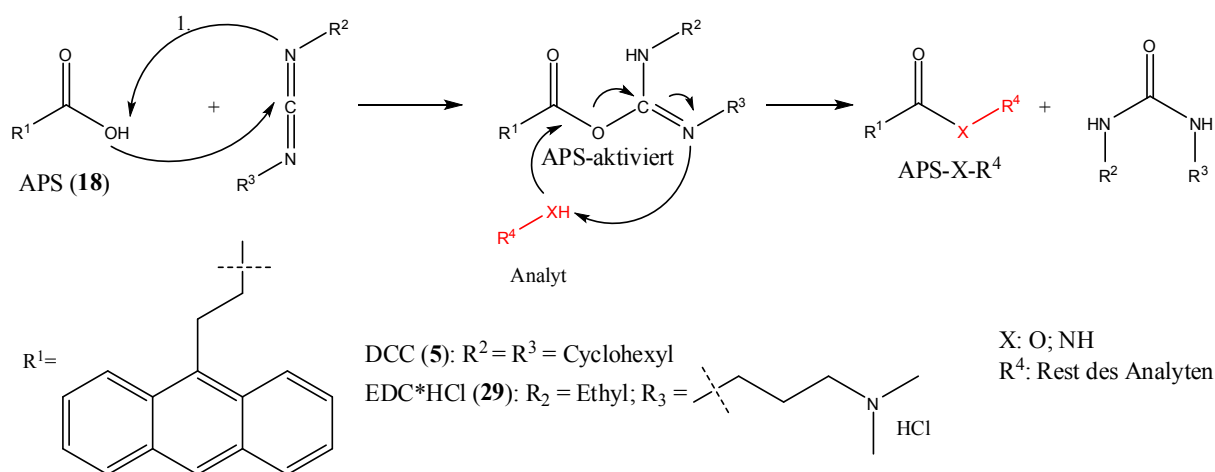


Abbildung 26: Mechanismus der Derivatisierung von Nucleophilen mit APS (18) nach Aktivierung mit Carbodiimid-Reagenzien nach [219]. Der Analyt ist rot dargestellt.

Nach der Aktivierung des APS (18) durch Carbodiimid-Reagenzien kann es bei Analyten, welche schlechte Nucleophile sind, zu einer intermolekularen Umlagerung des aktivierten APS (APS-aktiviert, Abbildung 26) kommen. Danach ist das APS (18) als Marker inaktiv. Dieser Umlagerung kann *in situ* durch Umesterung und der Bildung von Aktivestern vorgebeugt werden. Dazu wird häufig DMAP (6) zur nucleophilen Katalyse (vgl. Abbildung 32) oder HOBt (7) bzw. *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) (30) zur Aktivesterbildung (Abbildung 28) zugesetzt [219]. Die Derivatisierungsreaktion verträgt bei der Derivatisierung von Alkoholen wenige Prozent Wasser, da dieses vom Carbodiimid-Reagenz abgefangen werden kann. Dabei wird dann die Säure wiedergewonnen. Diese Reaktion ist in Abbildung 30 dargestellt. Auf Grund der höheren Reaktivität von Aminen gegenüber Alkoholen oder Wasser, können Amine in wässrigen oder alkoholischen Lösungen derivatisiert werden.

4.2.2 3-(Anthracen-9-yl)propansäurechlorid (APS-Cl)

Aus der Säure APS (18) lässt sich durch Umsetzung mit Oxalylchlorid (31) das 3-(Anthracen-9-yl)propansäurechlorid (APS-Cl) (32) herstellen [225,226]. Abbildung 27 zeigt das Reaktionsschema dieser Umsetzung.

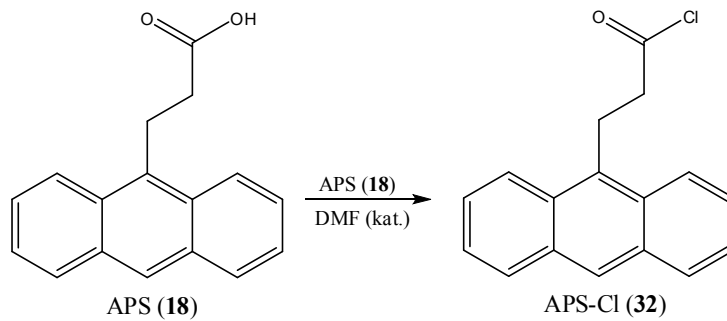


Abbildung 27: Synthese des APS-Cl (32).

Das APS-Cl (32) reagiert in Derivatisierungsreaktionen als Elektrophil. Es muss, anders als APS (18), nicht mehr aktiviert werden. Es ist reaktiver als APS (18) und damit empfindlicher für Nebenreaktionen, wie z.B. mit Wasser. Die Selektivität zwischen Aminen und Alkoholen ist aufgrund der recht hohen Reaktivität geringer. Es kann sehr leicht mit Alkoholen oder anderen Nucleophilen kontrolliert abreagieren. Als Derivatisierungsprodukte werden identisch gelabelte Analyten wie mit dem APS (18) erhalten.

4.2.3 3-(9-Anthryl)-propionsäure-2,5-dioxo-pyrrolidinylester (APS-NHS)

Das 3-(9-Anthryl)-propionsäure-2,5-dioxo-pyrrolidinylester (APS-NHS) (33) wurde durch die Reaktion von APS (18), nach Aktivierung durch EDC*HCl (29) und der anschließenden Veresterung mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) (30), hergestellt [227]. Die Strukturen und die Reaktionsgleichung sind in Abbildung 28 dargestellt. Mechanistisch läuft diese Synthese wie die in Abbildung 26 gezeigte Derivatisierung ab.

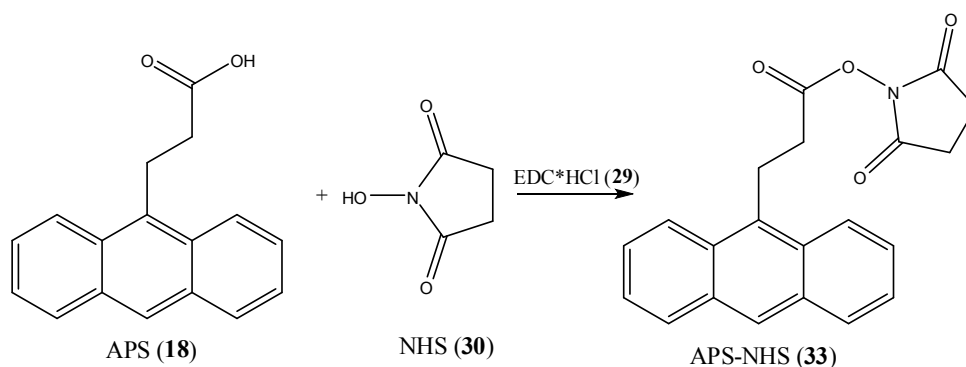


Abbildung 28: Syntheschema von APS-NHS (33).

Das APS-NHS (33) ist ein Aktivester. Das NHS (30) ist dabei eine gute Abgangsgruppe. Deshalb eignet sich das APS-NHS (33) für die Derivatisierung von Aminen. Der Aktivester ist relativ stabil gegenüber Wasser, sodass Amine auch aus wässrigen Lösungen gut

derivatisiert werden können. Dieser Marker benötigt, bis auf eine pH-Kontrolle, keine weiteren Kopplungsreagenzien [227,228].

4.2.4 3-(9-Anthryl)-propanol (APol)

3-(9-Anthryl)-propanol (APol) (34) wurde durch Reduktion von APS (18) mit Lithiumaluminiumhydrid (35) gewonnen [229]. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 29 dargestellt.

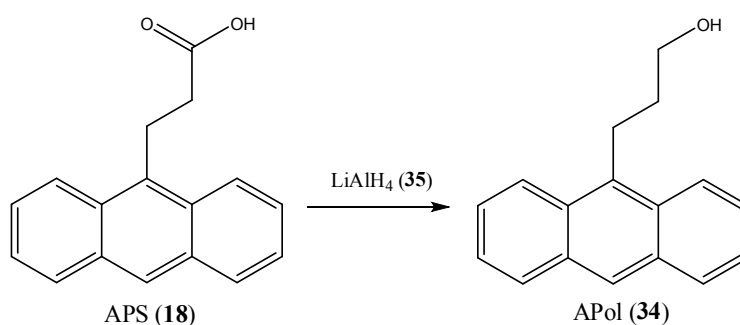


Abbildung 29: Syntheschema des APol (34).

Das APol (34) ist durch seinen primären Alkohol ein Nukleophil. Nach der Aktivierung von Carbonsäuren, durch z.B. ein Carbodiimid-Reagenz, kann das APol (34) mit ihnen reagieren. Der Mechanismus entspricht dabei dem in Abbildung 26 dargestellten Reaktionsverlauf, allerdings sind dann Analyt und Marker in ihrer Rollenverteilung vertauscht. Der Analyt wird aktiviert und der Marker ersetzt anschließend das Aktivierungsreagenz. Da Wasser in Konkurrenz zum Marker steht, verträgt diese Derivatisierungsreaktion nicht viel Wasser. Wenn Wasser mit einem aktivierten Analyten reagiert, wird wieder der Analyt zurück gewonnen. Deshalb erfordert diese Konkurrenzreaktion, bei höheren Wassermengen in der Matrix, sehr viel Kopplungsreagenz. Die Nebenreaktion mit Wasser ist in Abbildung 30 dargestellt.

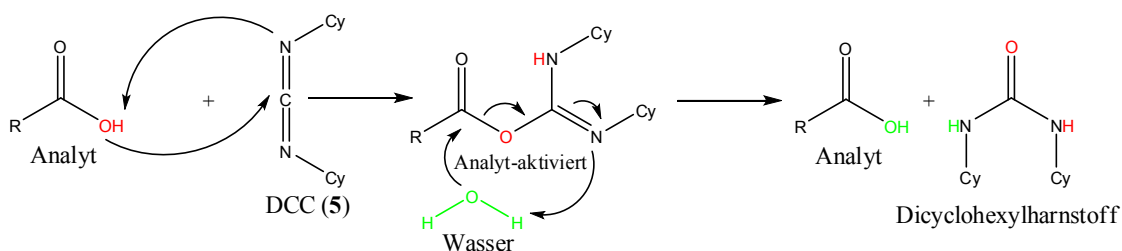


Abbildung 30: Reaktion einer durch DCC (5) aktivierten Säure mit Wasser. Das Wasser und die aus dem Wasser stammenden Atome sind grün dargestellt. Die OH-Gruppe, die aus dem Analyten entfernt und durch Wasser ersetzt wird, ist rot dargestellt. Cy: Cyclohexyl.

Da der Alkohol des APol (**34**) eine mittelstarke Nucleophilie aufweist, muss zu den Derivatisierungsreaktionen DMAP (**6**), oder eine andere Verbindung zur Bildung von Aktivestern, zugesetzt werden. Sonst findet die in Abschnitt 4.2.1 angesprochene Umlagerung statt. Der Analyt ist dann anschließend für die Derivatisierung, und damit die Analyse mittels APLI, nicht mehr zugänglich (vgl. Abbildung 31) [219].

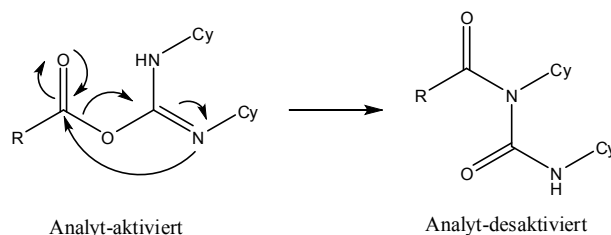


Abbildung 31: Umlagerungsreaktion einer durch DCC (5**) aktivierten Säure nach [219]. Cy: Cyclohexyl.**

Diese Umlagerung ist relativ langsam, sodass bei guten Nucleophilen die Zugabe von z.B. DMAP (**6**) optional ist. Bei einem relativ schwachen Nucleophil wie dem APol (**34**) ist sie aber von entscheidender Bedeutung. Der Mechanismus der Aktivierung durch DMAP (**6**) ist in Abbildung 32 gezeigt.

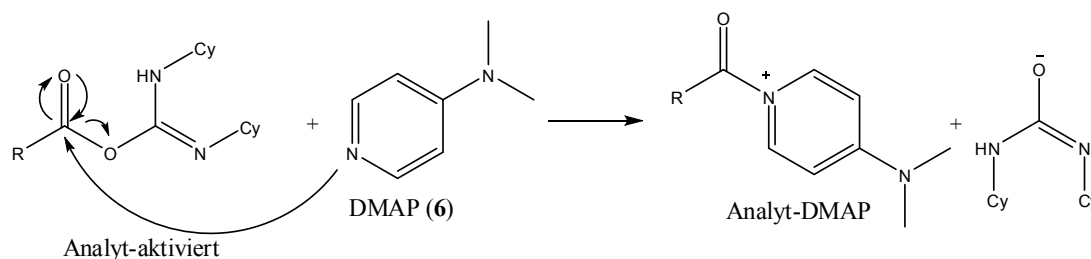


Abbildung 32: Mechanismus der Aktivierung durch DMAP (6**).**

Die Spezies Analyt-DMAP aus Abbildung 32 ist stark elektrophil und reagiert auch mit mittelstarken bzw. schwachen Nucleophilen rasch. So wird zum einen die unerwünschte Umlagerung aus Abbildung 31 verhindert, zum anderen die Derivatisierungsreaktion beschleunigt.

4.2.5 3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorid

Das 3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorid (APA*HCl) (**36**) wurde aus dem APS (**18**) über APS-Cl (**32**) durch Reaktion mit Ammoniak (**37**) und anschließender Reduktion mit LiAlH_4 (**35**) hergestellt. Die Syntheseroute ist in Abbildung 33 dargestellt. Das freie

4 Ergebnisse und Diskussion

3-(9-Anthryl)-propylamin (APA) (**38**) konnte leider nicht hergestellt werden. Obwohl das APA (**38**) isolierbar war, konnte es weder getrocknet noch gelagert werden. Beim Trocknen verfärbte es sich von gelblich über bräunlich zu dunkelbraun. Es setzten vermutlich wärme- und lichtinduzierte Dimerisierungsreaktionen ein, welche mit normalen Lagermethoden nicht verhindert werden konnten. Dieses Phänomen von Anthracenderivaten, auch des APA (**38**), ist untersucht und literaturbekannt [230-232]. Über die Dimerisierung hinaus finden in Lösung auch Reaktionen mit CO_2 statt [230]. Welche Reaktionen beim Zerfall hier eine Rolle spielten, wurde nicht untersucht. Das APA (**38**) wurde deshalb einfach mit Salzsäure (**39**) in das Säurechlorid $\text{APA} \cdot \text{HCl}$ (**36**) überführt, dieses zeigte sich, bei einer Lagerperiode von über einem Jahr im Kühlschrank unter Lichtausschluss, als stabil. Mittels $^1\text{H-NMR}$ konnten keinerlei Zersetzungsreaktionen festgestellt werden.

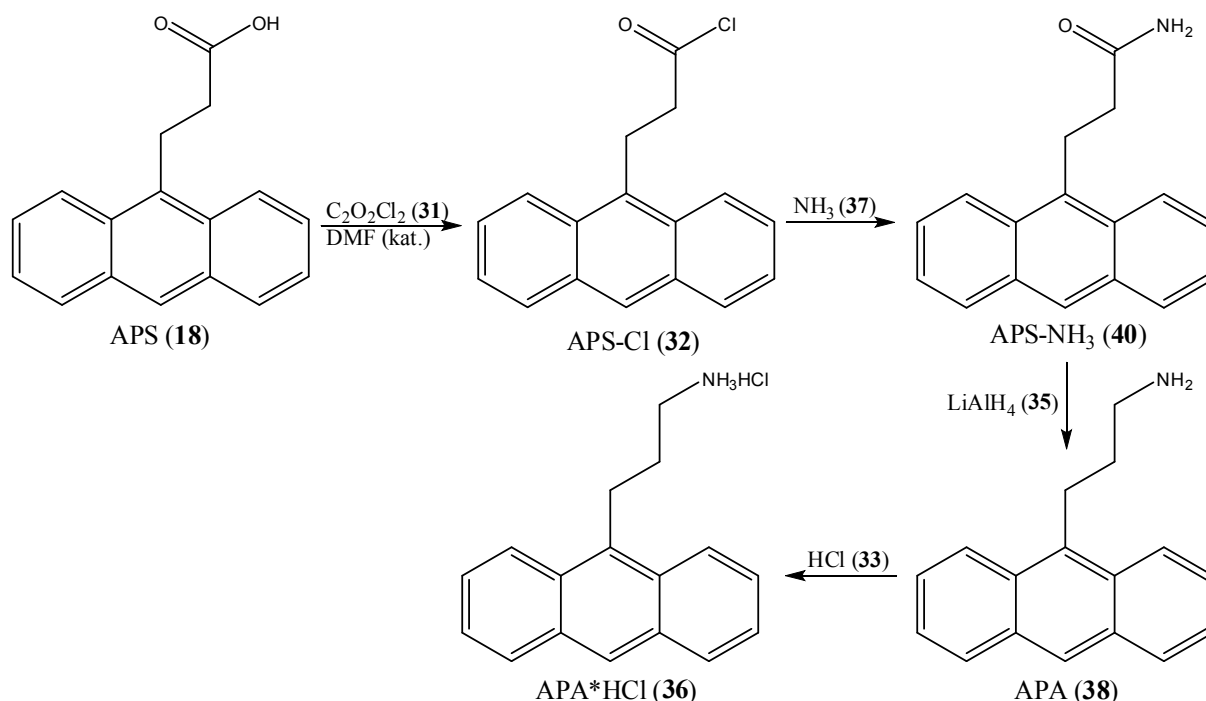


Abbildung 33: Synthese des $\text{APA} \cdot \text{HCl}$ (**36**).

Wie das APol (**34**) ist auch das $\text{APA} \cdot \text{HCl}$ (**36**) eine nukleophile Verbindung. Nach Deprotonierung zum Amin ist es ein deutlich besseres Nukleophil als das APol (**34**). Damit lassen sich Säuren nach Aktivierung mit Carbodiimid-Reagenzien derivatisieren. Im Vergleich zum APol (**34**) ist das $\text{APA} \cdot \text{HCl}$ (**36**) reaktiver. Die Zugabe von z.B. DMAP (**6**) zur nukleophilen Katalyse ist deshalb nicht mehr zwingend erforderlich. Darüber hinaus besitzt das $\text{APA} \cdot \text{HCl}$ (**36**) eine gute Wasserlöslichkeit ($>3,3$ g/L; bei Raumtemperatur). Aus diesem Grund lassen sich damit Säuren, nach Aktivierung mit dem ebenfalls wasserlöslichen

EDC*HCl (**29**), auch in wässrigen Proben derivatisieren [176]. Das primäre Amin des APA*HCl (**36**) ist nukleophiler als Wasser, sodass Derivatisierungsreaktionen im Wasser bei nicht zu hohem Überschuss an Kopplungsreagenz und Marker möglich sind. Der Mechanismus der Derivatisierungsreaktion ist in Abbildung 26 dargestellt. Durch das Addieren des großen unpolaren aromatischen Ionophors an den Analyten wird auch die Extraktion des derivatisierten Analyten aus dem Wasser erleichtert. Das Labeln von Carbonsäuren aus organischen Lösemitteln für die GC-Analyse ist bevorzugt mit dem APol (**34**), statt mit dem APA*HCl (**36**), durchzuführen. Zum einen wird keine Säure durch das APol (**34**) in die Probenlösung eingetragen, zum anderen generiert das APol (**34**) einen Ester ohne verbleibendes acids Proton. Das APA*HCl (**36**) generiert ein Amid welches für eine gaschromatographische Trennung prinzipiell geeignet ist, einem Ester aber im Vergleich unterliegt [153,154].

4.2.6 Toluol-4-sulfonsäure-3-(9-anthryl)-propylester (TSA)

Toluol-4-sulfonsäure-3-(9-anthryl)-propylester (TSA) (**41**) wurde durch Reaktion von APol (**34**) mit Tosylchlorid (TosCl) (**42**) hergestellt. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 34 dargestellt.

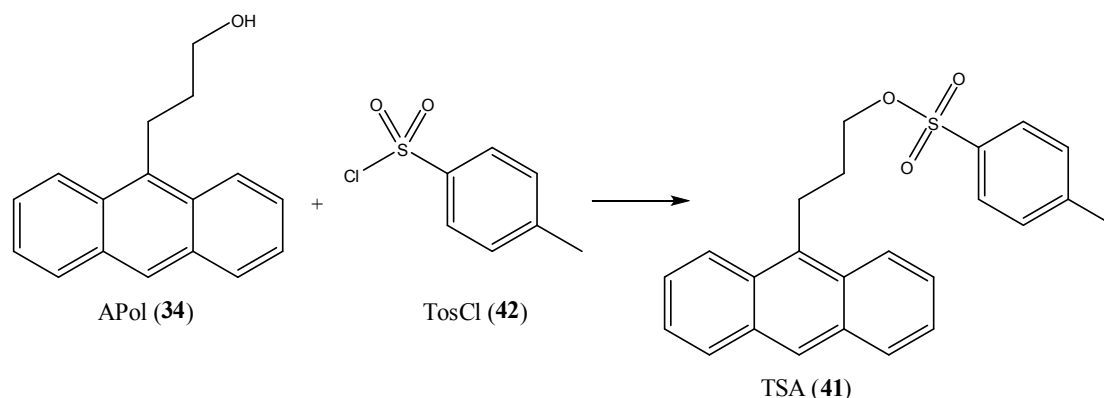


Abbildung 34: Syntheseroute von TSA (**41**).

Das Tosylat (OTos) (**43**) ist eine sehr gute Abgangsgruppe. Damit kann das TSA (**41**) analog zum DAMA (**4**) (vgl. Abbildung 17), bei dem der Stickstoff als Abgangsgruppe fungiert, reagieren. Das TSA (**41**) nimmt so an S_N2 -Reaktionen als Elektronenpaarakzeptor teil. Deprotonierte Carbonsäuren stellen Nukleophile dar und können deshalb als Elektronenpaardonatoren reagieren. Das OTos (**43**) verlässt dann das Molekül. Der Mechanismus dieser Derivatisierungsreaktion ist in Abbildung 35 dargestellt.

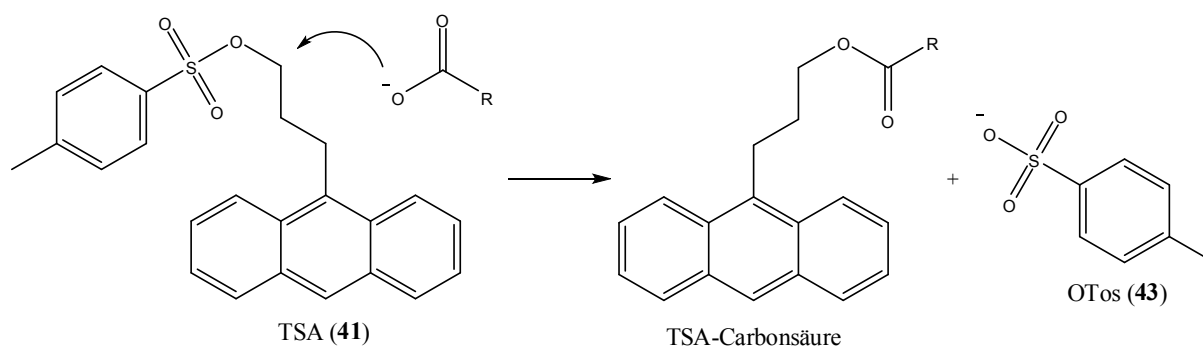


Abbildung 35: Mechanismus der Derivatisierung von Carbonsäuren mit TSA (41).

Diese Derivatisierungsstrategie für Carbonsäuren generiert das gleiche Derivatisierungsprodukt wie die Derivatisierung von Säuren mit APol (34). Die Derivatisierungsbedingungen sind allerdings aggressiver. Zum einen wird eine Base für die Deprotonierung der Carbonsäure benötigt, zu anderen erfordert diese Derivatisierungsreaktion, aufgrund der schlechten Nucleophilie deprotonierter Carbonsäuren, hohe Temperaturen.

4.3 Derivatisierung und Analyse von Alkoholen

Alkohole lassen sich direkt mittels LC-MS analysieren. Dabei kommen häufig die ESI und die APCI als Ionisationsmethoden zum Einsatz. Die Quantifizierung mit beiden Methoden ist schwierig, da die Ionisationsausbeute direkt von der Molekülstruktur abhängig ist. Deshalb müssen für eine Quantifizierung interne Standards, am besten Stabilisotopen markierte Standards, verwendet werden [41,233].

HPLC-Analysen mit einem UV-Detektor bedürfen häufig der Derivatisierung. Viele Alkohole besitzen keine natürliche UV-Absorption und es muss ein Chromophor eingeführt werden [161,233,234]. Derivatisierung von Alkoholen wird bei Analysen mit der HPLC auch eingesetzt, um die Probenaufbereitung zu erleichtern [233], um die Ionisationsausbeute und damit die Empfindlichkeit zu erhöhen [15], oder um labile Analyten zu stabilisieren [10]. Üblicherweise werden Alkohole mittels GC untersucht. Dabei lassen sich nur relativ kleine Alkoholmoleküle direkt mit der GC analysieren [235,236]. Um ihre Dampfdrücke zu erhöhen und sie damit für die GC zugänglich zu machen, werden größere Alkohole fast immer derivatisiert [10,11,210,237,238]. In manchen Fällen wird durch Derivatisierung das Fragmentieren nach der Ionisation unterbunden. Dadurch werden die Massenspektren vereinfacht und die Nachweisgrenzen verbessert [239]. Die häufigsten

Derivatisierungsreaktionen für Alkohole sind die Silylierung und die Acetylierung (vgl. Tabelle 1) [151,153,206]. Alkohole werden auch derivatisiert, um bestimmte Analysetechniken anwenden zu können (z. B. fluorierte EC-Tags [82,240]). Für die Derivatisierung von Alkoholen kommen *in situ* [122] oder *ex situ* [206] aktivierte Carbonsäuren zum Einsatz [153]. Weiter werden Alkylsilyle [151] und Alkyle mit jeweils guten Abgangsgruppen wie z.B. Bromid [154] eingesetzt.

In diesem Kapitel werden die in Kapitel 4.2 vorgestellten Marker für die Derivatisierung von Alkoholen eingesetzt.

4.3.1 Analyse des HPP

Wie in Kapitel 4.1 bereits beschrieben, wurde das HPP (**16**) als Modellanalyt für das POB (**10**) und das PHB (**11**) verwendet. Diese drei Verbindungen ähneln sich strukturell sehr stark. Alle drei besitzen einen primären Alkohol und einen Pyridinring. Abbildung 36 zeigt die Strukturen dieser drei Verbindungen.

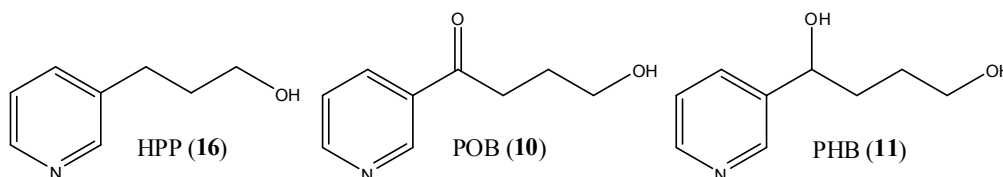


Abbildung 36: Strukturen des HPP (**16**), POB (**10**) und PHB (**11**).

Die Analyse des POB (**10**) und des PHB (**11**) ist von besonderer Bedeutung für die Krebsforschung. Diese beiden Verbindungen leiten sich vom 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) (**44**) ab, einem Nikotinmetaboliten, der Hämoglobin- bzw. DNA-Addukten bilden kann [84,88]. POB (**10**) und PHB (**11**) werden nach Hydrolyse der DNA bzw. der Hämoglobinlösung freigesetzt. Die Kanzerogenität des NNK (**44**) löst bei Labortieren vorwiegend Lungenkrebs aus. Weitere Krebsarten werden aber auch beobachtet [241]. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl Raucher als auch Nichtraucher NNK (**44**) im täglichen Leben ausgesetzt sind. Bei Nichtrauchern wurden Mengen an NNK (**44**) gefunden, welche sich zunächst nicht erklären lassen [242]. Obwohl Raucher etwa das fünfzigfache des Nikotin-Metaboliten NNK im Urin aufweisen, beträgt die freigesetzte Menge an POB (**10**) aus Hämoglobin nur ca. das Dreifache von dem der Nichtraucher [84,181]. Dieser Umstand wird über Myosmin in Lebensmitteln wie Reis und Mais erklärt. Myosmin könnte auch zu NNK (**44**) metabolisiert werden [213].

4 Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 37 zeigt einen deutlich vereinfachten Metabolismus des NNK (44) und die Freisetzung des POB (10) und des PHB (11) nach saurer Hydrolyse der DNA.

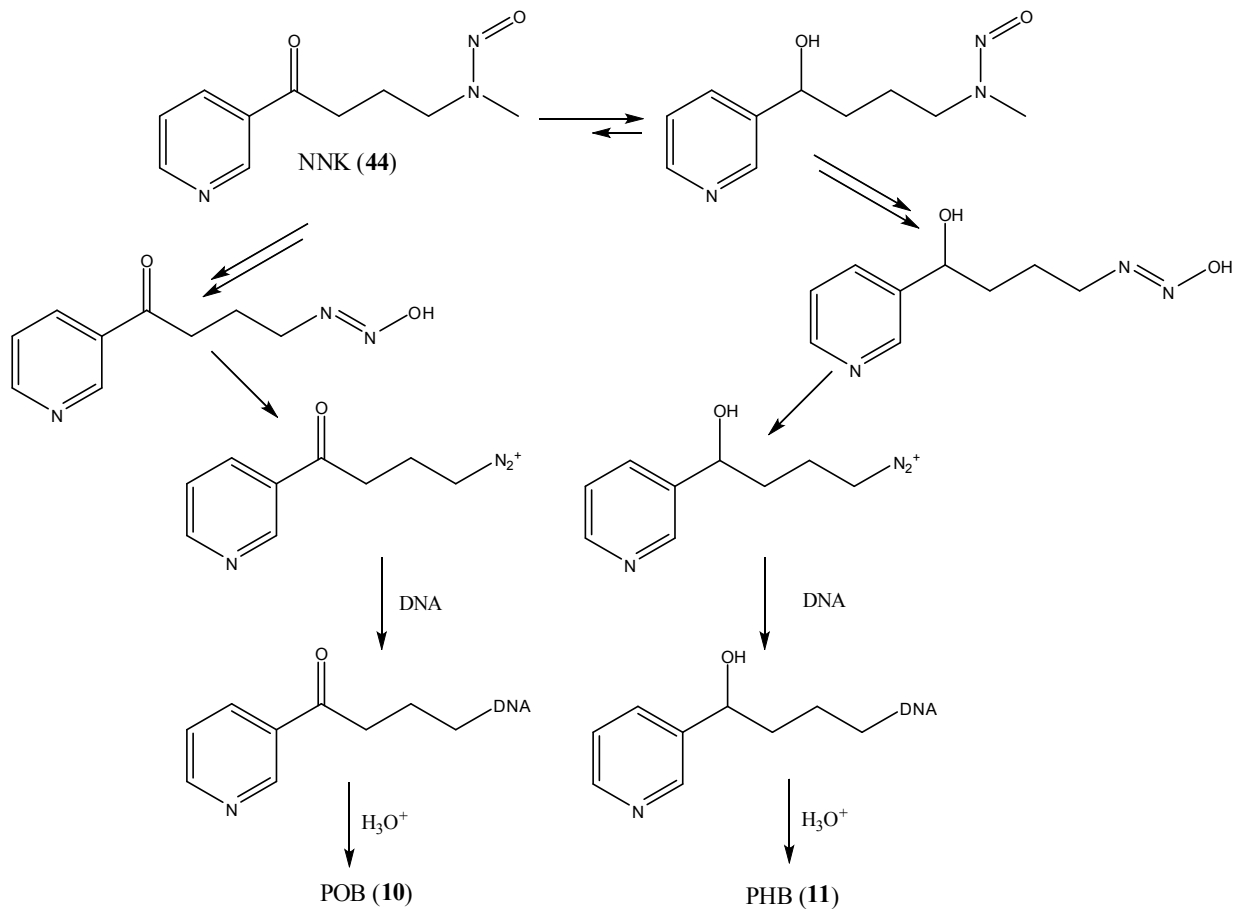


Abbildung 37: Struktur des NNK (44) und vereinfachter Metabolismus zum POB (10) und PHB (11) nach [241,242].

Da bei der Entnahme von Gewebe bei Patienten möglichst schonend verfahren werden muss, stehen nur kleine Mengen DNA für die Untersuchung auf DNA-Addukte zur Verfügung. Deshalb ist eine möglichst sensitive Analysenmethode notwendig, um kleinste Mengen dieser DNA-Addukte sicher nachweisen und quantifizieren zu können [84]. Die bisher angewandte und empfindlichste Methode für POB (10) ist das Labeln des Analyten mit Pentafluorobenzoylchlorid (12) und die anschließende Analyse mittels GC-EC-MS (vgl. Abbildung 18) [84]. Die dort berichtete Nachweisgrenze beträgt 4,6 fmol an POB (10).

Für die Derivatisierung des HPP (16) wurde für die APLI die APS (18) nach Aktivierung mit DCC (5) und DMAP (6) verwendet. Abbildung 38 zeigt das Reaktionsschema dieser Derivatisierungsreaktion.

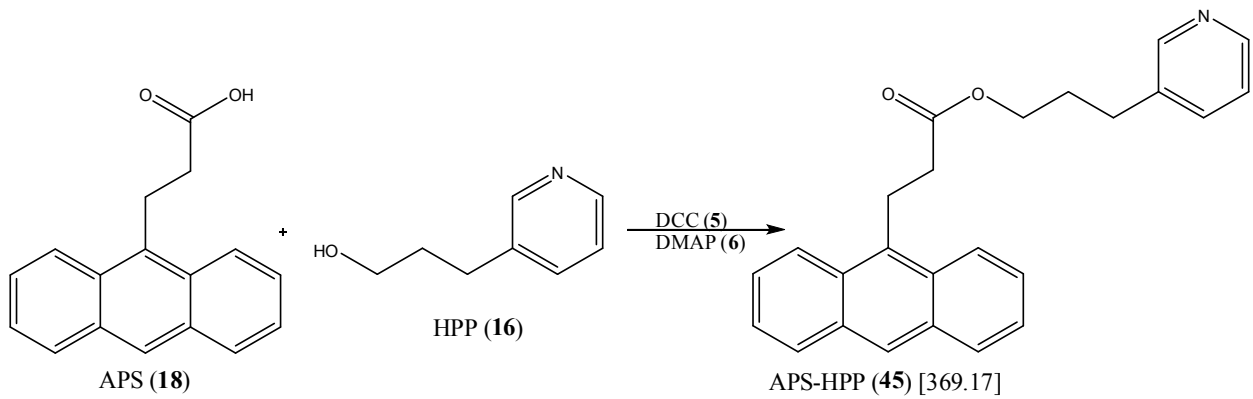


Abbildung 38: Reaktionsschema von APS (18) mit HPP (16).

Das APS-HPP (45) ließ sich mittels GC-APLI-(ToF)MS untersuchen. Dieses stellt bereits eine deutliche Verbesserung gegenüber dem AMAA-HPP (17) dar (vgl. Abschnitt 4.1). Abbildung 39 zeigt die Chromatogramme der extrahierten Massenspuren (EIC; engl. Extracted Ion Chromatogramm) des APS-HPP (45).

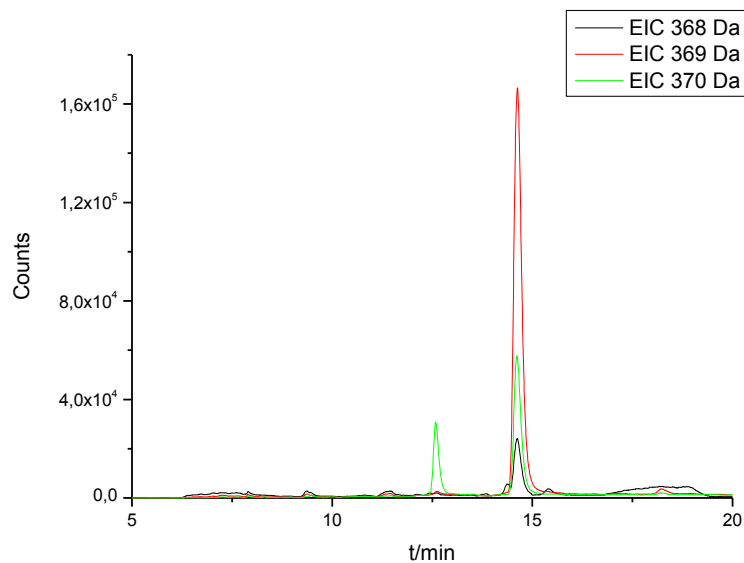


Abbildung 39: EIC einer GC-APLI-(ToF)MS-Analyse des APS-HPP (45). $[M]^+ = 369$ Da, $[M-H]^+ = 368$ Da und $[M+H]^+ = 370$ Da.

Das Massenspektrum zum Analytpeak aus Abbildung 39 ist in Abbildung 40 dargestellt.

4 Ergebnisse und Diskussion

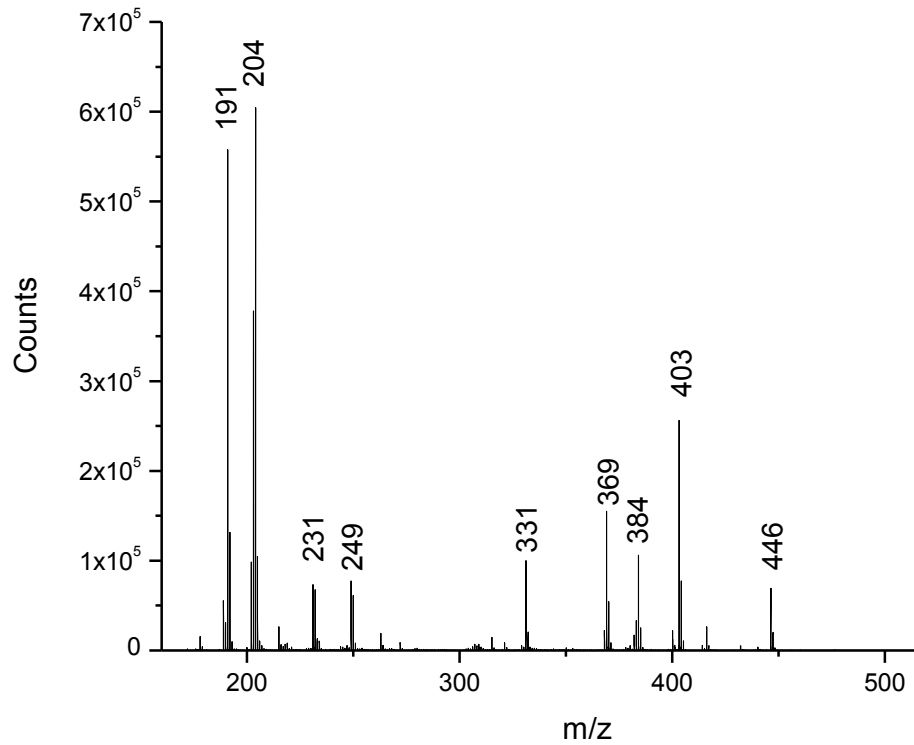


Abbildung 40: Massenspektrum zu der APS-HPP (45) GC-APLI-(ToF)MS-Analyse.

Eine Fragmentanalyse zeigt, dass auch das APS-HPP (45) fragmentiert. Abbildung 41 stellt die EICs der Fragmentmassen dar.

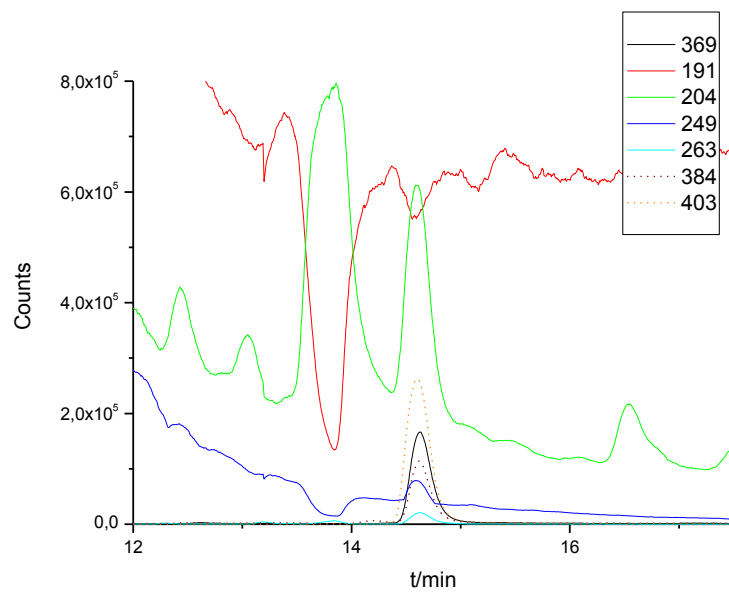


Abbildung 41: EICs der Fragmentmassen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Massenspur 446 Da und 231 Da verzichtet.

In Abbildung 41 ist deutlich zu erkennen, dass das Fragment Methylantracen mit der Masse 191 Da nicht mehr gebildet wird. Das Fragment mit der größten Fläche ist nun das Vinylanthracen (vgl. Fragment 9 in Abbildung 42). Abbildung 42 zeigt mögliche Strukturen und die Peakflächen der Fragmente bzw. der Ionisationsprodukte des APS-HPP (**45**).

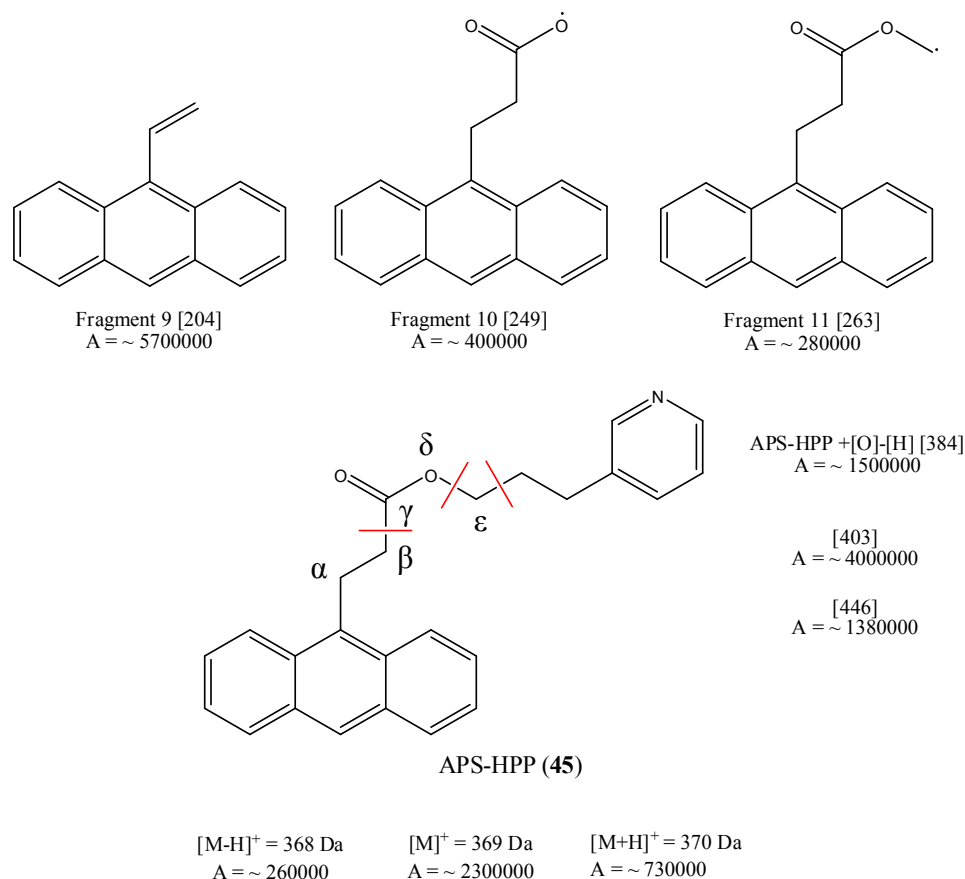


Abbildung 42: Fragmentstrukturen des APS-HPP (45**) und ihre Flächen der EIC-Chromatogramme aus Abbildung 39 und Abbildung 41.**

Es ist auch zu erkennen, dass Ionen mit größerer Masse als die des APS-HPP (**45**) detektiert werden. Das Ion mit der Masse 384 Da ist vermutlich ein Oxidationsprodukt des ionisierten und deprotonierten APS-HPP (**45**). Oxidationsreaktionen von Ionen in der Gasphase sind bekannt. Diese treten häufig in AP-Versuchen mit APPI als Ionisationsmethode auf [96]. Allerdings kann hier nicht der gleiche Mechanismus angenommen werden. In APPI-Experimenten werden Moleküle wie Wasser oder Sauerstoff durch die VUV-Strahlung direkt angeregt und können mit den Analyten reagieren. Die Photonen des hier eingesetzten Lasers haben aber nicht genug Energie für diesen Vorgang. Eventuell fungiert hier der Analyt und weitere aromatische Verunreinigungen der Ionenquelle als Dopanten und ermöglichen so die Oxidation. Die geringe Intensität des [M-H]⁺ des APS-HPP (**45**) und die Masse des

4 Ergebnisse und Diskussion

Oxidationsproduktes welches ein Wasserstoff verlieren muss, lassen vermuten, dass das APS-HPP (**45**) nach dem Verlust des Wasserstoffs bevorzugt oxidiert wird. Die Produkte mit den Massen 403 Da und 446 Da können nicht erklärt werden. Die Ionen mit den Massen 231 Da und 191 Da stammen aus Verunreinigungen der Ionenquelle. Diese beiden Fragmente zeigen keine Signalerhöhung beim Auftreten des Analytpeaks. Deren Vorhandensein kann also nicht über den Analyten erklärt werden. Die in Abbildung 42 dargestellten Fragmente deuten auf eine erhöhte Fragmentierungswahrscheinlichkeit um die polare Esterfunktion hin. Diese Fragmentierung findet vermutlich nach ähnlichen Mechanismen wie die in Abbildung 22 vorgeschlagenen Reaktionswege statt und ist stoßinduziert.

Die erhaltenen Signalfächen der Fragmente und der Analytsignale zeigen, dass mit dem neuen Marker APS (**18**) eine deutlich bessere Stabilität als mit dem alten Marker AMAA (**2**) gegeben ist. Jetzt kommen ca. 25% des derivatisierten Analyten über die GC unfragmentiert am Detektor an, vorher waren es lediglich ca. 2% über die HPLC. Die Parameter der Ionenquelle wurden bei dem Vergleich der Fragmentierungsmuster von AMAA-HPP (**17**) und APS-HPP (**45**) bewusst gleich belassen (vgl. Kapitel 5.3). Der einzige Unterschied lag in dem Wechsel von der HPLC-APLI-Konfiguration zu der GC-APLI-Konfiguration.

Im weiteren Verlauf der Arbeit mit dieser Derivatisierungsreaktion wurde beobachtet, dass der derivatisierte Testanalyt APS-HPP (**45**) in Lösung nicht stabil war. Er zersetzte sich im Laufe der Derivatisierungsreaktion bzw. während des Aufbewahrens in Lösung wieder. Was mit dem derivatisierten Analyten in Lösung passiert, wurde nicht untersucht. Abbildung 43 zeigt drei Injektionen ein und derselben mit APS (**18**) derivatisierten HPP (**16**)-Lösung.

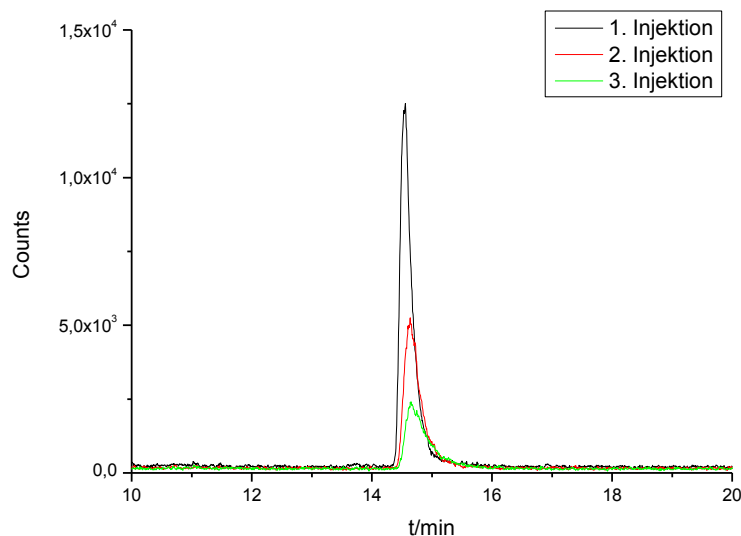


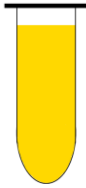



Abbildung 43: Mehrfachinjektion einer Lösung, welche APS-HPP (**45**) enthielt.

Es ist zu erkennen, dass die Konzentration mit der Zeit abnimmt. Zwischen der ersten und der dritten Injektion vergingen ca. vier Stunden. Aufgrund der Instabilität in Lösung wurden alle darauffolgenden Derivatisierungen des HPP (**16**) nach einer definierten Reaktionszeit eingengt und erst kurz vor der Injektion wieder gelöst.

Im Laufe dieser Arbeit wurden die Derivatisierungsbedingungen so angepasst, dass eine möglichst geringe Menge Analyt sicher nachweisbar ist. Dabei wurden sowohl die Konzentrationen der Reagenzien, die Menge an Analyt, die Reaktionszeit der Derivatisierung und die Derivatisierungstemperatur durch Variation optimiert. Der Einsatz von Ultraschall zur Verbesserung der Derivatisierungsausbeute wurde erprobt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die variierten Parameter und deren Kombination untereinander.

Die Reaktionsgefäße wurden den Anforderungen der Reaktionsführung ebenfalls angepasst, sodass die Derivatisierungsreaktionen letztendlich in GC-Inserts (ca. 100 μL Innenvolumen) durchgeführt wurden. Das optimale Volumen für diese Reaktion betrug 15 μL , eine Derivatisierungszeit von 1 h im Ultraschallbad hat sich als geeignet erwiesen. Die Konzentration dieser Derivatisierungslösung konnte leider nicht in den sub-nM-Bereich verschoben werden, dieses ist vermutlich durch den Abbau des derivatisierten Analyten zu begründen. Durch das niedrige Volumen konnten aber Analytmengen im femtomolaren Bereich (10^{-15} mol) erfolgreich derivatisiert und analysiert werden.

Tabelle 2: Variierte Parameter für die Derivatisierung des HPP (16)

Volumen / μL	1500	100	50 - 100	15
c (Analyt)	mM - μM	μM -nM	μM -nM	nM
n (Analytmenge)	nmol - pmol	pmol	pmol	fmol
t	2-4h	2h	>5h	<2h
T	35 - 45°C	RT - 35°C	RT - 45°C	RT (im Ultraschallbad)
Gefäße	 Eppendorf Reaktionsgefäß 2 mL	 Eppendorf Reaktionsgefäß 0,5 mL	 GC-Vial 2 mL	 GC-Vial mit Insert ~ 0,1 mL

4 Ergebnisse und Diskussion

Um die Abhängigkeit der Analyse von der derivatisierten Analytmengenmenge zu testen, wurde eine Derivatisierungsreihe mit verschiedenen Mengen Analyt angesetzt und vermessen.

Abbildung 44 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Die Darstellung belegt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter HPP (**16**)-Menge und erhaltenem Signal besteht, sodass die APLI nach vorheriger Derivatisierung durchaus für quantitative Bestimmungen genutzt werden kann.

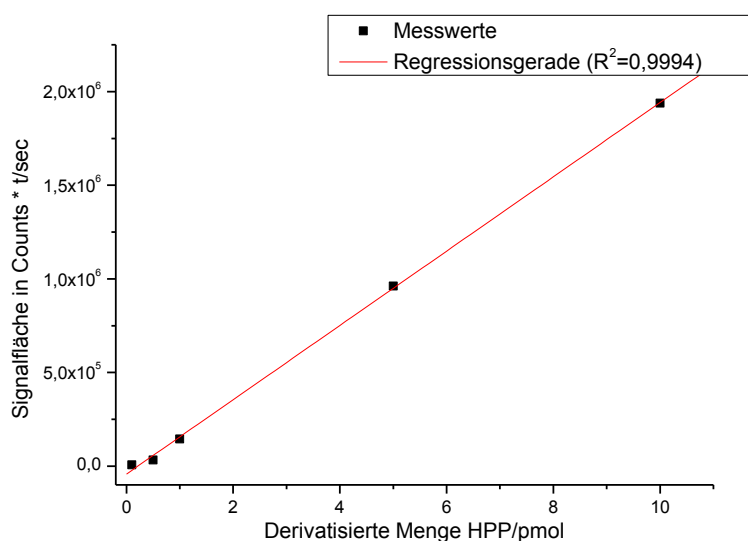


Abbildung 44: Analytmengenabhängige Derivatisierung des HPP (16).

Abbildung 45 zeigt zwei der EIC-Signale aus Abbildung 44. Dargestellt sind die EIC-Chromatogramme für 100 fmol (10 μ L einer 10 nM HPP (**16**)-Lösung) und 1 pmol (10 μ L einer 100 nM HPP (**16**)-Lösung) HPP (**16**). Bei einem Massenfenster des EIC von $[M+H]^+ \pm 0,5$ Da ergibt sich für das HPP (10 nM) ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) von 12. Die Nachweisgrenze (LOD; engl. Limit of Detection; $S/N = 3$), berechnet über das S/N-Verhältnis, entspricht damit 2,5 nM bzw. 25 Femtomol Gesamtmenge Analyt.

Bei einer Verkleinerung des ausgewerteten Massenfensters des EICs auf $[M+H]^+ \pm 0,05$ Da lässt sich die Nachweisgrenze weiter erniedrigen. Durch die Reduzierung der ausgewerteten Massenbreite lässt sich das Rauschen reduzieren und so das S/N-Verhältnis auf 40 verbessern. Da das Massenspektrometer in dieser Arbeit allerdings nicht kalibriert war, wurde von dieser Möglichkeit kein Gebrauch gemacht.

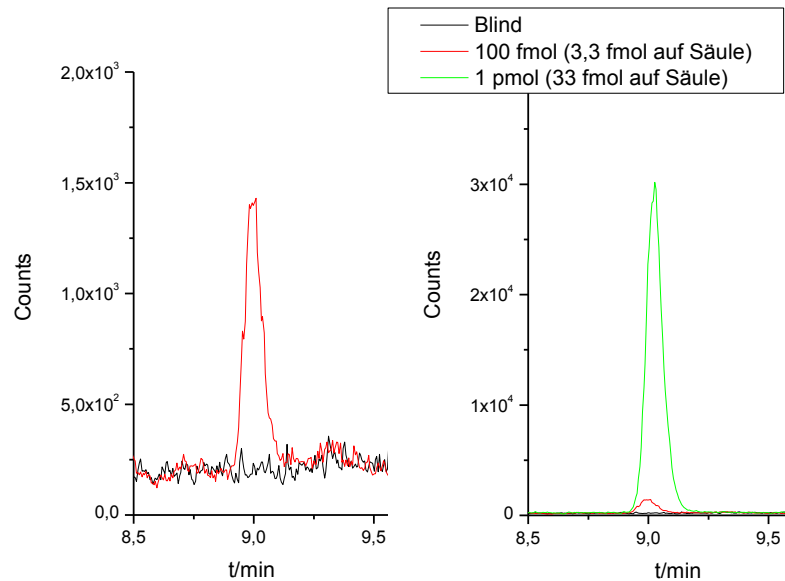


Abbildung 45: Bestimmung der Nachweisgrenze für das HPP (16).

4.3.2 Analyse des 6:2- und des 8:2-FTOHs

Um die Möglichkeiten der neuen APLI-Marker zu demonstrieren, wurden Fluortelomeralkohole (FTOHs) als weitere Testanalyten für Alkohole ausgewählt. Fluortelomeralkohole sind teilfluorierte aliphatische Alkohole. Sie bestehen aus einer geraden Anzahl von fluorierten Kohlenstoffatomen und einer geraden Anzahl nicht fluorierten C-Atome. Das letzte nicht fluorierte Kohlenstoffatom trägt die OH-Gruppe. Sie werden über die Anzahl der fluorierten und nicht fluorierten Kohlenstoffatome klassifiziert und benannt. Die erste Zahl in der Benennung ist die Anzahl der fluorierten, die zweite Zahl die Anzahl der nicht fluorierten Kohlenstoffatome [243,244]. Abbildung 46 zeigt die Struktur der hier untersuchten FTOHs und erläutert die Benennung.

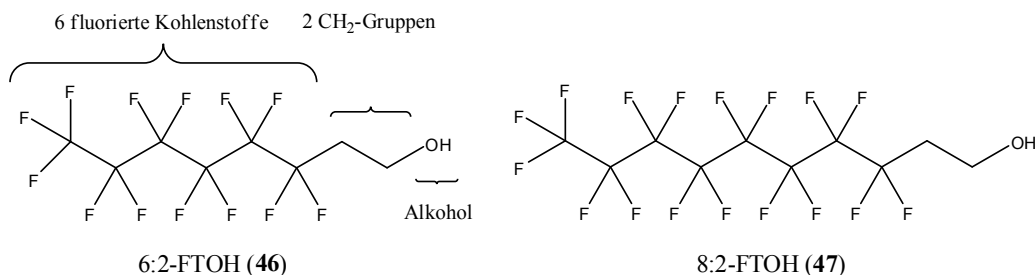


Abbildung 46: Struktur der hier untersuchten Fluortelomeralkohole 6:2- (46) und 8:2-FTOHs (47).

FTOHs sind wichtige Verbindungen für die Materialwissenschaft. Sie werden in Polymeren, Farben, Papier, Teppichen, Löschmitteln und Beschichtungen eingesetzt. Sie sind leicht

4 Ergebnisse und Diskussion

flüchtig und deshalb in der Atmosphäre weit verbreitet. Darüber hinaus stellen sie die Ausgangsstoffe für die potentiell krebserregenden Perfluorcarbonsäuren dar [243,245,246]. Perfluorcarbonsäuren sind über den Einsatz in der Industrie weit verbreitet und lassen sich sogar im Blut der Allgemeinbevölkerung nachweisen [247,248]. FTOHs sind hitzestabil und verfügen über die Eigenschaft, die Oberflächenspannung zu reduzieren. Sie sind gute Schaumbildner [243]. Das 8:2-FTOH (**47**) ist das am weitesten verbreitete FTOH [247]. Diese fluorierten Alkohole werden durch z.B. Hydrolyse von imprägnierten Beschichtungen freigesetzt und so entweder durch den menschlichen Körper aufgenommen oder über ihre Flüchtigkeit in die Umwelt freigesetzt [248]. Die sensitivste bisher publizierte Methode für das 6:2- (**46**) bzw. das 8:2-FTOH (**47**) basiert auf einer GC-CI-MS Messung im positiven Modus. Die Bestimmungsgrenzen betragen 522 pM für das 6:2-FTOH (**46**) und 275 pM für das 8:2 FTOH (**47**). Dies ergibt Nachweisgrenzen von 174 pM für das 6:2-FTOH (**46**) bzw. 91 pM für das 8:2-FTOH (**47**) [249].

Zwei der hier vorgestellten APLI-Marker können für die Kopplung mit Alkoholen eingesetzt werden. Das APS-Cl (**32**) reagiert direkt mit Alkoholen, das APS (**18**) lässt sich nach Aktivierung mit Carbodiimid-Reagenzien an Alkohole koppeln. Die Reaktion des APS-Cl (**32**) mit dem 8:2-FTOH (**47**) ist in Abbildung 47 dargestellt.

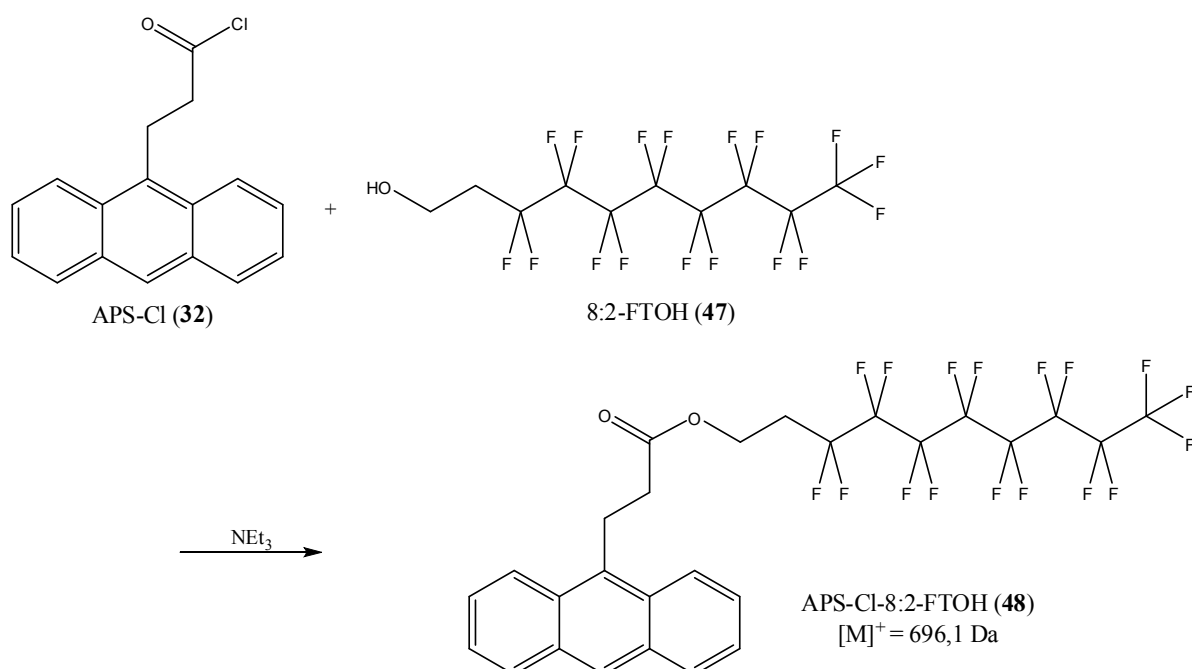


Abbildung 47: Reaktionsschema zur Derivatisierungsreaktion von 8:2-FTOH (**47**) mit APS-Cl (**32**).

Die Analyse einer 1,6 $\mu\text{molaren}$ und mit APS-Cl (**32**) derivatisierten 8:2-FTOH (**47**)-Lösung ergab ein chromatographisches Signal mit einem S/N-Verhältnis von 67900. Die injizierte

68

4 Ergebnisse und Diskussion

8:2-FTOH (47) liegt das S/N-Verhältnis bei einer Konzentration von 95 pM und einer Injektionsmenge von 95 Attomol bei 6,1. Dies ergibt jeweils eine Nachweisgrenze von unter 50 pM und eine detektierbare Analytmenge von ca. 50 Attomol auf der GC-Säule.

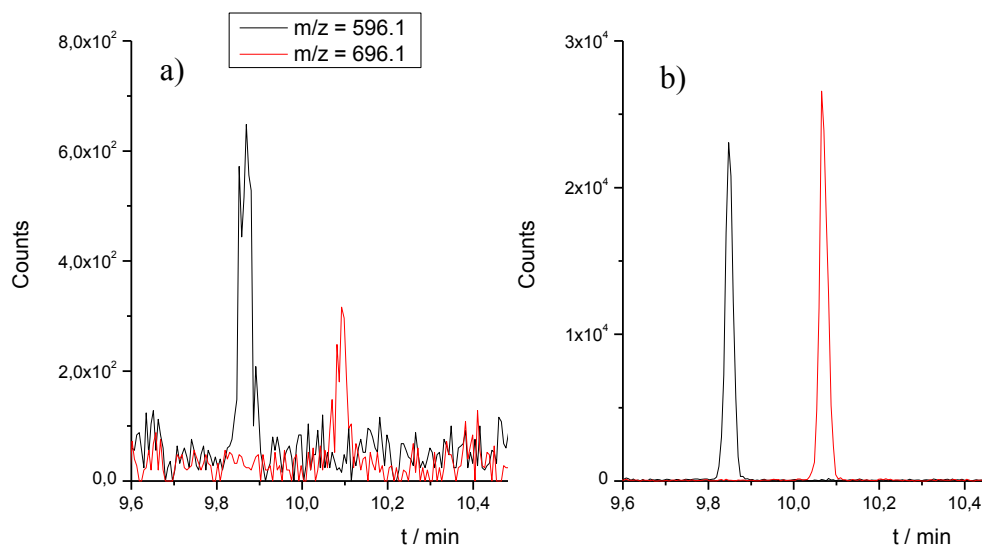


Abbildung 50: GC-APLI-(ToF)MS-Analyse des 6:2 FTOH (46) und des 8:2 FTOH (47) nach Derivatisierung mit APS (18). a) 6:2 FTOH (46) 107 pM; 8:2 FTOH (47) 95 pM. b) 6:2 FTOH (46) 1,25 nM; 8:2 FTOH (47) 1,12 nM.

4.4 Derivatisierung und Analyse von Carbonsäuren

Carbonsäuren werden üblicherweise sowohl mit der HPLC als auch mit der GC analysiert. Ionen- und flüssigchromatographische Trennungen von Carbonsäuren können ohne Derivatisierung durchgeführt werden. Dabei kommen die UV- [250,251] und die Leitfähigkeitsdetektion [157,252] zum Einsatz. Die Massenspektrometrie ist ebenfalls sehr gut für ungelabelte Säuren einsetzbar [157,253]. Carbonsäuren können vor der Analyse mittels HPLC derivatisiert werden, um z.B. die Selektivität zu erhöhen [157,176]. Die Nachweisgrenzen werden durch geeignete Derivatisierungsreaktionen ebenfalls verbessert [177]. So werden z.B. Chromophore addiert welche eine bessere UV- [159,170] bzw. Fluoreszenzdetektion [150,160,163-165,174,175] zulassen.

Carbonsäuren lassen sich auch ohne Derivatisierung mittels GC untersuchen. Da Säuren sehr polar sind, muss die GC aber angepasst werden. Lange Fettsäuren lassen sich z.B. auf speziellen stationären Phasen aus Polyethylenglycol trennen [254]. Kleinere Carbonsäuren können auch auf anderen stationären Phasen untersucht werden [157]. Am häufigsten werden Massenspektrometer und Flammenionisationsdetektoren für die Detektion eingesetzt.

Der Großteil der Analysen von Säuren mittels GC wird aber mit Derivatisierung durchgeführt [157,205,252,253,255,256]. Die Derivatisierung von Säuren zur Erniedrigung der Polarität ist weit verbreitet. Häufig werden Silylierungs- bzw. Methylierungsreaktionen angewendet (vgl. Tabelle 1) [151,154,206,257]. Daneben werden Säuren häufig in Gegenwart einer Base nach dem S_N2 -Mechanismus derivatisiert. Als Abgangsgruppe kommen dabei oft Bromid [165,170,173,175] und das in dieser Arbeit verwendete OTos (**43**) [150,160,163,164] zum Einsatz. Säuren werden auch nach Aktivierung mit DCC (**5**) [122], EDC*HCl (**29**) [171,174,176,177,207] und *N,N'*-Carbodiimidazol (**51**) (CDI) [154] derivatisiert.

In diesem Abschnitt werden die aus Kapitel 4.2 vorgestellten Marker für die Derivatisierung von Carbonsäuren eingesetzt.

4.4.1 Derivatisierung und Analyse einer Carbonsäuremischung

Carbonsäuren spielen eine wichtige Rolle in der Natur. Hier findet man sie u.a. als Bestandteile von Pflanzen [150,163]. Sie stellen oft auch Biomarker in der Umwelt dar [257]. Carbonsäuren werden deshalb z.B. in Metabolismusstudien untersucht. Sie spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Medizin und der Lebensmittelindustrie [136]. Manche Säuren sind Botenstoffe oder übernehmen wichtige andere Funktionen im Körper [170,258]. In diesem Abschnitt wird eine Carbonsäurestandardlösung derivatisiert und so die Funktion der APLI-Label für Säuren demonstriert.

Das TSA (**41**) kann als Elektrophil unter S_N2 -Bedingungen mit deprotonierten Carbonsäuren reagieren. Abbildung 35 zeigt den Mechanismus dieser Reaktion. Um die Funktionsweise der TSA (**41**) als Label für Carbonsäuren zu demonstrieren, wurde hier eine Standardlösung, welche 1 nM Methacrylsäure (MAA; engl. Methacrylic Acid) (**52**) und 1 nM Hexansäure (**53**) enthielt, derivatisiert und anschließend mittels GC-APLI-(ToF)MS analysiert. Abbildung 51 stellt die beiden Säuren und die Derivatisierungsprodukte dieser Derivatisierungsreaktion dar.

4 Ergebnisse und Diskussion

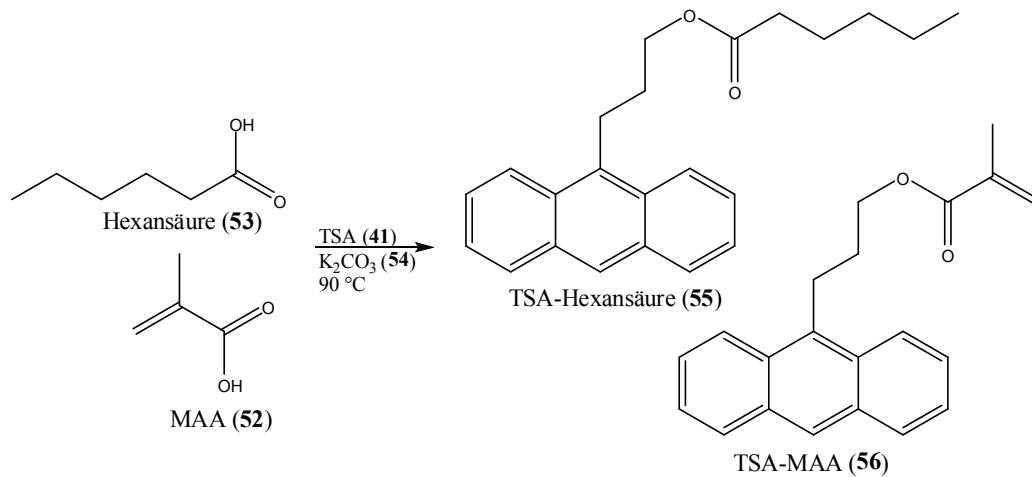


Abbildung 51: Strukturen der Testanalyten MAA (52) und Hexansäure (53) und die Strukturen der mit TSA (41) derivatisierten Säuren.

Abbildung 52 zeigt die Analyse dieser derivatisierten Standardlösung. Das chromatographische Signal der TSA-Hexansäure (55) ergibt bei einer eingesetzten Konzentration von 1 nM und einer injizierten Analytmenge von 1 fmol auf die GC-Säule ein S/N-Verhältnis von 367. Daraus lässt sich eine Nachweisgrenze von unter 50 pM bzw. 50 amol Analytmenge auf der Säule berechnen. Das Signal der TSA-MAA (56) ergibt bei gleichen Einsatzmengen ein S/N-Verhältnis von 58. Die berechnete Nachweisgrenze beträgt demnach 320 pM bzw. 320 Attomol. Die Unterschiede der Nachweisgrenzen ergeben sich aus unterschiedlichen Derivatisierungsausbeuten für die MAA (52) bzw. die Hexansäure (53). Die Polaritäten der beiden Säuren unterscheiden sich. Dieses hat einen Einfluss auf die pK_s-Werte und auf die Reaktivitäten der Analyten. Ein weiterer Grund für unterschiedliche Signalgrößen ist die Iontenmission zum Massenanalysator des micrOTOF. Diese ist massenabhängig und transferiert Ionen abhängig von deren m/z-Verhältnis.

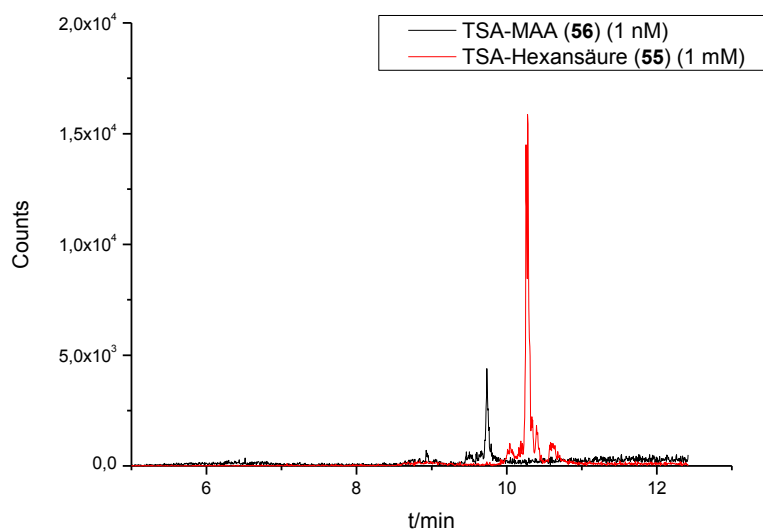


Abbildung 52: GC-APLI-(ToF)MS-Analyse einer 1 nM Hexansäure- (53) und einer 1 nM Methacrylsäure (52)-Lösung nach Derivatisierung mit TSA (41).

In Abbildung 52 ist ein Anstieg des Rauschens beider Massenspuren vor und nach dem eigentlichen Analytsignal zu erkennen. Vermutlich ist dieses der Salzfracht der Derivatisierungslösung und der anwesenden Tosylationen (43) geschuldet. Der Anstieg der Basislinie vor bzw. nach dem Analytsignal deutet auf eine inhomogene Verdampfung hin. Unterschiedliche Injektortemperaturen und das Säubern des Injektorsystems brachten nur kleine Verbesserungen dieses Phänomens. Das Label TSA (41) ist damit nicht ohne weitere Probenaufbereitung für den Einsatz in der GC-APLI-ToF(MS) geeignet.

Carbonsäuren lassen sich auch mit APol (34) derivatisieren. Der Mechanismus dieser Reaktion wurde bereits in Abbildung 26 erläutert. Der Analyt muss vor der Derivatisierung aktiviert werden. Dazu eignen sich z.B. das DCC (5) oder das EDC*HCl (29). Um die Kopplung des APol (34) mit Carbonsäuren zu demonstrieren, wurde eine Propansäure (57) und Hexansäure (53) (je 1 nM in DCM) enthaltende Lösung derivatisiert und analysiert. Abbildung 53 zeigt die Strukturen dieser beiden Testanalyten und die jeweiligen Derivatisierungsprodukte.

4 Ergebnisse und Diskussion

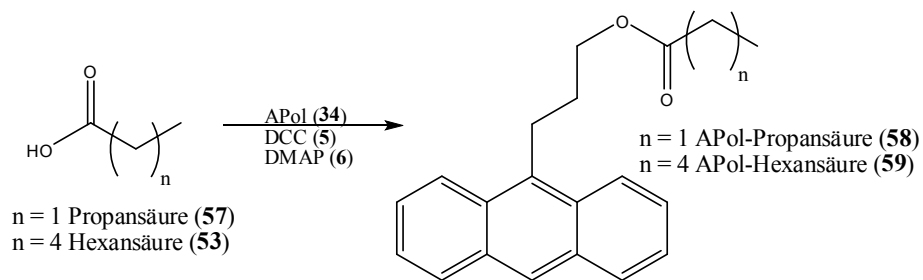


Abbildung 53: Strukturen des Testanalyten Propansäure (57) und Hexansäure (53) und deren jeweiliges Derivatisierungsprodukt.

Das chromatographische Signal der APol-Propansäure (58) ergab bei einer injizierten Analytmenge von 1 Femtomol ein S/N-Verhältnis von 100. Damit liegt die berechnete Nachweisgrenze bei unter 100 pM bzw. unter 100 Attomol Injektionsmenge. Für das Signal der APol-Hexansäure (59) wurde ein S/N-Verhältnis von 1000 bestimmt. Die Nachweisgrenzen ergeben sich daraus näherungsweise zu 10 pM bzw. 10 Attomol auf der Säule. Abbildung 54 zeigt das Chromatogramm, welches diesen Berechnungen zu Grunde liegt.

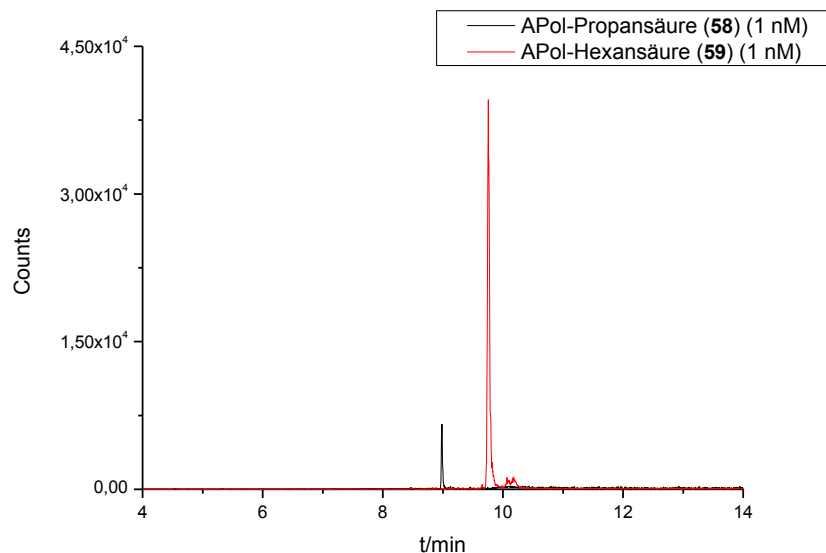


Abbildung 54: GC-APLI-(ToF)MS-Analyse einer 1 nM Propansäure (57) und einer 1 nM Hexansäure (53)-Lösung nach Derivatisierung mit APol (34).

Auch hier sind die Signalintensitäten trotz gleicher Konzentration der Analyten unterschiedlich. Der Grund dafür sind die unterschiedlichen Derivatisierungsausbeuten der beiden Säuren.

4.4.2 Derivatisierung und Analyse von Acrylsäure und Methacrylsäure

Acrylsäure (AA; engl. Acrylic Acid) (**60**) und MAA (**52**) sind sehr wichtige Bausteine in der Polymerchemie [259]. Beides sind sehr polare kleine Carbonsäuren, welche keine große Toxizität aufweisen [260,261]. Die Analyse von AA (**60**) kann nach einer aufwendigen und mehrstufigen Extraktion aus wässriger Matrix mit anschließender Derivatisierung und GC-Analyse ausgestattet mit einem Electron Capture Detector (ECD) durchgeführt werden. Die Nachweisgrenze liegt dann bei 3 nM [262]. HPLC-Analysen mit anschließender elektrochemischer Detektion ergeben Nachweisgrenzen von 20 nM [263]. Für HPLC-Analysen von Acrylsäure (**60**) mit anschließender UV-Detektion wurden Nachweisgrenzen von 0,7 ng (entspricht ca. 8 Picomol) berichtet. Vermutlich ist dies die injizierte Menge. Die Publikation macht diesbezüglich leider keine genauen Angaben [264]. In dieser Arbeit wurden AA (**60**) und MAA (**52**) als Modellanalyten für wasserlösliche Säuren ausgewählt um die Derivatisierung von Säuren aus wässrigen Proben zu demonstrieren.

Um die Derivatisierbarkeit von Säuren und deren anschließende Extraktion aus wässriger Lösung zu zeigen, wurde AA (**60**) und MAA (**52**) mit APA*HCl (**36**) derivatisiert und die Derivatisierungsprodukte mit Dichlormethan aus der wässrigen Phase extrahiert. Abbildung 55 zeigt die Analyten und die mit Dichlormethan extrahierbaren Derivatisierungsprodukte.

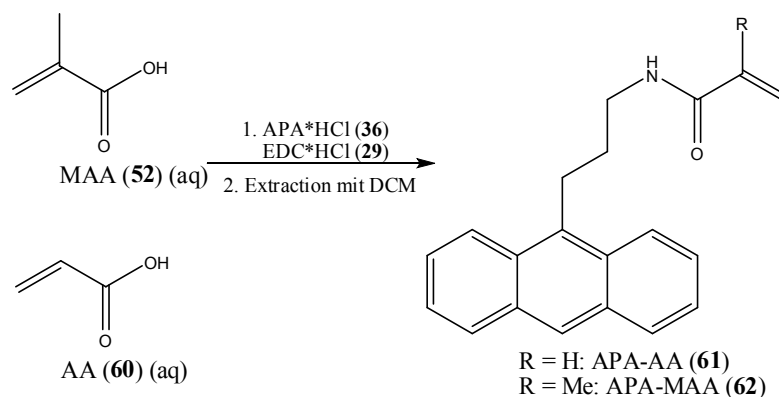


Abbildung 55: Strukturen und Derivatisierungsprodukte von AA (**45**) und MAA (**41**).

Abbildung 56 zeigt die Massenspektren von APA-AA (**61**) und APA-MAA (**62**) nach Derivatisierung im wässrigen Milieu, Extraktion mit Dichlormethan und Trennung mittels HPLC. Es ist zu erkennen, dass es zu keinerlei Fragmentbildung kommt. Die derivatisierten Analyten sind nach der Ionisation mittels APLI stabil.

4 Ergebnisse und Diskussion

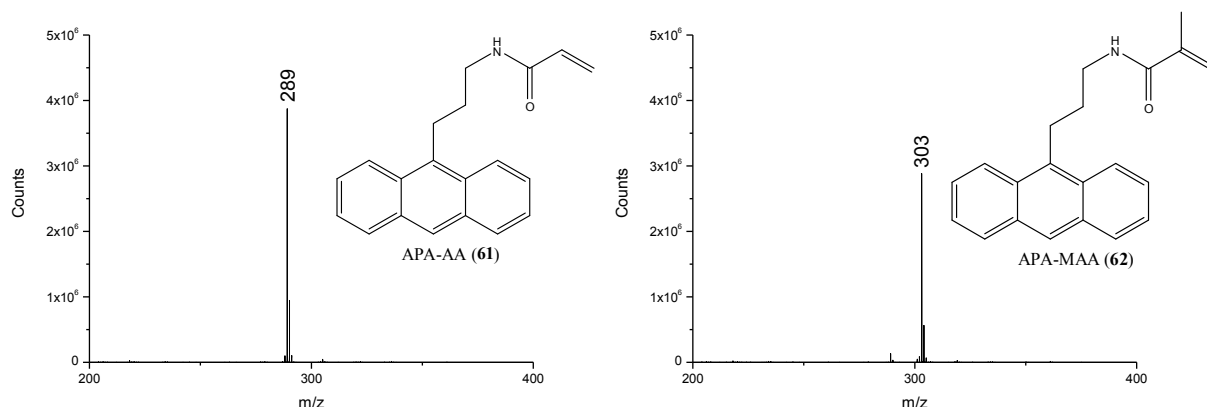


Abbildung 56: Massenspektren von APA-AA (61) und APA-MAA (62) nach Trennung mittels HPLC.

Diese Derivatisierungsreaktion wurde anschließend auf eine komplexe Matrix übertragen. Urin wurde mit einer AA (60) und MAA (52) enthaltenden wässrigen Lösung versetzt, sodass die Konzentration des AA (60) im Urin 165 μM und des MAA (52) 108 μM betrug. Die Derivatisierungsbedingungen wurden nicht auf die Matrix optimiert. Die hier dargestellten Ergebnisse stellen deshalb nicht das Optimum einer Derivatisierung von Säuren im Urin dar. Die Derivatisierung und Extraktion wurde dreimal durchgeführt. Abbildung 57 stellt die Chromatogramme der EICs für APA-AA (61) und APA-MAA (62) dar.

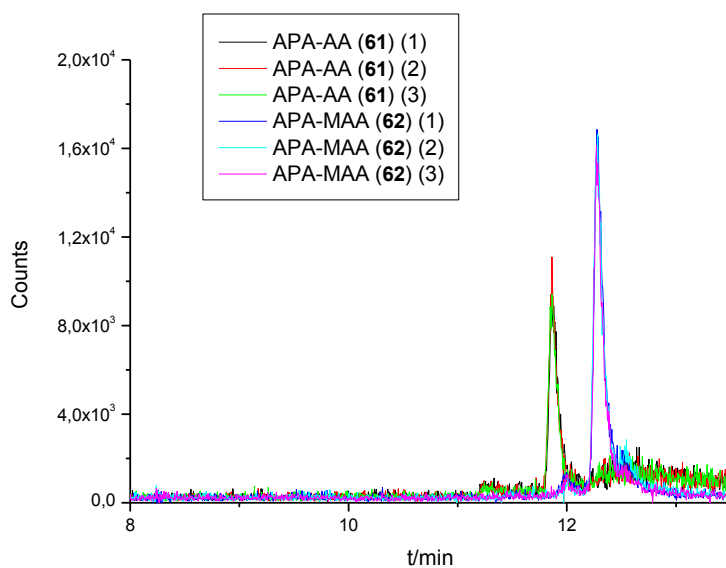


Abbildung 57: HPLC-APLI-(ToF)MS-Analyse einer mit AA (60) und MAA (52) aufgestockten Urinprobe. Die Probe wurde dreimal derivatisiert und aufgearbeitet. Dargestellt sind die EICs von APA-AA (61) und APA-MAA (62) der drei Ansätze.

Die für das APA-AA (**61**) erhaltene S/N-Verhältnis beträgt 44. Damit liegt die Nachweisgrenze für die hier dargestellte Derivatisierung bei 10 μM . Das APA-MAA (**62**) ergab ein S/N-Verhältnis von 82, die Nachweisgrenze für das MAA (**52**) liegt demnach bei 4 μM . Die Standardabweichung für die Signalfäche des APA-AA (**61**) beträgt 2,6 %, die des APA-MAA (**62**) beträgt 4,9 %.

4.5 Derivatisierung und Analyse von Aminen

Amine werden sowohl mit der HPLC [147,148,207,265-271] als auch mit der GC [155,212,272,273] analysiert. Da die meisten Amine keine UV-Absorption zeigen oder keine natürliche Fluoreszenz aufweisen, werden sowohl Vor- als auch Nachsäulenderivatisierungsreaktionen eingesetzt [147,207,265,266,268,270,271,274]. Die Massenspektrometrie ist geeignet, um Amine ohne Derivatisierung nach einer Trennung auf der HPLC zu detektieren [147]. Trotzdem wird zur Verbesserung der chromatographischen Trennung [148,269] oder zur Erhöhung der Ionisationsausbeute eine Derivatisierung oftmals eingesetzt [148]. Darüber hinaus können Derivatisierungsreaktionen die Fragmentierungseigenschaften von Aminen ändern [148]. Auch GC-Analysen werden sowohl mit [147,155,212,272] als auch ohne [155,273] vorherige Derivatisierung durchgeführt. Die Derivatisierung von Aminen vor der Analyse mit der GC reduziert deren Polarität und erhöht den Dampfdruck. Darüber hinaus wird durch die Derivatisierung die Adsorption an die stationäre Phase reduziert und ein Tailing und Memoryeffekte verhindert [155,272,273]. Derivatisierungsreaktionen haben üblicherweise keinen Effekt auf die Detektion von Aminen nach der Trennung mittels GC. Amine werden für die GC häufig acetyliert oder alkyliert (vgl. Tabelle 1) [153,154,206]. Zur Derivatisierung von Aminen werden oft Säurechloride [166], Säureanhydride [155] oder Aktivester [118,209,275] eingesetzt. Es können aber auch Carbonsäuren mit einem Aktivierungsreagenz wie DCC (**5**) verwendet werden [122].

4.5.1 Analyse eines Propylaminstandards

In diesem Abschnitt soll demonstriert werden, dass das APS (**18**) ein geeignetes Derivatisierungsreagenz für Amine darstellt. Hierfür wurde Propylamin (**63**) als Modellanalyt ausgewählt. Das Propylamin (**63**) wurde unter DCC (**5**)-Kopplung mit APS (**18**) derivatisiert. Abbildung 58 zeigt die Reaktionsgleichung dieser Derivatisierungsreaktion.

4 Ergebnisse und Diskussion

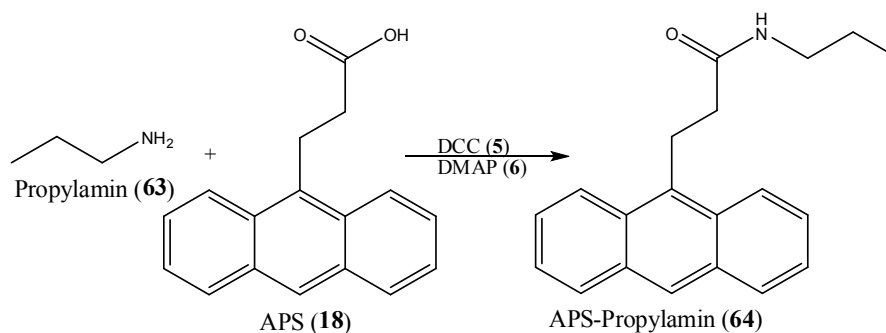


Abbildung 58: Reaktionsgleichung von Propylamin (63) mit APS (18).

Die aus dieser Derivatisierungsreaktion resultierende GC-Analyse des APS-Propylamins (64) ist in Abbildung 59 dargestellt. Die Derivatisierung einer 250 nM Propylaminlösung und die in die GC injizierte Analytmenge von 250 Femtomol resultierte in ein chromatographisches Signal mit einem S/N-Verhältnis von 1280. Die sich daraus berechnete Nachweisgrenze beträgt ca. 600 pM bzw. 600 Attomol.

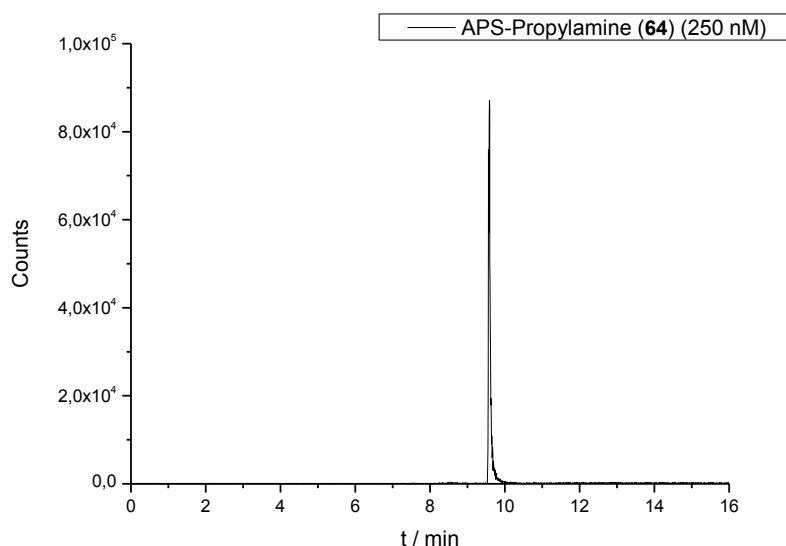


Abbildung 59: GC-APLI-(ToF)MS-Analyse einer 250 nM Propylamin (63)-Lösung nach Derivatisierung mit APS (18).

4.5.2 Analyse von Spermin und Spermidin

Spermin (65) (Spn) und Spermidin (66) (Spd) sind zwei Polyamine. Polyamine sind wichtige Analyten für die Krebsforschung. Es wird angenommen, dass Polyamine eine wichtige Rolle für den Wachstum von Krebszellen spielen und deshalb im Urin bei Patienten mit Krebs in höheren Konzentrationen gefunden werden können [276,277]. Die bisher berichteten Nachweisgrenzen dieser beiden Analyten liegen im unteren nanomolaren Bereich. Nach der Derivatisierung mit Dansylchlorid und der Analyse mittels HPLC mit UV-Detektion wurden

Nachweisgrenzen von 1 nM Spd (**66**) und 1,6 nM Spn (**65**) berichtet [278]. Die Derivatisierung mit Benzoylchlorid und anschließender HPLC-(ToF)MS-Analyse erzielte Nachweisgrenzen von 1,4 nM (Spd (**66**)) bzw. 2 nM (Spn (**65**)) [279]. Eine Nachweisgrenze von 108 nM für das Spn (**65**) wurde nach Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion erreicht [280]. Eine direkte Analyse ohne Derivatisierung mittels HPLC-MS/MS ergab Nachweisgrenzen von 10 nM für das Spd (**66**) bzw. 14,8 nM für das Spn (**65**). Über eine Derivatisierung mit 4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol und anschließender Trennung mittels Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz Detektion konnten Nachweisgrenzen von 8,9 nM für das Spn (**65**) und 8,8 nM für das Spd (**66**) erreicht werden [281].

In der vorliegenden Arbeit wurden Spermin (**65**) und Spermidin (**66**) in Standardlösungen und anschließend in einer Urinmatrix derivatisiert und daraufhin analysiert. Abbildung 60 stellt die Strukturen der beiden Polyamine Spn (**65**) und Spd (**66**) dar.

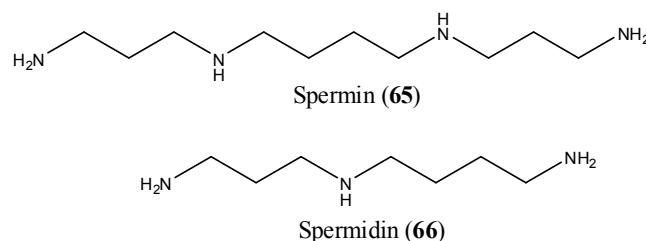


Abbildung 60: Strukturen von Spn (65**) und Spd (**66**).**

Für die Derivatisierung von Aminen in wässrigen Proben kommen prinzipiell das APS-NHS (**33**) und das APS-Cl (**32**) als Label in Frage. Beide Label wurden in dieser Arbeit getestet. Da beide Analyten mehrere Amine als funktionelle Gruppen tragen, kann es bei beiden Analyten zu Mehrfachderivatisierung kommen. Tabelle 3 gibt einen Überblick der Massen möglicher Derivatisierungsprodukte. Die Tabelle gilt sowohl für die Derivatisierung mit APS-NHS (**33**), als auch für das Labeln mit APS-Cl (**32**), da beide Label gleiche Derivatisierungsprodukte ergeben.

Tabelle 3: Massen möglicher Derivatisierungsprodukte des Spn (65**) bzw. Spd (**66**).**

Derivatisierung	Spermidin (66) [145,25]	Spermin (65) [202,34]
1-fach	377,25 Da	434,30 Da
2-fach	609,33 Da	666,39 Da
3-fach	841,42 Da	898,48 Da
4-fach	-	1130,57 Da

4 Ergebnisse und Diskussion

Die ersten Versuche, einen Spermidinstandard zu derivatisieren, verliefen unbefriedigend. Trotz hoher Spermidinkonzentrationen wurden nur sehr kleine Signale für das zweifach derivatisierte Spermidin erhalten. Abbildung 61 zeigt das TIC-Chromatogramm (engl. Total Ion Current) für einen Blindwert und den derivatisierten Spermidinstandard. Vor dem großen Peak, welcher dem Marker zuzuschreiben ist, befindet sich ein kleiner Peak mit einem m/z -Verhältnis von 610 (Spd [M+H]^+). Einfach derivatisiertes Spd (**66**) konnte nicht detektiert werden. Abbildung 62 zeigt die Massenspektren der beiden TICs der Blindmessung und der Spermidinderivatisierung zur Retentionszeit des Peaks mit m/z 610.

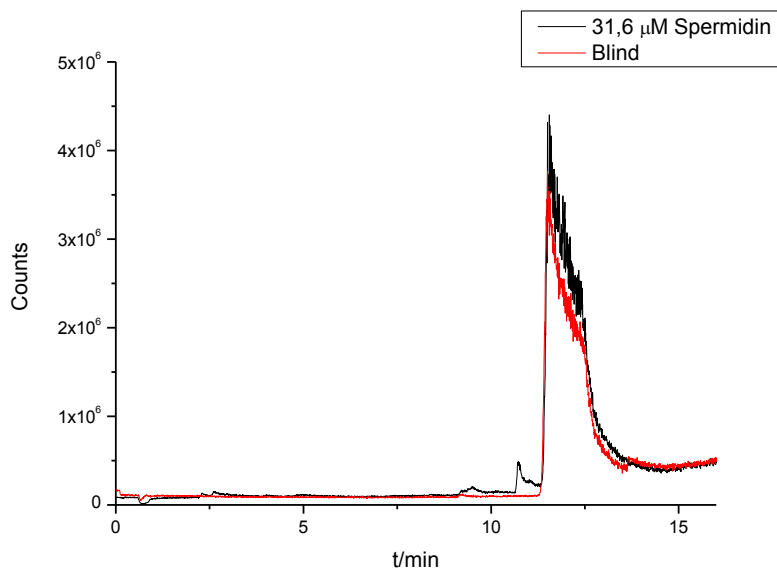


Abbildung 61: HPLC-APLI-(ToF)MS-Analyse eines Spermidinstandards (**66**) derivatisiert mit APS-NHS (**33**).

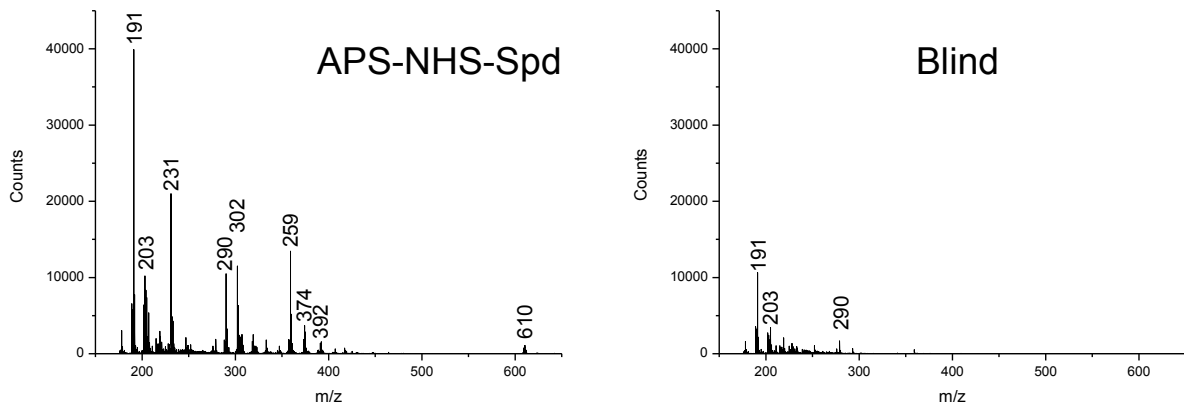


Abbildung 62: Massenspektrum des kleinen zusätzlichen Peaks aus Abbildung 61 bei 10,8 min verglichen mit dem Massenspektrum des Blindlaufs zum gleichen Zeitpunkt.

Eine Analyse des Massenspektrums zeigt, dass das APS-NHS-Spd (**67**) stark fragmentiert. Die Fragmentation fand bevorzugt neben den elektronegativen Atomen im Molekül statt. Mögliche Strukturen der Fragmente sind in Abbildung 63 gegeben.

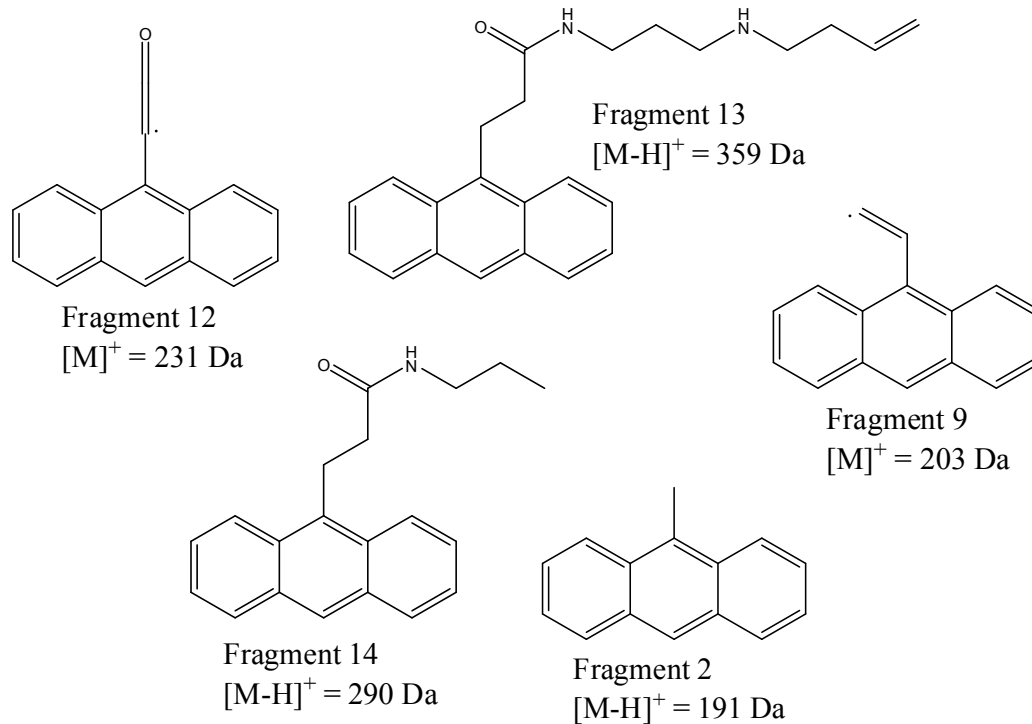


Abbildung 63: Mögliche Fragmentstrukturen zum APS-NHS-Spd (67**)-Spektrum aus Abbildung 62.**

Offensichtlich kommt es bei dem Spd (**66**) trotz stabilem Marker zu starker Fragmentbildung im Analytenteil. Um die stoßinduzierte Dissoziation der Ionen zu reduzieren, wurden die Quellen- und die MS-Parameter angepasst. Zudem wurden die Derivatisierungsbedingungen so variiert, dass für beide Analyten, Spd (**66**) und Spn (**65**), das zweifach derivatisierte Produkt bevorzugt wird. Optimiert wurden die eingesetzte APS-NHS (**33**)-Menge, die Menge des organischen Lösemittels (hier MeCN) und die Derivatisierungszeit. Abbildung 64 zeigt die EICs der jeweils zweifach derivatisierten und protonierten Polyamine Spd (**66**) und Spn (**65**). Eingesetzt wurde eine 7,6 µM Spn (**65**)-Lösung und eine 15,8 µM Spd (**66**)-Lösung.

4 Ergebnisse und Diskussion

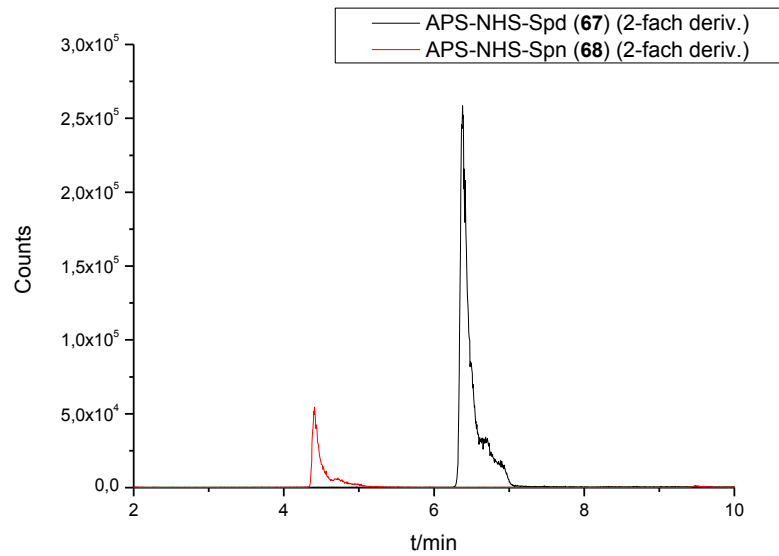


Abbildung 64: HPLC-APLI-(ToF)MS-Analyse einer Standardlösung, welche Spd (66) und Spn (65) enthält.

Die in Abbildung 64 gezeigten chromatographischen Signale zeigen ein starkes Tailing. Dieses ist auf den Verschleiß der HPLC-Säule oder auf Metallgehalte in der stationären Phase zurückzuführen. Nach der Optimierung der Derivatisierungsbedingungen wurde die Säule durch eine andere ersetzt. Die gemessenen Signale wiesen für das APS-NHS-Spn (68) ein S/N-Verhältnis von 449 auf. Daraus konnte eine Nachweisgrenze von 50 nM berechnet werden. Für das APS-NHS-Spd (67) betrug das S/N-Verhältnis 1600, die Nachweisgrenze lag demnach bei 29 nM. Signale für die einfach derivatisierten Analyten waren vernachlässigbar klein. Abbildung 65 zeigt die Massenspektren der beiden Peaks aus Abbildung 64.

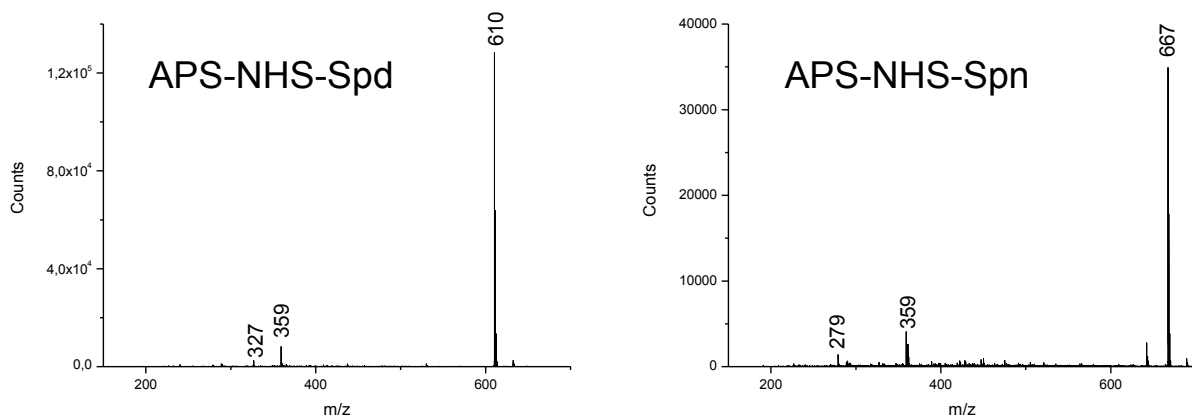


Abbildung 65: Massenspektren zu den chromatographischen Signalen aus Abbildung 64.

Wie Abbildung 65 zeigt, konnten massenspektrometrische Bedingungen gefunden werden, bei denen die derivatisierten Analyten nur sehr wenig fragmentieren. Das Hauptfragment bei beiden Analyten das Fragment 13 aus Abbildung 63.

Um die Derivatisierung von Spd (**66**) und Spn (**65**) auch an einer realen Matrix zu demonstrieren, wurde Urin mit beiden Standards aufgestockt und analysiert. Der Urin enthielt nach dem Aufstocken eine Konzentration von 16,3 μM Spd (**66**) und 16,5 μM Spn (**65**). Abbildung 66 zeigt die Analyse des mit den Polyaminen aufgestockten Urins.

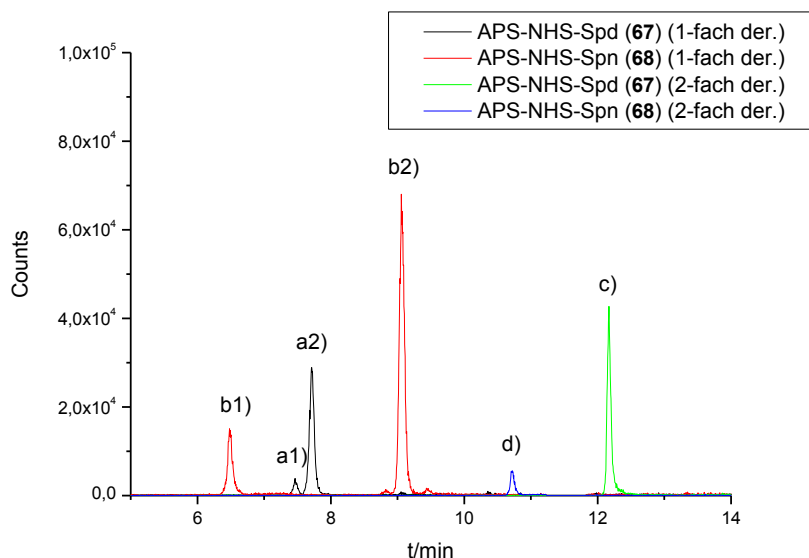


Abbildung 66: HPLC-APLI-(ToF)MS Analyse von mit Spd (66**) und Spn (**65**) aufgestocktem und mit APS-NHS (**33**) derivatisierten Urin. a1) S/N = 30; a2) S/N = 260; b1) S/N = 100; b2) S/N = 440; c) S/N = 640; d) S/N = 100.**

In der Urinmatrix können neben den zweifach derivatisierten Analyten auch die einfach derivatisierten detektiert werden. Die S/N-Verhältnisse für die einzelnen Peaks sind in der Bildunterschrift gegeben. Für die Signale mit den größten S/N-Verhältnissen ergeben sich für das Spd (**66**) eine Nachweisgrenze von 77 nM und für das Spn (**65**) eine Nachweisgrenze von 111 nM. Die Derivatisierung des Urins wurde dreimal durchgeführt, dabei wurden Standardabweichungen für alle Peaks von 0,75 bis 6 % gefunden.

Die Proben wurden vor der Analyse mittels HPLC basisch mit Ethylacetat extrahiert. Dieses hatte mehrere Vorteile. Zum einen konnte die Probe so aufkonzentriert werden, zum anderen wurde ein Teil des Derivatisierungsreagenzes von den derivatisierten Analyten abgetrennt.

Für die Derivatisierung von Spn (**65**) und Spd (**66**) in Urin wurde auch APS-Cl (**32**) als Label verwendet. Abbildung 67 zeigt die Ergebnisse der Derivatisierung der beiden Polyamine

4 Ergebnisse und Diskussion

vergleichend derivatisiert mit APS-NHS (**33**) und mit APS-Cl (**32**). Für die Darstellung wurden die Massenspuren der einfach bzw. zweifach derivatisierten Analyten addiert.

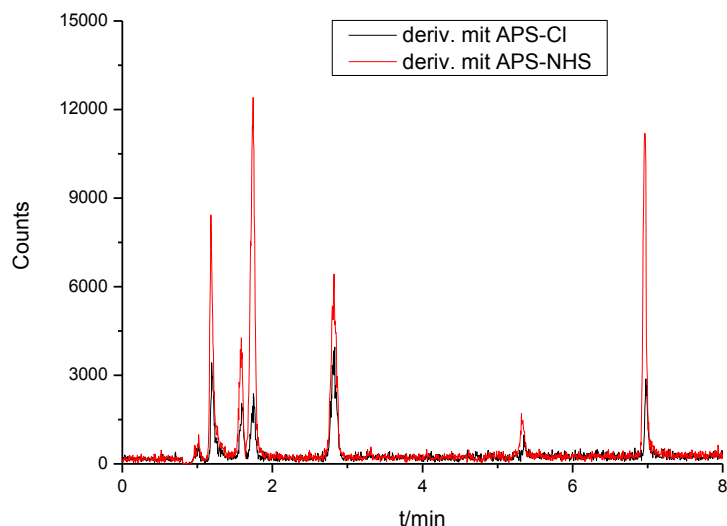


Abbildung 67: HPLC-APLI-(ToF)MS-Analyse von Spn (65) und Spd (66). Dargestellt sind vergleichend die Chromatogramme der Summe der einfach und zweifach derivatisierten Massenspuren der Polyamine.

Es ist zu erkennen, dass die resultierenden Signale der Derivatisierung mit APS-Cl (**32**) deutlich kleiner ausfallen als bei der Derivatisierung mit APS-NHS (**33**). Dieses hat zum einen den Grund, dass etwas weniger APS-Cl (**32**) als APS-NHS (**33**) eingesetzt wurde, zum anderen ist das APS-Cl (**32**) reaktiver als der Aktivester APS-NHS (**33**) und hydrolysiert schneller, sodass das Säurechlorid eine kürzere Zeit für die Derivatisierung zu Verfügung steht. Mit diesem Versuch sollte die prinzipielle Einsetzbarkeit des APS-Cl (**32**) für die Derivatisierung von Aminen demonstriert werden. Die schnelle Hydrolyse dieses Markers muss bei der Reaktionsführung beachtet werden. Nichtsdestotrotz ist das APS-Cl (**32**), wie hier gezeigt, sogar für Derivatisierungen von Aminen in wässrigen Lösungen einsetzbar.

4.6 Weitere Ergebnisse

In diesem Kapitel werden Versuche vorgestellt, welche nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten. Dabei werden entweder gescheiterte Ideen oder Ideen mit viel Potential, welche aber in den ersten Versuchen keine positiven Ergebnisse lieferten, diskutiert.

4.6.1 Derivatisierung von Nukleotiden

Die Nukleotidanalyse spielt in der Krebsforschung eine wichtige Rolle. Nach der Spaltung der DNA in Nukleotide und deren Untersuchung, lassen sich wichtige Erkenntnisse zu DNA-Addukten und Modifikationen der DNA-Basen gewinnen. Eine der dabei eingesetzten Verfahren ist die von Schmitz et al. eingeführte Methode der Derivatisierung der Nukleotide an der Phosphorsäurefunktion mit einem Fluoreszenzmarker und anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion [211,282-284]. Dabei wurde BODIPY-FL-EDA (**69**) (4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-S-indacen-3-propionylethylendiamin-hydrochlorid) nach vorheriger Aktivierung der Phosphorsäure der Nukleotide mit EDC*HCl (**29**) als Fluoreszenzlabel eingesetzt. Da das BODIPY-FL-EDA (**69**) als Ankergruppe ein primäres Amin, welches als Hydrochlorid vorliegt, besitzt, wurde angenommen, dass eine äquivalente Reaktion mit APA*HCl (**36**) möglich sei. Die Reaktion des BODIPY-FL-EDA (**69**) mit einem Nukleotide ist in Abbildung 68 dargestellt.

Bei den Versuchen APA*HCl (**36**) mit Nukleotiden zu koppeln, wurden hauptsächlich 2'-Desoxycytidine-3'-monophosphat Natriumsalz (**70**) (2'-dC-3'-MP), 2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat Natriumsalz (**71**) (2'-dA-3'-MP) und 2'-Desoxyuridine-5'-monophosphat Natriumsalz (**72**) (2'-dU-5'MP) als Modellanalyten eingesetzt. Die ersten Versuche Nukleotide zu derivatisieren wurden sehr stark an die Derivatisierungsbedingungen mit BODIPY-FL-EDA (**69**) angelehnt [283]. Dabei wurde versucht jeweils 10 µg Aliquote der Nukleotid zu derivatisieren.

4 Ergebnisse und Diskussion

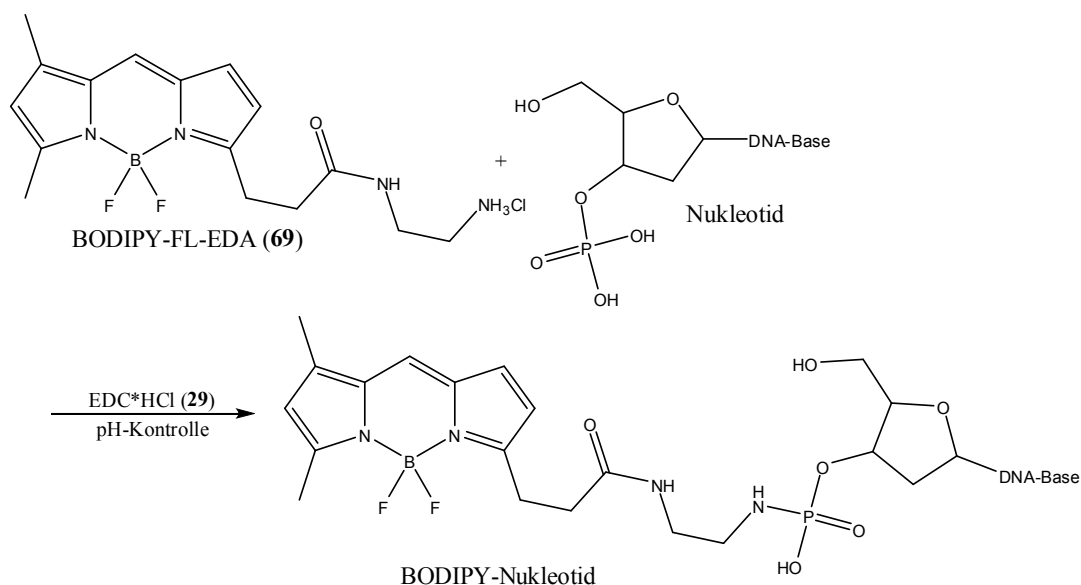


Abbildung 68: Reaktion des BODIPY-FL-EDA (50) mit einem Nukleotid unter EDC·HCl (29)-Aktivierung nach [284].

Im weiteren Verlauf wurde der pH variiert und mit einem HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) bzw. mit einem MES-Puffer (2-(*N*-morpholino)ethansulfonsäure) im pH-Bereich von 3 bis 8 in 0,5er Schritten gearbeitet. Die Pufferkonzentration betrug dabei in den Derivatisierungslösungen ca. 50 mM. Zudem wurde die EDC·HCl (29)-Menge und die Reaktionszeit von 12 - 48 Stunden bei jeweils 30 °C variiert. Die Reaktionskontrolle wurde mittels Dünnschichtchromatographie, HPLC-DAD (DAD: Dioden Array Detector), HPLC-APLI-(ToF)MS und ESI-MS durchgeführt. Keine der durchgeführten Versuche brachte den gewünschten Erfolg. Auch Versuche, die Derivatisierungslösung nach Schiewek mittels Extraktion aufzuarbeiten [285], führte nicht zum Ziel. Obwohl die Bildung von Phosphorsäureamiden über die Aktivierung des Phosphors der Phosphorsäure mit EDC·HCl (29) bekannt und häufig durchgeführt wird [282,286-295], konnten in dieser Arbeit keine Derivatisierungsprodukte aus APA·HCl-Nukleotid nachgewiesen werden.

Nach diesen unbefriedigenden Ergebnissen wurden weitere Verfahren zur Herstellung von Phosphorsäureamiden ausprobiert um das APA·HCl (36) an Nukleotide zu koppeln. Eine literaturbekannte Methode dazu ist die Aktivierung der Phosphorsäure mit DCC (5) [296-305]. Da das DCC (5) nur sehr schlecht wasserlöslich ist, werden bei dieser Kopplung häufig Lösemittelsysteme bestehend aus Wasser und *tert*-Butanol eingesetzt, Es finden aber auch Dimethylformamid (DMF)- und Dimethylsulfoxid (DMSO)-Lösungen Anwendung. Häufig sind hohe Temperaturen für die Kopplungsreaktion notwendig. In dieser Arbeit wurde eine

Kopplung in *tert*-Butanol/Wasser bei 80 °C ausprobiert. HPLC-APLI-(ToF)MS-Experimente zeigten jedoch keinen Derivatisierungserfolg der eingesetzten Nukleotide.

Weitere Kopplungsreagenzien für die Bildung von Phosphorsäureamiden sind das CDI (**51**) [306-309] und eine Kombination aus Triphenylphosphin (**73**) (PPh₃) und 2,2'-Dipyridyldisulfid (**74**) ((PyS)₂) [310-312]. Das CDI (**51**) wurde zur Kopplung des APA*HCl (**36**) mit Phosphorsäuren ausprobiert. Für diese Reaktion wurden verschiedene Lösemittel (DMF und DMSO), die Zugabe von Tertbutylammoniumbromid (**75**), Triethylamin (**76**) und verschiedene Reaktionsbedingungen wie Ultraschall oder hohe Temperatur (60 °C) eingesetzt. Auch hier waren die Versuche nicht erfolgreich. Die Reagenzienkombination aus PPh₃ (**73**) und (PyS)₂ (**74**) wurden nicht getestet.

Obwohl alle Versuche, Nukleotide für die APLI zugänglich zu machen, scheiterten, ist eine solche Derivatisierung sicherlich möglich und sollte weiter verfolgt werden.

4.6.2 Derivatisierung von Aldehyden und Isocyanaten

Isocyanate [168,169,268,313,314] und Aldehyde [315-318] reagieren unter guten Ausbeuten mit Aminen. Dabei bilden Isocyanate Harnstoffe und Aldehyde nach Wasserabspaltung Imine. Abbildung 69 zeigt die beiden Reaktionsschemata dieser beiden funktionellen Gruppen mit Aminen.

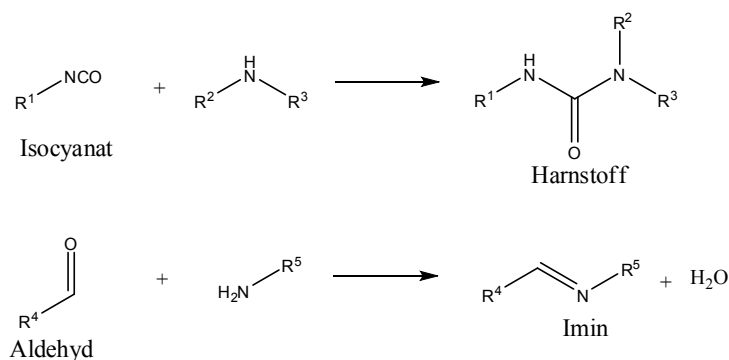


Abbildung 69: Reaktion von Isocyanaten und Aldehyden mit Aminen nach [168,315].

In dieser Arbeit wurden erste Versuche unternommen, um sowohl Amine als auch Aldehyde mit einem APLI-Marker zu derivatisieren. Phenylacetaldehyd (**77**) und 3-Nitrobenzaldehyd (**78**) wurden als Modellanalyten für Aldehyde ausgewählt und mit APA*HCl (**36**) in Gegenwart von Triethylamin (**76**) zur Reaktion gebracht. Eine GC-APLI-(ToF)MS-Analyse der Umsetzungsversuche lieferte keine befriedigenden Ergebnisse. Es konnte zwar neue Signale im Vergleich zum Blindversuch detektiert werden, allerdings gelang keine eindeutige Zuordnung dieser Signale.

4 Ergebnisse und Diskussion

Cyclohexylisocyanat (**79**) und 1-Naphthylisocyanat (**80**) wurden als Testanalyten für Isocyanate ausgewählt. Eine APA (**38**)-Lösung wurde zur Derivatisierung eingesetzt. Die GC-APLI-(ToF)MS-Analyse dieser Versuche brachte kein eindeutiges Ergebnis. Es konnte im Vergleich zur Blindlösung ein Signal für das APA-1-Naphthylisocyanat (**81**) detektiert werden. Für das APA-Cyclohexylisocyanat (**82**) wurden zwei Signale detektiert. Die zwei Signale konnten nicht erklärt werden, da es bei der Derivatisierung von Isocyanaten zu einem eindeutigen Derivatisierungsprodukt kommt. Vermutlich war der Standard mit einem Isomer verunreinigt. Abbildung 70 stellt die GC-APLI-(ToF)MS-Analyse der beiden hier untersuchten Isocyanate dar.

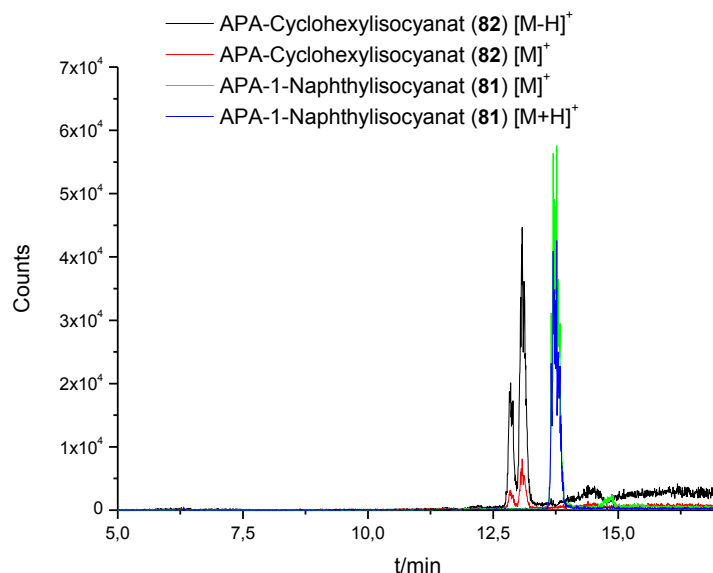


Abbildung 70: GC-APLI-(ToF)MS-Analyse derivatisierter Isocyanate. Dargestellt sind jeweils die beiden intensivsten Massenspuren.

Die ersten Derivatisierungsversuche von Aldehyden müssen aufgrund der ersten Ergebnisse als gescheitert angesehen werden. Isocyanate lieferten Massenspuren, welche den derivatisierten Analyten zugeordnet werden konnten. Die Derivatisierung beider funktioneller Gruppen mit APLI-Markern erscheint vorstellbar bzw. vielversprechend, sodass weitere Versuche erfolgreich verlaufen können.

4.6.3 Carbamine als funktionelle Gruppe bei APLI-Markern

Das AQC (**1**) ist ein Fluoreszenzlabel welches als funktionelle Gruppe ein Carbamin enthält. Dieses Label wird häufig in wässriger Lösung für die Derivatisierung von Aminen verwendet.

Für die Reaktion ist kein Kopplungsreagenz notwendig, die Reaktion verläuft sehr schnell und der Marker wird durch Wasser hydrolysiert, sodass – verglichen zu den Derivatisierungsprodukten – nur relativ kleine Moleküle als Nebenprodukte entstehen, welche sich sehr leicht chromatographisch abtrennen lassen. Abbildung 71 zeigt die Reaktionsgleichung und -geschwindigkeiten des AQC (**1**) in einer wässrigen Amin-Lösung [167].

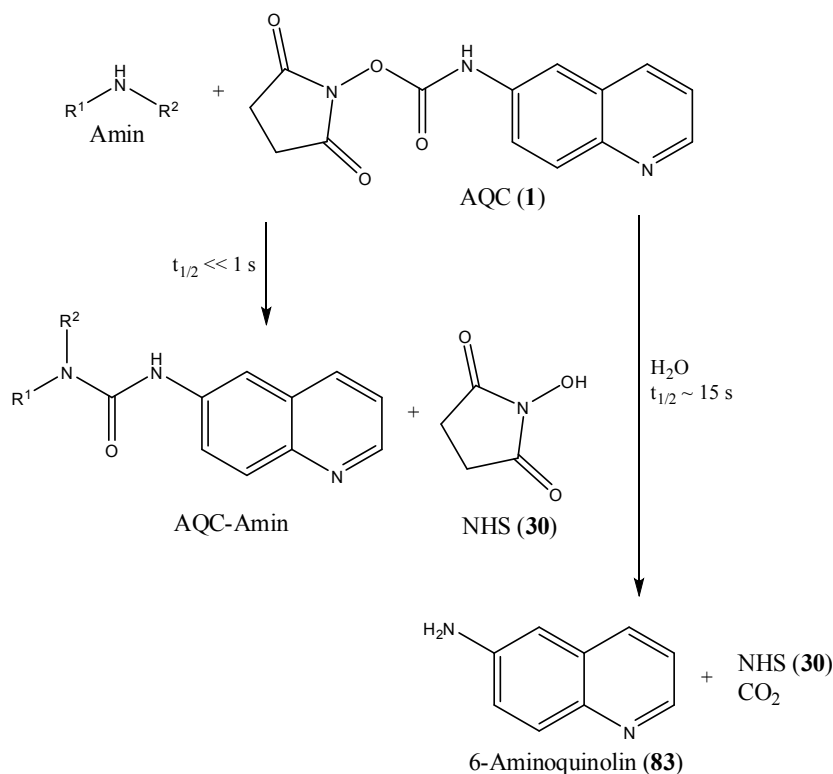


Abbildung 71: Struktur und Reaktionsmechanismus des AQC (1**) nach [167]**

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Patrick Schlenger, Bergische Universität Wuppertal, wurde das AQC (**1**) als APLI-Label für Aminosäuren getestet. Dieses stellte sich als ungeeignet heraus. Zum einen lassen sich kleine Heteroaromaten wie das Aminoquinolin nur relativ schlecht mittels APLI ionisieren, zum zweiten ist der Spacer zwischen Label und Analyt nicht lang genug um die Ionisation analytunabhängig zu gestalten [131,319].

Aufbauend auf der Arbeit von Patrick Schlenger wurden zwei Ionisationslabel mit einer Carbaminfunktion als APLI-Marker hergestellt und getestet. Beide Label wurden ausgehend vom APA*HCl (**36**) hergestellt. Das 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat (NHS-C) (**84**) besaß wie das AQC (**1**) das NHS (**30**) als Abgangsgruppe, beim 4-Nitrophenyl-3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat (NP-C) (**85**) fungierte hingegen

4 Ergebnisse und Diskussion

4-Nitrophenol (**86**) als Abgangsgruppe [320]. Die Strukturen beider Marker sind in Abbildung 72 dargestellt.

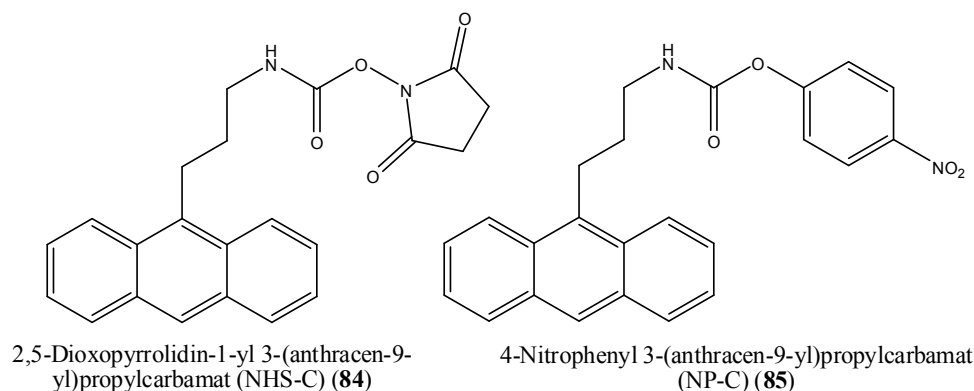


Abbildung 72: Strukturen des NHS-C (84) und des NP-C (85).

Erste Versuche Aminosäuren zu derivatisieren, zeigten, dass die beiden hier synthetisierten Marker eine deutlich geringere Reaktivität aufwiesen als das AQC (**1**). Selbst nach Reaktionszeiten von 40 – 50 min und bei erhöhter Temperatur konnten noch sehr große Signale für die Marker in HPLC-APLI-(ToF)MS-Experimenten detektiert werden. Derivatisierte Aminosäuren waren hingegen nicht detektierbar. Es wurden zwar neue chromatographische Signale detektiert, diese konnten aber keiner der eingesetzten Aminosäure eindeutig zugeordnet werden.

Dennis Klink, Bergische Universität Wuppertal, hat im Rahmen seiner Promotion das APS-NHS (**33**) für das Labeln von Aminosäuren eingesetzt. Erste Ergebnisse brachten Erfolge, sodass APS-NHS (**33**) bei zukünftigen Versuchen den Markern auf Carbaminbasis vorgezogen werden sollte.

4.6.4 Einsatz eines DPSS-Lasers

Wie bereits im theoretischen Teil beschrieben, ist die Ionisation der APLI verglichen mit der REMPI relativ unabhängig von der eingesetzten Wellenlänge. Es reicht ein Laser mit einer ausreichenden Leistung und Frequenz dessen Wellenlänge im Bereich von 250 nm liegt.

Um den wartungsintensiven - regelmäßig mit einem Fluorgasgemisch zu füllenden und teuren Excimer-Laser - zu ersetzen, wurden Versuche mit einem anderen Laser vorgenommen. Zum Einsatz kam ein diodengepumpter Festkörperlaser (DPSS-Laser; engl. Diode Pumped Solid State) der Firma CryLas. Dieser lieferte Photonen der Wellenlänge 266 nm bei einer Pulsenergie von ca. 60 μ J und einer Frequenz von 100 Hz. Die Strahlfläche betrug dabei

$2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$, sie war damit um ein Vielfaches kleiner als die des Excimerlaser, dafür war die Energiedichte etwa um den Faktor zehn größer [30,321].

Durch die kleinere Strahlfläche wurde angenommen, dass der DPSS-Laser für den Einsatz in der HPLC-APLI nicht geeignet ist. Der Analyt wird dabei breit in die Ionenquelle versprüht und durch den kleinen Strahldurchmesser zu einem viel geringeren Teil vom Laserlicht erfasst. Es wurde angenommen, dass dadurch die Sensitivität im Vergleich zum Excimerlaser deutlich abnimmt und so der Vorteil der APLI verloren geht.

Für die GC-APLI schien der Laser zunächst sehr gut geeignet. Da die Analyten nur wenige Millimeter vor dem Sprayschild von der GC-Säule eluieren, kann ein Großteil des Raumes zwischen GC-Säule und Eingang zum Massenspektrometer auch von dem DPSS-Laser abgedeckt werden. Der Laserstrahl muss allerdings genauer auf den Ausgang der GC-Säule ausgerichtet werden.

Das Ausrichten des DPSS-Lasers ist verglichen mit dem Excimer-Laser aufwendiger. Der Laserstrahl wurde nicht über einen justierbaren Spiegel in die Ionenquelle eingekoppelt, sondern direkt, sodass der gesamte Laserkopf für die Positionsänderung des Laserstrahls bewegt werden musste. Da der DPSS-Laser deutlich kleiner und aus mehreren Baugruppen aufgebaut ist, konnte dieser mit zwei Mikrometerschrauben, an denen der Laserkopf befestigt wurde, ausgerichtet werden.

Die Versuche mit dem DPSS-Laser verliefen sehr unbefriedigend. Abbildung 73 zeigt den Vergleich derselben Derivatisierungslösung, vermessen mit dem Excimer-Laser und mit dem DPSS-Laser. Analysiert wurde ein mit APS (**18**) derivatisierter Standard der in dieser Arbeit untersuchten FTOHs.

Die Retentionszeiten der beiden in Abbildung 73 dargestellten APS-8:2-FTOH (XI)-Signale unterscheiden sich leicht, da zwischen den beiden Messungen beim Justieren der GC-Säule ein Stück von dieser abgebrochen war.

Die Analytsignale wurden mit dem DPSS-Laser häufig nicht detektiert. Selbst mehrfaches Ausrichten brachte keinen Erfolg. Die in Abbildung 73 gezeigte GC-(DPSS)APLI-(ToF)MS-Analyse stellt eine der wenigen Messungen bei der überhaupt ein Signal für die Analyten detektiert wurde dar.

4 Ergebnisse und Diskussion

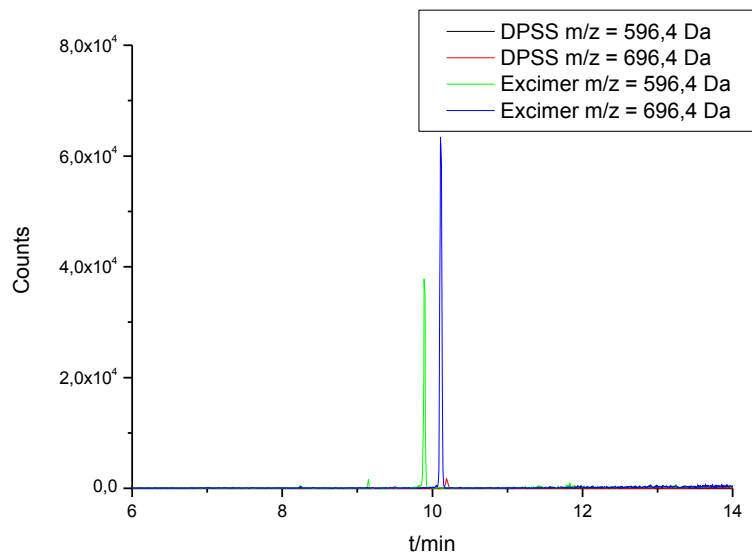


Abbildung 73: GC-APLI-(ToF)MS Analyse einer APS-6:2-FTOH (49) ($[M]^+ = 596,4$ Da) und APS-8:2-FTOH (50) ($[M]^+ = 696,4$ Da) haltigen Lösung. Verglichen wurde der DPSS-Laser mit dem Excimer-Laser.

Das APS-8:2-FTOH (50) konnte mit dem DPSS-Laser detektiert werden, das Signal hatte ein S/N-Verhältnis von 62. Es wurde kein Signal für das APS-6:2-FTOH (49) detektiert. Die gleiche Lösung vermessen mit dem Excimer-Laser ergab für beide derivatisierten Analyten ein Signal. Die aufwendige Laserjustierung entfiel. Für das APS-6:2-FTOH (49) wurde ein Signal mit einem S/N-Verhältnis von 474 und für das Signal des APS-8:2-FTOH (50) ein S/N-Verhältnis von 364 gemessen. Das Rauschen des DPSS-Lasers war kleiner als das des Excimer-Lasers, sodass trotz des deutlich kleineren Signals, das S/N-Verhältnis des APS-8:2-FTOH (50) nur um den Faktor 6 reduziert war.

Dennis Klink, Bergische Universität Wuppertal, hat das Phänomen der mit dem DPSS-Laser nur manchmal messbaren Peaks untersucht. Dabei konnte er feststellen, dass der GC-Säulenverbinder, mit dem die GC-Säule im GC-Ofen in der Transferline befestigt wurde, sich während des Aufheizens des GC-Ofens thermisch ausdehnte und so die GC-Säule aus dem Lichtstrahl des Lasers bewegte.

Diese Messungen haben leider gezeigt, dass trotz des hinnehmbaren Sensitivitätsverlustes bei Messungen mit dem DPSS-Laser im Vergleich zum Excimer-Laser, der kleine, preiswerte und wartungsarme DPSS-Laser für GC-APLI-Analysen ungeeignet ist. Der Aufbau der GC-TFL und der lockere Sitz der GC-Kapillare verhindern den Einsatz.

5 Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Lösemittel

<ul style="list-style-type: none"> • Wasseraufbereitung 	TKA GenPure (Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert, Deutschland)
<ul style="list-style-type: none"> • 2-Propennitril • 4-Dimethylaminopyridin • 1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione (NHS) • Oxalylchlorid • CDCl_3 • 1<i>H</i>,1<i>H</i>,2<i>H</i>,2<i>H</i>-Perfluoro-1-decanol (8:2-FTOH) • 1<i>H</i>,1<i>H</i>,2<i>H</i>,2<i>H</i>-Perfluoro-1-octanol (6:2-FTOH) 	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany
<ul style="list-style-type: none"> • Zinkpulver 	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • 3-(Ethyliminomethylenamino)-<i>N,N</i>-dimethyl-propan-1-amin hydrochlorid (EDC*HCl) • 4-Methylbenzonsulfonylchlorid (Tosylchlorid) • Ammoniak (25% in H_2O) • 3-Pyridin-3-yl-propan-1-ol (HPP) • Propansäure • 2-(<i>N</i>-morpholino)ethansulfonsäure (MES) • 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) 	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland

5 Experimenteller Teil

<ul style="list-style-type: none"> • Natrium • Acetonitril • Methanol • Chloroform • Dichlormethan (DCM) • Hexan • Ethylacetat • Pyridin • Triethylamin 	<p>VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Anthron • Kieselgel (LiChroprep® 15-25 µm) • LiAlH₄ • Kalium • Seesand für Chromatographie • Hexansäure • Methacrylsäure • Propylamin • Molsieb 0.3 nm • Molsieb 0.4 nm • CuSO₄*5H₂O • Toluol • MgSO₄ • DC-Platten (TLC silica gel 60 F₂₅₄) • Bromessigsäure • Trichloressigsäure 	<p>Merck, Darmstadt, Germany.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Dimethylformamid (DMF) • Tetrahydrofuran (trocken) (THF) • <i>tert</i>-Butanol • <i>N,O</i>-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) • Essigsäure • NaCl • NaOH • Kieselgel (0.06 – 0.2 mm) 	<p>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</p>

<ul style="list-style-type: none"> • Salzsäure (~37% in H₂O) • Aceton • Diethylether 	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • DMSO-d₆ • Na₂SO₄ 	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Alle Lösemittel wurden in der Qualität “HPLC grade” oder besser gekauft und, wenn nicht explizit erwähnt, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Lösemittel wurden nach gängigen Vorschriften der organischen Chemie entsprechend mit Molekularsieb, Natrium oder Kalium getrocknet. Chemikalien wurden in der Reinheit “synthetic grade” oder besser gekauft und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

5.2 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

(oaTOF)MS	micrOTOF, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland
Temperaturkontrollierte Ionenquelle (TC-MPIS) Temperaturkontrollierte GC-transfer line (CG-TFL)	iGenTraX Haan, Deutschland
Excimerlaser (KrF, 248 nm)	ATLEX 300 SI, ATL, Wermelskirchen, Deutschland
DPSS-Laser (266 nm)	FQSS 266-50, CryLas, Berlin, Deutschland
Gaschromatograph	GC 7890 A Agilent Technologies Inc., Shanghai, China
GC-Säule	1. ZB-5HT INFERNO, 30m/0.25mm/0.25µm, 60-400 °C (430 °C), Phenomenex Aschaffenburg, Deutschland 2. DB-EUPAH, 20m/0.18mm/0.14µm, 40-320 °C (340 °C), Agilent J&W Columns, Waldbronn, Deutschland
Thermomixer Comfort	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Speedvac	Jouan RC 10.22., St. Nazaire, Frankreich

5 Experimenteller Teil

Ultraschallbad	Sonorex Rk 31, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Q-TOF für die Bestimmung der exakten Massen	Agilent Technologies 6538 UHD Accurate Mass Q-TOF, Waldbronn, Deutschland
HPLC-Anlage (APLI)	Merck Hitachi L-6200A Intelligent Pump; Tokyo, Japan
HPLC-Anlage (DAD)	Shimadzu Prominence 20 xr, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland
HPLC-Säulen	<ol style="list-style-type: none"> 1. C18 Symmetry, 3.5 μm, 4.6 mm x 75 mm; Waters, Milford, USA 2. Chromolith® Performance RP-8 endcapped 100-4,6; Merck, Darmstadt, Deutschland
NMR-Spektrometer	BRUKER AVANCE 400, Bruker BioSpin AG, Fällanden, Schweiz

5.3 Experimentelle Parameter

In diesem Kapitel werden die experimentellen Parameter der einzelnen Messungen aufgeführt. Die Angaben beziehen sich auf die Abbildungen der dargestellten Ergebnisse. Die jeweiligen Einstellungen des Massenspektrometers wurden als Screenshot der DataAnalysis-Software von Bruker entnommen und nicht weiter bearbeitet.

5.3.1 Experimentelle Daten zu Abbildung 20 (AMAA-HPP (17))

Derivatisierungsvorschrift: 5 μ L einer 10 μ M HPP (16)-Lsg in Dichlormethan (DCM) wurden mit 3 μ L DMAP (6) (100 mM in DCM), 20 μ L AMAA (2) (20 mM in DCM), 50 μ L DCM und 50 μ L DCC (5) (100 mM in DCM) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 35 °C und 1000 rpm auf einem Thermomixer unter Lichtausschluss gerührt. Daraufhin wurde die Lösung mit der Speedvac eingengt, in 50 μ L Acetonitril (MeCN) gelöst und mit 50 μ L H₂O versetzt, zentrifugiert und anschließend in die HPLC-APLI-ToF(MS) injiziert.

HPLC: Injektionsschleife: 20 μ L, Säule 1, mobile Phase: MeCN/H₂O (70/30), Fluss: 1,2 mL/min

Ionenquelle: 100°C

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	3.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	170.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	35.5 μ s
Pre Puls Storage Time	15.1 μ s
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	803 V
Set Pulsar Push	803 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	553 V
Set Detector TOF	1920 V

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

5.3.2 Experimentelle Daten zu Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41 (APS-HPP (45))

Derivatisierungsvorschrift: 50 μ L einer 10 μ M HPP (16)-Lsg in DCM wurden mit 3 μ L DMAP (6) (100 mM in DCM), 20 μ L APS (18) (13 mg/mL in Chloroform) und 15 μ L

5 Experimenteller Teil

DCC (**5**) (160 mM in DCM) versetzt. Die Lösung wurde 1 h lang bei 45 °C und 1000 rpm im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurden 100 µL DCM zugegeben und die Lösung weitere 1,5 h im Thermomixer geschüttelt. Die Lösung wurde dann bei 45 °C eingeeengt und bei -30 °C gelagert. Vor der Injektion in die GC-APLI-ToF(MS) wurde der Feststoff in 1,5 mL DCM gelöst.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 2, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 320 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 100 °C; 0 min; 30 °/min; 310 °C; 30 min

Ionenquelle: RT;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): vgl. 5.3.1

MS: vgl. 5.3.1

5.3.3 Experimentelle Daten zu Abbildung 43 (Zersetzung des APS-HPP (**45**))

Derivatisierungsvorschrift: 50 µL einer 10 µM HPP (**16**)-Lsg in DCM wurden mit 3 µL DMAP (**6**) (100 mM in DCM), 20 µL APS (**18**) (13 mg/mL in Chloroform) und 15 µL DCC (**5**) (100 mM in DCM) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 45 °C und 1000 rpm im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz an der Speedvac eingeeengt. Vor der Injektion in die GC-APLI-ToF(MS) wurde der Feststoff in 1,0 mL DCM gelöst.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 2, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 320 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 100 °C; 0 min; 30 °/min; 310 °C; 17 min

Ionenquelle: vgl. 5.3.2

Excimerlaser (KrF, 248 nm): vgl. 5.3.1

MS: vgl. 5.3.1

5.3.4 Experimentelle Daten zu den Abbildung 44 und Abbildung 45 (APS-HPP (**45**))

Derivatisierungsvorschrift: 10 µL einer 1 µM HPP (**16**)-Lösung, 50 µL einer 100 nM HPP (**16**)-Lösung, 10 µL einer 100 nM HPP (**16**)-Lösung, 50 µL einer 10 nM HPP (**16**)-Lösung und 10 µL einer 10 nM HPP (**16**)-Lösung wurden jeweils in ein Derivatisierungsgefäß überführt und eingedampft. Anschließend wurde jedes Vial mit 10 µL einer Derivatisierungslösung bestehend aus 6 g/L DMAP (**6**) und 14 g/L APS (**18**) in DCM versetzt. Daraufhin wurden in jedes Vial 5 µL einer 23 g/L DCC (**5**)-Lösung addiert. Die Reaktionslösungen wurden 1 h im Ultraschallbad derivatisiert und anschließend mit einem

Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Unmittelbar vor der Injektion in die GC-APLI-ToF(MS) wurden die Ansätze in 30 µL DCM gelöst.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 320 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 100 °C; 0 min; 30 °/min; 310 °C; 17 min

Ionenquelle: RT;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): vgl. 5.3.1

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	0.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	170.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	35.5 µs
Pre Puls Storage Time	15.1 µs
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	803 V
Set Pulsar Push	803 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	553 V
Set Detector TOF	1920 V

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

5.3.5 Experimentelle Daten zu Abbildung 48 (APS-Cl-8:2-FTOH (48))

Derivatisierungsvorschrift: 800 µL einer 8:2-FTOH (47)-Lösung (1,6 µM in DCM) wurden mit 50 µL Triethylamin (76) (100 µL in 5 mL trockenem Acetonitril) versetzt und anschließend wurden 20 µL einer APS-Cl (32)-Lösung (25 µg/mL in DCM) dazugegeben. Die Reaktionslösung wurde 1 h lang mit Ultraschall behandelt und anschließend mit 10 µL Ethanol versetzt.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 350 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 60 °C; 1 min; 30 °/min; 370 °C; 6 min

Ionenquelle: 110 °C;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): vgl. 5.3.1

5 Experimenteller Teil

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	500 m/z	Set Capillary	200 V	Set Dry Gas	0.0 l/min
Scan End	850 m/z	Set End Plate Offset	-200 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	150.0 V
Set Skimmer 1	30.0 V
Set Hexapole 1	23.0 V
Set Skimmer 2	22.0 V
Set Hexapole 2	20.6 V
Set Hexapole RF	550.0 V
Set Transfer Time	49.0 µs
Pre Puls Storage Time	20.0 µs
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	803 V
Set Pulsar Push	803 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	553 V
Set Detector TOF	1920 V

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

5.3.6 Experimentelle Daten zu Abbildung 50 (APS-6:2-FTOH (49) und APS-8:2-FTOH (50))

Derivatisierungsvorschrift: **a)** Zu 100 µL einer Lösung aus Dichlormethan, welche eine Konzentration von 107 pM 6:2-FTOH (46) und 95 pM 8:2-FTOH (47) enthielt, wurden 20 µL einer APS (18)-Lösung (4 mg/L in Dichlormethan) und 3 µL einer DMAP (6)-Lösung (100 mM in DCM) pipettiert. Die Lösung wurde fünf Mal für je 45 min mit Ultraschall behandelt. Zwischen den Ultraschallbehandlungen lagen jeweils 30 min Pause. **b)** Je 35 µL einer 1,3 µg/L 6:2-FTOH (46)-Lösung und einer 1,48 µg/L 8:2-FTOH (47)-Lösung (beide in DCM) wurden zusammenpipettiert und mit 30 µL DCM verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 3 µL einer 100 mM DMAP (6)-Lösung, 20 µL einer 4 mg/mL APS (18)-Lösung und 30 µL einer 100 mM DCC (5)-Lösung (alle in DCM) addiert. Die Lösung wurde fünf Mal für je 45 min mit Ultraschall behandelt. Zwischen den Ultraschallbehandlungen lagen jeweils 30 min Pause.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 375 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 60 °C; 1 min; 30 °/min; 350 °C; 2 min; 30 °/min; 370 °C; 5 min

Ionenquelle: 110 °C;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): vgl. 5.3.1

MS: vgl. 5.3.5

5.3.7 Experimentelle Daten zu Abbildung 52 (TSA-MAA (56) und TSA-Hexansäure (55))

Derivatisierungsvorschrift: Ca. 10 mg K_2CO_3 (54) wurden in einem Vial vorgelegt und mit 500 μ L einer MAA (52) und Hexansäure (53) enthaltenden Lösung (je 1 nM in DMF) versetzt. Zu dieser Suspension wurden 30 μ L einer TSA (41)-Lösung (10 μ g/mL in DCM) pipettiert. Die Suspension wurde 1 h lang bei 90 °C und 1000 rpm im Thermomixer zur Reaktion gebracht.

GC: Injektionsvolumen: 1 μ L, Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 350 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 80 °C; 1 min; 30 °/min; 350 °C; 5 min

Ionenquelle: 110 °C;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): vgl. 5.3.1

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	0.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	170.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	35.5 μ s
Pre Puls Storage Time	15.1 μ s
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	803 V
Set Pulsar Push	803 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	553 V
Set Detector TOF	1920 V

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

5.3.8 Experimentelle Daten zu Abbildung 54 (APol-Propansäure (58) und APol-Hexansäure (59))

Derivatisierungsvorschrift: Zu 500 μ L einer DCM-Lösung, welche jeweils 1 nM Propansäure (57) und Hexansäure (53) enthielt, wurden 40 μ L einer APol (34)-Lösung (0,3 mg/mL in DCM) pipettiert. Zu dieser Lösung wurden anschließend 50 μ L einer DCM-Lösung pipettiert, welche 20,6 mg/mL DCC (5) und 1,7 mg/mL DMAP (6) enthielt. Die Lösung wurde bei 40 °C und 1000 rpm für 20 min gerührt und anschließend zweimal mit je 1 h Ultraschall behandelt.

5 Experimenteller Teil

GC: Injektionsvolumen: 1 μL , Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 320 $^{\circ}\text{C}$, TFL-Temperatur: 322 $^{\circ}\text{C}$, Temperaturprogramm: 80 $^{\circ}\text{C}$; 1 min; 30 $^{\circ}/\text{min}$; 350 $^{\circ}\text{C}$; 5 min

Ionenquelle: 110 $^{\circ}\text{C}$;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): vgl. 5.3.1

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 $^{\circ}\text{C}$
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	0.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	170.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	210.0 V
Set Transfer Time	35.5 μs
Pre Puls Storage Time	15.1 μs
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	803 V
Set Pulsar Push	803 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	553 V
Set Detector TOF	1925 V

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

5.3.9 Experimentelle Daten zu Abbildung 56 (APA-AA (61) und APA-MAA (62))

Derivatisierungsvorschrift: 100 μL einer wässrigen AA- (60) und MAA (52)-Lösung (jeweils 10 μM) wurden mit 100 μL eines 50 mM HEPES-Puffers (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, pH 4,5) versetzt. Zu dieser Lösung wurden 30 μL APA*HCl (36) (30 mg/mL in H_2O) und 25 μL EDC*HCl (29) (35 mg/100 μL in H_2O) pipettiert. Diese Lösung wurde geschüttelt und 15 s lang bei 13400 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung 17 h bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und 1100 rpm im Thermomixer zur Reaktion gebracht. Die Probenlösung wurde daraufhin mit 100 μL HCl (1 M) versetzt und mit 800 μL DCM extrahiert. 650 μL der organischen Phase wurden bei 55 $^{\circ}\text{C}$ im Thermomixer eingedampft und anschließend in 150 μL Methanol gelöst. Vor der Injektion in die HPLC wurde die Lösung mit 150 μL Wasser verdünnt.

HPLC: Injektionsschleife: 20 μL , Säule 1, Gradient: Start MeOH/ H_2O (jeweils mit 0,02% Ameisensäure) (60/40) 2 min gehalten, MeOH-Anteil von 2 – 15 min auf 95 % erhöht und 2 min gehalten; Fluss: 1,0 mL/min

Ionenquelle: 110 $^{\circ}\text{C}$

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

MS:**Acquisition Parameter****Source**

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	0.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	170.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	35.5 μ s
Pre Puls Storage Time	15.1 μ s
Set Lens 1 Storage	30.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	803 V
Set Pulsar Push	803 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	553 V
Set Detector TOF	2030 V

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

5.3.10 Experimentelle Daten zu Abbildung 57 (APA-AA (61) und APA-MAA (62))

Derivatisierungsvorschrift: Dieser Ansatz wurde dreimal angesetzt. 500 μ L Urin wurden mit 50 μ L einer wässrigen AA- (60) (13,126 mg/100 mL) und MAA (52)-Lösung (10,296 mg/100 mL) versetzt. Zu dieser Lösung wurden 200 μ L eines 50 mM HEPES-Puffers (pH 4,5) addiert. Anschließend wurde die Urinlösung mit 70 μ L einer APA*HCl (36)-Lösung (0,872 mg/0,28 mL in H₂O) und 150 μ L einer EDC*HCl (29)-Lösung (310 mg/0,88 mL in H₂O) versetzt. Die Ansätze wurden bei 30 °C und 1100 rpm 23 h im Thermomixer zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösungen wurden dann mit jeweils 400 μ L 1 M HCl versetzt und mit 550 μ L DCM extrahiert. 450 μ L der organischen Phase wurden abgenommen und die wässrige Phase mit weiteren 400 μ L DCM extrahiert. 350 μ L der zweiten organischen Phase wurden abgenommen und mit der ersten vereinigt. Das Lösemittel wurde bei 50 °C am Thermomixer entfernt. Der Rückstand wurde vor der Injektion in die HPLC jeweils in 200 μ L MeCN und 200 μ L Wasser gelöst.

HPLC: Injektionsschleife: 5 μ L, Säule 2, Gradient: Start MeOH/H₂O (jeweils mit 0,5% Ameisensäure) (20/80), 2 min gehalten, MeOH-Anteil von 2 – 14 min auf 95 % erhöht und 2 min gehalten; Fluss: 1,5 mL/min

Ionenquelle: 110°C

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

5 Experimenteller Teil

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	2.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	100.0 V
Set Skimmer 1	40.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	35.5 µs
Pre Puls Storage Time	15.1 µs
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.5 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	802 V
Set Pulsar Push	802 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	551 V
Set Detector TOF	2030 V

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

5.3.11 Experimentelle Daten zu Abbildung 59 (APS-Propylamin (64))

Derivatisierungsvorschrift: Zu 500 µL einer 250 nM Propylamin (63)-Lösung in DCM wurden 40 µL einer APS-Lösung (0,2 mg/mL in DCM) und 50 µL einer Dichlormethanolösung von DCC (5) (20,6 mg/mL) und DMAP (6) (1,7 mg/mL) pipettiert. Diese Lösung wurde bei Raumtemperatur jeweils 1 h dreimal mit Ultraschall behandelt. Vor der Injektion in die GC wurde die Reaktionslösung mit 20 µL einer BSTFA-Lösung (200 µL BSTFA, 400 µL Pyridin und 600 µL Acetonitril) versetzt.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 320 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 80 °C; 1 min; 30 °/min; 350 °C; 5 min

Ionenquelle: 110 °C;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 3,5 mJ bei 100 Hz

MS: vgl. 5.3.7

5.3.12 Experimentelle Daten zu Abbildung 61 (APS-NHS-Spd (67))

Derivatisierungsvorschrift: 500 µL einer wässrigen 31,6 µM Spd (66)-Lösung wurden mit 300 µL MeCN, 15 µL einer 5,6%igen Trichloressigsäurelösung (in Wasser), 40 µL einer 13,4%igen Kaliumcarbonatlösung und 40 µL einer APS-NHS (33)-Lösung (1,5 mg/mL in MeCN) versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 40 °C und 1100 rpm im Thermomixer zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden 50 µL einer 1 M Natronlauge und 300 µL einer gesättigten Natriumchloridlösung zugegeben. Die Lösung wurde daraufhin mit 300 µL Ethylacetat extrahiert, die organische Phase abgenommen und bei 60 °C das Lösemittel

abgedampft. Vor der Injektion wurden die Proben in 100 µL MeCN gelöst und mit 100 µL Wasser versetzt.

HPLC: Injektionsschleife: 5 µL, Säule 1, Gradient: Start MeOH/H₂O (mit 1% Ameisensäure) (40/60), MeOH-Anteil von 0 – 15 min auf 90 % erhöht und 3 min gehalten; Fluss: 1,0 mL/min

Ionenquelle: 110 °C;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	2.0 l/min
Scan End	700 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	170.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	35.5 µs
Pre Puls Storage Time	15.1 µs
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	802 V
Set Pulsar Push	802 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	551 V
Set Detector TOF	2030 V

Processing

Summation	6667 x
Gessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Gessed Average	100

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

5.3.13 Experimentelle Daten zu Abbildung 64 (APS-NHS-Spd (67) und APS-NHS-Spn (68))

Derivatisierungsvorschrift: 500 µL einer wässrigen 15,8 µM Spd (66)- und 7,6 µM Spn (65)-Lösung wurden mit 300 µL MeCN, 15 µL einer 5,6%igen Trichloressigsäurelösung (in Wasser), 40 µL einer 13,4%igen Kaliumcarbonatlösung und 30 µL einer APS-NHS (33)-Lösung (1,5 mg/mL in MeCN) versetzt. Die Lösung wurde 1 h lang mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 50 µL einer 1 M Natronlauge und 300 µL einer gesättigten Natriumchloridlösung zugegeben. Die Lösung wurde anschließend zweimal mit je 300 µL Ethylacetat extrahiert, die organische Phase abgenommen und das Lösemittel wurde an der Speedvac entfernt. Vor der Injektion wurden die Proben in 100 µL MeCN gelöst und mit 200 µL Wasser versetzt.

HPLC: Injektionsschleife: 5 µL, Säule 1, Gradient: Start MeOH/H₂O (mit 1% Ameisensäure) (40/60), MeOH-Anteil von 0 – 10 min auf 90 % erhöht und 3 min gehalten; Fluss: 1,2 mL/min

Ionenquelle: 110 °C;

5 Experimenteller Teil

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1100 V	Set Dry Gas	2.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-700 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	150.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	50.0 µs
Pre Puls Storage Time	15.1 µs
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.5 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	802 V
Set Pulsar Push	802 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	551 V
Set Detector TOF	2030 V

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

Processing

Summation	5208 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

5.3.14 Experimentelle Daten zu Abbildung 66 (APS-NHS-Spd (67) und APS-NHS-Spn (68))

Derivatisierungsvorschrift: 500 µL Urin wurden mit jeweils 25 µL einer Spd (66) (2,313 mg/mL; 363,3 µM) und einer Spn (65)-Lösung (3,132 mg/mL; 359,8 µM) versetzt. Die sich daraus ergebenden Konzentrationen waren 16,5 µM für das Spd (66) und 16,3 µM für das Spn (65). Zu dieser Lösung wurden 150 µL 2 M Perchlorsäure zugegeben. Die Lösung wurde geschüttelt und 15 min lang bei 13400 rpm zentrifugiert. 250 µL des Überstands wurden in ein neues Vial überführt und langsam mit 400 µL einer 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung (pH = 10,2) versetzt. Anschließend wurde die Lösung mit 150 µL Acetonitril und 150 µL APS-NHS (33) (4,8 mg/mL in MeCN) versetzt. Die Lösung wurde 1 h lang mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden weitere 100 µL der APS-NHS-Lösung dazu pipettiert und die Reaktionslösung weitere 30 min mit Ultraschall behandelt. Die Lösung wurde ohne weitere Vorbehandlung injiziert.

HPLC: Injektionsschleife: 5 µL, Säule 2, Gradient: Start MeOH/H₂O (mit 0,5% Ameisensäure) (20/80), 2 min gehalten, MeOH-Anteil von 2 – 14 min auf 95 % erhöht und 2 min gehalten; Fluss: 1,5 mL/min; Die ersten 2,5 Minuten und die Zeit zwischen 11,25-11,8 Minuten des chromatographischen Laufs wurde das Eluat über ein 6-Wegeventil entsorgt und nicht in die Ionenquelle gegeben. Zu Beginn der Trennung werden die Salze von der Säule gespült. Diese verunreinigen die Quelle und können den APCI-Heater verstopfen. Im zweiten, nicht in die Ionenquelle injizierten Segment, wird der Ionisationsmarker bzw. seine Abbauprodukte eluiert. Diese verunreinigen ebenfalls die Quelle und sättigen den Detektor.

Ionenquelle: 110 °C;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

MS: vgl. 5.3.13

5.3.15 Experimentelle Daten zu Abbildung 67

Derivatisierungsvorschrift: 1,342 mg Spd (**66**) und 1,596 mg Spn (**65**) wurden in 100 mL Urin gelöst. Für zwei Ansätze wurden jeweils 500 µL dieser Lösung mit 150 µL 2 M Perchlorsäure versetzt und 15 min bei 13400 rpm zentrifugiert. 250 µL des Überstands wurden abgenommen und vorsichtig mit 400 µL 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung (pH = 10,2) versetzt. Anschließend wurde ein Ansatz mit 220 µL APS-Cl (**32**) (1 mg/mL in MeCN) und ein Ansatz mit 250 µL APS-NHS (**33**) (1,5 mg/mL in MeCN) versetzt. Beide Lösungen wurden für 1 h mit Ultraschall behandelt und anschließend mit 50 µL konzentrierter Salzsäure versetzt. Vor der Injektion wurden die Ansätze jeweils mit 600 µL MeCN versetzt.

HPLC: Injektionsschleife: 5 µL, Säule 2, Gradient: Start MeOH/H₂O (mit 1% Ameisensäure) (40/60), MeOH-Anteil von 0 – 10 min auf 90 % erhöht und 3 min gehalten; Fluss: 2,5 mL/min; Die ersten 1,5 min Minuten des chromatographischen Laufs wurde das Eluat über ein 6-Wegeventil entsorgt und nicht in die Ionenquelle gegeben.

Ionenquelle: 110 °C;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

MS: vgl. 5.3.13

5.3.16 Experimentelle Daten zu Abbildung 70 (APA-Cyclohexylisocyanat (**82**) und APA-1-Naphthylisocyanat (**81**))

Derivatisierungsvorschrift: 50 µL einer Dichlormethanlösung welche 6,2 nM Cyclohexylisocyanat (**79**) und 2,8 nM 1-Naphthylisocyanat (**80**) enthielt, wurde mit 10 µL einer APA (**38**)-Lösung (ca. 0,5 mg/mL in DCM) versetzt und bei Raumtemperatur 1 h lang zur Reaktion gebracht. Als Derivatisierungslösung wurde die NMR-Lösung des APA (**38**) um den Faktor 20 verdünnt mit trockenem DCM eingesetzt.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 375 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 80 °C; 1min; 30 °/min; 350 °C; 2 min; 30 °/min; 370 °C; 5 min

Ionenquelle: RT °C;

DPSS-Laser: 62 µJ bei 100Hz;

5 Experimenteller Teil

MS:

Acquisition Parameter

Source

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Active			Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set Capillary	1000 V	Set Dry Gas	0.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set End Plate Offset	-1000 V	Set Divert Valve	Waste

Ion Optics

Set Capillary Exit	170.0 V
Set Skimmer 1	65.0 V
Set Hexapole 1	22.0 V
Set Skimmer 2	23.0 V
Set Hexapole 2	19.9 V
Set Hexapole RF	130.0 V
Set Transfer Time	35.5 µs
Pre Puls Storage Time	15.1 µs
Set Lens 1 Storage	50.0 V
Set Lens 1 Extraction	20.2 V
Set Lens 2	9.0 V
Set Lens 3	-20.0 V
Set Lens 4	0.0 V
Set Lens 5	-27.5 V

TOF

Set Corrector Fill	51 V
Set Pulsar Pull	803 V
Set Pulsar Push	803 V
Set Reflector	1690 V
Set Flight Tube	8610 V
Set Corrector Extract	553 V
Set Detector TOF	1920 V

Processing

Summation	6667 x
Guessed Noise	200
Peak Width	5 pts
Average Noise	10
Guessed Average	100

Mass Calibration

Regression Mode	Quadratic
-----------------	-----------

5.3.17 Experimentelle Daten zu Abbildung 73 (Vergleich DPSS- und Excimer-Laser)

Derivatisierungsvorschrift: Je 45 µL einer 5,29 µg/L 6:2-FTOH- (**46**) und einer 5,94 µg/L 8:2-FTOH-Lösung (**47**) (beide in DCM) wurden zusammengegeben und mit 23 µL einer 4g/L APS-Lösung (**18**) (enthält 3 µL 100 mM DMAP; in DCM) versetzt. Anschließend wurden 30 µL einer 100 mM DCC-Lösung (**5**) in DCM zugegeben. Die Lösung wurde fünf Mal für jeweils 45 min Ultraschall mit jeweils 30 min Pausen behandelt. Die Lösung wurde ohne weitere Vorbehandlung in die GC injiziert.

GC: Injektionsvolumen: 1 µL, Säule 1, Trägergas: He, Fluss: 1,5 mL/min, Injektortemperatur: 375 °C, TFL-Temperatur: 322 °C, Temperaturprogramm: 60 °C; 1min; 30 °/min; 350 °C; 2 min; 30 °/min; 370 °C; 5 min

Ionenquelle: RT °C;

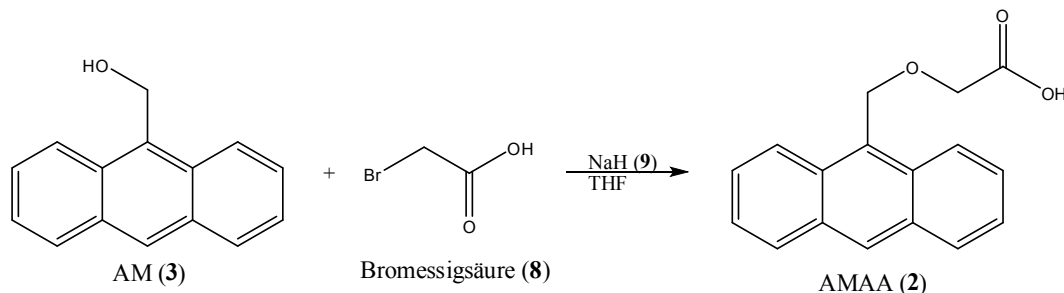
DPSS-Laser: 62 µJ bei 100Hz;

Excimerlaser (KrF, 248 nm): 5 mJ bei 100 Hz

MS: vgl. 5.3.5

5.4 Synthesevorschriften

5.4.1 Anthracen-9-ylmethoxyessigsäure AMAA (2) [131]

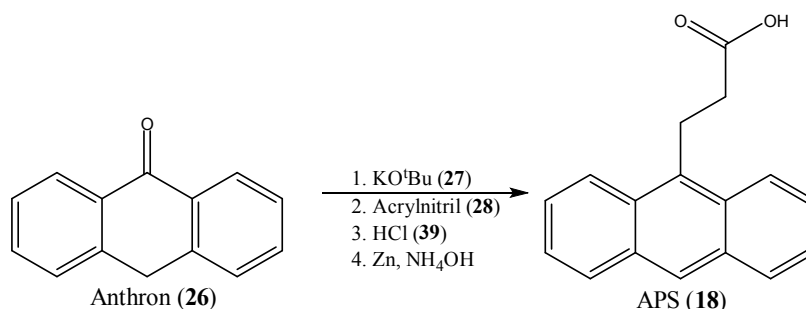


Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
Anthracen-9-ylmethanol (3) [208,26]	2,2	10,5	1
Bromessigsäure (8) [138,95]	5,0	36	3,4
NaH (9) [23,99]	2,5	104	9,9

In einem 100 mL Kolben wurden 2,2 g Anthracen-9-ylmethanol (3) mit 2,5 g NaH (9) in 30 mL trockenem THF suspendiert. Die Suspension verfärbte sich braun und wurde anschließend langsam mit 5,0 g Bromessigsäure (8) gelöst in 30 mL THF versetzt. Die Suspension färbte sich währenddessen gelb und wurde 2 Tage lang unter Schutzgasatmosphäre bis zum Siedepunkt unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde dann nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) in einen Scheidetrichter überführt und langsam mit 30 mL Methanol versetzt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit 625 mL Wasser und 200 mL Diethylether versetzt und extrahiert. Die Etherphase wurde verworfen, die wässrige Phase wurde mit Salzsäure (5 M) angesäuert, der entstehende Feststoff wurde abfiltriert, in Diethylether gelöst und daraufhin filtriert. Das organische Filtrat wurde mit 300 mL 2 M Natronlauge versetzt und extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether gewaschen und anschließend angesäuert. Dann wurde das Produkt aus der wässrigen Phase zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung und Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Der so gewonnene gelbe Feststoff wurde im Hockvakuum getrocknet. So wurden 1,57 g (5,9 mmol; 56 %) des Anthracen-9-ylmethoxyessigsäure (2) gewonnen.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃: δ = 8,516 (s, 1H, Ar-H), 8,409 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 8,042 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 7,615 – 7,470 (m, 4H, Ar-H), 5,693 (s, 2H), 4,272 (s, 2H).

5.4.2 3-(9-Anthryl)-propionsäure (18) [222,223]



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
Anthron (26) [194,23]	20,20	104	1
K [39,10]	4,95	126	1,2
Acrylnitril (28) [53,06; 0,81]	5,9 (7,3 mL)	111	1,1
Zn [65,41]	60,00	92	0,9
CuSO ₄ * 5 H ₂ O [249,69]			kat.

In einem 1L Dreihalskolben bestückt mit einem Magnetrührer, Rückflusskühler und Tropftrichter wurden 4,95 g Kalium in 200 mL trockenem *tert*-Butanol unter Stickstoffatmosphäre gelöst. 20,2 g Anthron (26) wurden hinzugegeben. Nach dem Lösen des Anthrons (26) wurden 7,3 mL Acrylnitril (28) gelöst in 40 mL trockenem *tert*-Butanol tropfenweise zu der Lösung gegeben. Die erst rote Lösung wurde zunächst dickflüssig, anschließend fiel ein Feststoff aus. Die Suspension wurde für 2 h unter Rückfluss bis zum Siedepunkt erhitzt. Anschließend wurden 11 mL konzentrierte Salzsäure gelöst in 225 mL Wasser tropfenweise zugegeben. Etwa 300 mL der Lösung wurden abdestilliert und anschließend wurden 100 mL Wasser zugegeben. Während der Destillation schied sich ein braunes Öl von der wässrigen Phase ab. Die wässrige Phase wurde abdekantiert, das braune Öl mit 100 mL konzentrierter Salzsäure versetzt und 2 h unter Rückfluss bis zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur entstand ein brauner Feststoff. 360 mL einer gesättigten wässrigen Ammoniaklösung, 250 mL Wasser, 60 g Zinkstaub und 3 mL einer 3 M Kupfersulfatlösung wurden zugegeben. Die Suspension wurde 5 h lang unter Reflux erhitzt. Die Farbe der flüssigen Phase änderte sich zu gelb. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und ein Mal 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 Methanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

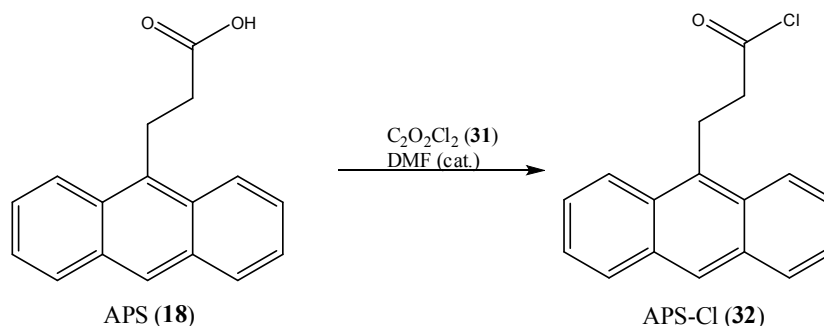
Anschließend wurden die Kristalle in einem Mörser zerkleinert und das entstandene gelbe Pulver wurde über mehrere Wochen bei 60 °C im Vakuum getrocknet. Das Trocknen wurde so lange fortgeführt, bis im $^1\text{H-NMR}$ kein Signal für Essigsäure zu sehen war. So wurden 16,75 g (67 mmol; 64%) der 3-(9-Anthryl)-propionsäure (APS) (**18**) als gelbes Pulver gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 : $\delta = 8,369$ (s, 1H, Ar-H), 8,292 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 8,035 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,610 – 7,440 (m, 4H, Ar-H), 4,060 – 3,980 (m, 2H), 2,920 – 2,830 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$: 100 MHz, CDCl_3 : $\delta = 178,705$ ($\underline{\text{C}}\text{OOH}$), 131,986 (Ar), 131,650 (Ar), 129,512 (Ar), 129,416 (Ar), 126,582 (Ar), 126,100 (Ar), 125,010 (Ar), 123,808 (Ar), 35,028, 23,097.

MS (APCI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[\text{M}]^+ = 250,0988$; gefunden: $[\text{M}]^+ = 250,0989$ (+0,4 ppm)

5.4.3 3-(9-Anthryl)-propionsäurechlorid (**32**) [225,226]



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
APS (18) [250,29]	0,212	0,85	1
Oxalyl chloride (31) [126,93; 1,48]	0,12 (80 μL)	0,93	1,1

Zu einer Suspension bestehend aus 212 mg der Säure APS (**18**) und 20 mL trockenem Dichlormethan wurden unter Stickstoffatmosphäre 5 μL Dimethylformamid zugegeben. Anschließend wurden 80 μL Oxalylchlorid (**31**) langsam zugegeben. Es setzte sofort Gasentwicklung ein und der Feststoff löste sich. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Der gelbe Feststoff wurde in trockenem Toluol gelöst, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der

5 Experimenteller Teil

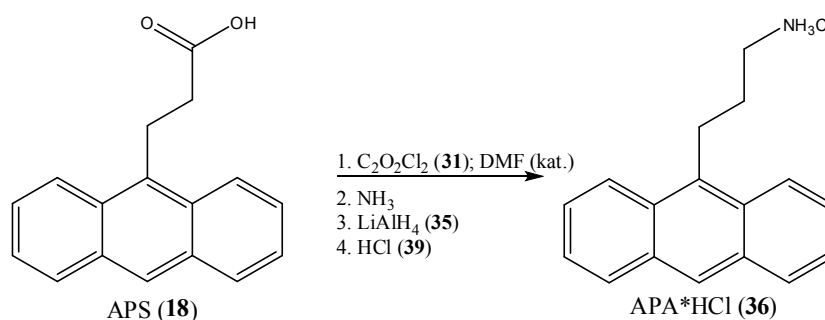
gelbe Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. So wurden 223 mg (0,83 mmol; 98%) des 3-(9-Anthryl)-propionsäurechlorids (**32**) als gelber Feststoff gewonnen.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃: δ = 8,408 (s, 1H, Ar-H), 8,200 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H), 8,035 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar-H), 7,650 – 7,435 (m, 4H, Ar-H), 4,075 – 4,015 (m, 2H), 3,300 – 3,360 (m, 2H).

¹³C-NMR: 100 MHz, CDCl₃: δ = 173,239 (C=O), 131,558 (Ar), 130,036 (Ar), 129,509 (Ar), 129,439 (Ar), 127,058 (Ar), 126,441 (Ar), 125,067 (Ar), 123,301 (Ar), 47,534, 23,234.

MS (APCI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[M]^+$ = 268,0649; gefunden: $[M]^+$ = 268,0660 (+4 ppm)

5.4.4 3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorid (**36**) [226,230]



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
APS (18) [250,29]	2,00	8,00	1
Oxalyl chloride (31) [126,93; 1,48]	2,22 (1,5 mL)	17,5	2,2
NH ₃ (25% in H ₂ O)	50 mL		
3-(9-Anthryl)-propylamide [249,31]	1,00	4,00	1
LiAlH ₄ (35) [37,95]	0,45	11,8	2,9

Zu einer Suspension aus 2,00 g der Säure (**18**) in 50 mL trockenem Dichlormethan und 30 μ L Dimethylformamid wurden 1,5 mL Oxalylchlorid (**31**) unter Inertgas langsam zugetropft. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur war der Feststoff gelöst und die Gasentwicklung abgeschlossen. 50 mL Ammoniak (25% in Wasser) wurden mit 5 mL 3 M NaOH versetzt und mit 60 mL Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und langsam bei 0 °C zu der ersten gelben Reaktionslösung zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das

Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer entfernt und der verbliebene Rückstand wurde mit 100 mL einer 10%igen NaOH-Lösung und 400 mL Wasser versetzt. Die Suspension wurde drei Mal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt ($R_f = 0,31$; normal phase; Ethylacetat). Das voluminöse weiße Produkt wurde im Vakuum getrocknet. 1,15 g 3-(9-anthryl)-propylamid (58%) konnten so als Zwischenprodukt hergestellt werden. 1,00 g des 3-(9-anthryl)-propylamids wurden anschließend in 70 mL trockenem Tetrahydrofuran suspendiert und langsam auf eine Suspension bestehend aus 0,45 g LiAlH₄ (**35**) und 40 mL THF unter Schutzgasatmosphäre gegeben. Die Suspension wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 1,3 mL Wasser, 2,6 mL NaOH (10%) und 4 mL Wasser zugetropft. Ein weißer Feststoff fiel aus, wurde abfiltriert und verworfen. Die braune Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt. 100 mL Wasser wurden zu dem Rückstand gegeben und dreimal mit je 80 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit 5 mL konzentrierter Salzsäure versetzt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Aceton; Aceton/Ethanol (1/1)) ($R_f = 0,34$; normal phase; Aceton/Ethanol (1/1)). Die Fraktionen mit dem Produkt wurden mit 2 mL konzentrierter Salzsäure versetzt und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Feststoff wurde in ca. 50 mL Ethylacetat suspendiert und Methanol wurde unter Rückfluss zugegeben, bis sich der Feststoff komplett löste. Das Volumen der Lösung wurde unter reduziertem Druck auf ca. 35 mL reduziert und die Lösung wurde über Nacht bei -25°C gelagert. Der bräunlich gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Ethylacetat gewaschen. Der Feststoff wurde im Vakuum getrocknet. Dies ergab 306 mg des 3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorids (**36**) als leicht braunes Pulver. Nach dem Entfernen des Lösemittels aus der Mutterlauge konnte der letzte Aufreinigungsschritt mit kleineren Volumina wiederholt und die Ausbeute so gesteigert werden.

3-(9-Anthryl)-propylamid (Zwischenprodukt)

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃: $\delta = 8,374$ (s, 1H, Ar-H), 8,297 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 8,017 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,560 – 7,450 (m, 4H, Ar-H), 3,740 – 3,660 (m, 2H), 5,293 (br s, 2H, CONH₂) 4,030 – 3,980 (m, 2H, Ar-CH₂), 2,720 – 2,680 (m, 2H, CH₂-CONH₂).

¹³C-NMR: 100 MHz, CDCl₃: $\delta = 174,260$ (C=O), 132,765 (Ar), 131,626 (Ar), 129,535 (Ar), 129,316 (Ar), 126,334 (Ar), 125,955 (Ar), 124,974 (Ar), 124,000 (Ar), 36,640, 23,362.

5 Experimenteller Teil

MS (ESI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[M+H]^+ = 250,1226$; gefunden: $[M+H]^+ = 250,1225$ (-0,4 ppm)

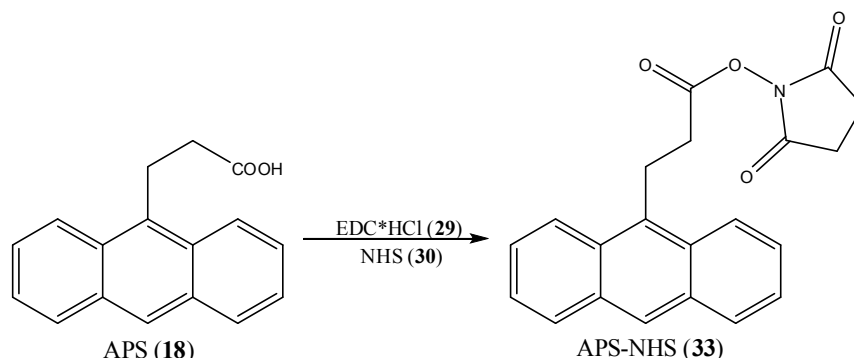
3-(9-Anthryl)-propylaminhydrochlorid (**36**)

¹H-NMR: 400 MHz, DMSO-d₆: $\delta = 8,523$ (s, 1H, Ar-H), 8,400 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 8,110 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 8,030 (br s, 3H, -NH₃) 7,610 – 7,500 (m, 4H, Ar-H), 3,740 – 3,660 (m, 2H), 3,110 – 3,010 (m, 2H), 2,050 – 1,950 (m, 2H).

¹³C-NMR: 100 MHz, DMSO-d₆: $\delta = 133,496$ (Ar), 131,142 (Ar), 129,106 (Ar), 129,059 (Ar), 125,889 (Ar), 125,769 (Ar), 125,103 (Ar), 124,373 (Ar), 38,859 (H₃N-CH₂), 28,816 (Ar-CH₂), 24,244 (CH₂-CH₂-CH₂).

MS (ESI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[M+H]^+ = 236,1434$; gefunden: $[M+H]^+ = 236,1437$ (+1,2 ppm)

5.4.5 3-(9-Anthryl)-propionsäure-2,5-dioxo-pyrrolidiny-lester (**33**) [227]



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
APS (18) [250,29]	0,10	0,40	1
NHS (30) [115,09]	0,09	0,78	1,9
EDC·HCl (29) [191,70]	0,15	0,78	1,9

0,1 g der Säure (**18**) wurden in 2 mL Acetonitril (trocken) gelöst. 0,09 g NHS (**29**) und 0,15 g EDC·HCl (**29**) wurden in 1 mL Acetonitril gelöst und zur ersten Lösung zugetropft. Die Lösung wurde 4 h lang unter einer Stickstoffatmosphäre auf 70 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. 50 mL Dichlormethan wurden zugegeben und die Lösung drei Mal mit Wasser (je ca. 30 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und

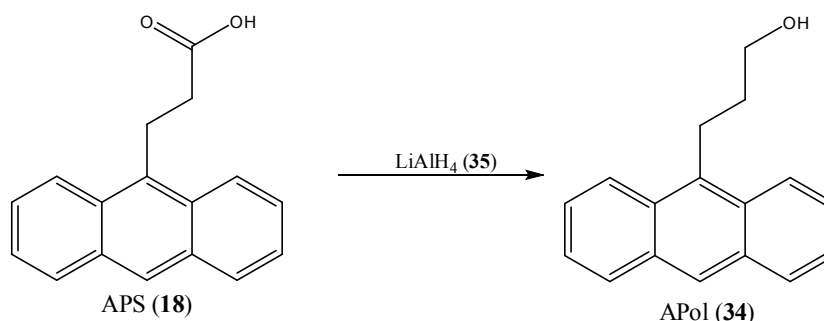
säulenchromatographisch aufgereinigt ($R_f = 0,4$; Ethylacetat/Hexan (1/1)). Die Fraktionen mit dem Produkt wurden eingengt und im Vakuum getrocknet. Dies ergab 124 mg (0,35 mmol; 89%) des 3-(9-Anthryl)-propionsäure-2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl-esters (**27**) als leicht gelblichen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 : $\delta = 8,409$ (s, 1H, Ar-H), 8,250 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 8,035 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,590 – 7,460 (m, 4H, Ar-H), 4,110 – 4,490 (m, 2H), 3,100 – 3,035 (m, 2H), 2,894 (br s, 4H, N-(CO- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$) $_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$: 100 MHz, CDCl_3 : $\delta = 169,244$ (N-($\underline{\text{C}}\text{O}$) $_2$), 168,197 ($\underline{\text{C}}\text{OON}$), 131,740 (Ar), 130,880 (Ar), 129,578 (Ar), 127,487 (Ar), 127,085 (Ar), 126,523 (Ar), 125,214 (Ar), 123,707 (Ar), 31,981, 25,811 (N-(CO- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$) $_2$), 23,039 (CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -COO).

MS (APCI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[\text{M}]^+ = 347,1152$; gefunden: $[\text{M}]^+ = 347,1159$ (+2 ppm)

5.4.6 3-(9-Anthryl)-propanol (**34**) [229]



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
APS (18) [250,29]	1,00	4,0	1
LiAlH ₄ (35) [37,95]	0,175	4,5	1,1

Zu einer Lösung aus 1,00 g der Säure (**18**) in 25 mL THF (trocken) wurde eine Suspension bestehend aus 0,175 g LiAlH₄ (**35**) in 5 mL THF (trocken) langsam bei 0 °C zugegeben. Der Suspension wurde erlaubt, sich auf Raumtemperatur zu erwärmen und sie wurde über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 11,4 mL HCl (10% in H₂O) kontrolliert abreagiert und anschließend wurden 5 mL Wasser zugegeben. Das Rohprodukt wurde dreimal mit je 35 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am

5 Experimenteller Teil

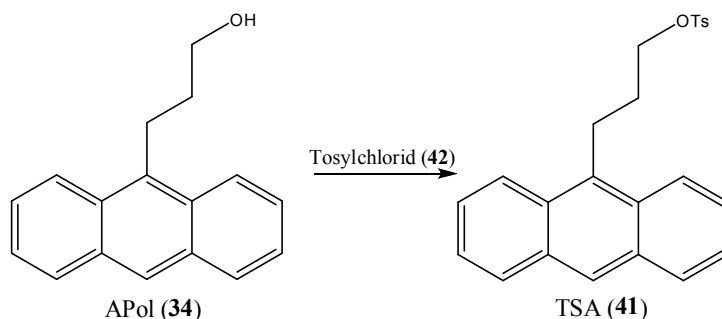
Rotationsverdampfer entfernt und der Feststoff säulenchromatographisch gereinigt ($R_f = 0,36$; normal phase; Ethylacetat/Hexan (1/1)). Nach dem Trocknen im Vakuum wurden 0,894 g (3,78 mmol; 94%) des APol (**34**) gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 : $\delta = 8,352$ (s, 1H, Ar-H), 8,315 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 8,010 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,540 – 7,440 (m, 4H, Ar-H), 3,832 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3,770 – 3,720 (m, 2H, HO- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2,135 – 2,070 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,454 (br s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$: 100 MHz, CDCl_3 : $\delta = 134,454$ (Ar), 131,801 (Ar), 129,826 (Ar), 129,394 (Ar), 125,975 (Ar), 125,699 (Ar), 124,997 (Ar), 124,480 (Ar), 62,825 (HO- CH_2), 34,153 (Ar- CH_2), 24,236 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$).

MS (APCI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[\text{M}]^+ = 236,1196$; gefunden: $[\text{M}]^+ = 236,1198$ (+1 ppm)

5.4.7 Toluol-4-sulfonsäure-3-(9-anthryl)-propylester (**41**) [163,164]



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
APol (34) [236,12]	0,89	3,78	1
Tosylchlorid (42) [190,64; 1,49]	2,16 (1,45 mL)	11,3	3
Pyridin (87) [79,10; 0,98]	1,18 (1,2 mL)	14,9	3,9

0,89 g des Alcohols (**34**) wurden in einem Gemisch aus 40 mL trockenem Diethylether und 25 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Bei 0°C wurden 1,2 mL trockenes Pyridin und eine Lösung bestehend aus 1,45 mL Tosylchlorid (**42**) in 20 mL Diethylether (trocken) tropfenweisen zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. 20 mL Wasser wurden tropfenweise zugegeben und Reaktionsmischung wurde stark gerührt. Die organische Phase wurde im Scheidetrichter abgenommen und mit gesättigter NaCl-Lösung

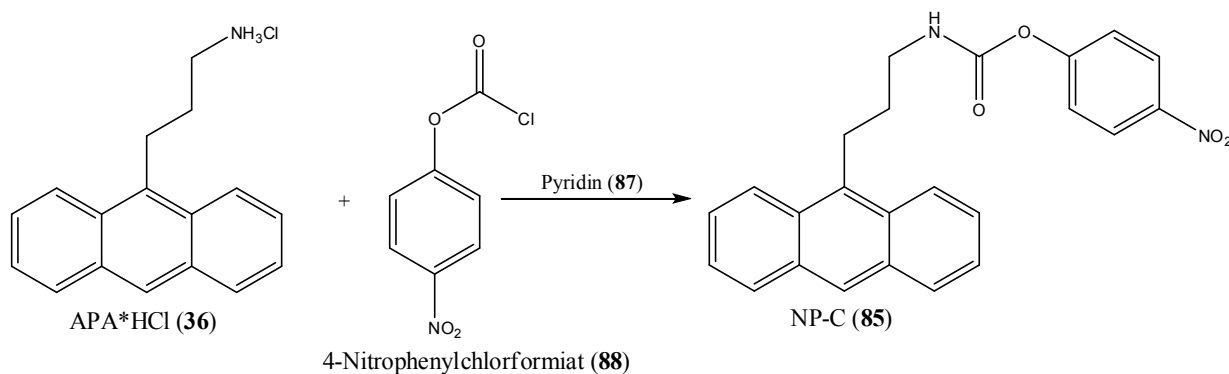
gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt ($R_f = 0.15$; normal phase; Ethylacetat/hexan (1/8)). 643 mg (1,65 mmol; 43 %) Toluol-4-sulfonsäure-3-(9-anthryl)-propylesters (**41**) wurden so als gelbes Öl, welches bei 8 °C auskristallisierte, gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 : $\delta = 8,348$ (s, 1H, Ant-H), 8,160 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, Ant-H), 8,000 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,834 (d, 2H, $J = 8,2$, Tol-H), 7,520 – 7,430 (m, 4H, Ar-H), 7,337 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Tol-H), 4,218 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz, Ant- CH_2 - CH_2), 3,690 – 3,640 (m, 2H, TolSO_3 - CH_2), 2,446 (s, 3H, CH_3), 2,120 – 2,180 (m, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_2), 1,454 (br s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$: 100 MHz, CDCl_3 : $\delta = 144,924$ (Ar), 132,849 (Ar), 131,731 (Ar), 130,040 (Ar), 129,719 (Ar), 129,443 (Ar), 128,073 (Ar), 126,288 (Ar), 126,001 (Ar), 125,826 (Ar), 125,053 (Ar), 124,090 (Ar), 70,494, 30,403, 23,973, 21,797.

MS (APCI+)-(TOF)MS berechnet: $[\text{M}]^+ = 390,1284$; gefunden: $[\text{M}]^+ = 390,1291$ (+1,8 ppm)

5.4.8 4-Nitrophenyl-3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat (**85**)



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
APA*HCl (36) [271,78]	0,22	0,81	1
4-Nitrophenylchloroformiat (88) [201,56]	0,25	1,24	1,5
Pyridin (87) [79,10; 0,98]	0,20 (0,2 mL)	2,58	3,2

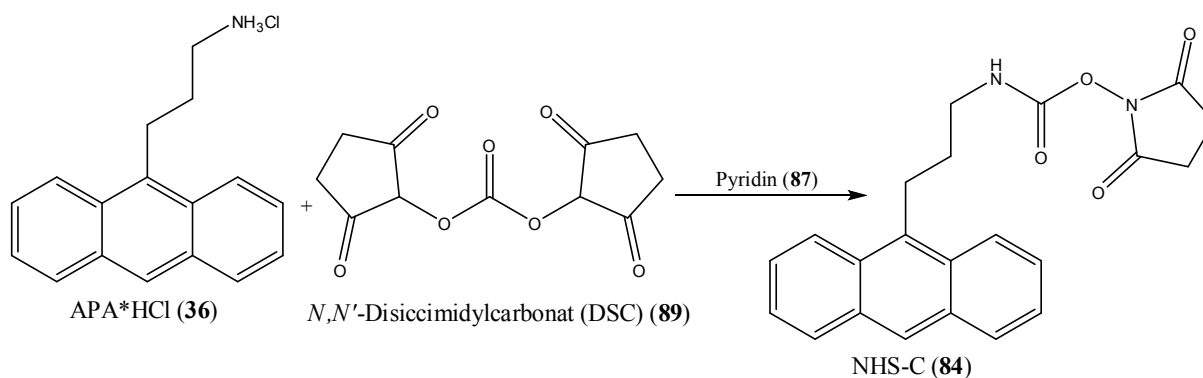
5 Experimenteller Teil

220 mg des APA*HCl (**36**) wurden in 20 mL THF vorgelegt und mit 0,2 mL Pyridin (**87**) versetzt. Zu der Suspension wurden 250 mg 4-Nitrophenylchlorformiat (**88**), gelöst in ca. 5 mL THF, gegeben. Die Reaktion setzt sofort ein, die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es entstand eine gelbe Lösung mit braunem Niederschlag. Der Feststoff wurde abfiltriert und verworfen. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das bräunlich gelbe Öl wurde in trockenem Toluol umkristallisiert, der gelbe Feststoff abfiltriert und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. So konnten 78 mg (0,2 mmol; 24 %) des NP-C (**85**) als oranger Feststoff hergestellt werden.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃: δ = 8,376 (s, 1H, Ant-H), 8,300 – 8,200 (m, 4H, Phenyl-H), 8,028 (d, 2H, J = 8,2 Hz, Ar-H), 7,520 – 7,420 (m, 4H, Ant-H), 7,320 – 7,270 (m, 2H, Ant-H), 3,723 (t, 2H, NH-CH₂), 3,530 – 3,760 (m, 2H, Art-CH₂), 2,200 – 2,100 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂).

MS (APCI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[M+H]^+$ = 401,1496; gefunden: $[M+H]^+$ = 401,1508 (+3,0 ppm)

5.4.9 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 3-(anthracen-9-yl)propylcarbammat (**84**)



Chemikalien	[g]	[mmol]	eq.
APA*HCl (36) [271,78]	0,21	0,77	1
DSC (89) [256,17]	0,22	0,85	1,1
Pyridin (87) [79,10; 0,98]	0,10 (0,1 mL)	1,28	1,7

210 mg APA*HCl (**36**) wurden in 100 mL MeCN suspendiert und mit 0,1 mL Pyridin (**87**) versetzt. Diese Suspension wurde über 30 min zu einer Lösung bestehend aus 220 mg

DSC (**89**) und 40 mL MeCN gegeben. Die Suspension wurde über Nacht bei RT gerührt und es entstand eine sehr dünne rotbraune Suspension. Die Suspension wurde filtriert und der Feststoff verworfen. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer vom Lösemittel befreit und das zurückgebliebene braune Öl in Chloroform gelöst. Die Lösung wurde mit Wasser, 1 M Natronlauge, Wasser, 4%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und einer gesättigten Kochsalzlösung gewaschen. Die gelbe Lösung wurde anschließend mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wurde über Nacht am Hochvakuum getrocknet. So konnten 213,5 mg (0,567 mmol; 73 %) des NHS-C (**84**) hergestellt werden.

¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃: δ = 8,358 (s, 1H, Ant-H), 8,221 (d, 2H, J = 8,2 Hz, Ant-H), 8,009 (d, 2H, J = 8,2 Hz, Ant-H), 7,540 – 7,440 (m, 4H, Ant-H), 3,720 – 3,650 (t, 2H, NH-CH₂), 3,480 – 3,420 (m, 2H, Ar-CH₂), 2,824 (s, 4H, (CO-CH₂)₂), 2,130 – 2,085 (m, 2H, CH₂-CH₂).

MS (APCI(+)-(TOF)MS) berechnet: $[M]^+$ = 376,1418; gefunden: $[M]^+$ = 376,1429 (+2,9 ppm)

6 Ausblick und Zusammenfassung

6.1 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bilden eine gute Grundlage für weitere Derivatisierungsreaktionen für die APLI. Die synthetisierten Label erlauben die Analyse vieler verschiedener Stoffklassen, sodass die Analyse von Naturstoffen wie z.B. Aminosäuren und Aromastoffen, auch in komplexer Matrix, möglich erscheint. Die einzige Voraussetzung ist lediglich eine derivatisierbare funktionelle Gruppe im Zielanalyten.

Die Derivatisierung von Nukleotiden muss weiter untersucht werden. Diese sollten mit dem hier vorgestellten Marker mit Aminfunktionalität derivatisierbar sein. Damit würde die APLI ein neues und wichtiges Werkzeug für die Untersuchungen der DNA, deren Kodierung und Zusammensetzung, darstellen.

Die Derivatisierung von Isocyanaten und Aldehyden erscheint mit den hier vorgestellten APLI-Labeln vielversprechend bzw. denkbar und sollte weiter verfolgt werden.

Um kleinere und preiswertere Festkörperlaser einsetzen zu können, muss über den Umbau der GC-Transferline nachgedacht werden. Diese ist, in der jetzigen Ausführung, für Laser mit kleiner Strahlfläche nicht einsetzbar. Zudem haben Ergebnisse von Dennis Klink, Bergische Universität Wuppertal, gezeigt, dass Phenanthren mit dem hier eingesetzten DPSS-Laser eine bessere Ionisationsausbeute aufweist und damit kleinere Nachweisgrenzen ermöglicht als das hier verwendete Anthracengrundgerüst der Label. Für weitere Versuche mit DPSS-Lasern sollte deshalb über die Synthese von Markern auf Phenanthrenbasis nachgedacht werden.

In dieser Arbeit wurden einige wenige Versuche unternommen, um die derivatisierten Analyten von der Probenmatrix und den Derivatisierungsreagenzien abzutrennen. Hier steckt noch sehr viel Verbesserungspotential. Wenn die derivatisierten Analyte nicht von den APLI-Markern vor der chromatographischen Trennung angetrennt werden, wird bei jeder Injektion das chromatographische System, die Ionenquelle und das Massenspektrometer belastet und verunreinigt. Die mehrfache Injektion großer Markermengen auf z.B. eine GC-Säule führt unweigerlich zu sehr großen Untergrundsignalen und einem erhöhten Verschleiß der Trennkapillare und des Injektorsystems (Inlet) und erhöht den Wartungsaufwand der Ionenquelle durch zusätzlich notwendige Reinigungen.

Der Einsatz der APLI ohne Abtrennung der Derivatisierungsreagenzien lässt auch keine Möglichkeit des Screenings von Proben unbekannter Zusammensetzung zu. Es ist aufgrund sehr hoher Untergrundsignale nahezu nicht möglich, neue Probenbestandteile mit kleinen Konzentrationen zu identifizieren. Zurzeit erscheint deshalb nur eine Targetanalytik sinnvoll.

Mit der Abtrennung von Nebenprodukten und Derivatisierungsreagenzien wird auch das Screening unbekannter Proben möglich.

6.2 Zusammenfassung

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Problemen der von Schiewek *et al.* vorgestellten APLI-Marker [122]. Diese Marker tragen alle ein Sauerstoff in unmittelbarer Nähe zum ionisierbaren Anthracen. Dieser Sauerstoff führte zu einer sehr hohen Dissoziation im Spacer derivatisierter Analyten und reduzierte so die Sensitivität der APLI erheblich. Darüber hinaus waren die von Schiewek *et al.* vorgestellten Label nicht mit allen Analyten GC-gängig. Die GC-APLI ist jedoch deutlich sensitiver als die HPLC-APLI.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine neue Grundstruktur für APLI-Marker entwickelt. Ausgehend von dieser Grundstruktur wurde eine Vielzahl verschiedener APLI-Derivatisierungsreagenzien synthetisiert. Die neuen Marker sind denen von Schiewek eingesetzten Label sehr ähnlich, tragen aber keinen Sauerstoff mehr im Spacer. Des Weiteren besteht der Spacer aller neu hergestellten Marker aus einer Kohlenstoffkette von mindestens drei C-Atomen, sodass der Einsatz von mit Stabilisotopen markierten Standards zur Quantifizierung nicht notwendig ist.

Synthetisiert wurden Label mit einer Carbonsäure, einem Säurechlorid, einem Alkohol, einem Aktivester, einem Aminhydrochlorid und einem Tosylester als funktionelle Ankergruppe. Die Reaktivität der neu hergestellten Label wurde ausführlich diskutiert.

Die neue Grundstruktur der Marker hat sich als deutlich stabiler erwiesen als die mit dem Sauerstoff im Spacer. Die neuen APLI-Label wurden für den Einsatz in der GC getestet und es wurden, für einige Analyten, Nachweisgrenzen im unteren pM-Bereich erzielt.

Mit den synthetisierten Markern wurden zwei Derivatisierungsreaktionen für Alkohole, drei für Carbonsäuren und drei für Amine vorgestellt. Da wo es sinnvoll erschien, wurden auch die Fragmentmuster der im Folgenden beschriebenen derivatisierten Analyten diskutiert.

Mit dem Label APS (**18**), welches eine Carbonsäure als reaktive Gruppe besitzt, wurden der Alkohol HPP (**16**) als Modellanalyt für DNA-Addukte derivatisiert. Die über eine GC-APLI-(ToF)MS-Analyse erreichten Nachweisgrenzen betragen 2,5 nM bzw. 25 Femtomol Gesamtmenge des HPP (**18**) injiziert in die GC. Aufgrund der Zersetzung des derivatisierten Analyten in Lösung waren die Nachweisgrenzen leider nicht weiter zu verbessern. Trotz dieser Zersetzung konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion für den Einsatz quantitativer Bestimmungen eingesetzt werden kann. Alkohole, welche ein stabiles Derivatisierungsprodukt mit dem APS (**18**) ergaben, erlaubten Nachweisgrenzen von unter 50

pM bzw. 50 Attomol Injektionsmenge Analyt in die GC. Gezeigt wurde dieses am Beispiel der Fluortelomeralkohole 6:2- (**46**) und 8:2-FTOH (**47**). Das APS (**18**) kann auch für die Analyse von Aminen eingesetzt werden. Demonstriert wurde dieses am Beispiel des Modellanalyten Propylamin (**63**). Die sich aus dieser Analyse ergebende Nachweisgrenze lag bei ca. 600 pM.

Mit dem Säurechlorid APS-Cl (**32**) wurde der Alkohol 8:2-FTOH (**47**) derivatisiert. Dies ergab eine Nachweisgrenze von ca. 70 pM bzw. 70 Attomol injizierter Gesamtmenge Analyt. Der Einsatz des APS-Cl (**32**) für Amine wurde anhand der Derivatisierung von Spermin (**65**) und Spermidin (**66**), beides Polyamine, in einer Urinmatrix demonstriert. Damit wurde gezeigt, dass der Marker zum einen für komplexe Matrices geeignet ist, zum anderen, dass dieser auch für wässrige Proben eingesetzt werden kann. Spermin (**65**) und Spermidin (**66**) wurden ebenfalls mit APS-NHS (**33**), einem Aktivester, in wässriger Matrix derivatisiert. Diese Derivatisierungsreaktion wurde daraufhin auf Urin übertragen. Die Nachweisgrenzen betragen für eine HPLC-APLI-(ToF)MS-Analyse 111 nM bzw. 77 nM. Es wurde auch gezeigt, dass diese Derivatisierungsreaktion reproduzierbar ist.

Die Carbonsäuren Propan- (**57**) und Hexansäure (**53**) wurden mit APol (**34**), einem Anthracen mit einem Alkohol als reaktive Gruppe, derivatisiert. Die über eine GC-APLI-(ToF)MS-Analyse ermittelten Nachweisgrenzen betragen 100 pmol/L bzw. 10 pmol/L. Mit dem TSA (**41**), einem Tosylester mit einem Anthracenrest, ließen sich die Hexan- (**53**) und die Methacrylsäure (**52**) derivatisieren. Die Nachweisgrenzen betragen 50 pM bzw. 320 pM.

Mit dem wasserlöslichen Aminhydrochlorid APA*HCl (**36**) konnten die ebenfalls wasserlöslichen Säuren Acryl- (**60**) und Methacrylsäure (**52**) derivatisiert werden. Diese Derivatisierungsreaktion war in einer Urinmatrix reproduzierbar.

Die neuen APLI-Label erweitern den Einsatz der APLI wirkungsvoll auf nicht aromatische Verbindungen und bieten pro funktionelle Gruppe mehrere Derivatisierungsstrategien bzw. Derivatisierungsmöglichkeiten. Die Einführung verschiedener Label für jede der oben genannten funktionellen Gruppen erlaubt es, die Derivatisierungsreaktion flexibler auf die Matrix und den Analyten anzupassen und macht so die APLI universeller einsetzbar.

Die neuen APLI-Marker wurden auch für die Derivatisierung von Isocyanaten, Aldehyden und organischen Phosphorsäuren getestet. Diese Versuche waren allerdings nicht erfolgreich. Abschließend wurde der Einsatz eines DPSS-Lasers untersucht. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass zum einen die Ionisationsausbeuten geringer als mit dem Excimer-Laser sind, und zum anderen, dass die Analysen aufgrund der sich thermisch bewegenden GC-Kapillare

6 Ausblick und Zusammenfassung

nicht reproduzierbar sind. Um dem DPSS-Laser einsetzen zu können, muss der Aufbau der GC-TFL inkl. Ionenquelle neu konzipiert werden.

7 Literatur

- [1] Arsene, C., Vione, D., Grinberg, N., and Olariu, R. I., "*GC x GC-MS HYPHENATED TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN AIR*", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **34** (2011) 1077-1111
- [2] Banerjee, S., Mazumdar, S., "*Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*", *International Journal of Analytical Chemistry*, **2012** (2011) 1-40
- [3] Syage, J. A., Short, L. C., and Cai, S. S., "*APPI: The Second Source for LC-MS*"; 2008, <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/LC/APPI-The-Second-Source-for-LC-MS/ArticleStandard/Article/detail/504702> (am 11.03.2013 aufgerufen)
- [4] Constapel, M., Schellentrager, M., Schmitz, O. J., Gäb, S., Brockmann, K. J., Giese, R., and Benter, T., "*Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry*", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19** (2005) 326-336
- [5] Giese, R. W., "*Electron-capture mass spectrometry: recent advances*", *Journal of Chromatography A*, **892** (2000) 329-346
- [6] El Aneed, A., Cohen, A., and Banoub, J., "*Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*", *Applied Spectroscopy Reviews*, **44** (2009) 210-230
- [7] Schulze, W. X., Usadel, B., "*Quantitation in Mass-Spectrometry-Based Proteomics*", *Annual Review of Plant Biology*, **61** (2010) 491-516
- [8] Botitsi, H. V., Garbis, S. D., Economou, A., and Tsipi, D. F., "*Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices*", *Mass spectrometry reviews*, **30** (2011) 907-939
- [9] Wang, D., Li, Q. X., "*Application of mass spectrometry in the analysis of polybrominated diphenyl ethers*", *Mass spectrometry reviews*, **29** (2010) 737-775
- [10] Prakash, C., Shaffer, C. L., and Nedderman, A., "*Analytical strategies for identifying drug metabolites*", *Mass spectrometry reviews*, **26** (2007) 340-369
- [11] Mishur, R. J., Rea, S. L., "*Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: Detection of biomarkers of aging and of age-related diseases*", *Mass spectrometry reviews*, **31** (2012) 70-95
- [12] Cai, S. S., Short, L. C., Syage, J. A., Potvin, M., and Curtis, J. M., "*Liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry analysis of triacylglycerol lipids-Effects of mobile phases on sensitivity*", *Journal of Chromatography A*, **1173** (2007) 88-97
- [13] Dettmer, K., Aronov, P. A., and Hammock, B. D., "*Mass spectrometry-based metabolomics*", *Mass spectrometry reviews*, **26** (2007) 51-78

- [14] Yates, J. R., Ruse, C. I., and Nakorchevsky, A., "*Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications*", Annual Review of Biomedical Engineering, **11** (2009) 49-79
- [15] Halket, J. M., Waterman, D., Przyborowska, A. M., Patel, R. K. P., Fraser, P. D., and Bramley, P. M., "*Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS*", Journal of Experimental Botany, **56** (2005) 219-243
- [16] Paul, W., Steinwedel, H., "*Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld*", Zeitschrift Naturforschung Teil A, **8** (1953) 448-450
- [17] Glish, G. L., Vachet, R. W., "*The basics of mass spectrometry in the twenty-first century*", Nature Reviews Drug Discovery, **2** (2003) 140-150
- [18] Henchman, M., Steel, C., "*Understanding the Quadrupole Mass Filter through Computer Simulation*", Journal of Chemical Education, **8** (1998) 1049-1054
- [19] Miller, P. E., Denton, M. B., "*The quadrupole mass filter: Basic operating concepts*", Journal of Chemical Education, **7** (1986) 617-623
- [20] Marshall, A. G., Hendrickson, C. L., "*High-Resolution Mass Spectrometers*", Annual Review of Analytical Chemistry, **1** (2008) 579-599
- [21] Skoog, D. A., J. J. Leary, "*Instrumentelle Analytik*", Springer Verlag, Heidelberg, (1996) 462-481
- [22] Stephens, W. E., "*A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion.*", Physical Review, **69** (1946) 691-691
- [23] Wolff, M. M., Stephens, W. E., "*A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion*", Review of Scientific Instruments, **24** (1953) 616-617
- [24] Baeza-Romero, M. T., Blitz, M. A., Goddard, A., and Seakins, P. W., "*Time-of-flight mass spectrometry for time-resolved measurements: Some developments and applications*", International Journal of Chemical Kinetics, **44** (2012) 532-545
- [25] Jonsson, A. P., "*Mass spectrometry for protein and peptide characterisation*", Cellular and Molecular Life Sciences, **7** (2001) 868-884
- [26] Schiewek, R., Lorenz, M., Giese, R., Brockmann, K., Benter, T., Gäb, S., and Schmitz, O. J., "*Development of a multipurpose ion source for LC-MS and GC-API MS*", Analytical and Bioanalytical Chemistry, **392** (2008) 87-96
- [27] Bruker Daltonics GmbH, "*micrOTOF User Manual*", Version 1.0 (2006)
- [28] Aiello, D., De Luca, D., Gionfriddo, E., Naccarato, A., Napoli, A., Romano, E., Russo, A., Sindora, G., and Tagarelli, A., "*Review: Multistage mass spectrometry in quality, safety and origin of foods*", European Journal of Mass Spectrometry, **17** (2011) 1-31
- [29] Smith, B. E., Rowland, S. J., "*A derivatisation and liquid chromatography/electrospray ionisation multistage mass spectrometry method for*

- the characterisation of naphthenic acids*", Rapid Communications in Mass Spectrometry, **22** (2008) 3909-3927
- [30] Kersten, H., Lorenz, M., Brockmann, K. J., and Benter, T., "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)", Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **22** (2011) 1063-1069
- [31] McEwen, C. N., Larsen, B. S., "Ionization Mechanisms Related to Negative Ion APPI, APCI, and DART", Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **20** (2009) 1518-1521
- [32] Kostianen, R., Kauppila, T. J., "Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, **1216** (2009) 685-699
- [33] Droste, S., Schellentrager, M., Constapel, M., Gäb, S., Lorenz, M., Brockmann, K. J., Benter, T., Lubda, D., and Schmitz, O. J., "A silica-based monolithic column in capillary HPLC and CEC coupled with ESI-MS or electrospray-atmospheric-pressure laser ionization-MS", Electrophoresis, **26** (2005) 4098-4103
- [34] McEwen, C. N., McKay, R. G., "A combination atmospheric pressure LC/MS : GC/MS ion source: Advantages of dual AP-LC/MS : GC/MS instrumentation", Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **16** (2005) 1730-1738
- [35] Pacchiarotta, T., Nevedomskaya, E., Carrasco-Pancorbo, A., Deelder, A. M., and Mayboroda, O. A., "Evaluation of GC-APCI/MS and GC-FID As a Complementary Platform", Journal of Biomolecular Techniques, **21** (2010) 205-213
- [36] Schiewek, R., Schellentrager, M., Monnikes, R., Lorenz, M., Giese, R., Brockmann, K. J., Gäb, S., Benter, T., and Schmitz, O. J., "Ultrasensitive determination of polycyclic aromatic compounds with atmospheric-pressure laser ionization as an interface for GC/MS", Analytical Chemistry, **79** (2007) 4135-4140
- [37] Crotti, S., Seraglia, R., and Traldi, P., "Some thoughts on electrospray ionization mechanisms", European Journal of Mass Spectrometry, **17** (2011) 85-99
- [38] Banerjee, S., Mazumdar, S., "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte", International Journal of Analytical Chemistry, **2012** (2012) 1-40
- [39] Kebarle, P., Verkerk, U. H., "Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now", Mass spectrometry reviews, **28** (2009) 898-917
- [40] Santa, T., "Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry", Biomedical Chromatography, **25** (2011) 1-10
- [41] Bernabé-Zafón, V., Simó-Alfonso, E. F., and Ramis-Ramos, G., "On the determination of underivatized fatty alcohol ethoxylates by electrospray ionisation-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, **1118** (2006) 188-198

- [42] Yanes, O., Tautenhahn, R., Patti, G. J., and Siuzdak, G., "*Expanding Coverage of the Metabolome for Global Metabolite Profiling*", *Analytical Chemistry*, **83** (2011) 2152-2161
- [43] Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., and Kuster, B., "*Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **389** (2007) 1017-1031
- [44] Gross, J. H., "*Massenspektrometrie*", Springer Spektrum Verlag, Heidelberg, 2012
- [45] Gao, Y., Wang, Y. S., "*A method to determine the ionization efficiency change of peptides caused by phosphorylation*", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **18** (2007) 1973-1976
- [46] Marginean, I., Page, J. S., Tolmachev, A. V., Tang, K., and Smith, R. D., "*Achieving 50% Ionization Efficiency in Subambient Pressure Ionization with Nanoelectrospray*", *Analytical Chemistry*, **82** (2010) 9344-9349
- [47] Covey, T. R., Thomson, B. A., and Schneider, B. B., "*Atmospheric pressure ion sources*", *Mass spectrometry reviews*, **28** (2009) 870-897
- [48] Krieger, S., Trotha, A., Leung, K. Y., and Schmitz, O., "*Development, optimization, and use of an APCI source with temperature-controlled vaporization of solid and liquid samples*", *Anal Bioanal Chem*, **405** (2013) 1373-1381
- [49] McEwen, C. N., "*GC/MS on an LC/MS instrument using atmospheric pressure photoionization*", *International Journal of Mass Spectrometry*, **259** (2007) 57-64
- [50] Watson, J. T., Sparkman, O. D., "*Introduction to Mass Spectrometry*", John Wiley & Sons, West Sussex, 2007, 639-688
- [51] Huang, M. Z., Yuan, C. H., Cheng, S. C., Cho, Y. T., and Shiea, J., "*Ambient Ionization Mass Spectrometry*", *Annual Review of Analytical Chemistry*, **3** (2010) 43-65
- [52] Herrera, L. C., Grossert, J. S., and Ramaley, L., "*Quantitative Aspects of and Ionization Mechanisms in Positive-Ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **19** (2008) 1926-1941
- [53] Donato, P., Cacciola, F., Tranchida, P. Q., Dugo, P., and Mondello, L., "*Mass spectrometry detection in comprehensive liquid chromatography: Basic concepts, instrumental aspects, applications and trends*", *Mass spectrometry reviews*, 2012, 2-37
- [54] Pasikanti, K. K., Ho, P. C., and Chan, E. C. Y., "*Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids*", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **871** (2008) 202-211
- [55] Devle, H., Naess-Andresen, C. F., Stenstrom, Y., and Ekeberg, D., "*Rapid method for analysis of sphingomyelin by microwave derivatisation for gas chromatography-*

- mass spectrometry*", European Journal of Lipid Science and Technology, **113** (2011) 708-710
- [56] Maštovská, K., Lehotay, S. J., "Practical approaches to fast gas chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography A, **1000** (2003) 153-180
- [57] Schmidt, S., Appel, M. F., Garnica, R. M., Schindler, R. N., and Benter, T., "Atmospheric pressure laser ionization. An analytical technique for highly selective detection of ultralow concentrations in the gas phase", Analytical Chemistry, **71** (1999) 3721-3729
- [58] Ghaderi, S., Kulkarni, P. S., Ledford, E. B., Wilkins, C. L., and Gross, M. L., "Chemical ionization in Fourier transform mass spectrometry", Analytical Chemistry, **53** (1981) 428-437
- [59] Magi, E., Ianni, C., and Grotti, M., "Study of amino acids by means of liquid chromatography mass spectrometry: optimization of the particle-beam interface", Analytica Chimica Acta, **401** (1999) 55-64
- [60] Cappiello, A., Famiglioni, G., Pierini, E., Palma, P., and Trufelli, H., "Advanced Liquid Chromatography Mass Spectrometry Interface Based on Electron Ionization", Analytical Chemistry, **79** (2007) 5364-5372
- [61] Cappiello, A., Famiglioni, G., Palma, P., Pierini, E., Termopoli, V., and Trufelli, H., "Direct-EI in LC-MS: Towards a universal detector for small-molecule applications", Mass spectrometry reviews, **30** (2011) 1242-1255
- [62] Palma, P., Famiglioni, G., Trufelli, H., Pierini, E., Termopoli, V., and Cappiello, A., "Electron ionization in LC-MS: recent developments and applications of the direct-EI LC-MS interface", Anal Bioanal Chem, **399** (2011) 2683-2693
- [63] Cammann, K., "Instrumentelle Analytische Chemie", Spektrum Akademischer Verlag, 2001
- [64] Ding, W. H., Fujita, Y., Aeschimann, R., and Reinhard, M., "Identification of organic residues in tertiary effluents by GC/EI-MS, GC/CI-MS and GC/TSQ-MS", Fresenius J Anal Chem, **354** (1996) 48-55
- [65] Stephanou, E., "Identification of nonionic detergents by GC/CI-MS: I. A complementary method or an attractive alternative to GC/EI-MS and other methods?", Chemosphere, **13** (1984) 43-51
- [66] Munson, M. S. B., Field, F. H., "Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction", Journal of the American Chemical Society, **88** (1966) 2621-2630
- [67] Hunt, D. F., Crow, F. W., "Electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry", Analytical Chemistry, **50** (1978) 1781-1784
- [68] Dougherty, R. C., "Negative chemical ionization mass spectrometry: Applications in environmental analytical chemistry", Biological Mass Spectrometry, **8** (1981) 283-292

- [69] Pagliano, E., Meija, J., Sturgeon, R. E., Mester, Z., and D'Ulivo, A., "*Negative Chemical Ionization GC/MS Determination of Nitrite and Nitrate in Seawater Using Exact Matching Double Spike Isotope Dilution and Derivatization with Triethyloxonium Tetrafluoroborate*", *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 2592-2596
- [70] Hayen, H., Karst, U., "*Strategies for the liquid chromatographic mass spectrometric analysis of non-polar compounds*", *Journal of Chromatography A*, **1000** (2003) 549-565
- [71] Abdel-Baky, S., Giese, R. W., "*Gas chromatography/electron capture negative-ion mass spectrometry at the zeptomole level*", *Analytical Chemistry*, **63** (1991) 2986-2989
- [72] Giese, R. W., Saha, M., Abdelbaky, S., and Allam, K., "*Measuring DNA adducts by gas chromatography electron capture mass spectrometry: Trace organic analysis*", *Methods in Enzymology*, **271** (1996) 504-522
- [73] Singh, G., Gutierrez, A., Xu, K., and Blair, I. A., "*Liquid Chromatography/Electron Capture Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry: Analysis of Pentafluorobenzyl Derivatives of Biomolecules and Drugs in the Attomole Range*", *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 3007-3013
- [74] Sheen, J. F., Her, G. R., "*Application of pentafluorophenyl hydrazine derivatives to the analysis of nabumetone and testosterone in human plasma by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*", *Anal Bioanal Chem*, **380** (2004) 891-897
- [75] Annan, R. S., Kresbach, G. M., Giese, R. W., and Vouros, P., "*Trace Detection of Modified Dna Bases Via Moving-Belt Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry Using Electrophoretic Derivatization and Negative Chemical Ionization*", *Journal of Chromatography*, **465** (1989) 285-296
- [76] Kresbach, G. M., Itani, M., Saha, M., Rogers, E. J., Vouros, P., and Giese, R. W., "*Ester and related derivatives of ring N-pentafluoro-benzylated 5-hydroxymethyluracil: Hydrolytic stability, mass spectral properties, and trace detection by gas chromatography-electron-capture detection, gas chromatography-electron-capture negative ion mass spectrometry, and moving-belt liquid chromatography-electron-capture negative ion mass spectrometry*", *Journal of Chromatography A*, **476** (1989) 423-438
- [77] Singh, G., Gutierrez, A., Xu, K., and Blair, I. A., "*Liquid Chromatography/Electron Capture Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry: Analysis of Pentafluorobenzyl Derivatives of Biomolecules and Drugs in the Attomole Range*", *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 3007-3013
- [78] González-Gago, A., Brandsma, S., Leonards, P., de Boer, J., Marchante-Gayón, J., and García Alonso, J., "*Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by isotope dilution GC(ECNI)MS using ⁸¹Br-labelled standards*", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **401** (2011) 2639-2649
- [79] Bowden, J. A., Ford, D. A., "*An examination of pentafluorobenzoyl derivatization strategies for the analysis of fatty alcohols using gas chromatography/electron capture negative ion chemical ionization-mass spectrometry*", *Journal of*

- Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1375-1383
- [80] Dills, R. L., Shen, D. D., "*Methods to reduce background interferences in electron-capture gas chromatographic analysis of valproic acid and its unsaturated metabolites after derivatization with pentafluorobenzyl bromide*", Journal of Chromatography B, **690** (1997) 139-152
- [81] Wang, Z. X., Bain, N. Y., and Giese, R. W., "*Electron-capture detection: Difluorobenzyl and related electrophores*", Journal of Chromatography B, **689** (1997) 195-203
- [82] Foiles, P. G., Akerkar, S. A., Carmella, S. G., Kagan, M., Stoner, G. D., Resau, J. H., and Hecht, S. S., "*Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine-DNA adducts in smokers and nonsmokers*", Chemical Research in Toxicology, **4** (1991) 364-368
- [83] Hölzle, D., Schmeiser, H. H., Tricker, A. R., and Richter, E., "*Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung*", Toxicology, **232** (2007) 277-285
- [84] Heppel, C., Heling, A. K., and Richter, E., "*Ultrasensitive method for the determination of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts by gas chromatography-high resolution mass spectrometry in mucosal biopsies of the lower esophagus*", Analytical and Bioanalytical Chemistry, **393** (2009) 1525-1530
- [85] Saha, M., Saha, J., and Giese, R. W., "*4-(Trifluoromethyl)-2,3,5,6-Tetrafluorobenzyl Bromide As A New Electrophoric Derivatizing Reagent*", Journal of Chromatography, **641** (1993) 400-404
- [86] Zhang, X., Xu, L. X., Wang, P. G., Wang, Z. X., and Giese, R. W., "*Synthesis of releasable electrophore tags for applications in mass spectrometry*", Bioconjugate Chemistry, **13** (2002) 1002-1012
- [87] Wang, P. G., Murugaiah, V., Yeung, B., Vouros, P., and Giese, R. W., "*2-Phosphoglycolate and glycolate-electrophore detection, including detection of 87 zeptomoles of the latter by gas chromatography electron-capture mass spectrometry*", Journal of Chromatography A, **721** (1996) 289-296
- [88] Kutzer, C., Branner, B., Zwickenpflug, W., and Richter, E., "*Simultaneous solid-phase extraction and gas chromatographic mass spectrometric determination of hemoglobin adducts from tobacco-specific nitrosamines and aromatic amines*", Journal of Chromatographic Science, **35** (1997) 1-6
- [89] Hoelzle, D., Schlobe, D., Tricker, A. R., and Richter, E., "*Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung*", Toxicology, **232** (2007) 277-285
- [90] Rivera-Rodríguez, L. B., Rodríguez-Estrella, R., Ellington, J. J., and Evans, J. J., "*Quantification of low levels of organochlorine pesticides using small volumes ($\leq 100 \mu\text{l}$) of plasma of wild birds through gas chromatography negative chemical ionization mass spectrometry*", Environmental Pollution, **148** (2007) 654-662

- [91] Kontsas, H., Pekari, K., "*Determination of polychlorinated biphenyls in serum using gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionization for exposure estimation*", *Journal of Chromatography B*, **791** (2003) 117-125
- [92] Saha, M., Giese, R. W., "*High-Performance Liquid-Chromatography Versus Solid-Phase Extraction for Post-Derivatization Cleanup Prior to Gas-Chromatography Electron-Capture Negative-Ion Mass-Spectrometry of N1,N3-Bis-(Pentafluorobenzyl)-N7-(2-[Pentafluorobenzyloxy]Ethyl)Xanthine, A Product Derived from An Ethylene-Oxide Dna Adduct*", *Journal of Chromatography*, **629** (1993) 35-40
- [93] Giese, R. W., "*Detection of DNA adducts by electron capture mass spectrometry*", *Chemical Research in Toxicology*, **10** (1997) 255-270
- [94] Terrier, P., Desmazières, B., Tortajada, J., and Buchmann, W., "*APCI/APPI for synthetic polymer analysis*", *Mass spectrometry reviews*, **30** (2011) 854-874
- [95] Short, L. C., Cai, S.-S. S. J. A., "*APPI-MS: Effects of mobile phases and VUV lamps on the detection of PAH compounds*", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **18** (2007) 589-599
- [96] Kersten, H., Funcke, V., Lorenz, M., Brockmann, K. J., Benter, T., and O'Brien, R., "*Evidence of Neutral Radical Induced Analyte Ion Transformations in APPI and Near-VUV APLI*", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **20** (2009) 1868-1880
- [97] Garcia-Ac, A., Segura, P. A., Viglino, L., Gagnon, C., and Sauvé, S., "*Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater*", *Journal of Mass Spectrometry*, **46** (2011) 383-390
- [98] Bos, S., van Leeuwen, S., and Karst, U., "*From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry*", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **384** (2006) 85-99
- [99] Klee, S., Albrecht, S., Derpmann, V., Kersten, H., and Benter, T., "*Generation of ion-bound solvent clusters as reactant ions in dopant-assisted APPI and APLI*", *Anal Bioanal Chem*, **405** (2013) 6933-6951
- [100] Clark, A., Ledingham, K. W. D., Marshall, A., Sander, J., and Singhal, R. P., "*Attomole detection of nitroaromatic vapours using resonance enhanced multiphoton ionization mass spectrometry*", *Analyst*, **118** (1993) 601-607
- [101] Kimura, K., "*Very-High-Resolution Laser Photoelectron Spectroscopy of Molecules*", *Lecture Notes in Physics*, **715** (2007), 215-239
- [102] Zimmermann, R., Boesl, U., Heger, H. J., Rohwer, E. R., Orthner, E. K., Schlag, E. W., and Kettrup, A., "*Hyphenation of gas chromatography and resonance-enhanced laser mass spectrometry (REMPI-TOFMS): A multidimensional analytical technique*", *Journal of High Resolution Chromatography*, **20** (1997) 461-470

- [103] Appel, M. F., Short, L. C., and Benter, T., "*Development of medium pressure laser ionization, MPLI. Description of the MPLI ion source*", Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **15** (2004) 1885-1896
- [104] Zimmermann, R., Welthagen, W., and Gröger, T., "*Photo-ionisation mass spectrometry as detection method for gas chromatography: Optical selectivity and multidimensional comprehensive separations*", Journal of Chromatography A, **1184** (2008) 296-308
- [105] Boesl, U., "*Laser mass spectrometry for environmental and industrial chemical trace analysis*", Journal of Mass Spectrometry, **35** (2000) 289-304
- [106] Zimmermann, R., Heger, H. J., Yeretzian, C., Nagel, H., and Boesl, U., "*Application of Laser Ionization Mass Spectrometry for On-line Monitoring of Volatiles in the Headspace of Food Products: Roasting and Brewing of Coffee*", Rapid Communications in Mass Spectrometry, **10** (1996) 1975-1979
- [107] Grotemeyer, J., Boesl, U., Walter, K., and Schlag, E. W., "*A general soft ionization method for mass spectrometry: Resonance-enhanced multi-photon ionization of biomolecules*", Organic Mass Spectrometry, **21** (1986) 645-653
- [108] Dessent, C. E. H., Müller-Dethlefs, K., "*Hydrogen-Bonding and van der Waals Complexes Studied by ZEKE and REMPI Spectroscopy*", Chemical Reviews, **100** (2000) 3999-4022
- [109] Frost, M. J., "*3 Optical studies of ion-molecule reactions*", Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry), **100** (2004) 29-72
- [110] Müller, C., Klöppel-Riech, M., Schröder, F., Schroeder, J., and Troe, J., "*Fluorescence and REMPI Spectroscopy of Jet-Cooled Isolated 2-Phenylindene in the S1 State*", The Journal of Physical Chemistry A, **110** (2006) 5017-5031
- [111] LI, A., UCHIMURA, T., TSUKATANI, H., and IMASAKA, T., "*Trace Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Gas Chromatography Mass Spectrometry Based on Nanosecond Multiphoton Ionization*", Analytical Sciences, **26** (2010) 841-846
- [112] Zimmermann, R., Heger, H. J., Kettrup, A., and Nikolai, U., "*Direct observation of the formation of aromatic pollutants in waste incineration flue gases by on-line REMPI-TOFMS laser mass spectrometry*", Fresenius Journal of Analytical Chemistry, **366** (2000) 368-374
- [113] Garnica, R. M., Appel, M. F., Eagan, L., McKeachie, J. R., and Benter, T., "*A REMPI method for the ultrasensitive detection of NO and NO₂ using atmospheric pressure laser ionization mass spectrometry*", Analytical Chemistry, **72** (2000) 5639-5646
- [114] UCHIMURA, T., "*Sensitive and Selective Analysis of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins/Dibenzofurans and Their Precursors by Supersonic Jet/Resonance-Enhanced Multiphoton Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry*", Analytical Sciences, **21** (2005) 1395-1400

- [115] Gullett, B. K., Oudejans, L., Tabor, D., Touati, A., and Ryan, S., "*Near-Real-Time Combustion Monitoring for PCDD/PCDF Indicators by GC-REMPI-TOFMS*", *Environmental Science & Technology*, **46** (2011) 923-928
- [116] Fernandes-Whaley, M., Muhlberger, F., Whaley, A., Adam, T., Zimmermann, R., Rohwer, E., and Walte, A., "*On-line derivatization for resonance-enhanced multiphoton ionization time-of-flight mass spectrometry: Detection of aliphatic aldehydes and amines via reactive coupling of aromatic photo ionization labels*", *Analytical Chemistry*, **77** (2005) 1-10
- [117] Haeffliger, O. P., Zenobi, R., "*Laser mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons with wide wavelength range laser multiphoton ionization spectroscopy*", *Analytical Chemistry*, **70** (1998) 2660-2665
- [118] Srinivasan, J. R., Romano, L. J., and Levis, R. J., "*Velocity Distributions for A Laser-Vaporized, Anthracene-Labeled Nucleotide*", *Journal of Physical Chemistry*, **99** (1995) 13272-13279
- [119] Zhu, J., Lustig, D., Sofer, I., and Lubman, D. M., "*Selective laser-induced resonant two-photon ionization and fragmentation of substituted nitrobenzenes at atmospheric pressure*", *Analytical Chemistry*, **62** (1990) 2225-2232
- [120] Kolaitis, L., Lubman, D. M., "*Atmospheric pressure ionization mass spectrometry with laser-produced ions*", *Analytical Chemistry*, **58** (1986) 1993-2001
- [121] Lubman, D. M., Kronick, M. N., "*Plasma chromatography with laser-produced ions*", *Analytical Chemistry*, **54** (1982) 1546-1551
- [122] Schiewek, R., Monnikes, R., Wulf, V., Gäb, S., Brockmann, K. J., Benter, T., and Schmitz, O. J., "*A Universal Ionization Label for the APLI-(TOF)MS Analysis of Small Molecules and Polymers*", *Angewandte Chemie-International Edition*, **47** (2008) 9989-9992
- [123] Panda, S. K., Brockmann, K. J., Benter, T., and Schrader, W., "*Atmospheric pressure laser ionization (APLI) coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry applied to petroleum samples analysis: comparison with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization methods*", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **25** (2011) 2317-2326
- [124] Gaspar, A., Zellermann, E., Lababidi, S., Reece, J., and Schrader, W., "*Characterization of Saturates, Aromatics, Resins, and Asphaltenes Heavy Crude Oil Fractions by Atmospheric Pressure Laser Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*", *Energy & Fuels*, **26** (2012) 3481-3487
- [125] Schrader, W., Panda, S. K., Brockmann, K. J., and Benter, T., "*Characterization of non-polar aromatic hydrocarbons in crude oil using atmospheric pressure laser ionization and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (APLI FT-ICR MS)*", *Analyst*, **133** (2008) 867-869
- [126] Arthen-Engeland, T., Dunsbach, R., "*New generation of GC/high resolution TOF-MS: APCI/APLI source for increased flexibility*", *Lc Gc Europe*, 2008) 34-35
- [127] Schmitz, O. J., Universität Duisburg-Essen, *Persönliche Mitteilung*, (2014)

- [128] Poehler, T., Kunte, R., Hoenen, H., Jeschke, P., Wissdorf, W., Brockmann, K. J., and Benter, T., "*Numerical Simulation and Experimental Validation of the Three-Dimensional Flow Field and Relative Analyte Concentration Distribution in an Atmospheric Pressure Ion Source*", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **22** (2011) 2061-2069
- [129] Lorenz, M., Schiewek, R., Brockmann, K. J., Schmitz, O. J., Gäb, S., and Benter, T., "*The distribution of ion acceptance in atmospheric pressure ion sources: Spatially resolved APLI measurements*", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **19** (2008) 400-410
- [130] Gaspar, A., Zellermann, E., Lababidi, S., Reece, J., and Schrader, W., "*Impact of Different Ionization Methods on the Molecular Assignments of Asphaltenes by FT-ICR Mass Spectrometry*", *Analytical Chemistry*, **84** (2012) 5257-5267
- [131] Schiewek, R., "*Entwicklung einer Multi-Purpose Ionenquelle für die AP-MS sowie Design und Anwendung von APLI-Ionisationslabeln*", Dissertation, Universität Wuppertal, (2008)
- [132] Schmitt-Kopplin, P., Englmann, M., Rossello-Mora, R., Schiewek, R., Brockmann, K. J., Benter, T., and Schmitz, O. J., "*Combining chip-ESI with APLI (cESILI) as a multimode source for analysis of complex mixtures with ultrahigh-resolution mass spectrometry*", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391** (2008) 2803-2809
- [133] Annesley, T. M., "*Ion Suppression in Mass Spectrometry*", *Clinical Chemistry*, **49** (2003) 1041-1044
- [134] Sun, M., Liu, D. Q., and Kord, A. S., "*A Systematic Method Development Strategy for Determination of Pharmaceutical Genotoxic Impurities*", *Organic Process Research & Development*, **14** (2010) 977-985
- [135] Gritti, F., Guiochon, G., "*Performance of columns packed with the new shell Kinetex-C18 particles in gradient elution chromatography*", *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 1604-1615
- [136] Wei, G. L., Zeng, E. Y., "*Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantifying fatty acids*", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **30** (2011) 1429-1436
- [137] Wang, A., Tolley, H. D., and Lee, M. L., "*Gas chromatography using resistive heating technology*", *Journal of Chromatography A*, **1261** (2012) 46-57
- [138] Cordero, R., Paterson, S., "*Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS*", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **850** (2007) 423-431
- [139] "*Excimer Lase Technology for High Precision*"
<http://old.mjilinc.com/bbs/filebox/product/20080714135647.pdf> (am 25.03.2013 aufgerufen)
- [140] "*ATLEX-SI-Series*" http://www.laser2000.co.uk/ds/DS_00636.pdf (am 25.03.2013 aufgerufen)

- [141] Viktor, F. T. a. S., I, "*Pulsed lasers on plasmas produced by electron beams and discharges*", Quantum Electronics, **33** (2003) 117-128
- [142] Arteev and, M. S., "*Exciplex KrF laser pumped by an ion beam*", Soviet Journal of Quantum Electronics, **16** (1986) 1448-1455
- [143] Boichenko, A. M., Tarasenko, V. F., and Yakovlenko, S. I., "*Exciplex rare-halide lasers*", Laser Physics, **10** (2000) 1159-1187
- [144] Nuhu, A. A., Basheer, C., and Saad, B., "*Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: Recent applications in bioanalysis*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1180-1188
- [145] Toyooka, T., "*Modern derivatization methods for separation sciences*", Wiley, Chichester, (1999)
- [146] Hernandez-Cassou, S., Saurina, J., "*Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1270-1281
- [147] Bouchereau, A., Gullett, B. K., and Larher, F., "*Analysis of amines in plant materials*", Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, **747** (2000) 49-67
- [148] Spacil, Z., Eriksson, J., Jonasson, S., Rasmussen, U., Ilag, L. L., and Bergman, B., "*Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples*", Analyst, **135** (2010) 127-132
- [149] Foettinger, A., Leitner, A., and Lindner, W., "*Derivatisation of arginine residues with malondialdehyde for the analysis of peptides and protein digests by LC-ESI-MS/MS*", Journal of Mass Spectrometry, **41** (2006) 623-632
- [150] Sun, J., Chen, G. C., Zhao, X. N., Xu, W. H., Zhou, G. Y., Han, Y. J., and You, J. M., "*Determination of 30 free fatty acids in two famous Tibetan medicines by HPLC with fluorescence detection and mass spectrometric identification*", Chromatographia, **65** (2007) 469-476
- [151] Halket, J., Zaikin, V., "*Review: Derivatization in mass spectrometry 1. Silylation*", European Journal of Mass Spectrometry, **9** (2003) 1-21
- [152] Mandalakis, M., Apostolaki, M., and Stephanou, E. G., "*Trace analysis of free and combined amino acids in atmospheric aerosols by gas chromatography-mass spectrometry*", Journal of Chromatography A, **1217** (2010) 143-150
- [153] Zaikin, V., Halket, J., "*Review: Derivatization in mass spectrometry 2. Acylation*", European Journal of Mass Spectrometry, **9** (2003) 421-434
- [154] Halket, J. M., Zaikin, V. G., "*Review: Derivatization in mass spectrometry 3. Alkylation (arylation)*", European Journal of Mass Spectrometry, **10** (2004) 1-19

- [155] Kataoka, H., "*Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis*", *Journal of Chromatography A*, **733** (1996) 19-34
- [156] Schwarz, A., Modun, D., Heusser, K., Tank, J., Gutzki, F. M., Mitschke, A., Jordan, J., and Tsikas, D., "*Stable-isotope dilution GC-MS approach for nitrite quantification in human whole blood, erythrocytes, and plasma using pentafluorobenzyl bromide derivatization: Nitrite distribution in human blood*", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **879** (2011) 1485-1495
- [157] Molnar-Perl, I., "*Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and amino acids in food*", *Journal of Chromatography A*, **891** (2000) 1-32
- [158] Bernal, J. L., Nozal, M. J., Toribio, L., Diego, J. C., and Ruiz, A., "*A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey*", *Journal of Separation Science*, **28** (2005) 1039-1047
- [159] Cooper, M. J., Anders, M. W., "*Determination of Long-Chain Fatty-Acids As 2-Naphthacyl Esters by High-Pressure Liquid-Chromatography and Mass-Spectrometry*", *Analytical Chemistry*, **46** (1974) 1849-1852
- [160] Li, Y. L., Zhao, X., Ding, C. X., Wang, H. L., Suo, Y. R., Chen, G. C., and You, J. M., "*HPLC-APCI-MS determination of free fatty acids in Tibet folk medicine *Lomatogonium rotatum* with fluorescence detection and mass spectrometric identification*", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **29** (2006) 2741-2751
- [161] Micó-Tormos, A., Simó-Alfonso, E. F., and Ramis-Ramos, G., "*Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatization with phthalic anhydride followed by liquid chromatography with UV-vis detection*", *Journal of Chromatography A*, **1203** (2008) 47-53
- [162] Kelly, M. T., Blaise, A., and Larroque, M., "*Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey*", *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 7385-7392
- [163] You, J. M., Zhao, X. N., Suo, Y. R., Li, Y. L., Wang, H. L., and Chen, G. C., "*Determination of long-chain fatty acids in bryophyte plants extracts by HPLC with fluorescence detection and identification with MS*", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **848** (2007) 283-291
- [164] Song, C. H., Sun, Z. W., Xia, L., Suo, Y. R., and You, J. M., "*Hplc-Fluorimetric Method for Analysis of Free Fatty Acids in *Stellera Chamaejasma* l'*", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **33** (2010) 859-874
- [165] Zonta, F., Stancher, B., Bogoni, P., and Masotti, P., "*High-Performance Liquid-Chromatography of Okadaic Acid and Free Fatty-Acids in Mussels*", *Journal of Chromatography*, **594** (1992) 137-144

- [166] Kang, X. J., Xiao, J., Huang, X., and Gu, Z. Z., "*Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples*", *Clinica Chimica Acta*, **366** (2006) 352-356
- [167] De Antonis, K. M., Brown, P. R., and Cohen, S. A., "*High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Synthetic Peptides Using Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate*", *Analytical Biochemistry*, **223** (1994) 191-197
- [168] Roh, Y. M., Streicher, R. P., and Ernst, M. K., "*Development of a new approach for total isocyanate determination using the reagent 9-anthracenylmethyl 1-piperazinecarboxylate*", *Analyst*, **125** (2000) 1691-1696
- [169] Tremblay, P., Lesage, J., Ostiguy, C., and Van Tra, H., "*Investigation of the competitive rate of derivatization of several secondary amines with phenylisocyanate (PHI), hexamethylene-1,6-diisocyanate (HDI), 4,4'-methylenebis(phenyl isocyanate) (MDI) and toluene diisocyanate (TDI) in liquid medium*", *Analyst*, **128** (2003) 142-149
- [170] Mehta, A., Oeser, A. M., and Carlson, M. G., "*Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography*", *Journal of Chromatography B*, **719** (1998) 9-23
- [171] Miwa, H., Yamamoto, M., "*Liquid-Chromatographic Determination of Free and Total Fatty-Acids in Milk and Milk-Products As Their 2-Nitrophenylhydrazides*", *Journal of Chromatography*, **523** (1990) 235-246
- [172] Wang, P. G., Giese, R. W., "*Phosphate-Specific Fluorescence Labeling Under Aqueous Conditions*", *Analytical Chemistry*, **65** (1993) 3518-3520
- [173] Ikeda, M., Shimada, K., and Sakaguchi, T., "*High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Free Fatty-Acids with 1-Naphthylamine*", *Journal of Chromatography*, **272** (1983) 251-259
- [174] Saito, M., Ushijima, T., Sasamoto, K., Ohkura, Y., and Ueno, K., "*2-(5-hydrazinocarbonyl-2-oxazolyl)-5,6-dimethoxybenzothiazole as a precolumn fluorescence derivatization reagent for carboxylic acids in high-performance liquid chromatography and its application to the assay of fatty acids in human serum*", *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, **674** (1995) 167-175
- [175] Yamaguchi, M., Hara, S., Matsunaga, R., Nakamura, M., and Ohkura, Y., "*3-Bromomethyl-6,7-Dimethoxy-1-Methyl-2(1H)-Quinoxalinone As A New Fluorescence Derivatization Reagent for Carboxylic-Acids in High-Performance Liquid-Chromatography*", *Journal of Chromatography*, **346** (1985) 227-236
- [176] Miwa, H., "*High-performance liquid chromatographic determination of free fatty acids and esterified fatty acids in biological materials as their 2-nitrophenylhydrazides*", *Analytica Chimica Acta*, **465** (2002) 237-255
- [177] Miwa, H., "*High-performance liquid chromatographic determination of mono-, poly- and hydroxycarboxylic acids in foods and beverages as their 2-nitrophenylhydrazides*", *Journal of Chromatography A*, **881** (2000) 365-385

- [178] Kusmierek, K., Chwatko, G., Glowacki, R., Kubalczyk, P., and Bald, E., "Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **879** (2011) 1290-1307
- [179] Black, R. M., Muir, B., "Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products", *Journal of Chromatography A*, **1000** (2003) 253-281
- [180] Hsieh, T. J., Chen, S., "A fluorescent electrophilic reagent, 9-fluorenone-4-carbonyl chloride (FCC), for the enantioresolution of amino acids on a teicoplanin phase under the elution of the methanol-based solvent mixture", *Amino Acids*, **33** (2007) 97-104
- [181] Hölzle, D., Schlöbe, D., Tricker, A. R., and Richter, E., "Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung", *Toxicology*, **232** (2007) 277-285
- [182] Singh, G., Gutierrez, A., Xu, K., and Blair, I. A., "Liquid Chromatography/Electron Capture Atmospheric Pressure Chemical Ionization/Mass Spectrometry: Analysis of Pentafluorobenzyl Derivatives of Biomolecules and Drugs in the Attomole Range", *Analytical Chemistry*, **72** (2000) 3007-3013
- [183] Xu, L. X., Bian, N. Y., Wang, Z. X., Abdelbaky, S., Pillai, S., Magiera, D., Murugaiah, V., Giese, R. W., Wang, P., O'Keeffe, T., Abushamaa, H., Kutney, L., Church, G., Carson, S., Smith, D., Park, M., Wronka, J., and Laukien, F., "Electrophore mass tag dideoxy DNA sequencing", *Analytical Chemistry*, **69** (1997) 3595-3602
- [184] Hoelzle, D., Schlobe, D., Tricker, A. R., and Richter, E., "Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung", *Toxicology*, **232** (2007) 277-285
- [185] Iwasaki, Y., Nakano, Y., Mochizuki, K., Nomoto, M., Takahashi, Y., Ito, R., Saito, K., and Nakazawa, H., "A new strategy for ionization enhancement by derivatization for mass spectrometry", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **879** (2011) 1159-1165
- [186] Shimbo, K., Oonuki, T., Yahashi, A., Hirayama, K., and Miyano, H., "Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **23** (2009) 1483-1492
- [187] Kretschmer, A., Giera, M., Wijtmans, M., de Vries, L., Lingeman, H., Irth, H., and Niessen, W. M. A., "Derivatization of carboxylic acids with 4-APEBA for detection by positive-ion LC-ESI-MS(/MS) applied for the analysis of prostanoids and NSAID in urine", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **879** (2011) 1393-1401
- [188] DeBarber, A. E., Sandler, Y., Pappu, A. S., Merkens, L. S., Duell, P. B., Lear, S. R., Erickson, S. K., and Steiner, R. D., "Profiling sterols in cerebrotendinous xanthomatosis: Utility of Girard derivatization and high resolution exact mass LC-

- ESI-MSn analysis*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1384-1392
- [189] Johnson, D. W., "*Free amino acid quantification by LC-MS/MS using derivatization generated isotope-labelled standards*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1345-1352
- [190] Ullmer, R., Plematl, A., and Rizzi, A., "*Derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate for enhancing the ionization yield of small peptides and glycopeptides in matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry*", Rapid Communications in Mass Spectrometry, **20** (2006) 1469-1479
- [191] Wang, H. Y., Chu, X., Zhao, Z. X., He, X. S., and Guo, Y. L., "*Analysis of low molecular weight compounds by MALDI-FTICR-MS*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1166-1179
- [192] Nishikaze, T., Nakamura, T., Jinmei, H., and Amano, J., "*Negative-ion MALDI-MS2 for discrimination of alpha 2,3-and alpha 2,6-sialylation on glycopeptides labeled with a pyrene derivative*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1419-1428
- [193] Mathieu, B. T. T., Catala, C., Colas, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Mann, A., and Wagner, A., "*Trimethoxyarene as a Highly Ionizable Tag for Reaction Analysis by Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry (APPI/MS): Exploration of Heterocyclic Synthesis*", European Journal of Organic Chemistry, 2012) 85-92
- [194] Igor G.Zenkevich, "*Amines, Amino Acids, Amides and Imides: Derivatization for GC Analysis*", Encyclopedia of Chromatography, Third Edition, Taylor & Francis, Boca Raton, (2010) 50-56
- [195] Ruiz-Matute, A. I., Hernandez-Hernandez, O., Rodriguez-Sanchez, S., Sanz, M. L., and Martinez-Castro, I., "*Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1226-1240
- [196] Joppich, M., Joppich-Kuhn, R., Sentissi, A., and Giese, R. W., "*Single-step, quantitative derivatization of amino, carboxyl, and hydroxyl groups in iodothyronine amino acids with ethanolic pivalic anhydride containing 4-dimethylaminopyridine*", Analytical Biochemistry, **153** (1986) 159-165
- [197] Zaikin, V., Halket, J., "*Review: Derivatization in mass spectrometry 6. Formation of mixed derivatives of polyfunctional compounds*", European Journal of Mass Spectrometry, **11** (2005) 611-636
- [198] Cohen, S. A., Michaud, D. P., "*Synthesis of A Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino-Acids Via High-Performance Liquid-Chromatography*", Analytical Biochemistry, **211** (1993) 279-287

- [199] de Castro, M. D. L., Priego-Capote, F., and Peralbo-Molina, A., "*The role of ultrasound in analytical derivatizations*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1189-1195
- [200] Llompart, M. P., Lorenzo, R. A., Cela, R., Pare, J. R. J., Belanger, J. M. R., and Li, K., "*Phenol and methylphenol isomers determination in soils by in-situ microwave-assisted extraction and derivatisation*", Journal of Chromatography A, **757** (1997) 153-164
- [201] Galesio, M., Rial-Otero, R., Simal-Gandara, J., de la Torre, X., Botre, F., and Capelo-Martinez, J. L., "*Improved ultrasonic-based sample treatment for the screening of anabolic steroids by gas chromatography/mass spectrometry*", Rapid Communications in Mass Spectrometry, **24** (2010) 2375-2385
- [202] Galesio, M., Mazzarino, M., de la Torre, X., Botre, F., and Capelo, J. L., "*Accelerated sample treatment for screening of banned doping substances by GC-MS: ultrasonication versus microwave energy*", Analytical and Bioanalytical Chemistry, **399** (2011) 861-875
- [203] Allam, K., Abdelbaky, S., and Giese, R. W., "*Derivatization in Trace Organic-Analysis - Selection of An Inert Solvent*", Analytical Chemistry, **64** (1992) 238-239
- [204] Abdelbaky, S., Allam, K., and Giese, R. W., "*Derivatization in Trace Organic-Analysis - Use of An All-Glass Conical Reaction Vial*", Analytical Chemistry, **64** (1992) 2882-2884
- [205] Hallmann, C., van Aarssen, B. G. K., and Grice, K., "*Relative efficiency of free fatty acid butyl esterification choice of catalyst and derivatisation procedure*", Journal of Chromatography A, **1198** (2008) 14-20
- [206] Danielson, Neil D., Gallagher, Patricia A., and Bao, James J., "Encyclopedia of Analytical Chemistry", (**2006**),
- [207] Lian, X., Zhiwei, S., Yourui, S., and Jinmao, Y., "*4-(1-METHYL-1H-PHENANTHRO[9,10-d]IMIDAZOLE-2-) BENZOIC ACID (MPIBA) AND ITS APPLICATION FOR DETERMINATION OF AMINES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION AND IDENTIFICATION WITH MASS SPECTROSCOPY/ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION*", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **33** (2009) 72-88
- [208] Todoroki, K., Yoshida, H., Hayama, T., Itoyama, M., Nohta, H., and Yamaguchi, M., "*Highly sensitive and selective derivatization-LC method for biomolecules based on fluorescence interactions and fluoruous separations*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **879** (2011) 1325-1337
- [209] Wang, W. Q., Ackermann, D., Mehlich, A. M., and Konig, S., "*False labelling due to quenching failure of N-hydroxy-succinimide-ester-coupled dyes*", Proteomics, **10** (2010) 1525-1529
- [210] Kouremenos, K. A., Harynyuk, J. J., Winniford, W. L., Morrison, P. D., and Marriott, P. J., "*One-pot microwave derivatization of target compounds relevant to*

- metabolomics with comprehensive two-dimensional gas chromatography*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **878** (2010) 1761-1770
- [211] Schmitz, O. J., Wörth, C. C. T., Stach, D., and Wießler, M., "Kapillarelektrophoretische Analyse von DNA-Addukten als Biomarker der Kanzerogenese", *Angewandte Chemie*, **114** (2002) 461-464
- [212] Kataoka, H., Shindoh, S., and Makita, M., "Determination of Secondary-Amines in Various Foods by Gas-Chromatography with Flame Photometric Detection", *Journal of Chromatography A*, **695** (1995) 142-148
- [213] Ina Ebersbach, "Use of an ionization label for DNA adduct analysis by APLI-(TOF)MS"; (2010)
- [214] Ekern, S. P., Marshall, A. G., Szczepanski, J., and Vala, M., "Photodissociation of Gas-Phase Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Cations", *The Journal of Physical Chemistry A*, **102** (1998) 3498-3504
- [215] Kim, H. S., Wagner, D. R., and Saykally, R. J., "Single Photon Infrared Emission Spectroscopy of the Gas Phase Pyrene Cation: Support for a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Origin of the Unidentified Infrared Emission Bands", *Physical Review Letters*, **86** (2001) 5691-5694
- [216] Brechignac, P., Pino, T., "Electronic spectra of cold gas phase PAH cations: Towards the identification of the Diffuse Interstellar Bands carriers", *Astronomy & Astrophysics*, **343** (1999) L49-L52
- [217] Maskos, Z., Dellinger, B., "Radicals from the Oxidative Pyrolysis of Tobacco", *Energy & Fuels*, **22** (2008) 1675-1679
- [218] Hartung, J., Gottwald, T., and +ápehar, K., "Selectivity in the Chemistry of Oxygen-Centered Radicals - The Formation of Carbon-Oxygen Bonds", *Synthesis*, **2002** (2002) 1469-1498
- [219] Brückner, R., "Reaktionsmechanismen", 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, (2004)
- [220] Guo, X., Sievers, H. L., and Grützmacher, H. F., "Hydrogen atom elimination from polycyclic aromatic hydrocarbons with sustained off-resonance irradiation: a new approach to produce carbon/hydrogen cluster cations $C_nH_x^+$ ", *International Journal of Mass Spectrometry*, **185-187** (1999) 1-10
- [221] Arjunan, P., Shymasundar, N., Berlin, K. D., Najjar, D., and Rockley, M. G., "Syntheses of selected .epsilon.-(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", *The Journal of Organic Chemistry*, **46** (1981) 626-629
- [222] Daub, G. H., Doyle, W. C., "The Monocyanoethylation of Anthrone - An Improved Synthesis of Beta-(9-Anthranyl)-Propionic Acid and Beta-(9,10-Dihydro-9-Anthranyl)-Propionic Acid", *Journal of the American Chemical Society*, **74** (1952) 4449-4450

- [223] Hrdlovic, P., Danko, M., and Chmela, S., "*Preparation, spectral characteristics and photolytic stability of anthracene-hindered amine probes: influence of the medium*", Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry, **149** (2002) 207-216
- [224] Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., and Nudelman, A., "*NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities*", The Journal of Organic Chemistry, **62** (1997) 7512-7515
- [225] Gorobets, E., McDonald, R., and Keay, B. A., "*Diastereospecific Intramolecular Ullmann Couplings: Unique Chiral Auxiliary for the Preparation of 3,3'-Disubstituted MeO-BIPHEP Derivatives*", Organic Letters, **8** (2006) 1483-1485
- [226] McSkimming, G., Tucker, J. H. R., Bouas-Laurent, H., Desvergne, J. P., Coles, S. J., Hursthouse, M. B., and Light, M. E., "*Photoinduced Formation of a Cryptand from a Coronand: An Unexpected Switch in Cation Binding Affinity*", Chemistry - A European Journal, **8** (2002) 3331-3342
- [227] Ihara, T., Fujii, T., Mukae, M., Kitamura, Y., and Jyo, A., "*Photochemical ligation of DNA conjugates through anthracene cyclodimer formation and its fidelity to the template sequences*", Journal of the American Chemical Society, **126** (2004) 8880-8881
- [228] Shimbo, K., Yahashi, A., Hirayama, K., Nakazawa, M., and Miyano, H., "*Multifunctional and Highly Sensitive Precolumn Reagents for Amino Acids in Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*", Analytical Chemistry, **81** (2009) 5172-5179
- [229] Andrews, S. P., Ladlow, M., "*Convenient preparation and use of a new analytical construct for the analysis and development of solid-phase chemistries*", Journal of Organic Chemistry, **68** (2003) 5525-5533
- [230] Horiguchi, M., Ito, Y., "*Solvent-dependent effect by carbon dioxide on the photoreactions of (9-anthryl)alkylamines*", Tetrahedron, **63** (2007) 12286-12293
- [231] Ito, Y., Olovsson, G., "*Use of linker for preparation of missing solid-state photoproducts: Head-to-head photodimerization of anthracene-9-propionic acid in its crystalline double salt with cyclohexane-1,2-diamine*", Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 1997) 127-133
- [232] Bouas-Laurent, H., Castellan, A., Desvergne, J. P., and Lapouyade, R., "*Photodimerization of anthracenes in fluid solution: structural aspects*", Chemical Society Reviews, **29** (2000) 43-55
- [233] Cassani, G., Tibaldi, F., Donato, G., and Andriollo, N., "*Determination of Alcohol Ethoxylates derivatized with Naphthoyl Chloride, in Waste Water Treatment Plant Influent, Effluent and Sludge Samples by Liquid Chromatography Mass Spectrometry*", Journal of Surfactants and Detergents, **14** (2011) 139-150
- [234] Micó-Tormos, A., Bianchi, F., Simó-Alfonso, E. F., and Ramis-Ramos, G., "*Determination of fatty alcohol ethoxylates with diphenic anhydride derivatization and liquid chromatography with spectrophotometric detection: A comparative study with other anhydrides*", Journal of Chromatography A, **1216** (2009) 3023-3030

- [235] Merli, D., Speltini, A., Ravelli, D., Quartarone, E., Costa, L., and Profumo, A., "Multi-walled carbon nanotubes as the gas chromatographic stationary phase: Role of their functionalization in the analysis of aliphatic alcohols and esters", *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 7275-7281
- [236] Andersson, R., Boutonnet, M., and Järås, S., "On-line gas chromatographic analysis of higher alcohol synthesis products from syngas", *Journal of Chromatography A*, **1247** (2012) 134-145
- [237] Orozco-Solano, M., Ruiz-Jiménez, J., and Luque de Castro, M. D., "Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 1227-1235
- [238] Deng, C., Ji, J., Zhang, L., and Zhang, X., "Diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by rapid determination of 17 α -hydroxyprogesterone in dried blood spots by gas chromatography/mass spectrometry following microwave-assisted silylation", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19** (2005) 2974-2978
- [239] Szczepaniak, L., Isidorov, V. A., "Gas chromatographic retention indices of trimethylsilyl derivatives of terpene alcohols", *Journal of Chromatography A*, **1218** (2011) 7061-7064
- [240] Hölzle, D., Schmeiser, H. H., Tricker, A. R., and Richter, E., "Mass spectrometric analysis of 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-releasing DNA adducts in human lung", *Toxicology*, **232** (2007) 277-285
- [241] Peterson, L. A., "Molecular Mechanisms of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-Induced Lung Carcinogenesis", *Advances in Molecular Toxicology*, Volume 3, Elsevier, Delaware, (2009) 117-160
- [242] Hecht, S. S., "DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **424** (1999) 127-142
- [243] Arakaki, A., Ishii, Y., Tokuhisa, T., Murata, S., Sato, K., Sonoi, T., Tatsu, H., and Matsunaga, T., "Microbial biodegradation of a novel fluorotelomer alcohol, 1H,1H,2H,2H,8H,8H-perfluorododecanol, yields short fluorinated acids", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **88** (2010) 1193-1203
- [244] Szostek, B., Prickett, K. B., "Determination of 8 : 2 fluorotelomer alcohol in animal plasma and tissues by gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **813** (2004) 313-321
- [245] Fiedler, S., Pfister, G., and Schramm, K. W., "Partitioning of fluorotelomer alcohols (FTOH) to semipermeable membrane devices (SPMD)", *Environmental Science and Pollution Research*, **17** (2010) 420-428
- [246] Stock, N. L., Ellis, D. A., Deleebeeck, L., Muir, D. C. G., and Mabury, S. A., "Vapor pressures of the fluorinated telomer alcohols - Limitations of estimation methods", *Environmental Science & Technology*, **38** (2004) 1693-1699

- [247] Nilsson, H., Karrman, A., Rotander, A., Van Bavel, B., Lindstrom, G., and Westberg, H., "*Inhalation Exposure to Fluorotelomer Alcohols Yield Perfluorocarboxylates in Human Blood?*", *Environmental Science & Technology*, **44** (2010) 7717-7722
- [248] Dasu, K., Royer, L. A., Liu, J. X., and Lee, L. S., "*Hydrolysis of fluorotelomer compounds leading to fluorotelomer alcohol production during solvent extractions of soils*", *Chemosphere*, **81** (2010) 911-917
- [249] Ellington, J. J., Washington, J. W., Evans, J. J., Jenkins, T. M., Hafner, S. C., and Neill, M. P., "*Analysis of fluorotelomer alcohols in soils: Optimization of extraction and chromatography*", *Journal of Chromatography A*, **1216** (2009) 5347-5354
- [250] Lin, J. T., Liu, S. C., Shen, Y. C., and Yang, D. J., "*Comparison of Various Preparation Methods for Determination of Organic Acids in Fruit Vinegars with a Simple Ion-Exclusion Liquid Chromatography*", *Food Analytical Methods*, **4** (2011) 531-539
- [251] Shui, G., Leong, L. P., "*Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography*", *Journal of Chromatography A*, **977** (2002) 89-96
- [252] Phillips, M., Case, R., Rimmer, C., Sander, L., Sharpless, K., Wise, S., and Yen, J., "*Determination of organic acids in Vaccinium; berry standard reference materials*", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398** (2010) 425-434
- [253] St'avova, J., Beranek, J., Nelson, E. P., Diep, B. A., and Kubatova, A., "*Limits of detection for the determination of mono- and dicarboxylic acids using gas and liquid chromatographic methods coupled with mass spectrometry*", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **879** (2011) 1429-1438
- [254] Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., and Gallego, M., "*Determination of carboxylic acids in water by gas chromatography using several detectors after flow preconcentration*", *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 7440-7447
- [255] Mato, I., Suárez-Luque, S., and Huidobro, J. F., "*A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines*", *Food Research International*, **38** (2005) 1175-1188
- [256] Sun, S. H., Xie, J. P., Xie, F. W., and Zong, Y. L., "*Determination of volatile organic acids in oriental tobacco by needle-based derivatization headspace liquid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry*", *Journal of Chromatography A*, **1179** (2008) 89-95
- [257] Pastorova, I., vanderBerg, K. J., Boon, J. J., and Verhoeven, J. W., "*Analysis of oxidised diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMAH*", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **43** (1997) 41-57
- [258] Dahl, S. R., Olsen, K. M., and Strand, D. H., "*Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by*

- UPLC-MSMS*", Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **885** (2012) 37-42
- [259] Göthlich, A., Koltzenburg, S., Schornick, G., "*Funktionale Polymere im Alltag*", Chemie in unserer Zeit, **39** (2005) 262-273
- [260] o.V. "*Methacrylsäure*"; The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, MAK, 41. Lieferung, 2006
- [261] o.V. "*Acrylsäure*"; The MAK-Collection for Occupational Health and Safety, MAK, 40. Lieferung, 2006
- [262] Vairavamurthy, A., Andreae, M. O., and Brooks, J. M., "*Determination of acrylic acid in aqueous samples by electron capture gas chromatography after extraction with tri-n-octylphosphine oxide and derivatization with pentafluorobenzyl bromide*", Analytical Chemistry, **58** (1986) 2684-2687
- [263] Casella, I. G., Pierri, M., and Contursi, M., "*Determination of acrylamide and acrylic acid by isocratic liquid chromatography with pulsed electrochemical detection*", Journal of Chromatography A, **1107** (2006) 198-203
- [264] Qureshi, M., Bhongale, S. S., and Thorave, A. K., "*Determination of organic acid impurities in lactic acid obtained by fermentation of sugarcane juice*", Journal of Chromatography A, **1218** (2011) 7147-7157
- [265] Konakovsky, V., Focke, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Schmid, R., Scheiner, O., Moser, P., Jarisch, R., and Hemmer, W., "*Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines*", Food Additives & Contaminants: Part A, **28** (2011) 408-416
- [266] Hurst, W. J., "*A Review of HPLC Methods for the Determination of Selected Biogenic Amines in Foods*", Journal of Liquid Chromatography, **13** (1990) 1-23
- [267] Hernandez-Orte, P., Ibarz, M. J., Cacho, J., and Ferreira, V., "*Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method*", Chromatographia, **58** (2003) 29-35
- [268] Zhou, Q., Zhang, X., and Xiao, J., "*Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase micro-extraction: A novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples*", Journal of Chromatography A, **1216** (2009) 4361-4365
- [269] Marand, A., Karlsson, D., Dalene, M., and Skarping, G., "*Determination of amines as pentafluoropropionic acid anhydride derivatives in biological samples using liquid chromatography and tandem mass spectrometry*", Analyst, **129** (2004) 522-528
- [270] Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., and Kumudavally, K. V., "*A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products*", Food Chemistry, **75** (2001) 255-259

- [271] Busto, O., Miracle, M., Guasch, J., and Borrull, F., "*Solid phase extraction of biogenic amines from wine before chromatographic analysis of their AQC derivatives*", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **20** (1997) 743-755
- [272] Llop, A., Pocurull, E., and Borrull, F., "*Automated determination of aliphatic primary amines in wastewater by simultaneous derivatization and headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry*", *Journal of Chromatography A*, **1217** (2010) 575-581
- [273] Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., and Gallego, M., "*Evaluation of stationary phases and gas chromatographic detectors for determination of amines in water*", *Journal of Separation Science*, **33** (2010) 3365-3373
- [274] Rando, R. J., Poovey, H. G., and Gibson, R. A., "*Evaluation of 9-Methylamino-Methylanthracene As A Chemical Label for Total Reactive Isocyanate Group - Application to Isocyanate Oligomers, Polyurethane Precursors, and Phosgene*", *Journal of Liquid Chromatography*, **18** (1995) 2743-2763
- [275] Nimura, N., Iwaki, K., Kinoshita, T., Takeda, K., and Ogura, H., "*Activated Carbamate Reagent As Derivatizing Agent for Amino-Compounds in High-Performance Liquid-Chromatography*", *Analytical Chemistry*, **58** (1986) 2372-2375
- [276] Lozanov, V., Benkova, B., Mateva, L., Petrov, S., Popov, E., Slavov, C., and Mitev, V., "*Liquid chromatography method for simultaneous analysis of amino acids and biogenic amines in biological fluids with simultaneous gradient of pH and acetonitrile*", *Journal of Chromatography B*, **860** (2007) 92-97
- [277] Fujita, K., Nagatsu, T., Maruta, K., Ito, M., Senba, H., and Miki, K., "*Urinary Putrescine, Spermidine, and Spermine in Human Blood and Solid Cancers and in an Experimental Gastric Tumor of Rats*", *Cancer Research*, **36** (1976) 1320-1324
- [278] Mao, H. m., Chen, B. g., Qian, X. m., and Liu, Z., "*Simultaneous determination of twelve biogenic amines in serum by high performance liquid chromatography*", *Microchemical Journal*, **91** (2009) 176-180
- [279] Liu, R., Jia, Y., Cheng, W., Ling, J., Liu, L., Bi, K., and Li, Q., "*Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry*", *Talanta*, **83** (2011) 751-756
- [280] Gosetti, F., Mazzucco, E., Gennaro, M., and Marengo, E., "*Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS*", *Anal Bioanal Chem*, 2012) 1-10
- [281] Elbashir, A. A., Krieger, S., and Schmitz, O. J., "*Simultaneous determination of polyamines and acetylpolyamines in human urine by capillary electrophoresis with fluorescence detection*", *Electrophoresis*, **00** (2013) 1-7
- [282] Wirtz, M., Stach, D., Kliem, H. C., Wiessler, M., and Schmitz, O. J., "*Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection*", *Electrophoresis*, **25** (2004) 839-845

- [283] Klink, D., "Untersuchung zum Einfluss von Kanzerogenen auf den genomweiten Methylierungsgrad von Caco-2 Zellen und der Einsatz eines Fluoreszenzmarkers zur Analyse des Methylierungsgrades mittels CE-LIF", Diplomarbeit, Universität Wuppertal, (2009)
- [284] Wirtz, M., "Kapillarelektrophoretische Bestimmung von DNA-Addukten als Biomarker der chemischen Kanzerogenese", Dissertation, Universität Wuppertal, (2006)
- [285] Schiewek, R., "Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades in Ratten nach Behandlung mit 3-Nitrobenzanthon und Weiterentwicklung der kapillarelektrophoretischen Methode", Diplomarbeit, Universität Wuppertal, (2005)
- [286] Welch, M., Chastang, J., and Yarus, M., "An Inhibitor of Ribosomal Peptidyl Transferase Using Transition-State Analogy", *Biochemistry*, **34** (1995) 385-390
- [287] Manuilov, A. V., Hixson, S. S., and Zimmermann, R. A., "New photoreactive tRNA derivatives for probing the peptidyl transferase center of the ribosome", *Rna - A Publication of the Rna Society*, **13** (2007) 793-800
- [288] Huang, F. Q., He, J., Zhang, Y. L., and Guo, Y. L., "Synthesis of biotin-AMP conjugate for 5' biotin labeling of RNA through one-step in vitro transcription", *Nature Protocols*, **3** (2008) 1848-1861
- [289] Chou, T. F., Baraniak, J., Kaczmarek, R., Zhou, X., Cheng, J. L., Ghosh, B., and Wagner, C. R., "Phosphoramidate pronucleotides: A comparison of the phosphoramidase substrate specificity of human and *Escherichia coli* histidine triad nucleotide binding proteins", *Molecular Pharmaceutics*, **4** (2007) 208-217
- [290] Yang, S. Q., Froeyen, M., Lescrinier, E., Marliere, P., and Herdewijn, P., "3-Phosphono-L-alanine as pyrophosphate mimic for DNA synthesis using HIV-1 reverse transcriptase", *Organic & Biomolecular Chemistry*, **9** (2011) 111-119
- [291] Ivanovskaya, M. G., Gottikh, M. B., and Shabarova, Z. A., "Modification of Oligo (Poly) Nucleotide Phosphomonoester Groups in Aqueous-Solutions", *Nucleosides & Nucleotides*, **6** (1987) 913-934
- [292] Huang, F. Q., Wang, G. C., Coleman, T., and Li, N., "Synthesis of adenosine derivatives as transcription initiators and preparation of 5' fluorescein- and biotin-labeled RNA through one-step in vitro transcription", *Rna-A Publication of the Rna Society*, **9** (2003) 1562-1570
- [293] Huang, F. A. Q. I., Wang, G. U. O. C., Coleman, T. R. I. C., and Li, N. A., "Synthesis of adenosine derivatives as transcription initiators and preparation of 5' fluorescein- and biotin-labeled RNA through one-step in vitro transcription", *RNA*, **9** (2003) 1562-1570
- [294] Kapustin, G. V., Fejer, G., Gronlund, J. L., McCafferty, D. G., Seto, E., and Etkorn, F. A., "Phosphorus-based SAHA analogues as histone deacetylase inhibitors", *Organic Letters*, **5** (2003) 3053-3056
- [295] Lan, Z. H., Qian, X. H., and Giese, R. W., "Preparation of an IMI dye (imidazole functional group) containing a 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole

- fluorophore for labeling of phosphomonoesters*", Journal of Chromatography A, **831** (1999) 325-330
- [296] Moffatt, J. G., "Nucleoside Polyphosphates. X. the Synthesis and Some Reactions of Nucleoside-5' Phosphoromorpholidates and Related-Compounds - Improved Methods for the Preparation of Nucleoside-5' Polyphosphates", Current Contents/Physical Chemical & Earth Sciences, 1984) 14-14
- [297] Abraham, T. W., Kalman, T. I., McIntee, E. J., and Wagner, C. R., "Synthesis and biological activity of aromatic amino acid phosphoramidates of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 1-beta-arabinofuranosylcytosine: Evidence of phosphoramidase activity", Journal of medicinal chemistry, **39** (1996) 4569-4575
- [298] Ruiz, J. C., Beadle, J. R., Aldern, K. A., Keith, K. A., Hartline, C. B., Kern, E. R., and Hostetler, K. Y., "Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl-phosphate conjugates of cidofovir and adefovir", Antiviral Research, **75** (2007) 87-90
- [299] Zhernosek, E. V., Kvach, S. V., Eroshevskaya, L. A., Kalinichenko, E. N., and Zinchenko, A. I., "Synthesis of conjugates of 2',3'-dideoxynucleoside-5' -monophosphates with alpha-amino acids", Chemistry of Natural Compounds, **42** (2006) 208-211
- [300] Juodka, B., Sasnauskiene, S., and Petniunaite, R., "Oligonucleotides and Nucleotide-Peptides 54. the Synthesis and Hydrolytic Properties of Adenylyl-(5'->N₃)-Lysylpeptides - Model Compounds of the Amp-Rna Ligase Covalent Complex", Nucleosides & Nucleotides, **11** (1992) 1445-1453
- [301] Giraut, A., Dyubankova, N., Song, X. P., and Herdewijn, P., "Phosphodiester Substrates for Incorporation of Nucleotides in DNA Using HIV-1 Reverse Transcriptase", Chembiochem, **10** (2009) 2246-2252
- [302] Terrazas, M., Marliere, P., and Herdewijn, P., "Enzymatically catalyzed DNA synthesis using L-Asp-dGMP, L-Asp-dCMP, and L-Asp-dTMP", Chemistry & Biodiversity, **5** (2008) 31-39
- [303] Adelfinskaya, O., Herdewijn, P., "Amino acid phosphoramidate nucleotides as alternative substrates for HIV-1 reverse transcriptase", Angewandte Chemie-International Edition, **46** (2007) 4356-4358
- [304] Trigalo, F., Charon, D., and Szabo, L., "Chemistry of Bacterial-Endotoxins .4. Synthesis of Anomeric 2-Deoxy-2-[(3R)-3-Hydroxytetradecanamido]-D-Glucopyranosyl Phosphate and Pyrophosphate Derivatives Related to Lipid-A", Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 1988) 2243-2249
- [305] Maiti, M., Michielssens, S., Dyubankova, N., Maiti, M., Lescrinier, E., Ceulemans, A., and Herdewijn, P., "Influence of the Nucleobase and Anchimeric Assistance of the Carboxyl Acid Groups in the Hydrolysis of Amino Acid Nucleoside Phosphoramidates", Chemistry - A European Journal, **18** (2012) 857-868
- [306] Cramer, F., Neunhoeffler, H., "Zur Chemie der Energiereichen Phosphate .15. Reaktionen Von Adenosin-5'-Phosphorsäure-Imidazolid-Eine Neue Synthese Von Adenosindiphosphat und Flavin-Adenin-Dinucleotid", Chemische Berichte-Recueil, **95** (1962) 1664-1669

- [307] Feld, B. K., Weiss, G. A., "Convenient methods for the synthesis of P-1-farnesyl-P-2-indicator diphosphates", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16** (2006) 1665-1667
- [308] Ryu, Y. H., Scott, A. I., "Efficient one-step syntheses of isoprenoid conjugates of nucleoside 5'-diphosphates", *Organic Letters*, **5** (2003) 4713-4715
- [309] Zatorski, A., Goldstein, B. M., Colby, T. D., Jones, J. P., and Pankiewicz, K. W., "Potent Inhibitors of Human Inosine Monophosphate Dehydrogenase Type-II - Fluorine-Substituted Analogs of Thiazole-4-Carboxamide Adenine-Dinucleotide", *Journal of medicinal chemistry*, **38** (1995) 1098-1105
- [310] Garipova, I. Y., Silnikov, V. N., "Synthesis of phosphamide conjugates of 5'-mononucleotides with carcinine and its analogs", *Russian Chemical Bulletin*, **51** (2002) 1940-1944
- [311] Pei, R., Rothman, J., Xie, Y. L., and Stojanovic, M. N., "Light-up properties of complexes between thiazole orange-small molecule conjugates and aptamers", *Nucleic Acids Research*, **37** (2009) 1-6
- [312] Bichenkova, E. V., Gbaj, A., Walsh, L., Savage, H. E., Rogert, C., Sardarian, A. R., Etchells, L. L., and Douglas, K. T., "Detection of nucleic acids in situ: novel oligonucleotide analogues for target-assembled DNA-mounted exciplexes", *Organic & Biomolecular Chemistry*, **5** (2007) 1039-1051
- [313] Rando, R. J., Poovey, H. G., and Gibson, R. A., "Evaluation of 9-Methylamino-Methylanthracene As A Chemical Label for Total Reactive Isocyanate Group - Application to Isocyanate Oligomers, Polyurethane Precursors, and Phosgene", *Journal of Liquid Chromatography*, **18** (1995) 2743-2763
- [314] Fiechter, G., Mayer, H. K., "Characterization of amino acid profiles of culture media via pre-column 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization and ultra performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **879** (2011) 1353-1360
- [315] Van Brabandt, W., Verniest, G., De Smaele, D., Duvey, G., and De Kimpe, N., "Synthesis of 3-fluoroazetidines", *Journal of Organic Chemistry*, **71** (2006) 7100-7102
- [316] De Kimpe, N., De Smaele, D., "A Convenient Synthesis of 3-Alkoxyazetidines", *Tetrahedron*, **51** (1995) 5465-5478
- [317] Yamashita, D. S., Marquis, R. W., Xie, R., Nidamarthy, S. D., Oh, H. J., Jeong, J. U., Erhard, K. F., Ward, K. W., Roethke, T. J., Smith, B. R., Cheng, H. Y., Geng, X. L., Lin, F., Offen, P. H., Wang, B., Nevins, N., Head, M. S., Haltiwanger, R. C., Sarjeant, A. A. N., Liable-Sands, L. M., Zhao, B. G., Smith, W. W., Janson, C. A., Gao, E., Tomaszek, T., McQueney, M., Jarnes, I. E., Gress, C. J., Zembryki, D. L., Lark, M. W., and Veber, D. F., "Structure activity relationships of 5-, 6-, and 7-methyl-substituted azepan-3-one cathepsin K inhibitors", *Journal of medicinal chemistry*, **49** (2006) 1597-1612

- [318] Wypych, J. C., Nguyen, T. M., Benechie, M., and Marazano, C., "*Reaction of aldimine anions with vinamidinium chloride: Three-component access to 3-alkylpyridines and 3-alkylpyridinium salts and access to 2-alkyl glutaconaldehyde derivatives*", *Journal of Organic Chemistry*, **73** (2008) 1169-1172
- [319] Schmitz, O. J. and Benter, T., "*Journal of Chromatography Library volume 72 - advances in LC-MS instrumentation*", **72** (2007) 89-113
- [320] Kornblum, N., Scott, A., "*A new method for protecting amines*", *The Journal of Organic Chemistry*, **42** (1977) 399-400
- [321] CryLas GmbH, "*FQSS 266-50 Data Sheet*",
http://www.crylas.de/productsheets/FQSS_266-50.pdf (am 08.06.2013 aufgerufen)

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

