

Entwicklung und Optimierung einer auf Massenspektrometrie basierten Fettsäureanalytik für die Systembiologie, Medizin und Ernährung

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG EINES AKADEMISCHEN GRADES EINES
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

– Dr. rer. nat. –

VORGELEGT VON

Paul Eric Görs

ANGEWANDTE ANALYTISCHE CHEMIE

FAKULTÄT FÜR CHEMIE DER UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN
2024

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/82179

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240710-125013-9

Alle Rechte vorbehalten.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2020 bis April 2023 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver J. Schmitz in der Angewandten Analytischen Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 26.06.2024

Gutachter: Prof. Dr. Oliver J. Schmitz

PD Dr. Ursula Telgheder

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Meckenstock

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Entwicklung und Optimierung einer auf Massenspektrometrie basierten Fettsäureanalytik für die Systembiologie, Medizin und Ernährung“

selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die ich wörtlich oder inhaltlich übernommen habe, als solche kenntlich gemacht habe, mich auch keiner anderen als der angegebenen Literatur oder sonstiger Hilfsmittel bedient habe. Ich habe weder in diesem noch einem anderen Fach ein gescheitertes Promotionsverfahren durchlaufen.

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorgenannten Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und dass die Angaben der Wahrheit entsprechen und ich nichts verschwiegen habe.

Die Strafbarkeit einer falschen eidesstattlichen Versicherung ist mir bekannt, namentlich die Strafandrohung gemäß § 156 StGB bis zu drei Jahren Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei vorsätzlicher Begehung der Tat bzw. gemäß § 161 Abs.1 StGB bis zu einem Jahr Freiheitsstrafe oder Geldstrafe bei fahrlässiger Begehung.

Essen, den _____

Paul E. Görs

Danksagung

Auch wenn am Ende auf einer Dissertation vorne nur ein einziger Name draufstehen kann, wäre das Verfassen eine solche Arbeit ohne vielerlei Unterstützungen nicht möglich. Daher möchte ich mich an dieser Stelle einmal ausführlich bei den vielen Kollegen, Kooperationspartnern, Mentoren, Familienmitgliedern und Freunden bedanken, die diese Arbeit auf ihre Art und Weisen möglich gemacht haben.

Zunächst möchte ich mich bei allen meinen Kollegen dafür bedanken, dass ihr mich über die Zeit in der Abteilung begleitet habt, die vielen Gespräche, die wir geführt, und die Unterstützung, die ich von euch erhalten habe. Bei Flo möchte ich mich für die technische Einarbeitung und seine Ratschläge bedanken, Pia danke ich für ihre Zusammenarbeit, sowohl während ihrer Zeit als Masterstudentin an der Methodenoptimierung der APCI-Methode, wie auch bei ihrer Unterstützung bei der Bedienung des Multi Purpose Samplers für die Aufarbeitung der Tumorzellen. Bei Juan bedanke ich für die Zusammenarbeit an unseren beiden gemeinsamen Publikationen. Lidia, Constantin und Delia möchte ich danken für unser gemeinsames Projekt zur Auftrennung der CoA-Ester. Bei Janosch möchte ich mich für seine Unterstützung im Bereich der organischen Chemie bedanken, Florian danke ich für die Unterstützung bei der Planung und seinen kritischen Blick auf die Dissertation, sowie die vielen Abende, die wir gemeinsam in der Uni verbracht haben, um noch „die eine Messung“ zu schaffen.

Bei unseren Kooperationspartnern des Universitätsklinikums, der AG Grüner: und der AG Littwitz-Salomon, möchte ich für die Bereitstellung der Proben danken. Einen besonderen Dank geht zudem an den Arbeitskreis Siebers, mit denen ich über die Jahre eng zusammengearbeitet habe. Namentlich nennen möchte ich hier Xiaoxiao und Christian, die die Kultivierung der Archaeen übernommen haben, sowie Christopher und Bettina für die Leitung des Lipid divide Projektes sowie das Vertrauen, dass sie in uns gesetzt haben. Der VW-Stiftung danke ich für die Finanzierung unseres Forschungsprojektes: *“Resolving the ‘lipid divide’ by unravelling the evolution and role of fatty acid metabolic pathways in Archaea”*. Denn wie immer gilt auch hier: ohne Geld keine Forschung.

Sven und Oliver danke ich für die Möglichkeiten, die ich bei euch gehabt habe. Insbesondere die ausgezeichnete analytische Ausstattung ist hier zu nennen, die uns als Doktoranden eine Vielzahl an Türen geöffnet hatte. Ich habe mich bei euch direkt

in unserem ersten Gespräch sehr wohl gefühlt, und meinen Wechsel zur Universität Duisburg-Essen nie bereut. Oliver wünsche ich eine schöne Zeit in Kanada, und vor allem viele neue Eindrücke und Forschungs Kooperationen, und Sven wünsche ich viel Kraft auf den letzten Metern zur Habilitation.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich vor allem für die emotionale Unterstützung bedanken. Dank der Pandemie, dem Krieg in der Ukraine sowie dem Hacking-Angriff auf die Universität haben sich viele Gewissheiten plötzlich aufgelöst und es musste improvisiert werden. Ihr habt mir geholfen, einen kühlen Kopf bei all dem Irrsinn zu behalten.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei zwei Personen bedanken, welche zwar nichts mit dieser Dissertation zu tun hatten, die mich jedoch maßgeblich geprägt haben und ohne die ich vermutlich nicht in die analytische Chemie gewechselt hätte. Zum einen möchte ich mich bei meinem alten Analytik-Professor Uwe Karst bedanken. In einer Zeit, als mein Bachelorstudium wirklich nicht gut lief hatte er mit seiner großartigen Vorlesung es geschafft, mich für die Analytik zu begeistern. Zum anderen möchte ich mich bei Thorsten Saenger, den Betreuer meiner Masterarbeit bedanken, dank dem ich meinen Spaß an der Forschung entdeckt habe.

Danke für alles!

Urheberrechtlicher Hinweis

Einige der hier gezeigten Daten und Ergebnisse sind bereits in Form von Publikationen veröffentlicht worden. Um dies möglichst transparent zu kennzeichnen, sind im Kapitel „Ergebnisse und Diskussionen“ zu Beginn jedes Unterkapitel die Publikationen aufgeführt, in welchen die Daten und Ergebnisse veröffentlicht wurden, inklusive einer Verlinkung zu den jeweiligen Publikationen (digitale Version). Eine komplette Liste aller veröffentlichten Publikationen ist zudem im Anhang unter „Publikationen und Tagungsbeiträge“ zu finden.

Zusammenfassung

Fettsäuren erfüllen wichtige Rollen in biologischen Systemen, sie dienen als Energiespeicher, Hormone, Bausteine größerer Lipide und haben essenzielle Aufgaben beim interzellularen Transport von Proteinen. Als Konsequenz werden in verschiedenen Bereichen Methoden für eine sensitive Fettsäureanalytik benötigt. Dazu zählen die Aufklärung von Krankheiten, die Beantwortung von ernährungsphysiologischen Fragestellungen, die Identifikation von Lebensmittelfälschungen oder die Untersuchung evolutionsbiologischer Zusammenhänge.

Solche Fragestellungen erfordern eine Methode, welche eine sensitive und selektive Identifikation und Quantifizierung von Fettsäuren in verschiedenen Matrices ermöglicht. Anstelle der im gaschromatographischen Bereich klassischerweise verwendeten Elektronenstoßionisation von Fettsäuremethylestern wurde eine Derivatisierung der Fettsäuren mittels Pentafluorobenzylbromid durchgeführt, welche anschließend mit verschiedenen Ionenquellen ionisiert wurden. Hierbei wurde die üblicherweise bei dieser Derivatisierung verwendete *Negative Ion Chemical Ionization* mit zwei modernen Atmosphärendruckquellen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) sowohl sensitiver ist, und zudem deutlich geringere Unterschiede bei der Ionisationseffizienz der analysierten Fettsäuren aufweist. Die optimierte und validierte APCI-Methode wurde anschließend verwendet, um zwei Studien zur Tumordiagnostik analytisch zu unterstützen. Die Tumorzellen wiesen hierbei signifikante Unterschiede in der Fettsäurekonzentration auf.

Die entwickelte GC-APCI-MS-Methode wurde genutzt, um verschiedene Archaeen auf Fettsäuren zu untersuchen. Archaeen bilden eine eigene Domäne des Lebens, welche sich in ihrem Lipidom von anderen Organismen stark unterscheidet. Bei Archaeen war, anders als bei Eukaryonten und Bakterien, jedoch noch nicht geklärt, ob diese in der Lage sind, Fettsäuren zu bilden, und wenn ja, welchen quantitativen Anteil diese ausmachen. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Archaeen auf einem ^{13}C -markierten Nährmedium kultiviert, und die in den Zellen enthaltene ^{13}C -markierte Fettsäuren wurden identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Archaeen in der Lage sind Fettsäuren zu bilden und dass das Nährmedium dabei eine wesentliche Rolle spielt, wobei die gebildeten Fettsäuren gattungsabhängig sind. In *Sulfolobus acidocaldarius* wurden Caprylsäure (FA 8:0), Caprinsäure (FA 10:0) und

Laurinsäure (FA 12:0) identifiziert und quantifiziert, während in *Haloferax volcanii* vor allem Palmitinsäure (FA 16:0) vorliegt.

Neben der Kettenlänge hat bei ungesättigten Fettsäuren auch die Anzahl und die Position der Doppelbindungen einen Einfluss auf ihre physiologische Wirkung. Während die Anzahl der Doppelbindungen anhand des Masse-zu-Ladungsverhältnisses der ionisierten Fettsäure bestimmt werden kann, ist die Bestimmung der Doppelbindungsposition analytisch herausfordernder. Fettsäureisomere weisen häufig nur geringe Polaritätsunterschiede auf, wodurch eine chromatographische Trennung oft nur durch die Verwendung von langen Säulen und damit verbundenen langen Analysezeiten erreicht werden kann. Um die Detektion der Fettsäureposition zu vereinfachen, wurde die entwickelte GC-APCI-MS-Methode modifiziert, indem Benzaldehyd als Reaktant in die Ionenquelle eingebracht wurde. Hierdurch wurde die Bildung von regiospezifischen *in-source*-Fragmenten unterstützt, welche für die Bestimmung der Doppelbindungsposition genutzt werden können. Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde anschließend anhand der Analyse von Fischölen demonstriert. Diese enthalten verschiedene mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie zum Beispiel die ω 3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (FA 20:5) und Docosahexaensäure (FA 22:6) sowie einige weniger bekannte Fettsäuren wie Hexadecatriensäure (FA 16:3), Hexadecatetraensäure (FA 16:4) oder Stearidonsäure (FA 18:4). Mit der entwickelten Methode konnten innerhalb einer Messung diese Fettsäuren nachgewiesen, quantifiziert und deren Doppelbindungspositionen bestimmt werden. Die Methode stellt daher eine wertvolle Ergänzung zu der üblicherweise verwendeten Ozonolyse und Paternò-Büchi-Reaktion dar, da sie eine selektive Identifikation der Doppelbindungsreaktion mit geringem Aufwand ermöglicht.

Abstract

Fatty acids fulfill various important roles in biological systems. They can serve as energy storage, hormones, building blocks of more complex lipids and assist in the inter-cellular transport of proteins. Therefore, sensitive methods for fatty acid analysis are required in various areas. This includes the identification of illnesses, nutritional-physiological questions, the identification of food fraud, and evolutionary developments of organisms.

Due to this, a sensitive and selective method for analyzing fatty acid in different matrices is required. In the field of gas chromatographic analysis, electron impact ionization of fatty acid methyl ester is commonly used. An alternative is the derivatization using pentafluorobenzyl bromide which has been used in combination with various ion sources. The traditional used negative ion chemical ionization was compared with two modern atmospheric pressure sources. It was able to demonstrate that atmospheric pressure chemical ionization (APCI) is more sensitive and provides more uniform ionization of the analyzed fatty acids. The optimized and validated method was then used for two studies in the field of diagnostics. Significant differences in the fatty acid concentration of the analyzed tumor cells were identified.

The optimized GC-APCI-MS method was used to analyze fatty acids in archaea. Archaea are one of the three domains of life and their lipidome differs significantly from the other two domains. Until now, it was not clear whether archaea are able to synthesize fatty acids. To target that, archaea were cultivated on different ^{13}C -labeled media and the ^{13}C -labeled fatty acids were analyzed. The ability to synthesize fatty acids could be proved for archaea. Both the media and the species both have a high influence on the fatty acid synthesis in archaea. Caprylic acid (FA 8:0) caprinic acid (FA 10:0) and lauric acid were identified and quantified in *Sulfolobus acidocaldarius*, while palmitic acid (FA 16:0) was the most dominant fatty acid in *Haloferax volcanii*.

The number and the position of double bonds play an important role in the physiological effects of fatty acids. While the number of double bonds can be determined from the mass-to-charge ratio of the ionized fatty acid, determining the position of these double bonds is much more challenging. The chromatographic separation of fatty acid isomers is often difficult and requires long analysis times. To simplify this, the GC-APCI-MS method has been modified using benzaldehyde as a reactant. This promotes

a regiospecific in-source fragmentation, which can be used for double bond position determination. The performance of this method was demonstrated by the analysis of fish oil. Several rare fatty acids such as hexadecatrienic acid (FA 16:3), hexadecatetraenic acid (FA 16:4) or stearidonic acid (FA 18:4) were identified, quantified and the double bond position was confirmed by the regiospecific fragments. This method represents a fast and simple approach, complementing the existing methods such as the Paternò-Büchi reaction and ozonolysis.

Abkürzungsverzeichnis

ACP	Acyl-Carrier-Protein
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
API	Ionisation bei Atmosphärendruck
APPI	Photoionisation bei Atmosphärendruck
CE	Kapillarelektrophorese
CI	Chemische Ionisation (positive)
CoA	Coenzym A
DoE	Design-of-Experiments
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	Extracted Ion Chromatogram
EMA	European Medicines Agency
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FAMEs	Fettsäuremethylester
FFA	Freie Fettsäuren (<i>engl. Free Fatty Acid</i>)
FID	Flammenionisationsdetektors
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>engl. High Performance Liquid Chromatography</i>)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LLOQ	untere Bestimmungsgrenze (<i>engl. Lower Limit of Quantification</i>)
LOD	Nachweisgrenze (<i>engl. Limit of Detection</i>)
LUCA	Letzter universeller gemeinsamer Vorfahre (<i>engl. Last Universal Common Ancestor</i>)
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometer
NICI	Chemische Ionisation (negativ)
PB	Paternò-Büchi
PFB	Pentafluorobenzylbromid
pMRM	<i>pseudo</i> Multiple Reaction Monitoring
s/n	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (<i>engl. signal-to-noise-ratio</i>)
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
SPE	Festphasenextraktion
SRM	Selective Reaction Monitoring
TLC	Dünnschichtchromatographie
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
ULOQ	obere Bestimmungsgrenze (<i>engl. Upper Limit of Quantification</i>)
VUV	Vakuum-Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1	THEORETISCHER HINTERGRUND	1
1.1	FETTSÄUREN UND FETTSÄUREDERIVATE IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN	1
1.1.1	Struktur und Nomenklatur	1
1.1.2	Fettsäurestoffwechsel	4
1.1.3	Vorkommen und Wirkung von Fettsäuren	7
1.1.4	Lipid Divide – Fettsäuren in Archaeen	8
1.2	ANALYTISCHE METHODEN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON FETTSÄUREN	11
1.2.1	Gaschromatographische Analyse von Fettsäuren	11
1.2.2	Detektion von Fettsäuren in der Gaschromatographie	14
1.2.3	Flüssigchromatographische Methoden zur Fettsäurebestimmung	19
1.2.4	Weitere Methoden zur Fettsäurebestimmung	20
1.2.5	Identifikation von Doppelbindungspositionen	21
1.3	WIRTSCHAFTLICHE BEDEUTUNG VON FETTSÄUREN	24
2	ZIELSETZUNG	27
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	CHEMIKALIEN UND PROBEN	29
3.1.1	Fettsäurestandards	29
3.1.2	Chemikalien	30
3.1.3	Proben	31
3.2	GERÄTEKONFIGURATIONEN	31
3.2.1	Gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuren	31
3.2.2	Untersuchung der Aminosäuren mittels LC-ESI-QToF-MS	33
3.2.3	Identifikation der Doppelbindungsposition mittels GC-APCI-QToF-MS	34
3.3	EXPERIMENTELLER TEIL	35
3.3.1	Hydrolyse der Lipide	35
3.3.2	Lipidextraktion	35
3.3.3	Derivatisierung von Lipiden	37
3.3.4	Festphasenextraktion	37
3.4	SOFTWARE	37
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
4.1	ENTWICKLUNG EINER SENSITIVEN DETEKTIONSMETHODE FÜR FETTSÄUREN	39
4.1.1	Einleitung	39
4.1.2	Methodenoptimierung	40
4.1.3	Charakterisierung der Methode	45
4.1.4	Analyse von Fettsäuren in biologischen Proben	52
4.1.5	Fazit	58
4.2	„LIPID DIVID“ - ANALYSE VON FETTSÄUREN IN ARCHAEEN	59
4.2.1	Einleitung	59
4.2.2	Untersuchung der Fettsäuren in <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	62
4.2.3	Analyse von <i>Haloferax volcanii</i>	70
4.2.4	Fazit	72
4.3	BESTIMMUNG DER DOPPELBINDUNGSPOSITION	74
4.3.1	Einleitung	74
4.3.2	Methodenentwicklung	76
4.3.3	Fragmentation	79
4.3.4	Anwendung	84
4.3.5	Fazit	87
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	88
6	ANHANG	91
6.1	ABBILDUNGEN	91
6.2	TABELLEN	94
7	LITERATUR	96

1 Theoretischer Hintergrund

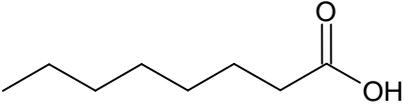
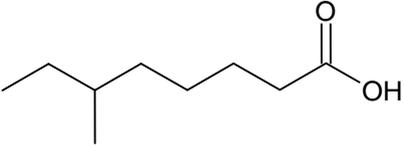
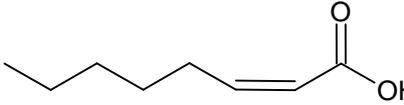
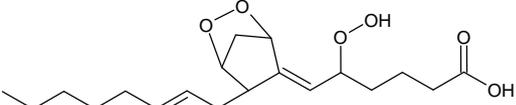
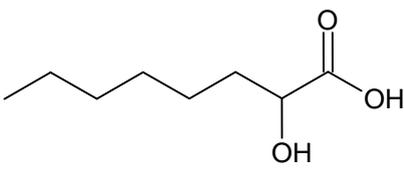
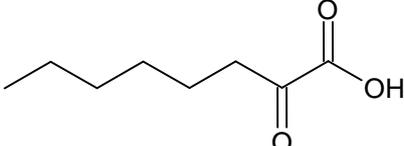
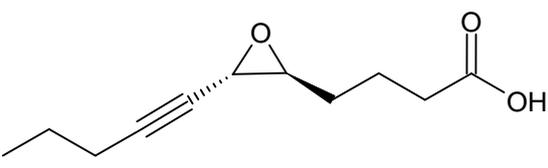
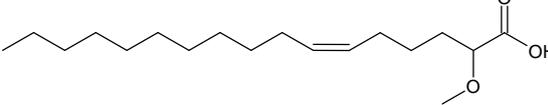
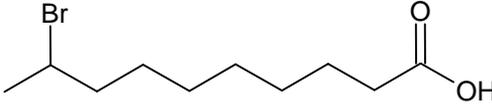
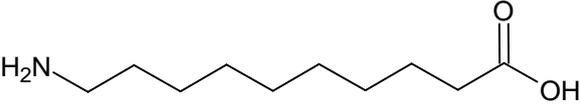
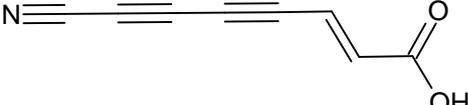
1.1 Fettsäuren und Fettsäurederivate in biologischen Systemen

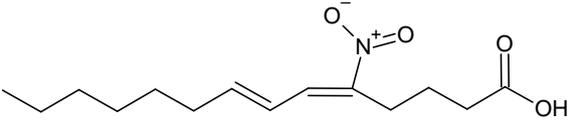
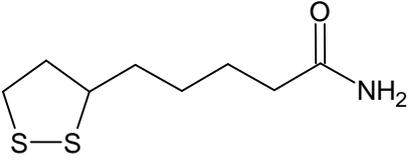
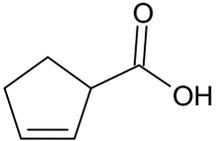
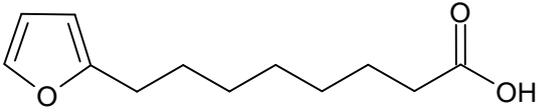
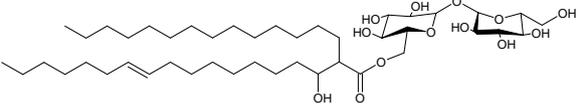
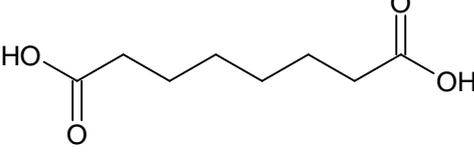
Fettsäuren werden der Klasse der Lipide zugeordnet. Diese galten lange Zeit als reine Energieträger ohne Einfluss auf den Metabolismus, weshalb das wissenschaftliche Interesse an ihnen gering war. Ende der 1920er Jahre änderte sich diese Ansicht jedoch, nachdem die Forschung des Ehepaares Burr zeigte, dass Linolensäure bei der Ernährung von Ratten essenziell ist. Wurden die Ratten mit Linolensäure freier Kost ernährt, so traten bei ihnen nach einiger Zeit unterschiedliche Mangelerscheinungen auf [1,2], wodurch erstmals der Einfluss von Fettsäuren auf den Metabolismus von Versuchstieren nachgewiesen und der Begriff „essenzielle Fettsäuren“ geprägt wurde [3]. Hierdurch wurde die Grundlagen für die Fettsäureanalytik gelegt, welche heutzutage in verschiedenen Bereichen eine entscheidende Rolle spielt, wie beispielsweise bei der Aufklärung von Lebererkrankungen oder Insulinresistenzen [4-7]. Auch das Verständnis evolutionärer Prozesse wie dem Aufbau von Zellmembranen sowie des sogenannten Lipid Divide, den evolutionären Wechsel zwischen ethergebundenen Isoprenoiden und veresterten Fettsäuren als Baustein von Zellmembranen, erfordert eine sensitive Fettsäureanalytik [8,9]. Zudem werden zunehmend aus wirtschaftlicher Sicht sensitive Methoden zur Analyse von Fettsäuren benötigt, beispielsweise um Lebensmittelfälschungen von Käse, Fleisch oder Speiseölen zu identifizieren [10-12].

1.1.1 Struktur und Nomenklatur

Fettsäuren können in ihrer Struktur sehr vielfältig sein. So werden Fettsäuren bei Lipidmaps in insgesamt 17 verschiedene Klassen eingeteilt, welche in Tabelle 1 gezeigt sind [13]. So können Fettsäuren beispielsweise mit Amino- Cyano- und Nitro-Gruppen vorliegen. Die größte Verbreitung haben jedoch lineare geradkettige Fettsäuren und ihre ungesättigten Derivate. Diese sind verglichen mit anderen Lipiden in ihrer Grundstruktur wenig komplex, und werden allgemein als *„lange Kohlenwasserstoffketten unterschiedlicher Länge und Anzahl von Doppelbindungen, die mit einer Carboxylgruppe enden“* beschrieben [14].

Tabelle 1: Klassifizierung der Fettsäuren (FS) nach Lipid Maps [13].

Klassifizierung	Name	Struktur
geradlinige FS	Octansäure	
verzweigt-kettige FS	6-Methyl-Octansäure	
ungesättigte FS	2Z-Octansäure	
Hydroperoxy-FS	5-Hydroperoxy-7-[3,5-Epideoxy-2-(2-Octenyl)-Cyclopentyl]-6-Heptensäure	
Hydroxy-FS	2-Hydroxy-Octansäure	
Oxo-FS	2-Oxo-Octansäure	
Epoxy-FS	5S,6S-Epoxy-Undec-7-ynsäure	
Methoxy-FS	2-Methoxy-6Z-Hexadecensäure	
Halogenierte-FS	9-Bromo-Decansäure	
Amino-FS	10-Amino-Decansäure	
Cyano-FS	7-Cyano-2E-Hepten-4,6-diyne-säure	

Nitro-FS	5-Nitro-5Z,7E-Tetradecadiensäure	
Thia-FS	5-(1,2-Dithiolan-3-yl)Pentanamid	
Carbozyklische-FS	(2-Cyclopenten-1-yl)-Carboxylsäure	
Heterozyklische-FS	2-Furanooctansäure	
mycolische-FS	6-O-[3-hydroxy-2-tetradecyloctadec-11E-enoyl]-α-D-glucopyranosyl-α-D-glucopyranosid	
Dicarboxy-FS	1,8-Octanedisäure	

Ihr Name leitet sich von dem jeweiligen Kohlenwasserstoff ab, dem das Suffix „-säure“ angehängt wird. Die Kohlenstoffatome werden, wie in Abbildung 1 gezeigt, bei Verwendung der IUPAC-Nomenklatur (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) vom Carboxylende aus nummeriert (rote Zahlen). Das zweite und dritte Kohlenstoffatom wird auch als α - und β -Atom bezeichnet, das letzte Kohlenstoffatom wird als ω -Atom bezeichnet. Enthält die Kohlenwasserstoffkette keine Doppelbindungen, wird von gesättigten Fettsäuren gesprochen, liegen eine oder mehrere Doppelbindungen vor, werden diese als ungesättigte Fettsäuren bezeichnet. Bei ungesättigten Fettsäuren wird zudem die Position der Doppelbindungen bei der Benennung mit einbezogen. Hierbei wird die Position der Doppelbindung durch eine hochgestellte Indexziffer gekennzeichnet, der der griechische Buchstabe Delta (Δ) vorausgestellt wird. Cis- und trans-Isomere werden durch ein entsprechendes Präfix gekennzeichnet. Bei der alternativ verwendeten ω -Nomenklatur, welche vor allem im biologischen und ernährungswissenschaftlichen Bereich Verwendung findet, erfolgt die Nummerierung entgegengesetzt vom Alkan-Ende aus, wobei einzig die Position der ersten Doppelbindung

in den Namen einfließt. So werden sowohl α -Linolensäure wie auch Docosapentaensäure zu den ω 3-Fettsäuren gezählt, trotz ihrer unterschiedlichen Summenformeln.[14]

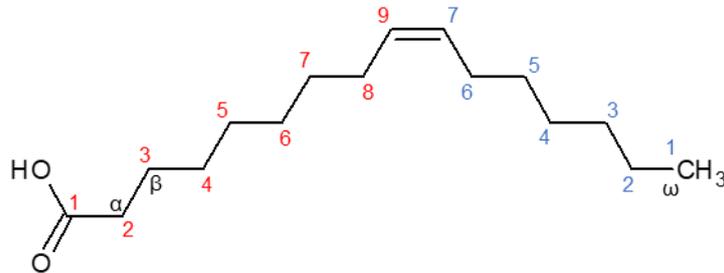


Abbildung 1: Strukturformel der *cis*- Δ^9 -Hexadecensäure, welche auch als ω 7-Fettsäure bezeichnet wird.

1.1.2 Fettsäurestoffwechsel

Um ihre Funktion als Energiespeicher zu erfüllen, spielt der Fettsäureabbau und die Fettsäuresynthese eine zentrale Rolle. Der Grund liegt in der hohen Energiedichte von Fettsäuren. So kann eine einzige Palmitinsäure über den Fettsäureabbau und den angeschlossenen Citratzyklus in 106 ATP-Äquivalente umgewandelt werden. Der Fettsäureabbau beinhaltet Oxidationen, Hydratisierung und Spaltungsreaktionen, während die Fettsäuresynthese aus Kondensation, Reduktion und Dehydratisierungsreaktionen besteht. Die hierbei entstehenden Zwischenprodukte sind sich strukturell sehr ähnlich, wie aus Abbildung 2 hervorgeht [15].

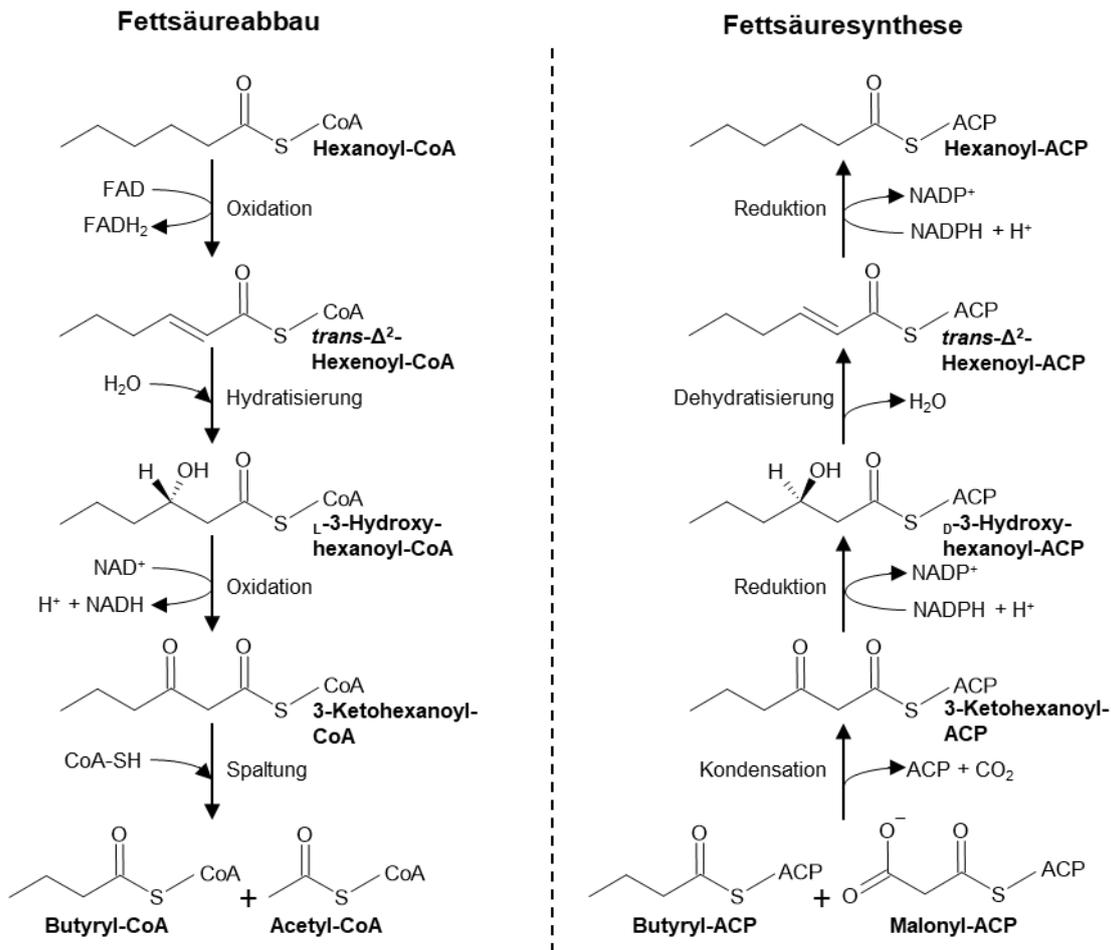


Abbildung 2: Fettsäurestoffwechselreaktionen in biologischen Systemen am Beispiel von Hexansäure, unterteilt in Fettsäureabbau (links) und Fettsäuresynthese (rechts) [modifiziert nach [15]].

Es gibt jedoch auch einige entscheidende Unterschiede zwischen dem Fettsäureabbau und der Fettsäuresynthese. So erfolgt die Aktivierung der Fettsäure bei dem Fettsäureabbau durch eine Verknüpfung mit Coenzym A (CoA), während bei der Fettsäuresynthese die Aktivierung durch die Verknüpfung mit einem Acyl-Carrier-Proteins (ACP) erfolgt. Räumlich findet der Fettsäureabbau in der mitochondrialen Matrix, die Fettsäuresynthese hingegen im Cytoplasma statt. Zudem gibt es Unterschiede bei den involvierten Enzymen, dem C₂-Donator (Malonyl-ACP), den involvierten zellulären Energieträgern (FAD) sowie der Isomerie des Hydroxyacyl-Zwischenproduktes [15].

Das aus dem Fettsäureabbau entstandene Acetyl-CoA kann über den Citratzyklus energetisch verwertet werden. Hierbei wird das Acetyl-CoA mit Wasser in verschiedenen Oxidationsschritten enzymatisch zu CoA und CO₂ umgewandelt. Der Citratzyklus

lus dient der Zelle zur Energiegewinnung. Die bei dem Zyklus entstehenden Energieträger, drei NADH, ein FADH₂ und ein GTP, entsprechen zusammengerechnet zehn ATP-Äquivalenten [16]. Die Bildung ungesättigter Fettsäuren erfolgt durch Desaturasen des Endoplasmatischen Retikulums. Unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH wird ein Sauerstoffatom übertragen. Anschließend erfolgt die Abspaltung von Wasser, wodurch eine Doppelbindung entsteht (siehe Abbildung 3).

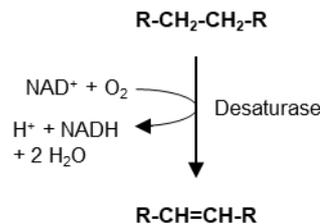


Abbildung 3: Synthese von ungesättigten Fettsäuren durch Desaturasen des Endoplasmatischen Retikulums [modifiziert nach [17]].

Dieser Weg ist jedoch nur an den ersten zehn Kohlenstoffatomen möglich. Daher können einige Fettsäuren wie Linol- oder Linolensäure nicht im Körper von Desaturasen gebildet werden. Diese Fettsäuren werden auch als „essenzielle Fettsäuren“ bezeichnet, da sie über die Nahrung aufgenommen werden müssen [17].

Neben der von C₂-Einheiten ausgehenden Fettsäuresynthese gibt es jedoch auch andere Wege, mithilfe derer - unter anderem - verzweigte Fettsäuren synthetisiert werden. Verzweigte Fettsäuren sind wichtige Bestandteile bakterieller Membranen und können daher von vielen Mikroorganismen synthetisiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von Phytansäure aus Chlorophyll, welche mithilfe von Mikroorganismen im Pansen von Kühen abläuft (siehe Abbildung 4). Im ersten Schritt kommt es zu einer Abspaltung von Phytol aus dem Chlorophyllmolekül. Dieses wird zu Dihydrophytol reduziert, anschließend erfolgt eine Oxidation zu Phytanal und dann zur Phytansäure. Die von den Bakterien gebildeten Fettsäuren werden von den Kühen im Zwölffingerdarm aufgenommen und sind im Milchfett nachweisbar [18].

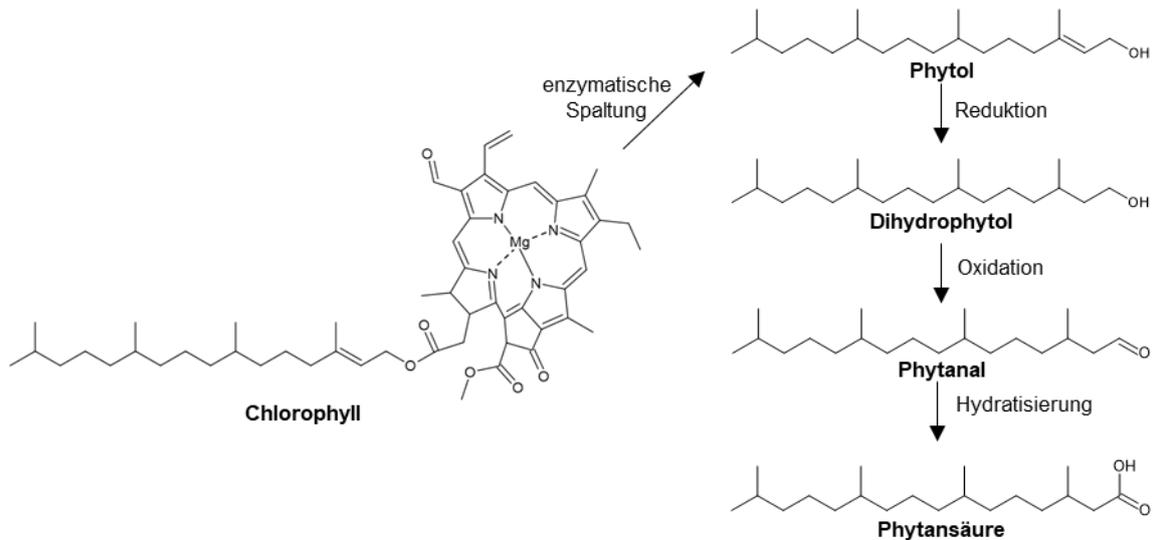


Abbildung 4: Neben der Fettsäuresynthese aus C_2 -Einheiten können auch andere Stoffwechselwege zur Synthese von Fettsäuren führen. Die Synthese findet durch Mikroorganismen im Pansen statt [modifiziert nach [18]].

1.1.3 Vorkommen und Wirkung von Fettsäuren

Fettsäuren erfüllen in biologischen Systemen verschiedene Rollen. Sie dienen als Energiespeicher in Form von Triglyceriden, welche je nach Bedarf auf- und abgebaut werden können, spielen bei interzellulären Proteintransport eine Rolle, dienen als Hormone und interzelluläre Botenstoffe und sind zudem ein wichtiger Baustein von Membranlipiden [15]. Diese lassen sich generell in drei Gruppen einteilen, die Phospholipide, bei welchen Fettsäuren über eine Ester- oder Amidgruppe gebunden sind, Glykolipide, welche ebenfalls mit einer Amidgruppe gebundene Fettsäuren enthalten, sowie Cholesterine [14]. Die Zusammensetzung der in der Membran eingebauten gebundenen Fettsäuren hat hierbei einen großen Einfluss auf die Fluidität der Membran. Der Schmelzpunkt von Fettsäuren steigt mit zunehmender Kettenlänge und sinkt mit der Anzahl an Doppelbindungen ab. Dies wird in biologischen Systemen dazu genutzt, um Membranlipide auf äußere Einflüsse wie extreme pH-Werte oder Temperaturen anzupassen [19].

Bei einer Betrachtung der in biologischen Systemen vorkommenden Fettsäuren fällt auf, dass es sich vor allem um geradzahlige, unverzweigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 4 bis 24 Kohlenstoffatomen handelt. Ungesättigte Fettsäuren liegen zudem meist in *cis*-Konfiguration vor [20]. Quantitativ liegen in biologischen Systemen

jedoch die meisten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 und 18 Kohlenstoffatomen vor. So weisen beispielsweise über 80% der gebundenen und nichtgebundenen Fettsäuren in humanem Serum eine Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen auf. Lediglich Arachidonsäure liegt mit etwa 10% des Gesamtfettsäuregehaltes in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich [21]. Der Grund hierfür liegt in der durch die Aktivität der β -Ketoacyl-ACP-Synthase bedingte Reaktionsgeschwindigkeit, eines bei der Kettenverlängerung wichtigen Enzyms, welche mit zunehmender Kettenlänge abnimmt. Zeitgleich steigt die Aktivität der Thioesterase, welche für die Abspaltung des ACP, und damit für den Abbruch der Kettenverlängerung zuständig ist [22].

Fettsäuren dienen oft als Baustein komplexer Lipide und liegen daher gebunden vor, beispielsweise als Ester bei Triglyceriden oder als Thioester bei Coenzym A-Estern. In meist kleineren Konzentrationen können sie jedoch auch in freier Form vorkommen [23]. Freie Fettsäuren werden mit einer großen Anzahl an Stoffwechselreaktionen und damit verbundenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So können hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren in der Leber Krankheiten wie Insulinresistenz begünstigen [6]. Auch Entzündungsreaktionen können auf Fettsäuren zurückgeführt werden, da diese häufig wichtige Vorprodukte von komplexeren Lipiden wie beispielsweise Oxylipinen sind [23,24]. In interzellulären Signalkaskaden spielen freie Fettsäuren eine wichtige Rolle, und können durch ihre Bindung an einen geeigneten Rezeptor wie den in der Zellmembran vorkommenden FFA-Rezeptoren (*engl. Free Fatty Acid*) als Signalmolekül dienen. Diese werden unter anderem mit der Glukoseaufnahme und Hormonausschüttung von Zellen in Verbindung gebracht, und stehen zudem mit Krebserkrankungen im Zusammenhang [25-28].

1.1.4 Lipid Divide – Fettsäuren in Archaeen

Archaeen sind Prokaryoten, welche erst 1977 zu einer eigenständigen Domäne des Lebens erklärt wurden [29]. Da sie wie Bakterien über keinen Zellkern oder andere Organellen verfügen [30], wurden viele Archaeen aufgrund ihres ähnlichen Aufbaus als Bakterien klassifiziert. Aus dieser Zeit stammt auch der Ausdruck „Archo-Bakterien“, weshalb noch heute einige Archaeen das Suffix „*bacterium*“ in ihrem Gattungsnamen tragen [31,32]. Jedoch zeigen Archaeen einige fundamentale Unterschiede zu

Bakterien. Beispielsweise gibt es mehrere grundlegende Unterschiede bei den Stoffwechselreaktionen von Bakterien und Archaeen [33]. Diese sind insbesondere bei den in der Zellmembran enthaltenden Lipiden zu beobachten, da diese entscheidend für das Verständnis des Lipid Divide sind [9,34,35]. Dies führte zu dem in der Abbildung 5 dargestellten, aktuell gültigen phylogenetischen drei-Domänen-Stammbaum, bei dem sich die Eukaryoten aus den Archaeen entwickelt haben [36-38]. Die Archaeen gelten nun als eigenständige Domäne, welche sich evolutionär schon früh von den Bakterien abgespalten haben [39]. Es ist im Augenblick unklar, warum sich der letzte universelle Gemeinsame Vorfahre (*last universal common ancestor, LUCA*) in Bakterien und Archaeen aufgespalten hat. Die Hypothese, dass LUCA über beide Arten von Zelllipiden verfügte hatte und aufgrund von evolutionärem Druck sich unterschiedliche Zellmembranen entwickelten, wird aktuell jedoch als unwahrscheinlich angesehen, da Zellmembranen aus archaealen und bakteriellen Lipiden ähnlich wie rein archaeale/bakterielle Zellmembranen eine hohe Stabilität besitzen [40-42].

Die Zellmembran von Bakterien und Eukaryoten enthält Fettsäuren, welche mit einem Glycerol-3-Phosphat verestert vorliegen [30]. Bei Archaeen enthält die Zellmembran anstelle von Fettsäuren Isoprenoide, welche über eine Etherbindung an ein Glycerol-1-Phosphat gebunden sind [9,30,34,35]. Dies führt zu einer Frage, warum sich, trotz der engen Verwandtschaft von Bakterien und Archaeen, die Zellmembran von Archaeen so grundlegend von der Zellmembran von Bakterien unterscheidet. Zum anderen, warum Eukaryoten wie Bakterien eine Zellmembran aus veresterten Fettsäuren besitzen, obwohl sich die Eukaryoten aus den Archaeen entwickelt haben. Diese Veränderung der in den Zellen vorliegenden Lipide wird auch als „Lipid Divide“ bezeichnet [9,34,43]. Ein Teilaspekt des Lipid Divide, dem Vorkommen von Fettsäuren in Archaeen, wird mit den entwickelten hoch sensitiven Methoden analysiert.

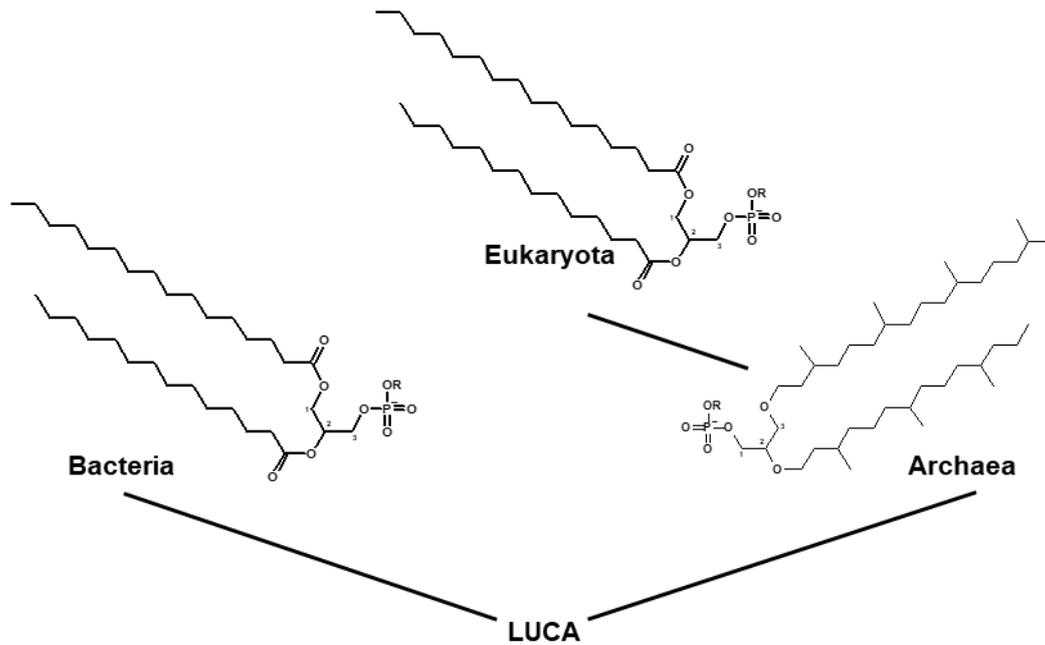


Abbildung 5: Stammbaum der drei Domänen des Lebens, bestehend aus Bakterien, Archaeen und Eukaryoten, ausgehend vom LUCA. Bakterien und Archaeen entwickelten sich aus einem gemeinsamen Vorfahren, später entwickelten sich Eukaryoten aus den Archaeen. Bei der Zellmembran gibt es jedoch einen fundamentalen Unterschied zwischen den verschiedenen Domänen: Während die Zellmembran von Bakterien und Eukaryoten Glycerol-3-Phosphat veresterte Fettsäuren enthält, enthält die Zellmembran von Archaeen Glycerol-1-Phosphat veretherte Isoprenoide. Dieser Wechsel in der Lipidstruktur wird auch als „Lipid Divide“ bezeichnet [modifiziert nach [35,44]].

Die Anwesenheit von Fettsäuren in Archaeen, sowie ihre enzymatischen Bildungswege werden bereits seit längerem diskutiert [45-47]. Dazu passend haben erste Forschungsgruppen Fettsäuren in Archaeen gefunden. In einer Publikation von *Jones et al.* wurden bereits 1991 Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 14 Kohlenstoffatomen in *Methanospaera stadtmanae* charakterisiert [48], *Gattinger et al.* detektierte Phospholipidfettsäuren in verschiedenen *Euryarchaeota* [49]. *Hamerly et al.* konnte in *Sulfolobus solfataricus* und *Ignicoccus hospitalis* Fettsäuren mit Kettenlängen von 14 bis 18 Kohlenstoffatomen charakterisieren [35]. Trotz allem sind genaue Funktion sowie Bildung und Abbau der Fettsäuren in Archaeen zum aktuellen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt. Auch bei *Sulfolobus acidocaldarius* wurde ein potentieller Stoffwechselweg für Fettsäuren entdeckt [50]. Es fehlt jedoch sowohl hierbei wie bei den vorausgegangenen Studien ein belastbarer Nachweis, dass die identifizierten Fettsäuren tatsächlich aus den Archaeen stammen und es sich nicht um fehlerhaft zugeordnete Signale von Kontaminationen handelt. Dies soll unter anderem mit der in

der Arbeit entwickelten hochsensitiven Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Fettsäuren beantwortet werden.

1.2 Analytische Methoden zur Quantifizierung von Fettsäuren

Die Strukturvielfalt von Fettsäuren (Kapitel 1.1.1), welche unterschiedlich lange Kohlenwasserstoffketten sowie Doppelbindungen an verschiedenen Positionen und Konfigurationen beinhaltet, stellt analytisch eine Herausforderung dar. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit, und den daraus resultierenden geringen Unterschieden in Bezug auf viele physikochemischen Eigenschaften kann es je nach verwendeter Methode zu einer schlechten chromatographischen Trennung, oder sogar zu Coelutionen verschiedener Fettsäuren kommen. Dies gilt insbesondere für regioisomere Fettsäuren, deren einziger struktureller Unterschied in der Position der Doppelbindung besteht. Zwar kann dies durch die Verwendung längerer Säulen gelöst werden, jedoch wird hierbei die Analysenzeit deutlich erhöht, was die Anwendbarkeit einschränkt. Auch die Verwendung von speziellen Reaktionen wie der Paternò-Büchi-Reaktion oder der Ozonolyse sind mit einem hohen Aufwand und gewissen Nachteilen verbunden, auf welche in Kapitel 1.2.5 genauer eingegangen wird.

Daneben stellen auch Kontaminationen bei der Fettsäureanalytik eine große Herausforderung dar. Insbesondere Palmitinsäure (FA 16:0) und Stearinsäure (FA 18:0) sind bekannte Kontaminationen, welche zwar durch verschiedene Methoden wie der Vermeidung von Plastik oder dem Ausheizen von Laborglas reduziert werden können. Eine vollständige Vermeidung dieser Kontaminationen erfordert jedoch einen so großen Zeit- und Kostenaufwand, dass dies in der Praxis häufig nicht anwendbar ist. Kontaminationen haben daher einen wesentlichen Einfluss auf die Nachweisgrenze der verwendeten Methoden und können fehlerhafte Quantifizierungen zur Folge haben [51-54].

1.2.1 Gaschromatographische Analyse von Fettsäuren

Die Gaschromatographie (GC) gilt allgemein auch als „Goldstandard“ der Fettsäureanalytik, welcher seit vielen Jahrzehnten für die Identifikation und Quantifizierung von Fettsäuren eingesetzt wird [55-57]. Der Grund hierfür liegt in den Möglichkeiten, die

der Flammenionisationsdetektor (FID) für die Quantifizierung von Fettsäuren bietet. Dessen Signal ist direkt proportional zur Anzahl der Kohlenstoffatome, was eine einfache Quantifizierung der Fettsäuren ermöglicht. Da sich Fettsäuren in Bezug auf ihre Flüchtigkeit jedoch stark unterscheiden, können nur kurzkettige Fettsäuren ohne Derivatisierung analysiert werden [58]. Für die GC-Analyse von mittel- und langkettigen Fettsäuren ist eine Derivatisierung notwendig, um ihre Flüchtigkeit zu erhöhen. Hierzu wurden verschiedene Methoden entwickelt, wie beispielsweise die Methylierung, Silylierung und die Derivatisierung mittels Pentafluorobenzylbromid. Die Produkte dieser Derivatisierungsreaktionen sind in Abbildung 6 dargestellt.

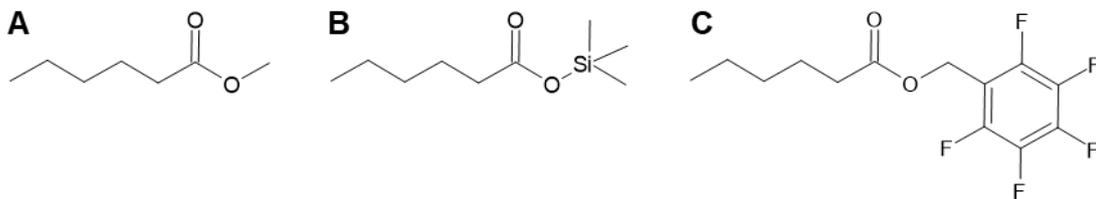


Abbildung 6: Verschiedene für Fettsäuren übliche Derivate. Gezeigt sind methylierte (A), silylierte (B) sowie mit Pentafluorobenzylbromid (C) derivatisierte Derivate der Hexansäure.

A: Fettsäuremethylester

Die am meisten verbreitete Derivatisierung stellt bei Fettsäuren die Methylierung der Säuregruppe dar. Fettsäuremethylester (engl. *Fatty Acid Methyl Esters*; *FAMES*) sind bereits bei Temperaturen unter 250 °C flüchtig, was eine gaschromatographische Trennung ohne hohe thermische Belastung von Analyten und Säule ermöglicht. Üblicherweise werden bei FAMES polarer Säulen wie beispielsweise FFAP- oder FAME-WAX-Säulen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um modifizierte Polyethylenglycol-Säulen, welche eine hohe chromatographische Trennleistung in Bezug auf FAMES besitzen. Die Säulen können jedoch üblicherweise nur bis 250 °C betrieben werden und eignen sich daher nicht für die Trennung aller Derivate. Über die Jahre wurde eine große Anzahl an unterschiedlichen Derivatisierungsmethoden entwickelt, wie der Derivatisierung mittels Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) [59], BF_3 [60] und die Methylierung mit Methanol und KOH [61] oder HCl [62], welche je nach Analyt Vor- und Nachteile in ihrer Derivatisierungseffizienz aufweisen [63].

B: Silylierung von Fettsäuren

Eine andere übliche Derivatisierungsmethode stellt die Silylierung von Fettsäuren dar. Zur Silylierung können verschiedene Derivatisierungsmittel eingesetzt werden, wie N,O-Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid, oder Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide [64-67]. Ein Vorteil der Silylierung sind die spezifischen Fragmentierungsmuster durch das Silylierungsreagenz, welche bei der Ionisation von silylierten Analyten entstehen [64,65,68]. Jedoch sind für eine optimale Derivatisierung je nach verwendeter Methode und Analyt mehrere Stunden notwendig [65-67]. Zudem ist die Silylierung eine wenig spezifische Reaktion, neben Carbonsäuren können beispielsweise auch Amine, Phenole, Thiole oder Alkohole erfasst werden [69].

C: Derivatisierung mittels Pentafluorobenzylbromid

Einen anderen Ansatz ermöglicht die Derivatisierung mittels Pentafluorobenzylbromid (PFB). Die Methode wurde von Kawahara *et al.* in den 60er Jahren entwickelt [70]. Hierbei wird die PFB-Gruppe unter Abspaltung von Bromwasserstoff an die Fettsäure gebunden (Abbildung 7). Werden die PFB-Derivate mittels chemischer Ionisation im *negative-Mode* (engl. *Negative Ion Chemical Ionization; NICI*) ionisiert, was erstmals von Strife und Murphy durchgeführt wurde [71], kommt es zu einem Elektroneneinfang durch die halogenisierte Derivatisierungsgruppe. Dies ermöglicht eine weiche Ionisation durch Abspaltung der PFB-Gruppe im *negative-Mode* [57,72]. Aufgrund dessen ist das intakte Carboxylation $[M-PFB]^-$ im MS-Spektrum sichtbar und kann selektiv detektiert werden. Dies führt zu einer deutlichen geringeren Nachweisgrenze von PFB-Derivaten im Vergleich zu FAMES [73]. Ein weiterer Vorteil der PFB-Derivatisierung liegt in der Spezifität und Selektivität in Bezug auf freie Fettsäuren [52,57,74,75]. Aus diesem Grund kann auf eine aufwendige Probenvorbereitung wie eine Festphasenextraktion (engl. *Solid Phase Extraction; SPE*) verzichtet werden.

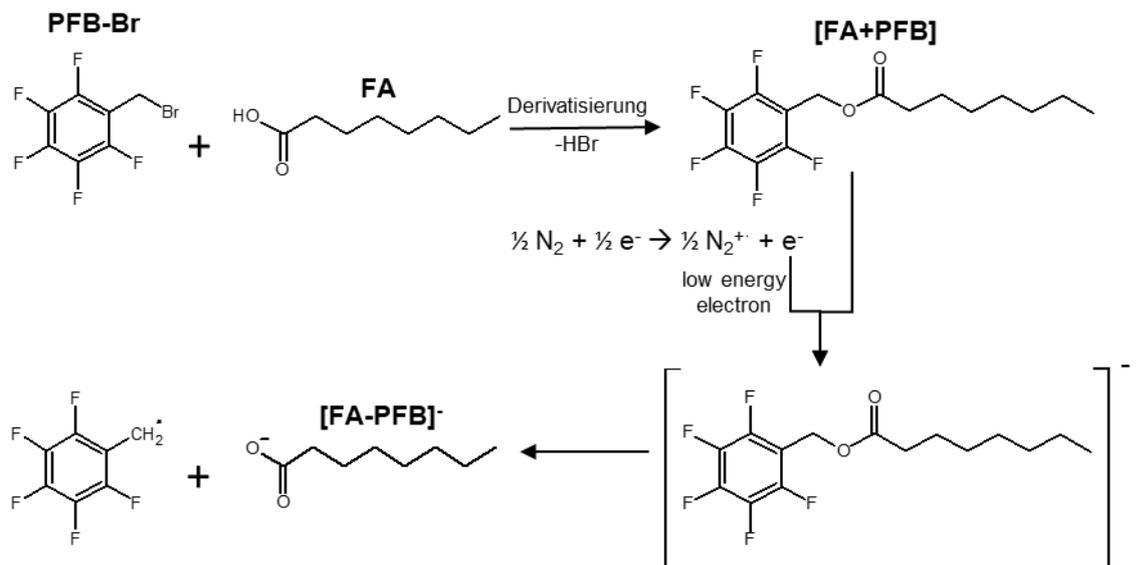


Abbildung 7: Derivatisierung einer Carbonsäure mit Pentafluorobenzylbromid und Ionisierung mittels negative Elektronen-Einfang (engl. electron capture) am Beispiel einer APCI-Quelle. In der Quelle bildet sich zunächst ein niedrig-energetisches Elektron. Dieses führt zur Ionisation des Analyten über eine Elektronen-Einfangreaktion. Dabei wird das PFB abgespalten und es bildet sich ein [FA-PFB]⁻-Ion, welches massenspektrometrisch erfasst werden kann [modifiziert nach [72]].

1.2.2 Detektion von Fettsäuren in der Gaschromatographie

Der FID wird klassischerweise für die Detektion methylierter und silylierter Fettsäuren verwendet, und wird auch heutzutage für die Analyse des Gesamtfettsäuregehaltes häufig eingesetzt [76-78]. Ein Vorteil des FID liegt in seinen niedrigeren Anschaffungs- und Betriebskosten, seiner geringen Fehleranfälligkeit sowie die einfache Quantifizierung von Fettsäuren, da das Signal des Detektors direkt mit der Anzahl der Kohlenstoffatome korreliert. Zudem sind viele Messmethoden bereits mit dem Einsatz eines FID validiert und zertifiziert, was insbesondere in stark regulierten Bereichen wie beispielsweise der pharmazeutischen Industrie eine große Rolle spielt, da die Validierung neuer Messmethoden zeit- und kostenintensiv ist. Als Nachteil des FID muss jedoch der Informationsgehalt der Messungen sowie die Sensitivität und Selektivität des Detektors angeführt werden. So werden für die Identifikation wichtige Informationen über das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) oder das Fragmentationsmuster der Fettsäuren nicht erfasst. Aufgrund dessen ist bei der Verwendung eines FID eine Basislinientrennung jedes zu untersuchenden Peaks sowie eine Abtrennung aller coelulierender

Matrixbestandteile notwendig. Da die Identifikation der Fettsäuren nur über die exakte Retentionszeit erfolgt, sind hierzu Standards notwendig. Dies kann insbesondere bei nicht kommerziell erhältlichen Fettsäuren zum Problem werden.

Die Elektronenstoßionisation (engl. *Electron Ionization; EI*) stellt die am häufigsten verwendete Ionisierungsmethode für die massenspektrometrische qualitative und quantitative Analyse von Fettsäuren dar [79]. Anders als bei Verwendung eines FID liefern EI-MS-Messungen deutlich mehr Informationen über die analysierten Fettsäuren, wie beispielsweise ihr spezifisches Fragmentierungsmuster. Die Fragmentierung in der Quelle (*in-source*-Fragmentierung) kann allerdings auch zu einem Selektivitätsverlust führen, insbesondere wenn Fettsäuren mit ähnlichen Fragmentierungsspektren oder sehr geringen Konzentrationen analysiert werden. Ähnlich wie beim FID werden eine Basislinientrennung sowie eine Abtrennung coelulierender Matrixbestandteile nötig, damit eine Identifikation über das Massenspektrum möglich ist. Daher kann es sinnvoll sein, *in-source*-Fragmentationen zu vermeiden, was durch den Einsatz von weichen Ionisationsmethoden wie chemische Ionisation (engl. *Chemical Ionization; CI*) oder Atmosphärendruck-Chemische-Ionisation (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization; APCI*) möglich ist [80,81]. Die Verwendung weicher Ionisationsmethoden ist im GC-Bereich aktuell jedoch deutlich weniger verbreitet.

PFB-Derivate können neben der üblicherweise verwendeten NICI-Quelle auch mit anderen Ionenquellen ionisiert werden. So ist es der Arbeitsgruppe von Singh *et al.* gelungen, flüssigchromatographisch getrennte PFB-Derivate verschiedener Biomoleküle mittels APCI-Quelle zu ionisieren, wobei eine hohe Sensitivität erreicht wurde [72]. Davon ausgehend entwickelten Meckelmann *et al.* eine Methode zur Detektion von Oxidationsprodukten mehrfach ungesättigter Fettsäuren, auch Oxylipine genannt. Hierbei zeigte sich jedoch im Vergleich zu früheren Studien ohne PFB Derivatisierung deutlich höhere Nachweisgrenzen, was vermutlich entweder auf die verwendete APCI-Quelle oder auf die verwendeten *Reversed Phase* Bedingungen zurückgeführt werden konnte [75]. Aufbauend auf diese beiden Studien wurde für die Ionisation von PFB-Fettsäurederivate nicht nur die klassischen NICI-, sondern auch eine APCI- und APPI-Quelle (engl. *Atmospheric Pressure Photo Ionization*) eingesetzt. Durch die Verwendung der GC können mögliche, aus dem Laufmittel resultierende, Probleme vorgebeugt werden [75].

Negative Ion Chemical Ionization

Bei der NICI-Quelle (früher auch NCI abgekürzt) handelt es sich um eine Vakuum-Ionenquelle, bei welcher die Ionisation mit Hilfe eines Reaktantgases stattfindet. Das Reaktantgas, welches in deutlich höherer Konzentration als die Analytmoleküle vorliegt (üblicherweise 10^3 - bis 10^5 -fache Konzentration, wodurch der Druck in der Quelle bei um die 10^{-2} mbar liegt), wird im ersten Schritt vergleichbar mit der Elektronenstoßionisation durch einen Elektronenstrahl bei 50 bis 100 eV ionisiert. Im zweiten Schritt wird der Analyt durch das Reaktantgas ionisiert. Dies kann auf verschiedenen Wegen ablaufen und ist unter anderem von dem Verhältnis der Ionisationspotentiale und Protonenaffinitäten von Reaktantgas und Analyt abhängig [82].

Aufgrund der im Vergleich zur EI-Quelle deutlich geringeren übertragenen Energie kommt es bei der NICI-Quelle nicht zu einer vollständigen Fragmentierung des Analytions [82]. Stattdessen wird unter den richtigen Bedingungen ein $[M-H]^-$ Ion gebildet welches nicht, oder nur zu einem geringen Anteil, fragmentiert (Abbildung 7) [57,83]. Am weitesten verbreitet ist Methan als Reaktantgas [57,71], aber auch andere Gase wie Ammoniak oder Isobutan finden ihre Anwendung [84,85]. Die Wahl des Reaktantgases ist von dem zu untersuchenden Analyten abhängig.

Die NICI-Quelle findet heutzutage für sehr unterschiedliche Fragestellungen ihre Anwendung. So wird sie aktuell unter anderem für die Detektion von Fettsäuren [86] und organischer Schadstoffe in Humanproben [87], der Detektion von Haloanisolen und Halophenolen in Kork [88] oder auch für die Detektion von chlorierten Pestiziden eingesetzt [89]. Die hohe Sensitivität bei der Analyse von halogenierten Verbindungen ermöglicht eine Detektion im Spuren- und Ultraspurenbereich, weshalb die NICI-Quelle seit vielen Jahren ein fester Bestandteil der massenspektrometrischen Ionisierung darstellt.

Atmosphärendruckquellen

In den letzten Jahren haben Methoden mit weicher Ionisation mittels API-Quellen (engl. *Atmospheric Pressure Ionization*) bei GC-Analysen zunehmend Verbreitung gefunden. API-Quellen sind im flüssigchromatographischen Bereich seit längerem bekannt, eine GC-Kopplung wurde jedoch erst in den 70er Jahren von Horning *et al.* entwickelt [90]. Seit der Jahrtausendwende sind API-Quellen auch im GC-Bereich zunehmend verbreitet, und haben ihren Weg in die Kommerzialisierung gefunden [91].

Insbesondere APCI- und die APPI-Quelle spielen in Kombination mit GC eine entscheidende Rolle (Abbildung 8). Beide Ionenquellen können sowohl im *positiv*- wie auch im *negativ mode* betrieben werden und bieten ein großes Potential bei der Ionisation unterschiedlicher Stoffklassen [81,92,93].

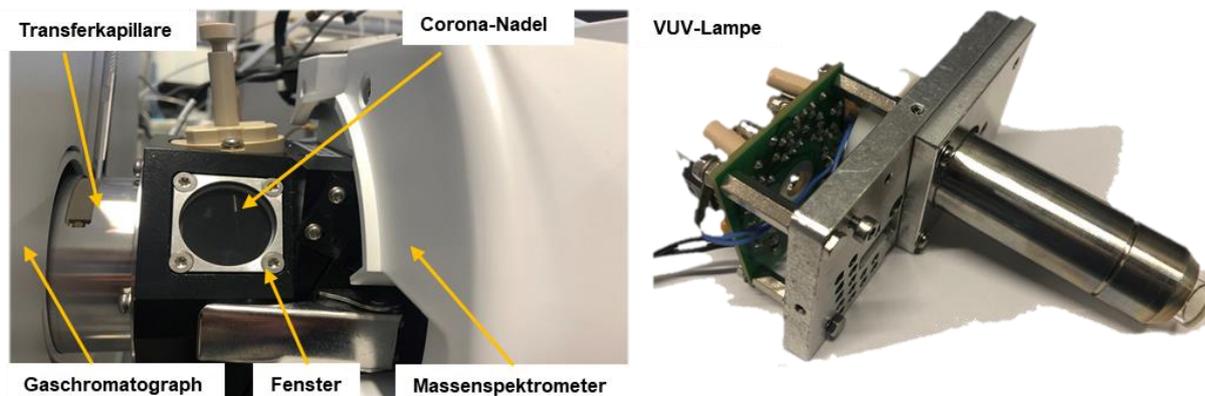


Abbildung 8: Bei den APCI/APPI-Messungen verwendete Ionenquelle. Links: Die Säule aus der GC wird durch eine beheizte Transferkapillare geführt und endet kurz vor der Corona-Nadel. Die Corona-Entladung kann durch ein Fenster beobachtet werden. Rechts: Für die APPI-Messungen wurde die Corona-Nadel entfernt und das Fenster wurde durch eine VUV-Lampe ersetzt. Der Dopant wurde mittels einer Spritzenpumpe in die Zelle injiziert.

Bei der APCI-Quelle erfolgt die Ionisation über die unter Hochspannung stehende Corona-Nadel [94]. An der Corona-Nadel kommt es zu einer Ionisation von Stickstoffmolekülen, welche über eine Reaktionskaskade die vorbeiströmenden Analytmoleküle ionisieren (Abbildung 9) [82]. Als Analyten eignen sich hier vor allem Substanzen mit geringer bis mittlerer Polarität [82]. Die APCI-Quelle kann sowohl mit, wie auch ohne einem Dopanten verwendet werden, wobei der Dopant (verwendet wird hier üblicherweise Methanol oder Wasser) Protonentransfer-Reaktionen unterstützen kann [91,95,96]. Insbesondere bei der Detektion von halogenierten Analyten zeigt sich die analytische Stärke der GC-APCI-MS Systeme. So zeigte sich, dass die Sensitivität von APCI-Quellen bei der Analyse von bromierten Flammschutzmitteln 4 bis 40 Mal höher liegt als bei vergleichbaren NCI- oder EI-Quellen [97]. Andere aktuelle Anwendungsgebiete der GC-APCI-Quelle sind die Analyse von flüchtigen Verbindungen in Pflanzen [98], die Detektion von Dioxinen [99] oder die Bestimmung von polychlorierten Naphthalenen in Sedimentproben [92].

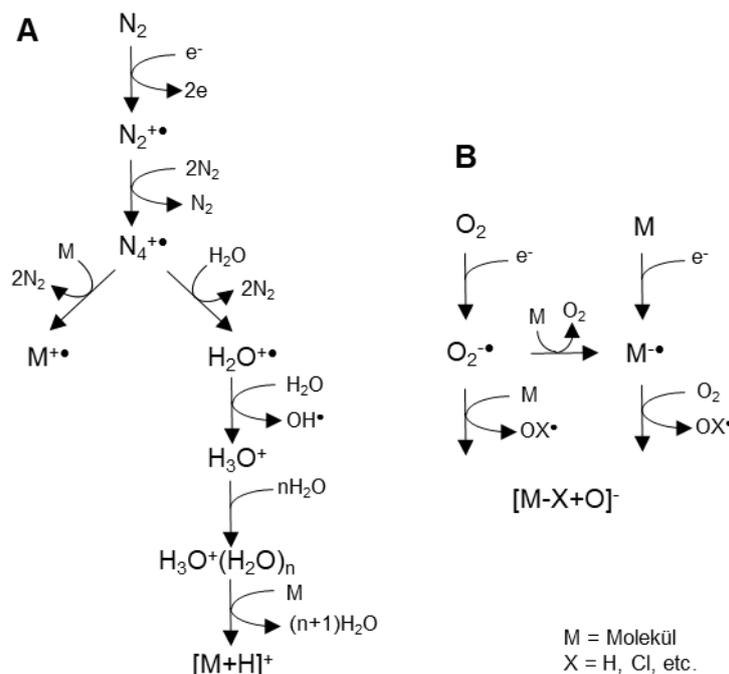


Abbildung 9: Ionisationsmechanismus einer GC-APCI im positive (A) und negative Mode (B) [modifiziert nach [100]].

Ein möglicher Mechanismus für die Ionisierung von PFB-Derivaten in einer APCI-Quelle im *negative-Mode* wurde von Singh *et al.* am Beispiel von Estron entwickelt. Hiernach wird durch die Corona-Entladung aus dem als *Auxillary Gas* eingesetztem Stickstoff ein radikales Kation sowie niedrig-energetische Elektronen erzeugt. Diese interagieren mit dem PFB-Derivat und bilden ein radikalisches Anion. Im letzten Schritt wird die PFB-Gruppe radikalisch abgespalten und es bildet sich das charakteristische $[M-PFB]^-$ Ion. Ein $[M-H]^-$ Ion, welches üblicherweise bei der Verwendung einer APCI-Quelle zu erwarten wäre, konnte von Singh *et al.* nicht beobachtet werden. Um den Unterschied im Ionisationsverhalten zu betonen, wird der Mechanismus für die Ionisierung von PFB-Derivaten daher auch als *electron capture APCI* bezeichnet [72]. Der Mechanismus von Singh *et al.* wurde in Abbildung 7 am Beispiel einer Fettsäure gezeigt.

Die APPI-Quelle ist vom Aufbau der APCI-Quelle sehr ähnlich, anstelle einer Corona-Nadel ist hier jedoch eine Vakuum-Ultraviolett (VUV) Lampe eingebaut. Die VUV-Lampe emittiert Photonen mit 10 eV, wodurch entweder der Analyt direkt, oder eine photoionisierbare Substanz (Dopant) ionisiert wird [82]. Der Dopant ionisiert anschließend das Analyt in einer Gasphasenreaktion [101]. Als Dopanten werden,

ähnlich wie im flüssigchromatographischen Bereich, häufig Aceton, Anisol, Chlorbenzol, Tetrahydrofuran oder Toluol verwendet, aber auch der Einsatz von Benzol und Diethylether ist im GC-Bereich möglich [91,92,102]. Eine GC-Kopplung der APPI-Quelle bietet den Vorteil, dass anders als bei flüssigchromatographischen Anwendungen die Photonen nicht durch das Laufmittel absorbiert werden, weshalb mehr Photonen für die Ionisation des Analyten beziehungsweise des Dopanten zur Verfügung stehen. GC-APPI-Systeme können für verschiedene Fragestellungen eingesetzt werden, z. B. für die *general-unknown*-Analyse von Rohölproben [103] oder für die Untersuchung von polychlorierten Flammschutzmitteln [104].

Trotz der großen Vorteile, welche API-Quellen bieten, gibt es zurzeit noch einige Herausforderungen. So verfügen APCI-Quellen häufig über eine sehr hohe relative Standardabweichung, welche je nach Anwendung bei um die 50 % oder höher liegt [96,105]. Nichtsdestotrotz kann davon ausgegangen werden, dass durch die Entwicklung neuer Quellendesigns [106] die GC-API Koppelung in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen wird.

1.2.3 Flüssigchromatographische Methoden zur Fettsäurebestimmung

Ursprünglich wurden flüssigchromatographische Methoden nur im geringen Umfang zur Analyse von Fettsäuren eingesetzt. Der Grund hierfür liegt in der Struktur der Fettsäuren, welche nur eine schlechte Erfassung mittels UV/Vis oder Dioden-Array-Detektor ermöglicht. Durch die Verbreitung der Massenspektrometrie wird die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl. *High Performance Liquid Chromatography*; HPLC) jedoch zunehmend für die Trennung von Fettsäuren eingesetzt. Im Gegensatz zur GC bietet sie die Möglichkeit, freie Fettsäuren ohne vorherige Derivatisierung zu untersuchen, da eine Verdampfbarkeit der Analyten bei Verwendung von HPLC-Systemen nicht erforderlich ist [53]. Dies senkt den Aufwand bei der Probenvorbereitung, was zu geringeren Kosten und weniger möglichen Kontaminationsquellen führt. Eine durch die Derivatisierung bedingte Diskriminierung einzelner Fettsäuren kann somit ausgeschlossen werden [63]. Aber auch bei der Verwendung von HPLC kann es je nach Fragestellung sinnvoll sein, eine Derivatisierung durchzuführen, um beispielsweise die chromatographische Leistung zu verbessern und damit die benötigte Analysenzeit zu verkürzen [107], oder um die Position der Doppelbindung konstitutioneller

isomerer Fettsäuren aufzuklären [108]. Die untere Bestimmungsgrenze der in der Literatur beschriebenen HPLC-Methoden variiert je nach Methode und den untersuchten Fettsäuren sehr stark, üblicherweise liegt sie jedoch im Bereich von 5 - 1000 nM [53]. Die mit einem Massenspektrometer gekoppelte Elektrospray-Ionisierung (ESI-MS) wird häufig als Detektor in HPLC-Methoden verwendet [53,107,109]. Hierbei kommt es anders als bei der im GC-Bereich üblichen EI-Quelle zu keiner ausgeprägten *in-source*-Fragmentierung der Fettsäuren, was ihre Identifizierung über ihr Masse-zu-Ladungsverhältnis erleichtert. Neben den stark verbreiteten ESI-Methoden gibt es allerdings auch verschiedene APCI-Methoden, welche insbesondere bei der Analyse komplexer Fettsäurederivate wie Triacylglycerole oder Glycidol-Ester eingesetzt werden [110-112].

1.2.4 Weitere Methoden zur Fettsäurebestimmung

Neben den bereits vorgestellten GC- und HPLC-Methoden wurden über die Jahre auch andere Methoden entwickelt, deren Verbreitung im Vergleich zu den oben beschriebenen Methoden hingegen vergleichsweise gering ist. Ein Beispiel hierfür ist die Dünnschichtchromatographie (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC), welche Ende letzten Jahrhunderts für die Quantifizierung von Fettsäuren eingesetzt wurde [113,114]. Auch wenn moderne GC- und HPLC-Methoden deutlich bessere Trennleistungen bieten, ist TLC in der Fettsäureanalytik noch immer nicht komplett verschwunden. So findet TLC in Kombination mit GC-FID selbst heutzutage noch bei Lipidomic-Analysen vereinzelt Anwendung [115,116].

Die Kapillarelektrophorese (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) kann zwar, verglichen mit HPLC- und GC-Methoden, weniger universell eingesetzt werden, bietet jedoch Vorteile durch die niedrigen Kosten, kurze Analysenzeiten und einfache Probenvorbereitung [117]. Gekoppelt mit einem UV-Detektor ermöglicht die CE eine einfache Detektion von ungesättigten Fettsäuren und ihren Hydroperoxiden [118,119]. Zudem kann durch die Verwendung einer ESI-Quelle auch eine massenspektrometrische Kopplung vorgenommen werden [120].

Auch wenn aktuell die Supercritical Fluid Chromatography (SFC) im Bereich der Fettsäureanalytik nur wenig Verbreitung findet, ist diese Technik in den letzten Jahren wieder verstärkt in den Fokus der Wissenschaft geraten [121-123]. SFC bietet Vorteile

in Bezug auf die geringe Temperatur, den Verzicht von Derivatisierungsmitteln sowie der Möglichkeit, dass die Detektion sowohl massenspektrometrisch wie auch mithilfe von flammenbasierten Detektoren erfolgen kann [121,124]. Ihre Einsatzmöglichkeiten liegen sowohl in der Identifizierung und Quantifizierung von Fettsäuren [121], wie auch bei metabolischen Studien [122].

1.2.5 Identifikation von Doppelbindungspositionen

Die Anzahl und die Position von Doppelbindungen haben einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Wirkung von Fettsäuren, wie beispielsweise ihr Verhalten in Zellmembranen [19,125,126]. Da die Anzahl der Doppelbindungen zumeist einen großen Einfluss auf die Retentionszeit hat, und zudem in unterschiedlichen m/z -Verhältnissen resultieren, können Fettsäuren mit unterschiedlichen Doppelbindungsverhältnissen meist vergleichsweise einfach charakterisiert werden. Die Identifikation von Doppelbindungspositionen stellt jedoch noch immer eine Herausforderung dar, da während des *Low-energy Collision Induced Dissociation* Prozesses keine diagnostisch eindeutigen Fragmente für die Aufklärung der Doppelbindungsposition entstehen [127,128].

Trennung von Isomeren mittels Gaschromatographie

Eine chromatographische Trennung von Fettsäureisomeren mittels Gaschromatographie ist mithilfe spezieller Trennsäulen wie der *Select FAME columns* (Agilent-Technologies) möglich, jedoch sehr zeit- und kostenintensiv. Laut Herstellerangaben ist die 200 m lange Säule in der Lage, die unterschiedlichen Isomere der Ölsäure (FA 18:1) voneinander zu trennen. Die Länge der Säule stellt allerdings hohe Anforderungen an die verwendete Analysenmethode, zudem liegt eine 200 m lange Trennsäule preislich im mittleren vierstelligen Bereich [129]. Um diese Probleme zu umgehen, wurden in den letzten Jahren vermehrt Methoden für die Charakterisierung der Doppelbindungspositionen von Fettsäuren entwickelt, bei welchen die Identifikation nicht alleinig anhand der chromatographischen Trennung, sondern auch mithilfe von Nachsäulenderivatisierungen erfolgt. Hierbei werden die für die Reaktion benötigten Reagenzien direkt in die Ionenquelle eingebracht und die Derivatisierung der Analyten findet erst nach der chromatographischen Trennung statt. Dies hat den Vorteil, dass es durch die De-

rivatisierung zu keiner Veränderung der Retentionszeiten kommt, was eine Identifikation der Analyten erleichtert. Insbesondere die Ozonolyse und die Paternò-Büchi Reaktion spielen hierbei eine bedeutende Rolle [128].

Ozonolyse

Bei der Ozonolyse kommt es zu einer Anlagerung von Ozon an die Doppelbindung der Fettsäure. Hierbei bildet sich ein 1,2,3-Trioxolan, welches auch als primäres Ozonoid bezeichnet wird [130]. Durch Umlagerungs- und Spaltungsreaktionen bilden sich ein Aldehyd- und ein Carbonyl-Fragment (Abbildung 10). Diese können aufgrund ihres charakteristischen m/z -Unterschieds von 16 Da identifiziert werden. Anhand der Länge der Carboxylkette kann die Position der Doppelbindung bestimmt werden [130]. Moderne Methoden sind unter Verwendung der sogenannten ozone-induced dissociation in der Lage, einen Massenbereich von bis zu 5 Größenordnungen abzudecken, was ein breites Anwendungsfeld für Ozonolysen ermöglicht [131].

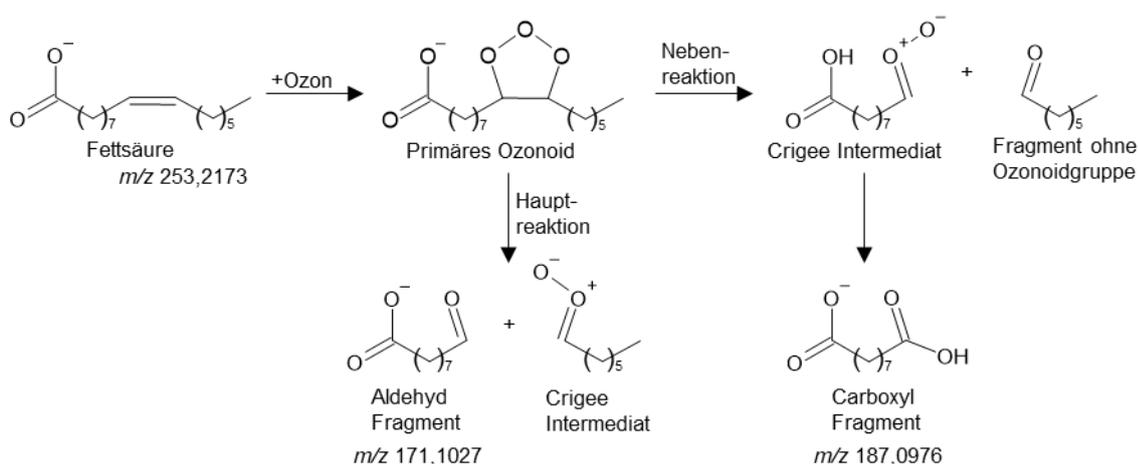


Abbildung 10: Ozonolyse am Beispiel von *cis*- Δ^9 -Hexadecensäure [modifiziert nach [130]].

Jedoch birgt die klassische Ozonolyse auch einige Nachteile. So muss darauf geachtet werden, dass die eingesetzten Materialien Ozon-kompatibel sind. Zudem handelt es sich bei Ozon um ein giftiges Gas, weshalb Herstellung und Verwendung von Ozon mit Risiken verbunden sind [132].

Einen neuen vielversprechenden Ansatz stellt die Verwendung von Plasmaquellen dar [130,133]. Hierbei kommt es zu einer *in-source*-Ozonolyse, anhand derer die Position der Doppelbindungen bestimmt werden kann. Da sich das benötigte Ozon im Plasma in der Ionenquelle bildet, muss es nicht separat generiert werden. Auch die

beschriebenen Nachteile der Ozonolyse können leichter kontrolliert werden. Plasmaquellen sind aktuell allerdings nicht besonders weit verbreitet und in ihrer Anwendung komplex, was die Einsatzfähigkeit der Methode einschränkt.

Paternò-Büchi Reaktion

In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Paternò-Büchi (PB)-Reaktion für die Identifikation von Doppelbindungen zu nutzen [128]. Bei der PB-Reaktion handelt es sich um eine [2+2]-Photocycloaddition eines Ketons oder Aldehyds an eine Doppelbindung. Die gebildeten PB-Produkte, welche sich aufgrund der Anlagerung an der Doppelbindung sterisch unterscheiden, werden mittels MS/MS in zwei diagnostische Fragmente gespalten (Abbildung 11) [134,135]. Bei den meisten in der Literatur beschriebenen PB-Reaktionen geht durch die Spaltung die Information über die Gesamtmasse der Fettsäuren verloren, da die entstandenen Fragmente lediglich aus der Carboxylkette sowie der Alkankette bis zu der gespaltenen Doppelbindung, dem sogenannten α -Ion, bestehen [136]. Einige Reaktanten wie Acetylpyridinen ermöglichen zwar, das als ω -Ion bezeichnete abgespaltene Alkanfragment zu analysieren. Dies findet jedoch zurzeit deutlich seltener Anwendung [108]. Der m/z -Unterschied der entstandenen Fragmente ist hierbei von dem verwendeten Reaktant abhängig, so werden beispielsweise - wie in Abbildung 11 dargestellt - durch die Verwendung von Aceton zwei α -Ionen, eines mit einer Isopropengruppe und eines mit einer Aldehydgruppe, mit einem m/z -Unterschied von 26 Da gebildet [136]. Anhand der entstandenen Fragmente können anschließend Rückschlüsse auf die Position der Doppelbindung getroffen werden.

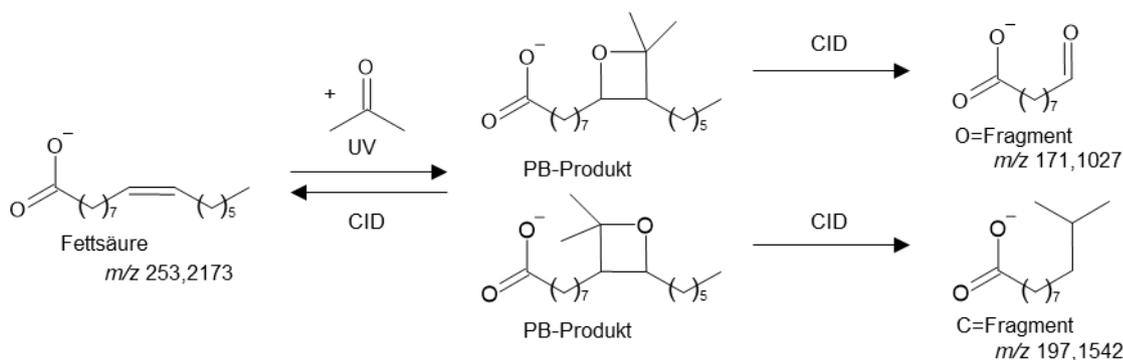


Abbildung 11: Ablauf der Paternò-Büchi Reaktion am Beispiel von *cis*- Δ^9 -Hexadecensäure mit Aceton als Reaktionspartner [modifiziert nach [137]].

Es sind bereits verschiedene Publikationen erschienen, in denen die PB-Reaktion mithilfe eines ESI-MS Systems durchgeführt wurde. Oft wird hierbei auf eine chromatographische Trennung verzichtet, die PB-Reaktion erfolgt kurz vor oder direkt in der Quelle [108,136,138-140]. Die Identifikation der einzelnen Fettsäuren erfolgt hierbei über die Massenübergänge der PB-Reaktion. Um die Vorteile einer chromatographischen Trennung zu nutzen, kann die PB-Reaktion auch als Nachsäulenderivatisierung nach einer HPLC-Trennung durchgeführt werden [141]. Die Messung erfolgte anschließend wie bei den zuvor genannten Publikationen mithilfe von ESI-MS Systemen. Hierbei kann neben den Produkten der PB-Reaktion auch die Retentionszeit der Substanzen für die Identifikation der Fettsäuren herangezogen werden.

Weitere Methoden zur Strukturaufklärung von Fettsäuren

Neben den beschriebenen *post-column*-Derivatisierungen wurden über die Jahre verschiedene andere Strategien für die Bestimmung von Doppelbindungspositionen entwickelt. Beispiele hierfür sind die gezielte Elektronenstoßfragmentierung von organischen Molekülen [142], *fast atom bombardment* [143], *ultraviolet photodissociation* [144] oder der gezielten Fragmentierung von Lithium-Addukten [145]. Diese Methoden haben jedoch im Vergleich zur Ozonolyse und der PB-Reaktion eine deutlich geringere Verbreitung.

1.3 Wirtschaftliche Bedeutung von Fettsäuren

Fettsäuren und Fettsäureanalytik haben nicht nur bei akademischen Fragestellungen eine große Bedeutung, sondern nehmen auch aus wirtschaftlicher Sicht eine entscheidende Rolle ein. Insbesondere im Bereich der Lebensmittelfälschungen kann eine Fettsäureanalytik zur Aufklärung beitragen [10-12]. Lebensmittelfälschungen sind ein entscheidender wirtschaftlicher Faktor, mit dem laut Andreas Hensel, dem Präsidenten des Bundesinstituts für Risikobewertung „*mehr Geld [...] verdient wird als mit Prostitution und Drogenhandel*“ [146]. Während einige wenige entdeckte Fälle eine große mediale Aufmerksamkeit erlangen, wie der sogenannte „Pferdefleischskandal“ im Jahr 2013, werden viele andere Fälle nicht entdeckt [146-148]. In einigen Fällen kann es sogar zu schweren gesundheitlichen Schäden kommen, wie beim Panschen von Olivenöl mit Maschinenöl [146]. Hier können Methoden zur Fettsäureanalytik dazu beitragen, den Verbraucher vor Betrug und Schaden zu bewahren.

Viele Produkte wie Leinsamen, Leinöle oder Walnüsse werben mit ihrem hohen, natürlichen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, insbesondere ω 3-Fettsäuren (Abbildung 12). Daneben gibt es auch eine große Auswahl an Nahrungsergänzungsmitteln, welche mit einem hohen ω 3-Gehalt werben. Lange Zeit konnten zudem auf ω 3-Fettsäuren basierende Medikamente erworben werden. Entgegen des üblicherweise verbreiteten Bildes hat die European Medicines Agency (EMA) jedoch 2019 in einer Stellungnahme bekanntgegeben, dass auf ω 3-Fettsäuren basierte Medikamente nach dem aktuellen Stand der Forschung „*nicht nach einem Herzinfarkt vor weiteren Herzproblemen schützen*“ [149]. Sie können allerdings zur Senkung des Triglyceridgehaltes im Blut eingesetzt werden.

Ø enthalten in 100 ml:
Alpha-Linolensäure (Omega-3)
 Alpha-Linolensäure trägt im Rahmen einer abwechslungsreichen ausgewogenen Ernährung und einer gesunden Lebensweise bei einer täglichen Aufnahme von 2 g (= 4 ml/1 TL Leinöl) zur Aufrechterhaltung eines normalen Cholesterinspiegels im Blut bei.
**Erste kalte Pressung,
 Reich an Omega-3- Fettsäuren**



Abbildung 12: Viele Öle werben mit ihrem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren.

Nahrungsergänzungsmittel, welche nach der deutschen Nahrungsmittelverordnung als „Nahrungsmittel“ eingestuft werden [150], und daher deutlich geringeren gesetzlichen Anforderungen unterliegen als Medikamente, erfreuen sich dennoch einer hohen Beliebtheit. Diese machten laut Angaben der Zeitung *The Guardian* aus dem Jahr 2018 einen Umsatz von 30 Milliarden US-Dollar aus [151]. Viele namenhafte phar-

mazeutische, aber auch chemische Unternehmen sind in diesem Feld tätig, wie beispielsweise Evonik oder BASF [152,153]. Jedoch wird auch in den Medien zunehmend die Wirkung von ω 3-Nahrungsergänzungsmitteln kontrovers diskutiert [151,154].

2 Zielsetzung

Fettsäuren sind zentraler Bestandteil des Stoffwechsels der meisten Organismen und erfüllen verschiedene physiologische und pathophysiologische Funktionen. Unter anderem sind sie an der Kommunikation innerhalb und zwischen Zellen beteiligt, sind Baustein komplexer Lipide oder dienen der Energiespeicherung. Auch nach Dekaden intensiver Forschung ist eine sensitive Detektion von Fettsäuren noch immer eine große Herausforderung. Dies trifft insbesondere auf den sicheren Nachweis sehr geringer Fettsäurekonzentrationen sowie der Identifikation und Quantifizierung freier Fettsäuren bei Anwesenheit anderer Lipide in komplexen Proben zu.

Für die sensitive Detektion von freien und gebundenen Fettsäuren in verschiedenen biologischen Proben wird daher eine zuverlässige Methode zur Bestimmung entwickelt und validiert. Hierzu soll die Derivatisierung von Fettsäuren mittels Pentafluorobenzylbromid verwendet werden. Diese erlaubt die Ionisation der Fettsäuren mittels NCI, APCI und APPI. Die jeweiligen Techniken sollen optimiert und anhand verschiedener analytischer Parameter verglichen werden. Dies soll in Anlehnung an die „*EMA guidelines for bioanalytical method validation*“ erfolgen. Die geeignetste Methode soll anschließend für die Analyse verschiedener biologischer Proben genutzt werden. Dazu zählen Serum- und Plasmaproben, verschiedene Zelllinien aus dem Bereich der Tumordiagnostik und Metastasierung sowie verschiedene archaeale Zelllinien.

Mithilfe der sensitiven und selektiven Methode zur Charakterisierung von Fettsäuren sollen verschiedene Archaeen charakterisiert werden, um zentrale Fragen des *Lipid Divide* zu beantworten. Dieser beschreibt den evolutionären Wechsel von Isoprenoiden zu Fettsäuren bei den Zellmembranlipiden. Hierbei sollen verschiedene Archaeenproben auf das Muster und die Konzentrationen relevanter Fettsäuren untersucht werden. Eine besondere Herausforderung stellt die hohe Hintergrundbelastung sowie die geringen zu erwartenden Fettsäurekonzentrationen dar, welche eine sensitive und selektive Detektion erschweren. Um eine Detektion der Fettsäuren trotz der zu erwartenden Hintergrundbelastung zu ermöglichen, erfolgte die Kultivierung der Archaeen auf einem vollständig ^{13}C -markierten Medium als einzige Kohlenstoffquelle. Sofern die untersuchten Archaeen in der Lage sind, diese Kohlenstoffquelle zur Bildung von Fettsäuren zu nutzen, müssen diese vollständig ^{13}C -markiert vorliegen und

wären somit von Kontaminationen massenspektrometrisch unterscheidbar. Es ist am Beispiel von *Sulfolobus acidocaldarius* und *Haloferax volcanii* zu untersuchen, ob Archaeen generell in der Lage sind, Fettsäuren zu bilden. Aufbauend hierauf sind der Einfluss des Nährmediums, der Einfluss von genetischen Knock-Outs, sowie die biologischen Unterschiede zwischen verschiedenen Archaeengattungen auf die Fettsäurekonzentration zu identifizieren.

Abschließend soll die Methode für non-target oder suspected-target Fragestellungen weiterentwickelt werden, wobei die Bestimmung der Doppelbindungsposition von zentraler Bedeutung ist. Die Position von Doppelbindungen hängt bei Fettsäuren eng mit ihrer biologischen Wirksamkeit zusammen. Aufgrund dessen sind Informationen über die Doppelbindungsposition vom großen analytischen Interesse. Es gibt bereits verschiedene Methoden zur Bestimmung von Doppelbindungspositionen, beispielsweise mithilfe der PB-Reaktion oder der Ozonolyse. Dazu wird die entwickelte GC-APCI Methode an einem QTOF-MS eingesetzt und optimiert. Hierbei soll der Einfluss von UV-Licht sowie eines Reaktanten auf die Fragmentation in der Ionenquelle untersucht werden und die Anwendbarkeit der Methode für unterschiedliche einfach- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren soll überprüft werden. Die Leistungsfähigkeit soll anschließend anhand der Analyse von Fischölproben demonstriert werden. Fischöl ist ein weit verbreitetes Nahrungsergänzungsmittel, welches einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren besitzt. Häufig beschränken sich Analysen jedoch nur auf wenige ungesättigte Fettsäuren, vor allem Eicosapentaensäure (FA 20:5) und Docosahexaensäure (FA 22:6), welche in großen Mengen in Fischöl vorhanden sind. Es ist zu untersuchen, welche Fettsäuren neben den bekannten Fettsäuren in Fischöl zu finden sind, und an welcher Position ihre Doppelbindungen vorkommen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Proben

3.1.1 Fettsäurestandards

Tabelle 2: Liste aller verwendeten Fettsäurestandards (ohne Deuterierung).

IUPAC	Trivialname	Summenformel	Abkürzung	Bezugsquelle
Hexansäure	Capronsäure	C ₆ H ₁₂ O ₂	FA 6:0	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
Octansäure	Caprylsäure	C ₈ H ₁₆ O ₂	FA 8:0	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
Decansäure	Caprinsäure	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	FA 10:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Dodecansäure	Laurinsäure	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	FA 12:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Tetradecansäure	Myristinsäure	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	FA 14:0	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
Hexadecansäure	Palmitinsäure	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	FA 16:0	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
<i>cis</i> - Δ^9 -Hexadecensäure	Palmitoleinsäure	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	FA 16:1	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
Octadecansäure	Stearinsäure	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	FA 18:0	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
<i>cis</i> - Δ^8 -Octadecensäure	<i>cis</i> -8-Octadecensäure	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	FA 18:1	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
<i>cis</i> - Δ^9 -Octadecensäure	Ölsäure	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	FA 18:1	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
<i>trans</i> - Δ^9 -Octadecensäure	Elaidinsäure	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	FA 18:1	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
<i>cis</i> - Δ^{11} -Octadecensäure	Vaccensäure	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	FA 18:1	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
<i>cis-cis</i> - $\Delta^{9,12}$ -Octadiensäure	Linolsäure	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	FA 18:2	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
<i>all-cis</i> - $\Delta^{9,12,15}$ -Octatriensäure	α -Linolensäure	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	FA 18:3	Merck, (Darmstadt, Deutschland)
<i>all-cis</i> - $\Delta^{6,9,12}$ -Octatriensäure	γ -Linolensäure	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	FA 18:3	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Eicosansäure	Arachinsäure	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	FA 20:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
<i>all-cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure	Arachidonsäure	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	FA 20:4	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
<i>all-cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eicosapentaensäure	<i>Eicosapentaensäure</i>	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	FA 20:5	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)

Docosansäure	Behensäure	$C_{22}H_{44}O_2$	FA 22:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
<i>all-cis-Δ</i> ^{7,10,13,16,19} -Docosapentaensäure	<i>Docosapentaensäure</i>	$C_{22}H_{34}O_2$	FA 22:5	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
<i>all-cis-Δ</i> ^{4,7,10,13,16,19} -Docosahexaensäure	<i>Docosahexaensäure</i>	$C_{22}H_{32}O_2$	FA 22:6	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Tetracosansäure	Lignocerinsäure	$C_{24}H_{48}O_2$	FA 24:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
Hexacosansäure	Cerotinsäure	$C_{26}H_{52}O_2$	FA 26:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 3: Liste aller als interner Standard eingesetzter, deuterierter Fettsäuren.

IUPAC	Trivialname	Summenformel	Abkürzung	Bezugsquelle
² H ₂ -Decansäure	D ₂ -Caprinsäure	$C_{10}H_{20}O_2$	² H ₂ -FA 10:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
² H ₂ -Pentadecansäure	D ₂ -Pentadecansäure	$C_{15}H_{30}O_2$	² H ₂ -FA 15:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
² H ₄ -Octadecansäure	D ₄ -Stearinsäure	$C_{18}H_{36}O_2$	² H ₄ -FA 18:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
² H ₈ - <i>all-cis-Δ</i> ^{5,8,11,14} -Eicosatetraensäure	D ₈ -Arachidonsäure	$C_{20}H_{32}O_2$	² H ₈ -FA 20:4	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)
² H ₄ -Tetracosansäure	D ₄ -Lignocerinsäure	$C_{24}H_{48}O_2$	² H ₄ -FA 24:0	Biomol GmbH, (Hamburg, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien

Acetone (≥99.9%), Ammoniumacetat (≥99.9%), Chlorobenzol (≥98 %), Chloroform (≥99.9 %), Diethylether (≥99.0 %), Essigsäure (≥99.9 %), Methyl tert-Butylether (MTBE; ≥99.9 %), N,N-Diisopropylethylamin (≥99.5 %), N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (≥98.5 %), 2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid (≥98.5 %), Tetrahydrofuran (≥99.9 %) und Toluol (≥99.9 %) wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) beschafft. Dichlormethan (≥99.8 %) wurde von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogen. Acetonitril (≥99.9%), Benzol (≥99.0 %), Methanol (≥99.9 %) und 2-Propanol (≥99.9 %) wurden von Avantor (Darmstadt, Deutschland) erworben. Glycerol (≥99.5 %) wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) beschafft. Kaliumhydroxid (≥85 %) wurde von AnalytiChem GmbH (Duisburg, Deutschland) bezogen. Ultrapureinstwasser mit einer Leitfähigkeit von 18.2 M Ω/cm (im folgendem als „Wasser“ bezeichnet) wurde mithilfe des Reinstwassersystems *Arium pro VF* von Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland) erzeugt.

Methan (4.5), Helium (5.0) und Stickstoff (5.0) wurden von Air Liquide Deutschland GmbH, (Düsseldorf, Germany) erworben.

3.1.3 Proben

Humanserum und Humanplasma wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. Alle untersuchten Archaeenproben wurden vom AK Molekulare Enzymtechnologie von Prof. Dr. Bettina Siebers (Universität Duisburg-Essen) von den Doktoranden Xiaoxiao Zhou und Christian Schmerling kultiviert. Die Zelllinien ASPC1, Panc1, PatuT, PatuS, YAPC und YAPCS3 wurden von AG Grüner: Zellplastizität und Metastasierung der Inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen kultiviert und zu Aliquoten mit je 1 Millionen Zellen aliquotiert. Die Rattenserum wurden von AG Littwitz-Salomon des Instituts für translationale HIV-Forschung des Universitätsklinikums Essen erhalten.

3.2 Gerätekonfigurationen

3.2.1 Gaschromatographische Bestimmung von Fettsäuren

Messung der Fettsäuren mittels GC-APCI-QqQ-MS

Die APCI-Messungen erfolgten mit einem Agilent 7890B GC, welche mit einem G4567A Autoinjektor und einer DB-5-Säule (30 m x 250 µm x 0,25 µm), beide von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland), ausgestattet war. Der GC wurde mit einer kommerziellen APCI-Quelle (G312-69,100) sowie einem 6495 Triple Quadrupole MS von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) gekoppelt. Ein Probenvolumen von 1 µL wurde in den Liner bei 320 °C injiziert, welcher *splitless* oder mit einem Split von 1:10 und einem *Septum Purge Flow* von 1,5 mL/min betrieben wurde. Der Säulenfluss betrug 1,3 mL/min mit Helium als Trägergas. Der Temperaturgradient startete bei 100 °C, mit 15 °/min auf 160 °C gesteigert, und dann linear mit 5 °/min auf 320 °C. Diese Temperatur wurde dann 5 min gehalten. Die Säule wurde über eine 320 °C heiße *Transfer Line* an die APCI-Quelle gekoppelt. Über ein T-Stück wurde ein *Auxillary Gas* 1 L/min Stickstoff, beigefügt [155]. Die APCI-Quelle wurde mit folgenden Parametern betrieben: *Corona Current* 35 µA, *Source Gas Flow* 11 L/min, *Source Gas*

Temperature 270 °C, Cell Acceleration Voltage 5 V und Capillary Voltage 2000 V. Die Ionisation erfolgte im *negative-Mode*, der Triplequadrupol wurde im *pseudo* Multiple Reaction Monitoring (*pMRM*) betrieben. Bei der *pseudoMRM*-Methode sind Q1 und Q3 auf dieselbe Masse eingestellt, während der q2 ohne angelegte *Collision Energy* betrieben wird. Insgesamt sind in der Methode 75 verschiedene Transitionen enthalten, welche im Anhang in Tabelle 10 und Tabelle 11 einzusehen sind. Für einige Fragestellungen wurde das Massenspektrometer im Scan Modus (333 ms/spectra) betrieben.

Messung der Fettsäuren mittels GC-APPI-QqQ-MS

Die APPI-Messungen wurden mit dem oben beschriebenen System durchgeführt. Hierbei wurden für die chromatographische Trennung dieselben Parameter verwendet. Die Ionenquelle wurde für die APPI-Messungen modifiziert. Die APCI-Nadel wurde entfernt und eine Stahlkapillare wurde in die Quelle eingebaut, mit deren Hilfe über eine Spritzenpumpe ein Dopant in die Quelle eingebracht wurde. Das Fenster der APCI-Quelle wurde ausgebaut, und an dessen Stelle eine Krypton VUV- Lampe (Heraeus, Hanau, Deutschland) eingebaut (10,6 eV, $\lambda = 100\text{--}190$ nm). Die APPI-Quelle wurde mit folgenden Parametern betrieben: *Auxillary Gas Flow 4 L/min, Source Gas Flow 11 L/min, Source Gas Temperature 200 °C, Cell Acceleration Voltage 5 V und Capillary Voltage 2400 V.* Die Ionisation erfolgte im *negative-Mode*, der Triple Quadrupol wurde, wie bei den APCI-Messungen, im *pMRM* betrieben.

Messung der Fettsäuren mittels GC-NICI-Q-MS

Die NICI-Messungen erfolgten mit einem Shimadzu QP2010 Ultra GC-MS, welche mit einem AOC-20i Autoinjector von Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) und einer Zebron ZB-5MS Säule (30 m x 250 μm x 0,25 μm) von Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) ausgerüstet war. Die Säule besitzt vergleichbare Trenneigenschaften zu der oben beschriebenen DB-5 Säule. Die chromatographische Trennung erfolgte mit den oben genannten Parametern. Die NICI-Messungen wurden mithilfe einer Multimode-Quelle von Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) und mit Methan als Reaktantgas durchgeführt. Die Quelltemperatur betrug 280 °C. Alle weiteren Parameter wurden durch die geräteeigene Software automatisiert mithilfe der Autotune-Funktion optimiert. Die Messungen erfolgten im SIM-Mode, wobei die im Anhang in Tabelle 10 aufgeführten *m/z*-Verhältnisse detektiert wurden.

Untersuchung der Archaeen mittels GCxGC-EI-Q-MS

Die GCxGC-Messungen erfolgten mit einem Shimadzu QP2010 Ultra GC-MS, welcher mit einem AOC-20i Autoinjector von Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) ausgerüstet war. Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte mithilfe einer Rxi5Sil-MS-Säule (30 m x 250 µm x 0,25 µm), die Trennung in der zweiten Dimension erfolgte mithilfe einer Rxi5Sil-MS-Säule (1 m x 150 µm x 0,15 µm). Die Modulation erfolgte über einen Jet-Loop-Modulator (ZOEX Corporation, Houston, Texas, USA) und einer Modulationszeit von 3,8 s. Ein Probenvolumen von 1 µL wurde in einen 280 °C heißen *Liner* injiziert, welcher mit einem Split von 1:2 und einem *Septum Purge Flow* von 1,5 mL/min betrieben wurde. Der Säulenfluss betrug 1,3 mL/min mit Helium als Trägergas. Der Temperaturgradient startete bei 100 °C mit 15 °/min auf 110 °C, anschließend linear mit 10 °/min auf 320 °C. Diese Temperatur wurde dann 5 min gehalten. Die Säule wurde über eine 320 °C heiße *Transfer Line* an die EI-Quelle von Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland) gekoppelt. Die EI-Quelle wurde mit einer Temperatur von 230 °C und einem Scan-Bereich von *m/z* 45-500 betrieben.

3.2.2 Untersuchung der Aminosäuren mittels LC-ESI-QToF-MS

Die LC-Messung erfolgte an einem 1290 Infinity II LC System mit einer *Agilent AdvanceBio MS Spent Media* (2,1 x 150 mm), jeweils von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland). Als mobile Phasen A wurden 10 mM Ammoniumacetat in Wasser (pH 9) verwendet, mobile Phase B bestand aus 10 mM Ammoniumacetat in Acetonitril/Wasser (9/1, v/v) (pH 9). Der Gradient startete für 2 min bei 90% B, sank bis zu Minute 12 auf 40% B, und dann auf 20 % B bis Minute 13. Dieser Eluent wurde bis zur 16. Minute gehalten und anschließend innerhalb einer Minute auf die Ausgangsbedingungen gebracht. Die Flussrate betrug 0,25 mL/min.

Die Kopplung mit einem Agilent 6546 Q-ToF-MS von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) erfolgte über eine GC-ESI-Quelle (G1958-65138; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Folgende Parameter wurden verwendet: Temperatur 250 °C, 10 L/min *Drying Gas* (Stickstoff), *Nebulizer* 40 psi, *Sheat Gas Temperature* 300 °C, *Sheat Gas Flow* 12 L/min, *Capillary Voltage* 3000 V, *Nozzle Vol-*

tage 0 V, *Fragmentor Voltage* 125 V und *Skimmer Voltage* 85 V. Das QToF-MS System wurde mit einem Massenbereich von m/z 50-1000 mit 333 ms/spectra im *negative-Mode* betrieben.

3.2.3 Identifikation der Doppelbindungsposition mittels GC-APCI-QToF-MS

Die GC-Analysen zur Bestimmung der Doppelbindungsposition wurden mit einem Agilent 7890B GC von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland), ausgestattet mit einer DB-5-Säule (30 m × 250 µm × 0,25 µm) und einem Agilent G4567A Autoinjektor, welcher bei einer Temperatur von 320 °C im *splitless mode* oder mit einem Splitverhältnis von 1:10 betrieben wurde, durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,3 mL/min eingesetzt. Bei der Methodenentwicklung wurden die Messungen der Einzelstandards mithilfe einer verkürzten Methode durchgeführt. Hierbei wurde eine Starttemperatur von 100 °C verwendet, welche linear um 40 °/min auf 320 °C gesteigert und anschließend 3 min gehalten wurde. Für alle weiteren Messungen wurde, wie zuvor für die APCI-Messungen beschrieben, eine Starttemperatur von 100 °C verwendet, welche linear mit 15 °/min auf 160 °C, anschließend linear mit 5 °/min auf 320 °C erhöht und 5 min gehalten wurde. Die Kopplung mit einem Agilent 6546 Q-ToF-MS von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) erfolgte über eine GC-APCI-Quelle (G312-69,100; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die GC-Säule wurde über eine beheizte Transferkapillare bei 320 °C mit der Ionenquelle gekoppelt. Über ein T-Stück wurde ein *Auxillary-Gas* (0,3 L/min Stickstoff) in die Quelle eingeführt [155]. Die Verringerung des *Auxillary-Gas-Flow* im Vergleich zu der für die GC-APCI-QqQ-MS beschriebenen Methode war notwendig, da dieses durch eine Gasflasche geleitet wurde, welche bei Bedarf mit Benzaldehyd gefüllt werden konnte. Sofern UV-Licht in der Quelle benötigt wurde, wurde das Fenster der APCI-Quelle mit einem UVP Pen-Ray (Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts) ersetzt, einer Quecksilberlampe mit einem Emissionsmaximum von 254 nm Wellenlänge. Die APCI-Quelle wurde mit folgenden Parametern betrieben: Temperatur 300 °C, 10 L/min *Source Gas Flow* (Stickstoff), *Capillary Voltage* 2000 V und *Corona Current* 40 µA. Das QToF-MS System wurde mit einem Massenbereich von m/z 40-700 mit 200 ms/spectra im *negative-Mode* betrieben. Die *Fragmentor Voltage* betrug 150 V und die *Skimmer Voltage* 80 V.

3.3 Experimenteller Teil

3.3.1 Hydrolyse der Lipide

Bei der Untersuchung des Gesamtfettsäuregehaltes wurde vor der Lipidextraktion eine Hydrolyse durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in 100 μL IS-Mix, bestehend aus den unter Kapitel 3.1.1 aufgeführten internen Standards, und 60 μL Kaliumhydroxid (10 M) gelöst. Die Proben wurden 5 min in einem gekühlten Ultraschallbad homogenisiert und danach für 30 min bei 60 °C mithilfe eines Ultraschallbades inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch die Zugabe von 70 μL Essigsäure (50 %) beendet, wobei die Proben mit Eis gekühlt wurden. Anschließend wurde die Extraktion wie bei den freien Fettsäuren durchgeführt.

3.3.2 Lipidextraktion

2-Propanol (Archaeen)

Bei der Extraktion der Lipide aus dem kompletten Pellet wurde ein Zellpellet (0,5 - 1 g) in 5 mL 2-Propanol suspendiert und in ein 15 mL Greiner-Gefäß überführt. Die Zellen wurden 1 h im Ultraschallbad sonifiziert und für 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Glasvial überführt und danach im Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Anschließend wurde der getrocknete Überstand mit PFB derivatisiert, wobei abweichend vom Protokoll die Derivatisierung mit je 75 μL der Derivatisierungsreagenzien durchgeführt wurde und die derivatisierten Fettsäuren wurden abschließend in 1 mL Methanol aufgenommen.

Chloroform (Archaeen)

Die Extraktion der freien Fettsäuren erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bligh und Dyer [156]. Die Archaeenzellen (20 mg) wurden in einem Glasvial mit 750 μL Methanol, 750 μL Chloroform und 2 μL Essigsäure gelöst und 45 min in einem gekühlten Ultraschallbad beschallt, wobei die Proben alle 15 min für 1 min mithilfe eines Kreisschüttlers durchmischt wurden. Die Probe wurde 3 min bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde mit 375 μL Methanol und 375 μL Chloroform erneut gewaschen. Die Überstände wurden im Vakuumrotationsverdampfer bei 45 °C getrocknet.

MTBE (Plasma, Serum, Archaeen und Fischöl)

Die Extraktion der freien Fettsäuren erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Matyash *et al.* [157]. Hierbei wurden 10 µL Plasma, Serum oder eine definierte Menge an Archaeen (20-200 mg Zellpellet) mit 100 µL IS-Mix versetzt (je 500 nM) und mit 5 µL Essigsäure angesäuert. Die Proben wurden mit 200 µL Methanol versetzt und danach 5 min in einem gekühlten Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit 600 µL MTBE versetzt und 5 min mithilfe eines Kreisschüttlers durchmischt. Nach der Zugabe von 300 µL Wasser wurden die Proben erneut 5 min mithilfe eines Kreisschüttlers durchmischt. Die obere, organische Phase wurde in ein anderes Vial überführt, die untere Phase wurde erneut mit 300 µL MTBE extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mithilfe eines Vakuumrotationsverdampfer bei 45 °C getrocknet.

Automatisierte Lipidextraktion mittels Multipurpose Sampler

Für die Bestimmung der freien Fettsäuren wurden 1 Millionen Tumorzellen mit Methanol und Wasser in ein Glasvial überführt und mit internem Standard versetzt (2 µM Endkonzentration). Für die Bestimmung des Gesamtfettsäuregehaltes wurden die Proben zunächst hydrolysiert (siehe Kapitel 3.3.1) und danach wie bei der Bestimmung der freien Fettsäuren aufgearbeitet.

Der *Multipurpose Sampler (MPS Pro)* der Firma Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Deutschland) wurde zusammen mit Pia Wittenhofer für die Extraktion der von der AG Grüner kultivierten Zelllinien eingesetzt. Die Extraktion erfolgte mit der im Folgenden beschriebenen Methode: 5 µL Essigsäure sowie 300 µL Methanol, 500 µL MTBE und 500 µL Wasser wurden hinzugegeben, wobei die Proben nach jedem Schritt geschüttelt wurden (5 min, 2000 rpm). Anschließend wurde die Proben zentrifugiert (5 min, 4500 g) und 300 µL der oberen organischen Phase in ein neues Vial überführt. Zur verbleibenden wässrigen Phase wurden 100 µL Methanol und 300 µL MTBE gegeben und erneut geschüttelt (5 min, 2000 rpm). Nach der Zugabe von 100 µL Wasser wurde wieder geschüttelt (5 min, 2000 rpm) und anschließend zentrifugiert (5 min, 4500 g). Es wurde 300 µL der oberen organischen Phase entnommen und mit der organischen Phase aus dem ersten Extraktionsschritt vereint. Beim dritten Extraktionsschritt wurden 300 µL MTBE zu der wässrigen Phase gegeben, geschüttelt (5 min, 2000 rpm) und zentrifugiert (5 min, 4500 g). Von der oberen organischen Phase wurden 400 µL entnommen und die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet. Die Trocknung

der Proben erfolgte für 10 min im Rotationsverdampfer bei 250 rpm, einer Temperatur von 50 °C sowie einem Druck von 600 mbar, welcher nach 5 min auf 100 mbar reduziert wurde. Anschließend wurden die Proben entnommen und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Derivatisierung von Lipiden

Die getrockneten Lipidextrakte wurden in 20 µL Diisopropylethylamin in Dichlormethan (1/9; v/v) gelöst. Es wurden 20 µL Pentafluorobenzylbromid in Dichlormethan hinzugegeben (1/9; v/v) und die Proben wurden für 60 min bei 50 °C in einem Aluminiumtrockenbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mittels Vakuumverdampfers bei 45 °C getrocknet, in 100 µL Methanol aufgenommen und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

3.3.4 Festphasenextraktion

Eine C18-Festphasenextraktionssäule (*SPE Superclean LC-18* von Supelco (Traufkirchen, Deutschland)) wurde mit 10 mL Methanol und anschließend mit 10 mL Wasser-Methanol-Gemisch (95/5, v/v) konditioniert. Die Lipidextrakte wurden in 2 mL Methanol/Wasser-Gemisch gelöst (20/80; v/v) und mit 80 µL Essigsäure angesäuert. Die Probe wurde auf die konditionierte Säule gegeben und die Säule wurde mit 5 mL Wasser-Methanol-Gemisch (95/5, v/v) gewaschen und mit dem angelegten Vakuum getrocknet. Die auf der Säule retardierten Lipide wurden anschließend mit 10 mL Methanol eluiert und das Lipidextrakt wurde mit einem Rotationsverdampfer bei 30 °C getrocknet.

3.4 Software

Für die Planung der *Design-of-Experiments* (DoE) wurde Modde, Version 12.1, (Sartorius, Goettingen, Deutschland) verwendet. Die Datenauswertung bei APCI-QqQ-MS und APPI-QqQ-MS erfolgte mithilfe von Skyline-daily, Version 21.0.9.118 (MacCoss Lab, UW, Washington, USA).

Die Datenauswertung der NICI-Q-MS und EI-Q-MS Messungen erfolgte mithilfe von LabSolutions, GCMSsolution Version 4.45SP1 von Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg Deutschland). Die Visualisierung der GCxGC-Messungen erfolgte mithilfe von GC-Image, Version 2.0b5 (ZOEX Corporation, Houston, Texas, USA).

Die Berechnung der Kalibrationsgeraden für den Vergleich der APCI-, APPI- und NICI-Quelle wurde mit GraphPad Prism, Version 5.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Die Chromatogramme der APCI-QToF-Messungen wurden mit einer *Function width* von 25 Punkten und einer *Gaussian width* von 10.000 Punkten mithilfe der Mass Hunter Workstation Software, Qualitative Analysis Navigator Version B.08.00 Build 8.0.8208.0 von Agilent Technologies, Waldbronn (Deutschland) geglättet und ausgewertet.

Grafiken wurden mit Excel und PowerPoint erstellt. Die Doktorarbeit wurde mit Word geschrieben was auch zur Prüfung von Rechtschreibung und Grammatik verwendet wurde (Microsoft 365, Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Die Gerätesteuerung der GC-MS Systeme erfolgte über Mass Hunter Workstation Software GC/MS Acquisition (Version B.08.02) von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland), beziehungsweise über LabSolutions, GCMSsolution Version 4.45SP1 von Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg Deutschland). Die Steuerung des Multipurpose Samplers erfolgte über Gerstel Maestro Version 1.5.4.27 (Mühlheim an der Ruhr, Deutschland).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung einer sensitiven Detektionsmethode für Fettsäuren

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten sind in der Publikation "Potential of atmospheric pressure ionization sources for the analysis of free fatty acids in clinical and biological samples by gas chromatography-mass spectrometry" 2022 in Zusammenarbeit mit P. Wittenhofer J.F. Ayala-Cabrera und S.W. Meckelmann bei Analytical and Bioanalytical Chemistry 414, 6621–6634 veröffentlicht worden [158]. (<https://doi.org/10.1007/s00216-022-04223-z>) Des Weiteren sind Daten enthalten, welche in Kooperation mit AG Grüner: Zellplastizität und Metastasierung der Inneren Klinik (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen und AG Littwitz-Salomon des Instituts für translationale HIV-Forschung des Universitätsklinikums Essen entstanden sind. Die Daten aus der Kooperation mit Frau Littwitz-Salomon wurden unter dem Titel „Fatty acids are crucial to fuel NK cells upon acute retrovirus infection“ 2023 in Zusammenarbeit mit S. Schimmer, T. Werner, S. W. Meckelmann, D. Mittermüller, K. Finlay, U. Dittmer und E. Littwitz-Salomon bei Frontiers in Immunology 14:1296355 veröffentlicht [159]. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1296355>)***

** This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.*

*** Copyright © 2023 Schimmer, Mittermüller, Werner, Görs, Meckelmann, Finlay, Dittmer and Littwitz-Salomon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*

4.1.1 Einleitung

PFB-Derivate haben den Vorteil, dass sie sehr effizient im *negative-Mode* ionisiert werden können, während viele andere Substanzen oft nicht, oder nur ineffizient, im *negative-Mode* ionisierbar sind. Da auch moderne GC-Atmosphärenquellen in der Lage sind, eine weiche Ionisation im *negative-Mode* durchzuführen, wurden zunächst eine

APCI-, eine APPI- und eine NCI-Quelle für die Analyse von Fettsäuren optimiert und anschließend in Bezug auf ihre analytischen Kenngrößen wie Nachweisgrenzen, Bestimmungsgrenzen und dem Bestimmtheitsmaß der Kalibration miteinander verglichen. Die GC-Bedingungen sind hierbei für alle Messungen konstant gehalten worden, sodass gemessene Unterschiede auf die verwendeten Quellen zurückzuführen sind. Die MS-Bedingungen wurden bei den jeweiligen Quellen wie im Folgenden beschrieben optimiert.

4.1.2 Methodenoptimierung

Optimierung der Derivatisierung

GC-Methoden zur Fettsäureanalytik erfordern häufig einen Derivatisierungsschritt. Hierzu bieten sich verschiedene Reaktionen an, wie Methylierungs- oder Silylierungsreaktionen (Abbildung 6) [63,64,66]. Meist werden Derivatisierungen dazu genutzt, um die Flüchtigkeit von Substanzen zu verbessern, sie haben aber auch einen Einfluss auf ihr Ionisationsverhalten. So ermöglicht eine Derivatisierung mit PFB eine selektive Ionisierung der Analyten im *negative-Mode* [52,57,74]. Um die Sensitivität der Methode zu maximieren, wurde zunächst die Derivatisierung optimiert. Das Ziel hierbei war die Maximierung des Analytsignals, während Kontaminationen möglichst minimiert werden sollten.

Die Vermeidung von Kontaminationen ist eine große Herausforderung bei der Fettsäureanalytik. Vor allem Palmitinsäure (FA 16:0) und Stearinsäure (FA 18:0), in geringeren Mengen auch andere kurz- bis mittellange Fettsäuren kommen in der Umwelt ubiquitär vor [51-54], und können oft nur minimiert, aber nicht verhindert werden. Um eine kontaminationsbedingte Erhöhung der Nachweisgrenzen zu verhindern, wurden die verwendeten Chemikalien und Laborausstattung auf ihren jeweiligen Einfluss auf die Hintergrundkontamination untersucht und diese so weit wie möglich minimiert.

Um das Volumen des Derivatisierungsreagenzes zu optimieren, wurde die PFB-Derivatisierung der Fettsäure $^2\text{H}_2\text{-FA 15:0}$ (1 μM) mit verschiedenen Volumina an Derivatisierungsreagenz durchgeführt, wobei die Konzentration konstant bei 10% gehalten wurde. Anschließend wurden die Proben mittels GC-APCI-QqQ-MS analysiert. Der deuterierte Standard wurde gewählt, um kontaminationsbedingte Schwankungen zu vermeiden. Die Intensität des Analyten weist keine signifikanten Unterschiede auf

(t-Test; p-Wert >0,05; 2-seitig, heteroskedastisch), die Intensität der Hintergrundkontamination steigt hingegen mit dem eingesetzten Volumen an (Abbildung 13 A). Um diese zu minimieren, wird daher ein Volumen von 20 μL für die Derivatisierung eingesetzt.

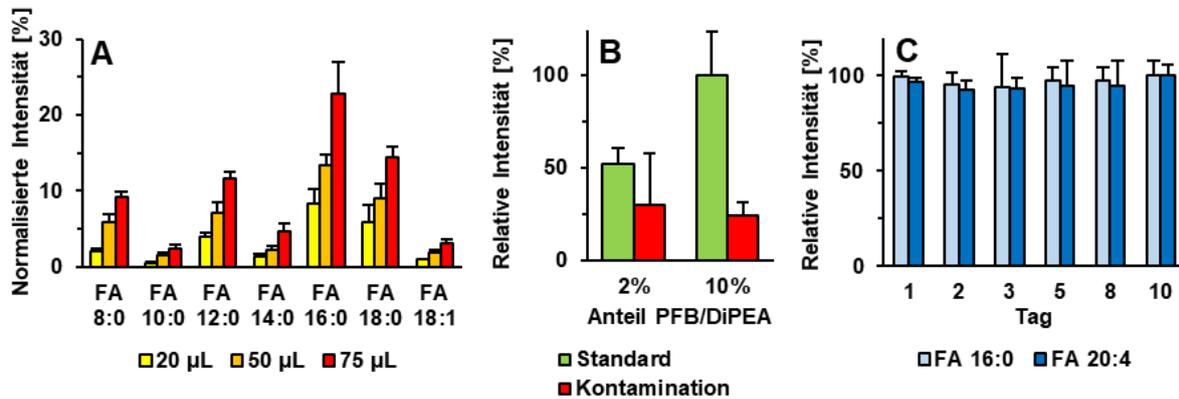


Abbildung 13: Optimierung der PFB-Derivatisierung. A: Einfluss des Volumens an Derivatisierungsreagenz auf die Hintergrundkontamination der Fettsäuren FA 8:0, FA 10:0, FA 12:0, FA 14:0, FA 16:0 und FA 18:0. Höhere Volumina des Derivatisierungsreagenz führen zu höheren Intensitäten an Hintergrundkontaminationen, während sich die Intensität des internen Standards $^2\text{H}_2\text{-FA 15:0}$ (1 μM) nicht signifikant ändert. **B:** Einfluss der Konzentration des Derivatisierungsmittels (2 und 10 %) auf die Intensität der Analyten und Hintergrundkontamination. Der interne Standard $^2\text{H}_2\text{-FA 15:0}$ (1 μM) zeigt einen Anstieg der Intensität, während die Intensität der Hintergrundkontaminationen sich nicht signifikant ändert. **C:** Die Stabilität der PFB-Derivate bei Raumtemperatur wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen untersucht [modifiziert nach [158]].

Bei der Konzentration des Derivatisierungsmittels gibt es je nach Publikation starke Unterschiede [57,71,160]. Um diese zu optimieren, wurde die zuvor verwendete 10%ige Lösung mit einer 2%igen Lösung verglichen. Hierzu wurde wie zuvor $^2\text{H}_2\text{-FA 15:0}$ (1 μM) derivatisiert und analysiert. Die Intensität des Analyten wurde anschließend mit der Intensität der aus den zu vorigen Messungen bekannten Kontaminationen verglichen (Summe aus FA 8:0 bis FA 18:1, siehe Abbildung 13 A). Während kein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Derivatisierungsreagenzien und den Hintergrundkontaminationen festzustellen ist (t-Test; p-Wert >0,05), ist die Intensität der Analyten bei Derivatisierung mittels des 10%igem Derivatisierungsreagenz sehr signifikant (t-Test; p-Wert $\leq 0,01$) erhöht (Abbildung 13 B). Dies kann auf eine unvollständige Derivatisierung bei Verwendung des 2%igen Derivatisierungsreagenz zurückgeführt werden. Um eine vollständige Derivatisierung der Fettsäuren zu erreichen, wurde daher im Folgenden 10%iges Derivatisierungsreagenz eingesetzt.

Die Stabilität der Analyten ist bei analytischen Studien von großer Bedeutung. Kommt es während einer Messequenz zu einer Zersetzung der Analyten, kann dies zu systematischen Fehlern führen. Zudem ist bekannt, dass die Ionisierungseffizienz von APCI-Quellen größeren Schwankungen als andere Ionenquellen im gaschromatographischen Bereich unterliegt [96,105,106]. Um diese Faktoren zu untersuchen, wurden 10 µM Palmitinsäure (FA 16:0) und Arachidonsäure (FA 20:4) derivatisiert, 10 µM Stearinsäure (FA 18:0) wurde als interner Standard verwendet. Die Lösung wurde auf fünf verschiedene Vials aufgeteilt, welche über einen Zeitraum von zehn Tagen bei Raumtemperatur gelagert und in regelmäßigen Abständen mittels GC-APCI-MS analysiert wurden. Es konnte über den untersuchten Zeitraum kein Absinken der relativen Signalintensität festgestellt werden (Abbildung 13 C), sowohl die gesättigten wie auch ungesättigten Fettsäurederivate sind somit lagerstabil. Auch bei der absoluten Signalintensität der drei untersuchten Fettsäuren (siehe Anhang, Abbildung 40) kann ein solcher Trend nicht festgestellt werden, wobei die Standardabweichungen und die Abweichungen zwischen den verschiedenen Tagen hier, wie erwartet, deutlich höher sind.

Optimierung der Ionisierungs- und Detektionsparameter

Um die Sensitivität und Selektivität der Methode zu maximieren, wurden verschiedene Ionisierungsparameter optimiert. Für die APCI-Quelle wurden die durch die Software steuerbaren Parameter (*Corona Current*, *Source gas flow*, *Source gas temperature*, *Nitrogen auxiliary gas flow* und *Capillary voltage*) untersucht. Zur Reduktion der hierzu notwendigen Experimente wurde ein DoE-Ansatz mit einem *Lineare Process Model* gewählt. Dieses umfasste insgesamt 61 Experimente (Abbildung 14 A) was einen guten Kompromiss zwischen Genauigkeit des Modells und der Anzahl der hierfür benötigten Experimente darstellte. Als Standards wurden Palmitinsäure (FA 16:0), Stearinsäure (FA 18:0) und Arachidonsäure (FA 20:4) mit einer Konzentration von je 1 µM untersucht.

Das Model zeigt, dass *Corona Current*, *Gas flow* und *Gas Temperature* die einflussreichsten Faktoren für die Ionisierung von PFB-Derivaten sind, während andere Faktoren lediglich einen geringen Einfluss aufweisen. Im direkten Vergleich zwischen den ursprünglichen Parametern vor der Optimierung und den durch die Optimierung erhaltenden Parametern zeigt sich, dass die Peakintensitäten bei den untersuchten

Fettsäuren verfünffacht, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verdoppelt wurde (Abbildung 14 B).

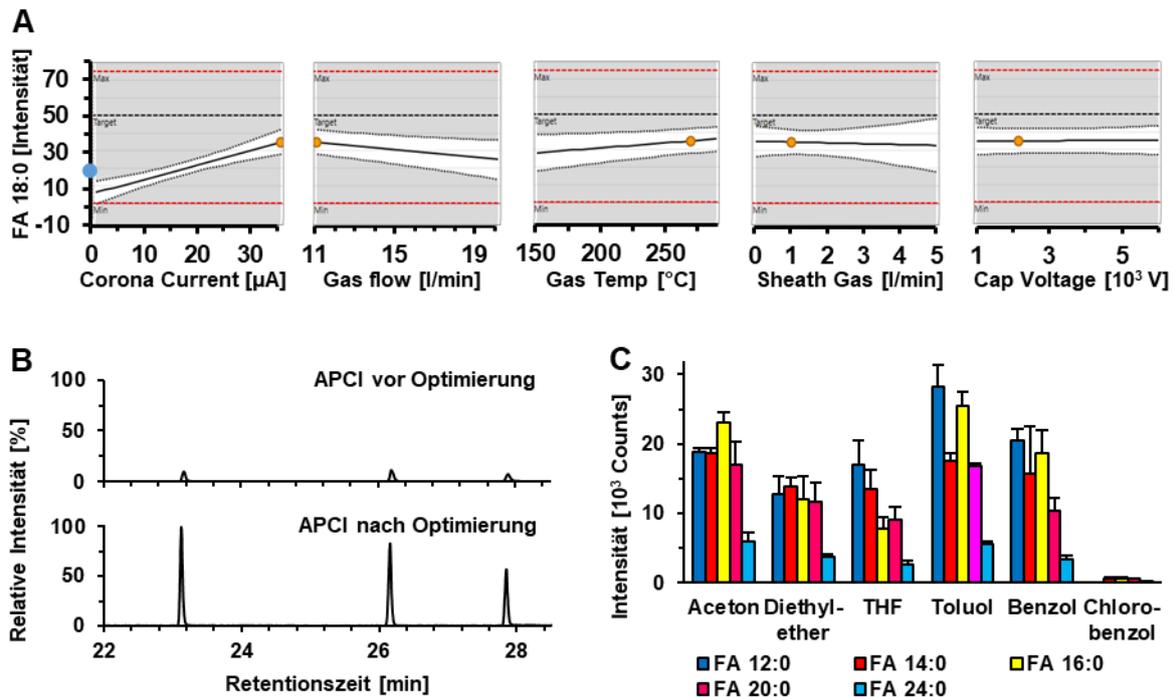


Abbildung 14: Optimierung der Atmosphärendruckionenquellen. A: Die Ionisationsbedingungen der APCI- und APPI-Quelle wurden mithilfe eines DoE-Modells optimiert. Gezeigt ist die Optimierung der APCI-Quelle mit FA 18:0. **B:** Die Optimierung der APCI-Methode führte zu einem deutlichen Anstieg der Sensitivität. Die Chromatogramme zeigen FA 16:0, FA 18:0, und FA 20:4 mit einer Konzentration von je $1 \mu\text{M}$ welche vor (oben) und nach (unten) der Optimierung gemessen wurden. Hierbei zeigte sich nach der Optimierung eine Verfünffachung des analysierten Signals. **C:** Einfluss von verschiedenen Dopanten auf die Signalintensität der Fettsäuren FA 12:0, FA 14:0, FA 16:0, FA 20:0, und FA 24:0 bei Verwendung der APPI-Quelle [modifiziert nach [158]].

Die APPI-Quelle unterscheidet sich von der APCI-Quelle durch die Installation einer Krypton VUV-Lampe, welche anstelle der APCI-Nadel für die Ionisation verantwortlich ist. Um die Ionisation zu verbessern, bzw. überhaupt zu ermöglichen, wird bei der APPI in der Regel ein Dopant verwendet. Für die Optimierung wurde ein Mix aus fünf verschiedenen mit PFB-derivatisierten Fettsäurestandards mit Aceton, Diethylether, Tetrahydrofuran, Toluol, Benzol und Chlorbenzol als Dopanten untersucht. Dabei zeigen sich große Unterschiede zwischen den verwendeten Dopanten (Abbildung 14 C). Da die Fettsäuren bei der Verwendung von Toluol sowohl bei der kürzesten (FA 12:0) als auch bei der längsten analysierten Fettsäure (FA 24:0) eine hohe Signalintensität und eine geringe Standardabweichung aufweisen, wurde dieses bei

den folgenden Messungen als Dopant eingesetzt. Anschließend wurde unter Verwendung eines DoE die übrigen Quellenparameter (*dopant flow*, *source gas temperature*, *capillary voltage*, *source gas flow* und *nitrogen auxiliary gas flow*) optimiert. Hierbei zeigten sich jedoch Unstimmigkeiten zwischen den mit dem DoE bestimmten und den experimentell gemessenen Parametern, weshalb die Werte einzeln überprüft und angepasst wurden. Die optimierten Werte sind der unter 3.2.1 aufgeführten Methode zu entnehmen.

Selective Reaction Monitoring (SRM)-Methoden, bei denen im ersten Quadrupol ein Molekül selektiv ausgewählt, dieses in der Kollisionszelle fragmentiert wird und ein charakteristisches Fragment im dritten Quadrupol untersucht wird, können große Vorteile in Bezug auf die Selektivität einer Methode bieten. Um zu untersuchen, ob bei den untersuchten Fettsäuren eine selektive Fragmentierung möglich ist, wurde eine Mischung aus drei Fettsäurestandards (6 μM) mit unterschiedlichen Polaritätseigenschaften mittels PFB derivatisiert und anschließend mittels APCI-MS unter Verwendung unterschiedlicher Kollisionsenergien untersucht. Der erste Quadrupol wurde hierbei auf das m/z -Verhältnis des [M-PFB]-Ions eingestellt, während der dritte Quadrupol im Scan Modus betrieben wurde (FA 10:0: m/z 50-180; FA 18:0: m/z 50-290; FA 24:0: m/z 50 bis 380). Es konnte zwar durch die abfallende Intensität des [M-PFB]-Ions festgestellt werden, dass es zu einer Fragmentierung des Ions kommt. Allerdings wurden, wie schon bei früheren Publikationen, keine charakteristischen Fragmente identifiziert, welche für die Identifikation der Fettsäuren genutzt werden können (Anhang, Abbildung 41) [53,161]. So wurden von Koch *et al.* bei einer Analyse von über 40 Fettsäuren gezeigt, dass es lediglich bei Fettsäuren mit vier oder mehr Doppelbindungen zu einer Abspaltung von CO_2 kommt. Fettsäuren mit weniger oder keinen Doppelbindungen zerfallen zwar ab einer gewissen Spannung, die gebildeten Fragmente sind jedoch analytisch nicht nutzbar [53]. Aufgrund dessen wird für die Analyse von ionisierte Fettsäuren üblicherweise ein *pseudoSRM* genutzt [53,161], das heißt, sowohl der erste wie auch der dritte Quadrupol wurden mit dem m/z -Verhältnis des [M-PFB]-Ions betrieben, ohne dass eine Kollisionsenergie zur Fragmentierung der Analytionen verwendet wird. Da der Einsatz der Methode nicht auf die verwendeten Fettsäuren beschränkt sein soll, enthält die Methode neben den als Standard eingesetzten Fettsäuren noch eine große Anzahl weiterer Fettsäuren (insgesamt 75 verschiedene Fettsäuren), deren

Retentionszeit entweder durch Standards bestimmt oder mithilfe der umliegenden Fettsäuren mithilfe der Formel

Formel 1: Berechnung der Retentionszeit einer nicht als Standard verfügbaren Fettsäure am Beispiel von Undecansäure

$$RT (FA 11:0) = \frac{RT (FA 10:0) + RT (FA 12:0)}{2}$$

berechnet wurde. Dies ermöglicht eine schnelle Neuberechnung der Retentionszeiten, wenn dies beispielsweise nach einem Wechsel der Säule notwendig ist. Die zu erwartende Abweichung zu den tatsächlichen Retentionszeiten ist aufgrund der Größe der gewählten Retentionsfenster zu vernachlässigen. Die vollständige Liste der untersuchten Fettsäuren ist im Anhang in Tabelle 10 zu finden.

Die NICI-Quelle wird automatisch über die Auto Tune Funktion optimiert, analog zu einer EI, weshalb die *ionizations voltage*, *ion optics* und die Detektor-spezifischen Parameter nicht manuell angepasst wurden. Da jedoch die Temperatur der Ionenquelle sowohl für die Ionisation wie auch für die Robustheit des Systems eine große Rolle spielt, wurde der Einfluss der Quelltemperatur untersucht. Hierbei zeigt sich ein Optimum bei 250 °C, wobei die Unterschiede nur sehr gering sind und sich das Optimum je nach Fettsäure unterscheidet. Zudem zeigte es sich, dass es über die Messungen zu einer Kontamination der Ionenquelle kam, weshalb die Temperatur in Anlehnung an Quehenberger *et al.* auf 280 °C erhöht wurde [57]. Diese Temperaturerhöhung führte zu einer deutlich robusteren Analysenmethode, sodass auch bei der Analyse von biologischen Proben mit hohem Matrixanteil keine Kontamination der Quelle zu beobachten war.

4.1.3 Charakterisierung der Methode

Chromatographische Trennung und Detektion

Während zur Trennung von FAMES üblicherweise polare stationäre Phasen wie Wax (Polyethylenglycol) oder FFAP (mit Nitroterephthalsäure modifiziertes Polyethylenglycol) eingesetzt werden [63,162,163], ist dies bei PFB-Derivaten aufgrund ihres höheren Siedepunkts nicht möglich. Diese werden häufig mit unpolaren stationären Phasen wie DB-5 ((5%-Phenyl-)methylpolysiloxan) analysiert [57,74], was jedoch bei ungesättigten Fettsäuren zu Coelutionen führen kann.

Die hier beschriebene Methode ermöglicht eine Trennung der am weitesten verbreiteten gesättigten Fettsäuren auf Basis ihrer Kettenlänge mit einer Analysenzeit von 41 min. Da die Methode primär für die sensitive Analyse von Fettsäuren in Archaeen entwickelt wurde, spielt die lange Analysenzeit nur eine untergeordnete Rolle. Die Trennung von zehn gesättigten, acht ungesättigten sowie fünf internen Standards unter Verwendung der APCI (A), APPI (B) und NICI (C) Quelle sind in Abbildung 15 dargestellt.

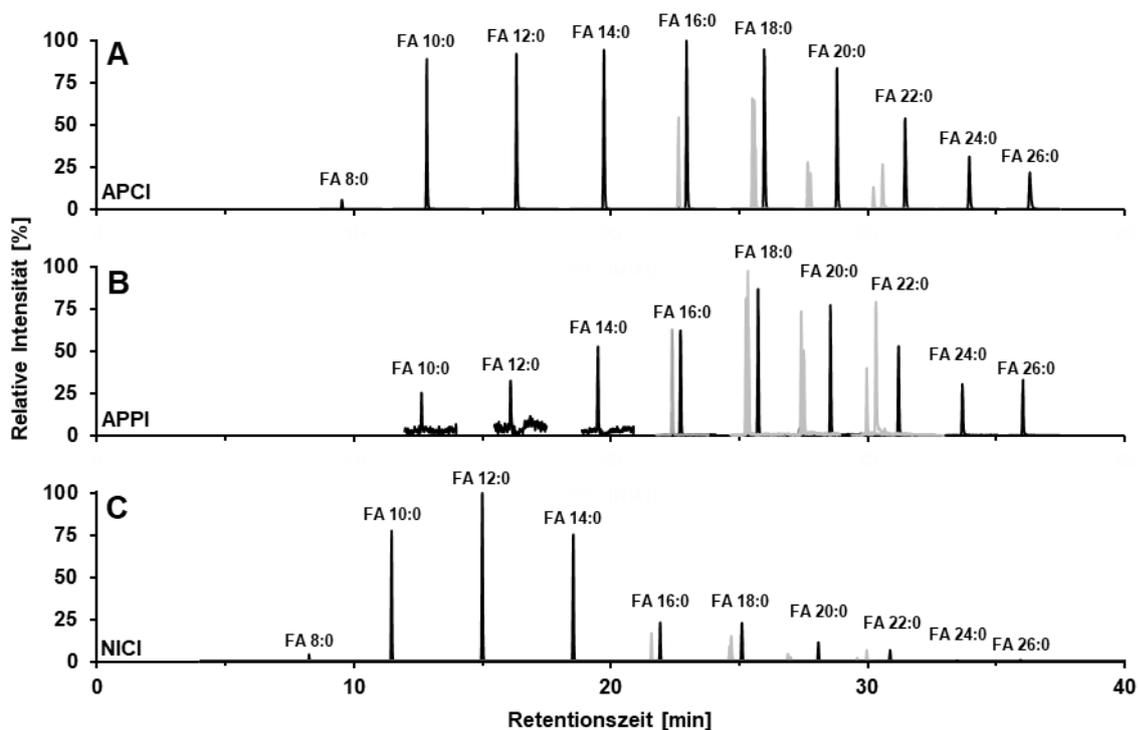


Abbildung 15: GC-MS Analyse einer Fettsäuremischung. Der Mix (30 μ M) besteht aus FA 8:0-FA 26:0 mit unterschiedlichen Sättigungsgraden. Bei allen Analysen wurden identische chromatographische Bedingungen genutzt. Zur besseren Orientierung wurden die gesättigten Fettsäuren (schwarz) beschriftet. Anders als bei FAMES eluieren ungesättigte Fettsäuren (grau) bei PFB-Derivaten vor ihrer gesättigten Varianten. Untersucht wurde die Ionisation mittels APCI- (A), APPI (B) und NICI-Quelle (C). Während die Ionisierung bei der Verwendung einer APCI-Quelle zu einer gleichmäßigen Effizienz von Fettsäuren im Bereich von FA 10:0-FA 20:0 führt, zeigt die APPI-Quelle eine höhere Ionisationseffizienz für langkettige Fettsäuren und die NICI-Quelle eine bessere Effizienz für kurzkettige Fettsäuren. Die Verschiebungen in der Retentionszeit, welche insbesondere zwischen der NICI- und den API-Quellen zu beobachten ist, kann auf instrumentelle Unterschiede zurückgeführt werden [modifiziert nach [158]].

Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, sind die gesättigten Fettsäuren basisliniengetreunt. Bei einigen ungesättigten Fettsäuren (FA 18:1 bis FA 18:3 sowie FA 20:4

und FA 20:5) werden jedoch Coelutionen beobachtet (hellgraue Peaks). Genauere Informationen über die Retentionszeiten und Peakbreiten der untersuchten Fettsäuren sind Tabelle 4 zu entnehmen. Keine der drei verwendeten Ionenquellen hat die Fettsäuren in einer relevanten Menge fragmentiert. Daher kann die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Fettsäuren mithilfe des $[M-PFB]$ -Ions erfolgen, welches dem $[M-H]$ -Ions der ursprünglichen Fettsäure entspricht. Dies ermöglicht eine sensitive Identifikation der Fettsäuren mithilfe der Retentionszeit sowie des m/z -Verhältnisses. Da eine höhere Anzahl an Doppelbindungen zu einer Reduktion des m/z -Verhältnisses führt, können mithilfe dieses m/z -Unterschieds coeluiierende Fettsäuren identifiziert werden.

Die APCI-Quelle weist für eine große Anzahl der gesättigten Fettsäuren nur geringe Unterschiede in der Ionisationseffizienz auf. Dies resultiert insbesondere bei Fettsäuren mit einer Kettenlänge von zehn bis zwanzig Kohlenstoffatomen in ähnlichen Intensitäten der jeweiligen Peaks im Chromatogramm (Abbildung 15 A), wodurch eine Reduzierung der für die Quantifizierung benötigten internen und externen Standards möglich wird. Sowohl die APPI- wie auch die NICI-Quelle zeigen deutliche Unterschiede in der Ionisationseffizienz. So ist die APPI-Quelle besser für die Ionisation von mittel- und langkettigen Fettsäuren (Abbildung 15 B), die NICI-Quelle hingegen besser für kurz- und mittelkettige Fettsäuren geeignet (Abbildung 15 C). Auffallend hierbei ist vor allem die geringe Ionisationseffizienz der APPI für Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen. Bei der APPI hängt die Ionisationseffizienz von der Differenz der benötigten Ionisationsenergie von Dopant und Analytmolekül ab. Diese kann sich abhängig vom untersuchten Analyten sehr unterscheiden, insbesondere bei Analyse von Analyten mit großen strukturellen Unterschieden wie Caprylsäure (FA 8:0) und Cerotinsäure (FA 26:0), weshalb eine gleichbleibende Ionisationseffizienz für alle untersuchten Fettsäuren nicht erreicht werden konnte. Auffallend bei der APPI-Quelle ist zudem, dass die Unterschiede von gesättigten Fettsäuren zu ihren ungesättigten Derivaten bei der APPI-Quelle deutlich geringer sind, bei einigen Fettsäuren wird die Intensität der gesättigten Fettsäure sogar überstiegen. Somit konnte gezeigt werden, dass bei der Ionisation mittels APPI die Kettenlänge einen deutlich größeren Einfluss auf die Ionisationseffizienz hat als die Anzahl an Doppelbindungen.

Sensitivität

Um die Methode zu charakterisieren und einen Vergleich der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Quellen zu ermöglichen, wurden angelehnt an die „*EMA guidelines for bioanalytical method validation*“ (seit dem 27.07.2022 überarbeitet und umbenannt in *ICH Guideline M10 on bioanalytical method validation*) die Nachweisgrenzen (Signal zu Rausch-Verhältnis ($s/n \geq 3$) und die untere Bestimmungsgrenzen ($s/n \geq 5$ bei einer Präzision (engl. *Accuracy*) von $\pm 20\%$) bestimmt [164].

Die sensitivsten Nachweisgrenzen weist die APCI-Quelle mit 30 und 300 nM (3 bis 30 fmol oder 0,4 bis 8 pg *on column*) auf (Tabelle 5). Somit ist die Sensitivität der Methode vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Methoden, welche je nach Methode im unteren bis oberen femtomolaren Bereich *on-column* liegen [165,166]. Auch wenn die NICI-Quelle mit 10 bis 1.000 nM (1 bis 100 fmol oder 0,1 bis 25 pg *on column*) bei einzelnen Fettsäuren etwas sensitiver ist, liegt ihre Sensitivität im Durchschnitt unter der der APCI-Quelle, insbesondere bei FA 8:0 erweist sich die Ionenquelle mit einer Nachweisgrenze von 6.000 nM als deutlich weniger sensitiv als die APCI-Quelle (30 nM). Die APPI-Quelle zeigt für Fettsäuren ab einer Kettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen eine Nachweisgrenze zwischen 100 und 3.000 nM (10 bis 300 fmol oder 2 bis 90 pg *on column*), kürzere Fettsäuren können jedoch wie im Fall von Caprylsäure (FA 8:0) gar nicht nachgewiesen werden, oder die Nachweisgrenze lag wie bei Caprinsäure (FA 10:0) und Laurinsäure (FA 12:0) mit 30.000 und 20.000 nM mehrere Größenordnungen über den übrigen untersuchten Fettsäuren.

Bei einem Vergleich der beschriebenen GC-Methode mit HPLC-Methoden müssen einige Parameter wie Injektionsvolumen und Splitverhältnis beachtet werden. GC-Messungen werden üblicherweise mit einem *Split*-Verhältnis zwischen 1:10 bis 1:100 durchgeführt. Die injizierten Volumina bei LC sind zudem oft deutlich größer als bei GC, was einen direkten Vergleich zwischen diesen beiden Systemen zusätzlich erschwert. Aktuelle LC-Methoden zeigten beispielsweise, bezogen auf die Konzentration in der untersuchten Probe, mit 5 bis 100 nM etwas geringere Nachweisgrenzen als die hier beschriebene Methode. Wird die Konzentration jedoch auf die Stoffmenge *on column* bezogen, lagen die Methoden mit 50 bis 1.000 fmol deutlich über der neu entwickelten GC-APCI-Methode [53,167].

Tabelle 4: Chromatographische Trennleistung der GC-MS Analyse. Die m/z -Verhältnisse der einzelnen Analyten wurden bei den *pseudo* SRM und SIM-Analysen untersucht. Der bei der Quantifizierung verwendete interne Standard, die Retentionszeit (t_R), die Peakweite (full peak width) sowie die Peakweite bei halber Peakhöhe (full width at half maximum; FWHM) sind aufgeführt (n=3) [modifiziert nach [156]].

FA	m/z	Internal Standard			t_R [min]			Full width*			Peak width [min]			FWHM		
		APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI
08:0	143,2	² H ₂ -FA 10:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₂ -FA 10:0	n.b.	n.b.	8,25 ± 0,01	9,54 ± 0,01	0,12 ± 0,00	n.b.	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	n.b.	0,03 ± 0,00	
10:0	171,2	² H ₂ -FA 10:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₂ -FA 10:0	n.b.	n.b.	11,46 ± 0,02	12,84 ± 0,01	0,13 ± 0,01	n.b.	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	n.b.	0,04 ± 0,00	
12:0	199,3	² H ₂ -FA 15:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₂ -FA 15:0	16,09 ± 0,01	14,99 ± 0,01	14,99 ± 0,01	16,33 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	
14:0	227,4	² H ₂ -FA 15:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₂ -FA 15:0	19,50 ± 0,00	18,53 ± 0,01	18,53 ± 0,01	19,72 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	
16:0	255,5	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	22,71 ± 0,01	21,90 ± 0,02	21,90 ± 0,02	22,95 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	
16:1	253,5	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	22,39 ± 0,01	21,57 ± 0,02	21,57 ± 0,02	22,62 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	
18:0	283,5	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	25,72 ± 0,01	25,08 ± 0,01	25,08 ± 0,01	25,97 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	
18:1	281,5	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	25,34 ± 0,01	24,67 ± 0,01	24,67 ± 0,01	25,57 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	
18:2	279,5	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	25,26 ± 0,01	24,60 ± 0,02	24,60 ± 0,02	25,49 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	
18:3	277,5	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	² H ₄ -FA 18:0	25,37 ± 0,00	24,71 ± 0,02	24,71 ± 0,02	25,60 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	
20:0	311,5	² H ₆ -FA 20:4	² H ₈ -FA 20:4	² H ₆ -FA 20:4	28,54 ± 0,01	28,07 ± 0,02	28,07 ± 0,02	28,80 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	
20:4	303,5	² H ₆ -FA 20:4	² H ₈ -FA 20:4	² H ₆ -FA 20:4	27,41 ± 0,00	26,87 ± 0,02	26,87 ± 0,02	27,67 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	
20:5	301,5	² H ₆ -FA 20:4	² H ₈ -FA 20:4	² H ₆ -FA 20:4	27,50 ± 0,00	26,99 ± 0,02	26,99 ± 0,02	27,76 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00	
22:0	339,6	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	31,19 ± 0,01	30,85 ± 0,02	30,85 ± 0,02	31,45 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	
22:5	329,5	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	30,32 ± 0,00	29,95 ± 0,01	29,95 ± 0,01	30,57 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	
22:6	327,5	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	29,95 ± 0,00	29,56 ± 0,02	29,56 ± 0,02	30,20 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	
24:0	367,7	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	33,67 ± 0,01	33,46 ± 0,02	33,46 ± 0,02	33,96 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	
26:0	395,7	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	² H ₄ -FA 24:0	36,03 ± 0,02	35,92 ± 0,01	35,92 ± 0,01	36,29 ± 0,01	0,30 ± 0,09	0,12 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	

n.b.: nicht bestimmbar

Tabelle 5: Vergleich der Validierungen der verschiedenen untersuchten Ionenquellen. Die Methodencharakterisierung wurde in Anlehnung an die EMA-Richtlinie durchgeführt. Nachweisgrenze (engl. *limit of detection*, LOD) und untere/ obere Bestimmungsgrenze (engl. *lower/ upper limit of quantification*, LLOQ/ ULOQ) wurden mithilfe des s/n-Verhältnisses berechnet. Verglichen wurden LOD, linearer Bereich, Accuracy (%) und das Bestimmtheitsmaß (R²). Das Bestimmtheitsmaß wurde mittels einer gewichteten linearen Regression (1/x²) bestimmt (n=3) [modifiziert nach [156]].

FA	LOD			LOD ocolumn [fmol]			LOD on-column [pg]			Calibration range						Accuracy [%]						R ²							
	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	LLOQ	APPI	NICI	LLOQ	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI	NICI	APCI	APPI
8:0	30	n.b.	6.000	3	n.b.	545	0.4	n.b.	78.7	100	n.b.	10.000	1.000	n.b.	30.000	30.000	30.000	99	n.b.	107	96	n.b.	139	0,996	n,b	0,812			
10:0	100	30.000	100	9	2.727	9	1.6	469.6	1.6	300	n.b.	300	20.000	n.b.	30.000	30.000	30.000	96	n.b.	105	87	n.b.	93	0,981	n,b	0,984			
12:0	100	20.000	30	9	1.818	3	1.8	364.2	0.5	300	n.b.	100	30.000	n.b.	30.000	30.000	30.000	103	n.b.	101	103	n.b.	114	0,992	n,b	0,978			
14:0	30	300	10	3	27	1	0.6	6.2	0.2	100	3.000	30	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	98	104	90	100	107	104	0,996	0,983	0,978			
16:0	300	100	1.000	27	9	91	7	2.3	23.3	1.000	300	3.000	30.000	20.000	20.000	20.000	20.000	105	85	106	89	90	108	0,970	0,915	0,977			
16:1	30	1.000	100	3	91	9	0.7	23.1	2.3	100	1.000	300	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	106	96	98	93	97	87	0,974	0,979	0,993			
18:0	300	100	300	27	9	27	7.8	2.6	7.8	1.000	300	1.000	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	102	86	99	101	85	103	0,997	0,926	0,982			
18:1	100	300	300	9	27	27	2.6	7.7	7.7	300	300	1.000	30.000	30.000	20.000	20.000	20.000	102	103	101	91	92	108	0,985	0,972	0,994			
18:2	30	1.000	100	3	91	9	0.8	25.5	2.6	100	1.000	300	30.000	30.000	20.000	20.000	20.000	106	95	99	94	96	101	0,974	0,973	0,997			
18:3	30	3.000	300	3	273	27	0.8	76	7.6	100	3.000	1.000	30.000	30.000	20.000	20.000	20.000	103	94	100	99	101	105	0,991	0,962	0,991			
20:0	30	1.000	100	3	91	9	0.9	28.4	2.8	100	1.000	300	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	94	112	100	105	115	115	0,980	0,944	0,987			
20:4	30	3.000	300	3	273	27	0.8	83	8.3	100	3.000	1.000	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	98	101	100	92	106	93	0,996	0,989	0,996			
20:5	100	3.000	300	9	273	27	2.8	82.5	8.3	100	3.000	1.000	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	105	99	101	114	103	98	0,984	0,983	0,993			
22:0	30	1.000	100	3	91	9	0.9	31	3.1	100	1.000	300	30.000	30.000	10.000	10.000	10.000	106	98	97	92	111	102	0,995	0,979	0,993			
22:5	100	3.000	100	9	273	9	3	90.1	3	300	3.000	300	30.000	20.000	20.000	20.000	20.000	102	107	105	94	114	115	0,990	0,964	0,984			
22:6	100	3.000	1.000	9	273	91	3	89.6	29.9	300	3.000	3.000	20.000	30.000	30.000	30.000	30.000	100	104	100	99	115	102	0,999	0,975	0,998			
24:0	100	1.000	3.000	9	91	273	3.4	33.5	100.6	300	6.000	6.000	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	98	108	103	92	103	93	0,996	0,960	0,973			
26:0	100	1.000	300	9	91	27	3.6	36.1	10.8	300	10.000	1.000	30.000	30.000	10.000	10.000	10.000	97	103	97	96	108	91	0,993	0,966	0,985			
Me- dian	100	1000	300	9	91	27	1.7	33.5	7.7	200	3.000	1.000	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	102	101	100	95	103	103	0,992	0,972	0,986			

Robustheit

Nach der *EMA guidelines for bioanalytical method validation* darf die *Tag-zu-Tag*-Varianz einer Methode an der unteren Bestimmungsgrenze bei maximal 20 % liegen. Um dies zu überprüfen, wurde ein Fettsäuremischstandard derivatisiert und an drei verschiedenen Tagen mittels GC-APCI-MS untersucht. Hierbei liegen alle Varianzen unter den Vorgaben der EMA, mit Ausnahme von Palmitoleinsäure (FA 16:1) und Linolensäure (FA 18:3), welche diese mit jeweils 23 % leicht überschreiten (Abbildung 16 A). Diese Abweichung lässt sich jedoch vor allem auf die Standardabweichung der verwendeten APCI-Quellen zurückführen, welche laut Literatur zwischen 10 bis 60 % liegt [96,105,106].

Die Verschleppung darf nach EMA-Richtlinie maximal 20 % der unteren Bestimmungsgrenze betragen. Um dies zu überprüfen, wurde direkt nach der Messung des höchsten Kalibrationspunktes (30 µM) reines Methanol injiziert und gemessen. Bei keiner der untersuchten Fettsäuren konnte eine Verschleppung detektiert werden, was in Abbildung 16 B am Beispiel von Palmitinsäure (FA 16:0) und Stearinsäure (FA 18:0) gezeigt ist. Die Vorgaben der EMA-Richtlinie sind somit erfüllt.

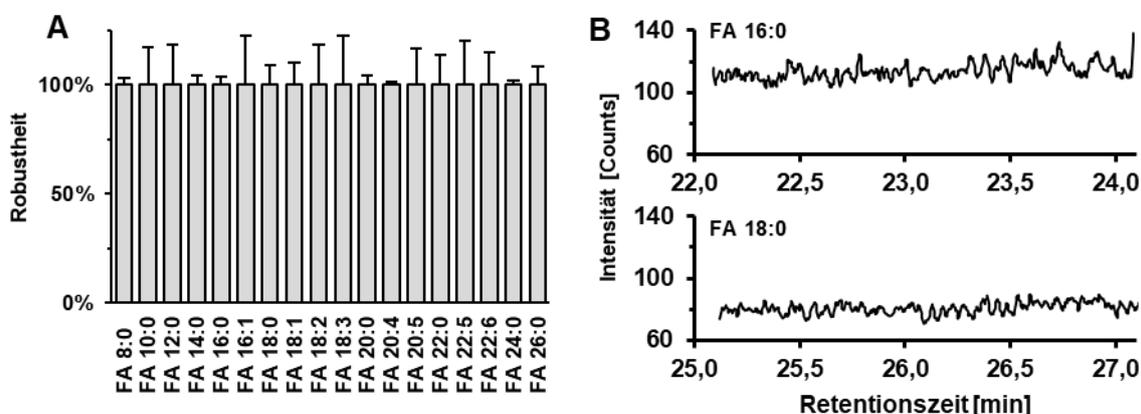


Abbildung 16: Tag-zu-Tag-Varianz und Verschleppung der APCI-Methode. **A:** Standards wurden an den jeweiligen unteren Bestimmungsgrenzen mittels GC-APCI-MS an drei verschiedenen Tagen gemessen und die Varianz der Fettsäuren wurden für jede einzelne Fettsäure bestimmt. **B:** Um die Verschleppung für die GC-APCI-MS zu bestimmen, wurde im Anschluss an einen hochkonzentrierten Standard (30 µM) reines Methanol injiziert und gemessen. Wie anhand von FA 16:0 und FA 18:0 gezeigt, ist bei den Retentionszeiten der Fettsäuren (FA 16:0: 22,95 min; FA 18:0: 25,97 min) kein Peak, und somit keine Verschleppung, sichtbar [modifiziert nach [158]].

4.1.4 Analyse von Fettsäuren in biologischen Proben

Plasma/ Serum

Nach Evaluation aller Methoden stellt sich die APCI-Methode als die am besten geeignete Methode für die Bestimmung von Fettsäuren heraus. Diese Methode wurden verwendet um Plasma und Serum, beides Proben die in medizinischen Studien häufig untersucht werden, zu analysieren. Hierbei wurden die Proben zur Bestimmung der freien Fettsäuren zunächst mit MTBE extrahiert [157], mit PFB derivatisiert und schließlich mittels GC-APCI-MS analysiert. Um die gebundenen Fettsäuren zu erfassen, erfolgte vor der Extraktion ein Hydrolyseschritt.

Die freien Fettsäuren Palmitinsäure (FA 16:0), Stearinsäure (FA 18:0), Ölsäure (FA 18:1) und Linolsäure (FA 18:2) sind die abundantesten Fettsäuren in den untersuchten Proben (Abbildung 17). Zudem liegen verschiedene gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 bis 22 Kohlenstoffatome in dem Plasma und Serum vor. Bei den freien Fettsäuren zeigt sich bei den Plasmaproben in einem Vergleich zu einer Studie von Bowden *et al.* für die Konzentration von Ölsäure ($136 \pm 23 \mu\text{M}$) und Linolsäure ($78 \pm 11 \mu\text{M}$) eine hohe Übereinstimmung ($110 \mu\text{M}/ 44 \mu\text{M}$) [21]. Die Konzentrationen von Palmitinsäure ($144 \pm 34 \mu\text{M}$) und Stearinsäure ($68 \pm 12 \mu\text{M}$) liegt deutlich über den von Bowden *et al.* beschriebenen Werten ($43 \mu\text{M}/15 \mu\text{M}$) [21], da es sich hierbei um häufig auftretende Kontaminationen handelt, sind hierbei hohe Abweichungen zwischen verschiedenen Studien nicht unüblich [51-54]. Zudem ist es gelungen, mit Laurinsäure, Myristinsäure und Eicosapentaensäure einige Fettsäuren nachzuweisen, welche zuvor nicht als freie Fettsäuren in Plasmaproben beschrieben wurden [21]. Da diese bereits in geringer Konzentration bei den Gesamtfettsäuren von Plasma beschrieben wurden [168], kann dies auf die Sensitivität der Methode zurückgeführt werden. In Serum liegen bei den freien Fettsäuren für Palmitinsäure ($123 \pm 36 \mu\text{M}$), Stearinsäure ($56 \pm 6 \mu\text{M}$) und Linolsäure ($93 \pm 13 \mu\text{M}$) deutlich geringere Konzentrationen vor als zuvor von Zhao *et al.* beschrieben ($234 \mu\text{M}/ 222 \mu\text{M}/ 182 \mu\text{M}$) [169]. Lediglich Ölsäure ($121 \pm 22 \mu\text{M}$) liegt in guter Übereinstimmung mit der von Zhao *et al.* beschriebenen Konzentration ($131 \mu\text{M}$) [169].

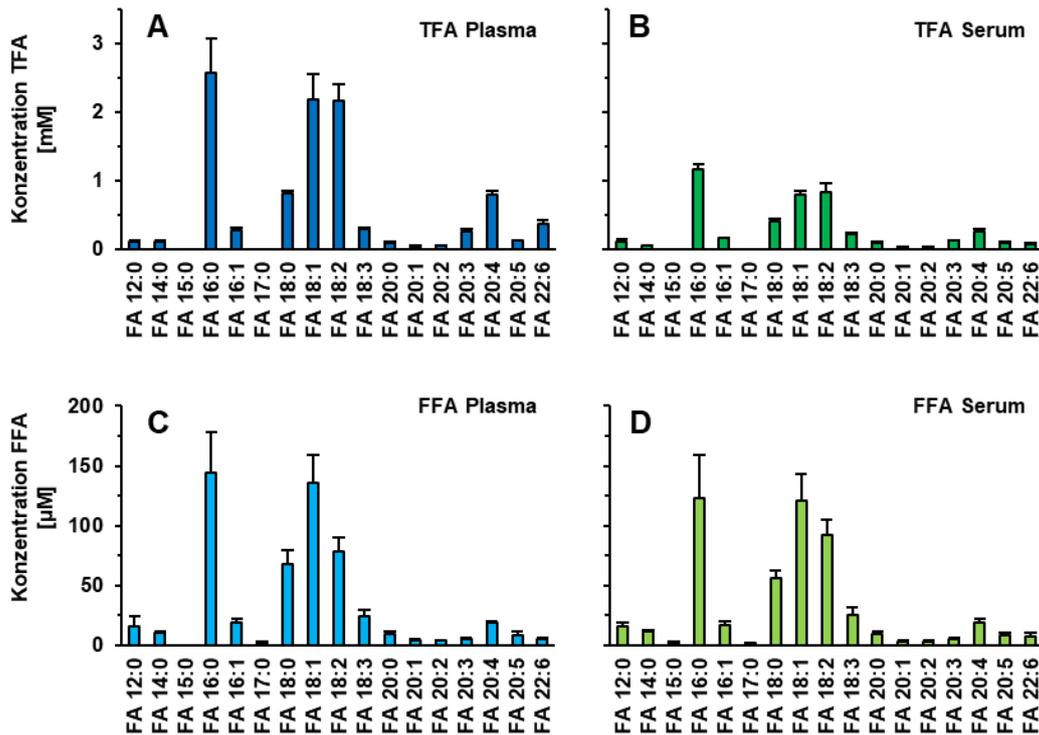


Abbildung 17: Quantifizierung von freien und absoluten Fettsäuren in Plasma und Serum mit GC-APCI-MS. Die Proben (A/C: Plasma, B/D: Serum; n=5) wurden nach Matyash *et al.* extrahiert und anschließend mit PFB derivatisiert. A-B: Bei der Bestimmung des Gesamtfettsäuregehaltes wurden die Proben im ersten Schritt mit KOH hydrolysiert, extrahiert und derivatisiert. C-D: Bei der Bestimmung der freien Fettsäuren erfolgte die Extraktion ohne vorherige Hydrolyse. Die Messungen wurden mithilfe der zuvor beschriebenen GC-APCI-Methode im *pseudo* SRM-Modus durchgeführt. Die Konzentration der freien Fettsäuren und der Gesamtfettsäuregehalt wurden mithilfe von authentischen Standards sowie isopenmarkierten internen Standards bestimmt [modifiziert nach [158]].

Zur Erfassung von gebundenen Fettsäuren mussten diese vor der Derivatisierung mit einer Hydrolyse in freie Fettsäuren umgewandelt werden. Bei den Plasma-proben konnte eine gute Übereinstimmung der bestimmten Gesamtfettsäuregehalte mit den von Cruz-Hernandez *et al.* beschriebenen Konzentrationen erreicht werden. So weichen die Konzentrationen von Palmitinsäure ($2579 \pm 504 \mu\text{M}$), Stearinsäure ($810 \pm 47 \mu\text{M}$), Ölsäure ($2185 \pm 378 \mu\text{M}$) und Linolsäure ($2161 \pm 245 \mu\text{M}$) nur gering von den beschriebenen Werten ($2360 \mu\text{M}/ 640 \mu\text{M}/ 1610 \mu\text{M}/ 2840 \mu\text{M}$) ab [168]. Die in Serum identifizierten Gesamtfettsäuregehalte liegen hingegen ähnlich den freien Fettsäuren bei Palmitinsäure ($1170 \pm 61 \mu\text{M}$), Stearinsäure ($409 \pm 22 \mu\text{M}$), Ölsäure ($786 \pm 54 \mu\text{M}$) und Linolsäure ($830 \pm 121 \mu\text{M}$) deutlich unter den von Sergeant *et al.* beschriebenen Werten ($2350 \mu\text{M}/ 980 \mu\text{M}/ 2390 \mu\text{M}/ 3830 \mu\text{M}$) [163].

Bei der Bewertung der Daten muss jedoch einbezogen werden, dass die untersuchten Proben von anderen Herstellern stammten und es sich hierbei nicht um standardisierte Proben gehandelt hat. Daher können die Abweichungen zu den Literaturwerten aufgrund der natürlichen biologischen Schwankungen zustande gekommen sein. Eine weitere Möglichkeit für die geringeren Fettsäurekonzentrationen im Serum kann das Alter der analysierten Proben darstellen, da diese zuvor bereits mehrere Jahre bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Auch bei der verwendeten analytischen Methode gab es Unterschiede. Die Fettsäuremuster hingegen stimmen bei allen untersuchten Proben mit den Literaturangaben überein und die beschriebenen Abweichungen bei der Fettsäurekonzentration sind lediglich bei den Serum- nicht jedoch bei den Plasma- proben aufgetreten. Daher kann angenommen werden, dass die beobachteten Abweichungen bei den Serumproben auf die untersuchten Proben zurückzuführen sind.

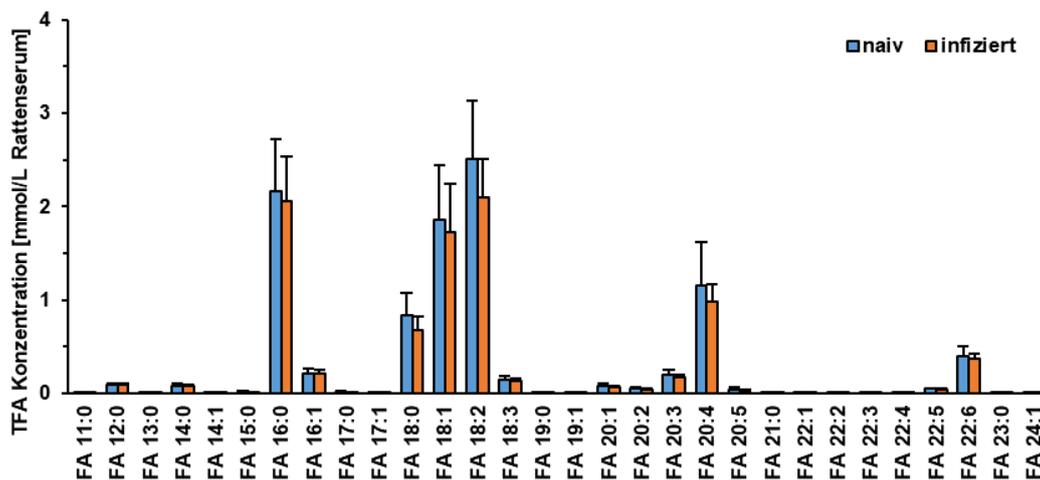


Abbildung 18: Gesamtfettsäurekonzentrationen in Rattenserumproben [modifiziert nach [159]].

Der Gesamtfettsäuregehalt in Blutseren von Ratten, welche von der AG Littwitz-Salomon bereitgestellt wurden, wurde anschließend mit der Methode untersucht. Bei dieser Studie sollte untersucht werden, welche Einflüsse Retroviren auf die Aktivität von *Natural Killer* Zellen haben. Es wurden je 5 Serumproben von gesunden sowie infizierten Ratten aufgearbeitet. Die gemessenen Fettsäurekonzentrationen liegen hierbei mit $2100 \pm 500\text{ }\mu\text{M}$ bei Palmitinsäure (FA 16:0) und $1800 \pm 500\text{ }\mu\text{M}$ bei Ölsäure (FA 18:1) (Abbildung 18) in deutlich besserer Übereinstimmung zu den zuvor beschriebenen Literaturwerten. Es konnte jedoch bei der Analyse des Rattenserums kein signifikanter Unterschied (t-Test; p-Wert $>0,05$) zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen festgestellt werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass die zuvor von der AG Littwitz-Salomon beobachteten Aktivitäts- und Stoffwechseländerungen der

Natural Killer Zellen nicht auf Unterschiede in der Fettsäurekonzentration oder -zusammensetzung zurückzuführen sind.

Die detektierten Gesamtfettsäuregehalte in den Rattenserumproben lagen deutlich über den im zuvor in Humanserum detektierten Gehalten, und passen daher auch deutlich besser zu den für Serum bekannten Werten. Da sich Ratten- und Humanserum chemisch nicht fundamental unterscheiden, kann hieraus geschlossen werden, dass die Abweichungen bei den Humanserumproben tatsächlich auf die untersuchten Proben zurückzuführen sind. Andere Effekte wie Ionensuppression sind hingegen eher unwahrscheinlich.

Tumorzellen

Bei einer Studie für die Bestimmung der Fettsäuren in verschiedenen Krebszelllinien wurden drei verschiedene Zelllinien untersucht, bei der jede Zelllinie einmal naiv und einmal metastasiert vorlag. Die erste Zelllinie bestand aus dem Paar Aspc1 und Panc1, die zweite Zelllinie aus PatuT und PatuS und die dritte aus Yapc und YapcS3. Die Reihenfolge aller Proben bei Aufarbeitung und Messung erfolgte randomisiert, um systematische Fehler auszuschließen. Die bei der Messung erhaltenen Konzentrationen an freien Fettsäuren sind in Abbildung 19 dargestellt.

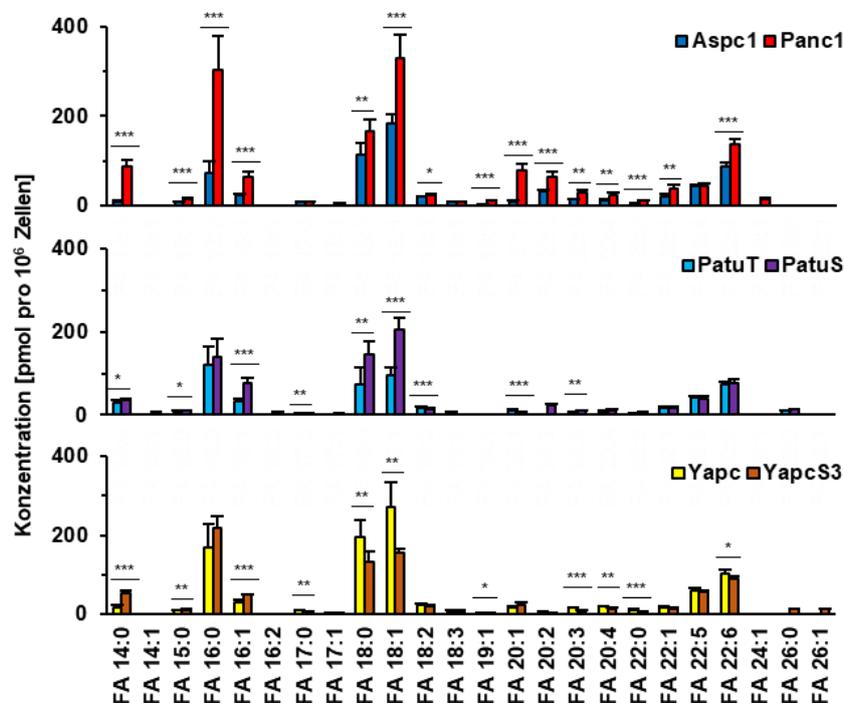


Abbildung 19: Mit GC-APCI-MS bestimmte Konzentrationen an freien Fettsäuren in verschiedenen Zellproben (n=7). Jede Zelllinie wurde mittels t-Test auf Unterschiede zwischen der naiven

und der metastasierten Variante überprüft. Signifikante (*) sehr signifikante (**) und hoch signifikante (***) Unterschiede sind jeweils gekennzeichnet.

Die Signifikanz der gemessenen Unterschiede wurde anschließend mithilfe eines t-Test (2-seitig, heteroskedastisch) überprüft. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, gibt es zwischen den Zelllinien signifikante ($\leq 0,05$, ein Stern), sehr signifikante ($\leq 0,01$ zwei Sterne) und hochsignifikante Unterschiede ($\leq 0,001$, drei Sterne) bei den Konzentrationen in den naiven und metastasierten Zellen. Auffallend ist hierbei, dass bei einigen Fettsäuren bei allen untersuchten Paaren Abweichungen vorliegen. So zeigt die Konzentration von Myristinsäure (FA 14:0) bei Paar 1 und 3 eine hochsignifikante und bei Paar 2 eine signifikante Abweichung. Bei Pentadecansäure (FA 15:0) ist die Abweichung signifikant bei Paar 2, sehr signifikant bei Paar 3 und hochsignifikant bei Paar 1 und bei Palmitoleinsäure (FA 16:1) liegt eine hochsignifikante Abweichung bei allen drei Paaren vor.

Das erste Paar (Aspc1 und Panc1) ist im Vergleich zu den anderen beiden Paaren zudem besonders auffällig. So liegen bei Palmitinsäure (FA 16:0) hochsignifikante Unterschiede vor, während beide anderen Paare keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Auch bei Docosahexaensäure (FA 22:6) liegen hochsignifikante Unterschiede vor, wobei bei Paar 2 keine signifikante, und bei Paar 3 lediglich signifikante Unterschiede festzustellen sind.

Wird das Muster der verschiedenen Fettsäuren betrachtet (Anhang, Abbildung 42), so zeigt sich bei Paar 1 und 2 eine Angleichung der Fettsäurekonzentrationen, welche beispielsweise bei Stearinsäure (FA 18:0) oder Ölsäure (FA 18:1) darin resultiert, dass in Aspc1 sogar etwas höhere prozentuale Anteile der jeweiligen Fettsäuren vorliegen als in Panc1. Der Grund liegt hierbei in den unterschiedlichen Gesamtkonzentrationen an freien Fettsäuren in den untersuchten Proben. Bei Paar 3, bei der die Gesamtkonzentrationen an freien Fettsäuren keine vergleichbaren Unterschiede zeigt, sind keine vergleichbaren Veränderungen feststellbar.

Für die Bestimmung des Gesamtfettsäuregehaltes wurde vor der Extraktion eine Hydrolyse der Proben durchgeführt. Anschließend wurden die Proben wie bei der Messung des Gesamtfettsäuregehaltes mithilfe des *Multipurpose Samplers* mit MTBE extrahiert, mit PFB derivatisiert und mittels GC-APCI-MS analysiert.

Auch hier zeigen sich, wie in Abbildung 20 dargestellt, signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Auch das generelle Verhältnis der Zellen untereinander ähnelt dem der freien Fettsäuren, so liegt beispielsweise der Gehalt an Palmitinsäure (FA 16:0) bei Panc1 hochsignifikant über der in Aspc1 bestimmten Konzentration, und die in Paar 2 bestimmten Konzentrationen liegen generell unter den Konzentrationen von Paar 1 und 3. Es zeigt sich jedoch, dass die relativen Unterschiede der einzelnen Zelllinien bei den Gesamtfettsäuregehalten deutlich geringer sind als bei den freien Fettsäuren. Während beispielsweise beim ersten Paar bei den freien Fettsäuren die Konzentration an Palmitinsäure (FA 16:0) in Aspc1 bei nur etwa 25 % im Vergleich von Panc1 liegt, liegt dieser bei der Bestimmung des Gesamtfettsäuregehaltes bereits bei 40 %.

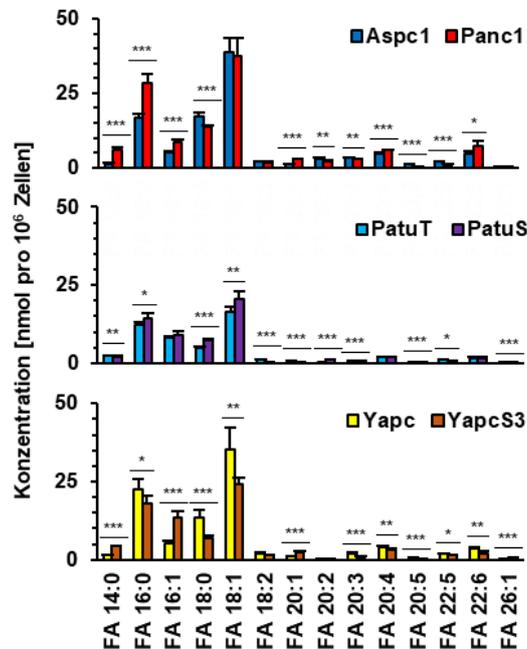


Abbildung 20: Mit GC-APCI-MS bestimmte Gesamtfettsäurekonzentrationen in verschiedenen Zellproben (n=7). Jede Zelllinie wurde mittels t-Test auf Unterschiede zwischen der naiven und der metastasierten Variante überprüft. Signifikante (*) sehr signifikante (**) und hoch signifikante (***) Unterschiede sind jeweils gekennzeichnet. Gezeigt sind alle Fettsäuren mit einem Anteil von $\geq 1\%$. Im Anhang in Abbildung 43 sind alle detektierten Fettsäuren dargestellt.

4.1.5 Fazit

Es wurde eine GC-APCI-MS Methode zur Analyse von Fettsäuren entwickelt, welche verschiedene Vorteile bietet. So erfordert die Methode keine aufwendige Probenvorbereitung, die derivatisierten Fettsäuren sind stabil, können während der Messsequenz bei Raumtemperatur gelagert werden und es ist zudem keine Verschleppung festzustellen. Die Sensitivität liegt mit 3 – 30 fmol *on column* deutlich niedriger als bei vergleichbaren HPLC-Methoden, welche aktuell bei 50 – 100 fmol liegen [53]. Deshalb eignet sich die Methode für eine Vielzahl an verschiedenen Fragestellungen, wie in zwei Studien im Bereich der Tumordiagnostik gezeigt wurde.

Die Anwendung eines DoE ermöglicht, wie für die APCI-Quelle gezeigt, eine Reduktion der Experimente, da nicht jeder Parameter einzeln untersucht werden muss und zudem Synergieeffekte zwischen den einzelnen Parameter mit beachtet werden können. Jedoch konnte bei der Optimierung der APPI-Quelle auch die Grenzen der DoE-Modelle gezeigt werden. Hier lagen die theoretisch berechneten und die tatsächlich gemessenen Optima nicht überein. Da es sich bei dieser Quelle um einen Prototyp handelte lag die Reproduzierbarkeit deutlich unter den APCI-Messungen, was auch am geringeren Bestimmtheitsmaß und dem linearen Bereich der APPI-Quelle abzulesen ist. Um dies zu kompensieren, hätte die Anzahl an Experimenten deutlich erhöht werden müssen, unter dem Verlust des Zeitvorteils des DoE.

Den größten Limitierungsfaktor der beschriebenen Methode stellen zurzeit Kontaminationen dar. Es wurde viel Wert auf die Vermeidung von Kontaminationen gelegt, dennoch wurde reproduzierbar eine Hintergrundkontamination für die verschiedenen Fettsäuren beobachtet, welche nicht unterschritten werden konnte. Daher sind die Nachweisgrenzen bei einer Vielzahl an kurz- und mittelkettigen Fettsäuren durch das Kontaminationssignal, und nicht aufgrund des s/n -Verhältnis limitiert, weshalb dieser auch nicht durch eine verbesserte Sensitivität der Messtechnik weiter verringert werden kann. Dies könnte durch die Verwendung eines Reinraumes für die Probenvorbereitung, oder einer ^{13}C -Markierung der zu untersuchenden Fettsäuren gelöst werden, was jedoch in beiden Fällen mit hohen Kosten verbunden ist.

4.2 „Lipid divid“ - Analyse von Fettsäuren in Archaeen

Die in diesem Kapitel gezeigten Daten sind in Kooperation mit dem AK Molekulare Enzymtechnologie der Universität Duisburg-Essen entstanden. Hierbei erfolgte die übergeordnete experimentale Planung, sowie die Kultivierung der untersuchten Zellen im AK Siebers. Die Daten wurde nach dem Disputationstermin unter dem Titel „De novo synthesis of fatty acids in Archaea via an archaeal fatty acid synthase complex“ in Zusammenarbeit mit C. Schmerling, X. Zhou, S. Kostlbacher, T. Kessenbrock, D. Podlesainski, D. Sybers, K. Wang, A.C. Lindas, J.L. Snoep, E. Peeters, M. Kaiser, T.J.G. Ettema, S.W. Meckelmann, C. Braesen und B. Siebers 2024 als Preprint bei bioRxiv veröffentlicht (<https://doi.org/10.1101/2024.07.05.601840>) und wird demnächst in einem Peer-Reviewed-Journal eingereicht.

4.2.1 Einleitung

Anders als bei Eukaryoten enthält die Zellmembran von Archaeen keine an Glycerol gebundenen Fettsäuren, sondern stattdessen Isoprenoide. Diese sind über eine Etherbindung an das Glycerolrückgrat gebunden, im Gegensatz zu den bei Fettsäuren üblichen Esterbindungen. Es wurde daher lange Zeit angenommen, dass Archaeen nicht in der Lage sind, Fettsäuren selbstständig zu bilden. Durch die von Hamerly *et al.* in Jahre 2015 erschienene Publikation wurde dies jedoch in Frage gestellt [35]. Hierbei wurden in *Sulfolobus solfataricus*, *Ignicoccus hospitalis* und *Ignicoccus hospitalis* - *Nanoarchaeum equitans* Fettsäuren gefunden, primär mit einer Kettenlänge von 16 und 18 Kohlenstoffatomen. Ein Vorkommen von Fettsäuren in Archaeen könnte dazu beitragen, den als „Lipid Divide“ bezeichneten evolutionsbiologischen Wechsel von Isoprenoiden und Fettsäuren besser zu verstehen. Um eine gute Lesbarkeit des Textes zu ermöglichen, wurden die verschiedenen untersuchten Archaeen abgekürzt. Diese sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Abkürzungen und Bezeichnungen der in diesem Kapitel untersuchten Archaeen.

Abkürzung	Erläuterung
Blindwert	Ein leeres Vial, welches alle Schritte der Probenaufarbeitung durchlaufen hat.
Kontrollprobe	Archaeen der auf Glycerol adaptierten Art „ <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MW00G“
¹³ C- <i>S. acidocaldarius</i>	Archaeen der auf ¹³ C-markiertem Glycerol adaptierten Art „ <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MW00G“
Knock-Out-Mutante	¹³ C- <i>S. acidocaldarius</i> , bei denen das Gen <i>saci_1115</i> deaktiviert wurde (vollständige Bezeichnung: <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> MW00G Δ <i>saci_1115</i>)
¹³ C- <i>H. volcanii</i>	Archaeen der auf ¹³ C-markiertem Glycerol adaptierten Art „ <i>Haloferax volcanii</i> “
¹³ C-Caprylsäure/ FA 8:0 ¹³ C ₈	Bezeichnung einer ¹³ C-markierter Fettsäure

Vorstellung und Überprüfung des experimentalen Ansatzes

In einer Studie von Hamerly *et al.* zu Fettsäuren in Archaeen wurden vor allem Palmitinsäure (FA 16:0), Stearinsäure (FA 18:0) sowie deren ungesättigten Analoga detektiert [35]. Diese Fettsäuren treten jedoch häufig als Kontaminationen auf, da diese ubiquitär in der Umwelt vorkommen [51-54]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in Archaeen gefundenen Fettsäuren nicht aus anderen Kontaminationsquellen stammten. Um mögliche Kontaminationen auszuschließen, wurden Archaeen der Art *S. acidocaldarius* auf einem Medium aus vollständig ¹³C-markiertem Glycerol (¹³C-Glycerol) kultiviert. Das ¹³C-Glycerol stellte die einzige Kohlenstoffquelle dar, welche den Archaeen zur Verfügung stand. Aus einer früheren Studie von Schmerling *et al.* ist bekannt, dass die Nutzung von Glycerol als Kohlenstoffquelle für *S. acidocaldarius* mithilfe einer Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase möglich ist [170]. Die beim Einsatz von ¹³C-Glycerol entstandene Verschiebung des *m/z*-Verhältnisses ermöglicht eine massenspektrometrische Differenzierung zwischen den aus Archaeen, und aus Kontaminationsquellen stammenden Fettsäuren. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass von den Archaeen gebildete Fettsäuren vollständig ¹³C-markiert vorliegen. Um zu überprüfen, ob das Glycerol wie vorgesehen von den Archaeen verstoffwechselt wurde, wurden die in den Archaeen vorkommenden Aminosäuren mittels LC-ESI-QTOF-MS untersucht (Abbildung 21). Dabei zeigte sich die zu erwartende Verschiebung des *m/z*-Verhältnisses. Es konnte somit gezeigt werden, dass das ¹³C markierte Glycerol von den Archaeen als Kohlenstoffquelle genutzt, und stoffwechseltechnisch verwertet wird.

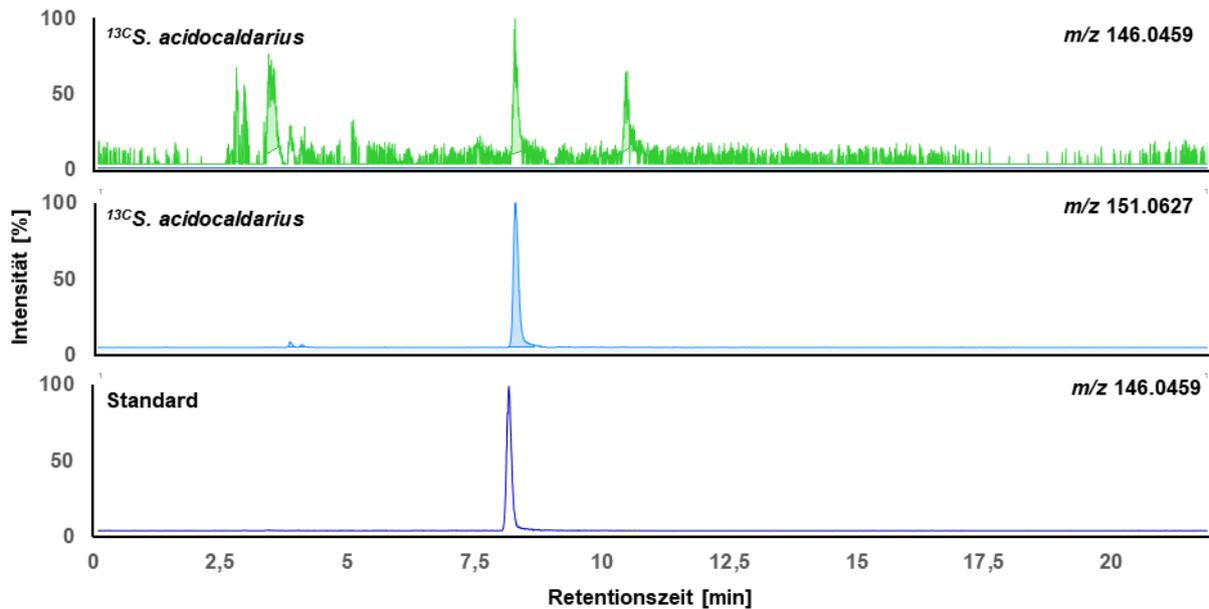


Abbildung 21: LC-QToF-MS-Messung der Aminosäuren der in den auf ^{13}C -markierten Glycerol kultivierten *S. acidocaldarius*. Wie in den oberen beiden Chromatogrammen gezeigt liegt Glutaminsäure vollständig ^{13}C -markiert vor. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass das Glycerol von *S. acidocaldarius* wie vorgesehen verstoffwechselt wurde.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass Fettsäuren, sofern sie von den Archaeen gebildet werden, vollständig ^{13}C -markiert vorliegen. Signale von nicht markierten Fettsäuren sind somit auf Kontaminationsquellen bei der Kultivierung der Zellen, der Extraktion der Lipide oder der Derivatisierung der Fettsäuren, und nicht auf den Metabolismus der Archaeen zurückzuführen. Auf diese Weise wurde eine Hintergrundkontamination der Proben ausgeschlossen, wodurch die Sensitivität der in Kapitel 4.1 validierten Methode weiter erhöht wird. Um zu überprüfen, ob die beschriebenen Fettsäuren in ^{13}C -*S. acidocaldarius* wiedergefunden werden können, wurden die Archaeen mit Isopropanol extrahiert und anschließend mittels GCxGC-EI-MS untersucht. Dies diente neben der Suche nach ^{13}C -markierten Fettsäuren auch einer Abschätzung der in den Archaeen vorliegenden Kontaminationen. Anhand der Unterschiede im MS-Spektrum sollte das Verhältnis von archaealen Fettsäuren zu Kontaminationen abgeschätzt werden. Hierbei können Palmitinsäure (FA 16:0), Stearinsäure (FA 18:0) und Ölsäure (FA 18:1) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22).

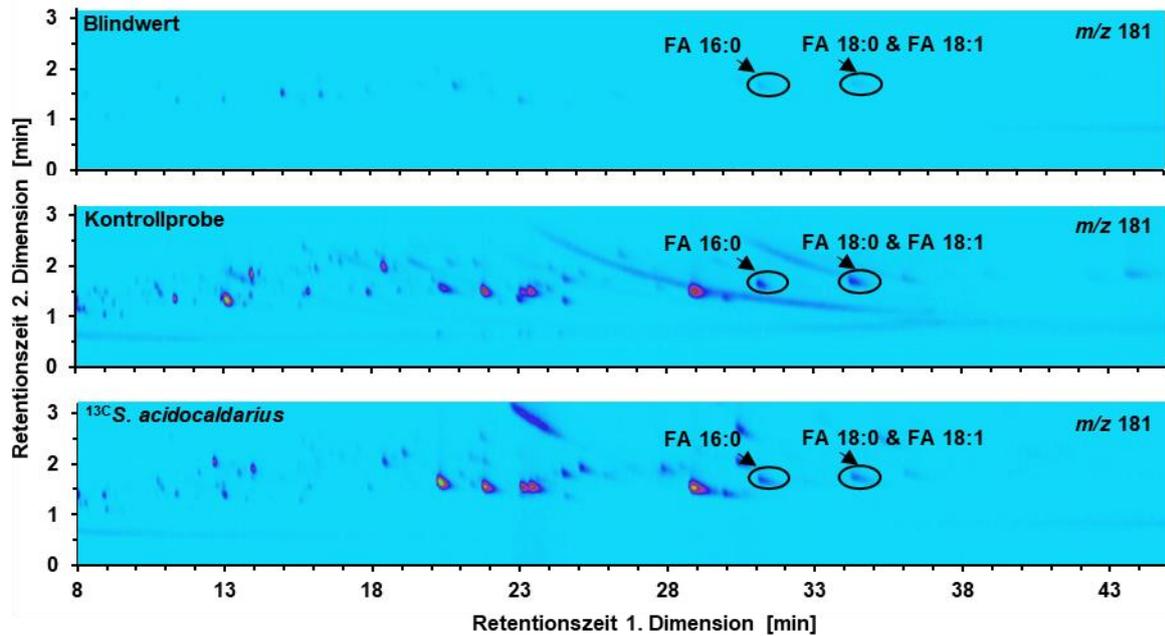


Abbildung 22: EIC (*Extracted Ion Chromatogram*) (m/z 181) der GCxGC-EI-MS Analyse von ^{13}C -*S. acidocaldarius*. Es wurden ein Blindwert und eine Kontrollprobe mit aufgearbeitet (siehe Tabelle 6). Dargestellt ist das aus der abgespaltenen PFB-Gruppe resultierende Ion (m/z 181), welches durch die Derivatisierung selektiv an die Fettsäure gebunden wurde. Bei den MS-Spektren zeigten sich keine Unterschiede in den m/z -Verhältnissen zu den Fragmenten der untersuchten Fettsäuren, weshalb die Signale auf Kontaminationen zurückzuführen sind.

Jedoch sind in den MS-Spektren keine Unterschiede zwischen der Kontrollprobe und ^{13}C -*S. acidocaldarius* feststellbar. Die detektierten Fettsäuren können somit auf Kontaminationen zurückgeführt werden.

4.2.2 Untersuchung der Fettsäuren in *Sulfolobus acidocaldarius*

Um ^{13}C -markierte Fettsäuren sensitiver zu erfassen, wurde die in Kapitel 4.1.2 optimierte GC-APCI-MS-Methode für die Detektion von Fettsäuren von einer Kettenlänge von 8 bis 26 Kohlenstoffatomen genutzt. Die m/z -Verhältnisse der analysierten Analyten wurde hierbei auf die ^{13}C -markierten Fettsäuren angepasst. Eine Liste aller Transitionen sind im Anhang in Tabelle 11 zu finden. Die Extraktion der Lipide erfolgte nach Hydrolyse mit Chloroform. Mithilfe der $p\text{MRM}$ -Methode konnten abermals keine der vermuteten Fettsäuren detektiert werden. Anders als bei früheren Messungen sind jedoch aufgrund der durch die Markierung bedingte Veränderung der analysierten m/z -

Verhältnisse keine Kontaminationssignale zu beobachten. Jedoch sind bei Untersuchung der freien Fettsäuren ^{13}C Caprylsäure (FA 8:0 $^{13}\text{C}_8$) und ^{13}C Caprinsäure (FA 10:0 $^{13}\text{C}_{10}$) nachzuweisen, welche in Abbildung 23 gezeigt sind. Bei der Analyse der Gesamtfettsäuren zeigen sich allerdings deutlich verringerte Signalintensitäten, weshalb lediglich ein geringes Signal der ^{13}C Caprinsäure nachzuweisen ist.

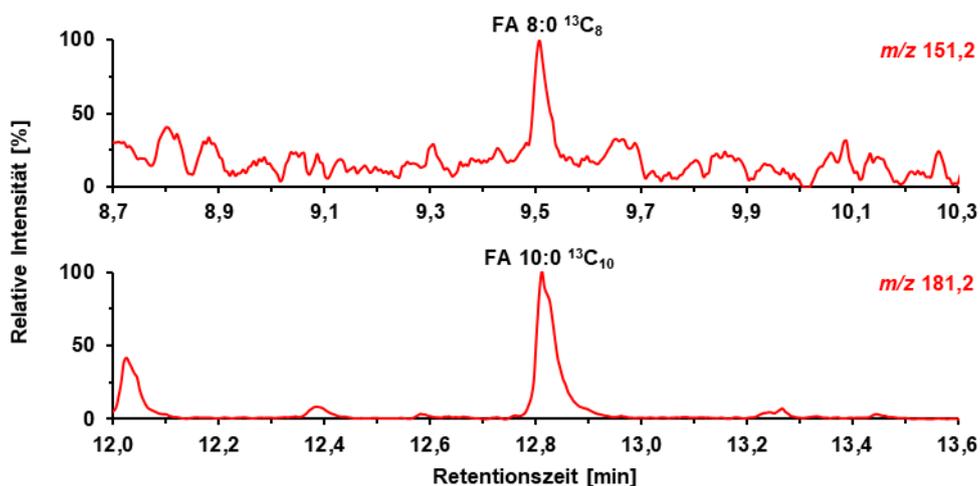


Abbildung 23: Freie Fettsäuren in ^{13}C *S. acidocaldarius*, analysiert mittels GC-APCI-MS. Es sind die Fettsäuren FA 8:0 $^{13}\text{C}_8$ (m/z 151,2) und FA 10:0 $^{13}\text{C}_{10}$ (m/z 181,2) detektierbar. Die Messungen wurden im *pseudo*MRM-Modus durchgeführt.

Da der Peak von ^{13}C Caprylsäure, wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, an der Grenze der Nachweisgrenze liegt ($s/n \approx 3$), ist eine genaue Quantifizierung der Fettsäure schwierig. Mithilfe des internen Standards kann jedoch abgeschätzt werden, dass diese in einem Konzentrationsbereich von 100 fmol pro mg Zellpellet liegt. ^{13}C Caprinsäure kann näherungsweise mit einer Konzentration von 1700 ± 400 fmol pro mg Zellpellet angegeben werden, die genannten Konzentrationen sind jedoch aufgrund des analysierten Konzentrationsbereichs mit der hieraus resultierenden Unsicherheit zu betrachten.

Fettsäuren können in biologischen Systemen sowohl frei wie auch gebunden vorliegen. Bisher wurde nach der Extraktion eine Hydrolyse durchgeführt, um gebundene Fettsäuren in freie Fettsäuren zu überführen. Jedoch kann es hierbei zu einer Diskriminierung von Fettsäuren kommen, wenn diese nicht von der Extraktion erfasst werden. Um dem vorzubeugen, wurde die Hydrolyse vor der Chloroform-Extraktion durchgeführt. Allerdings führen hierbei Matrixbestandteile zu Interferenzen bei der

Messung. Um diese Störungen zu reduzieren wurde die Extraktion mit MTBE als Lösungsmittel durchgeführt (Abbildung 24) [157].

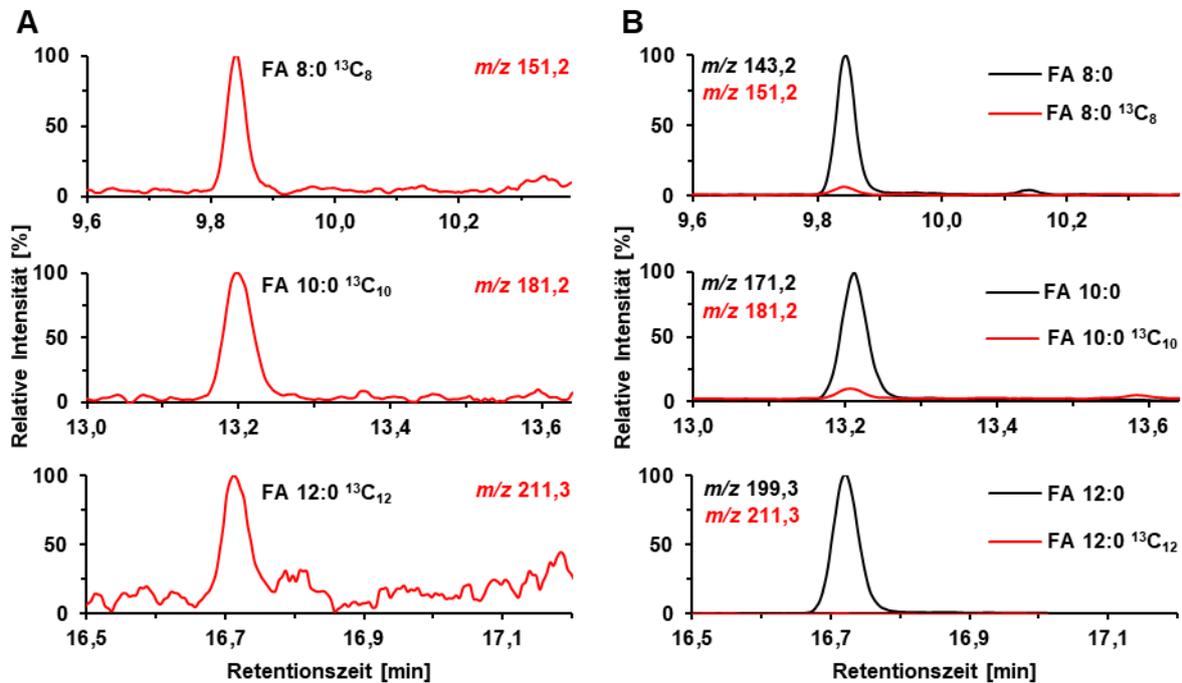


Abbildung 24: Analyse des Gesamtfettsäuregehaltes von ¹³C-*S. acidocaldarius* mittels GC-APCI nach Hydrolyse und Extraktion mittels MTBE. A: Signale für die Fettsäuren FA 8:0 ¹³C₈, FA 10:0 ¹³C₁₀ und FA 12:0 ¹³C₁₂ detektiert im pMRM-Modus. B: EICs der im Scan-Modus untersuchten Proben. Die schwarze Linie zeigt die Intensität der natürlich vorkommenden monoisotopischen Fettsäuren (Kontaminationssignal) im Vergleich zu den markierten Fettsäuren (rote Linie). Aufgrund der deutlich höheren Kontaminationssignale können die Proben nur mithilfe der ¹³C-Markierung analysiert werden. Da die aus dem Isotopenverhältnis resultierende Menge an vollständig ¹³C-markierten Fettsäuren bei FA 8:0 lediglich bei 1 zu 10¹⁶ liegt, ist ein Signal durch die natürliche ¹³C-Verteilung auszuschließen.

Neben der bereits zuvor gefundenen ¹³C-Caprylsäure und ¹³C-Caprinsäure konnte nach einer Extraktion mit MTBE auch ein Signal für ¹³C-Laurinsäure (FA 12:0 ¹³C₁₂) detektiert werden, wie in Abbildung 24 A dargestellt wurde. Bei dem Peak der ¹³C-Caprylsäure liegt das *s/n*-Verhältnis deutlich über den in Abbildung 23 dargestellten Ergebnissen, wodurch eine eindeutige Identifikation der Fettsäure möglich ist. Zudem gibt es Hinweise auf ¹³C-Myristinsäure (FA 14:0 ¹³C₁₄), welche jedoch aufgrund der sehr geringen Intensität und des daraus resultierenden, sehr geringen *s/n*-Verhältnisses nicht mit Sicherheit detektiert werden konnte und sich bei späteren Messungen als nicht reproduzierbar herausstellte.

Um das Verhältnis der markierten Fettsäuren, welche von den Archaeen gebildet wurden, und nicht markierten, aus Kontaminationen stammenden Fettsäuren, abzuschätzen, wurden dieselben Proben anschließend im Scan Modus analysiert (Abbildung 24 B). Die Messungen wurden in einem Bereich von m/z 142-153 (FA 8:0), m/z 168-183 (FA 10:0) und m/z 196-213 (FA 12:0) mit jeweils 333 ms/spectra durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, ob die Menge an detektierten ^{13}C -markierten Fettsäuren nicht auf das natürliche Isotopenverhältnis von ^{12}C und ^{13}C zurückzuführen ist. Wie in Abbildung 24 abgebildet, ist die Konzentration der natürlich vorkommenden monoisotopischen Fettsäuren (schwarz) deutlich größer als die ihrer ^{13}C -markierten Derivate (rot). So machen die Peaks von ^{13}C Caprylsäure und ^{13}C Caprinsäure lediglich ~10 % der Peaks des Kontaminationssignals aus. Die im $p\text{MRM}$ -Modus detektierte ^{13}C Laurinsäure, kann im Scan-Modus aufgrund der geringeren Sensitivität nicht detektiert werden. Es wurde gezeigt, dass eine Interferenz durch die natürlich vorkommende ^{13}C -Verteilung auszuschließen ist. Wären die gemessenen Signale auf die natürliche Isotopenverteilung zurückzuführen, so würde das Verhältnis von ^{13}C Caprylsäure zu Caprylsäure lediglich 1 zu 10^{16} betragen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die detektierten Fettsäuren tatsächlich durch die Verstoffwechslung des eingesetzten Glycerols entstanden sind. Die Notwendigkeit der verwendeten Markierung konnte somit dargelegt werden, da aufgrund des deutlich größeren Signals der natürlich isotopologen Fettsäuren eine sichere Bestimmung der archaealen Fettsäuren ohne eine Markierung nicht, beziehungsweise nur mit einem sehr großen Zeit- und Kostenaufwand, möglich gewesen wäre.

Untersuchung größerer Probeneinwaagen

Wie in den vorausgegangenen Abbildungen zu sehen, ist die Konzentration der Fettsäuren häufig im Bereich der Nachweisgrenze. Für eine bessere Auswertung sowie für eine robuste Quantifizierung wurde die Probeneinwaage von 20 mg auf 200 mg erhöht. Das Ziel war eine Verbesserung des s/n -Verhältnisses, um weitere von ^{13}C S. *acidocaldarius* Fettsäuren gebildete Fettsäuren zu detektieren und die bisher gefundenen Fettsäuren zu bestätigen. Allerdings kann eine deutlich größere Probenmenge zu starken Kontaminationen von Liner und Ionenquelle durch die Zellmatrix führen. Um diese zu minimieren und somit die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu erhöhen, wurde für die Reinigung des Lipidextraktes eine Festphasenextraktion (C18) eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.4). Die Messung erfolgte mittels GC-APCI-MS, welcher zur

zusätzlichen Steigerung der Sensitivität im *splitless-Mode* betrieben wurde. Zwar können durch die Festphasenextraktion einige möglicherweise störende Matrixbestandteile abgetrennt werden, sodass keine Verunreinigung von Quelle oder Liner feststellbar ist. Allerdings kommt es sowohl bei den zu untersuchenden ^{13}C -markierten Fettsäuren, wie auch bei den internen Standards zu hohen Verlusten, wodurch eine Quantifizierung nicht möglich ist.

Um Verluste durch die Extraktion zu vermeiden, wurden die Proben wie bisher ohne Festphasenextraktion aufgearbeitet. Hierbei sind die bereits zuvor detektierte ^{13}C Capryl-, ^{13}C Caprin- und ^{13}C Laurinsäure mit einem deutlich verbesserten *s/n*-Verhältnis detektierbar, und konnten somit abermals bestätigt werden (Abbildung 25).

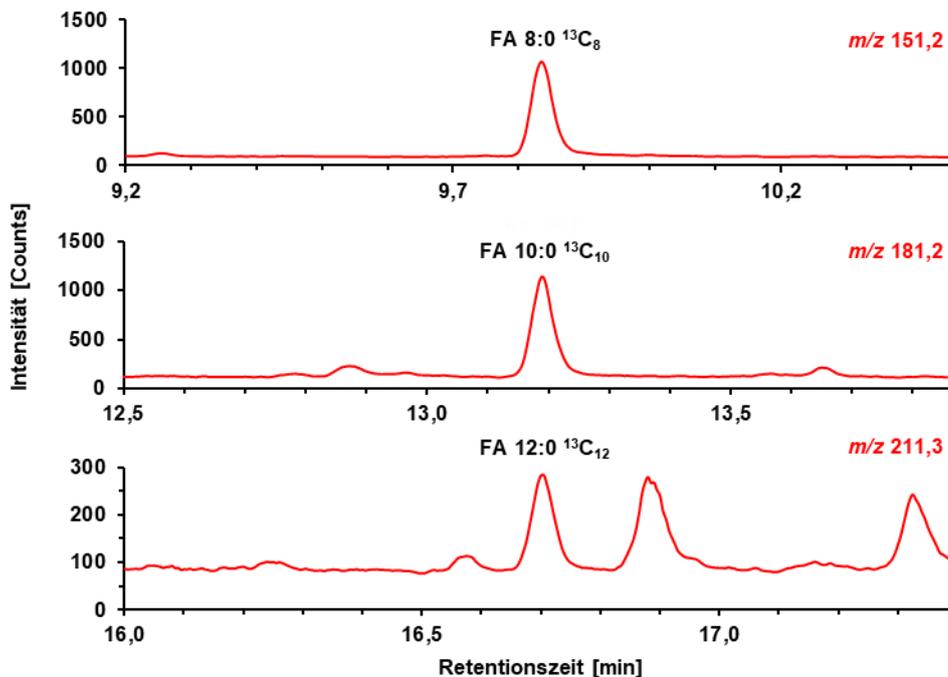


Abbildung 25: Aufarbeitung und Messung eines 200 mg Zellpellets von ^{13}C *S. acidocaldarius* mittels GC-APCI nach Hydrolyse. Die Intensität der Peaks lag bei FA 8:0 $^{13}\text{C}_8$ und FA 10:0 $^{13}\text{C}_8$ etwa bei dem 10–20-fachen im Vergleich zu früheren Messungen, sodass die Fettsäuren FA 8:0 $^{13}\text{C}_8$, FA 10:0 $^{13}\text{C}_{10}$ und FA 12:0 $^{13}\text{C}_{12}$ sowohl in den freien Fettsäuren (hier nicht gezeigt) wie auch in den Gesamtfettsäuren bestätigt werden konnten. Die große Probenmenge führt jedoch im Liner und der Quelle zu Verschmutzungen, weshalb die Messungen nicht reproduzierbar sind.

Abgesehen von den drei Fettsäuren, welche bereits bei den vorausgegangenen Experimenten detektiert worden sind, sind jedoch keine weiteren Fettsäuren nachweisbar. Da trotz der hohen Sensitivität der verwendeten Methode keine weiteren Fettsäuren detektierbar sind, kann vermutet werden, dass es sich bei ^{13}C Laurinsäure um die

längste, biologisch relevante Fettsäure in *S. acidocaldarius* handelt. Neben der detektierten ^{13}C Laurinsäure wurden auch weitere Peaks beobachtet, welche jedoch nicht weiter identifiziert werden konnten. Möglicherweise handelt es sich hierbei um verzweigt-kettige Isomere der Fettsäure, dies kann jedoch nur durch eine Analyse der entsprechenden Fettsäurestandards bestätigt werden.

Die großen Probenmengen, welche im *splitless-Mode* untersucht wurden, führen jedoch zu einer starken, sichtbaren Verschmutzung von Liner und Quelle. Dies resultiert bereits nach wenigen Messungen in einem Abfall der Signalintensität. So beträgt die Signalintensität bei den freien Fettsäuren bereits bei der zweiten Messung lediglich ein Zehntel der Intensität der ersten Messung, weswegen reproduzierbare Messungen nicht möglich sind. Die verwendete Methode eignet sich daher lediglich für qualitative Bestätigung der Ergebnisse, eine Quantifizierung ist hingegen nicht möglich.

Identifikation von Fettsäuren in der Knock-Out-Mutante

Der AK Molekulare Enzymtechnologie von Frau Prof. Dr. Siebers hat ein Protein und das entsprechende Gen identifiziert, welches für die Biosynthese von Fettsäuren in Archaeen maßgeblich verantwortlich ist. Um diese Ergebnisse auf metabolischer Ebene zu verifizieren, wurde das Gen ausgeknockt, wodurch das Expressieren des Proteins gestoppt wurde. Die Archaeen wurden, wie zuvor, auf ^{13}C -markierten Glycerol kultiviert, um einen direkten Vergleich zwischen dem auf Glycerol adaptierten Wildtyp und der Knock-Out-Mutante (*S. acidocaldarius* MW00G Δ saci_1115) zu ermöglichen. Die Proben wurden wie zuvor aufgearbeitet, und anschließend mittels GC-APCI-MS auf freie und veresterte Fettsäuren untersucht.

Sowohl in der Knock-Out-Mutante wie auch in ^{13}C *S. acidocaldarius* sind in den Gesamtfettsäure-Proben ^{13}C Caprylsäure und ^{13}C Caprinsäure nachweisbar. Nur ^{13}C Caprinsäure ist als freie Fettsäure nachweisbar, was primär auf die geringe Signalintensität bei den Proben zurückzuführen ist. Es zeigt sich jedoch, dass die Konzentration der Fettsäuren in ^{13}C *S. acidocaldarius* deutlich höher ist als in der Knock-Out-Mutante. Dies steht im Einklang zu der zuvor formulierten These, dass es sich bei dem deaktivierten Gen tatsächlich um ein für die Fettsäurebiosynthese relevantes Gen handelt, und somit die Fettsäurebiosynthese in der Knock-Out-Mutante gehemmt wird.

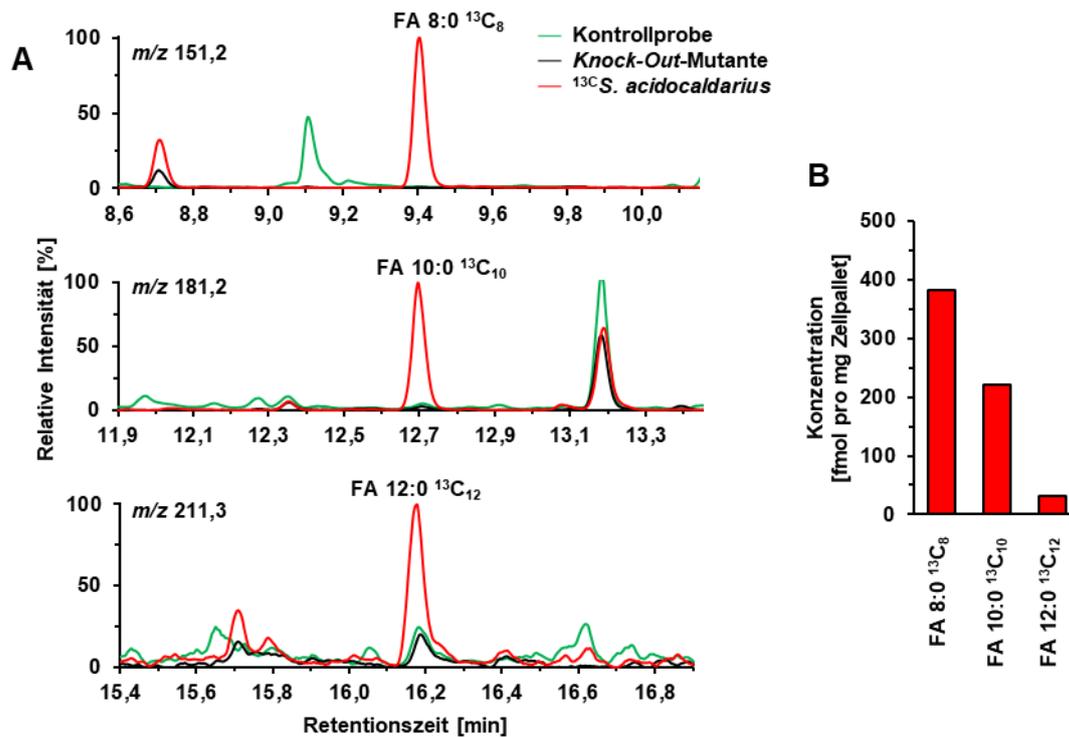


Abbildung 26: *Knock-Out-Experiment* des Gens *saci_1115*. Es wurden ^{13}C . *S. acidocaldarius* im Vergleich zu einer Kontrollprobe (siehe Tabelle 6) und einer *Knock-Out-Mutante* gemessen, bei der das Gen *saci_1115* ausgeschaltet wurde. Die Proben wurden wie zuvor hydrolysiert, mit MTBE extrahiert und anschließend mittels GC-APCI-MS gemessen. Hierbei zeigt sich eine deutlich höhere Signalintensität bei ^{13}C . *S. acidocaldarius*, woraus geschlossen wird, dass das untersuchte Gen eine entscheidende Rolle in der Fettsäuresynthese von *S. acidocaldarius* spielt (A). Detektierten Fettsäuren wurden mithilfe des internen Standards quantifiziert (Dreisatz) und in einem Balkendiagramm dargestellt (B).

Um dies zu bestätigen, wurden verschiedene Proben im Triplikate aufgearbeitet und untereinander verglichen: 1.) die *Knock-Out-Mutante* 2.) die *Knock-Out-Mutante*, bei der eine Zugabe von 0,05 % D-Arabinose im Medium erfolgte 3.) die *Knock-Out-Mutante*, welche das Plasmid (pBSAra-UTR:*saci_1115*-Ctts), welches das bei der Mutante fehlende Gen (*saci_1115*), enthält und bei der ebenfalls eine Zugabe von 0,05 % D-Arabinose im Medium erfolgte. Die D-Arabinose dient als Promoter für das Plasmid. Alle Proben wurden auf ^{13}C -markiertem Glycerol kultiviert. Zudem wurden zusätzlich zu den Mutanten, wie bei den vorhergegangenen Messungen, ^{13}C . *S. acidocaldarius*, eine Kontrollprobe sowie ein Blindwert untersucht (siehe Tabelle 6). Es wurde erwartet, dass die Fettsäurekonzentration der *Knock-Out-Mutante* durch das Plasmid erhöht wird und der in ^{13}C . *S. acidocaldarius* entsprechen würde.

Da die zu erwartenden Konzentrationsunterschiede im Bereich der Nachweisgrenzen liegen, wurde die Einwaage auf 50 mg erhöht und die Proben wurden im *Splitless-Mode* gemessen. Hierbei sind in ^{13}C *S. acidocaldarius*, wie in Abbildung 26 dargestellt, wieder ^{13}C Caprylsäure, ^{13}C Caprinsäure sowie geringe Mengen an ^{13}C Laurinsäure nachweisbar. Jedoch weisen entgegen der zuvor formulierten Hypothese keine Knock-Out-Mutanten, weder mit noch ohne Plasmid, ^{13}C -markierte Fettsäuren in einem quantifizierbaren Bereich auf. Eine mögliche Erklärung ist, dass das in dem Plasmid enthaltene Gen nicht in dem angenommenen Umfang exprimiert wird.

Einfluss des Nährmediums auf die Fettsäurekonzentration

Um ein besseres Verständnis für die biologischen Prozesse zu erlangen, welche zu der Bildung der gefundenen Fettsäuren in Archaeen führen, wurden vom AK Molekulare Enzymtechnologie Archaeen in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert und anschließend mit der GC-APCI-MS Methode analysiert. Neben den bereits untersuchten, auf ^{13}C -Glycerol adaptierten *S. acidocaldarius*, wurden *S. acidocaldarius* auf ^{13}C -markierter Xylose, sowie die auf ^{12}C - wie auch auf ^{13}C -markierter Xylose kultivierte Knock-Out-Mutante, analysiert.

Die Proben wurden wie zuvor beschrieben extrahiert, hydrolysiert und derivatisiert. Bei der Analyse mittels GC-APCI-MS sind lediglich in den Gesamtfettsäure-Proben der auf ^{13}C -markierten Glycerol kultivierten ^{13}C *S. acidocaldarius* markierte Fettsäuren nachweisbar. Da in den mit ^{13}C -markierter Xylose kultivierten ^{13}C *S. acidocaldarius* keine markierten Fettsäuren detektierbar sind (siehe Abbildung 27), konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Nährmediums einen maßgeblichen Einfluss auf die Bildung der Fettsäuren hat. Es wurde seitens des AK Molekulare Enzymtechnologie vermutet, dass es durch die Verwendung des Zuckers Xylose zu einer Hemmung der Fettsäuresynthese in den Archaeen kommt.

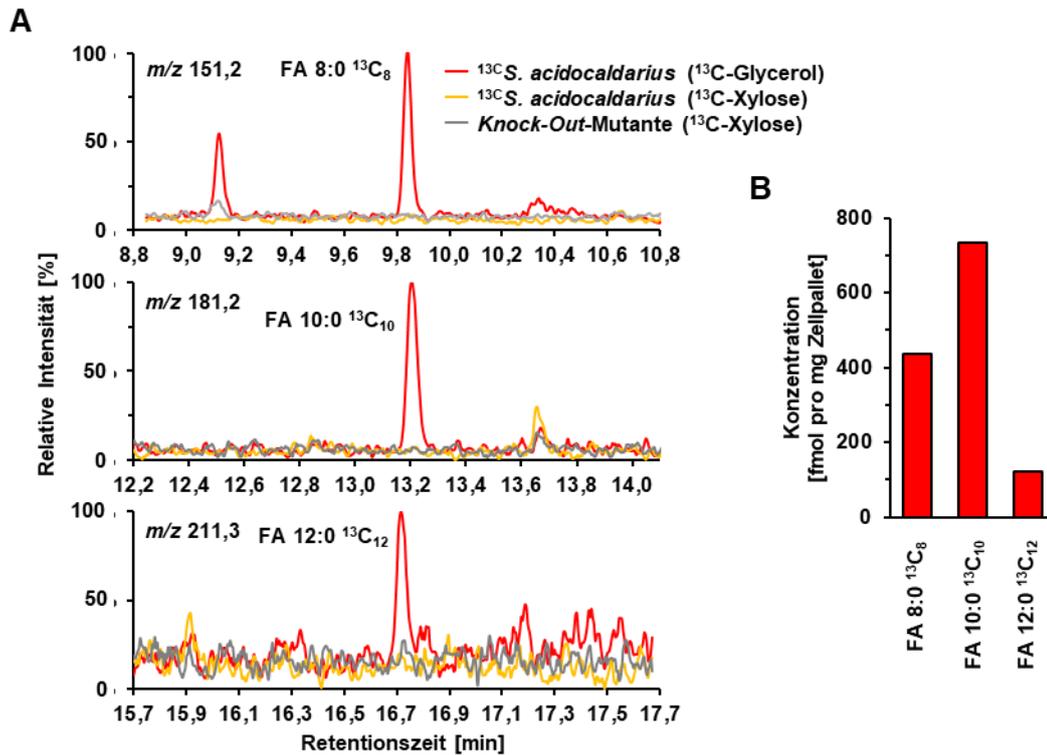


Abbildung 27: Untersuchung des Einflusses des Nährmediums auf die identifizierten Fettsäuren. In auf Glycerol kultivierten ^{13}C *S. acidocaldarius* sind Fettsäuren identifizierbar, im Gegensatz zu den auf Xylose kultivierten ^{13}C *S. acidocaldarius* und der auf Xylose kultivierten Knock-Out-Mutante.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den Einfluss des Nährmediums auf die Fettsäuresynthese ein Vergleich von Literaturergebnissen deutlich erschwert wird. So wurde beispielsweise in der eingangs erwähnten Publikation von Hamerly *et al.* für die Kultivierung von *S. solfataricus* DSMZ 182 Medium, welches mit 0,1 % Glucose versetzt wurde, verwendet [35]. Inwieweit die Unterschiede in dem detektierten Fettsäurespektrum auf die verwendete Kohlenstoffquelle zurückzuführen sind, kann daher an dieser Stelle nicht abgeschätzt werden.

4.2.3 Analyse von *Haloferax volcanii*

Um die Unterschiede in den Fettsäurespektren verschiedener Archaeen-Gattungen besser zu verstehen, wurden Proben der Gattung *Haloferax* aufgearbeitet und mit den zuvor untersuchten Zellen der Gattung *Sulfolobus* verglichen. Hierbei handelt es sich um einen halophilen Archaeenstamm, welcher im Lipidom große Unterschiede zu den

zuvor analysierten hyperthermophilen *S. acidocaldarius* aufweist [171]. Dies wird bereits bei der Extraktion der Proben deutlich, wie in Abbildung 28 zu erkennen ist. Während das Lipidextrakt von ^{13}C *S. acidocaldarius* über einen gelb-bräunlichen Farbton verfügt, ist das Lipidextrakt der ^{13}C *H. volcanii* rötlich gefärbt, was durch die in Haloferax enthaltenden Carotinoide wie Canthaxanthin verursacht wird [171].

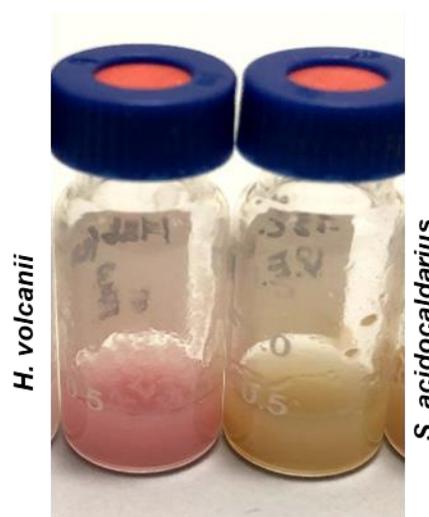


Abbildung 28: *H. volcanii* und *S. acidocaldarius* nach Hydrolyse.

Wie in Abbildung 29 A gezeigt, sind die zuvor in ^{13}C *S. acidocaldarius* gefundenen Fettsäuren (^{13}C Capryl-, ^{13}C Caprin- und ^{13}C Laurinsäure) in ^{13}C *H. volcanii* nicht, oder nur in Spuren nachweisbar. Einen hohen Anstieg gibt es jedoch bei ^{13}C Palmitinsäure (FA 16:0 $^{13}\text{C}_{16}$). Diese Fettsäure ist sowohl bei ^{13}C *H. volcanii* wie auch bei ^{13}C *S. acidocaldarius* detektierbar, bei ^{13}C *S. acidocaldarius* ist dieses jedoch nicht deutlich höher als ein coelulierendes Signal in der Kontrollprobe (Peakflächenverhältnis <3). Bei ^{13}C *H. volcanii* kann, wie in Abbildung 29 B dargestellt, ein deutliches Signal bei ^{13}C *H. volcanii* im Vergleich zur Kontrollprobe detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der verschiedenen Gattungen große Unterschiede im Fettsäurespektrum gibt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die detektierten Fettsäuren unterschiedliche Funktion in den Archaeen erfüllen und sich auf diese Weise auf ihre jeweiligen Lebensräume angepasst haben. Über diese kann allerdings bisher lediglich spekuliert werden, beispielsweise wäre eine Funktion als Signalmolekül denkbar.

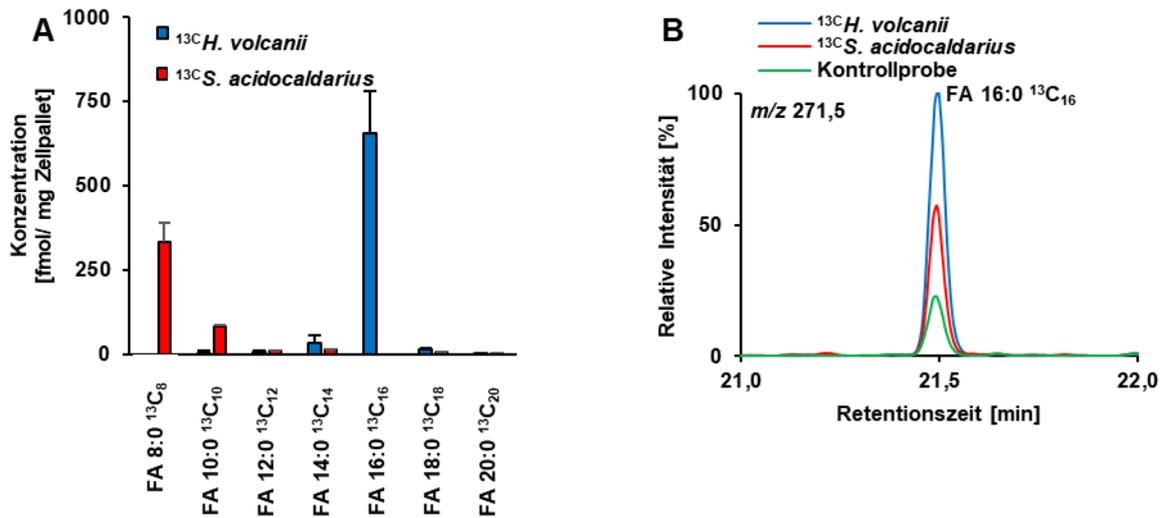


Abbildung 29: A: Konzentration von Fettsäuren in ¹³C-*H. volcanii* (blau) und ¹³C-*S. acidocaldarius* (rot). ¹³C-*H. volcanii* wurde als biologisches Triplikate aufgearbeitet. Bei ¹³C-*S. acidocaldarius* wurden technische Replikate gemessen, da aufgrund der verbleibenden Probenmenge biologische Replikate nicht möglich waren. B: Vergleich der Chromatogramme der Fettsäure FA 16:0 ¹³C₁₆ von ¹³C-*H. volcanii* (blau), ¹³C-*S. acidocaldarius* (rot) und der Kontrollprobe (grün).

4.2.4 Fazit

Durch die Verwendung von ¹³C-markiertem Glycerol als Kohlenstoffquelle konnte bestätigt werden, dass Fettsäuren von *H. volcanii* und *S. acidocaldarius* gebildet werden. Dabei unterscheiden sich die identifizierten Fettsäuren deutlich. Während in *S. acidocaldarius* ¹³C-Capryl-, ¹³C-Caprin- und ¹³C-Laurinsäure vorkommen, liegt in *H. volcanii* vor allem ¹³C-Palmitinsäure vor. In einer Knock-Out-Mutante von *S. acidocaldarius* sind hingegen keine der im Wildtyp identifizierten Fettsäuren detektierbar. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Fettsäurebiosynthese in Abwesenheit des für das Gen *saci_1115* translatierte Protein deutlich gehemmt abläuft. Jedoch ist nach Einbringen eines Plasmides, welches das entsprechende Gen enthält, keine erneute Steigerung der Fettsäurebiosynthese feststellbar. Zudem ist die Fettsäurebiosynthese in Archaeen stark abhängig vom verwendeten Nährmedium. So wurden neben dem Glycerol-basiertem Nährmedium auch Nährmedien mit Xylose als Kohlenstoffquelle zur Kultivierung von *S. acidocaldarius* untersucht. Hierbei zeigt sich, dass bei den auf Xylose kultivierten *S. acidocaldarius* keine Fettsäuren detektierbar sind. Auch die Gattung hat einen entscheidenden Einfluss. In *S. acidocaldarius* sind primär ¹³C-Caprylsäure und

¹³C-Caprinsäure detektierbar. Im Kontrast dazu liegt in Proben aus *H. volcanii* ¹³C-Palmitinsäure als primäre Fettsäure vor. Dies erklärt auch die Unterschiede zu der Publikation von Hamerly *et al.*, welcher langkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 14 bis 26 Kohlenstoffatomen detektiert hatte [35]. Die detektierten kürzerkettigen Fettsäuren wurden zuvor nicht beschrieben. Da sich jedoch sowohl die Archaeen wie auch das verwendete Medium und die verwendeten Analysemethoden unterscheiden, ist ein direkter Vergleich zwischen den Studien nur schwierig möglich. So wurden bei Hamerly *et al.* *S. solfataricus*, *L. hospitalis* und *L. hospitalis-N. equitans* auf einem Glucose-haltigem Medium kultiviert, die Fettsäuren wurden methyliert und anschließend mittels GC-EI-MS sowie mittels NMR untersucht. Zwar wurden die verschiedenen eingesetzten Materialien auf Fettsäuren untersucht, jedoch wurden weder Knock-Out-Experimente noch eine ¹³C-Markierung verwendet, um zu verifizieren, dass es sich bei den identifizierten Fettsäuren tatsächlich um archaeale Stoffwechselprodukte handelt.

Die Konzentrationen der detektierten Fettsäuren liegen im hohen femtomolaren Bereich pro Milligramm feuchtem Zellpellet. Eine genaue Quantifizierung ist hierbei allerdings von vielen Faktoren abhängig, wie beispielsweise dem Restwassergehalt des Zellpellets, der Homogenität des Pellets, biologischen Schwankungen, wie auch den geringen detektierten Konzentrationen nahe der Nachweisgrenzen. Dies führt teilweise zu großen Unterschieden, wenn Messungen aus verschiedenen Jahren verglichen werden. Für eine exaktere Quantifizierung müssten daher zum einen die Einwaage der Zellen standardisiert werden. Eine Gefriertrocknung der Zellen, wie diese häufig zur Probenvorbereitung von Zellen verwendet wird, ist jedoch aufgrund des hohen Salzgehaltes des Mediums nicht durchführbar. Zum anderen könnte durch eine größere Anzahl an biologischen Replikaten biologische Schwankungen durch die Kultivierung der Zellen sowie auch Schwankungen durch Aufarbeitung und Messung besser ausgeglichen werden. Hierbei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass das Markieren mit schweren Isotopen mit hohen Kosten verbunden ist, was die Machbarkeit einschränkt. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die Ergebnisse einen wertvollen Beitrag zur Entschlüsselung der Fettsäurebiosynthese in Archaeen liefern.

4.3 Bestimmung der Doppelbindungsposition

*Einige der in diesem Kapitel gezeigten Daten sind in der Publikation “Unraveling the Double Bond Position of Fatty Acids by GC-MS Using Electron Capture APCI and In-Source Fragmentation Patterns“ in Zusammenarbeit mit J.F. Ayala-Cabrera und S.W. Meckelmann beim Journal of the American Society of Mass Spectrometry publiziert worden.**

**Reprinted with permission from J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2023, 34, 11, 2538–2546; Publication Date: September 26, 2023; <https://doi.org/10.1021/jasms.3c00257>. Copyright 2023 American Chemical Society.*

4.3.1 Einleitung

Die im Kapitel 4.1 vorgestellte Methode ist dazu geeignet, Fettsäuren in komplexen Matrices sensitiv und selektiv nachzuweisen. Die Identifikation der Kettenlänge und die Anzahl der Doppelbindungen der Fettsäuren erfolgte hierbei über die Retentionszeit sowie dem m/z -Verhältnisses der analysierten Fettsäuren. Neben der Anzahl der Doppelbindungen hat auch die Position der Doppelbindungen einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit der Fettsäuren. Hierbei stößt die bisherige Methode jedoch an eine Grenze, so kann es je nach Konfiguration der verschiedenen Fettsäureisomere zu Coelutionen kommen (Abbildung 30). Zwar kann diese Trennung durch die Verwendung anderer Derivatisierungen und damit verbunden dem Einsatz anderer Säulen wie WAX-Säulen verbessert werden, jedoch würde dies zu einem Verlust der für die PFB-Methode beschriebenen Vorteile wie Selektivität und Sensitivität der Methode führen. Deshalb wurde eine GC-APCI-QToF-Methode entwickelt, welche durch eine regioselektive Fragmentierung der Fettsäuren an der Doppelbindung die Identifikation der Position der ersten C=C Doppelbindung in der Fettsäure ermöglicht.

Tabelle 7: Struktur der untersuchten FA 18:1-Isomere.

Name	IUPAC	Doppelbindungsposition	Konfiguration
cis-8-Octadecansäure	cis-8-Octadecansäure	$\Delta 8$	cis
Elaidinsäure	trans-9-Octadecansäure	$\Delta 9$	trans
Ölsäure	cis-9-Octadecansäure	$\Delta 9$	cis
Vaccensäure	cis-11-Octadecansäure	$\Delta 11$	cis

Da bei ungesättigten Fettsäuren neben der Kettenlänge auch die Position der Doppelbindung sowie die cis-/trans-Isomerie von Relevanz ist, wurden vier verschiedene Isomere von FA 18:1 (Tabelle 7) derivatisiert und anschließend chromatographisch getrennt (Abbildung 30). Hierbei zeigt sich am Beispiel von Öl- und Elaidinsäure, dass es mit der beschriebenen Methode möglich ist, cis- und trans- Isomere voneinander zu trennen. Bei Konstitutionsisomeren wie Öl- und Vaccensäure kommt es darauf an, wie groß die Unterschiede der Doppelbindungsposition sind. So können Isomere getrennt werden, deren Doppelbindung um zwei Kohlenstoffatome verschoben ist. Daraus kann geschlossen werden, dass auch die häufig untersuchten ω 3- und ω 6-Fettsäuren voneinander getrennt werden könnten.

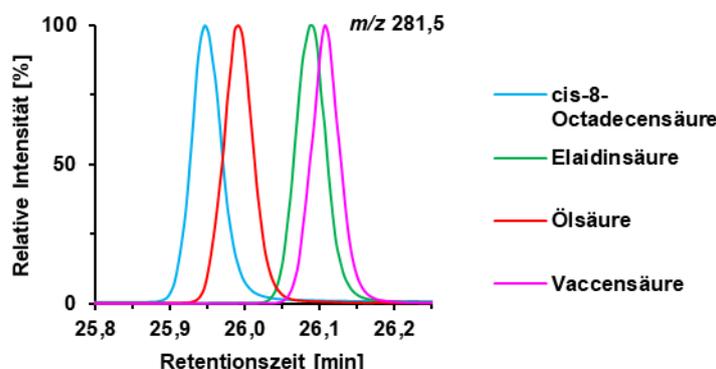


Abbildung 30: Trennung verschiedener isomerer Fettsäuren mittels GC-APCI-MS. Bei allen gezeigten Fettsäuren handelt es sich um Isomere der FA 18:1, weshalb für alle Fettsäuren dasselbe m/z -Verhältnis detektiert wird, und sind somit massenspektrometrisch nicht voneinander unterscheidbar. Ab einer Verschiebung der Doppelbindungsposition von 2 C-Atomen (Ölsäure/ Vaccensäure) sind die Peaks von FA 18:1 voneinander getrennt. Elaidinsäure, ein trans-Isomer der Ölsäure, weist zwar eine gute Trennung zu Ölsäure auf, coeluiert jedoch mit der Vaccensäure [modifiziert nach [158]].

Da sich die detektierten Fragmente aus der Position der ersten Doppelbindung ableiten, ist zur einfacheren Nachvollziehbarkeit eine Δ -Nomenklatur für die untersuchten Fragmente verwendet worden. Diese ist an die üblicherweise verwendete IUPAC-Nomenklatur der Fettsäuren angelehnt, bezieht sich jedoch anders als diese ausschließlich auf die Länge der Kohlenstoffkette (Fragmente). Diese Nomenklatur ist in Abbildung 31 am Beispiel von *n*-Hexadecansäure gezeigt.

4.3.2 Methodenentwicklung

Fragmentation von Fettsäuren in der APCI-Quelle

APCI-Quellen gehören zu den weichen Ionisationsverfahren, weswegen bei der Detektion von Fettsäuren die bisher analysierten [FA-PFB]-Ionen detektiert werden konnten. Zugleich kommt es jedoch im geringen Maße zu Fragmentierung und Oxidationen in der Ionenquelle (Abbildung 31). Die beobachteten Fragmente sind bereits in früheren Studien bei Plasmaquellen beschrieben worden [130,133]. Insbesondere eine Gruppe an oxidierten Fragmenten spielt hierbei eine besondere Rolle, welche bei APCI-Messungen auch bei gesättigten Fettsäuren auftreten, wie in Abbildung 31 am Beispiel von Palmitinsäure und Palmitoleinsäure gezeigt. Die Anzahl der gebildeten *in-source*-Fragmente nimmt hierbei mit sinkender Fragment-Kettenlänge ab. Bei ungesättigten Fettsäuren kommt es hingegen abhängig von der Position der Doppelbindung zu einem deutlichen Anstieg der jeweiligen regiospezifischen Fragmente. So liegt das $\Delta 9$ -Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 171,1027 in einer deutlich höheren Intensität vor als die übrigen untersuchten Fragmente. Anhand dieses Fragmentes lässt sich die Position der in Palmitoleinsäure vorliegenden Doppelbindung (zwischen dem neunten und dem zehnten Kohlenstoffatom) ableiten.

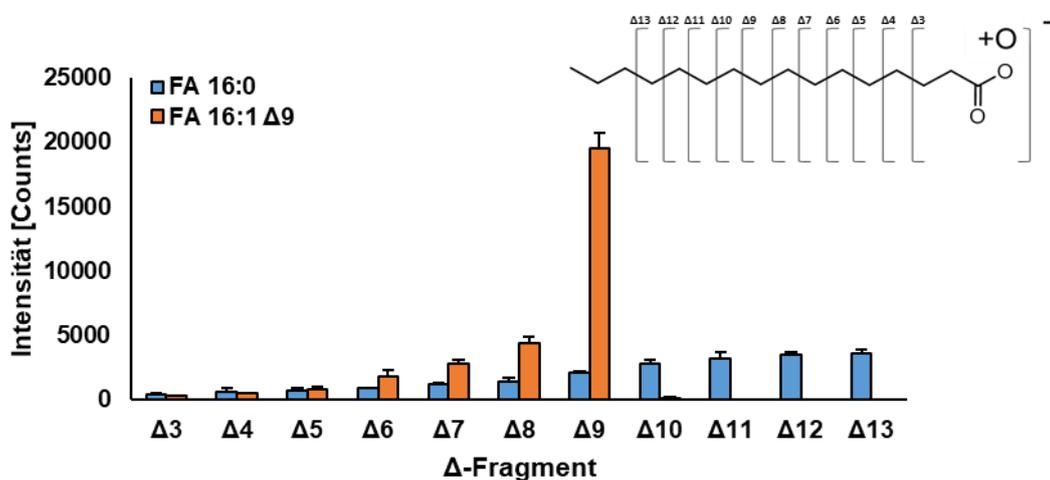


Abbildung 31: *In-source*-Fragmentierung von FA 16:0 und FA 16:1 $\Delta 9$ mittels GC-APCI-QToF ohne Verwendung eines Reaktanten.

Kopplung von Paternò-Büchi (PB) Reaktion mit Gaschromatographie

Um die auffällige Bildung der für die Doppelbindungsposition typischen Fragmente für die Bestimmung zu nutzen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die Bildung zu verstehen und zu optimieren. Hierzu wurde eine Kopplung der GC mit einer

PB-Reaktion durchgeführt. Als Reaktanten wurden Aceton und Benzaldehyd eingebracht und der Einfluss auf die Bildung spezifischer Ionen untersucht.

Bevor die eigentliche Reaktion aufgeklärt wurde, wurde untersucht, auf welche Weise der Reaktant in die Quelle eingebracht werden kann. Das Ziel war es, eine möglichst große Menge an Reaktant in der Gasphase der Quelle zu haben, um die Reaktion möglichst weit auf Seite des PB-Precursors zu verschieben. Hierbei wurden drei verschiedene Systeme getestet: Einbringen des Reaktanten mit einer Spritzenpumpe (Quellentemperatur 270 °C), Anreicherung des *Auxillary Gas* mittels Durchleitung durch eine mit Reaktant gefüllte Gaswaschflasche bei Raumtemperatur sowie das Einbringen eines mit Reaktant gefüllten Vials in die Ionenquelle (270 °C). Die Versuche wurden mit Aceton als Reaktant durchgeführt, welches über einen höheren Dampfdruck verfügt, weshalb ein deutlich sichtbares Signal für das Reaktant detektierbar ist und mögliche Änderungen in der Intensität deutlich schneller als bei Benzaldehyd erfassbar sind. Hierbei zeigt sich bei Verwendung der Spritzenpumpe, dass keine stabilen Signale erreichbar sind, und die Konzentration des Reaktanten in der Quelle starken Schwankungen ausgesetzt ist. Der Grund liegt vermutlich in der Bildung von Tropfen am Ende der Kapillare und eine daraus resultierende ungleichmäßige Verdampfung des Reaktanten. Bei dem Vial sowie bei den Gaswaschflaschen kann ein stabiles Signal über einen längeren Zeitraum erzeugt werden (siehe Abbildung 32).

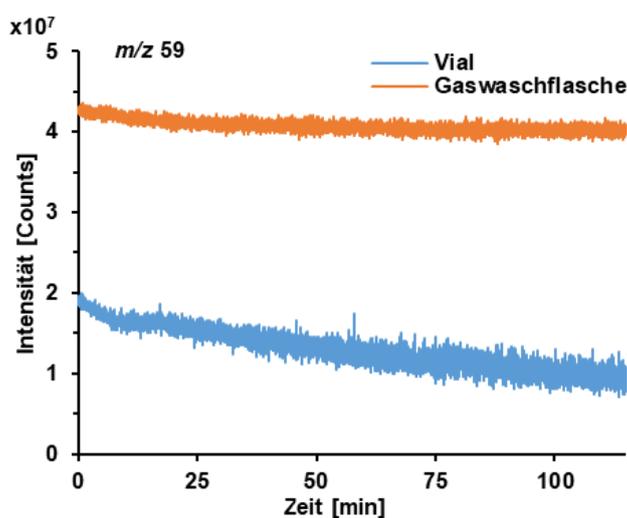


Abbildung 32: Messung der in der Quelle detektierten Acetonmenge unter Verwendung einer Gaswaschflasche (orange) und eines mit Aceton gefüllten Vials in der Quelle (blau).

Bei Verwendung des Vials kommt es jedoch über einen Zeitraum von 2 h zu einem Intensitätsabfall um 50 %. Dies kann auf den sinkenden Flüssigkeitsspiegel im

Vial und dem damit schlechteren Austausch der mit Aceton gesättigten Gasphase im oberen Teil des Vials zurückgeführt werden. Die Verwendung der Gaswaschflaschen ermöglicht hingegen deutlich längere Messzeiten. Der Intensitätsabfall liegt nach 2 h lediglich bei 5 %, welcher hauptsächlich auf das Anfahren der Anlage zurückzuführen ist. Auch die Intensität liegt trotz der geringeren Temperatur deutlich höher. In der Praxis kann die Anlage 6 h betrieben werden, bis die Gaswaschflaschen neu befüllt werden muss. Dies ermöglicht die Messung von längeren Messsequenzen.

Beim Einbringen von Aceton wurden bei verschiedenen Experimenten wiederholt sauerstoffhaltige Fragmente der Fettsäuren identifiziert, welche auch als Fragmente der PB-Reaktion beschrieben sind (O=Fragment; Abbildung 11). Allerdings ist das dazugehörige C=Fragment nicht reproduzierbar nachweisbar. Da es zudem in der Quelle zu Nebenreaktionen gekommen ist, ist das PB-Produkt, welches üblicherweise bei der PB-Reaktion im Q1 isoliert wird, nicht von dem entstandenen Nebenprodukt abzutrennen. Da das Nebenprodukt in deutlich höherer Konzentration als das eigentliche PB-Produkt vorliegt, ist eine gezielte Fragmentierung des PB-Produktes und eine Analyse der hierbei entstandenen Fragmente nicht möglich. Daher können die Doppelbindungspositionen der Fettsäuren nicht wie vorgesehen mit der PB-Reaktion bestimmt werden.

Warum die erwarteten Produkte bei der Reaktion nicht gebildet werden, liegt vermutlich an der zu geringen Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion, welche nicht vor dem Eintreten der Ionen in das Hochvakuum des Massenspektrometers vollständig abgelaufen ist. Zudem könnte der in der APCI-Quelle vorliegende Sauerstoff zu *in-source*-Nebenreaktionen führen. Das PB-Produkt kann sich zudem im Plasma der APCI-Nadel wieder zersetzt haben, was zu den geringen Konzentrationen an PB-Produkt geführt haben könnte. Von besonderem Interesse sind jedoch die gebildeten O=Fragmente. Bei der Interpretation der Massenspektren fällt auf, dass die Masse einem spezifischen Fragment der Fettsäure und der zugehörigen Doppelbindung zugeordnet werden kann.

Dieser Effekt kann durch den Einsatz von Benzaldehyd als Reaktant verstärkt werden. So werden hierbei die regiospezifischen Fragmente (m/z 171,1027 und 129,0557) im MS-Spektrum sichtbar, welche den jeweiligen Doppelbindungspositionen der untersuchten Fettsäuren zugeordnet werden können (Abbildung 33). Unklar ist jedoch der Mechanismus, der zur Bildung der Fragmente führt. Es wurde zunächst

angenommen, dass diese auf eine *in-source*-PB-Reaktion zurückzuführen wären, wogegen Zhang *et al.* [133] und Xie *et al.* [130] von einer Ozonolyse ausgehen.

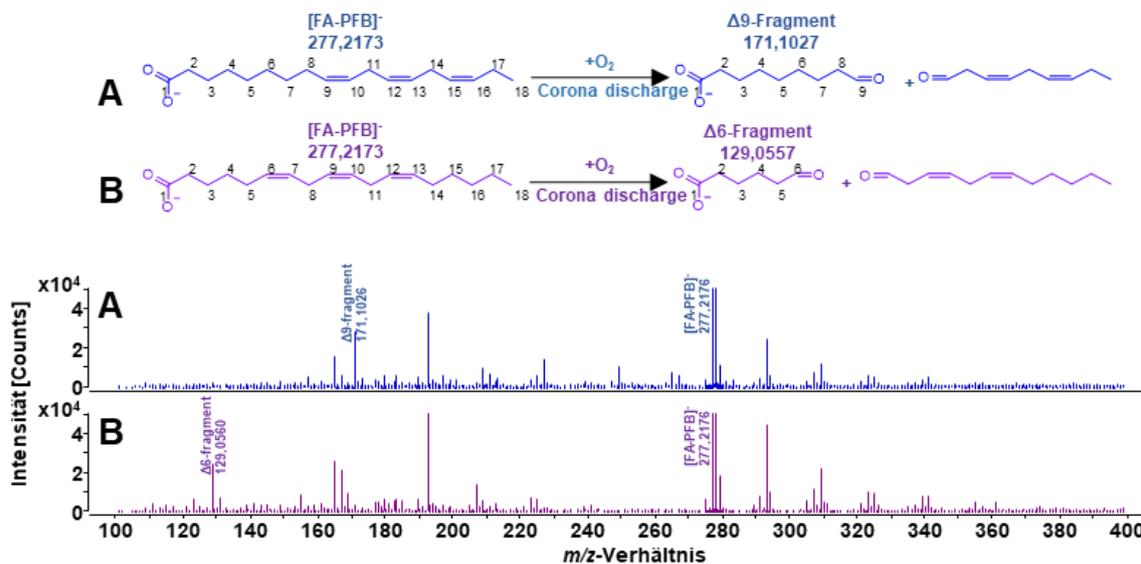


Abbildung 33: MS-Spektren von FA 18:3 in ω 3- und ω 6-Konfiguration und ein postulierter Reaktionsmechanismus. Anhand des regiospezifischen Fragmentes (m/z 171,1027 für ω 3-Konfiguration (A) und m/z 129,0557 für ω 6-Konfiguration (B)) kann die Position der ersten Doppelbindung bestimmt werden. Die Quantifizierung kann anhand des [FA-PFB]-Ions durchgeführt werden [modifiziert nach [172]].

4.3.3 Fragmentation

Um den Effekt der *in-source*-Fragmentierung genauer zu identifizieren, wurden die vier Fettsäurestandards (FA 18:1 (Δ 9), FA 18:3 (Δ 6,9,12), FA 18:3 (Δ 9,12,15) und FA 20:4 (Δ 5,8,11,14)) bei verschiedenen Parametern untersucht (experimenteller Aufbau siehe Abbildung 34). Zum einen sollte hierbei der Einfluss der UV-Lampe auf die beobachtete Reaktion bestimmt werden, welche bei der PB-Reaktion eine entscheidende (Abbildung 11), bei der Ozonolyse hingegen keine Rolle spielt (Abbildung 10). Zum anderen sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss der Reaktant auf die Reaktion hat. Organische Lösemittel haben bei der Ionisation von API-Quellen häufig einen großen Einfluss [173,174], da mit ihrer Hilfe Protonentransfer und Ladungsübertragungen zwischen Molekülen erleichtert werden können. Sie werden meist für APPI-Quellen verwendet, finden jedoch auch in Kombination mit APCI-Quellen ihre Anwendung [175,176]. Um diese Effekte zu untersuchen, wurden die Messungen mit ein- und aus-

geschalteter UV-Lampe sowie mit und ohne den Einsatz von Benzaldehyd als Reaktant durchgeführt, wobei die übrigen Parameter konstant gehalten wurden. Anschließend wurde die Intensität des [FA-PFB]-Ions sowie des jeweiligen regiospezifischen Fragmentes verglichen (Abbildung 35).

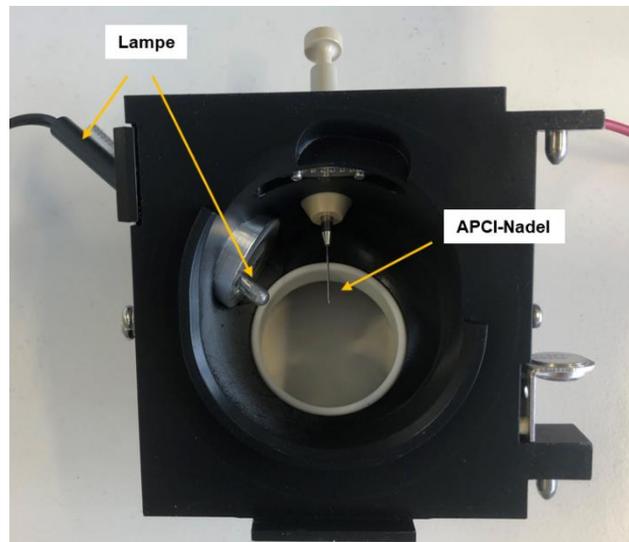


Abbildung 34: APCI-Quelle mit eingebauter UV-Lampe, welche für die Untersuchung des Mechanismus genutzt wurde.

Wie in Abbildung 35 am Beispiel von FA 18:1 Δ 9 zu sehen, führt die Verwendung der UV-Lampe sowohl bei dem detektierten [FA-PFB]-Ion (A) wie auch bei dem regiospezifischen Δ 9-Fragment (D) zu einem Abfall der Signalintensität. Wird Benzaldehyd als Reaktant eingesetzt, kommt es zu einem Abfall bei der Intensität des [FA-PFB]-Ions (B), allerdings zeitgleich auch zu einem Anstieg des Δ 9-Fragments (E). Wird zusätzlich zum Benzaldehyd die UV-Lampe verwendet, führt dies jedoch bei keinem der untersuchten Spezies zu einem bedeutsamen Intensitätsgewinn (C/F).

Hieraus kann geschlossen werden, dass die beobachtete *in-source*-Reaktion nicht photolytisch begünstigt wird. Daher ist anzunehmen, dass es sich bei der Reaktion um eine chemische Reaktion handelt, welche durch die Koronaentladung ausgelöst wurde, und zu den beobachteten oxidierten Fragmenten führt, wie in Abbildung 33 dargestellt. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurden die folgenden Experimente mit Benzaldehyd als Reaktant und mit ausgeschalteter UV-Lampe durchgeführt.

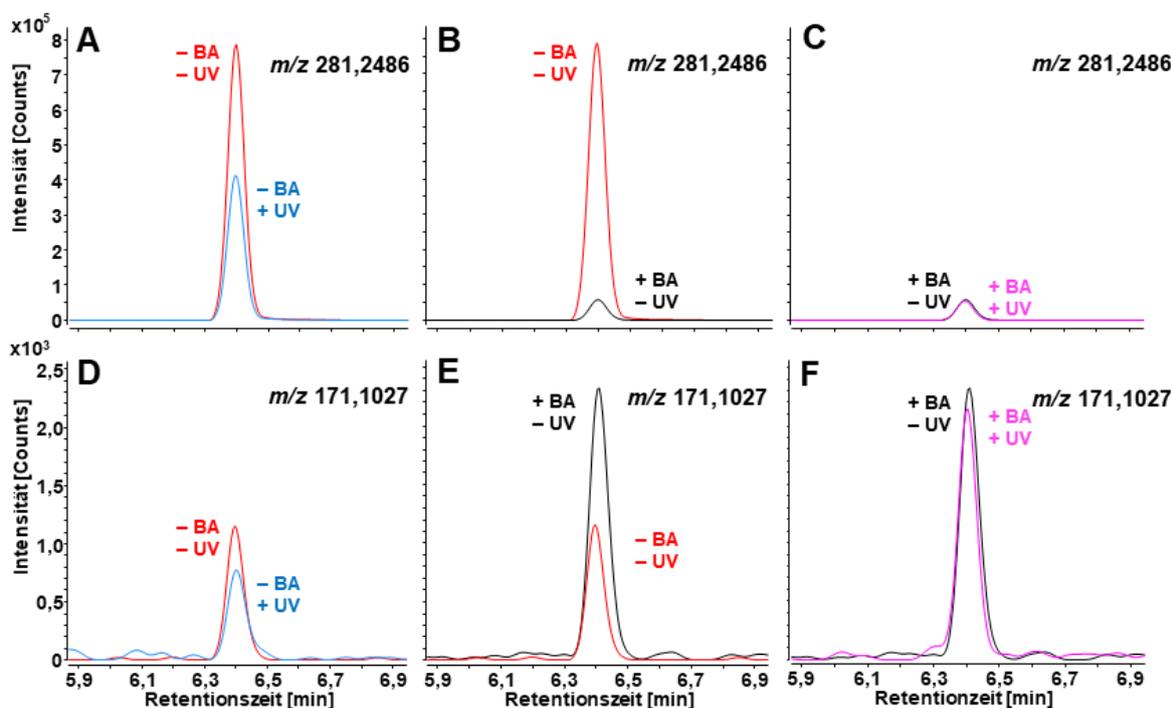
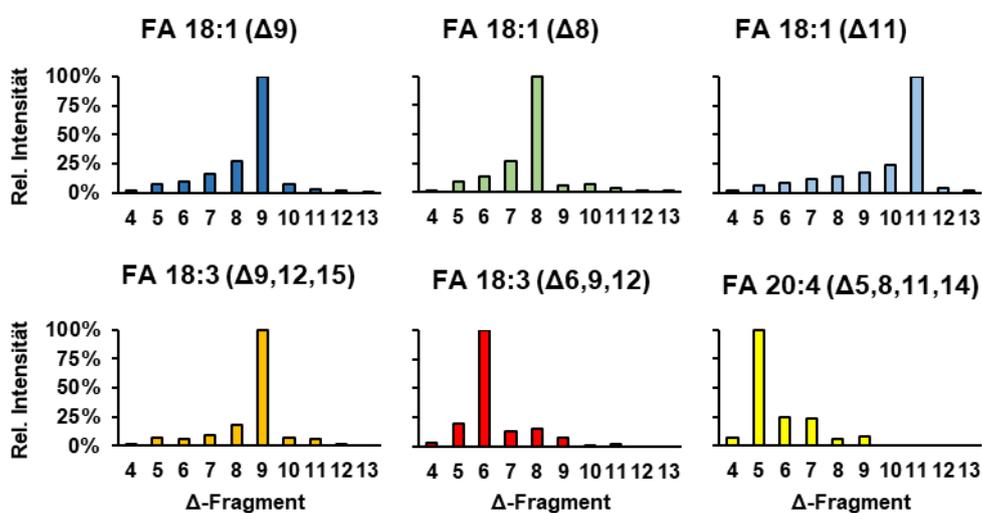


Abbildung 35: Einfluss des Reaktants und der UV-Strahlung auf Ölsäure (50 μM) für das [FA-PFB]-Ion (m/z 281,2486) A-C und das positionsspezifische Fragment (m/z 171,1027) D-E. Je nach Experiment wurden die Messungen mit oder ohne Benzaldehyd (+ BA/ - BA) und mit ein- oder ausgeschalteter UV-Lampe (+ UV/ - UV) durchgeführt. Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Intensität des positionsspezifischen Fragmentes werden erzielt, wenn die Messungen mit Benzaldehyd und mit ausgeschalteter UV-Lampe durchgeführt werden (schwarze Linie E/F) [modifiziert nach [172]].

Um die allgemeine Gültigkeit der in Abbildung 31 beobachtete Verteilung zu überprüfen, wurden verschiedene Fettsäuren untersucht. Eine Auswahl an Δ -Fragmenten (siehe Tabelle 8), welche für die Detektion der Doppelbindungsposition relevant sind, wurden als EIC aus den Daten extrahiert. Die erhaltenen Peaks wurden integriert und die Flächen auf die Intensität des jeweils höchsten Peaks normiert (Abbildung 36). Hierbei zeigt sich wie zuvor in Abbildung 31, dass es eine Verteilung an verschiedenen Δ -Fragmenten gibt. Die Maxima stimmten wie zuvor mit der jeweiligen Position der Doppelbindung überein. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Fragmente tatsächlich regiospezifisch entstehen, und dass die beschriebene Methode sowohl für ungesättigte wie auch für gesättigte Fettsäuren einsetzbar ist. Dies zeigt, dass die *in-source*-Fragmentierung neben dem m/z -Verhältnis und der Retentionszeit als weiteres Kriterium zur Identifikation der Doppelbindungsposition dienen kann.

Tabelle 8: Summenformel und m/z -Werte der zur Strukturaufklärung genutzten *in-source*-Fragmente [modifiziert nach [172]].

Fragment	m/z	Summenformel
$\Delta 4$	101,0244	$C_4H_5O_3$
$\Delta 5$	115,0401	$C_5H_7O_3$
$\Delta 6$	129,0557	$C_6H_9O_3$
$\Delta 7$	143,0714	$C_7H_{11}O_3$
$\Delta 8$	157,0870	$C_8H_{13}O_3$
$\Delta 9$	171,1027	$C_9H_{15}O_3$
$\Delta 10$	185,1183	$C_{10}H_{17}O_3$
$\Delta 11$	199,1340	$C_{11}H_{19}O_3$
$\Delta 12$	213,1496	$C_{12}H_{21}O_3$
$\Delta 13$	227,1653	$C_{13}H_{23}O_3$

Abbildung 36: *In-source*-Fragmentierungsmuster verschiedener einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren, beobachtet mit GC-APCI-QToF-MS. Die beobachteten Fragmente entstehen regio-spezifisch, wobei die Kohlenstoffkette zwischen Carboxylgruppe und der ersten Doppelbindung entscheidend ist [modifiziert nach [172]].

Durch die Identifizierung der Position der Doppelbindung können Coelutionen von Fettsäuren, trotz der identischen monoisotopischen Masse, festgestellt werden, wie in anhand verschiedener FA 18:1 Isomeren (8-Octadecansäure ($\Delta 8$), Elaidinsäure ($\Delta 9_{\text{trans}}$) und Vaccensäure ($\Delta 11$)) gezeigt wurde. So können im EIC des gemeinsamen [FA-PFB]-Ions bei m/z 281,2486 nur zwei Peaks nachgewiesen werden (Abbildung 37 A), da Elaidin- und Vaccensäure coeluiieren und somit als ein größerer Peak erscheinen. Durch die EIC der verschiedenen Δ -Fragmente wird jedoch deutlich, dass drei Δ -Fragment ($\Delta 8$, $\Delta 9$ und $\Delta 11$) deutlich intensiver als die übrigen Δ -Fragmente vorlagen (Abbildung 37 B).

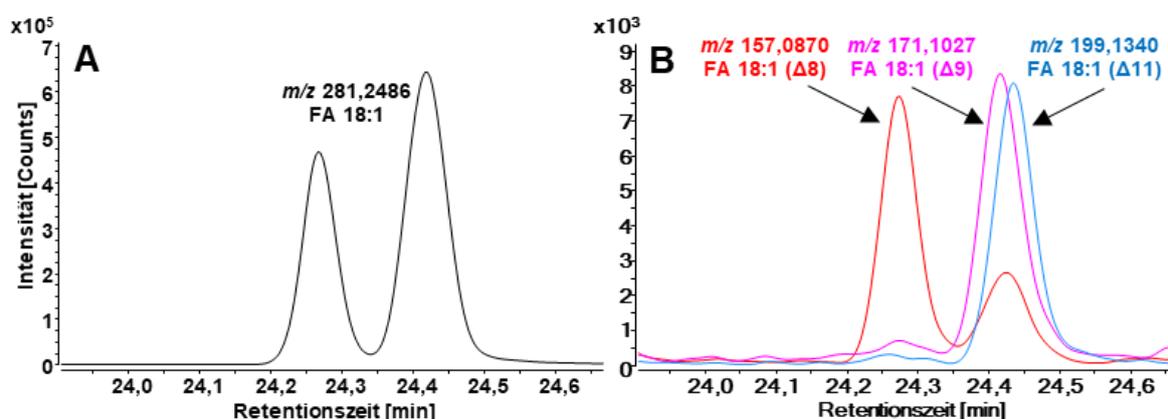


Abbildung 37: Identifizierung von Doppelbindungspositionen in coeluiierenden Fettsäuren. GC-APCI-QToF-MS-Analyse von drei verschiedenen FA 18:1-Isomeren. Während im EIC des [FA-PFB]-Ions nur zwei Peaks detektierbar sind, kann durch die Detektion der Δ -Fragmente eine Coelution im zweiten Peak nachgewiesen werden [modifiziert nach [172]].

Während bei dem linken Peak (24,25 min) aufgrund des $\Delta 8$ -Fragments als primäres *in-source*-Fragment und der in Abbildung 36 beobachteten Verteilung der übrigen Fragmente angenommen werden kann, dass es sich hierbei um eine einzelne Fettsäure handelt, zeigte sich beim rechten Peak (24,45 min) ein anderes Muster. Hier sind zwei primäre *in-source*-Fragmente ($\Delta 9$ - und $\Delta 11$ -Fragment) mit leicht unterschiedlichen Retentionszeiten detektierbar, was auf eine Coelution zweier Fettsäuren hinweist. Zusätzlich ist ein kleinerer $\Delta 8$ -Peak sichtbar, welcher sich durch die in Abbildung 36 gezeigte Fragmentverteilung der beiden Fettsäuren erklären lässt.

Wie Tabelle 9 zeigt, liegen die beobachteten Nachweisgrenzen im Bereich von 0,1 bis 1 μM für das [FA-PFB]-Ion und sind somit etwas höher als bei der unter Kapitel 4.1 entwickelten Methode. Dies ist vor allem durch die Abnahme dieses Ions durch

das Benzaldehyd zu erklären (Abbildung 35). Trotz der Verwendung der Gaswaschflasche konnte jedoch ein R^2 von $>0,99$ erreicht werden. Die für die Identifikation der Doppelbindung notwendigen Δ -Fragmente konnten ab einer Nachweisgrenze von 10 μM detektiert werden. Auch wenn diese nicht zur Quantifizierung genutzt wurden, konnte hier eine hohe Linearität und somit eine hohe Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden.

Tabelle 9: LOD-, LLOQ-, ULOQ und R^2 -Werte von [FA-PFB], die zur Quantifizierung verwendet werden, sowie des Δ -Fragments, das zur Identifizierung der Doppelbindungsposition verwendet wird [modifiziert nach [172]].

Fettsäure	[FA-PFB]				Δ -Fragment		
	LOD [μM]	LLOQ [μM]	ULOQ [μM]	R^2	LOD [μM]	LLOQ [μM]	R^2
FA 16:1 ($\Delta 9$)	0,1	0,3	100	0,999	10	50	0,999
FA 18:1 ($\Delta 8$)	0,1	0,3	50	0,999	10	50	0,996
FA 18:2 ($\Delta 9,12$)	0,1	0,3	100	0,994	10	50	0,986
FA 18:3 ($\Delta 6,9,12$)	0,1	0,3	50	0,999	50	100	0,993
FA 20:4 ($\Delta 5,8,11,14$)	0,1	1	100	0,996	50	100	0,997
FA 20:5 ($\Delta 5,8,11,14,17$)	0,3	1	100	0,998	50	100	0,999
FA 22:5 ($\Delta 7,10,13,16,19$)	1	1	100	0,998	50	100	0,999
FA 22:6 ($\Delta 4,7,10,13,16,19$)	1	1	100	0,992	100	500	n.b.

4.3.4 Anwendung

Viele Nahrungsergänzungsmittel werben mit einem hohen Gehalt an $\omega 3$ -Fettsäuren. Die wirtschaftliche Bedeutung von Nahrungsergänzungsmitteln wird auf über 30 Milliarden US-Dollar geschätzt [151]. Ein beliebtes Präparat stellen Fischölkapseln, welche mit ihrem hohen Gehalt an FA 20:5 (Eicosapentaensäure) und FA 22:6 (Docosahexaensäure), beides $\omega 3$ -Fettsäuren, beworben werden. Daneben sind auch andere ungesättigte Fettsäuren wie FA 16:1 ($\Delta 9$) oder FA 18:1 ($\Delta 9$) in hoher Konzentration in Fischöl zu finden [177,178]. Aufgrund dessen wurde Fischöl zur Anwendung der Methode untersucht. Die Fischölkapseln wurden zunächst hydrolysiert, mit MTBE extrahiert und mit PFB derivatisiert. Die in den Proben enthaltenen Fettsäuren wurden chromatographisch getrennt, wobei die Position der Doppelbindungen mithilfe der Δ -Fragmente identifiziert wurden, wie in Abbildung 38 dargestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren wurden anschließend mithilfe des [FA-PFB]-Ions bestimmt (Abbildung 39).

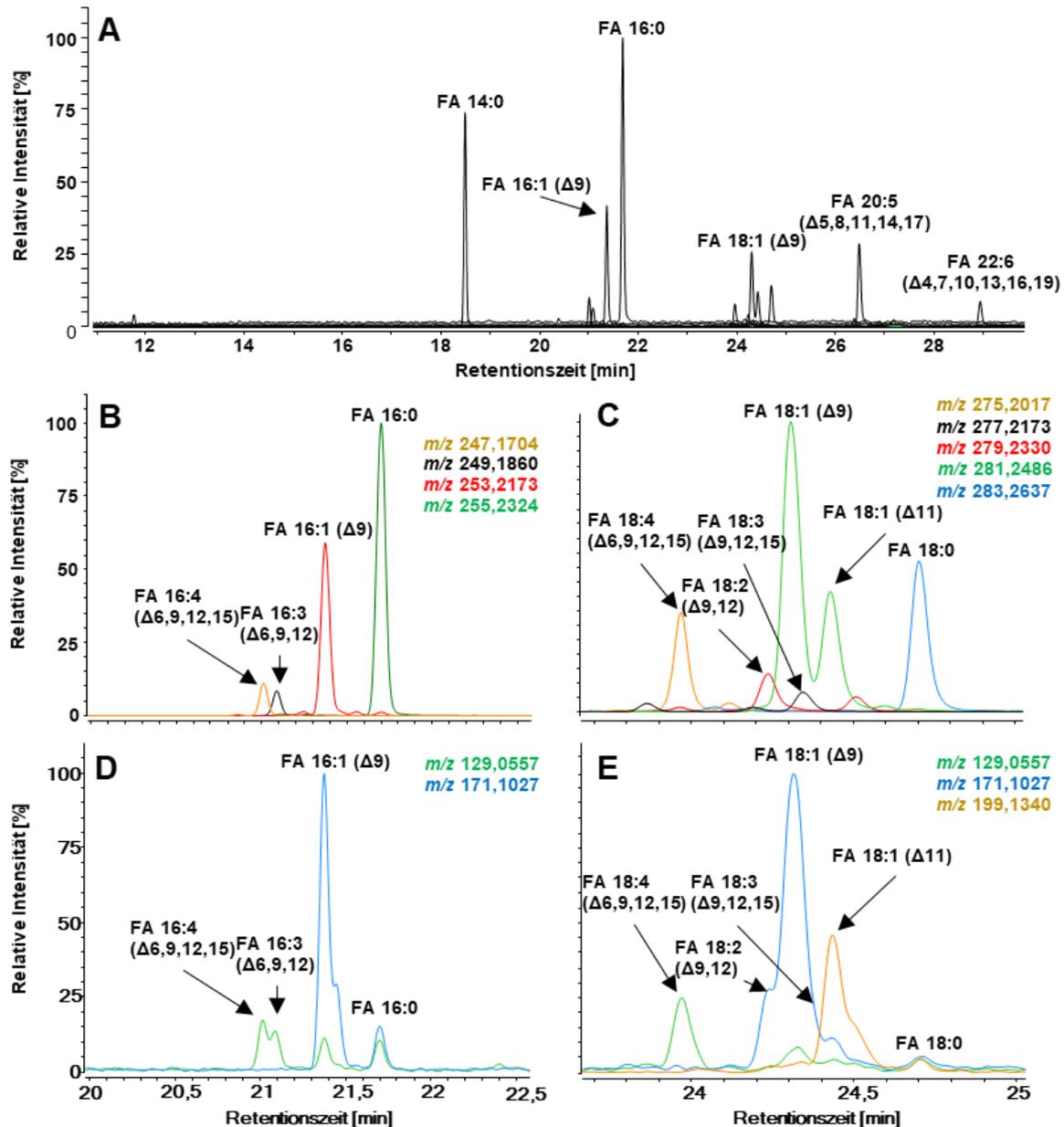


Abbildung 38: Identifikation und Quantifizierung der in Fischöl gefundenen Fettsäuren. A: Chromatographische Trennung der Fischölproben. Dargestellt sind die EIC der detektierten Fettsäuren (Abbildung 39). Die sechs quantitativ am häufigsten vorkommenden Fettsäuren sind beschriftet. B/C: Chromatographische Trennung von FA 16:0 (B), FA 18:0 (C) und ihren verwandten ungesättigten Isomeren. D/E: Regiospezifische Δ -Fragmente der unter B und C gezeigten Fettsäuren [modifiziert nach [172]].

Da es sich bei Fischöl um ein Produkt handelt, welches keinen strengen Regularien unterworfen ist und biologischen und saisonalen Schwankungen unterliegt [179], ist die Varianz zwischen verschiedenen Proben erwartbar hoch. Dies zeigt sich insbesondere bei den häufig untersuchten $\omega 3$ -Fettsäuren FA 20:5 ($\Delta 5,8,11,14,17$) und

FA 22:6 (Δ 4,7,10,13,16,19). So liegt die Konzentration von FA 20:5 (Δ 5,8,11,14,17) der gezeigten Probe bei $75,1 \pm 6,9$ mg/g, während Yi *et al.* Konzentrationen von 40-509 mg/g [178], und Brotas *et al.* 27-241 mg/g angegeben haben [177]. Die Konzentration von FA 22:6 (Δ 4,7,10,13,16,19) lag hingegen bei $60,2 \pm 0,7$ mg/g, während Yi *et al.* [178] 35-645 mg/g und Brotas *et al.* [177] bis zu 120 mg/g fanden. Die beiden abundanten Fettsäuren liegen somit genau im ermittelten Bereich der beiden Veröffentlichungen [177,178].

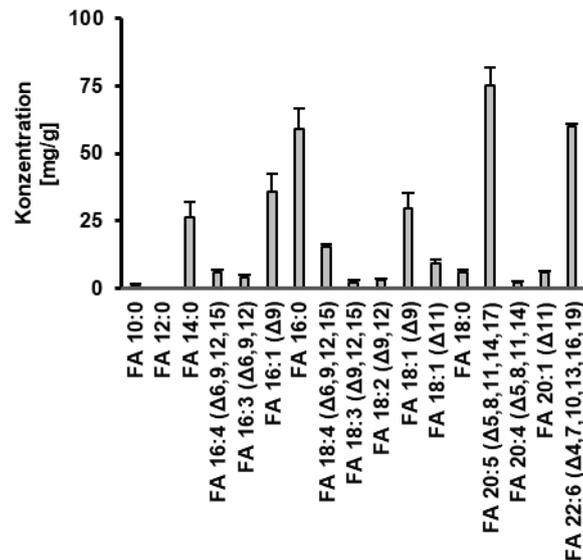


Abbildung 39: Konzentration der Fettsäuren, welche mithilfe der jeweiligen [FA-PFB]-Ionen in Fischölkapseln quantifiziert wurden. Die Identifikation der Doppelbindungsposition wurde mithilfe der Δ -Fragmente durchgeführt, was mit Fettsäurestandards validiert wurde [modifiziert nach [172]].

Neben den bekannten abundanten Fettsäuren kann die Methode jedoch auch zur Identifikation von bisher wenig beachteten Fettsäuren eingesetzt werden. So sind in den untersuchten Proben Hexadecatriensäure (FA 16:3 (Δ 6,9,12)), Hexadecatetraensäure (FA 16:4 (Δ 6,9,12,15)) sowie Stearidonsäure (FA 18:4 (Δ 6,9,12,15)) nachweisbar. Keine der drei Fettsäuren wurde zuvor als Standard untersucht, weshalb die genaue Retentionszeiten unbekannt waren. FA 16:3 (Δ 6,9,12) und FA 16:4 (Δ 6,9,12,15) sind bisher bereits in einer Krill (*Euphausia pacifica*), Tintenfisch sowie Thunfisch beschrieben worden [180-182]. FA 18:4 (Δ 6,9,12,15) wurde bereits in Fischöl identifiziert, und kann zudem auch in Algen und einigen Pflanzensamenölen vorkommen [183-185]. Bei allen drei Fettsäuren konnte die Position der Doppelbindung korrekt anhand der Δ -Fragmente bestimmt werden.

4.3.5 Fazit

Die Methode ermöglicht die Identifikation einer *in-source*-Fragmentierung in der APCI-Quelle, welche mit dem Delta-Ende der Fettsäuren korreliert. Die Fragmentierung kann zur Identifikation von Fettsäuren genutzt werden. Der große Vorteil der Methode liegt in dem geringen Aufwand, der hierbei betrieben werden muss. Die einzige Änderung im Vergleich zu der unter Kapitel 4.1 beschriebenen Methode zur Quantifizierung der Fettsäuren liegt in der Verwendung von Benzaldehyd als Reaktant. Es konnte auch gezeigt werden, dass es auch ohne die Verwendung eines Reaktanten im geringeren Umfang zu der beschriebenen Fragmentierung kommt.

Die Identifikation dreier weitestgehend unbekannter Fettsäuren in den untersuchten Fischölkapseln zeigt, dass die Methode universell einsetzbar ist. Durch den Einsatz eines QToF-MS in Kombination mit der GC-APCI können alle Fettsäuren und deren Fragmente in einer Messung erfasst werden. Das ermöglicht die Identifikation einer Vielzahl an Verbindungen und deren Quantifizierung.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Fettsäuren spielen in unterschiedlichen biologischen Systemen eine entscheidende Rolle, wobei die Identifizierung und Quantifizierung immer noch eine große Herausforderung darstellt. Deshalb wurde eine GC-MS-Analyse von Fettsäuren nach Derivatisierung mit Pentafluorobenzylbromid entwickelt und optimiert. Hierzu wurde die NICI, welche üblicherweise in Kombination mit dieser Derivatisierung verwendet wird, mit zwei API-Quellen, der APCI und der APPI, verglichen. Die APCI-Quelle ist am besten geeignet für die Analyse eines weiten Spektrums an Fettsäuren, da diese sowohl über eine hohe Sensitivität, mit Nachweisgrenzen im einstelligen femtomolaren Bereich *on-column*, wie auch über ein ähnliches Ionisationsverhalten für eine große Anzahl an unterschiedlich langen Fettsäuren verfügt. Dadurch kann eine robuste Quantifizierung durchgeführt werden.

Die Methode wurde anschließend für die Analyse verschiedener biologischer Proben verwendet. Zum einen wurden zur Validierung der Methode Serum- und Plasmaproben untersucht. Hierbei ist eine hohe Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten feststellbar. Die Methode wurde für die analytische Unterstützung einer Studie im Bereich der Tumordiagnostik eingesetzt, wobei es gelungen ist, hochsignifikante Unterschiede im Fettsäurespektrum der verschiedenen Zellklassen zu detektieren.

Eine weitere große Herausforderung in der Fettsäureanalytik ist die Hintergrundkontamination, welche bei vielen Fettsäuren vorliegt. Besonders betroffen sind hiervon Palmitinsäure und Stearinsäure, aber auch in geringerem Umfang andere kurz- und mittelkettige Fettsäuren. Hierdurch wird die Sensitivität der analytischen Methoden begrenzt. Auch wenn es instrumentell möglich ist, geringere Konzentrationen zu detektieren, können diese nicht von der Hintergrundkontamination unterschieden werden.

Die entwickelte Methode wurde anschließend für die Analyse von Archaeen eingesetzt. Das Problem der Hintergrundkontamination konnte hierbei umgangen werden, da die Fettsäuren durch den experimentellen Aufbau vollständig ^{13}C -markiert vorlagen. Bei *S. acidocaldarius* kommen die Fettsäuren ^{13}C Capryl-, ^{13}C Caprin- und ^{13}C Laurinsäure vor, was durch verschiedene Experimente bestätigt wurde. Die Analyse einer

Knock-out-Mutante zeigt, dass das Gen *saci_1115* bei der Synthese der Fettsäuren eine wichtige Rolle spielt. In der Mutante sind deutlich niedrigere Konzentration im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Auch andere Faktoren mit Einfluss auf die Fettsäurebiosynthese von Archaeen wurden identifiziert. Unter anderem verwertet *S. acidocaldarius* vor allem Glycerol zur Bildung von Fettsäuren. Andere Kohlenstoffquellen wie Xylose führen nicht zur Bildung von Fettsäuren. Darüber hinaus verdeutlichen die Analysen von Proben aus *H. volcanii* den Einfluss der Gattung auf die Fettsäurebiosynthese. Anstelle der oben genannten Fettsäuren liegt hier vor allem ¹³C-Palmitinsäure als primär Fettsäure vor.

Die Ergebnisse zeigen, dass Archaeen Fettsäuren erfolgreich synthetisieren können, und liefern damit wichtige Erkenntnisse über den Lipid Divide. Jedoch bleiben hier noch viele offene Fragen. So ist vor allem die genaue Biosynthese noch nicht beschrieben, und die Funktion der Fettsäuren ist immer noch unklar. Für ein besseres Verständnis wäre die Untersuchung einer großen Anzahl an unterschiedlichen Archaeen sinnvoll. Hierbei können Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen verschiedenen Gattungen identifiziert werden, was zu einem besseren Verständnis zur Funktion der Fettsäuren beitragen könnte.

Abschließend wurde die etablierte Methode weiterentwickelt, um weitere Informationen über den Aufbau von Fettsäuren zu gewinnen. Dazu ist die Bestimmung der Doppelbindungsposition in Fettsäuren essenziell. Dies wurde durch eine *in-source*-Fragmentierung in der APCI-Quelle erreicht. Hierbei können sauerstoffhaltige Fragmente des Analytens genutzt werden, welche im geringen Umfang in der Quelle gebildet werden und für die Bestimmung der Doppelbindung genutzt werden können. Die Bildung dieser regiospezifischen Fragmente kann durch den Einsatz von Benzaldehyd als Reaktant unterstützt werden, der den Einsatz von UV-Licht führt hingegen zu keiner Verbesserung der Sensitivität. Dies ermöglicht, dass die Bestimmung der Doppelbindungsposition direkt bei der Messung erfolgen kann, da es sich bei der Fragmentanalyse um eine Datenprozessierung handelt, und somit keine weitere Messzeit benötigt wird.

Die Methode wurde anschließend erfolgreich eingesetzt, um verschiedene Fischöle und die darin vorkommenden Fettsäuren zu analysieren. Neben den üblicherweise detektierten ungesättigten Fettsäuren FA 20:5 und FA 22:6 liegen hierbei auch

verschiedene andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren vor, welche quantifiziert und deren Doppelbindungsposition identifiziert wurde. Insbesondere die Identifikation der Fettsäuren FA 16:3, FA 16:4 und FA 18:4 ist von großem Interesse. Diese lagen nicht als Standards vor, sind jedoch über ihre exakte Masse, ihr Fragmentationsmuster und ihrer Retentionszeit identifizierbar.

Die Analyse von Fettsäuren mittels Gaschromatographie wird seit Jahrzehnten erfolgreich durchgeführt. Allerdings bietet die Kopplung über APCI nach Derivatisierung mit PFB ein großes Potential für die Fettsäureanalytik. Sowohl für die Quantifizierung wie auch für die strukturelle Aufklärung von Fettsäuren ergeben sich aus der Kopplung entscheidende Vorteile, da diese anders als EI-Quellen eine weiche Ionisation mit geringer Fragmentierung ermöglichen. Die Fragmentierung ist zudem stark von der Struktur der Fettsäure abhängig, weshalb die gebildeten *in-source*-Fragmente zusätzliche Informationen über die untersuchten Analyten bieten können.

6 Anhang

6.1 Abbildungen

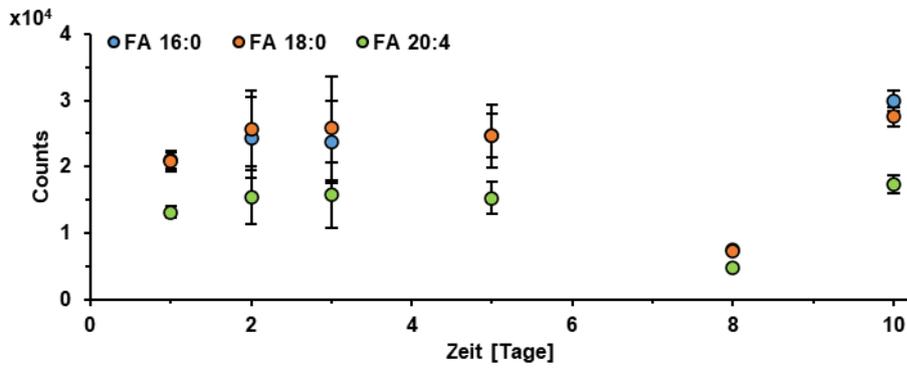


Abbildung 40: Stabilitätsmessungen der Fettsäurestandards ohne Normierung durch internen Standard.

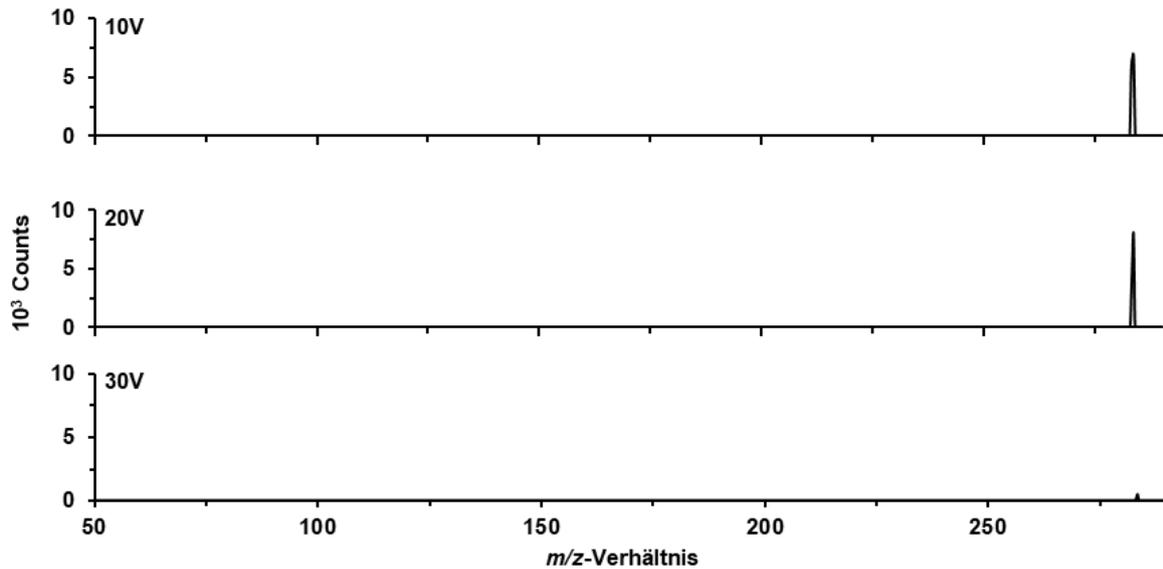


Abbildung 41: SRM-Messungen der Fettsäure FA 18:0. Mit zunehmender Kollisionsenergie nimmt das Signal der Fettsäure ab, jedoch konnten keine charakteristischen Fragmente detektiert werden.

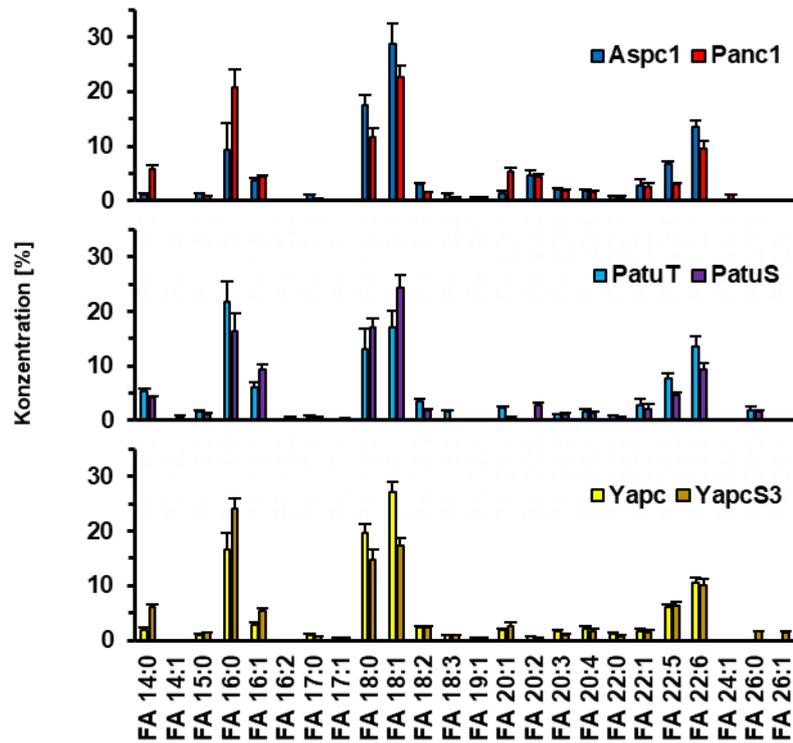


Abbildung 42: Konzentrationen an freien Fettsäuren in den untersuchten Tumorzellproben [%].

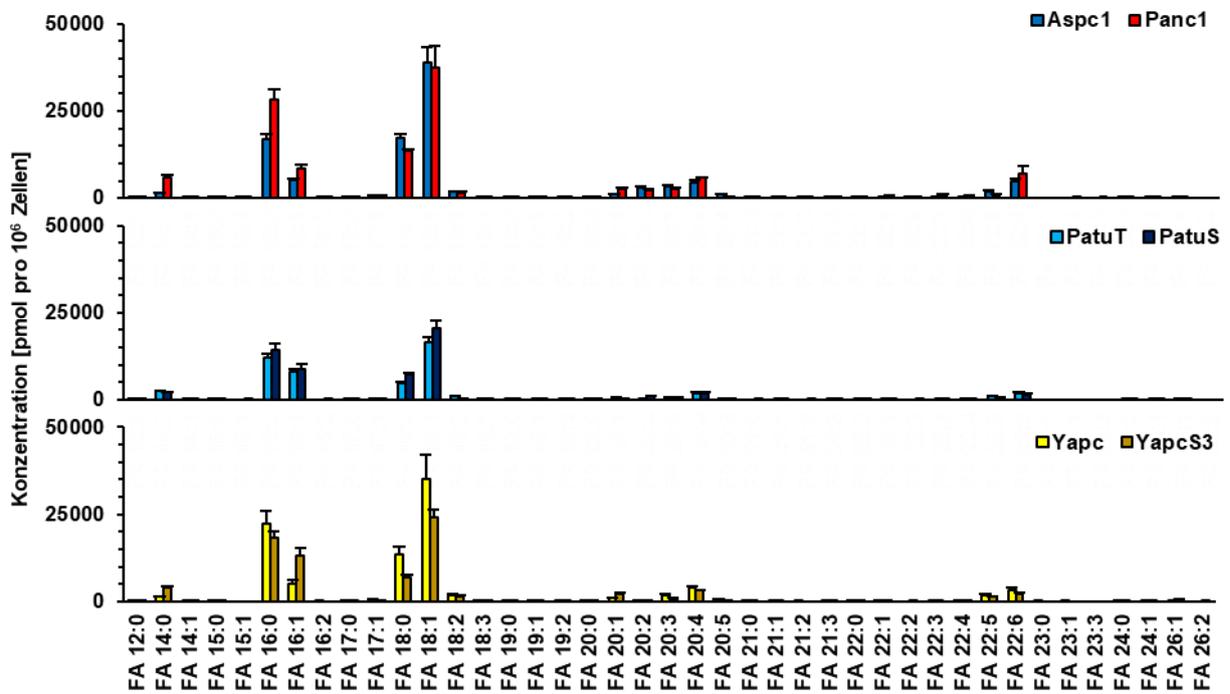


Abbildung 43: Gesamtfettsäuregehalte aller in den Tumorzellproben gefundener Fettsäuren.

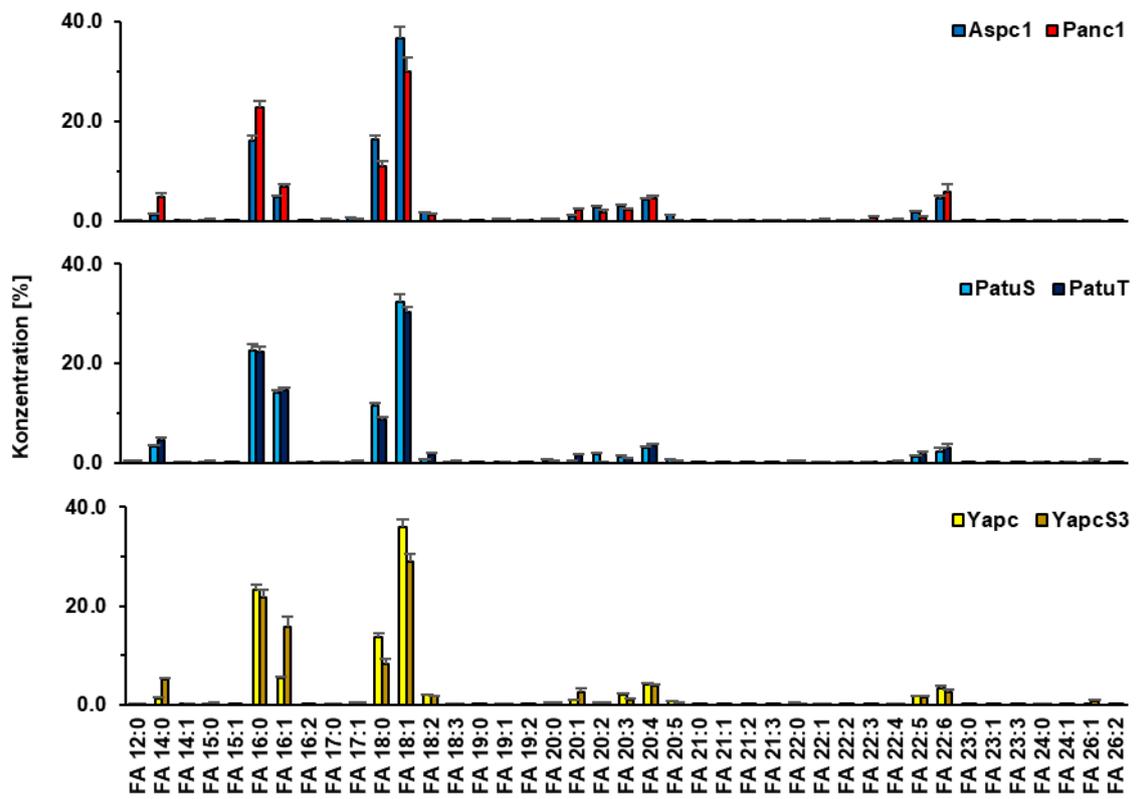


Abbildung 44: Gesamtfettsäuregehalt der untersuchten Tumorzellproben [%].

6.2 Tabellen

Tabelle 10: Liste der m/z -Werte aller analysierter Fettsäuren (Als Standard eingesetzte Fettsäuren wurden fett markiert).

Analyt	m/z	Modus	FA 20:5	301,5	negativ
FA 6:0	115,2	negativ	FA 21:0	325,5	negativ
FA 7:0	129,2	negativ	FA 21:1	323,5	negativ
FA 8:0	143,2	negativ	FA 21:2	321,5	negativ
FA 9:0	157,2	negativ	FA 21:3	319,5	negativ
FA 10:0	171,2	negativ	FA 22:0	339,6	negativ
$^2\text{H}_2$-FA 10:0	173,3	negativ	FA 22:1	337,6	negativ
FA 10:1	169,2	negativ	FA 22:2	335,6	negativ
FA 11:0	185,3	negativ	FA 22:3	333,6	negativ
FA 11:1	183,3	negativ	FA 22:4	331,6	negativ
FA 12:0	199,3	negativ	FA 22:5	329,5	negativ
FA 12:1	197,3	negativ	FA 22:6	327,5	negativ
FA 13:0	213,4	negativ	FA 23:0	353,6	negativ
FA 13:1	211,4	negativ	FA 23:1	351,6	negativ
FA 14:0	227,4	negativ	FA 23:2	349,6	negativ
FA 14:1	225,4	negativ	FA 23:3	347,6	negativ
FA 15:0	241,4	negativ	FA 23:4	345,6	negativ
$^2\text{H}_2$-FA 15:0	243,4	negativ	FA 23:5	343,6	negativ
FA 15:1	239,4	negativ	FA 23:6	341,6	negativ
FA 16:0	255,5	negativ	FA 24:0	367,7	negativ
FA 16:1	253,5	negativ	$^2\text{H}_4$-FA 24:0	371,7	negativ
FA 16:2	251,5	negativ	FA 24:1	365,7	negativ
FA 17:0	269,5	negativ	FA 24:2	363,7	negativ
FA 17:1	267,5	negativ	FA 24:3	361,7	negativ
FA 18:0	283,5	negativ	FA 24:4	359,7	negativ
$^2\text{H}_4$-FA 18:0	287,5	negativ	FA 24:5	357,7	negativ
FA 18:1	281,5	negativ	FA 24:6	355,7	negativ
FA 18:2	279,5	negativ	FA 25:0	381,7	negativ
FA 18:3	277,5	negativ	FA 25:1	379,7	negativ
FA 18:4	275,5	negativ	FA 25:2	377,7	negativ
FA 19:0	297,5	negativ	FA 26:0	395,7	negativ
FA 19:1	295,5	negativ	FA 26:1	393,7	negativ
FA 19:2	293,5	negativ	FA 26:2	391,7	negativ
FA 20:0	311,5	negativ	FA 26:3	389,7	negativ
FA 20:1	309,5	negativ	FA 26:4	387,7	negativ
FA 20:2	307,5	negativ	FA 26:5	385,7	negativ
FA 20:3	305,5	negativ	FA 26:6	383,7	negativ
FA 20:4	303,5	negativ			
$^2\text{H}_8$-FA 20:4	311,5	negativ			

Tabelle 11: Liste der m/z -Werte aller analysierter ^{13}C -markierter Fettsäuren (Als Standard eingesetzte Fettsäuren wurden fett markiert).

Analyt	m/z	Modus			
			FA 21:2	342,5	negativ
FA 6:0	121,2	negativ	FA 21:3	340,5	negativ
FA 7:0	136,2	negativ	FA 22:0	361,6	negativ
FA 8:0	151,2	negativ	FA 22:1	359,6	negativ
FA 9:0	166,2	negativ	FA 22:2	357,6	negativ
FA 10:0	181,2	negativ	FA 22:3	355,6	negativ
$^2\text{H}_2$-FA 10:0	173,3	negativ	FA 22:4	353,6	negativ
FA 10:1	179,2	negativ	FA 22:5	351,5	negativ
FA 11:0	196,3	negativ	FA 22:6	349,5	negativ
FA 11:1	194,3	negativ	FA 23:0	376,6	negativ
FA 12:0	211,3	negativ	FA 23:1	374,6	negativ
FA 12:1	209,3	negativ	FA 23:2	372,6	negativ
FA 13:0	226,4	negativ	FA 23:3	370,6	negativ
FA 13:1	224,4	negativ	FA 23:4	368,6	negativ
FA 14:0	241,4	negativ	FA 23:5	366,6	negativ
FA 14:1	239,4	negativ	FA 23:6	364,6	negativ
FA 15:0	256,4	negativ	FA 24:0	391,7	negativ
$^2\text{H}_2$-FA 15:0	243,4	negativ	$^2\text{H}_4$-FA 24:0	371,7	negativ
FA 15:1	254,4	negativ	FA 24:1	389,7	negativ
FA 16:0	271,5	negativ	FA 24:2	387,7	negativ
FA 16:1	269,5	negativ	FA 24:3	385,7	negativ
FA 16:2	267,5	negativ	FA 24:4	383,7	negativ
FA 17:0	286,5	negativ	FA 24:5	381,7	negativ
FA 17:1	284,5	negativ	FA 24:6	379,7	negativ
FA 18:0	301,5	negativ	FA 25:0	406,7	negativ
$^2\text{H}_4$-FA 18:0	287,5	negativ	FA 25:1	404,7	negativ
FA 18:1	299,5	negativ	FA 25:2	402,7	negativ
FA 18:2	297,5	negativ	FA 26:0	421,7	negativ
FA 18:3	295,5	negativ	FA 26:1	419,7	negativ
FA 18:4	293,5	negativ	FA 26:2	417,7	negativ
FA 19:0	316,5	negativ	FA 26:3	415,7	negativ
FA 19:1	314,5	negativ	FA 26:4	413,7	negativ
FA 19:2	312,5	negativ	FA 26:5	411,7	negativ
FA 20:0	331,5	negativ	FA 26:6	409,7	negativ
FA 20:1	329,5	negativ			
FA 20:2	327,5	negativ			
FA 20:3	325,5	negativ			
FA 20:4	323,5	negativ			
$^2\text{H}_8$-FA 20:4	311,5	negativ			
FA 20:5	321,5	negativ			
FA 21:0	346,5	negativ			
FA 21:1	344,5	negativ			

7 Literatur

1. Burr, G.O. and M.M. Burr, *A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet*. Journal of biological chemistry, **1929**. 82(2): p. 345-367.
2. Burr, G.O. and M.M. Burr, *On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition*. Journal of Biological Chemistry, **1930**. 86(2): p. 587-621.
3. Mukhopadhyay, R., *Essential Fatty Acids: The Work of George and Mildred Burr*. Journal of Biological Chemistry, **2012**. 287(42): p. 35439-35441.
4. Fernández-Real, J.-M., et al., *Insulin Resistance, Inflammation, and Serum Fatty Acid Composition*. Diabetes Care, **2003**. 26(5): p. 1362-1368.
5. Juárez-Hernández, E., et al., *Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease*. Nutrition Journal, **2016**. 15(72).
6. Mattace Raso, G., et al., *Effects of sodium butyrate and its synthetic amide derivative on liver inflammation and glucose tolerance in an animal model of steatosis induced by high fat diet*. PloS one, **2013**. 8(7): p. e68626.
7. Tvrzicka, E., et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, **2011**. 155(2): p. 117-30.
8. Brügger, B., et al., *Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **1997**. 94(6): p. 2339-2344.
9. Koga, Y., *From promiscuity to the lipid divide: on the evolution of distinct membranes in Archaea and Bacteria*. J Mol Evol, **2014**. 78(3-4): p. 234-42.
10. Caligiani, A., et al., *Development of a quantitative GC–MS method for the detection of cyclopropane fatty acids in cheese as new molecular markers for Parmigiano Reggiano authentication*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2016**. 64(20): p. 4158-4164.
11. Monahan, F.J., O. Schmidt, and A.P. Moloney, *Meat provenance: Authentication of geographical origin and dietary background of meat*. Meat Science, **2018**. 144: p. 2-14.
12. Sun, X., et al., *Fatty acid profiles based adulteration detection for flaxseed oil by gas chromatography mass spectrometry*. LWT-Food Science and Technology, **2015**. 63(1): p. 430-436.
13. *LIPID MAPS® Structure Database (LMSD)*. 05.08.2023; verfügbar unter: <https://www.lipidmaps.org/databases/lmsd/browse>.
14. Berg, J.M. and J.L. Tymoczko, *Stryer Biochemie*. Vol. 8. **2018**: Springer. 407-412.
15. Berg, J.M. and J.L. Tymoczko, *Stryer biochemie*. Vol. 8. **2018**: Springer. 756-781.
16. Berg, J.M. and J.L. Tymoczko, *Stryer Biochemie*. Vol. 8. **2018**: Springer. 597.
17. Rassow, J., et al., *Duale Reihe Biochemie 2006*, Stuttgart: Thieme.
18. Taormina, V.M., et al., *Branched-chain fatty acids—An underexplored class of dairy-derived fatty acids*. Nutrients, **2020**. 12(9): p. 2875.
19. Siliakus, M.F., J. van der Oost, and S.W.M. Kengen, *Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure*. Extremophiles, **2017**. 21(4): p. 651-670.
20. Kurreck, J.E., Joachim W.; Lottspeich, Friedrich *Bioanalytik*. Vol. 4. **2022**: Springer Spektrum.
21. Bowden, J.A., et al., *Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950–Metabolites in Frozen Human Plasma [S]*. Journal of lipid research, **2017**. 58(12): p. 2275-2288.
22. Dowhan, W. and M. Bogdanov, *Functional roles of lipids in membranes*, in *New comprehensive biochemistry*. **2002**, Elsevier. p. 1-35.
23. Calder, P.C., *Functional roles of fatty acids and their effects on human health*. Journal of parenteral and enteral nutrition, **2015**. 39: p. 18-32.
24. Camandola, S., et al., *Nuclear factor κ B is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid*. Biochemical and biophysical research communications, **1996**. 229(2): p. 643-647.
25. Milligan, G., et al., *Complex pharmacology of free fatty acid receptors*. Chemical Reviews, **2017**. 117(1): p. 67-110.
26. Moniri, N.H., *Free-fatty acid receptor-4 (GPR120): Cellular and molecular function and its role in metabolic disorders*. Biochemical pharmacology, **2016**. 110: p. 1-15.
27. Senatorov, I.S. and N.H. Moniri, *The role of free-fatty acid receptor-4 (FFA4) in human cancers and cancer cell lines*. Biochemical pharmacology, **2018**. 150: p. 170-180.

28. Ulven, T. and E. Christiansen, *Dietary fatty acids and their potential for controlling metabolic diseases through activation of FFA4/GPR120*. Annual Review of Nutrition, **2015**. 35: p. 239-263.
29. Woese, C.R. and G.E. Fox, *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1977**. 74(11): p. 5088-90.
30. Madigan, M.T., et al., *Brock Mikrobiologie*. **2020**, Pearson Deutschland. p. 1680.
31. Kates, M., L.S. Yengoyan, and P.S. Sastry, *A diether analog of phosphatidyl glycerophosphate in Halobacterium cutirubrum*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, **1965**. 98(2): p. 252-268.
32. Langworthy, T.A., T.G. Tornabene, and G. Holzer, *Lipids of Archaeobacteria*. Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, **1982**. 3(2): p. 228-244.
33. Bräsen, C., et al., *Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **2014**. 78(1): p. 89-175.
34. Koga, Y., *Early evolution of membrane lipids: how did the lipid divide occur?* J Mol Evol, **2011**. 72(3): p. 274-82.
35. Hamerly, T., et al., *Characterization of Fatty Acids in Crenarchaeota by GC-MS and NMR*. Archaea, **2015**. 2015: p. 472726.
36. Zaremba-Niedzwiedzka, K., et al., *Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity*. Nature, **2017**. 541(7637): p. 353-358.
37. Spang, A., et al., *Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes*. Nature, **2015**. 521(7551): p. 173-179.
38. Cox, C.J., et al., *The archaeobacterial origin of eukaryotes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2008**. 105(51): p. 20356-61.
39. Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis, *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1990**. 87(12): p. 4576-9.
40. Villanueva, L., S. Schouten, and J.S.S. Damsté, *Phylogenomic analysis of lipid biosynthetic genes of Archaea shed light on the 'lipid divide'*. Environmental microbiology, **2017**. 19(1): p. 54-69.
41. Sojo, V., *Why the lipid divide? Membrane proteins as drivers of the split between the lipids of the three domains of life*. BioEssays, **2019**. 41(5): p. 1800251.
42. Fan, Q., et al., *Stability against temperature and external agents of vesicles composed of archaeal bolaform lipids and egg PC*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, **1995**. 1240(1): p. 83-88.
43. Sohlenkamp, C., *Crossing the lipid divide*. J Biol Chem, **2021**. 297(1): p. 100859.
44. Eme, L., et al., *Archaea and the origin of eukaryotes*. Nat Rev Microbiol, **2017**. 15(12): p. 711-723.
45. Lombard, J., P. López-García, and D. Moreira, *An ACP-Independent Fatty Acid Synthesis Pathway in Archaea: Implications for the Origin of Phospholipids*. Molecular Biology and Evolution, **2012**. 29(11): p. 3261-3265.
46. Wang, K., et al., *A TetR-family transcription factor regulates fatty acid metabolism in the archaeal model organism Sulfolobus acidocaldarius*. Nat Commun, **2019**. 10(1): p. 1542.
47. Dibrova, D.V., M.Y. Galperin, and A.Y. Mulkidjanian, *Phylogenomic reconstruction of archaeal fatty acid metabolism*. Environ Microbiol, **2014**. 16(4): p. 907-18.
48. Jones, W.J. and G.U. Holzer, *The Polar and Neutral Lipid Composition of Methanosphaera stadtmanae*. Systematic and Applied Microbiology, **1991**. 14(2): p. 130-134.
49. Gattinger, A., M. Schloter, and J.C. Munch, *Phospholipid etherlipid and phospholipid fatty acid fingerprints in selected euryarchaeotal monocultures for taxonomic profiling*. FEMS Microbiol Lett, **2002**. 213(1): p. 133-9.
50. Xiaoxiao Zhou, C.S., Kun Wang, David Sybers, Till Kessenbrock, Ann-Christin Lindås, Eveline Peeters, Markus Kaiser, Christopher Bräsen, Bettina Siebers, *Fatty acid metabolism in Sulfolobus acidocaldarius – a potential archaeal pathway for fatty acid synthesis*. currently under submission, **2023**.
51. Cheng, Y.Y. and J.Z. Yu, *Minimizing contamination from plastic labware in the quantification of C16 and C18 fatty acids in filter samples of atmospheric particulate matter and their utility in apportioning cooking source contribution to urban PM2.5*. Atmosphere, **2020**. 11(10): p. 1120.
52. Elahee Doomun, S.N., et al., *A simple method for measuring carbon-13 fatty acid enrichment in the major lipid classes of microalgae using GC-MS*. Metabolites, **2016**. 6(4): p. 42.

53. Koch, E., et al., *Rapid quantification of fatty acids in plant oils and biological samples by LC-MS*. Analytical and bioanalytical chemistry, **2021**. 413(21): p. 5439-5451.
54. Yao, C.H., et al., *Inaccurate quantitation of palmitate in metabolomics and isotope tracer studies due to plastics*. Metabolomics, **2016**. 12.
55. Cropper, F.R. and A. Heywood, *Analytical Separation of the Methyl Esters of the C12–C22 Fatty Acids by Vapour-Phase Chromatography*. Nature, **1953**. 172(4389): p. 1101-1102.
56. James, A.T. and A.J. Martin, *Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid*. Biochem J, **1952**. 50(5): p. 679-90.
57. Quehenberger, O., A.M. Armando, and E.A. Dennis, *High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry*. Biochim Biophys Acta, **2011**. 1811(11): p. 648-56.
58. Wang, C.Y., et al., *Fast quantification of short-chain fatty acids in rat plasma by gas chromatography*. J Food Sci, **2020**. 85(6): p. 1932-1938.
59. Müller, K.-D., et al., *Trans-esterification of fatty acids from microorganisms and human blood serum by trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) for GC analysis*. Chromatographia, **1990**. 30(5): p. 245-248.
60. Kang, J.X. and J. Wang, *A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids*. BMC biochemistry, **2005**. 6(1): p. 1-4.
61. Morrison, W.R. and L.M. Smith, *Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol*. Journal of lipid research, **1964**. 5(4): p. 600-608.
62. Lepage, G. and C.C. Roy, *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction*. Journal of lipid research, **1986**. 27(1): p. 114-120.
63. Ostermann, A.I., et al., *Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography – a comparison of different derivatization and extraction procedures*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, **2014**. 91(6): p. 235-41.
64. Gee, A.J., L.A. Groen, and M.E. Johnson, *Determination of fatty acid amides as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography with mass spectrometric detection*. Journal of chromatography A, **1999**. 849(2): p. 541-552.
65. Wang, G., et al., *Optimization and validation of a method for analysis of non-volatile organic acids in Baijiu by derivatization and its application in three flavor-types of Baijiu*. Food Analytical Methods, **2022**. 15(6): p. 1606-1618.
66. Kumar, D.R., N.P. Kumar, and D. Uma, *Quantification of ω -fatty acids through GC-MS analysis in flaxseed (*Linum Usitatisium L.*)*. IJCS, **2020**. 8(3): p. 1767-1771.
67. Tammekivi, E., et al., *Comparison of derivatization methods for the quantitative gas chromatographic analysis of oils*. Analytical Methods, **2019**. 11(28): p. 3514-3522.
68. Jarukas, L., et al., *Investigation of organic acids in saffron stigmas (*Crocus sativus L.*) extract by derivatization method and determination by GC/MS*. Molecules, **2020**. 25(15): p. 3427.
69. Knapp, R., *Handbook of analytical derivatization reactions*. **1979**.
70. Kawahara, F.K., *Microdetermination of pentafluorobenzyl ester derivatives of organic acids by means of electron capture gas chromatography*. Analytical Chemistry, **1968**. 40(13): p. 2073-2075.
71. Strife, R.J. and R.C. Murphy, *Preparation of pentafluorobenzyl esters of arachidonic acid lipooxygenase metabolites: analysis by gas chromatography and negative-ion chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, **1984**. 305: p. 3-12.
72. Singh, G., et al., *Liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry: analysis of pentafluorobenzyl derivatives of biomolecules and drugs in the attomole range*. Analytical chemistry, **2000**. 72(14): p. 3007-3013.
73. Pawlosky, R.J., H. Sprecher, and N. Salem Jr, *High sensitivity negative ion GC-MS method for detection of desaturated and chain-elongated products of deuterated linoleic and linolenic acids*. Journal of lipid research, **1992**. 33(11): p. 1711-1717.
74. Rudolph, M.C., et al., *Mammalian fatty acid synthase activity from crude tissue lysates tracing ^{13}C -labeled substrates using gas chromatography–mass spectrometry*. Analytical biochemistry, **2012**. 428(2): p. 158-166.
75. Meckelmann, S.W., et al., *Comparison of derivatization/ionization techniques for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxylipins*. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, **2017**. 130: p. 8-15.
76. Jarukas, L., et al., *Optimization and validation of the GC/FID method for the quantification of fatty acids in bee products*. Applied Sciences, **2020**. 11(1): p. 83.

-
77. Tormási, J. and L. Abrankó, *Assessment of Fatty Acid-Specific Lipolysis by In Vitro Digestion and GC-FID*. *Nutrients*, **2021**. 13(11).
 78. Poonanan, A., et al., *Using shrimp shells as based catalysts for FAME production from palm oil feedstock*. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, **2021**. 31(2): p. 78-83.
 79. Dodds, E.D., et al., *Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry*. *Lipids*, **2005**. 40(4): p. 419-28.
 80. Wang, D.H., Z. Wang, and J.T. Brenna, *Gas chromatography chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry for identification and straightforward quantification of branched chain fatty acids in foods*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2020**. 68(17): p. 4973-4980.
 81. Garlito, B., et al., *Identification of very long-chain (> C24) fatty acid methyl esters using gas chromatography coupled to quadrupole/time-of-flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization source*. *Analytica chimica acta*, **2019**. 1051: p. 103-109.
 82. Schwedt, G., T.C. Schmidt, and O.J. Schmitz, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*. **2016**: John Wiley & Sons.
 83. Dougherty, R.C., *Negative chemical ionization mass spectrometry*. *Analytical chemistry*, **1981**. 53(4): p. 625-636.
 84. Laakso, P. and H. Kallio, *Optimization of the mass spectrometric analysis of triacylglycerols using negative-ion chemical ionization with ammonia*. *Lipids*, **1996**. 31(1): p. 33-42.
 85. Newsome, G.A., F.L. Steinkamp, and B.C. Giordano, *Isobutane made practical as a reagent gas for chemical ionization mass spectrometry*. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, **2016**. 27(11): p. 1789-1795.
 86. Kish-Trier, E. and T. Yuzyuk, *Quantitation of Fatty Acids in Serum/Plasma and Red Blood Cells by Gas Chromatography-Negative Chemical Ionization-Mass Spectrometry*, in *Clinical Applications of Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis*. **2022**, Springer. p. 149-163.
 87. Yang, Y., et al., *Derivatization gas chromatography negative chemical ionization mass spectrometry for the analysis of trace organic pollutants and their metabolites in human biological samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2020**. 412(25): p. 6679-6690.
 88. Marsol-Vall, A., et al., *Development and validation of a method for the analysis of halophenols and haloanisoles in cork bark macerates by stir bar sorptive extraction heart-cutting two-dimensional gas chromatography negative chemical ionization mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, **2022**: p. 463186.
 89. Zhang, J., et al., *Compound-Specific Chlorine Isotope Analysis of Organochlorine Pesticides by Gas Chromatography-Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2021**. 2021.
 90. Horning, E., et al., *Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: Studies of negative ion formation for detection and quantification purposes*. *Journal of Chromatography A*, **1977**. 142: p. 481-495.
 91. Ayala-Cabrera, J.F., et al., *Review on atmospheric pressure ionization sources for gas chromatography-mass spectrometry. Part I: Current ion source developments and improvements in ionization strategies*. *Analytica Chimica Acta*, **2022**: p. 340353.
 92. Ayala-Cabrera, J., et al., *Atmospheric pressure ionization for gas chromatography-high resolution mass spectrometry determination of polychlorinated naphthalenes in marine sediments*. *Chemosphere*, **2021**. 263: p. 127963.
 93. McEwen, C.N. and R.G. McKay, *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*, **2005**. 16(11): p. 1730-1738.
 94. Carroll, D., et al., *Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system*. *Analytical Chemistry*, **1975**. 47(14): p. 2369-2373.
 95. Xia, F., et al., *Quantification of phospholipid fatty acids by chemical isotope labeling coupled with atmospheric pressure gas chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (APGC/Q-TOF MS)*. *Analytica Chimica Acta*, **2019**. 1082: p. 86-97.
 96. Wachsmuth, C.J., et al., *Continuous Water Infusion Enhances Atmospheric Pressure Chemical Ionization of Methyl Chloroformate Derivatives in Gas Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry-Based Metabolomics*. *Analytical Chemistry*, **2014**. 86(18): p. 9186-9195.
 97. Lv, S., et al., *Atmospheric pressure chemical ionization gas chromatography mass spectrometry for the analysis of selected emerging brominated flame retardants in foods*. *Scientific reports*, **2017**. 7(1): p. 1-8.
-

98. Ghaste, M., et al., *Analysis of Grape Volatiles Using Atmospheric Pressure Ionization Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolomics*, in *Plant Metabolic Engineering*. **2022**, Springer. p. 117-136.
99. Van Bavel, B., et al., *Atmospheric-pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (APGC/MS/MS) an alternative to high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) for the determination of dioxins*. *Analytical chemistry*, **2015**. 87(17): p. 9047-9053.
100. Li, D.-X., et al., *Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS)*. *Analytica chimica acta*, **2015**. 891: p. 43-61.
101. Kauppila, T.J., J.A. Syage, and T. Benter, *Recent developments in atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry*. *Mass spectrometry reviews*, **2017**. 36(3): p. 423-449.
102. Ayala-Cabrera, J., et al., *Feasibility of gas chromatography-atmospheric pressure photoionization–high-resolution mass spectrometry for the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in environmental and feed samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2020**. 412(15): p. 3703-3716.
103. Kondyli, A. and W. Schrader, *High-resolution GC/MS studies of a light crude oil fraction*. *Journal of Mass Spectrometry*, **2019**. 54(1): p. 47-54.
104. Di Lorenzo, R.A., et al., *Fast gas chromatography-atmospheric pressure (photo) ionization mass spectrometry of polybrominated diphenylether flame retardants*. *Analytica chimica acta*, **2019**. 1056: p. 70-78.
105. Halloum, W., et al., *APCI as an innovative ionization mode compared with EI and CI for the analysis of a large range of organophosphate esters using GC-MS/MS*. *Journal of Mass Spectrometry*, **2017**. 52(1): p. 54-61.
106. Lipok, C., F. Uteschil, and O.J. Schmitz, *Development of an Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface for GC-MS*. *Molecules*, **2020**. 25(14): p. 3253.
107. Cai, T., et al., *HPLC-MRM relative quantification analysis of fatty acids based on a novel derivatization strategy*. *Analyst*, **2014**. 139(23): p. 6154-6159.
108. Esch, P. and S. Heiles, *Charging and Charge Switching of Unsaturated Lipids and Apolar Compounds Using Paternò-Büchi Reactions*. *J Am Soc Mass Spectrom*, **2018**. 29(10): p. 1971-1980.
109. Li, X. and A.A. Franke, *Improved LC– MS method for the determination of fatty acids in red blood cells by LC– Orbitrap MS*. *Analytical chemistry*, **2011**. 83(8): p. 3192-3198.
110. Masukawa, Y., et al., *A new analytical method for the quantification of glycidol fatty acid esters in edible oils*. *Journal of Oleo Science*, **2010**. 59(2): p. 81-88.
111. Beermann, C., et al., *Comparison of the structures of triacylglycerols from native and transgenic medium-chain fatty acid-enriched rape seed oil by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry (LC–APCI-ITMS)*. *Lipids*, **2007**. 42(4): p. 383-394.
112. Indelicato, S., et al., *HPLC/HRMS and GC/MS for Triacylglycerols Characterization of Tuna Fish Oils Obtained from Green Extraction*. *Foods*, **2023**. 12(6): p. 1193.
113. Wilson, R. and J.R. Sargent, *High-resolution separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin-layer chromatography*. *Journal of Chromatography A*, **1992**. 623(2): p. 403-407.
114. Hron, W. and L. Menahan, *A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma*. *Journal of lipid research*, **1981**. 22(2): p. 377-381.
115. Jouhet, J., et al., *LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation*. *PLoS One*, **2017**. 12(8): p. e0182423.
116. Fiore, E., et al., *Identification of plasma fatty acids in four lipid classes to understand energy metabolism at different levels of ketonemia in dairy cows using thin layer chromatography and gas chromatographic techniques (TLC-GC)*. *Animals*, **2020**. 10(4): p. 571.
117. Augusto Leal de Oliveira, M., et al., *20 years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis*. *Molecules*, **2014**. 19(9): p. 14094-14113.
118. Porto, B.L.S., M.V.N. de SOUZA, and M.A.L. de OLIVEIRA, *Analysis of omega 3 fatty acid in natural and enriched chicken eggs by capillary zone electrophoresis*. *Analytical Sciences*, **2011**. 27(5): p. 541-541.
119. Schmitz, O. and S. Gäb, *Separation of unsaturated fatty acids and related isomeric hydroperoxides by micellar electrokinetic chromatography*. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 781(1-2): p. 215-221.
120. Petersson, M.A., G. Hulthe, and E. Fogelqvist, *New sheathless interface for coupling capillary electrophoresis to electrospray mass spectrometry evaluated by the analysis of fatty acids and prostaglandins*. *Journal of Chromatography A*, **1999**. 854(1-2): p. 141-154.

121. Broughton, R., D.R. Tocher, and M.n.B. Betancor, *Development of a C18 supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the analysis of very-long-chain polyunsaturated fatty acid lipid matrices and its application to fish oil substitutes derived from genetically modified oilseeds in the aquaculture sector*. ACS omega, **2020**. 5(35): p. 22289-22298.
122. Gordillo, R., *Supercritical fluid chromatography hyphenated to mass spectrometry for metabolomics applications*. Journal of Separation Science, **2021**. 44(1): p. 448-463.
123. Toribio, L., et al., *Supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry: A valuable tool in food analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, **2021**. 143: p. 116350.
124. Senorans, F. and E. Ibanez, *Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography*. Analytica Chimica Acta, **2002**. 465(1-2): p. 131-144.
125. Rioux, V., et al., *Influence of the cis-9, cis-12 and cis-15 double bond position in octadecenoic acid (18:1) isomers on the rat FADS2-catalyzed Δ 6-desaturation*. Chemistry and Physics of Lipids, **2015**. 187: p. 10-19.
126. Antony, B., et al., *From zero to six double bonds: phospholipid unsaturation and organelle function*. Trends in Cell Biology, **2015**. 25(7): p. 427-436.
127. Thomas, M.C., et al., *Elucidation of double bond position in unsaturated lipids by ozone electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical chemistry, **2007**. 79(13): p. 5013-5022.
128. Hu, T. and J.L. Zhang, *Mass-spectrometry-based lipidomics*. Journal of separation science, **2018**. 41(1): p. 351-372.
129. Agilent Technologies. *Select FAME Columns*. [abgerufen 05.08.2023]; verfügbar unter: <https://www.agilent.com/en/product/gc-columns/application-specific-gc-columns/select-fame-columns>.
130. Xie, X., et al., *Investigation and applications of in-source oxidation in liquid sampling-atmospheric pressure afterglow microplasma ionization (LS-APAG) source*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, **2016**. 28(6): p. 1036-1047.
131. Menzel, J.P., et al., *Ozone-enabled fatty acid discovery reveals unexpected diversity in the human lipidome*. Nature communications, **2023**. 14(1): p. 3940.
132. Thomas, M.C., et al., *Ozone-induced dissociation: elucidation of double bond position within mass-selected lipid ions*. Analytical chemistry, **2008**. 80(1): p. 303-311.
133. Zhang, J.I., W.A. Tao, and R.G. Cooks, *Facile determination of double bond position in unsaturated fatty acids and esters by low temperature plasma ionization mass spectrometry*. Analytical chemistry, **2011**. 83(12): p. 4738-4744.
134. Adam, W., et al., *Hydroxy-Directed Regio- and Diastereoselective [2+2] Photocycloaddition (Paternò-Büchi Reaction) of Benzophenone to Chiral Allylic Alcohols*. Journal of the American Chemical Society, **2000**. 122(12): p. 2958-2959.
135. Büchi, G., C.G. Inman, and E.S. Lipinsky, *Light-catalyzed Organic Reactions. I. The Reaction of Carbonyl Compounds with 2-Methyl-2-butene in the Presence of Ultraviolet Light*. Journal of the American Chemical Society, **1954**. 76(17): p. 4327-4331.
136. Ma, X., et al., *Identification and quantitation of lipid C=C location isomers: A shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2016**. 113(10): p. 2573-2578.
137. Jeck, V., et al., *Double bond localization in unsaturated rhamnolipid precursors 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids by liquid chromatography-mass spectrometry applying online Paternò-Büchi reaction*. Analytical and bioanalytical chemistry, **2020**. 412(23): p. 5601-5613.
138. Ma, X. and Y. Xia, *Pinpointing double bonds in lipids by Paternò-Büchi reactions and mass spectrometry*. Angew Chem Int Ed Engl, **2014**. 53(10): p. 2592-6.
139. Murphy, R.C., et al., *Determination of Double Bond Positions in Polyunsaturated Fatty Acids Using the Photochemical Paternò-Büchi Reaction with Acetone and Tandem Mass Spectrometry*. Anal Chem, **2017**. 89(16): p. 8545-8553.
140. Chong, L., et al., *Coupling the Paternò-Büchi (PB) Reaction With Mass Spectrometry to Study Unsaturated Fatty Acids in Mouse Model of Multiple Sclerosis*. Front Chem, **2019**. 7: p. 807.
141. Jeck, V., et al., *Localization of double-bond positions in lipids by tandem mass spectrometry succeeding high-performance liquid chromatography with post-column derivatization*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2019**. 33: p. 86-94.
142. Baba, T., et al., *Structural identification of triacylglycerol isomers using electron impact excitation of ions from organics (EIEIO)*. Journal of lipid research, **2016**. 57(11): p. 2015-2027.
143. Jensen, N.J., K.B. Tomer, and M.L. Gross, *FAB MS/MS for phosphatidylinositol-, glycerol-, ethanolamine and other complex phospholipids*. Lipids, **1987**. 22(7): p. 480-489.

144. Feider, C.L., et al., *Double bond characterization of free fatty acids directly from biological tissues by ultraviolet photodissociation*. Analytical chemistry, **2020**. 92(12): p. 8386-8395.
145. Hsu, F.-F. and J. Turk, *Elucidation of the double-bond position of long-chain unsaturated Fatty acids by multiple-stage linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2011**. 19(11): p. 1673-1680.
146. Süddeutsche Zeitung, *Maschieneöl im Olivenöl*. **2015**.
147. Tagesschau, *Welche Produkte und Händler sind betroffen?* **2013**.
148. Spiegel, *Ermittler fassen mutmaßliche Hintermänner von Pferdefleischskandal*. **2017**.
149. European Medicines Agency, *EMA confirms omega-3 fatty acid medicines are not effective in preventing further heart problems after a heart attack*. EMA/328211/2019, **2019**.
150. *Nahrungsergänzungsmittelverordnung vom 24. Mai 2004 (BGBl. I S. 1011), die zuletzt durch Artikel 11 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist*.
151. The Guardian, *Fool's gold: what fish oil is doing to our health and the planet*. **2018**.
152. Frankfurter Allgemeine, *BASF steigt ins Geschäft mit Fischöl-Kapseln ein*. **2012**.
153. Evonik, *Evonik bringt neuartiges Omega-3-Produkt für Nahrungsergänzungsmittel auf den Markt* **2017**.
154. Quarks, *Omega-3-Kapseln: völlig überbewertet*. **2021**.
155. Lipok, C., J. Hippler, and O.J. Schmitz, *A four dimensional separation method based on continuous heart-cutting gas chromatography with ion mobility and high resolution mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **2018**. 1536: p. 50-57.
156. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian journal of biochemistry and physiology, **1959**. 37(8): p. 911-917.
157. Matyash, V., et al., *Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics*. Journal of lipid research, **2008**. 49(5): p. 1137-1146.
158. Görs, P.E., et al., *Potential of atmospheric pressure ionization sources for the analysis of free fatty acids in clinical and biological samples by gas chromatography-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2022**. 414(22): p. 6621-6634.
159. Schimmer, S., et al., *Fatty acids are crucial to fuel NK cells upon acute retrovirus infection*. Frontiers in Immunology, **2023**. 14: p. 1296355.
160. Kuiper, H.C., et al., *Quantitation of trans-fatty acids in human blood via isotope dilution-gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, **2018**. 1076: p. 35-43.
161. Hu, T., et al., *A sensitive and efficient method for simultaneous profiling of bile acids and fatty acids by UPLC-MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2020**. 178: p. 112815.
162. Weaver, K.L., et al., *Effect of dietary fatty acids on inflammatory gene expression in healthy humans*. Journal of Biological Chemistry, **2009**. 284(23): p. 15400-15407.
163. Sergeant, S., et al., *Impact of methods used to express levels of circulating fatty acids on the degree and direction of associations with blood lipids in humans*. British Journal of Nutrition, **2016**. 115(2): p. 251-261.
164. *European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation*. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, **2009**. Rev 1 Corr 22011.
165. Kish-Trier, E., et al., *Quantitation of total fatty acids in plasma and serum by GC-NCI-MS*. Clinical Mass Spectrometry, **2016**. 2: p. 11-17.
166. Schött, H.-F., et al., *A Validated Method for Quantification of Fatty Acids Incorporated in Human Plasma Phospholipids by Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry*. ACS omega, **2021**. 6(2): p. 1129-1137.
167. Kamphorst, J.J., et al., *Liquid chromatography–high resolution mass spectrometry analysis of fatty acid metabolism*. Analytical chemistry, **2011**. 83(23): p. 9114-9122.
168. Cruz-Hernandez, C., et al., *Quantification of fatty acids in erythrocytes and plasma by fast gas chromatography*. Journal of separation science, **2017**. 40(16): p. 3289-3300.
169. Zhao, L., et al., *Sex- and Age-Related Metabolic Characteristics of Serum Free Fatty Acids in Healthy Chinese Adults*. Journal of Proteome Research, **2020**. 19(4): p. 1383-1391.
170. Christian Schmerling, X.Z., Carsten Schroeder, Tobias Busche, Jörn Kalinowski, Lidia Montero, Oliver Schmitz, Sabrina Ninck, Markus Kaiser, Jan Bost, Alejandra Recalde, Sonja V. Albers, Christopher Bräsen, Bettina Siebers, *Glycerol degradation in the thermoacidophilic crenarchaeon Sulfolobus acidocaldarius involves an unusual glycerol-3-phosphate dehydrogenase*. currently under submission, **2023**.

-
171. Asker, D. and Y. Ohta, *Production of canthaxanthin by Haloferax alexandrinus under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction*. Applied microbiology and biotechnology, **2002**. 58: p. 743-750.
172. Görs, P.E., J.F. Ayala-Cabrera, and S.W. Meckelmann, *Unraveling the Double Bond Position of Fatty Acids by GC-MS Using Electron Capture APCI and In-Source Fragmentation Patterns*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2023**. 34(11): p. 2538-2546.
173. Rhourri-Frih, B., et al., *Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI*. Journal of Mass Spectrometry, **2009**. 44(1): p. 71-80.
174. Kauppila, T.J., H. Kersten, and T. Benter, *The ionization mechanisms in direct and dopant-assisted atmospheric pressure photoionization and atmospheric pressure laser ionization*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, **2014**. 25(11): p. 1870-1881.
175. Fredenhagen, A. and J. Kühnöl, *Evaluation of the optimization space for atmospheric pressure photoionization (APPI) in comparison with APCI*. Journal of Mass spectrometry, **2014**. 49(8): p. 727-736.
176. Cha, K.H., et al., *Development of a quantitative screening method for pesticide multiresidues in orange, chili pepper, and brown rice using gas chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry with dopant-assisted atmospheric pressure chemical ionization*. Food Chemistry, **2022**. 374: p. 131626.
177. Brotas, M.S., G.A. Carvalho, and P.A. Pereira, *Determination, through derivatization and GC-MS analysis, of omega-3 and omega-6 fatty acids in fish oil capsules sold in Salvador, Bahia*. Journal of the Brazilian Chemical Society, **2020**. 31: p. 447-455.
178. Yi, T., et al., *Comparative analysis of EPA and DHA in fish oil nutritional capsules by GC-MS*. Lipids in health and disease, **2014**. 13(1): p. 1-6.
179. Bratu, A., et al., *Quantitative determination of fatty acids from fish oils using GC-MS method and ¹H-NMR spectroscopy*. UPB Sci Bull B, **2013**. 75(2): p. 23-32.
180. Adachi, A., *Cuttle-Fish Oil. VIII. Isolation and Structure of Hexadecatrienoic Acid and Hexadecatetraenoic Acid*. Journal of Japan Oil Chemists' Society, **1960**. 9(7): p. 359-362.
181. Nemati, M., N. Huda, and F. Ariffin, *Development of calcium supplement from fish bone wastes of yellowfin tuna (Thunnus albacares) and characterization of nutritional quality*. International Food Research Journal, **2017**. 24(6): p. 2419-2426.
182. Yamada, H., et al., *Lipids, fatty acids and hydroxy-fatty acids of Euphausia pacifica*. Scientific Reports, **2017**. 7(1): p. 9944.
183. Ruiz-López, N., et al., *The synthesis and accumulation of stearidonic acid in transgenic plants: a novel source of 'heart-healthy' omega-3 fatty acids*. Plant Biotechnology Journal, **2009**. 7(7): p. 704-716.
184. Coupland, K., *Stearidonic acid: A plant produced omega-3 PUFA and a potential alternative for marine oil fatty acids*. Lipid Technology, **2008**. 20(7): p. 152-154.
185. Guil-Guerrero, J.L., *Stearidonic acid (18: 4n-3): metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources*. European Journal of Lipid Science and Technology, **2007**. 109(12): p. 1226-1236.
-

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Görs, P. E., Wittenhofer, P., Ayala-Cabrera, J. F., Meckelmann, S. W. *Potential of atmospheric pressure ionization sources for the analysis of free fatty acids in clinical and biological samples by gas chromatography-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2022**.

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-022-04223-z>

Görs, P. E., Ayala-Cabrera, J. F., Meckelmann, S. W. *Unraveling the Double Bond Position of Fatty Acids by GC-MS Using Electron Capture APCI and In-Source Fragmentation Patterns*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2023**.

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jasms.3c00257>

Schimmer, S. Werner, T., Görs, P.E., Meckelmann, S.W., Mittermüller, D., Finlay, D.K., Dittmer, U., Littwitz-Salomon, E., *Fatty acids are crucial to fuel NK cells upon acute retrovirus infection*. Frontiers in Immunology, section NK and Innate Lymphoid Cell Biology, **2023**.

<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1296355/full>

Schmerling, C., Zhou, X., Goers, P.E., Koestlbacher, S., Kessenbrock, T., Podlesainski, D., Sybers, D., Wang, K., Lindas, A.C., Snoep, J.L., Peeters, E., Kaiser, M., Ettema, T.J.G., Meckelmann, S.W., Braesen, C., Siebers, B., *De novo synthesis of fatty acids in Archaea via an archaeal fatty acid synthase complex*. BioRxiv, **2024** (Preprint).

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.07.05.601840v1.abstract>

Tagungsbeiträge:

Saenger T, König S, Görs P.E., Vordenbäumen S, Schulte MF, Bleck E, Schneider M, Jose J (2019) *A longitudinal study of human α S1-casein content and its phosphorylation of breast-milk from two mothers during the first 7 months post partum*. 6th Münster Conference on Biomolecule Analysis, Münster, **2019**.

Görs, P. E., Wittenhofer, P., Ayala-Cabrera, J. F., Meckelmann, *Comparison of ionization techniques for the gas chromatographic analysis of free fatty acids in plasma, serum, and cells*, ILS 2021, Regensburg, **2021**.

Görs, P.E. Montero, L., Meckelmann, S.W. Krempe, C.P. Castilla-Fernández D. *Analysis of CoA Esters using heart-cutting two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-LC-MS)*. HPLC 2023, San Diego, **2023**.

Görs, P. E., Ayala-Cabrera, J. F., Meckelmann, S. W. *Positionsspezifische Analyse von Doppelbindungen in Fettsäuren mittels GC-APCI-MS*. Deutsche Lebensmittelchemietage, Bonn, **2023**.