

A Theoretischer Teil

1 Einleitung

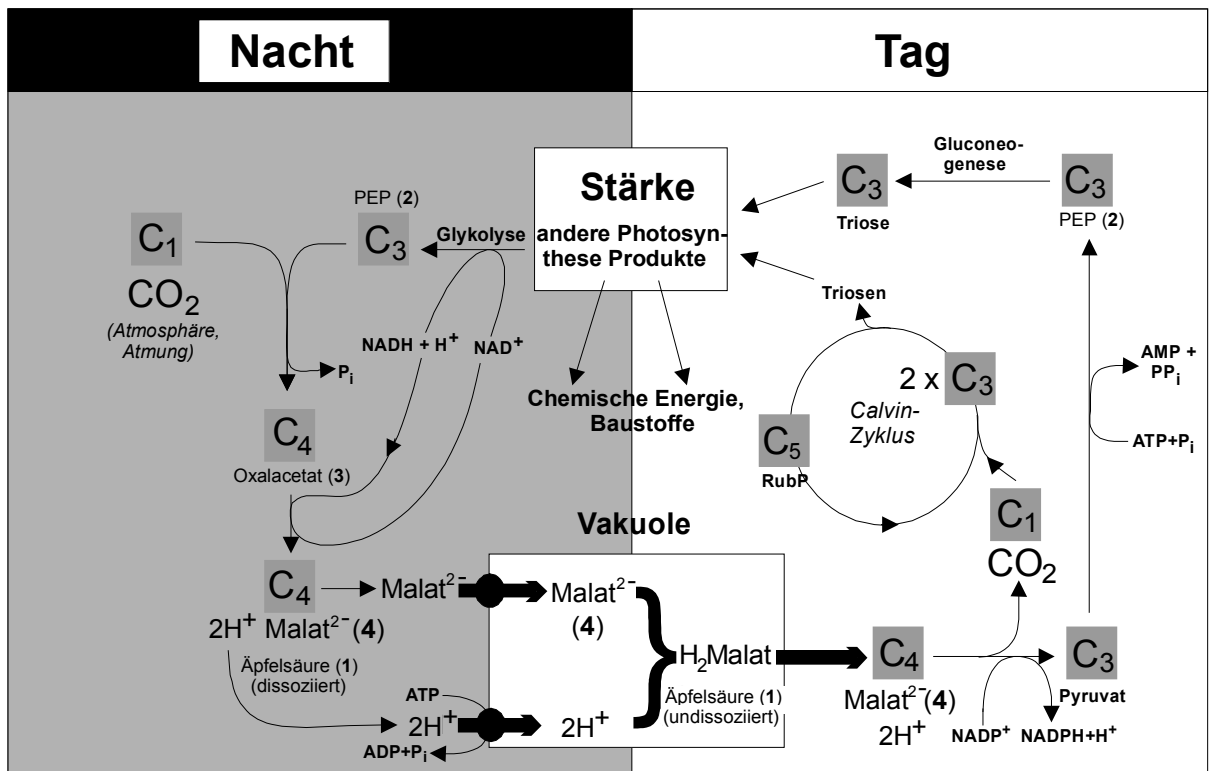
1.1 CAM-Pflanzen

Schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde bei Sukkulente n aus der Familie der Crassulaceen (Dickblattgewächse), wie z. B. *Bryophyllum calycinum*, ein als diurnaler Säurerhythmus bezeichneter Metabolismus entdeckt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, daß die Pflanze nachts große Mengen organischer Säuren - vor allem Äpfelsäure (**1**) - in den Blättern speichert, die tagsüber wieder verbraucht werden. Obwohl sich diese Art des Stoffwechsels nicht nur bei Pflanzen aus der Familie der Crassulaceen findet, wird er als Crassulaceen-Säuremetabolismus (engl. crassulacean acid metabolism; CAM) bezeichnet, da er zuerst in einer Pflanze dieser Familie entdeckt wurde und dort auch weit verbreitet ist [1, 2]. Wurde diese Art des Stoffwechsels früher als eine Kuriosität angesehen, so wird sie heute als eine Variante der Photosynthese beschrieben, die als Überlebensstrategie für Pflanzen in trockenen und heißen Vegetationszonen dient.

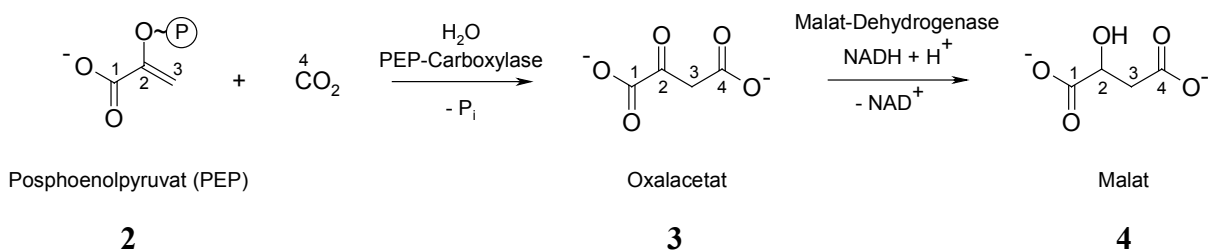
Wasserdampf abgabe sowie Gasaustausch von CO₂ und O₂ finden bei höher entwickelten Pflanzen über die Spaltöffnungen (Stomata) statt. Die Triebkraft für diesen Gasaustausch ist ein Konzentrationsgradient der Gase zwischen dem Blattinneren und der Umgebung außerhalb des Blattes. Der Gasaustausch bei Pflanzen ist somit ein diffusionskontrollierter Prozeß. Darin liegt jedoch eine Gefahr für Pflanzen, die in trockenen und heißen Gebieten wachsen. Werden beispielsweise bei Sukkulente n die Stomata weit geöffnet, um eine möglichst ungehinderte CO₂-Aufnahme zu gewährleisten, erhöht sich damit zwangsläufig auch die Transpiration, und die Pflanze droht zu vertrocknen. Andererseits erfolgt bei geschlossenen Stomata zwar kein Wasserverlust, es kann jedoch auch kein CO₂ mehr aufgenommen werden, wodurch die Photosynthese zum Erliegen kommt. Die Pflanze hat somit die Wahl, entweder zu verhungern oder zu verdursten.

Im Laufe der Evolution haben sich zwei Varianten der CO₂-Assimilation entwickelt, um den transpirationsbedingten Wasserverlust bei der CO₂-Aufnahme zu verringern. Bei der einen Variante handelt es sich um den Crassulaceen-Säuremetabolismus (CAM), die andere ist die sogenannte C₄-Photosynthese. Beide weisen formelmäßig bei der CO₂-Fixierung weitgehende Übereinstimmung auf. Während bei der C₄-Photosynthese die Aufnahme von CO₂ und die Photosynthese räumlich getrennt ablaufen, liegt beim CAM eine zeitliche Trennung von CO₂-Aufnahme und Photosynthese vor. So werden beim CAM nachts, bei

vergleichsweise niedrigen Temperaturen und einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit, die Stomata geöffnet und CO₂ unter geringem Wasserverlust aufgenommen. Das CO₂ wird dabei in einer dem Calvin-Zyklus vorgeschalteten Reaktion mit Phosphoenolpyruvat (PEP) (2) als Oxalacetat (3) fixiert und nach deren Reduktion zum Malat (4) als Äpfelsäure (1) in der Vakuole gespeichert (Schema 1 und Schema 2). Tagsüber wird die Äpfelsäure (1) decarboxyliert und dem Calvin-Zyklus CO₂ als endogenes Substrat zugeführt. Die Photosynthese kann daher bei geschlossenen Stomata ohne transpirationsbedingte Wasserverluste ablaufen.



Schema 1: Die Reaktionsfolge beim Crassulaceen-Säuremetabolismus (CAM) und ihre Verteilung auf die Dunkel- und Lichtperiode [1]. Die Zahlen hinter dem Kohlenstoff-Symbol geben die Anzahl der C-Atome in der jeweiligen Verbindung an.



Schema 2: Hauptreaktion der Biosynthese des Malats (4) bei CAM-Pflanzen [1].

Dieser Tag/Nacht-Rhythmus macht sich bei CAM-Pflanzen in einer Änderung des Säurespiegels in den Zellen - Ansäuerung in der Nacht und Absäuerung am Tag, sog. diurnaler Säurerhythmus - bemerkbar [1].

Bei abnehmender Dürrebelastung können einige CAM-Pflanzen jedoch auch unter Licht-einstrahlung am Tage über die nun nicht ganz geschlossenen Spaltöffnungen CO₂ direkt mit Ribulose-1,5-bisphosphat (RubP) in den Calvin-Cyclus aufnehmen. Die Pflanzen zeigen dann die gleiche CO₂-Fixierung wie C₃-Pflanzen [3].

Die Stoffwechselwege des CAM sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. So haben Markierungsexperimente mit ¹³CO₂ neben [4-¹³C]Äpfelsäure ([4-¹³C]1) auch [1-¹³C]Äpfelsäure ([1-¹³C]1) sowie Doppel- und Dreifachmarkierungen der durch ¹³CO₂ entstandenen Äpfelsäure (1) ergeben, was nach dem dargestellten Reaktionsschema nicht erklärt werden kann, da nur eine Markierung in 4-Position auftreten sollte (Schema 2) [4 - 8].

Außerdem werden in der Dunkelreaktion nicht nur Äpfelsäure (1), sondern auch Citronensäure und Isocitronensäure akkumuliert, über deren Bildungswege bisher wenig bekannt ist [9].

1.2 Methoden zur Untersuchung von Stoffwechselprozessen

Die Untersuchung von Stoffwechselprozessen auf molekularer Ebene wird erst durch die Markierung der beteiligten Substanzen mit stabilen oder radioaktiven Isotopen eines Elementes ermöglicht. Nachdem die positionsspezifisch markierten Substanzen in den Organismus eingeschleust sind, versucht man, das Isotop in den Stoffwechselprodukten zu detektieren und Rückschlüsse auf deren Bildungswege zu ziehen (Tracer-Methode). Der gewünschte maximale Informationsgehalt, der über das Isotop erhalten werden kann, sind Einbaurate und -position in den verschiedenen einfach oder mehrfach markierten Stoffwechselprodukten.

Früher wurden biologische Prozesse vor allem über die ¹⁴C-Pulsmarkierung untersucht. Nach einer meist chromatographischen Trennung der Inhaltsstoffe des biologischen Extraktes wurde mit Photopapier oder Geigerzähler die radioaktiv markierte Substanz detektiert und über Retentionszeitvergleich mit bekannten Substanzen identifiziert. Mit dieser Methode wurde 1945 von Calvin der Weg des Kohlenstoffs in der Photosynthese durch radioaktives ¹⁴CO₂ verfolgt [10]. Mit der ¹⁴C-Pulsmarkierungs-Methode erhält man nach ¹⁴CO₂-Verfütterung, enzymatischem Abbau und chromatographischer Trennung der

Abbauprodukte zwar die Information, wieviel markierter Kohlenstoff an welcher Position eingebaut wurde, jedoch ist keine Unterscheidung mehr innerhalb den unterschiedlich häufig markierten Stoffwechselprodukten möglich. Es ist also nur die Gesamteinbaurrate in den verschiedenen Positionen bestimmbar.

Massenspektrometrie [11] oder magnetische Kernresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) [12 - 14] erlauben auch den Einsatz von nicht-radioaktiven Tracer-Isotopen (^{13}C , ^2H , ^{15}N , ^{18}O , ^{32}S , ^{31}P) zur Untersuchung von Stoffwechselprozessen. Diese beiden Methoden werden daher bevorzugt im medizinischen Bereich eingesetzt, da sie eine geringere gesundheitliche Belastung für den Patienten mit sich bringen [15].

Nachteilig bei der Anwendung der NMR-Spektroskopie ist neben der langen Meßdauer die sehr umfangreiche Probenvorbereitung, da die Substanz aus der biologischen Matrix isoliert, sauber und im Milligramm-Bereich vorliegen muß. Zudem gibt auch diese Methode meist nur Auskunft über die Gesamteinbauraten in den verschiedenen Positionen. Eine Aufschlüsselung von Einbauraten und -position innerhalb der verschiedenen ein- und mehrfach markierten Stoffwechselprodukte ist nur bedingt möglich [16 - 18].

Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (isotope ratio mass spectrometry, IR-MS) ist eine unverzichtbare Methode in der Isotopen-Analytik mit großer Anwendungsbreite [11]. Deren Anwendungsgebiete reichen von Umweltanalytik [19], Archäologie [20], bis zu Medizin [21] und Lebensmittelauthentisierung [3, 22 - 26]. Die verwendeten Geräte müssen die Intensität der Ionenströme mit sehr großer Genauigkeit erfassen und sind deshalb meist nur zur Erfassung bestimmter Ionen konstruiert [27]. Die Isotopenverdünnungsmethode (isotope dilution mass spectrometry, ID-MS) dient der exakten quantitativen Analyse von Substanzen. Hierbei wird ein Isotopomer der zu bestimmenden Substanz als interner Standard beigemischt. Aus den Signalintensitäten im Massenspektrum kann dann die Menge der zu quantifizierenden Substanz berechnet werden [28]. Die Accelerator Mass Spectrometry (AMS) erlaubt die sehr präzise Analyse geringster Mengen langlebiger radioaktiver Isotope [29].

Eine sehr genaue Methode zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse in organischen Verbindungen steht mit der sog. Verbrennungstechnik zur Verfügung (GC-C-MS) [3, 30]. Diese eignet sich besonders für Einbauratenbestimmungen der Elemente H, C, N, O und S. Hierbei wird das organische Probenmaterial in die Meßgase H_2O , CO_2 , N_2 und SO_2 überführt, die dann im Massenspektrometer untersucht werden. Bei der Untersuchung komplexer Gemische werden die Substanzen vor der Verbrennung gaschromatographisch getrennt. Die Verbrennungstechnik wird häufig in der Lebensmittelanalytik eingesetzt, um

z. B. die physiologische oder geographische Herkunft von Nahrungsmittel-Inhaltsstoffen wie Zucker [22], Ethanol [23, 24], Vanilin [25], Coffein [26] oder Vitaminen zu analysieren. So läßt sich über das $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Verhältnis die Herkunft von Zucker oder Ethanol aus C_4 -Pflanzen (Mais, Zuckerrohr) oder C_3 -Pflanzen (Zuckerrübe, Weinrebe) bestimmen. Natürliches, von Pflanzen produziertes Vitamin C, kann in Fruchtsäften von synthetischem Vitamin C unterschieden werden [31].

Die Ursache für die Unterscheidbarkeit der pflanzlichen Herkunft dieser Substanzen liegt in den kinetischen Isotopeneffekten der biochemischen Reaktionen, die an der Entstehung oder am Abbau organischer Substanzen beteiligt sind. Bei der primären CO_2 -Bindung in der Photosynthese wird das reaktionsträgere $^{13}\text{CO}_2$ gegenüber dem leichteren $^{12}\text{CO}_2$ diskriminiert. Diese Isotopendiskriminierung ist jedoch nicht für alle Pflanzen gleich, sondern vom Photosynthese-Mechanismus der Pflanzen abhängig [32, 33]. Bei der Aufnahme von CO_2 über den primären Akzeptor PEP diskriminieren C_4 -Pflanzen das schwerere $^{13}\text{CO}_2$ weniger als C_3 -Pflanzen, die CO_2 über RubP aufnehmen (Calvin-Cyclus). Die $^{13}\text{CO}_2$ -Diskriminierung bei CAM-Pflanzen liegt zwischen C_3 - und C_4 -Pflanzen, da CAM-Pflanzen je nach Standortbedingungen sowohl nach dem Calvin-Cyclus als auch über PEP (Schema 1 und Schema 2) CO_2 aufnehmen können [3].

Der Nachteil der Verbrennungstechnik besteht darin, daß die Substanzen im GC-MS nur noch über die Retentionszeit zu unterscheiden sind. Durch Tailing der GC-Peaks in die Peaks der nachfolgenden Substanzen kann es zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen [34]. Zudem ist nach der Verbrennung der Substanz keine Bestimmung der Einbaupositionen mehr möglich, es sei denn, die Substanz wird zuvor enzymatisch abgebaut und die Abbauprodukte werden über GC-C-MS untersucht. Aber auch dann besteht keine Möglichkeit der Zuordnung von Position und prozentualem Anteil der verschiedenen einfach und mehrfach markierten Äpfelsäuren. Zur Bestimmung der Einbauraten und der Einbaupositionen in den unterschiedlich häufig markierten Äpfelsäuren (1) ist die Verbrennungstechnik daher nicht geeignet.

Prinzipiell ist die Massenspektrometrie bei Kenntnis des Fragmentierungsschemas einer Verbindung und nach Zuordnung von Fragment-Ionen-Struktur und der im Fragment enthaltenen Atompositionen des untersuchten Moleküls zur Bestimmung der Einbauraten und der Einbaupositionen hervorragend geeignet. In Verbindung mit der Gaschromatographie erlaubt sie selbst bei geringsten Substanzmengen (10 pg im Full-Scan-Modus) [35] aus der biologischen Matrix Trennung und Charakterisierung der untersuchten Verbindungen in einem Arbeitsgang.

2 Problemstellung

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode, die sowohl die Bestimmung der Einbaurate als auch der Einbaupositionen der ein- und mehrfach ^{13}C -markierten Äpfelsäuren erlaubt. Hierzu ist die Aufklärung des massenspektrometrischen Fragmentierungsverhaltens eines zur GC-Untersuchung geeigneten Derivates der Äpfelsäure (**1**) erforderlich. Die als Referenzsubstanzen benötigten, an verschiedenen Positionen vollständig markierten Äpfelsäuren müssen zuvor synthetisiert werden. Über die Verschiebung von Ionensignalen, die von isotope markierten Fragment-Ionen stammen, ist dann eine Zuordnung von Ionensignal, Fragmentstruktur und Einbauposition möglich.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Sektorfeld-Massenspektrometer

Durch ihr hohes Auflösungsvermögen erlauben Sektorfeld-Massenspektrometer die Bestimmung der exakten Masse von Ionen beispielsweise im sog. Peak-Matching-Verfahren [36, 37]. Mit Hilfe der sog. Linked-Scan-Techniken können die Ionen konsekutiver Fragmentierungsreaktionen untersucht werden [38, 39]. Hierbei werden die Zerfälle metastabiler oder stoßaktivierter Ionen aufgenommen. Metastabile Ionen besitzen eine Lebensdauer, die so lange ist (zwischen 10^{-6} und 10^{-5} Sekunden), daß sie außerhalb der Ionenquelle, d. h. auf dem Weg durch den Analysator fragmentieren [40]. Man erhält dadurch die Möglichkeit, selektiv die Reaktionen einer interessierenden Ionenspezies zu untersuchen, wodurch Mutter-Tochter-Beziehungen in einer Fragmentierungsreihe aufgestellt werden können. Bei den Linked-Scan-Techniken werden E- und B-Feld des Analysators in gegenseitiger Abhängigkeit verändert. Mit dem sog. $B/E = \text{const.}$ Linked-Scan (kurz B/E-Scan) und dem $B^2/E = \text{const.}$ Linked-Scan (kurz B^2/E -Scan) lassen sich Prozesse in der ersten feldfreien Region (1. FFR) untersuchen. Während beim B/E-Scan ein Massenspektrum aller Produkt-Ionen eines ausgewählten (metastabilen) Vorläufer-Ions aufgenommen werden kann, erhält man beim B^2/E -Scan ein Massenspektrum der möglichen Vorläufer-Ionen eines ausgesuchten Produkt-Ions. B/E-Scan und B^2/E -Scan ergänzen sich also dahingehend, daß sie komplementäre Informationen liefern.

3.2 Ionenfallen-Massenspektrometer

Ionenfallen-Massenspektrometer (ion traps) sind Speicher-Massenspektrometer [35, 41 - 47]. Hierdurch unterscheiden sie sich grundsätzlich von den Sektorfeld- und Quadrupol-Systemen, die als Ionenstrahl-Geräte arbeiten und somit als Massenfilter wirken. Dadurch, daß Ionenfallen-Massenspektrometer Ionen über einen definierbaren Zeitraum (bis zu mehreren Sekunden) sammeln können und dann in einem schnellen Scan (bis zu 5000 u/s) auf den SEV schicken, erreichen sie eine niedrigere Nachweisgrenze (10 pg im Full-scan-Betrieb) als Strahlgeräte (1 ng im Full-scan-Betrieb).

Durch geeignete Scantechniken können Ionen bis m/z 70.000 analysiert werden [43, 44]. Das Auflösungsvermögen ist weitaus niedriger als an Sektorfeldgeräten (60.000) und liegt bei Masse 1000 um ca. 5000 [43, 44]. Durch die Fähigkeit Ionen zu speichern und gezielt anzuregen, sind Ionenfallen in der chemischen Analytik zur Strukturaufklärung von großem Wert [35].

Die Ionenfalle besteht aus drei Elektroden: Zwei gegenüberliegenden hyperbolischen Endkappen auf Erdpotential mit Eintrittsöffnung für die Ionen von der Ionenquelle bzw. austretenden Ionen zum SEV und einer dazwischenliegenden hyperbolischen Ringelektrode, an der eine Radiofrequenz-Hochspannung (RF, ca. 1 MHz bei 500 – 1000 V) und gegebenenfalls zusätzlich eine konstante Gleichspannung (DC, U) anliegen (Abb. 1). Dadurch entsteht im Inneren der Ionenfalle ein periodisches, inhomogenes, dreidimensionales Quadrupolfeld, mit dem Ionen gespeichert bzw. nach ihren Massen analysiert werden können. Helium ($10^{-3} - 10^{-4}$ bar) im Inneren der Ionenfalle dient zum Abbremsen der aus der Ionenquelle eintretenden Ionen oder als Stoßpartner im MS/MS-Betrieb (CID). Die zugrundeliegende mathematische Theorie von Quadrupol- und Ionenfallen-Massenspektrometern ist weitestgehend gleich. So kann der zweidimensionale Quadrupol als Sonderfall der dreidimensionalen Ionenfalle angesehen werden.

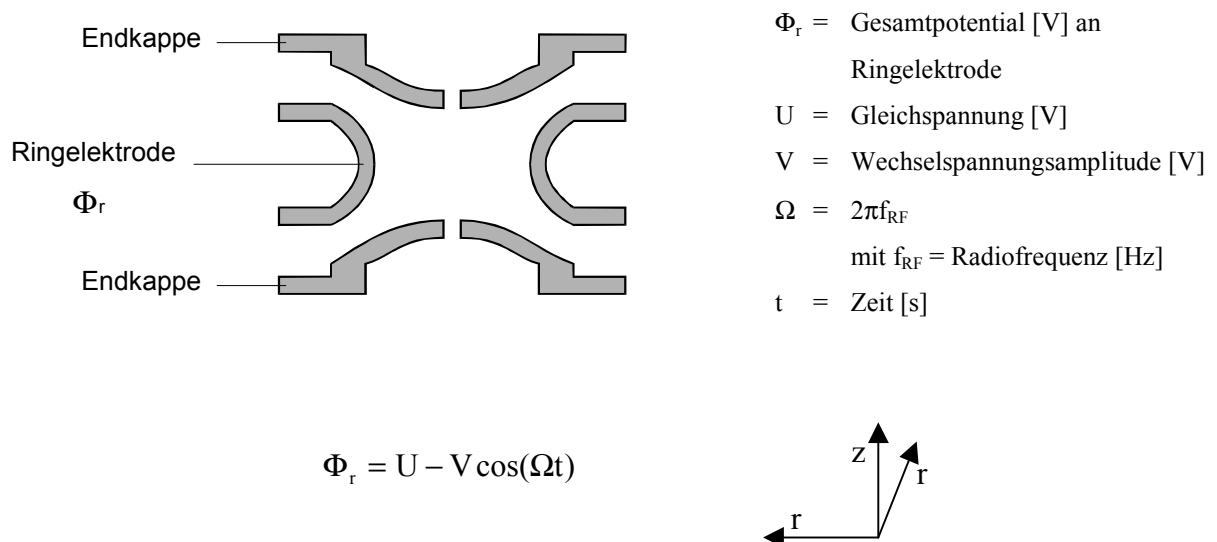


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Ionenfalle.

Die Ionenbewegung im radialsymmetrischen Quadrupolfeld der Falle wird durch die Lösung der Mathieu-Differentialgleichung beschrieben:

$$\frac{du^2}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0$$

u = Raumrichtungen x , y , und z

ξ = $\Omega t/2$

a_u, q_u = dimensionslose Parameter

Es ist somit möglich, stabile und instabile Bedingungen für beliebige Ionen vorherzusagen. Als Kriterium für die Stabilität eines Ions in den betrachteten Raumrichtungen sind die beiden dimensionslosen Parameter a und q etabliert. Für die gestreckte Ionenfalle ergeben sich die Stabilitätsparameter für die radiale Richtung (r) und die z -Achse (z) zu:

$$a_z = -2a_r = \frac{-16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

r_0 = Radius der Ringelektrode [m]

z_0 = Abstand vom Zentrum der Ringelektrode zur Endkappe

e = Elementarladung [C]

m = Teilchenmasse [kg]

$$q_z = -2q_r = \frac{-8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2}$$

Die Ionen müssen die Stabilitätskriterien für beide Raumrichtungen erfüllen, um nicht aus der Falle hinausgeschleudert zu werden. Trägt man die Wertepaare von a und q gegeneinander auf, so gelangt man zu einem sog. Stabilitätsdiagramm (Abb. 2). Die gekennzeichnete Schnittfläche weist den Bereich aus, in dem das Ion sowohl in radialer Richtung als auch in der z -Achse stabile Trajektorien beschreibt, und der auch in der Praxis genutzt wird.

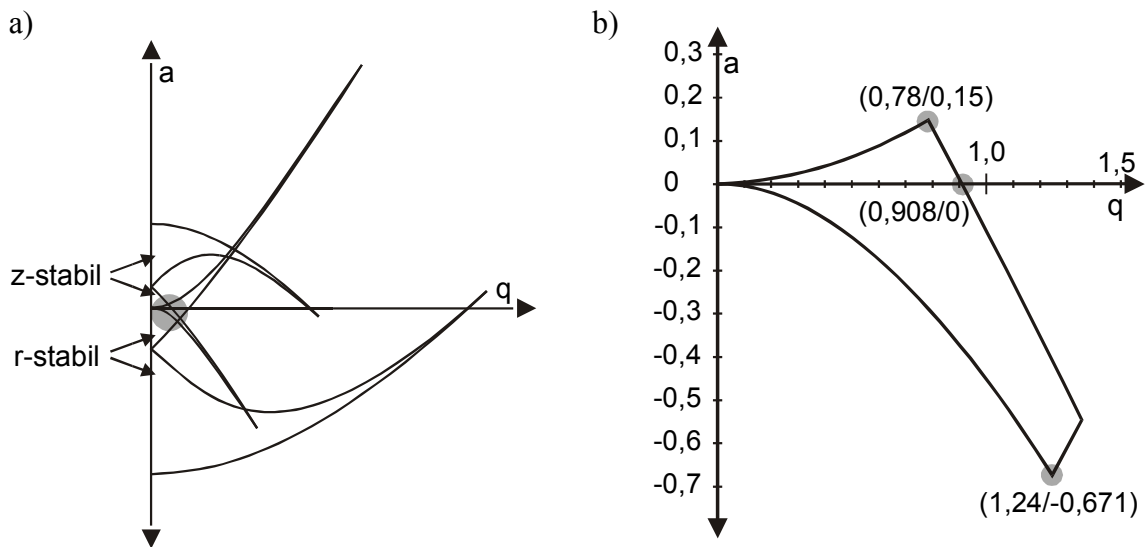


Abb. 2: a) Stabilitätsdiagramm für eine gestreckte Quadrupol-Ionenfalle.

b) Vergrößerter Ausschnitt des Schnittbereiches nahe des Ursprungs.

Das Stabilitätsdiagramm in dieser Darstellungsform (Aufzeichnung a gegen q) (Abb. 2) hat Gültigkeit für alle Ionen unabhängig von ihren Massen, doch gelten für Ionen unterschiedlicher Masse bei konstanten Werten für U und V unterschiedliche Positionen im Stabilitätsbereich. Besondere Beachtung verdient der Schnittpunkt der q -Achse mit der rechten Begrenzungslinie des Stabilitätsbereiches bei $q_z = 0,908$. An diesem Punkt befindet sich das Ion mit der kleinsten speicherbaren Masse. Man bezeichnet diese Masse deshalb auch als Cut-off-Masse oder einfach nur Cut-off.

3.2.1 Die Ionenfalle als Massenanalysator

Die in der Falle gesammelten Ionen können mit verschiedenen Methoden analysiert werden. Am weitesten verbreitet sind hierbei der sog. Mass-selective instability scan und Resonant ejection.

3.2.1.1 Mass-selective instability scan

Da sich Ionen unterschiedlicher Masse bei konstantem U und V an unterschiedlichen Positionen im Stabilitätsbereich befinden, ist es möglich, Ionen anhand ihrer Masse zu selektieren. Beim Mass-selective instability scan operiert man meist ohne Gleichspannungsanteil ($U = 0$, d. h. $a_z = a_r = 0$) und bewegt sich im Stabilitätsdiagramm entlang der q -Achse. So werden bei konstanter Radiofrequenz (RF) Ionen mit höheren Massen bei größeren

RF-Amplituden (V) und Ionen kleinerer Masse bei niedrigeren Amplituden (V) instabil. Beim Mass-selective instability scan wird bei konstanter Radiofrequenz (RF) die Amplitude (V) kontinuierlich erhöht. Dadurch bewegen sich die Ionen entlang der q_z -Achse, bis sie bei $q_z = 0,908$ (Instability boundary) den Stabilitätsbereich und damit die Ionenfalle verlassen. Durch kontinuierliche Detektion der austretenden Ionen in Korrelation zur Amplitude (V) entsteht ein Massenspektrum (Abb. 3).

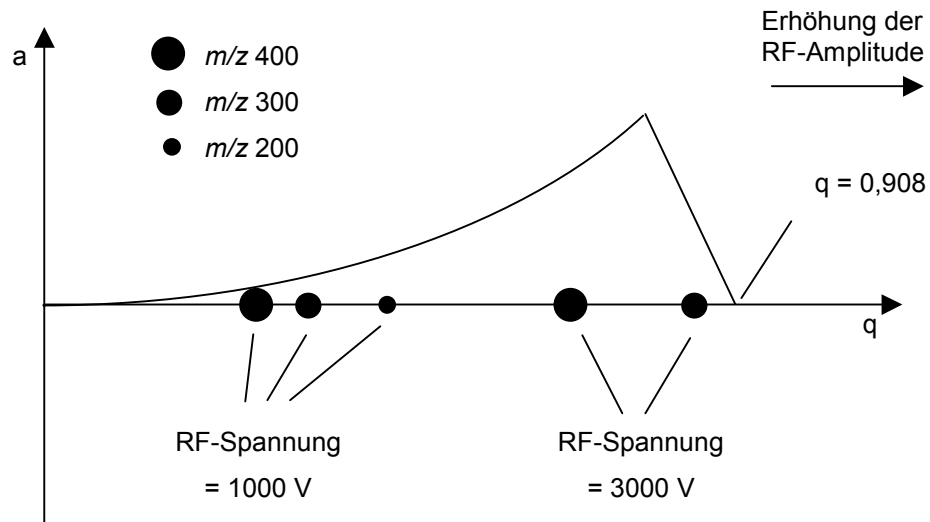


Abb. 3: Prinzip des Mass-selective instability scan.

3.2.1.2 Resonant ejection

Die Bewegungen der Ionen in der Ionenfalle sind durch zwei säkulare Frequenzen in axialer und radialer Richtung definiert. Eine zusätzliches, über die Endkappen eingestrahltes Hochfrequenzfeld von einigen hundert Millivolt kann mit diesen Säkularfrequenzen in Resonanz treten und so für verschiedene Anwendungen herangezogen werden.

Beim Scan wird die RF-Spannung und damit die Amplitude (V) an der Ringelektrode erhöht. Die Ionen erreichen nacheinander q_z -Werte, die ihnen die entsprechende axiale Säkularfrequenz verleihen, um mit der über die Endkappen eingestrahlten Frequenz in Resonanz zu treten. Diese Ionen nehmen unter Zunahme ihrer Schwingungsamplitude Energie auf und verlassen die Ionenfalle, bevor sie die eigentliche Instabilitätsgrenze bei $q_z = 0,908$ erreicht haben. Im Resonant ejection mode wird sozusagen ein „Loch“ im Stabilitätsdiagramm erzeugt und zwar bei dem q_z -Wert, dessen Säkularfrequenz mit der eingestrahlten Frequenz korrespondiert (Abb. 4).

Da die Ionen die Falle nun bei einer niedrigeren RF-Amplitude (V) verlassen, konnte mit dieser Methode der Massenbereich der Ionenfallen drastisch erhöht werden, bis zu m/z 70000. Ein weiterer Effekt besteht in der Verringerung von Raumladungseffekten und dadurch einer Erhöhung der Auflösung [43, 44].

Die Resonanzanregung wird hauptsächlich bei der Isolierung von Ionen eines bestimmten m/z -Wertes oder eines Massenbereiches genutzt und bei der Stoßanregung von Ionen in der Ionenfalle (Kap. 3.2.1.3).

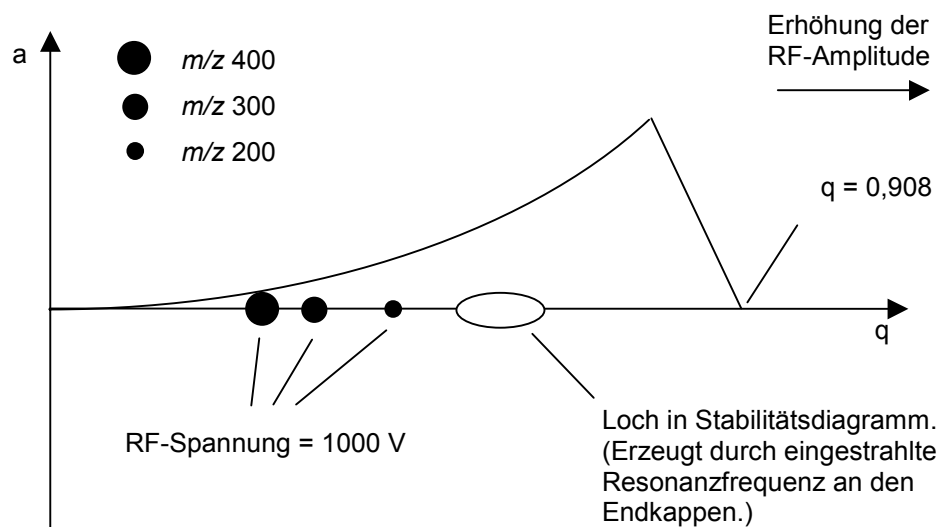


Abb. 4: Prinzip der Resonant ejection.

3.2.1.3 Tandem-Massenspektrometrie in Ionenfallen.

Zur Durchführung von MS/MS-Messungen sind drei Schritte notwendig:

1. Isolierung des Vorläufer-Ions
2. Fragmentierung des Vorläufer-Ions
3. Detektion der erzeugten Produkt-Ionen

Zur Isolierung von Ionen einer bestimmten Masse stehen mehrere Methoden zur Verfügung [48]. Die gebräuchlichste verwendet Resonant ejection [46]. Nach Ionisierung und Speicherung der Ionen, erfolgt die Isolierung des Vorläufer-Ions durch Anlegen einer breitbandigen hochfrequenten Spannung an den Endkappen des Analysators. Die Säkular-

frequenz des Vorläufer-Ions fehlt in diesem Frequenzspektrum und beläßt dieses als einziges Ion in der Ionenfalle.

Wird die über die Endkappen eingestrahlte Resonanzfrequenz anschließend auf den m/z -Wert der isolierten Ionen eingestellt und die Amplitude im Vergleich zum Isolierungsvorgang gering gehalten, nehmen die Schwingungsamplituden und die kinetische Energie der Ionen zu, ohne daß es zum Austritt aus der Ionenfalle kommt. Die Ionen nehmen durch Stöße mit dem vorhandenen Helium ($p = 10^{-3} - 10^{-4}$ bar) so lange Energie auf, bis diese ausreicht, eine Fragmentierung zu bewirken. Die gebildeten Produkt-Ionen werden in dieser Phase bei niedriger RF-Spannung gespeichert. Die anschließende massenspektrometrische Analyse der entstandenen Fragment-Ionen erfolgt mit Hilfe des Mass-selective instability scans oder Resonant ejection.

Die MS/MS-Analyse eröffnet durch die Möglichkeit, Ionen einer bestimmten Masse zu isolieren und durch nachfolgende Stoßaktivierung ein Fragment-Ionen-Spektrum des isolierten Ions aufzuzeichnen, neue Möglichkeiten zur Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen. Störende Ionensignale von anderen Substanzen als der zu untersuchenden (z.B. Untergrundsignale der biologischen Matrix), können so ausgeblendet werden. Außerdem erhält man Produktspektren, die frei von komplexen Isotopenmustern sind.

Besonders aus energiearmen Ionen, wie sie mit den schonenden Ionisierungsmethoden (CI [49, 50], FD [50, 51], FI [51, 52], FAB [53], ESI [54], MALDI [55, 56]) erzeugt werden, können durch die Stoßaktivierung nach der Ionisierung struktursignifikante Fragmentierungsreaktionen induziert werden.

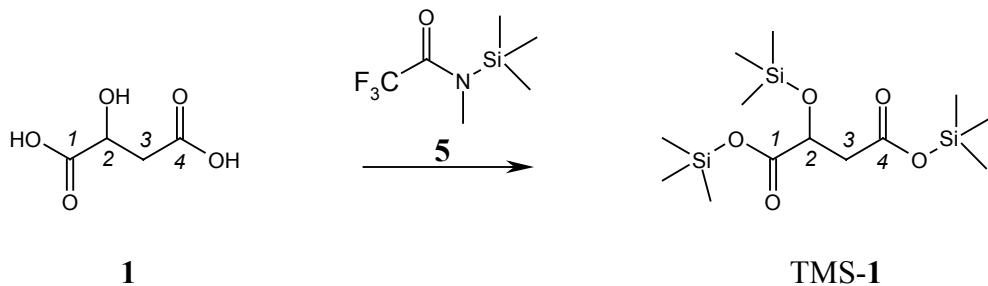
Die Kombination der schonenden Ionisierungstechniken mit der MS/MS-Analyse sind in der biochemischen Analytik von großer Bedeutung [57]. Einzelkomponenten in Gemischen können ohne vorherige chromatographische Auftrennung qualitativ und quantitativ untersucht werden. Die Anwendungen reichen von der Peptidsequenzierung [58 - 61] über die Charakterisierung von Lipiden [62 - 64] bis zur Strukturanalyse von Oligosacchariden [65 - 67].

Durch erneute Isolierung und Stoßaktivierung eines der Produkt-Ionen gelingt eine weitere Spezifizierung der Strukturanalyse. Auf kommerziell erhältlichen Geräten können MS/MS-Analysen bis MS^8 durchgeführt werden [44].

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Derivatisierung der Äpfelsäure (1)

Zur gaschromatographischen Trennung der Äpfelsäure (1) aus der biologischen Matrix muß diese in ein unzerstört verdampfbares Derivat überführt werden. Als Derivatisierungsreagenz hat sich *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) (5) bewährt [68], wodurch die Äpfelsäure (1) in ihr Tris(trimethylsilyl)-Derivat (TMS-Derivat) TMS-1 überführt wird (Schema 3). Die leicht verdampfbareren TMS-Derivate der in den aufbereiteten biologischen Proben enthaltenen Hydroxycarbonsäuren zeigen bei geeigneten GC-Parametern eine gute Trennung (Abb. 5).



Schema 3: Derivatisierung der Äpfelsäure (1) mit MSTFA (5).

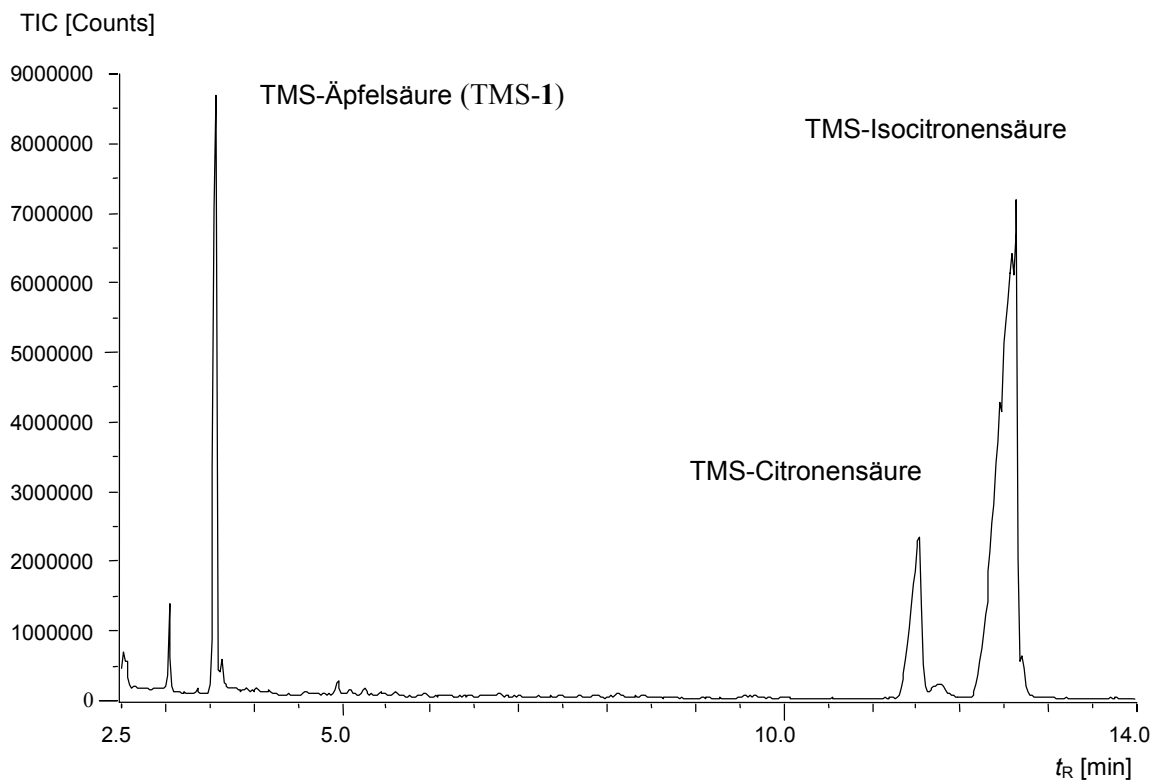


Abb. 5: Totalionenchromatogramm der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) aus biologischer Matrix.

4.2 Fragmentierungsreaktionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1)

Der Molekül-Ionenpeak (M^+) TMS-derivatisierter Substanzen (hier bei m/z 350) ist meist von geringer Intensität, jedoch ist das durch die Abspaltung eines Methylradikals aus den TMS-Gruppen entstehende Signal bei m/z 335 $[M - CH_3]^+$ gut zu erkennen [69].

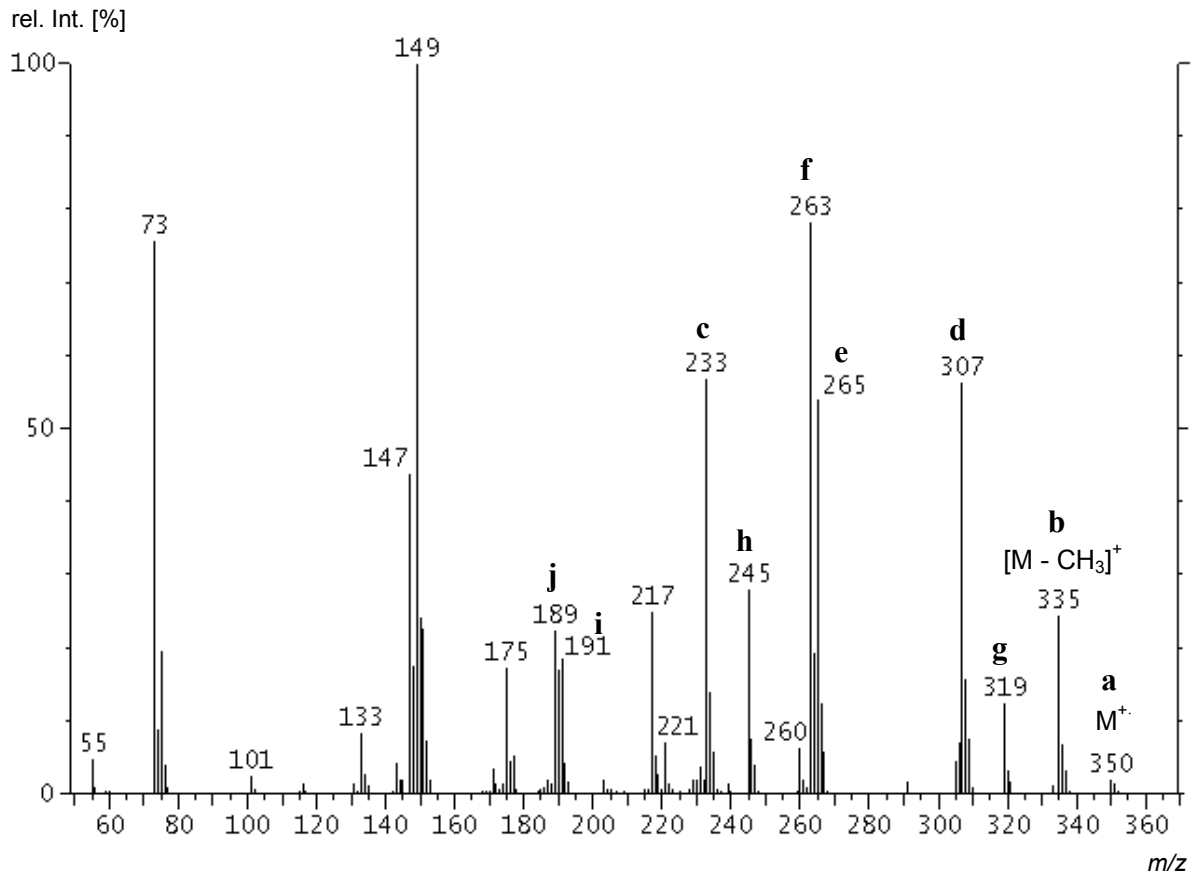
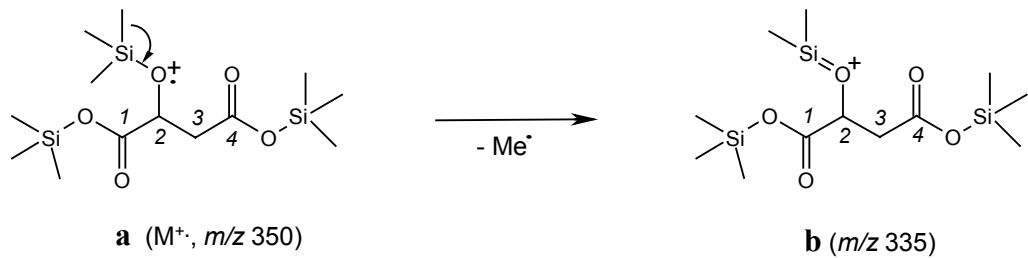
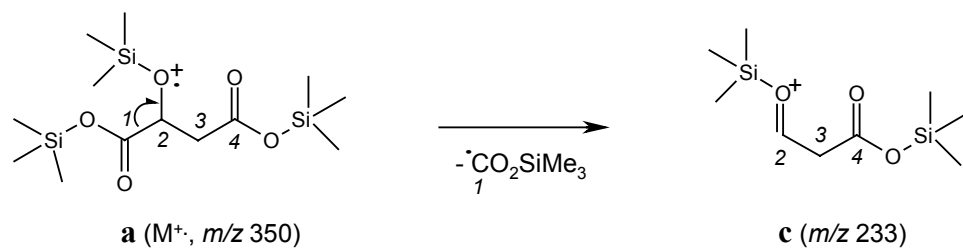


Abb. 6: Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-1), aufgenommen am Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan MAT GCQ.

Aus dem EI-Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) (Abb. 6) wurden bisher nur das Signal des Ions **b** bei m/z 335 (Schema 4) zur Bestimmung der Gesamteinbaurrate über alle Kohlenstoffpositionen und das Signal des Ions **c** bei m/z 233 (Schema 5) zur Bestimmung der Einbaurrate in 1-Position der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) genutzt [5, 6].



Schema 4: Bildung des Ions **b** bei m/z 335 durch α -Spaltung in einer TMS-Gruppe des Molekül-Ions **a** (M^+ , m/z 350).



Schema 5: Bildung des Ions **c** bei m/z 233 durch α -Spaltung zwischen der 1- und 2-Position des Molekül-Ions **a** (M^+ , m/z 350).

Das Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-**1**) (Abb. 6), zeigt die in der Literatur beschriebenen und für Trimethylsilyl-Derivate von Hydroxycarbonsäuren typischen Signale bei m/z 73, 147, 149 und 221 (Abb. 7) [69, 70]. Es handelt sich hierbei um Ionen, die aus den Trimethylsilanol-Gruppen der TMS-Äpfelsäure (TMS-**1**) gebildet werden und daher zur Bestimmung des Markierungsgrades der Äpfelsäure (**1**) nicht herangezogen werden.

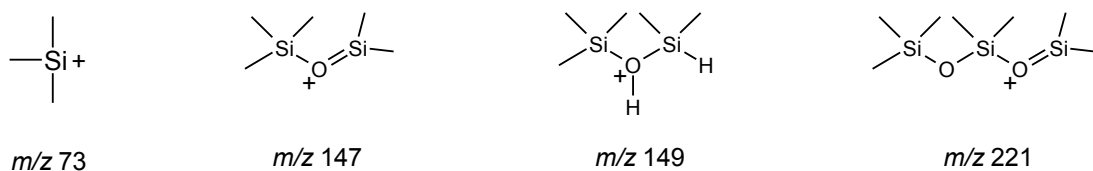


Abb. 7: Typische Fragment-Ionen in den EI-Spektren TMS-derivatisierter Hydroxycarbonsäuren.

4.2.1 Isotopenmarkierungen der Äpfelsäure (1)

Anhand der Verschiebungen, die die einzelnen Peaks in den Massenspektren der isoto-
penmarkierten TMS-Äpfelsäure erfahren, läßt sich bestimmen, welche Atome der Äpfel-
säure (1) noch in den einzelnen Fragmenten enthalten sind. Sie sind daher eine wertvolle
Interpretationshilfe bei der Aufklärung des Fragmentierungsverhaltens.

Zur Einbauratenbestimmung sind nur solche Signale geeignet, die im Falle einer vollstän-
digen (in der Praxis liegt diese bei ca. 99,5 %) Isotopenmarkierung an einer Position eine
vollständige Verschiebung und keine Durchmischung (Scrambling) der Positionen zeigen.
Dies hätte zur Folge, daß den Fragment-Ionen keine eindeutige Abspaltungsposition zuge-
ordnet werden könnte. Gleichzeitig sollten die Signale eine möglichst hohe relative Inten-
sität aufweisen und daher einen hohen dynamischen Bereich bieten. Ausreichende
Signalintensitäten werden für die Ionen **b** (m/z 335), **g** (m/z 319), **d** (m/z 307), **e** (m/z 265),
f (m/z 263), **h** (m/z 245), **c** (m/z 233), m/z 217, **i** (m/z 191), m/z 190, **j** (m/z 189), und bei
 m/z 175 registriert (Abb. 6).

Zur Bestimmung der in den Ionen enthaltenen Positionen der Äpfelsäure (1) wurden die an
allen Kohlenstoffpositionen 1-fach ^{13}C -markierten Äpfelsäuren ($[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$, $[2-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$,
 $[3-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$, $[4-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$), die 2-fach markierte $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ Äpfelsäure ($[1,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$), die 3-fach
markierte $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]$ Äpfelsäure ($[1,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$) sowie die in 2-Position 1-fach und in
3-Position 2-fach deuterierten Äpfelsäuren $[2-\text{D}]\mathbf{1}$ und $[3-\text{D}_2]\mathbf{1}$ eingesetzt.

Bei den Signalverschiebungen (Tab. 1, Anhang Tab. 1) fällt auf, daß die Signale bei m/z
263 und 217 jeweils von mindestens zwei Ionen unterschiedlicher Struktur herrühren müs-
sen, da bei verschiedenen Markierungen nur Teilverschiebungen zu erkennen sind. Anhand
der Verschiebungen im Falle der Isotopenmarkierungen können dem Signal bei m/z 263
klar zwei Ionen unterschiedlicher Struktur zugewiesen werden, die C-Atome aus verschie-
denen Positionen der Äpfelsäure (1) enthalten. Diese werden im folgenden als m/z 263/I
(Ion **f**) und 263/II unterschieden. Beim Signal bei m/z 217 ist aufgrund der Signalintensi-
täten der verschobenen Ionen keine eindeutige Anzahl der Ionen unterschiedlicher Struktur
zu erkennen. Das Signal bei m/z 190 zeigt keine Verschiebung.

Ion	TMS-1	Isotopenmarkierte TMS-Äpfelsäuren							[D ₂₇]TMS-1	
		[1- ¹³ C]1	[2- ¹³ C]1	[3- ¹³ C]1	[4- ¹³ C]1	[1,4- ¹³ C ₂]1	[1,3,4- ¹³ C ₃]1	[2-D]1		[3-D ₂]1
b	335	336	336	336	336	337	338	336	337	359
g	319	320	320	320	320	321	322	320	320	340
d	307	307	308	308	308	308	309	308	309	331
e	265	265	266	265	265	265	265	266	265	289
f	263/1	263	264	264	263	263	264	264	265	287
-	263/II	264	264	264	264	265	266	264	264	278
h	245	246	246	246	246	247	248	246	246	260
c	233	233	234	234	234	234	235	234	235	251
-	217	217/218	218	218	217/218	218	219	217/218	218/219	232
i	191	191	192	191	191	191	191	192	191	209
j	189	189	190	190	189	189	190	190	191	207
-	175	175	176	176	175	175	176	176	177	187

Tab. 1: Verschiebung der Isotopenmuster bei isotopenmarkierten TMS-Äpfelsäuren. Liegen keine eindeutigen Verschiebungen vor, ist das intensivere Signal **fett** gedruckt.

Über die vollständigen Verschiebungen von Ionensignalen, die von isotopenmarkierten Fragment-Ionen stammen (Tab. 1), ist eine Zuordnung von Ionensignal, Fragmentstruktur und Einbauposition in der Äpfelsäure (**1**) möglich (Tab. 2).

Fragment-Ionen	Enthaltene Positionen
b (m/z 335), g (m/z 319), h (m/z 245), m/z 263/II	1, 2, 3, 4
d (m/z 307), c (m/z 233)	2, 3, 4
e (m/z 265), i (m/z 191)	2
f (m/z 263/I), j (m/z 189), m/z 175	2, 3

Tab. 2: Fragment-Ionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-**1**) und in den Fragment-Ionen enthaltene Positionen der Äpfelsäure (**1**).

4.2.2 Isotopenmarkierungen im Derivatisierungsreagenz

Durch die Verwendung von deuteriertem Trimethylsilylierungs-Reagenz ($[D_{18}]BSA$) läßt sich errechnen, wie viele Wasserstoffatome aus den Methylgruppen des Derivatisierungsreagenzes im Fragment enthalten sind. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die Anzahl der noch im Fragment enthaltenen Methylgruppen und Siliziumatome, die aus dem Derivatisierungsreagenz stammen.

Um eine Zuordnung der korrespondierenden Signale in den Spektren der TMS- und $[D_{27}]TMS$ derivatisierten Äpfelsäure zu ermöglichen, wurden auch die Massenspektren aller $[D_{27}]TMS$ derivatisierten ^{13}C - und Deuterium-markierter Äpfelsäuren aufgenommen. Die Zuordnung ist durch die Beobachtung der Synchronität der Signalverschiebungen möglich (Anhang Tab. 2).

4.2.3 Summenformeln der Fragment-Ionen

Über Hochauflösungsmessungen wurden die Summenformeln der gebildeten Fragment-Ionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) ermittelt. Eine Absicherung der Summenformeln fand durch Bestimmung der Ionenmassen der $[D_{27}]$ TMS-Äpfelsäure ($[D_{27}]$ TMS-1) statt.

Die in den Hochauflösungsexperimenten der $[D_{27}]$ TMS-Äpfelsäure ($[D_{27}]$ TMS-1) gefundene Anzahl an Deuteriumatomen stimmt mit den Massenverschiebungen im Massenspektrum der $[D_{27}]$ TMS-Äpfelsäure ($[D_{27}]$ TMS-1) überein.

TMS-1		$[D_{27}]$ TMS-1	
Fragment-Ion	Summenformel	Fragment-Ion bei m/z	Summenformel
b (m/z 335)	$C_{12}H_{27}O_5Si_3$	359	$C_{12}H_3D_{24}O_5Si_3$
g (m/z 319)	$C_{11}H_{23}O_5Si_3$	340	$C_{11}H_2D_{21}O_5Si_3$
d (m/z 307)	$C_{11}H_{27}O_4Si_3$	331	$C_{11}H_3D_{24}O_4Si_3$
e (m/z 265)	$C_9H_{25}O_3Si_3$	289	$C_9HD_{24}O_3Si_3$
f (m/z 263/I)	$C_{10}H_{27}O_2Si_3$	287	$C_{10}H_3D_{24}O_2Si_3$
(m/z 263/II)	-	278	-
h (m/z 245)	$C_9H_{17}O_4Si_2$	260	$C_9H_2D_{15}O_4Si_2$
c (m/z 233)	$C_9H_{21}O_3Si_2$	251	$C_9H_3D_{18}O_3Si_2$
(m/z 217)	$C_8H_{17}O_3Si_2$	232	$C_8H_2D_{15}O_3Si_2$
i (m/z 191)	$C_7H_{19}O_2Si_2$	209	$C_7HD_{18}O_2Si_2$
j (m/z 189)	$C_8H_{21}OSi_2$	207	$C_8H_3D_{18}OSi_2$
(m/z 175)	$C_6H_{15}O_2Si_2$	187	$C_6H_3D_{12}O_2Si_2$

Tab. 3: Summenformelbestimmung der Ionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) über Hochauflösungsmassenspektrometrie.

Für das Ion II bei m/z 263 bzw. 278 konnte keine Summenformel bestimmt werden, die mit den in den Markierungsexperimenten beobachteten Verschiebungen in Einklang steht.

Das Ion bei m/z 217 besteht aus mehreren isomeren Ionen, denen aufgrund ihres unterschiedlichen Verschiebungsverhaltens verschiedene Ionenstrukturen zugewiesen werden müssen (Kap. 7.2.4).

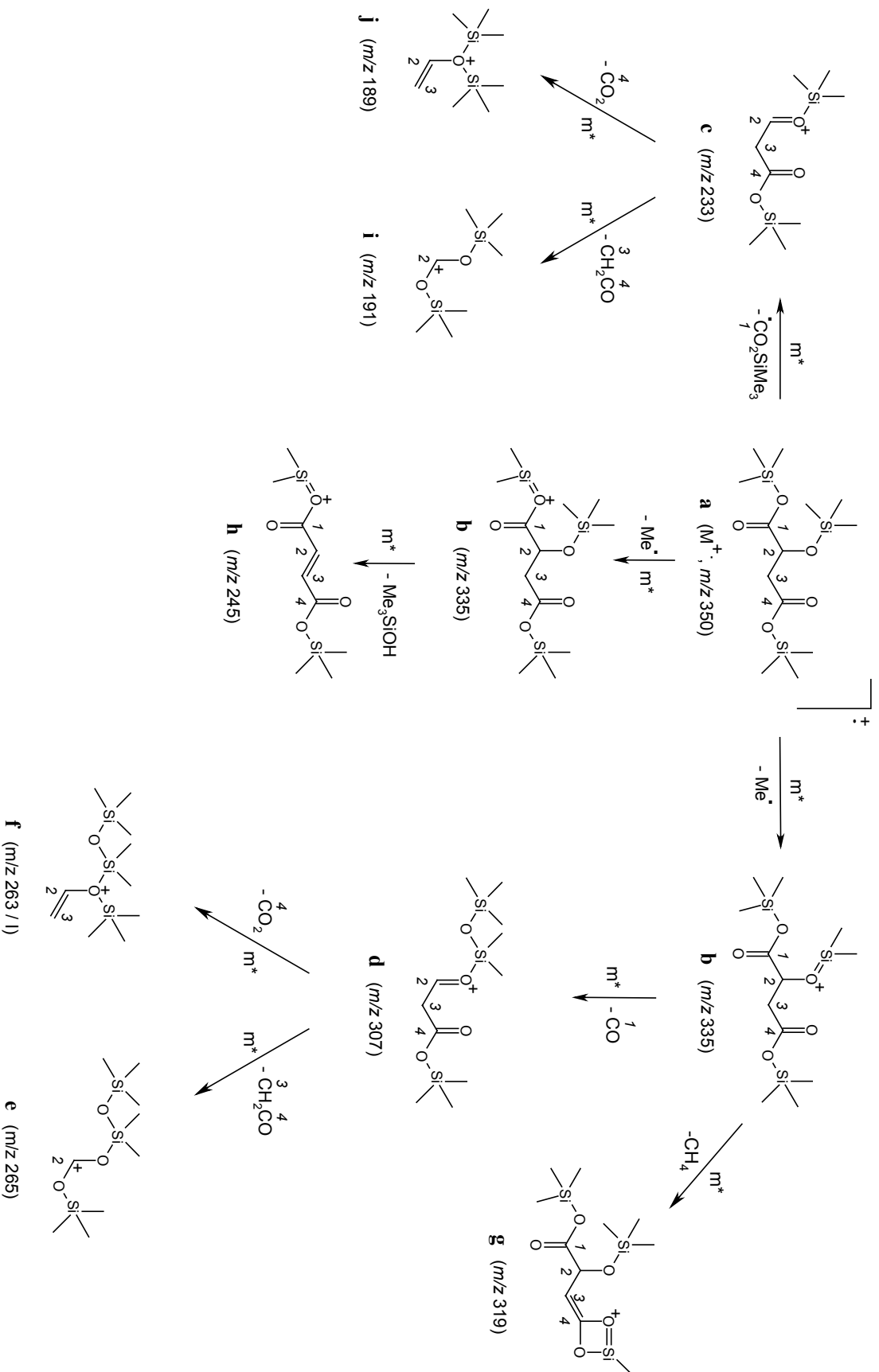
4.2.4 Metastabile Ionen

Zur Erstellung eines Fragmentierungsschemas der TMS-Äpfelsäure (TMS-1), wurden die metastabilen Fragmentierungen der charakteristischen Fragment-Ionen aufgenommen. Während in den B/E-Spektren die Masse der Produkt-Ionen des untersuchten Ions sichtbar wird, sind in den B²/E-Spektren deren Vorläufer-Ionen zu beobachten (Kap. 5, B Experimenteller Teil). Auch hier wurden Linked-Scan-Spektren der [D₂₇]TMS-Äpfelsäure ([D₂₇]TMS-1) zur Verifizierung herangezogen.

4.2.5 Fragmentierungsschema der TMS-Äpfelsäure (TMS-1)

Die beschriebenen massenspektrometrischen Experimente ermöglichen, das Fragmentierungsschema der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) aufzustellen (Schema 6). Die durch Messung metastabiler Ionen in ihren Mutter-Tochter-Beziehungen überprüften Fragmentierungsreaktionen sind mit m* gekennzeichnet. Sie stimmen mit den von Petersson [69] vorgeschlagenen, jedoch nicht von ihm mit Isotopenmarkierungen der Äpfelsäure (**1**) überprüften Fragmentierungsreaktionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) überein. Durch weiterführende Untersuchungen war eine weitreichende Ergänzung des Fragmentierungsschemas möglich. Eine ausführliche mechanistische Diskussion der im Schema aufgeführten sowie zusätzlicher Fragmentierungsreaktionen, die aber für die ¹³C-Einbauratenbestimmung ohne Relevanz sind, ist im Kap. 7 zu finden.

Durch weitere Untersuchungen mit Mischungen von ¹³C-Äpfelsäuren mit unterschiedlichen Markierungspositionen, muß die Eignung der gezeigten Ionen und ihrer Signale zur ¹³C-Einbauratenbestimmung verifiziert werden.



Schema 6: Fragmentierungsschema der TMS-Äpfelsäure (TMS-1).

4.3 Isotopen-Einbauratenbestimmung aus Massenspektren

Die Ionensignale markierter und unmarkierter Substanzen sind stets von weiteren Signalen, den sog. Isotopenpeaks begleitet. Diese führen zu den natürlichen Isotopenmustern der Ionensignale. Die relativen Intensitäten innerhalb des Isotopenmusters hängen von der elementaren Zusammensetzung des betrachteten Ions ab (Abb. 8) [71].

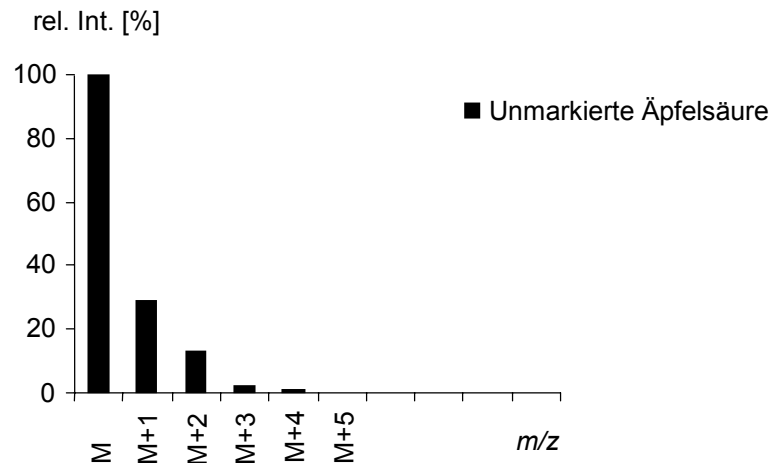


Abb. 8: Theoretisches Isotopenmuster des Ions **b** bei m/z 335 ($M = 335$, Summenformel $C_{12}H_{27}O_5Si_3$) der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1) (Standard).

In einer Mischung unterschiedlich häufig markierter Äpfelsäuren überlagern sich deren Isotopenmuster. Es kommt so zu einer neuen Intensitätsverteilung der Signale eines betrachteten Ions, die von den relativen Konzentrationsanteilen der verschiedenfach markierten Äpfelsäuren abhängt (Abb. 9).

Um aus dieser Intensitätsverteilung der Ionensignale die prozentualen Anteile der einzelnen unterschiedlich häufig markierten Äpfelsäuren zu berechnen, werden die Signalintensitäten um die von der natürlichen Isotopenverteilung der Elemente herrührenden Intensitätsanteile korrigiert. Dies geschieht durch Subtraktion dieser Anteile von den Signalintensitäten. Die korrigierten Peakintensitäten in den Signalen bei M , $M+1$, $M+2$, ..., spiegeln dann die relativen Anteile der verschiedenfach markierten Äpfelsäuren wider (Abb. 10) [72].

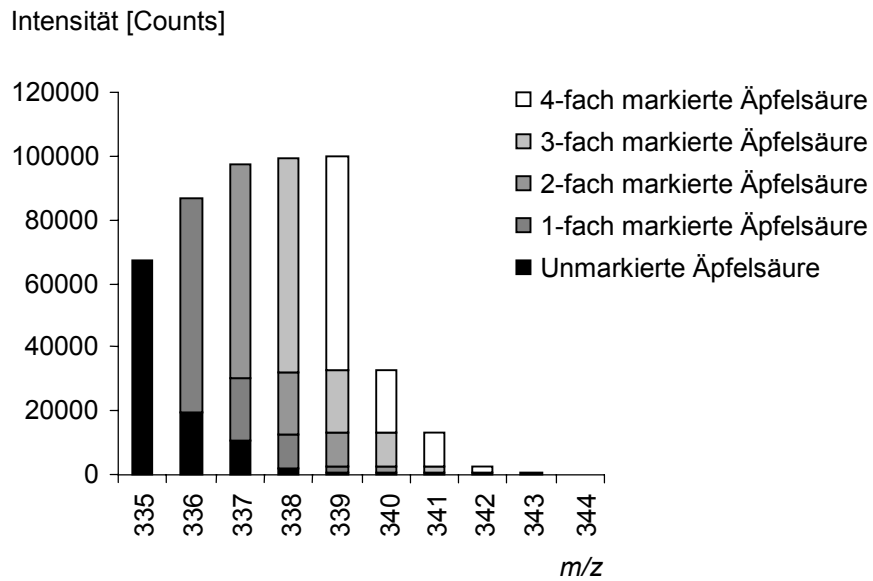


Abb. 9: Intensitätsverteilung des Ions **b** einer Mischung, die 20 % unmarkierte und jeweils 20 % der 1-fach bis 4-fach markierten TMS-Äpfelsäuren enthält.

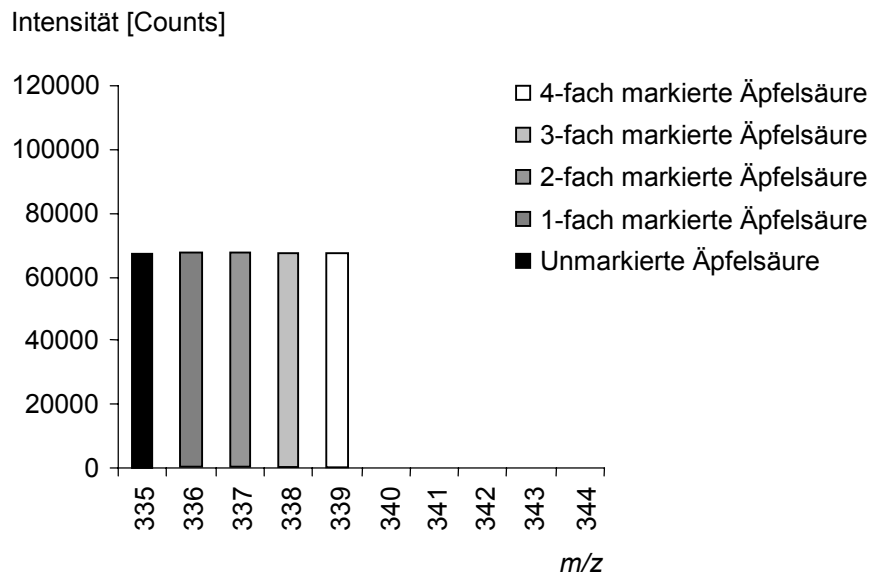


Abb. 10: Korrigierte Intensitätsverteilung des Ions **b** einer Mischung, die 20 % unmarkierte und jeweils 20 % der 1-fach bis 4-fach markierten TMS-Äpfelsäuren enthält.

Folgendes Beispiel soll das Berechnungsverfahren erläutern:

Eine Probe markierter Äpfelsäuren enthält 20 % unmarkierte Äpfelsäure sowie jeweils 20 % 1-fach, 2-fach, 3-fach und 4-fach markierte Äpfelsäure.

Die unmarkierte TMS-Äpfelsäure (TMS-1) hat im zur Bestimmung der Gesamteinbaurate herangezogenen Isotopenmuster des Ions **b** die in Tab. 4 und Abb. 8 gezeigte relative natürliche Intensitätsverteilung der Isotopenpeaks.

	M	M+1	M+2	M+3	M+4
<i>m/z</i>	335	336	337	338	339
rel. Intensität	100,00	29,05	15,47	3,12	0,81

Tab. 4: Relative Intensitäten des Isotopenmusters von Ion **b** der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1).

Die markierte Probe zeigt im Isotopenmuster die in Tab. 5 und Abb. 9 dargestellten Intensitäten.

	M	M+1	M+2	M+3	M+4
<i>m/z</i>	335	336	337	338	339
Intensität	67360	86920	97340	99440	99980

Tab. 5: Intensitäten [Counts] des Ions **b** einer markierten Probe mit 20 % unmarkierter Äpfelsäure sowie jeweils 20 % der 1-fach bis 4-fach markierten Äpfelsäuren.

Da die markierte Spezies mindestens eine um 1 u höhere Masse besitzt, stammt die Intensität des Signals bei $m/z = M$ gänzlich von der unmarkierten Spezies. Ausgehend von der Intensität bei $m/z = M$ und der bekannten relativen Intensitäten (Tab. 4), läßt sich der Intensitätsanteil in Counts berechnen, der in den Isotopenpeaks von der natürlichen Isotopenverteilung der unmarkierten Substanz stammt.

Dieser ergibt sich für die einzelnen Massen zu:

$$\begin{array}{lll}
 \text{M} & 67360 \cdot 1 & = 67360 \\
 \text{M+1} & 67360 \cdot 0,2905 & = 19568,1 \\
 \text{M+2} & 67360 \cdot 0,1547 & = 10420,6 \\
 \text{M+3} & 67360 \cdot 0,0312 & = 2101,6 \\
 \text{M+4} & 67360 \cdot 0,0081 & = 545,6
 \end{array}$$

Subtrahiert man diesen Intensitätsanteil (Int. von PR0) von den Gesamtintensitäten der markierten Probe, erhält man die ausschließlich von den markierten Molekülen stammenden Intensitäten (Korr. Int.) (Tab. 6).

	M	M+1	M+2	M+3	M+4
<i>m/z</i>	335	336	337	338	339
Intensität	67360	86920	97340	99440	99899
Int. von PR0	- 67360	- 19568,1	- 10420,6	- 2101,6	- 545,6
Korr. Int.	0,00	67687,9	87256,4	97676,4	99692,4

Tab. 6: Intensitäten, die ausschließlich von den markierten Molekülen stammen.

In gleicher Weise subtrahiert man auch die von der natürlichen Isotopenverteilung der markierten Substanzen rührenden Intensitätsanteile. Daraus ergeben sich die ausschließlich von synthetischer bzw. biologischer Markierung stammenden Intensitäten der markierten Äpfelsäuren (Abb. 10).

Aus der Summe aller korrigierten Intensitäten berechnen sich die relativen Konzentrationsanteile der unterschiedlich markierten Äpfelsäuren:

$$67360 + 67351,9 + 67353,7 + 67352,85 + 67266,38 = 336684,83$$

$$\text{PR0fach} = 20,00 \%$$

$$\text{PR1fach} = 20,00 \%$$

$$\text{PR2fach} = 20,00 \%$$

$$\text{PR3fach} = 20,00 \%$$

$$\text{PR4fach} = 20,00 \%$$

In der Praxis wird die Einbauratenberechnung über Massenspektren so durchgeführt, daß zuerst in einer Referenzmessung der unmarkierten Probe die relative natürliche Isotopenverteilung des gewählten Fragment-Ions bestimmt wird. Untergrundsignale der biologischen Matrix und auch weitere Fragment-Ionen schwacher Intensität, die mit dem Isotopenmuster überlagern, werden so berücksichtigt. Die gemessenen und auf 100 % normierten relativen Intensitäten der Isotopensignale werden über mehrere Scans im

GC-Lauf (in der Praxis ca. 10 Scans) gemittelt. Schwankungen der relativen Intensitäten über den GC-Peak werden so ausgeglichen. Die Einbaurate berechnet sich als arithmetisches Mittel der in den einzelnen Scans der markierten Probe gefundenen Einbauraten. Die Standardabweichung (STAW) dient als Maß für die Unsicherheit, der so bestimmten Einbauraten [11]. Die Auswertung läßt sich weitestgehend über eine entsprechende Software automatisieren (Kap. 9).

4.3.1 Das Massenspektrum zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung in Äpfelsäure (1)

Folgende Ionen im Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) bieten ein genügend hohes Signal-Rausch-Verhältnis und zeigen im Falle einer Isotopenmarkierung eindeutige Massenverschiebungen:

b (m/z 335), **g** (m/z 319), **d** (m/z 307), **e** (m/z 265), **f** (m/z 263), 263/II, **h** (m/z 245),
c (m/z 233), **i** (m/z 191), **j** (m/z 189), m/z 175.

Hierbei überschneiden sich die Isotopenmuster der Ionen **j** (m/z 189), m/z 190 und **i** (m/z 191) sowie **f** (m/z 263) und **e** (m/z 265). Wie schon erwähnt, wird das Signal bei m/z 263 zudem von zwei Ionen verschiedener Struktur hervorgerufen, die bei Isotopenmarkierungen der Äpfelsäure (1) ein unterschiedliches Verschiebungsverhalten zeigen (**f** und m/z 263/II). Die Isotopensignale des Ions bei m/z 175 werden durch den Peak eines Ions mit unbekannter Zusammensetzung bei m/z 177 gestört (Abb. 6). Da die Intensitäten der Isotopensignale zur Berechnung der Einbauraten herangezogen werden müssen, sind diese Ionen zur Bestimmung der Einbauraten nicht verwendbar. Weitere Untersuchungen zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung werden daher nur für folgende Ionen durchgeführt:

b (m/z 335), **g** (m/z 319), **d** (m/z 307), **h** (m/z 245), **c** (m/z 233).

4.3.2 Untersuchung verschiedener Mischungen

Um die Eignung der ausgewählten Ionensignale zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung zu prüfen, wurden Mischungen im Konzentrationsverhältnis von 50/50 der positionsspezifisch ^{13}C -markierten Äpfelsäuren und der unmarkierten Äpfelsäure (**1**) (Mischung A bis Mischung F) sowie mit dem zu erwartenden relativen Konzentrationsanteilen der biologischen Proben [73] (Mischung G bis Mischung K) untersucht (Tab. 7). Die Äpfelsäure-Gesamtkonzentration aller Mischungen lag ebenfalls im Bereich der für biologische Proben zu erwartenden Gesamtkonzentration (200 mg/l).

Mischung	1	[1- ^{13}C] 1	[2- ^{13}C] 1	[3- ^{13}C] 1	[4- ^{13}C] 1	[1,4- $^{13}\text{C}_2$] 1	[1,3,4- $^{13}\text{C}_3$] 1
A	50,0	50,0	-	-	-	-	-
B	50,0	-	50,0	-	-	-	-
C	50,0	-	-	50,0	-	-	-
D	50,0	-	-	-	50,0	-	-
E	50,0	-	-	-	-	50,0	-
F	50,0	-	-	-	-	-	50,0
G	80,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-
H	90,0	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-
I	95,0	1,25	1,25	1,25	1,25	-	-
J	75,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-
K	65,0	11,0	2,0	2,0	11,0	7,0	2,0

Tab. 7: Konzentrationsanteile [%] untersuchter Mischungen unmarkierter und ^{13}C -markierter Äpfelsäuren.

Der in den 50/50-Mischungen (Tab. 8 bis Tab. 11 und Anhang Tab. 3 bis Tab. 14) gefundene absolute Fehler bei der ^{13}C -Einbauratenbestimmung [72] liegt für die einzelnen Ionensignale bei maximal 2,5 %. Eine Ausnahme bilden die über Ion **d** (m/z 307) sowie bei Mischung F die über **b** bestimmten ^{13}C -Einbauraten. Diese zeigen Abweichungen von bis zu 5,7 %. Die gemittelten ^{13}C -Gesamteinbauraten der Ionen **b** (m/z 335), **g** (m/z 319) und **h** (m/z 245) zeigen Abweichungen von maximal 1,7 %. Die gemittelten Einbauraten über **d** (m/z 307) und **c** (m/z 233) zeigen bedingt durch die Abweichungen bei **d** etwas größere absolute Fehler im Bereich von 2,5 % und maximal 4,9 % für Mischung F. Die Standardabweichungen liegen bei höchsten 5,2 %.

Die absoluten Abweichungen bei den Mischungen mit ähnlicher Zusammensetzung wie die biologischen Proben (Mischung G bis K, Tab. 12 bis Tab. 15, Anhang Tab. 15 bis 23) liegen für die über **b** (m/z 335), **g** (m/z 319) und **h** (m/z 245) sowie **d** (m/z 307) und **c** (m/z 233) gemittelten ^{13}C -Einbauraten unter 1,0 %. Die absoluten Fehler für die einzelnen Ionen liegen unter 2,3 %.

Markierung	Fragment-Ionen mit 1,2,3,4-Position								
	b (m/z 335)		g (m/z 319)		h (m/z 245)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	50,1	(4,4)	49,4	(3,5)	51,1	(3,5)	50,2	50,0	0,2
1-fach	49,6	(3,8)	49,2	(4,3)	48,7	(3,9)	49,2	50,0	0,8
2-fach	-0,5	(1,1)	1,0	(3,4)	-0,4	(2,8)	0,0	0,0	0,0
3-fach	0,6	(1,9)	0,9	(2,1)	0,2	(1,3)	0,6	0,0	0,6
4-fach	0,2	(1,0)	-0,4	(1,2)	0,2	(1,0)	0,0	0,0	0,0

Tab. 8: Mischung A, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ^{13}C -Einbauraten der Fragment-Ionen **b**, **g** und **h**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Markierung	Fragment-Ionen mit 2,3,4-Position						
	d (m/z 307)		c (m/z 233)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	100,2	(3,3)	99,5	(1,6)	99,9	100,0	0,1
1-fach	-0,2	(2,4)	0,6	(1,1)	0,2	0,0	0,2
2-fach	-0,3	(2,6)	-0,6	(1,5)	-0,4	0,0	0,4
3-fach	0,3	(0,6)	0,5	(0,8)	0,4	0,0	0,4

Tab. 9: Mischung A, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ^{13}C -Einbauraten der Fragment-Ionen **d** und **c**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Markierung	Fragment-Ionen mit 1,2,3,4-Position								
	b (m/z 335)		g (m/z 319)		h (m/z 245)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	51,8	(3,7)	52,5	(3,9)	48,8	(4,2)	51,0	50,0	1,0
1-fach	49,5	(3,3)	51,5	(3,4)	52,7	(3,9)	51,2	50,0	1,2
2-fach	-1,7	(1,0)	-2,1	(1,7)	-0,4	(0,9)	-1,4	0,0	1,4
3-fach	0,5	(0,3)	-2,5	(1,6)	-1,3	(0,8)	-1,1	0,0	1,1
4-fach	-0,1	(0,5)	0,6	(0,6)	0,2	(0,3)	0,3	0,0	0,3

Tab. 10: Mischung B, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ^{13}C -Einbauraten der Fragment-Ionen **b**, **g** und **h**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Mar- kierung	Fragment-Ionen mit 2,3,4-Position						
	d (<i>m/z</i> 307)		c (<i>m/z</i> 233)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	54,2	(4,1)	50,6	(3,9)	52,4	50,0	2,4
1-fach	46,7	(3,7)	51,0	(3,5)	48,8	50,0	1,2
2-fach	-1,2	(1,5)	-1,6	(1,4)	-1,4	0,0	1,4
3-fach	0,4	(1,3)	0,0	(1,2)	0,2	0,0	0,2

Tab. 11: Mischung B, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ¹³C-Einbauraten der Fragment-Ionen **d** und **c**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Mar- kierung	Fragment-Ionen mit 1,2,3,4-Position								
	b (<i>m/z</i> 335)		g (<i>m/z</i> 319)		h (<i>m/z</i> 245)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	93,9	(2,5)	93,1	(3,1)	95,5	(2,0)	94,2	95,0	0,8
1-fach	6,4	(2,3)	5,6	(2,9)	4,4	(2,1)	5,5	5,0	0,5
2-fach	-0,4	(1,7)	1,2	(2,6)	-0,2	(0,9)	0,2	0,0	0,2
3-fach	0,3	(0,5)	0,0	(1,2)	0,4	(0,8)	0,2	0,0	0,2
4-fach	-0,2	(0,2)	0,1	(0,5)	-0,2	(0,2)	-0,1	0,0	0,1

Tab. 12: Mischung I, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ¹³C-Einbauraten der Fragment-Ionen **b**, **g** und **h**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Mar- kierung	Fragment-Ionen mit 2,3,4-Position						
	d (<i>m/z</i> 307)		c (<i>m/z</i> 233)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	96,5	(2,7)	96,4	(2,5)	96,5	96,25	0,2
1-fach	4,2	(2,0)	3,4	(1,7)	3,8	3,75	0,0
2-fach	-0,7	(1,3)	-0,1	(1,0)	-0,4	0,0	0,4
3-fach	-0,1	(0,4)	0,4	(0,3)	0,1	0,0	0,1

Tab. 13: Mischung I, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ¹³C-Einbauraten der Fragment-Ionen **d** und **c**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Mar- kierung	Fragment-Ionen mit 1,2,3,4-Position								
	b (<i>m/z</i> 335)		g (<i>m/z</i> 319)		h (<i>m/z</i> 245)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	76,7	(3,4)	73,4	(3,5)	74,9	(4,6)	75,0	75,0	0,0
1-fach	19,6	(3,2)	21,9	(3,3)	21,0	(3,5)	20,8	20,0	0,8
2-fach	4,3	(2,8)	5,1	(3,5)	4,3	(1,6)	4,6	5,0	0,4
3-fach	-0,5	(1,2)	0,0	(1,9)	0,0	(1,0)	-0,2	0,0	0,2
4-fach	0,0	(0,7)	-0,4	(1,1)	-0,3	(0,5)	-0,2	0,0	0,2

Tab. 14: Mischung J, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ¹³C-Einbauraten der Fragment-Ionen **b**, **g** und **h**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Mar- kierung	Fragment-Ionen mit 2,3,4-Position						
	d (<i>m/z</i> 307)		c (<i>m/z</i> 233)		Mittel	Theor.	Fehler
Unmark.	79,4	(3,1)	80,4	(2,8)	79,9	80,0	0,1
1-fach	20,8	(2,9)	19,3	(1,7)	20,0	20,0	0,0
2-fach	0,1	(1,3)	0,0	(1,3)	0,1	0,0	0,1
3-fach	-0,2	(0,5)	0,3	(1,3)	0,0	0,0	0,0

Tab. 15: Mischung J, gemessene (STAW in Klammern) und theoretische ¹³C-Einbauraten der Fragment-Ionen **d** und **c**, deren arithmetisches Mittel und absoluter Fehler [%].

Die Abweichungen von bis zu 5,7 % bei der Einbauratenbestimmung über die Signale der Ionen **b** und **d** sind auf vorgelagerte Signale bei *m/z* 305 und 306 bzw. *m/z* 334 und 333 zurückzuführen. Diese verschieben sich im Falle einer Markierung in gleicher Weise wie das zur Einbauratenbestimmung herangezogene Isotopenmuster. Sie addieren sich so zu den Signalen der weniger markierten Äpfelsäuren (Abb. 11). Dadurch erhöht eine *s*-fach markierte TMS-Äpfelsäure die Signale der (*s*-1)- bzw. (*s*-2)-fach markierten Säuren und täuscht eine überhöhte Konzentration dieser Säuren vor.

Nachbarsignale mit niedrigeren Massen treten auch bei den Ionen **g** (*m/z* 319), **h** (*m/z* 245) und **c** (*m/z* 233) auf, sind jedoch dort vernachlässigbar gering und führen zu keinen signifikanten Fehlern bei der Einbauratenberechnung.

Der durch vorgelagerte Signale entstehende Fehler kann vorausberechnet werden, indem die Signalintensitäten der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1) für diese Isotopenmuster mit einem entsprechenden Intensitätsfaktor um ein oder zwei *u* zur höheren Masse verschoben werden und mit den unverschobenen für jeden *m/z*-Wert addiert

werden (Abb. 11). Durch Bestimmung der Einbauraten im bekannten Verfahren [72] erhält man die zu erwartenden Einbauraten und Abweichungen zum eingesetzten Mischungsverhältnis.

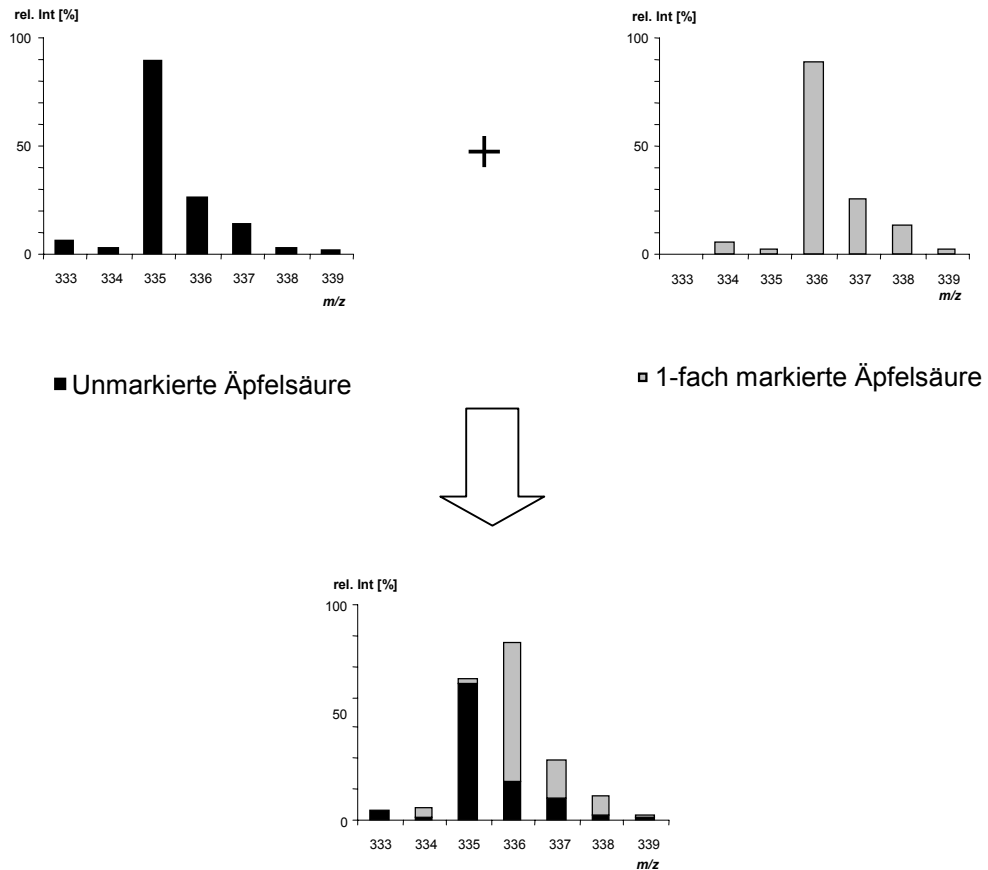


Abb. 11: Überlagerung der Isotopenmuster und der vorgelagerten Peaks des Ions **b** bei m/z 335 im Falle einer 50/50-Mischung von unmarkierter und 1-fach markierter Äpfelsäure.

Der zu erwartende Fehler ist abhängig von der relativen Konzentration markierter Äpfelsäure und ist um so kleiner, je weniger markierte Äpfelsäure in der Mischung zu finden ist. Für eine Mischung aus 50 % unmarkierter und 50 % $[2-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[2-^{13}\text{C}]1$) erhält man daher eine vorausberechnete Einbaurate von 50,8/49,2 (Unmarkiert / 1-fach markiert) bei Ion **b** (m/z 335) und 54,1/46,1 bei Ion **d** (m/z 307). Die vorausberechneten Abweichungen fallen für Mischung G jedoch geringer aus. Man erhält hier für die Einbauratenbestimmung über **b** (m/z 335) 80,2/19,8 und **d** (m/z 307) 85,8/14,2. Die aufgrund der vorgelagerten Signale entstehenden berechneten und gemessenen Fehler stimmen gut überein.

Da aus Voruntersuchungen bekannt ist, daß die Äpfelsäure in biologischen Proben zu ca. 5 % bis 40 % 1-fach markiert ist und die ^{13}C -Einbaurate zu den mehrfach markierten Äpfelsäuren stark abfällt [73], ist der Fehler, der durch die vorgelagerten Peaks entsteht, vernachlässigbar. Er berechnet sich zu unter 1,0 % absolut am höchsten bei **b** (m/z 335). Die Einzelergebnisse für die Ionen **b**, **g** und **h** werden zudem gemittelt. Der Fehler, der bei der Bestimmung der Einbauraten über **d** (m/z 307) auftritt, hängt vom Anteil in 1-Position markierter bzw. nicht in 1-Position markierter Äpfelsäuren ab. Für biologische Proben mit ähnlicher Zusammensetzung wie Mischung G liegt er bei ca. 1 % (siehe auch Kap. 4.3.3). Die über Ion **d** erhaltenen Ergebnisse werden mit den über Ion **c** erhaltenen Ergebnissen gemittelt, wodurch der Fehler nochmals verringert wird.

Durch Isotopeneffekte [40, 74 - 77] kann es zu Änderungen der Signalintensitäten im Massenspektrum kommen, da die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten beim unimolekularen Zerfall unterschiedlich sein können. Man spricht dann von kinetischen Isotopeneffekten [75]. Meßbare Isotopeneffekte werden meist nur beim Austausch von ^1H (H) gegen ^2H (D) gefunden, da die Auswirkungen der unterschiedlichen Massen der Isotope bei den Elementen C, N, O verglichen mit H zu D sehr gering sind [74]. Die guten Ergebnisse der ^{13}C -Einbauratenbestimmung der Mischungen A bis K zeigen, daß im Bereich der verfügbaren Meßgenauigkeit keine Isotopeneffekte bei der Bildung der herangezogenen Ionen gefunden werden.

Da die zur genaueren Untersuchung ausgewählten Signale in den Massenspektren der zu annähernd 100 % positionsspezifisch ^{13}C -markierten Äpfelsäuren eindeutige Verschiebungen zeigen (Tab. 1), kann, wie zu erwarten, keine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch Scrambling festgestellt werden.

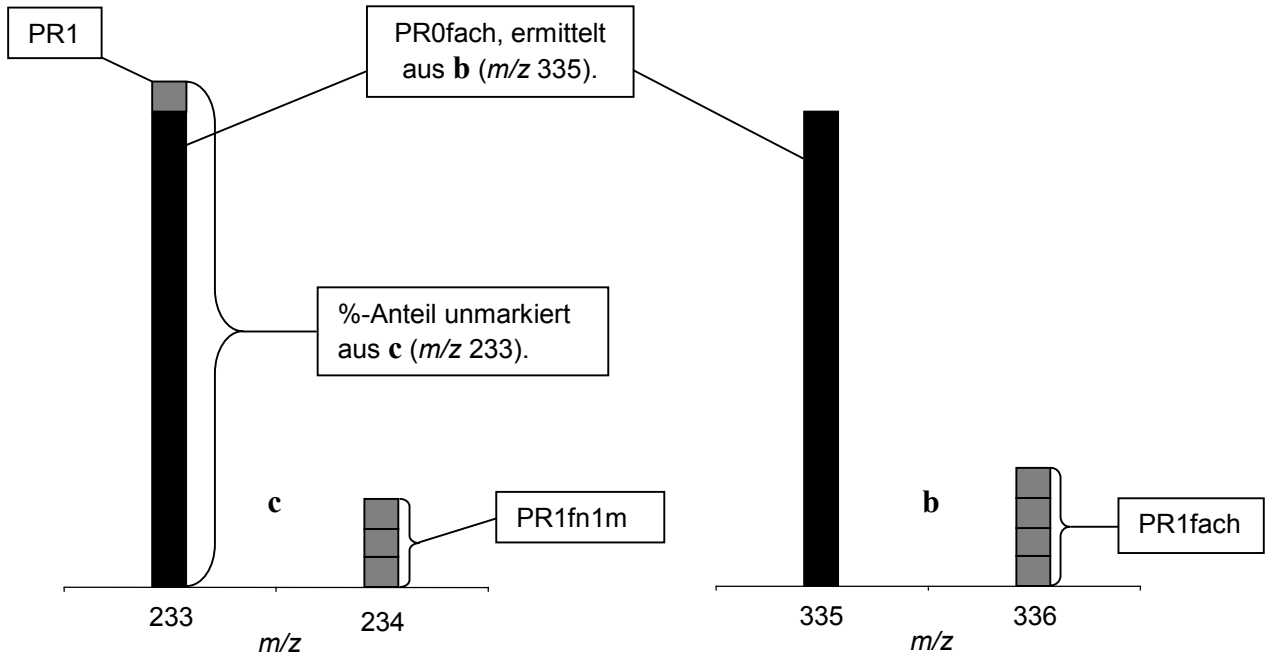
Durch die Auswahl von Mischungen, die von 50 % Einbaurate bis in die für biologische Proben zu erwartenden ^{13}C -Einbauraten reichen, ist die Linearität von Konzentration, gemessenen Signalintensitäten und berechneten Einbauraten für Gesamtkonzentrationen von 200 mg/l bestätigt. Durch Verdünnung der biologischen Proben oder Änderung der Injektionsvolumens kann gewährleistet werden, daß der Totalionenstrom des GC-Peaks der TMS-Äpfelsäure im gleichen Intensitätsbereich liegt.

Die erhaltenen Einbauraten bestätigen deutlich, daß die Isotopenmuster der Ionen **b** (m/z 335), **g** (m/z 319), **h** (m/z 245) und **c** (m/z 233) zur Bestimmung von ^{13}C -Einbauraten in biologischen Proben herangezogen werden können. Prinzipiell ist auch die Nutzung von **d** (m/z 307) möglich, allerdings sollten bei der Bewertung der Ergebnisse im Falle hoher ^{13}C -Einbauraten Fehler von ca. 4 % berücksichtigt werden.

4.3.3 Berechnung positionsspezifischer Konzentrationsanteile

Aus den ^{13}C -Einbauratenberechnungen für die 1,2,3,4-Position (**b**, **g**, **h**) und die 2,3,4-Position (**d**, **e**) lassen sich durch Differenzbildung die positionsspezifischen Konzentrationsanteile in 1-Position markierter und nicht in 1-Position markierter ^{13}C -Äpfelsäuren bestimmen.

Die s -fach ^{13}C -markierten Äpfelsäuren, die in 1-Position markiert sind, erscheinen in den Isotopenmustern von **c** $(s-1)$ -fach markiert (Schema 7). Für eine Äpfelsäuremischung, die zu 80 % aus unmarkierter und zu jeweils 5 % aus den vier 1-fach markierten Äpfelsäuren besteht, errechnet sich anhand des Isotopenmusters von **b** (m/z 335) eine Gesamteinbaurate von 80 % PR0fach, und 20 % PR1fach. Bei der Auswertung von **c** (m/z 233) erhält man Einbauraten von 85 % unmarkierter Äpfelsäure und 15 % 1-fach markierter Äpfelsäure, da die ursprünglich in 1-Position markierte $[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ nun unmarkiert erscheint. Aus der Differenz der in **c** und **b** als unmarkiert registrierten Äpfelsäuren ergibt sich der Anteil 1-fach markierter Äpfelsäuren, die in 1-Position markiert (PR1f1m = PR1) bzw. nicht markiert (PR1fn1m) sind (Schema 7, Gl. 1, Gl. 2, Gl. 3).



Schema 7: Korrigierte Signalintensitäten (d. h. ohne durch natürliche Isotopenverteilung hervorgerufene Isotopenpeaks) einer Äpfelsäuremischung der Zusammensetzung: 80 % unmarkierte, jeweils 5 % der vier 1-fach markierten Äpfelsäuren.

PR1 = %-Anteil unmarkiert aus **c** (m/z 233) – PR0fach, ermittelt aus **b** (m/z 335)

$$\text{PR1fn1m} = \text{PR1fach} - \text{PR1} \quad \text{Gl. 1}$$

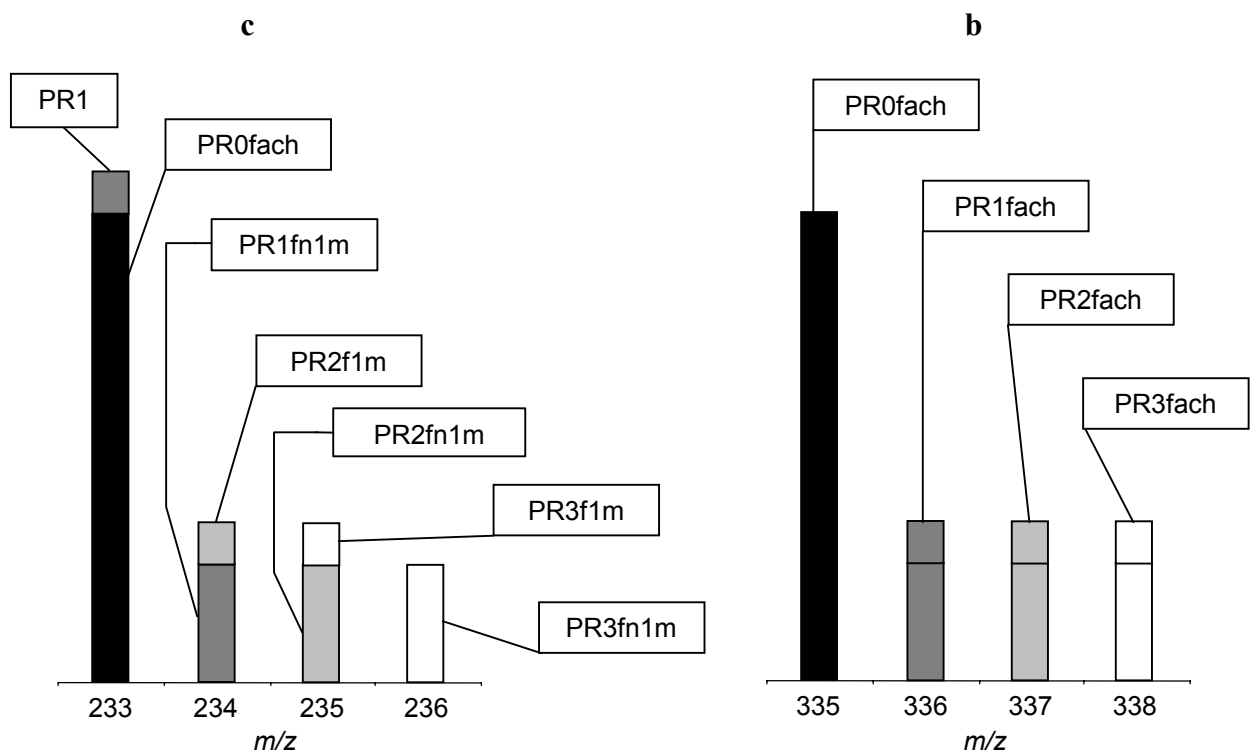
In gleicher Weise läßt sich auch für die mehrfach ^{13}C -markierten Äpfelsäuren der jeweilige Anteil berechnen, der in 1-Position markiert bzw. nicht markiert ist (Schema 8):

$$\text{PR2f1m} = \text{%-Anteil 1-fach markiert aus c (m/z 233)} - \text{PR1fn1m}$$

$$\text{PR2fn1m} = \text{PR2fach} - \text{PR2f1m} \quad \text{Gl. 2}$$

$$\text{PR3f1m} = \text{%-Anteil 2-fach markiert aus c (m/z 233)} - \text{PR2fn1m}$$

$$\text{PR3fn1m} = \text{PR234} = \text{PR3fach} - \text{PR3f1m} \quad \text{Gl. 3}$$



Schema 8: Korrigierte Signalintensitäten (d. h. ohne durch natürliche Isotopenverteilung hervorgerufene Isotopenpeaks) einer Äpfelsäuremischung unterschiedlich häufig markierter Äpfelsäuren.

Folgende Konzentrationsanteile ^{13}C -markierter Äpfelsäuren können somit aus den Massenspektren bestimmt werden:

PR1fach, PR1f1m, PR1fn1m
 PR2fach, PR2f1m, PR2fn1m
 PR3fach, PR3f1m, PR3fn1m
 PR4fach.

Wird die Berechnung der genannten Konzentrationsanteile mit den für die Signale der Ionen **b**, **g**, **h** sowie **d** und **c** gemittelten Einbauraten (Tab. 8 bis Tab. 15 und Anhang Tab. 3 bis 23) durchgeführt, liegen die maximalen absoluten Abweichungen der gemessenen von den theoretischen Konzentrationsanteilen für die Mischungen A bis F bei 3,3 %, für die Mischungen G bis K unter 1,2 % (Tab. 16 bis Tab. 19 und Anhang Tab. 5 bis 23).

%-Anteile ^{13}C -markierter Äpfelsäuren	Gemessen	Theor.	Fehler
1-fach und in 1-Position markiert (PR1f1m = PR1)	49,7	50,0	0,3
1-fach und nicht in 1-Position markiert (PR1fn1m)	-0,5	0,0	0,5
2-fach und in 1-Position markiert (PR2f1m)	0,7	0,0	0,7
2-fach und nicht in 1-Position markiert (PR2fn1m)	-0,6	0,0	0,6
3-fach und in 1-Position markiert (PR3f1m)	0,2	0,0	0,2
3-fach und nicht in 1-Position markiert (PR3fn1m)	0,4	0,0	0,4

Tab. 16: Mischung A, berechnete prozentuale Anteile der in 1-Position markierten bzw. in 1-Position nicht markierten Äpfelsäuren.

%-Anteile ^{13}C -markierter Äpfelsäuren	Gemessen	Theor.	Fehler
1-fach und in 1-Position markiert (PR1f1m = PR1)	-1,4	0,0	1,4
1-fach und nicht in 1-Position markiert (PR1fn1m)	49,9	50,0	0,1
2-fach und in 1-Position markiert (PR2f1m)	-1,0	0,0	1,0
2-fach und nicht in 1-Position markiert (PR2fn1m)	-0,4	0,0	0,4
3-fach und in 1-Position markiert (PR3f1m)	-1,0	0,0	1,0
3-fach und nicht in 1-Position markiert (PR3fn1m)	-0,1	0,0	0,1

Tab. 17: Mischung B, berechnete prozentuale Anteile der in 1-Position markierten bzw. in 1-Position nicht markierten Äpfelsäuren.

%-Anteile ^{13}C -markierter Äpfelsäuren	Gemessen	Theor.	Fehler
1-fach und in 1-Position markiert (PR1f1m = PR1)	2,3	1,25	1,1
1-fach und nicht in 1-Position markiert (PR1fn1m)	3,2	3,75	0,6
2-fach und in 1-Position markiert (PR2f1m)	0,6	0,0	0,6
2-fach und nicht in 1-Position markiert (PR2fn1m)	-0,4	0,0	0,4
3-fach und in 1-Position markiert (PR3f1m)	0,0	0,0	0,0
3-fach und nicht in 1-Position markiert (PR3fn1m)	0,2	0,0	0,2

Tab. 18: Mischung I, berechnete prozentuale Anteile der in 1-Position markierten bzw. in 1-Position nicht markierten Äpfelsäuren.

%-Anteile ^{13}C -markierter Äpfelsäuren	Gemessen	Theor.	Fehler
1-fach und in 1-Position markiert (PR1f1m = PR1)	4,9	5,0	0,1
1-fach und nicht in 1-Position markiert (PR1fn1m)	16,0	15,0	1,0
2-fach und in 1-Position markiert (PR2f1m)	4,0	5,0	1,0
2-fach und nicht in 1-Position markiert (PR2fn1m)	0,5	0,0	0,5
3-fach und in 1-Position markiert (PR3f1m)	-,05	0,0	0,5
3-fach und nicht in 1-Position markiert (PR3fn1m)	0,3	0,0	0,3

Tab. 19: Mischung J, berechnete prozentuale Anteile der in 1-Position markierten bzw. in 1-Position nicht markierten Äpfelsäuren.

4.3.4 Ergebnisse zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung aus Massenspektren

Die Gesamteinbaurate ^{13}C -markierter Äpfelsäure über alle vier Kohlenstoffpositionen läßt sich anhand der Isotopenmuster der Ionen **b** (m/z 335), **g** (m/z 319) und **h** (m/z 245) aus dem Massenspektrum des TMS-Derivates der Äpfelsäure (TMS-1) bestimmen. Die Bestimmung der ^{13}C -Gesamteinbaurate über die Positionen 2, 3 und 4 ist mit den Ionen **d** (m/z 307) und **c** (m/z 233) möglich. Die maximale, bei den fünf Ionen gemessene Standardabweichung, liegt bei 5,2 %. Für die hier verwendeten Äpfelsäure-Mischungen mit ähnlicher Zusammensetzung wie die biologischen Proben liegt der absolute Fehler der gemittelten Einbauraten unter 1,0 %.

Die relativen Konzentrationsanteile der in 1-Position markierten bzw. nicht markierten 1-fach, 2-fach und 3-fach markierten Äpfelsäuren können durch Differenzbildung der in Position 1 bis 4 gefundenen, mit den in Position 2 bis 4 gefundenen Gesamteinbauraten berechnet werden. Der absolute Fehler der durch Differenzbildung berechneten Konzentrationsanteile liegt für hier verwendete Mischungen mit ähnlichen Konzentrationsanteilen wie die zu erwartenden biologischen Proben unter 1,2 %.

Die Fehler, die durch benachbarte Signale bei M-1 und M-2 entstehen, sind bei diesem Konzentrationsbereich vernachlässigbar klein. Störende Einflüsse durch Scrambling oder Isotopeneffekte werden nicht festgestellt. Durch die Auswahl von Mischungen, die von 50 % Gesamteinbaurate bis in den für die biologischen Proben zu erwartenden Markierungsgrad von 5 % bis 40 % reichen, ist die Linearität von Konzentration, gemessenen Signalintensitäten und ermittelten Einbauraten für Gesamtkonzentrationen von 200 mg/l Äpfelsäure bestätigt.

Weitere geeignete Ionen bzw. Ionensignale, die die Bestimmung der Einbauraten in 2-, 3- oder 4-Position erlauben und damit eine weitergehende Berechnung der Konzentrationsanteile der einzelnen 1-fach und mehrfach markierten Äpfelsäuren, sind im Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) nicht vorhanden. Es ist daher keine positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung für die 2-, 3- und 4-Position möglich.

4.4 Tandem-Massenspektrometrie zur Bestimmung der positionsspezifischen ^{13}C -Einbauraten in Äpfelsäure (1)

Die in der Ionenquelle erzeugten Fragment-Ionen der verschiedenen isotopenmarkierten Äpfelsäuren erfahren eine von der Anzahl der im Fragment enthaltenen schwereren Isotope abhängige Massenverschiebung. Durch Isolierung und stoßinduzierte Fragmentierung isobarer Vorläufer-Ionen aus diesen Isotopomeren entstehen Produkt-Ionen, die ihrerseits, je nach den noch enthaltenen Positionen der Äpfelsäure (1), im Produkt-Ionen-Spektrum verschoben sind. In den Intensitätsverhältnissen der isotopomeren Produkt-Ionen spiegeln sich die Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Vorläufer-Ionen gleicher Markierungsanzahl wider.

Durch entsprechende Auswahl der Vorläufer-Ionen bzw. der Intensitätsverhältnisse von Produkt-Ionen, die von Ionen unterschiedlicher Markierungsposition gebildet werden, sollten über ein Gleichungssystem die relativen Konzentrationsanteile der Äpfelsäuren gleicher Markierungsanzahl bestimmt werden können.

Die Vorteile einer solchen Methode liegen auf der Hand: Durch gezielte Auswahl der Vorläufer-Ionen innerhalb des Isotopenmusters können die Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen ohne störende Überlagerungen mit anderen Ionen untersucht werden.

4.4.1 Auswahl geeigneter Vorläufer-Ionen

MS/MS-Messungen charakteristischer Ionen (**a** bis **j**, sowie m/z 260, 217, 175, 101, Anhang Abb. 11 bis Abb. 23) des Massenspektrums der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) zeigen, daß sich besonders die Isotopomere der Ionen **b**, **c**, und **d** als Vorläufer-Ionen zur positionsspezifischen ^{13}C -Einbauratenbestimmung eignen (Abb. 12). In ihren Produkt-Ionen-Spektren (Abb. 13 bis Abb. 15) finden sich die auch schon in den B/E-Scan-Massenspektren gefundenen typischen Fragment-Ionen (**d** bis **j**) der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) wieder. Diese zeichnen sich durch ausreichende und stabile Intensitäten in allen Scans über die gesamte Peakbreite im Produkt-Ionen-Chromatogramm und eine eindeutige Verschiebung im Falle einer ^{13}C -Markierung aus (Tab. 20 bis Tab. 22).

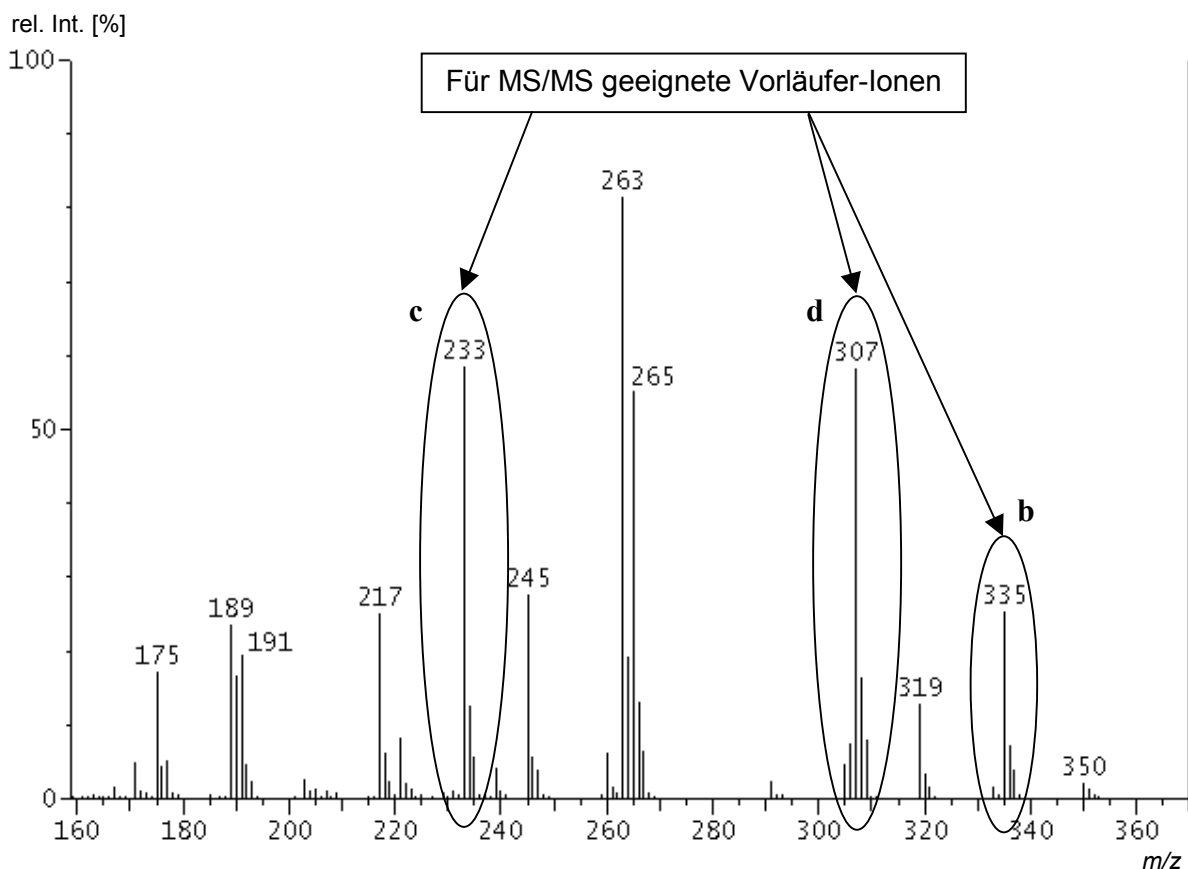
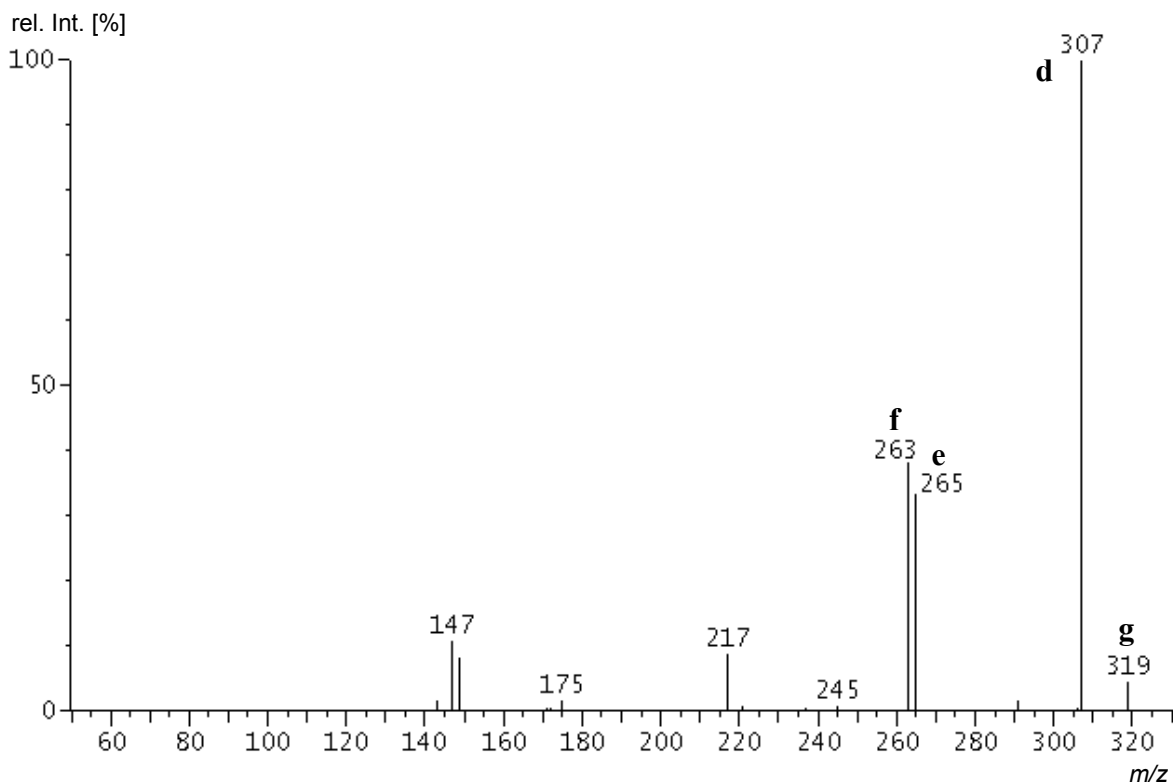


Abb. 12: Die Isotopomere der Fragment-Ionen **b**, **c** und **d** eignen sich als Vorläufer-Ionen zur positionsspezifischen ^{13}C -Einbauratenbestimmung über deren Produkt-Ionen-Spektren.

Das Produkt-Ionen-Spektrum des isolierten Ions **b** bei m/z 335 (Abb. 13) zeigt in Übereinstimmung mit dem Fragmentierungsschema der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) (Schema 6) das nach CO-Verlust (1-Position) entstehende Ion **d** bei m/z 307. In zwei nachfolgenden, konkurrierenden Fragmentierungen bilden sich die Ionen **f** und **e** bei m/z 263 und 265. Die Produkt-Ionen-Spektren der ^{13}C -markierten Ionen **d** zeigen die erwarteten Massenverschiebungen (Tab. 20). Das Produkt-Ion bei m/z 217 entsteht wie **d** durch den Verlust der 1-Position des Äpfelsäuregerüsts, seine Intensität ist jedoch deutlich schwächer. Ion **g** bei m/z 319 zeigt erwartungsgemäß keinen Verlust eines Kohlenstoffatoms der Äpfelsäure (**1**).

Abb. 13: Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (m/z 335).

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion b	m/z Produkt-Ionen				
		g	d	e	f	-
1	335	319	307	265	263	217
[1- ^{13}C] 1	336	320	307	265	263	217
[2- ^{13}C] 1	336	320	308	266	264	218
[3- ^{13}C] 1	336	320	308	265	264	218
[4- ^{13}C] 1	336	320	308	265	263	218
[1,4- $^{13}\text{C}_2$] 1	337	321	308	265	263	218
[1,3,4- $^{13}\text{C}_3$] 1	338	322	309	265	264	219

Tab. 20: Massenverschiebungen der Produkt-Ionen ausgehend von isotopomeren Vorläufer-Ionen **b**.

Die Produkt-Ionen-Spektren der unmarkierten, 1-fach und 2-fach markierten Isotopomere des Ions **d** (Abb. 14, Tab. 21) zeigen, wie erwartet, die schon im Spektrum des Vorläufer-Ions **b** konsekutiv aus Ion **d** gebildeten Produkt-Ionen **e** und **f** bei m/z 265 und 263. Das Ion bei m/z 217 zeigt im Falle einer Isotopenmarkierung die gleichen Verschiebungen wie sein

Vorläufer-Ion **d** und ist daher nicht zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung nutzbar. Das Ion bei m/z 175 zeigt die Abspaltung der 4-Position der Äpfelsäure (**1**), seine Intensität ist jedoch zu gering, um zur Auswertung herangezogen zu werden.

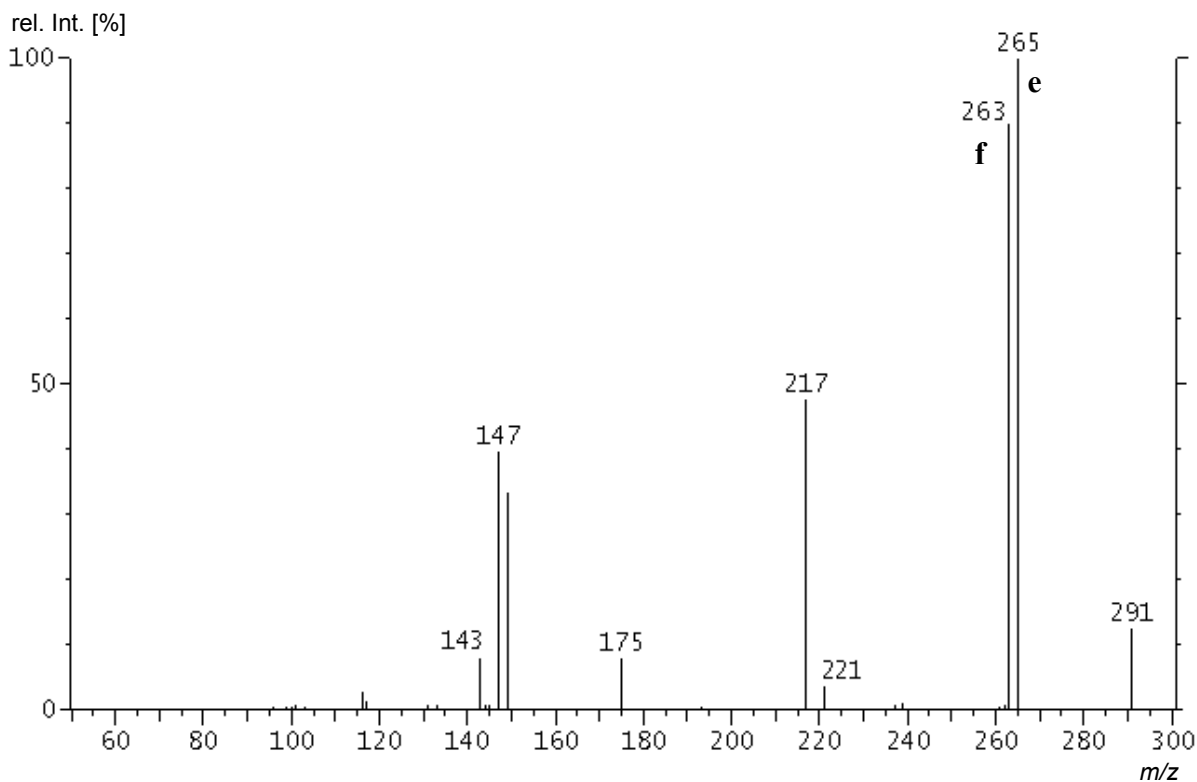
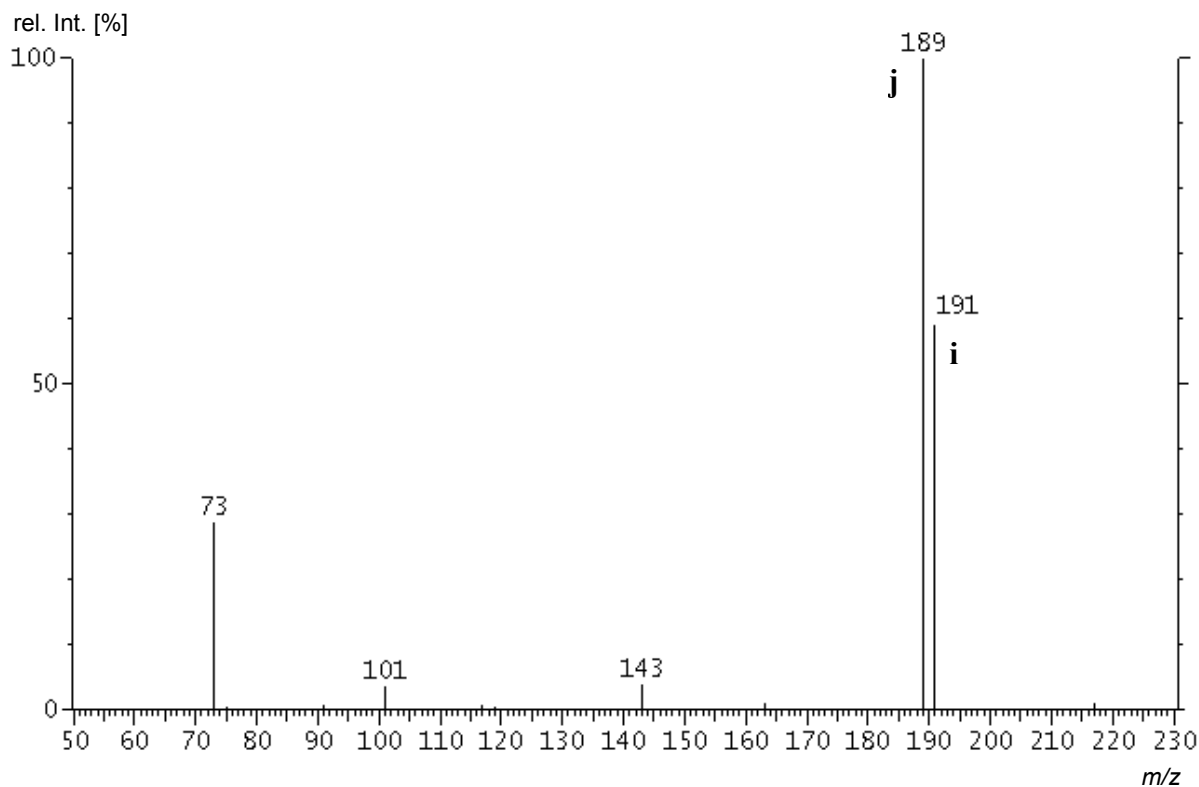


Abb. 14: Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **d** (m/z 307).

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion d	m/z Produkt-Ionen				
		-	e	f	-	-
1	307	291	265	263	217	175
[1- ^{13}C] 1	307	291	265	263	217	175
[2- ^{13}C] 1	308	292	266	264	218	176
[3- ^{13}C] 1	308	292	265	264	218	176
[4- ^{13}C] 1	308	292	265	263	218	175
[1,4- $^{13}\text{C}_2$] 1	308	292	265	263	218	175
[1,3,4- $^{13}\text{C}_3$] 1	309	293	265	264	219	176

Tab. 21: Massenverschiebungen der Produkt-Ionen ausgehend von isotopomeren Vorläufer-Ionen **d**.

Abb. 15: Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ion **c** bei m/z 233.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion c	m/z Produkt-Ionen		
		i	j	-
1	233	191	189	73
[1- ^{13}C] 1	233	191	189	73
[2- ^{13}C] 1	234	192	190	73
[3- ^{13}C] 1	234	191	190	73
[4- ^{13}C] 1	234	191	189	73
[1,4- $^{13}\text{C}_2$] 1	234	191	189	73
[1,3,4- $^{13}\text{C}_3$] 1	235	191	190	73

Tab. 22: Massenverschiebungen der Produkt-Ionen ausgehend von isotopomeren Vorläufer-Ionen **c**.

Die Vorläufer-Ionen **d** und **c** bei m/z 307 und 233 unterscheiden sich strukturell nur durch eine Trimethylsilylanolgruppe aus dem Trimethylsilylierungsreagenz. Auch die Produkt-Ionen **i** und **j** bei m/z 191 und 189 (Abb. 15) stellen die strukturellen Pendanten zu den Ionen **e** und **f** bei m/z 265 und 263 dar. Folglich zeigen sie bei gleichen im Ion enthaltenen Kohlenstoffpositionen der Äpfelsäure (**1**) die gleichen Verschiebungen in den Produkt-Ionen-Spektren (vgl. Tab. 21 und Tab. 22).

4.4.2 Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen-Signale

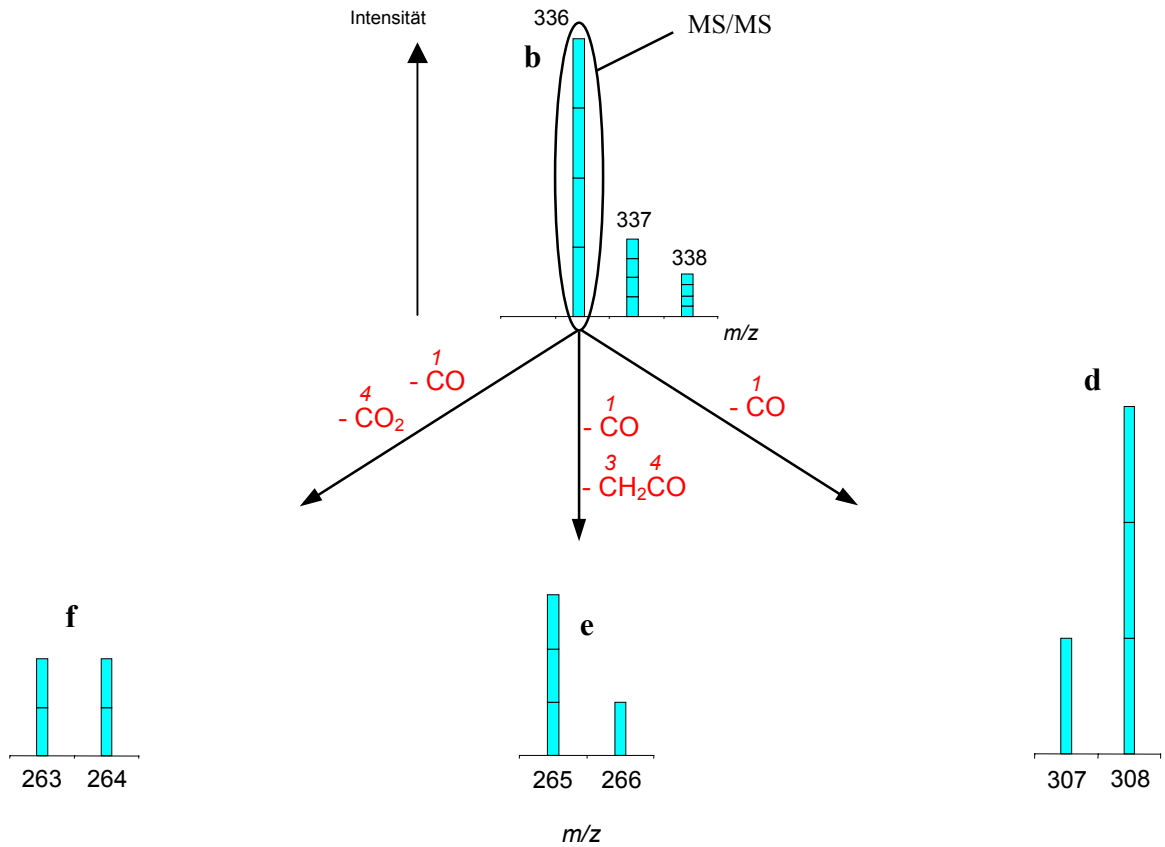
Anhand der Produkt-Ionen-Spektren des Vorläufer-Ions **b** (m/z 336) soll das Zustandekommen von Intensitätsverhältnissen der Produkt-Ionen-Signale für den Fall einer Mischung der 1-fach markierten Äpfelsäuren veranschaulicht werden:

In den Produkt-Ionen-Spektren der unter MS/MS-Bedingungen fragmentierten Vorläufer-Ionen **b** bei m/z 335 eignen sich vor allem die Ionen **d** bei m/z 307 sowie **e** und **f** bei m/z 265 und 263 zur Einbauratenbestimmung (Abb. 13).

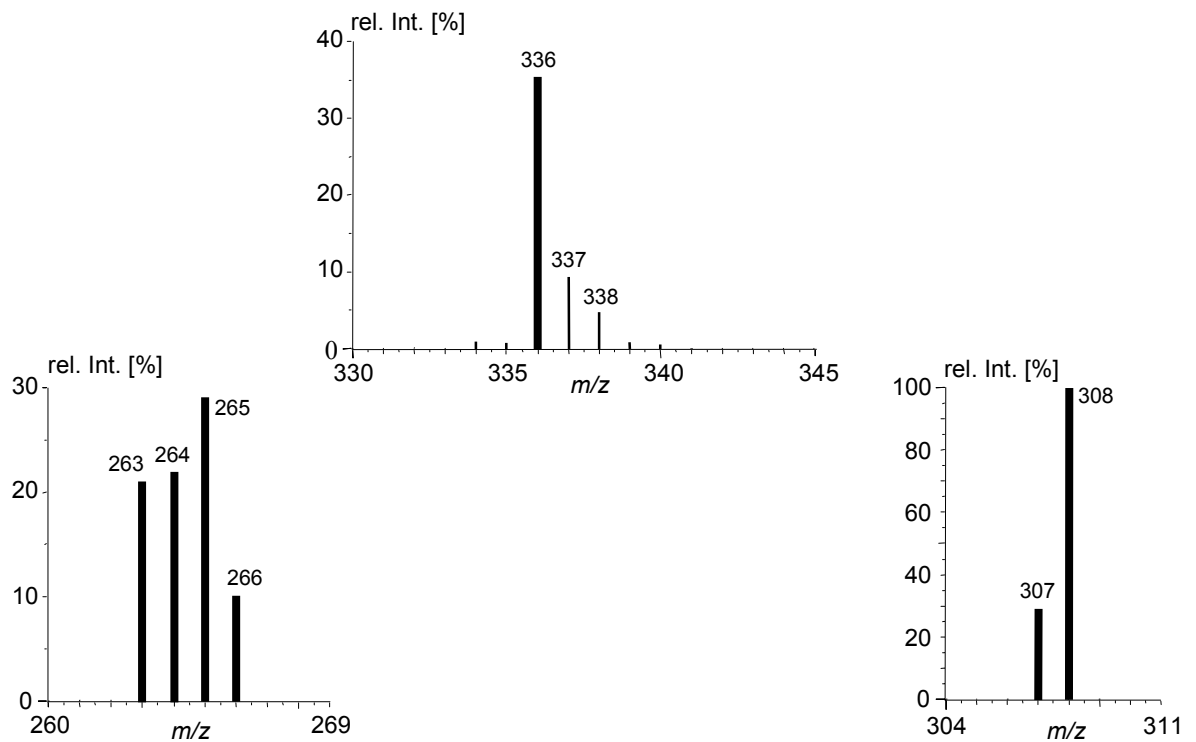
Im Falle einer 100 %igen 1-fachen Markierung der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) verschiebt sich das Signal des Vorläufer-Ions **b** von m/z 335 nach m/z 336. Unterwirft man die isolierten, 1-fach markierten Vorläufer-Ionen der Masse 336 einer stoßaktivierten Fragmentierung, verschieben sich die Massen der Produkt-Ionen nur dann, wenn die Markierung an einer Position eingeführt wurde, die noch im Fragment-Ion enthalten ist (Tab. 20). Das Ion **f** bei m/z 263 wird daher nach 264 verschoben, wenn in 2- oder 3-Position eine Markierung vorliegt, das Ion **e** bei m/z 265 wird nur im Falle einer Markierung in 2-Position verschoben. Beim Ion **d** (m/z 307) wird nur die 1-Position der Äpfelsäure abgespalten, so daß eine Verschiebung auf m/z 308 bei ^{13}C -Markierungen in 2-, 3- oder 4-Position stattfindet.

Liegt eine Mischung der 1-fach markierten Äpfelsäuren vor, kommt es nur zu Teilverschiebungen der Produkt-Ionen-Signale. Die Intensitätsverhältnisse innerhalb der teilverschobenen Produkt-Ionen-Signale spiegeln dann die Konzentrationsverhältnisse der isotopomeren, 1-fach markierten TMS-Äpfelsäuren wider.

Anhand einer Äpfelsäuremischung, die die vier 1-fach markierten Äpfelsäuren in gleichen Konzentrationsverhältnissen zu je 25 % enthält (Mischung L), soll dieser Sachverhalt verdeutlicht werden (Schema 9). Die Einflüsse natürlicher Isotopenverteilungen im Vorläufer-Ion **b** können hier vernachlässigt werden, da keine unmarkierte Substanz im Gemisch vorliegt.



Schema 9: Berechnete Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen **d**, **e**, **f** des stoßaktivierten Vorläufer-Ions **b**, jeweils 25 % Konzentrationsanteil der 1-fach markierten Äpfelsäuren.



Schema 10: Gemessene Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen **d**, **e**, **f** des stoßaktivierten Vorläufer-Ions **b**, jeweils 25 % Konzentrationsanteil der 1-fach markierten Äpfelsäuren.

Das Intensitätsverhältnis $R(307,308)_{336}$ der Produkt-Ionen **d** bei m/z 307 und 308 spiegelt das Konzentrationsverhältnis der $[1-^{13}\text{C}]\text{Äpfelsäure}$ ($[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$) (m/z 307, PR1) zu den restlichen 1-fach markierten Äpfelsäuren $[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$, $[2-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ und $[3-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ (m/z 308, PR2 + PR3 + PR4) wider. Da das Fragment-Ion **d** nur noch die 2-, 3- und 4-Position der Äpfelsäure (**1**) enthält, erscheinen auch nur die in diesen Positionen markierten Äpfelsäuren verschoben. Es ergibt sich somit ein theoretisches Intensitätsverhältnis von 1:3 (Gl. 4).

$$R(307,308)_{336} = \frac{\text{Int}(307)}{\text{Int}(308)} = \frac{\text{PR1}}{\text{PR2} + \text{PR3} + \text{PR4}} \quad \text{Gl. 4}$$

Das Produkt-Ion **e** trägt nur noch die 2-Position der Äpfelsäure (**1**), so daß das Intensitätsverhältnis $R(265,266)_{336}$ das Verhältnis der $[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$, $[3-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$, und $[4-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ (m/z 265) zur $[2-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ (m/z 266) von 3:1 anzeigt (Gl. 5).

$$R(265,266)_{336} = \frac{\text{Int}(265)}{\text{Int}(266)} = \frac{\text{PR1} + \text{PR3} + \text{PR4}}{\text{PR2}} \quad \text{Gl. 5}$$

Das Intensitätsverhältnis $R(263,264)_{336}$ der Produkt-Ionen **f** macht das Konzentrationsverhältnis von PR1 + PR4 zu PR2 + PR3 sichtbar. Die 1- und 4-Position sind hier abgespalten, so daß $[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ und $[4-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ nicht verschoben bei m/z 263 erscheinen. Es ergibt sich so ein Intensitätsverhältnis $R(263,264)_{336} = 1:1$ (Gl. 6).

$$R(263,264)_{336} = \frac{\text{Int}(263)}{\text{Int}(264)} = \frac{\text{PR1} + \text{PR4}}{\text{PR2} + \text{PR3}} \quad \text{Gl. 6}$$

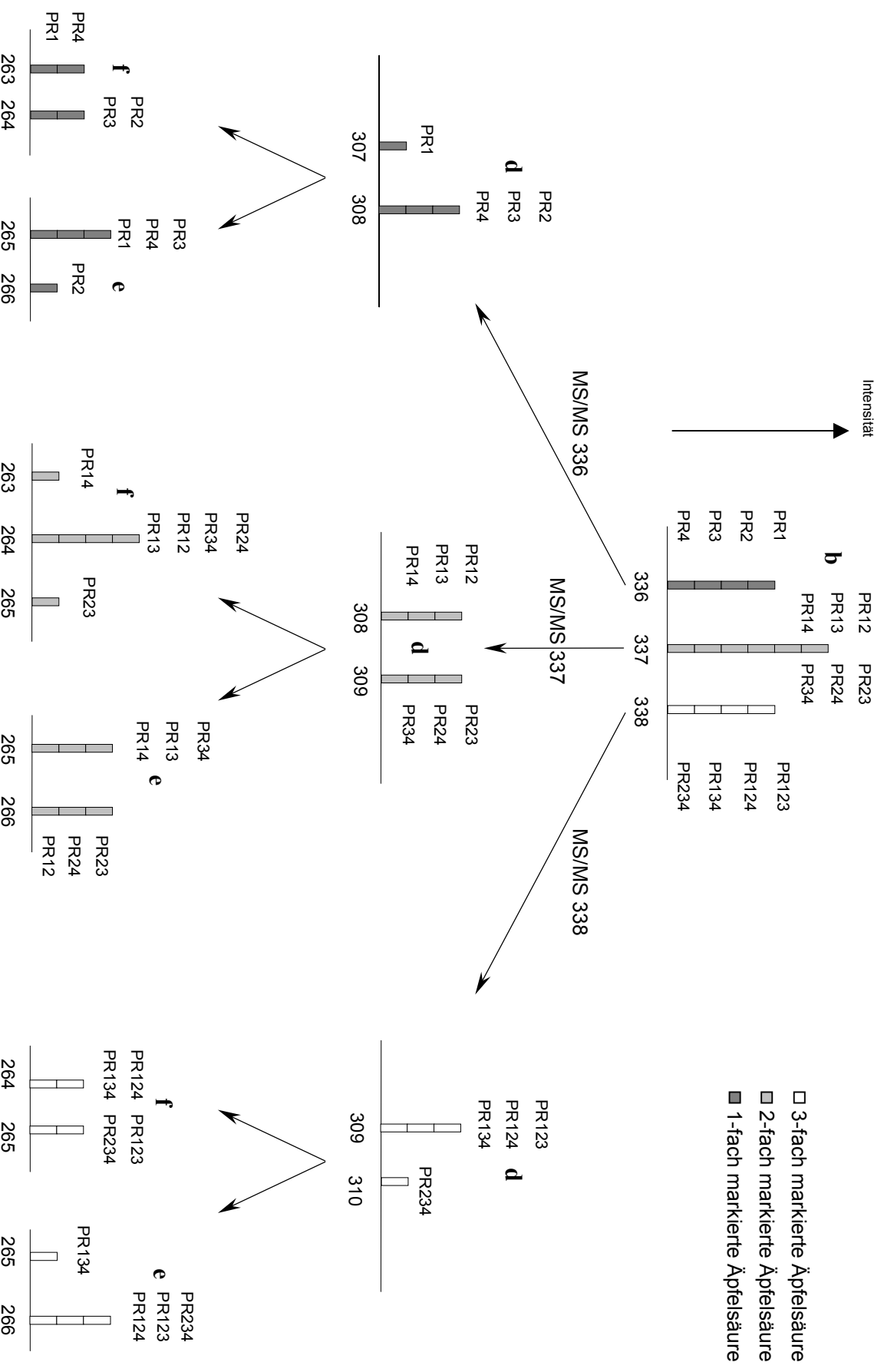
Produkt-Ionen	Theoretisches Intensitätsverhältnis	Gemessenes Intensitätsverhältnis
d (307/308)	1:3 = 0,333	0,314
e (265/266)	3:1 = 3,0	2,685
f (263/264)	1:1 = 1,0	0,946

Tab. 23: Gegenüberstellung der gemessenen und theoretischen Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions **b** (m/z 336), jeweils 25 % Konzentrationsanteil der 1-fach markierten Äpfelsäuren (Mischung L).

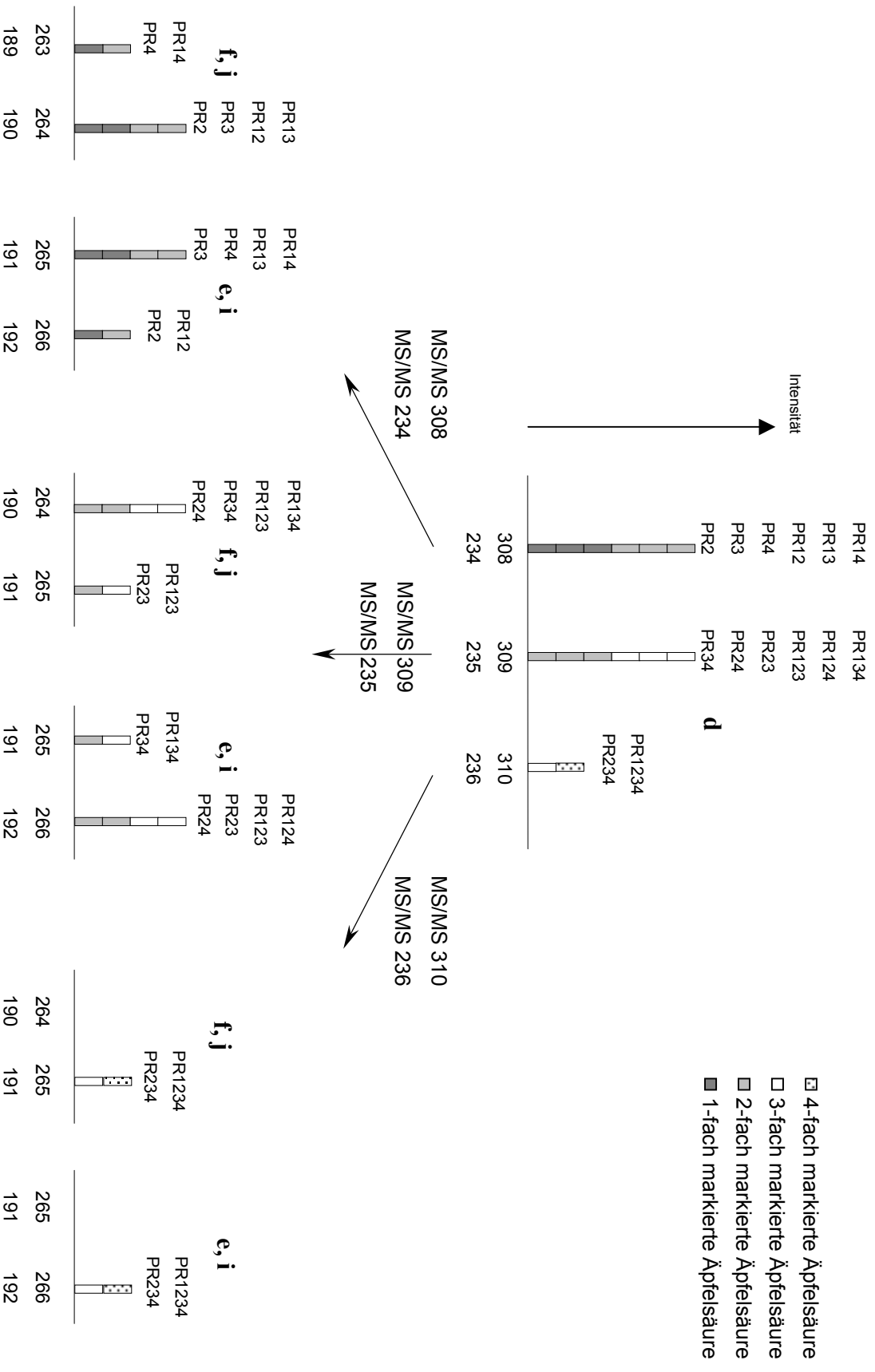
In Tab. 23 sind die theoretischen Intensitätsverhältnisse den gemessenen (Schema 10) gegenübergestellt. In gleicher Weise werden auch aus den isolierten und unter CID-Bedingungen fragmentierten Ionen der 2-fach und 3-fach markierten isotopomeren Vorläufer-Ionen **b** (m/z 337 und 338) Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen gebildet, die zur Berechnung der Konzentrationsverhältnisse herangezogen werden können. In Schema 11 sind die jeweils entstehenden Intensitätsverhältnisse der gebildeten Produkt-Ionen anhand von Mischungen gleicher Konzentrationsanteile der isotopomeren 1-fach, 2-fach und 3-fach markierten Äpfelsäuren dargestellt. Für diesen Fall müssen die von der natürlichen Isotopenverteilung der Elemente herrührenden Ionen nicht mitberücksichtigt werden.

Auch für die Produkt-Ionen-Verhältnisse der Vorläufer-Ionen **d** und **c** kann ein entsprechendes Schema aufgestellt werden. Da die Vorläufer-Ionen **d** und **c** sowie deren Produkt-Ionen strukturelle Pendanten mit den gleichen, aus der Äpfelsäure (**1**) stammenden Kohlenstoffpositionen darstellen, werden diese gemeinsam in Schema 12 gezeigt. In diesem Schema ist zu beachten, daß die s -fach in 1-Position markierten Äpfelsäuren nun bei den Signalen der $(s-1)$ -fach markierten Vorläufer-Ionen **d** und **c** auftreten.

Mit Hilfe von Gleichungssystemen lassen sich aus den gemessenen Konzentrationsverhältnissen der Produkt-Ionen die relativen Konzentrationen der markierten Äpfelsäuren berechnen (Kap. 4.4.3).



Schema 11: Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen der Vorläufer-Ionen **b**.



Schema 12: Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen **d** und **c**.

4.4.3 Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 1-fach markierten Äpfelsäuren

4.4.3.1 Vorläufer-Ion **b** (m/z 336)

Der Gesamtanteil 1-fach markierter Äpfelsäure (PR1fach) läßt sich anhand des Isotopenmusters der Ionen **b** (m/z 335), **g** (m/z 319) und **h** (m/z 245) direkt aus dem Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) bestimmen (Kap. 4.3).

$$\text{PR1fach} = \text{PR1} + \text{PR2} + \text{PR3} + \text{PR4} \quad \text{Gl. 7}$$

Im gewählten Beispiel einer zu gleichen Teilen aus den vier 1-fach ^{13}C -markierten Äpfelsäuren bestehenden Mischung kann $\text{PR1fach} = 100\%$ gesetzt werden.

Durch Kombination der Gleichungen 4 bis 7 lassen sich die relativen Konzentrationsanteile der 1-fach markierten ^{13}C -Äpfelsäuren (PR1, PR2, PR3, PR4) bestimmen. Durch Einsetzen von Gl. 4 in Gl. 7 erhält man:

$$\text{PR1} = \frac{\text{PR1fach}}{1 + \frac{1}{\text{R}(307,308)_{336}}} \quad \text{Gl. 8}$$

Aus Gl. 6 und Gl. 7 folgt:

$$\text{PR4} = \frac{\text{R}(263,264)_{336} \cdot (\text{PR1fach} - \text{PR1}) - \text{PR1}}{\text{R}(263,264)_{336} + 1} \quad \text{Gl. 9}$$

Aus Gl. 5 und Gl. 7 ergibt sich:

$$\text{PR3} = \frac{\text{PR1fach} - \text{PR1} - \text{PR4} - \frac{\text{PR1} - \text{PR4}}{\text{R}(265,266)_{336}}}{\frac{1}{\text{R}(265,266)_{336}} + 1} \quad \text{Gl. 10}$$

Schließlich kann PR2 durch Umformung von Gl. 7 berechnet werden:

$$\text{PR2} = \text{PR1fach} - \text{PR4} - \text{PR3} - \text{PR1} \quad \text{Gl. 7}$$

Für das Beispiel einer Äpfelsäuremischung von jeweils 25 % Konzentrationsanteil der vier 1-fach markierten Äpfelsäuren ergeben sich mit Gl. 7 bis Gl. 10 und den in Tab. 23 angegebenen Intensitätsverhältnissen die in Tab. 24 angegebenen experimentell bestimmten Einbauraten.

Äpfelsäure	Eingesetzt [%]	Gefunden [%]	Absoluter Fehler [%]
[1- ¹³ C]1	25,0	23,9	1,1
[2- ¹³ C]1	25,0	27,1	2,1
[3- ¹³ C]1	25,0	24,2	0,8
[4- ¹³ C]1	25,0	24,7	0,3

Tab. 24: Gegenüberstellung der gefundenen und eingesetzten Konzentrationsanteile 1-fach ¹³C-markierter Äpfelsäuren (Mischung L).

4.4.3.2 Vorläufer-Ionen **d** (*m/z* 308) und **c** (*m/z* 234)

Die Fragment-Ionen **d** (*m/z* 307) und **c** (*m/z* 233) enthalten nur noch die 2-, 3- und 4-Position der Äpfelsäure (**1**). Die isolierten Vorläufer-Ionen **d** (*m/z* 308) bzw. **c** (*m/z* 234) können daher von ursprünglich 1-fach markierter [2-¹³C]1, [3-¹³C]1 und [4-¹³C]1 sowie von ursprünglich 2-fach markierter [1,2-¹³C₂]1, [1,3-¹³C₂]1 und [1,4-¹³C₂]1 stammen (Schema 12).

Nur bei Abwesenheit ursprünglich 2-fach markierter Äpfelsäuren lassen sich folgende Intensitätsverhältnisse bilden:

$$R(265,266)_{308} = \frac{\text{Int}(265)}{\text{Int}(266)} = \frac{\text{PR3} + \text{PR4}}{\text{PR2}} = \frac{\text{Int}(191)}{\text{Int}(192)} = R(191,192)_{234} \quad \text{Gl. 11}$$

$$R(263,264)_{308} = \frac{\text{Int}(263)}{\text{Int}(264)} = \frac{\text{PR4}}{\text{PR2} + \text{PR3}} = \frac{\text{Int}(189)}{\text{Int}(190)} = R(189,190)_{234} \quad \text{Gl. 12}$$

Wenn PR1 und PR1fach aus dem Massenspektrum (Kap. 4.3) oder dem Produkt-Ionen-Spektrum von **b** (*m/z* 336) bekannt sind (Kap. 4.4.3.1), können die Produkt-Ionen-Spektren der Vorläufer-Ionen **d** (*m/z* 308) und **c** (*m/z* 234) eine zweite Methode zur Bestimmung der Konzentrationsanteile PR2, PR3 und PR4 sein. Aus Gl. 11, Gl. 12 und Gl. 7 kann gebildet werden:

$$PR2 = \frac{PR1fach - PR1}{R(265,266)_{308} + 1} \quad \text{Gl. 13}$$

$$PR4 = \frac{R(263,264)_{308} \cdot (PR1fach - PR1)}{R(263,264)_{308} + 1} \quad \text{Gl. 14}$$

$$PR3 = PR1fach - PR1 - PR2 - PR4 \quad \text{Gl. 7}$$

4.4.4 Positionsspezifische ¹³C-Einbauratenbestimmung der 2-fach markierten Äpfelsäuren

4.4.4.1 Vorläufer-Ion b (m/z 337)

Über das Verhältnis der Signale bei m/z 308 und 309 des Ions **d** kann die Bestimmung des Anteils von in 1-Position markierten (PR2f1m) bzw. nicht in 1-Position markierten 2-fach markierten Äpfelsäuren (PR2fn1m) durchgeführt werden.

$$R(308,309)_{337} = \frac{\text{Int}(308)}{\text{Int}(309)} = \frac{PR12 + PR13 + PR14}{PR23 + PR24 + PR34} = \frac{PR2f1m}{PR2fn1m} \quad \text{Gl. 15}$$

Der aus dem Massenspektrum (Kap. 4.3) bekannte Gesamtanteil an 2-fach markierter Äpfelsäure (PR2fach) ergibt sich zu:

$$PR2fach = PR12 + PR13 + PR14 + PR23 + PR24 + PR34 \quad \text{Gl.16}$$

Hiermit folgt für den Anteil 2-fach markierter Äpfelsäuren, die in 1-Position keine Markierung tragen (PR2fn1m):

$$PR2fn1m = \frac{PR2fach}{R(308,309)_{337} + 1} \quad \text{Gl. 17}$$

Der in 1-Position markierte Anteil der 2-fach markierten Äpfelsäuren (PR2f1m) ergibt sich nach Umformung von Gl. 2 zu:

$$PR2f1m = PR2fach - PR2fn1m \quad \text{Gl. 2}$$

Die stoßinduzierte Fragmentierung der 2-fach ¹³C-markierten Ionen **b** (*m/z* 337) führt zu einer Überlagerung der Intensitätsverhältnisse der Ionen **f** und **e** im Signal bei *m/z* 265 (Schema 11). Diese Signale können daher nicht zur Auswertung herangezogen werden, solange nicht bestimmt ist, zu welchen Anteilen die sechs 2-fach markierten Äpfelsäuren die beiden konkurrierenden Fragmentierungsreaktionen eingehen. Um auch eventuell vorliegende Isotopeneffekte zu berücksichtigen, werden daher Synthesen und einzelne Untersuchungen der sechs 2-fach markierten Äpfelsäuren erforderlich. Diese wurde jedoch innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Es kann somit nur das Verhältnis der Signale bei *m/z* 308 bzw. 309 für das Ion **d** zur ¹³C-Einbauratenbestimmung herangezogen werden.

4.4.4.2 Vorläufer-Ionen **d** (*m/z* 308) und **c** (*m/z* 234)

Liegt nur 2-fach markierte Äpfelsäure in der Mischung vor, so folgt für die Vorläufer-Ionen **d** und **c** bei *m/z* 308 und 234:

$$R(263,264)_{308} = \frac{\text{Int}(263)}{\text{Int}(264)} = \frac{\text{PR14}}{\text{PR12} + \text{PR13}} = \frac{\text{Int}(189)}{\text{Int}(190)} = R(189,190)_{234} \quad \text{Gl. 18}$$

$$R(265,266)_{308} = \frac{\text{Int}(265)}{\text{Int}(266)} = \frac{\text{PR13} + \text{PR14}}{\text{PR12}} = \frac{\text{Int}(191)}{\text{Int}(192)} = R(191,192)_{234} \quad \text{Gl. 19}$$

$$\text{PR2f1m} = \text{PR12} + \text{PR13} + \text{PR14} \quad \text{Gl. 20}$$

Ist PR2f1m aus dem Massenspektrum (Kap. 4.3) oder dem Produkt-Ionen-Spektrum des Ions **b** bei *m/z* 337 bekannt (Kap. 4.4.4.1), können mit den Gleichungen Gl. 20 bis Gl. 22 die Anteile PR12, PR13 und PR14 bestimmt werden.

$$\text{PR12} = \frac{\text{PR2f1m}}{R(265,266)_{308} + 1} \quad \text{Gl. 21}$$

$$\text{PR14} = \frac{R(263,264)_{308} \cdot \text{PR2f1m}}{R(263,264)_{308} + 1} \quad \text{Gl. 22}$$

$$\text{PR13} = \text{PR2f1m} - \text{PR12} - \text{PR14}$$

Gl. 20

Liegt wie in den biologischen Proben sowohl 1-fach, als auch 2-fach markierte Äpfelsäure vor, müssen entweder die relativen Anteile der jeweils 1-fach oder die der jeweils 2-fach markierten Äpfelsäuren bekannt sein. Dann können deren Intensitätsanteile in einem umfangreicheren Korrekturverfahren - wie auch die der natürlichen Isotopenmuster - von den Intensitäten subtrahiert werden (Kap. 4.4.7). Da PR1, PR2, PR3 und PR4 aus den Intensitätsverhältnissen der Produkt-Ionen von **b** (m/z 336) berechnet werden können, bieten sich die Produkt-Ionen von **d** (m/z 308) und **c** (m/z 234) besonders zur Berechnung der Konzentrationsanteile PR12, PR13, PR14 auch in Gegenwart 1-fach markierter Äpfelsäuren an.

4.4.4.3 Vorläufer-Ionen **d** (m/z 309) und **c** (m/z 235)

Wie bei Vorläufer-Ion **b** (m/z 337) kommt es auch bei Vorläufer-Ion **d** (m/z 309) und **c** (m/z 235) zu einer Überlagerung der Produkt-Ionen-Signale bei m/z 265 (Ionen **e** und **f**) bzw. m/z 191 (Ionen **i** und **j**) (Schema 12). Ohne Kenntnis der Konzentrationsanteile, der hier möglicherweise vorliegenden, ursprünglich 2-fach oder 3-fach markierten Äpfelsäuren, können die Intensitätsverhältnisse nicht zur Bestimmung der Einbauraten herangezogen werden. Da diese aus anderen Messungen nicht erhalten werden können, ist ein Produkt-Ionen-Spektrum der Ionen **d** (m/z 309) und **c** (m/z 235) zur Bestimmung der ¹³C-Einbauraten wertlos.

4.4.5 Positionsspezifische ¹³C-Einbauratenbestimmung der 3-fach markierten Äpfelsäuren

4.4.5.1 Vorläufer-Ion **b** (m/z 338)

Auch bei der stoßinduzierten Fragmentierung der Ionen **b** (m/z 338) kommt es zu einer Überschneidung der Signale der Ionen **e** und **f**, so daß nur das Verhältnis der Ionen **d** bei m/z 309 und m/z 310 zur Auswertung herangezogen werden kann (Schema 11). Von den 3-fach markierten Äpfelsäuren kann daher nur der Anteil von in 1-Position markierten (PR3f1m) bzw. nicht in 1-Position markierten Äpfelsäuren (PR3fn1m) berechnet werden. Eine Unterscheidung der Anteile an $[1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$, $[1,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$ und $[1,2,4\text{-}^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$ ist nicht möglich.

Aus dem Massenspektrum ist über das Isotopenmuster der Ionen **b**, **g** und **h** der Gesamtanteil 3-fach markierter Äpfelsäure (PR3fach) bekannt. Dieser setzt sich zusammen aus:

$$\text{PR3fach} = \text{PR123} + \text{PR124} + \text{PR134} + \text{PR234} \quad \text{Gl. 23}$$

Aus dem gemessenen Intensitätsverhältnis der Signale des Ions **d** bei m/z 309 und m/z 310 folgt:

$$R(309,310)_{338} = \frac{\text{Int}(309)}{\text{Int}(310)} = \frac{\text{PR123} + \text{PR124} + \text{PR134}}{\text{PR234}} \quad \text{Gl. 24}$$

Nach Einsetzen von Gl. 23 in Gl. 24 ergibt sich PR234 zu:

$$\text{PR234} = \frac{\text{PR3fach}}{R(309,310)_{338} + 1} \quad \text{Gl. 25}$$

Der in 1-Position markierte Anteil der 3-fach markierten Äpfelsäuren berechnet sich dann mit Gl. 3:

$$\text{PR3f1m} = \text{PR123} + \text{PR124} + \text{PR134} = \text{PR3fach} - \text{PR234} \quad \text{Gl. 3}$$

4.4.5.2 Vorläufer-Ionen **d** (m/z 310) und **c** (m/z 236)

Im CID-Spektrum der Vorläufer-Ionen **d** (m/z 310) und **c** (m/z 236) kommt es zu keiner Aufspaltung der isotopomeren Produkt-Ionen-Signale **e**, **f** bzw. **i**, **j** und daher nicht zur Bildung eines Intensitätsverhältnisses, das zur Berechnung von Einbauraten herangezogen werden kann (Schema 12).

4.4.6 Untersuchung verschiedener Mischungen

Um zunächst eine Berücksichtigung der vom natürlichen Isotopengehalt der Elemente hervorgerufenen Intensitätsanteile zu vermeiden, wurden verschiedene Mischung (Tab. 25) der 1-fach markierten Äpfelsäuren vermessen. Für die Untersuchung der Produkt-Ionen-Verhältnisse der Vorläufer-Ionen **d** (m/z 308) und **c** (m/z 234) können daher nur Mischungen der nicht in 1-Position 1-fach markierten Äpfelsäuren (PR1fn1m) herangezogen werden (Mischung M bis O).

Mi- schung	Konzentrationsanteile der Äpfelsäuren [%]						
	1	[1- ^{13}C] 1	[2- ^{13}C] 1	[3- ^{13}C] 1	[4- ^{13}C] 1	[1,4- ^{13}C] 1	[1,3,4- ^{13}C] 1
L	-	25,0	25,0	25,0	25,0	-	-
M	-	-	50,0	50,0	-	-	-
N	-	-	50,0	-	50,0	-	-
O	-	-	-	50,0	50,0	-	-

Tab. 25: Konzentrationsanteile [%] von Äpfelsäure-Mischungen zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung über Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen.

Bei der Berechnung der ^{13}C -Einbauraten wurde von 100 % 1-fach markierter Äpfelsäure (PR1fach) ausgegangen. Die Ergebnisse (Tab. 26 bis Tab. 28) zeigen, daß die Einbauratenbestimmung über Intensitätsverhältnisse von Produkt-Ionen prinzipiell möglich ist. Der absolute Fehler zwischen den eingesetzten und den über Vorläufer-Ion **b** (m/z 336) gefundenen Mischungsverhältnissen beträgt bei den verwendeten Mischungen maximal 2,1 %. Bei den über Vorläufer-Ion **d** (m/z 308) und **c** (m/z 234) ermittelten Konzentrationsanteilen liegt er bei maximal 1,5 % bzw. 2,5 %.

Die gute Übereinstimmung zwischen eingewogener Zusammensetzung der Äpfelsäuremischungen und den Meßergebnissen bestätigt, daß im Bereich der Meßgenauigkeit bei den untersuchten Isotopomeren keine Isotopeneffekte oder Scrambling zu beobachten sind. In Abb. 16 bis Abb. 18 sind die Produkt-Ionen-Spektren der Vorläufer-Ionen **b** (m/z 336), **d** (m/z 308) und **c** (m/z 234) von Mischung N gezeigt.

Eine weitere Untersuchung anderer isotopomerer Mischungen liefert keine zusätzliche Information, da die zu untersuchenden biologischen Proben die unterschiedlich markierten Äpfelsäuren in einer Mischung mit unmarkierter Äpfelsäure (**1**) beinhalten. Zusammen mit den Vorläufer-Ionen werden dann auch Ionen isoliert, die eine natürliche Isotopenmarkierung tragen. Bei der Fragmentierung verfälschen diese Ionen die Intensitätsverhältnisse, wodurch falsche Einbauraten berechnet werden. Die erforderlichen Korrekturen, die zur Ermittlung der richtigen Ergebnisse durchgeführt werden müssen, werden im Kap. 4.4.7 erläutert.

Mischung	Eingewogene Zusammensetzung [%]				Berechnete Intensitätsverhältnisse			Experimentelle Intensitätsverhältnisse			Experimentell bestimmte Zusammensetzung [%]			
	PR1	PR2	PR3	PR4	d (307/308)	f (263/264)	e (265/266)	d (307/308)	f (263/264)	e (265/266)	PR1	PR2	PR3	PR4
M	-	50,0	50,0	-	0,0/100,0	0,0/100,0	50,0/50,0	0,4/99,6	0,5/99,5	50,4/49,6	0,4	49,6	49,9	0,1
N	-	50,0	-	50,0	0,0/100,0	50,0/50,0	50,0/50,0	0,4/99,6	48,9/51,1	49,6/50,4	0,4	50,4	0,8	48,5
O	-	-	50,0	50,0	0,0/100,0	50,0/50,0	0,0/100,0	0,3/99,7	50,9/49,1	99,8/0,2	0,3	0,2	48,9	50,5
L	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0/75,0	50,0/50,0	75,0/25,0	23,9/76,1	48,6/51,3	72,9/27,1	23,9	27,1	24,2	24,7

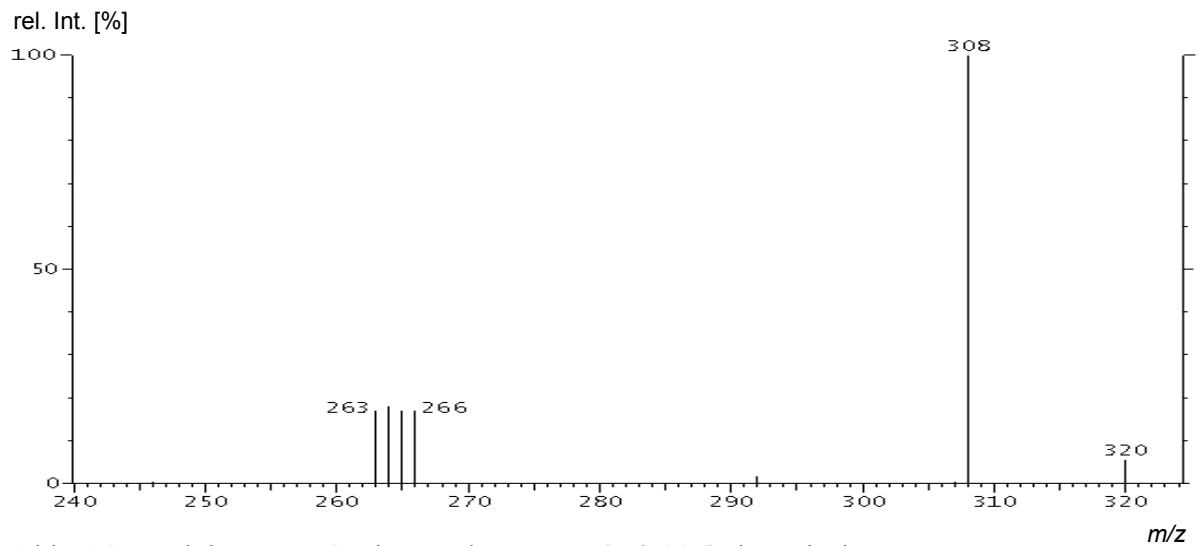
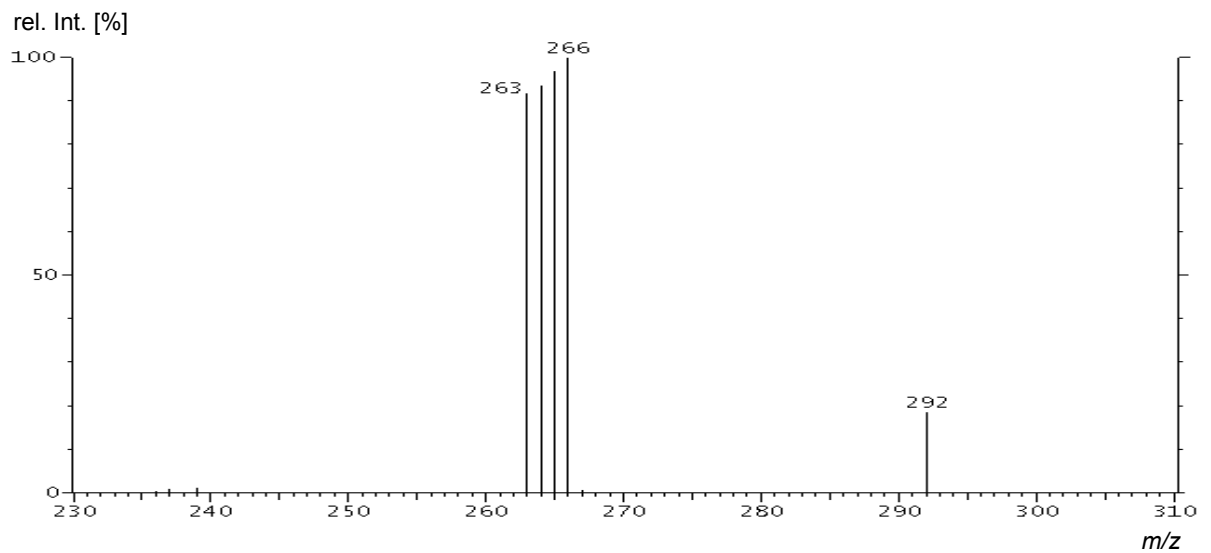
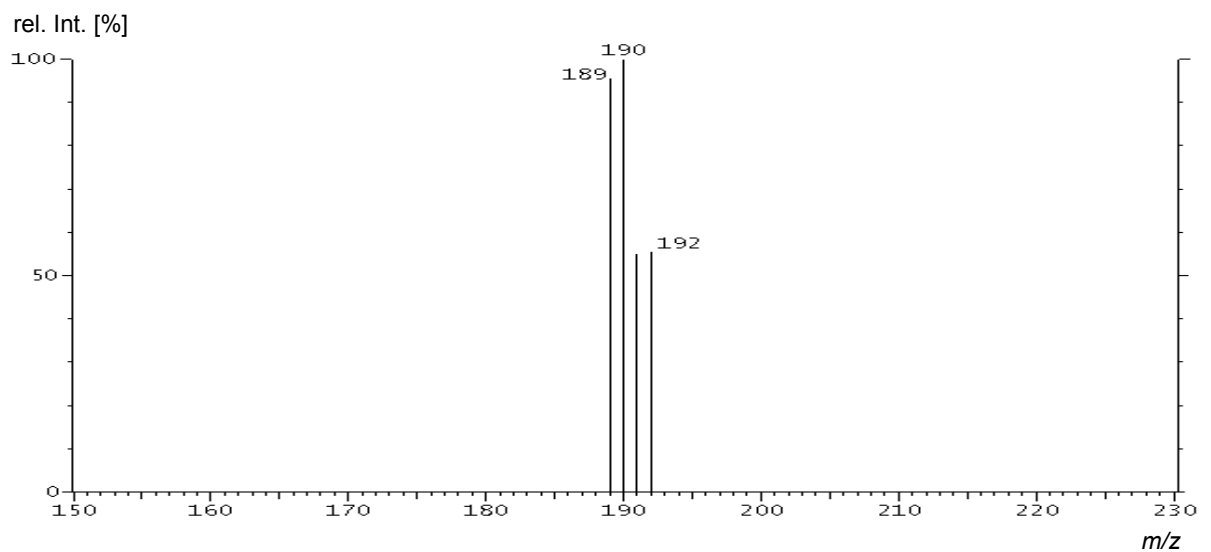
Tab. 26: Aus dem Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (m/z 336) experimentell bestimmte Zusammensetzung verschiedener Mischungen 1-fach markierter Äpfelsäuren.

Mischung	Eingewogene Zusammensetzung [%]				Berechnete Intensitätsverhältnisse		Experimentelle Intensitätsverhältnisse		Experimentell bestimmte Zusammensetzung [%]			
	PR1	PR2	PR3	PR4	f (263/264)	e (265/266)	f (263/264)	e (265/266)	PR1	PR2	PR3	PR4
M	-	50,0	50,0	-	0,0/100,0	50,0/50,0	0,0/100,0	50,7/49,3	-	49,3	50,6	0,1
N	-	50,0	-	50,0	50,0/50,0	50,0/50,0	49,4/50,6	49,7/50,3	-	50,3	0,3	49,4
O	-	-	50,0	50,0	50,0/50,0	100,0/0,0	49,8/50,2	98,7/1,3	-	1,3	48,5	50,2

Tab. 27: Aus dem Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **d** (m/z 308) experimentell bestimmte Zusammensetzung verschiedener Mischungen 1-fach markierter Äpfelsäuren.

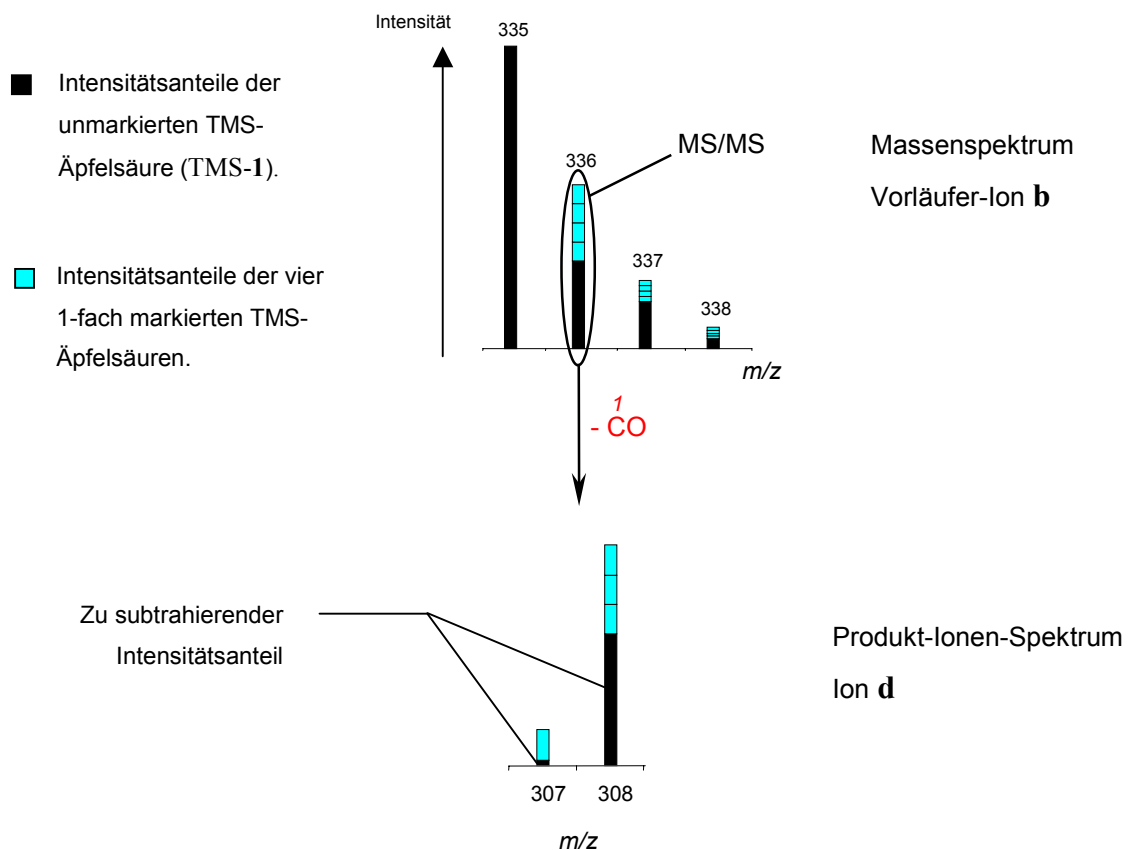
Mischung	Eingewogene Zusammensetzung [%]				Berechnete Intensitätsverhältnisse		Experimentelle Intensitätsverhältnisse		Experimentell bestimmte Zusammensetzung [%]			
	PR1	PR2	PR3	PR4	j (189/190)	i (191/192)	j (189/190)	i (191/192)	PR1	PR2	PR3	PR4
M	-	50,0	50,0	-	0,0/100,0	50,0/50,0	0,0/100,0	52,6/47,4	-	47,4	52,5	0,1
N	-	50,0	-	50,0	50,0/50,0	50,0/50,0	49,0/51,0	50,0/50,0	-	50,0	0,9	49,1
O	-	-	50,0	50,0	50,0/50,0	100,0/0,0	49,6/50,4	100,0/0,0	-	0,1	50,3	49,6

Tab. 28: Aus dem Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **c** (m/z 234) experimentell bestimmte Zusammensetzung verschiedener Mischungen 1-fach markierter Äpfelsäuren.

Abb. 16: Produkt-Ionen-Spektrum des Ions **b** (m/z 336) der Mischung N.Abb. 17: Produkt-Ionen-Spektrum des Ions **d** (m/z 308) der Mischung N.Abb. 18: Produkt-Ionen-Spektrum des Ions **c** (m/z 234) der Mischung N.

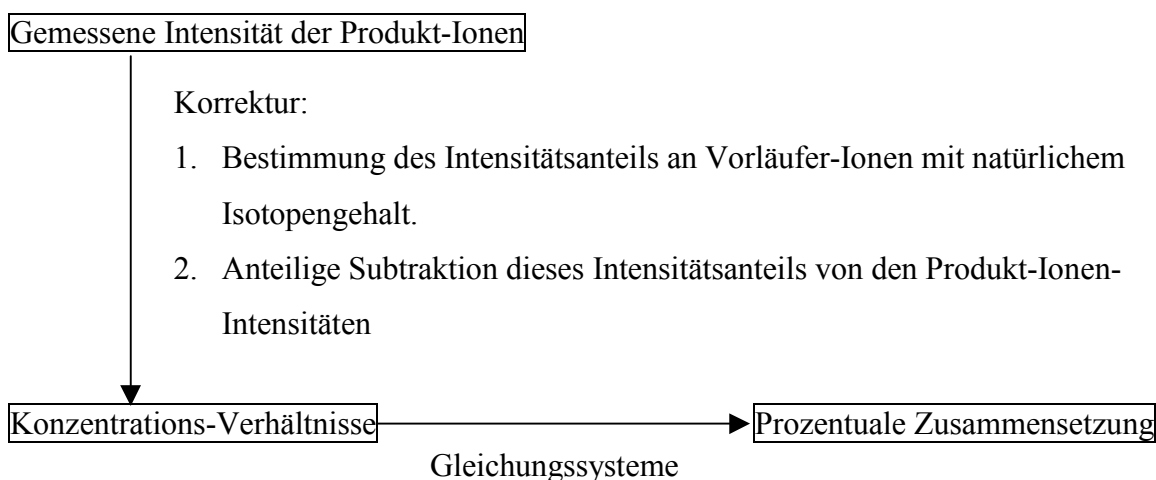
4.4.7 Berücksichtigung des natürlichen Isotopengehalts

Die markierten sowie die unmarkierte TMS-Äpfelsäure (TMS-1) weisen noch einen zusätzlichen, von der natürlichen Isotopenverteilung der Elemente herrührenden Isotopengehalt auf. Dieser führt zu den natürlichen Isotopenmustern der Signale im Massenspektrum. Bei der Isolierung der Ionen einer bestimmten Masse werden so nicht nur die gewünschten Ionen einer positionsspezifisch markierten TMS-Äpfelsäure einer stoßinduzierten Fragmentierung unterworfen, sondern auch diese, vom natürlichen Isotopengehalt stammenden, isobaren Ionen. Sie durchlaufen die gleichen Fragmentierungen wie die betrachteten Ionen positionsspezifisch markierter TMS-Äpfelsäuren und führen daher zu einer störenden Beeinträchtigung der zur Auswertung herangezogenen Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen. Bevor diese zur Berechnung der ^{13}C -Einbauraten genutzt werden können, muß eine Korrektur um den Intensitätsanteil vorgenommen werden, der von Ionen mit natürlichem Isotopengehalt hervorgerufen wird. Dies geschieht durch Subtraktion dieses Anteils von den Intensitäten der Produkt-Ionen (Schema 13).



Schema 13: Intensitätsverhältnis der Ionen **d** (m/z 307 und 308) im Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (m/z 336) einer Äpfelsäuremischung aus 80 % unmarkierter Äpfelsäure (**1**), sowie jeweils 5 % der vier 1-fach markierten Äpfelsäuren.

Die Intensitätssummen isotopomerer Produkt-Ionen aus einem isolierten Vorläufer-Ion besitzen jeweils den gleichen prozentualen Anteil an Ionen, die eine Markierung aus dem natürlichen Isotopenverhältnis der Elemente tragen. Um diesen Anteil zu bestimmen, ist zunächst der Gesamtanteil an Vorläufer-Ionen mit natürlichem Isotopengehalt zu identifizieren (Kap. 4.4.7.1). Zur Bestimmung des Verhältnisses, in dem dieser Anteil von den Produkt-Ionen subtrahiert wird, ist die Wahrscheinlichkeit W zu berechnen, in welcher Position des Vorläufer-Ions das schwerere Isotop anzutreffen ist (Kap. 4.4.7.2). Das zusätzliche Neutron ist (gewichtet nach den Isotopenhäufigkeiten der Elemente) statistisch über die Atome des Vorläufer-Ions verteilt. Es kann sich daher im eliminierten Neutralteilchen oder im entstehenden Produkt-Ion befinden. Danach entscheidet sich, ob das Ion mit natürlichem Isotopengehalt zur Erhöhung des markierten oder unmarkierten Produkt-Ionen-Signals beiträgt. Schließlich wird dieser Anteil von den Produkt-Ionen subtrahiert (Kap. 4.4.7.3), um über die vorgestellten Gleichungssysteme (Kap. 4.4.3 bis Kap. 4.4.6) die Konzentrationsanteile verschiedener ^{13}C -markierter Äpfelsäuren zu berechnen (Schema 14).



Schema 14: Erforderliche Korrekturen, um aus den Intensitäten der Produkt-Ionen die relativen Konzentrationsanteile ^{13}C -markierter Äpfelsäuren zu bestimmen.

4.4.7.1 Zusammensetzung der Vorläufer-Ionen

Die Signalintensitäten der Isotopomere der Vorläufer-Ionen entstehen durch die Überlagerung der natürlichen Isotopenmuster der unterschiedlich positionsspezifisch markierten Äpfelsäuren. Die relativen Anteile, mit denen die Isotopenmuster der verschiedenen Säuren zur Ausbildung der einzelnen Signalintensitäten der Isotopomere beitragen, hängen

von ihrem Konzentrationsanteil in der Mischung (PRp) und von den relativen natürlichen Isotopenhäufigkeiten (NH) der unmarkierten oder positionsspezifisch markierten Vorläufer-Ionen ab (Abb. 19).

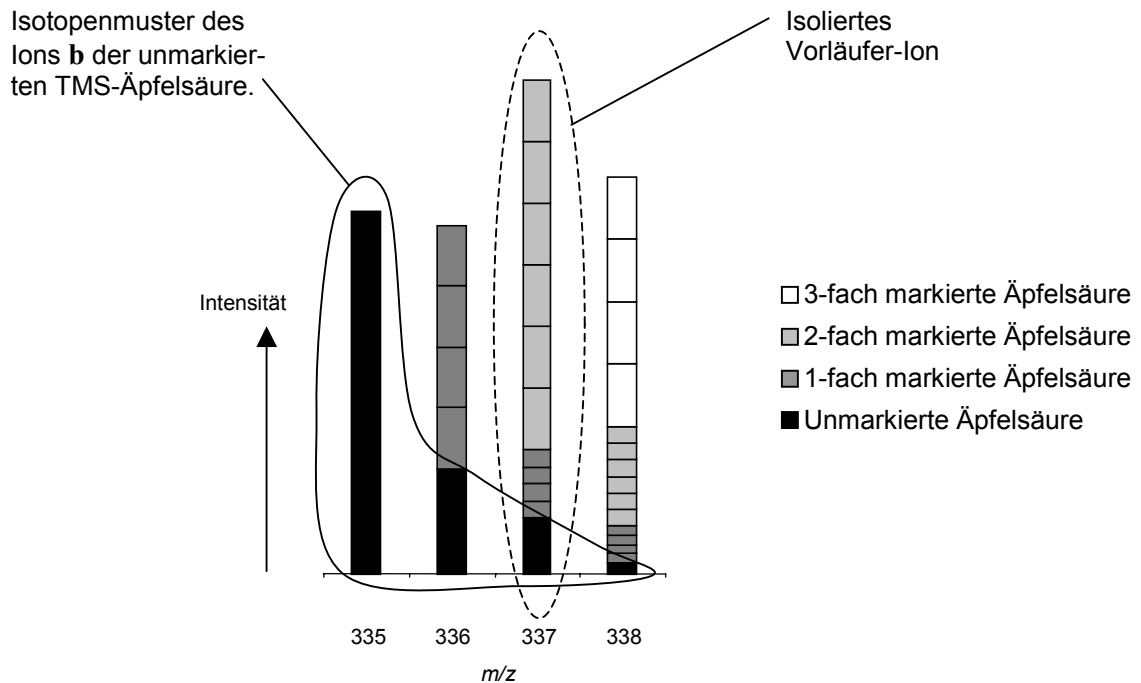


Abb. 19: Überlagerung der natürlichen Isotopenmuster unterschiedlich häufig ^{13}C -markierter TMS-Äpfelsäuren.

Die relativen natürlichen Isotopenhäufigkeiten (NH) eines Ions können experimentell bestimmt oder aus der Summenformel des betrachteten Ions und dem Grad der natürlichen Markierung berechnet werden [78]. Sie werden deshalb folgendermaßen gekennzeichnet:

$$\text{NHsfach}(m_1^+_{m/z})_V$$

m_1^+ = Vorläufer-Ion

V = Anzahl der Markierungen des Vorläufer-Ions aus natürlicher Isotopenhäufigkeit

s = Anzahl positionsspezifischer Markierungen

Die gute Übereinstimmung zwischen den experimentell ermittelten und theoretisch berechneten natürlichen Isotopenhäufigkeiten für das Vorläufer-Ion **b** der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1) (Tab. 29, Abb. 20) erlaubt für die weiteren Berechnungen die Verwendung der theoretischen natürlichen Isotopenhäufigkeiten auch für die anderen Vorläufer-Ionen (Kap. 8).

V	Experimentell	Theoretisch			
	NH0fach (\mathbf{b}_{335}) _V	NH0fach (\mathbf{b}_{335}) _V	NH1fach ($[^{13}\text{C}]\mathbf{b}_{336}$) _V	NH2fach ($[^{13}\text{C}_2]\mathbf{b}_{337}$) _V	NH3fach ($[^{13}\text{C}_3]\mathbf{b}_{338}$) _V
0	66,75	67,299	68,036	68,785	69,551
1	19,87	19,550	19,016	18,469	17,909
2	10,46	10,411	10,314	10,228	10,140
3	0,022	2,100	2,014	1,919	1,829
...
Σ	100	100	100	100	100

Tab. 29: Prozentuale natürliche Häufigkeit der Isotopen des Vorläufer-Ions \mathbf{b} ($\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{Si}_3$)⁺.

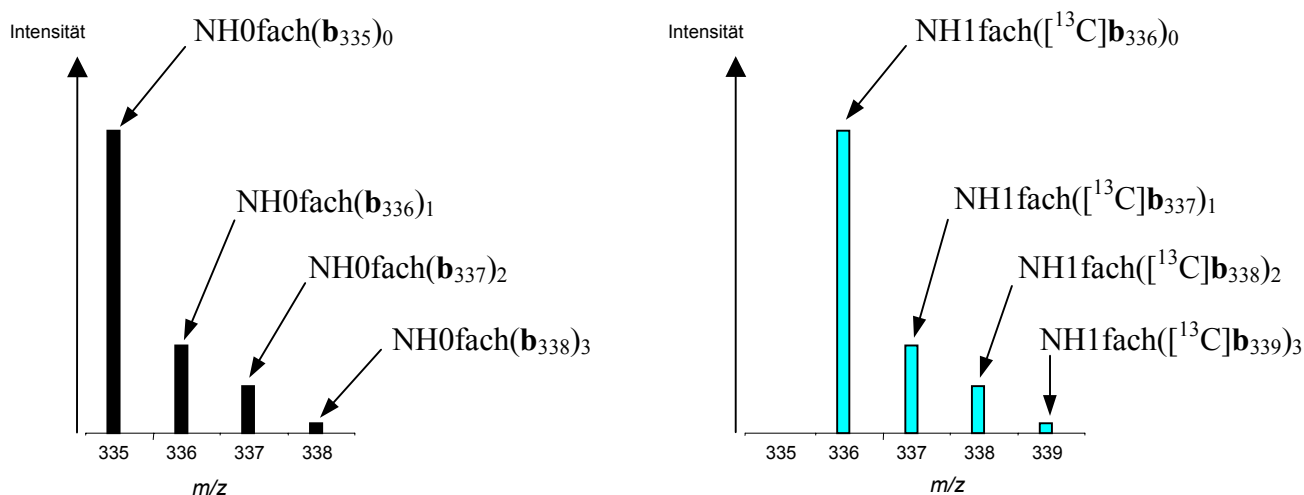


Abb. 20: Relative Intensitäten im Isotopenmuster des Ions \mathbf{b} der unmarkierten TMS-1 und der TMS-[1- ^{13}C]Äpfelsäure (TMS-[1- ^{13}C]1).

Zur Berechnung des Intensitätsanteils, den die Ionen innerhalb der Isotopomere eines m/z -Wertes in den einzelnen Signalen besitzen (NHPRp), müssen die natürlichen Isotopenhäufigkeiten (NHsfach) noch mit dem Konzentrationsanteil der Säure (PRp) multipliziert werden. Zur seiner Kennzeichnung wird folgende Bezeichnung eingeführt:

$$\text{NHPRp}(m_1^+_{m/z})_V = \text{NHsfach}(m_1^+_{m/z})_V \cdot \text{PRp}$$

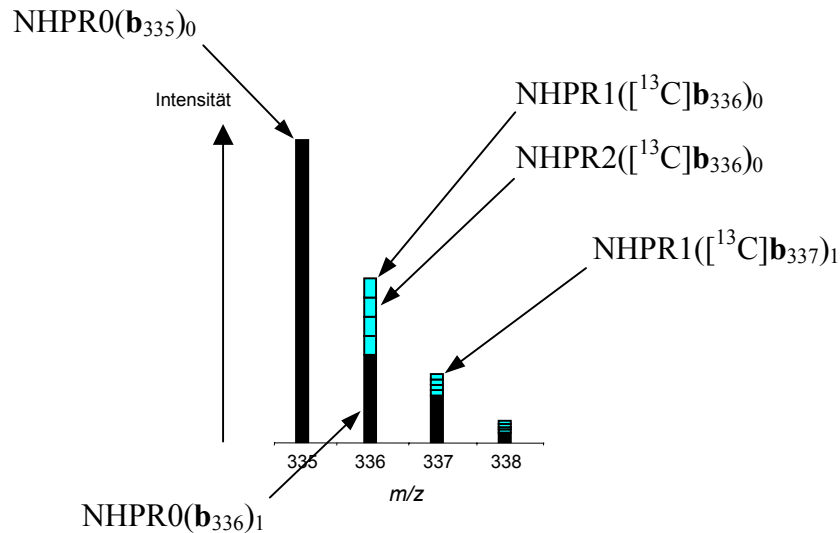


Abb. 21: Relative Signalintensitäten im Isotopenmuster des Ions **b** einer Mischung aus 80 % unmarkierter **1** ($\text{PR0} = 80\%$) und zu jeweils 5 % 1-fach markierter ($\text{PR1} = \text{PR2} = \text{PR3} = \text{PR4} = 5\%$) Äpfelsäure.

Als Maß für die relativen Intensitäten der Isotopensignale der Ionen **b** ergibt sich (Abb. 22):

$$\text{Int}(335) = \text{PR0} \cdot \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{335})_0$$

$$\text{Int}(336) = \text{PR0} \cdot \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 + (\text{PR1} + \text{PR2} + \text{PR3} + \text{PR4}) \cdot \text{NH1fach}([^{13}\text{C}]\mathbf{b}_{336})_0$$

$$\text{Int}(337) = \dots$$

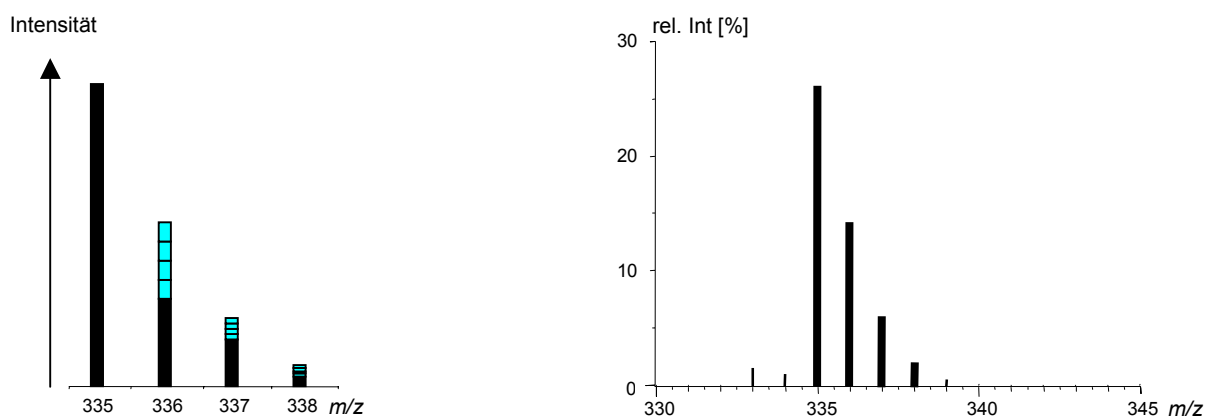


Abb. 22: Berechnete (links) und gemessene (rechts) relative Signalintensitäten im Isotopenmuster des Ions **b** einer Mischung aus 80 % unmarkierter **1** ($\text{PR0} = 80\%$) und zu jeweils 5 % 1-fach markierter ($\text{PR1} = \text{PR2} = \text{PR3} = \text{PR4} = 5\%$) Äpfelsäure.

Soll im Signal des Vorläufer-Ions der Intensitätsanteil (IAV) berechnet werden, der von Ionen mit natürlichem Isotopengehalt (einer in p-Position positionsspezifisch markierten Äpfelsäure) stammt, dividiert man deren Intensität durch die Gesamtintensität der Isotopomere des Vorläufer-Ions.

$$\text{IAV}(\text{PR}_{m/z}) = \frac{\text{Intensität der Vorläufer - Ionen mit Markierung aus natürlichem Isotopengehalt}}{\text{Gesamtintensität der Vorläufer - Ionen}}$$

Für das Vorläufer-Ion **b** bei m/z 336 ($s = 0$) ergibt sich somit:

$$\text{IAV}(\text{PR}_{336}) = \frac{\text{PR}_0 \cdot \text{NH}_0\text{fach}(\mathbf{b}_{336})_1}{\text{PR}_0 \cdot \text{NH}_0\text{fach}(\mathbf{b}_{336})_1 + \text{PR}_1\text{fach} \cdot \text{NH}_1\text{fach}([\text{}^{13}\text{C}]\mathbf{b}_{336})_0} = \frac{\text{NHPR}_0\text{fach}(\mathbf{b}_{336})_1}{\text{Int}(336)}$$

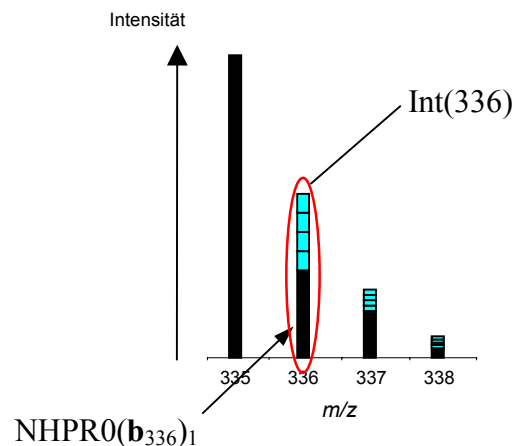


Abb. 23: Bestimmung des Intensitätsanteils ($\text{IAV}(\text{PR}_{336})$), den die natürlichen Isotopomere der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1) zur Intensität des Signals des Ions **b** bei m/z 336 beitragen.

Der Gesamtanteil isolierter Vorläufer-Ionen, die durch das natürliche Isotopenverhältnis markiert sind, lässt sich demnach bei Kenntnis von PR_0 und PR_1fach berechnen. Beide Konzentrationsanteile können aus dem Massenspektrum bestimmt werden (Kap. 4.3).

In entsprechender Weise lassen sich auch für die Vorläufer-Ionen **b** bei m/z 337 und 338 sowie **d** (m/z 308) und **c** (m/z 234) die Intensitätsanteile bestimmen, die von der natürlichen Isotopenverteilung der Elemente stammen (Kap. 8 und Anhang).

4.4.7.2 Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsfaktoren W

Die Wahrscheinlichkeit W, daß ein V-fach durch die natürliche Isotopenverteilung markiertes Vorläufer-Ion von diesen Markierungen N im eliminierten Neutralteilchen und P im Produkt-Ion trägt ist wie folgt gekennzeichnet:

$$W(m_1^+_{m/z}, m_2^+_{m/z})_{V,N,P}$$

m_1^+ = Vorläufer-Ion

m_2^+ = Produkt-Ion

V = Markierungsanzahl des Vorläufer-Ions aufgrund natürlicher Isotopenverteilung

N = Markierungsanzahl des Neutralteilchens aufgrund natürlicher Isotopenverteilung

P = Markierungsanzahl des Produkt-Ions aufgrund natürlicher Isotopenverteilung

Zur experimentellen Bestimmung von W unterwirft man die Isotopomere des natürlichen Isotopenmusters der Vorläufer-Ionen der stoßaktivierten Fragmentierung (Abb. 24). Aus den normierten Intensitäten der Isotopomere der einzelnen Produkt-Ionen kann W direkt bestimmt werden (Tab. 30).

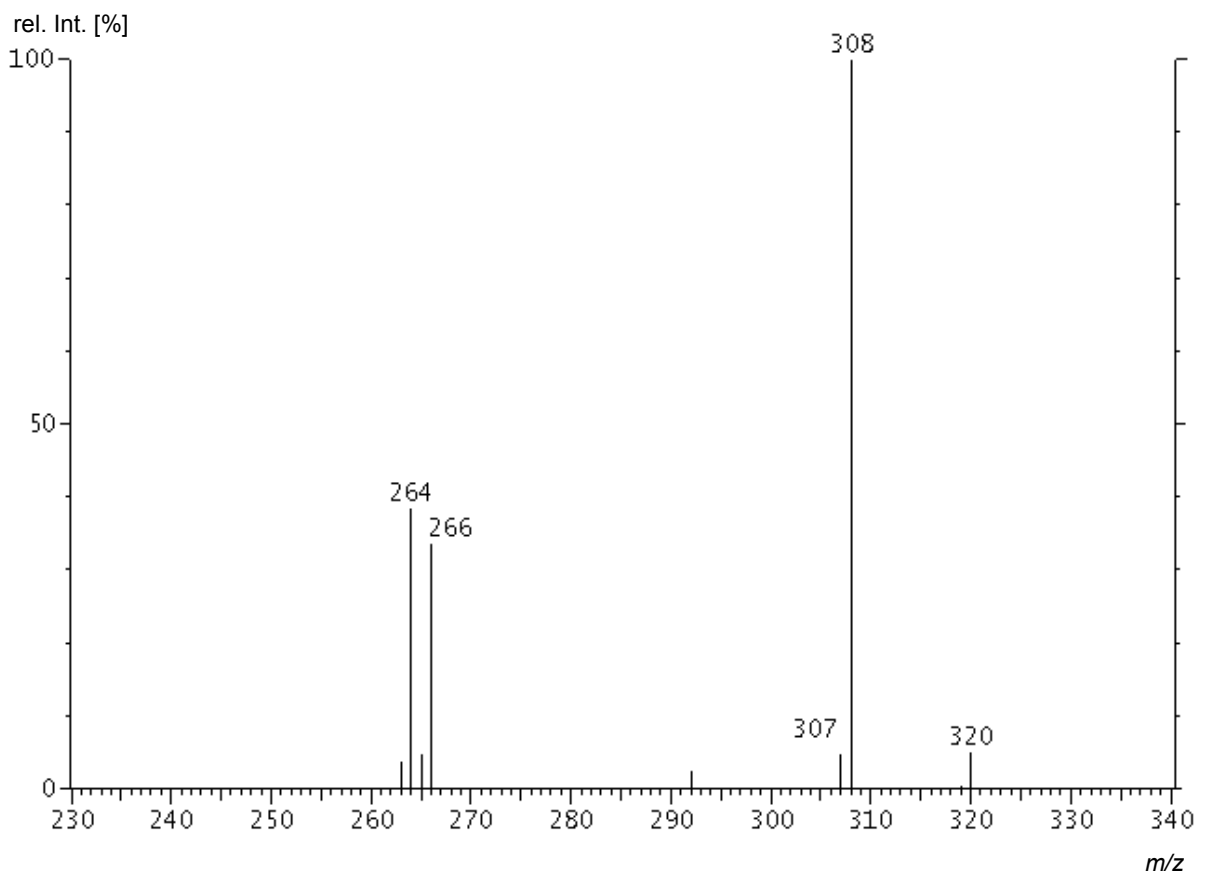


Abb. 24: Produkt-Ionen-Spektrum des unmarkierten Vorläufer-Ions **b** (m/z 336).

Vorläufer-Ion b (<i>m/z</i> 336)				
Produkt-Ion	Normierte Int. [Counts]	W	W (Experiment)	W (Berechnet)
d (<i>m/z</i> 307)	50020	$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0}$	0,050	0,038
d (<i>m/z</i> 308)	949980	$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1}$	0,950	0,962
e (<i>m/z</i> 265)	125068	$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{e}_{265})_{1,1,0}$	0,125	0,113
e (<i>m/z</i> 266)	874932	$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{e}_{266})_{1,0,1}$	0,875	0,886
f (<i>m/z</i> 263)	94304	$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{f}_{263})_{1,1,0}$	0,094	0,075
f (<i>m/z</i> 264)	905696	$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{f}_{264})_{1,0,1}$	0,906	0,924

Tab. 30: Experimentell bestimmte und berechnete Wahrscheinlichkeitsfaktoren W für Vorläufer-Ion **b** (*m/z* 336) der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1). Die Intensitäten der isotopomeren Produkt-Ionen sind in der Summe auf 10⁶ Counts normiert.

Die gemessenen und berechneten (Kap. 8) Wahrscheinlichkeitsfaktoren W für die Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions **b** (*m/z* 336) der unmarkierten Äpfelsäure zeigen eine gute Übereinstimmung (Abweichung ca. 1 %), so daß für weitere Berechnungen auch der anderen Isotopomere des Ions **b** die theoretisch ermittelten Wahrscheinlichkeitsfaktoren W herangezogen werden können.

Referenzmessungen der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1) werden daher nicht benötigt. Ionen aus biologischer Matrix oder vorgelagerte Ionen (Kap. 4.3) der Vorläufer-Ionen fragmentieren zu anderen Produkt-Ionen und stören dadurch nicht die Intensitätsverhältnisse im Produkt-Ionen-Spektrum.

Die Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen **d** bei *m/z* 307 und 308 berechnen sich dann in Abhängigkeit der Konzentrationen PR0 und PR1 folgendermaßen:

$$\text{Int}(307) = \text{PR0} \cdot \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 \cdot W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} + \text{PR1} \cdot \text{NH1fach}([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{336})_0$$

$$\text{Int}(308) = \text{PR0} \cdot \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 \cdot W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} + (\text{PR2} + \text{PR3} + \text{PR4}) \cdot \text{NH1fach}([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{336})_0 +$$

$$R(307,308)_{336} = \text{Int}(307) / \text{Int}(308)$$

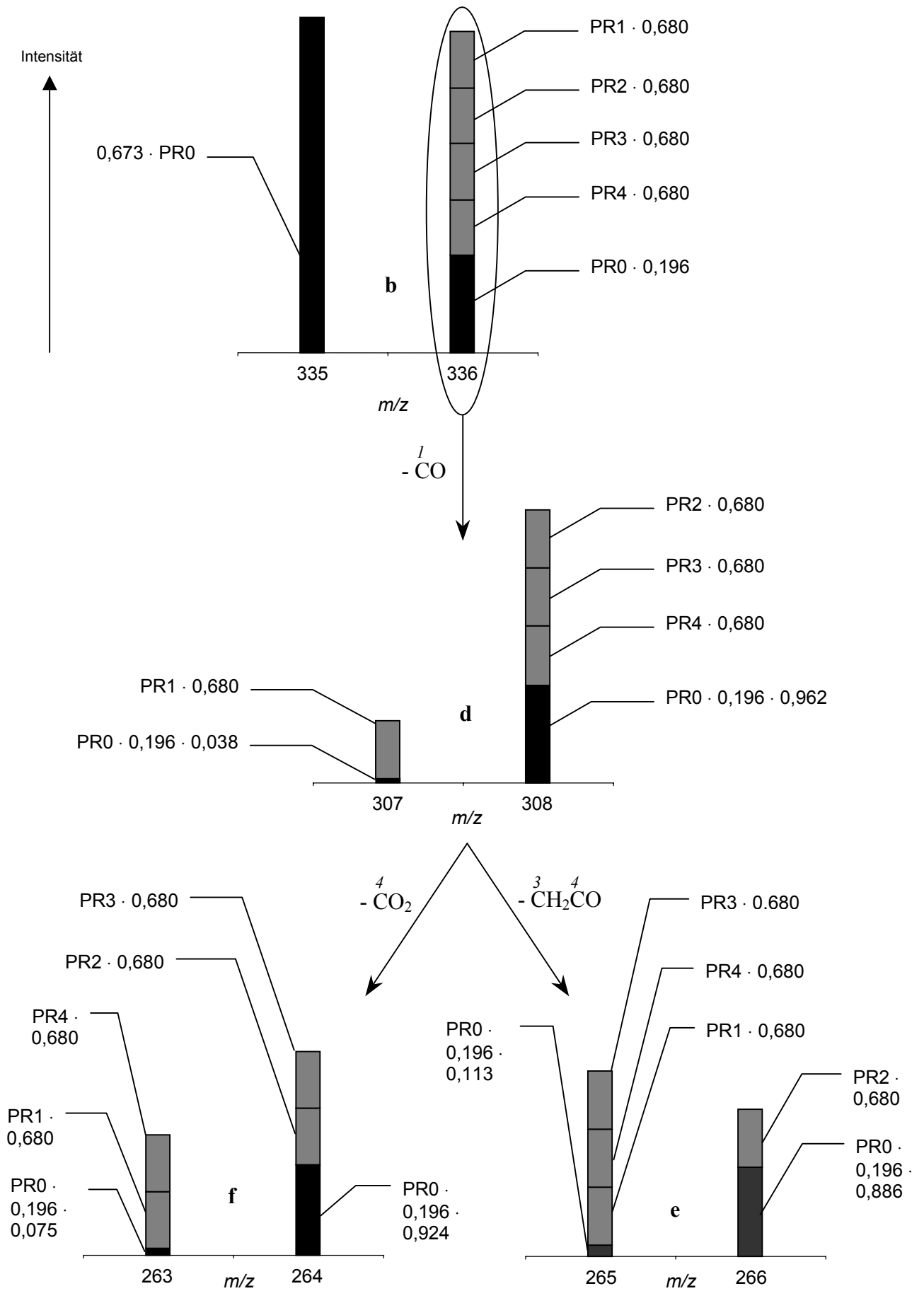
In gleicher Weise lassen sich auch für die weiteren, konsekutiven Fragmentierungsreaktionen der Ionen **d** bei m/z 307 und 308 die Intensitätsverhältnisse $R(265,266)_{336}$, $R(263,264)_{336}$ mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsfaktoren W berechnen (Kap. 8).

In Schema 15 ist gezeigt, wie die Intensitätsverhältnisse mit Hilfe der Wahrscheinlichkeitsfaktoren W und der natürlichen Isotopenhäufigkeiten der Ionen bei gegebenen Anteilen unmarkierter sowie der 1-fach markierter Äpfelsäuren vorausberechnet werden können.

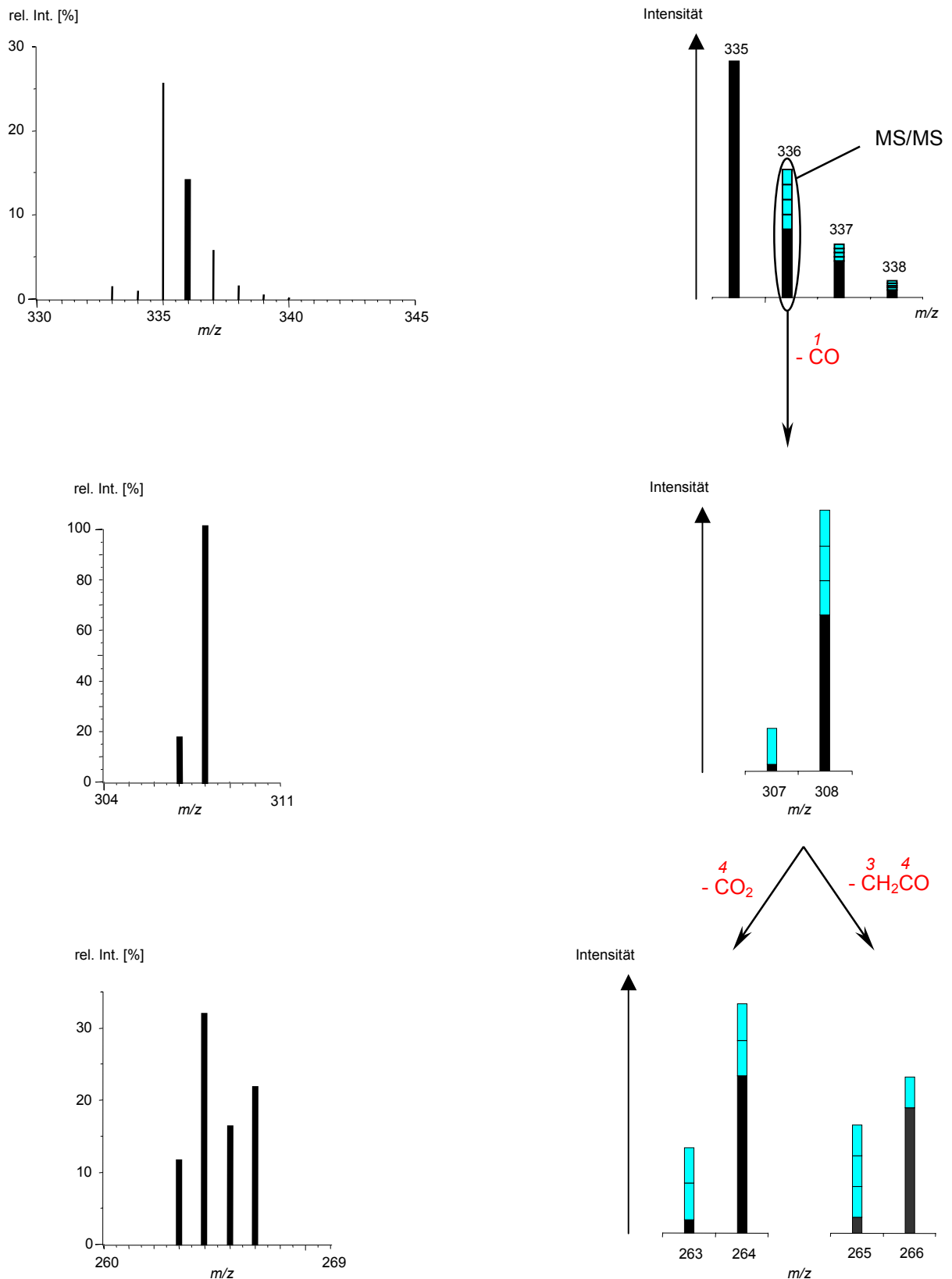
Für eine Mischung der Zusammensetzung $\text{PR0} = 80\%$, $\text{PR1} = 5\%$, $\text{PR2} = 5\%$, $\text{PR3} = 5\%$, und $\text{PR4} = 5\%$ (Mischung G) erhält man die in Tab. 31 dargestellten theoretischen Intensitätsverhältnisse. Die vorausgerechneten und experimentell bestimmten Intensitätsverhältnisse stimmen sehr gut überein (Schema 16).

Intensitätsverhältnis	Berechnetes Intensitätsverhältnis	Gemessenes Intensitätsverhältnis
$R(307,308)_{336}$	0,157	0,160
$R(265,266)_{336}$	0,689	0,712
$R(263,264)_{336}$	0,373	0,381

Tab. 31: Gegenüberstellung der gemessenen und vorausgerechneten Intensitätsverhältnisse einer Äpfelsäuremischung mit $\text{PR0} = 80\%$, $\text{PR1} = 5\%$, $\text{PR2} = 5\%$, $\text{PR3} = 5\%$ und $\text{PR4} = 5\%$ (Mischung G).



Schema 15: Berechnung der Intensitätsverhältnisse im Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (m/z 336).



Schema 16: Gegenüberstellung der gemessenen (links) und theoretischen (rechts) Intensitätsverhältnisse der Vorläufer- und Produkt-Ionen (80 % unmarkierte und jeweils 5 % der 1-fach markierten Äpfelsäuren).

Ebenso lassen sich mit den entsprechenden Wahrscheinlichkeitsfaktoren W auch die Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen für weitere ausgewählte Vorläufer-Ionen berechnen (Kap. 8).

4.4.7.3 Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung aus korrigierten Intensitätsverhältnissen der Produkt-Ionen

Unter der Voraussetzung, daß die registrierten Intensitäten sowohl der Vorläufer-Ionen als auch der Produkt-Ionen proportional zu den Konzentrationsanteilen der einzelnen Äpfelsäuren sind, kann aus der Intensitätssumme isotopomerer Produkt-Ionen durch Multiplikation mit $\text{IAV}(\text{PR}_{m/z})$ (Kap. 4.4.7.1) der Gesamtintensitätsanteil bestimmt werden, der von Ionen mit Markierung aus der natürlichen Isotopenverteilung der Elemente stammt.

Wird $\text{IAV}(\text{PR}_{0_{336}})$ mit den im Produkt-Ionen-Spektrum gemessenen Intensitätssummen der Ionen **d** bei m/z 307 und 308 multipliziert, erhält man den Intensitätsanteil, der dort insgesamt von TMS-Äpfelsäure mit natürlichem Isotopengehalt stammt (IAP):

$$\text{IAP}(\text{PR}_{0(307,308)_{336}}) = (\text{Int}(307) + \text{Int}(308)) \cdot \text{IAV}(\text{PR}_{0_{336}})$$

$\text{Int}(307)$ = Intensität gemessen für m/z 307

$\text{Int}(308)$ = Intensität gemessen für m/z 308

$\text{IAP}(\text{PR}_{0(307,308)_{336}})$ = Intensitätsanteil in den Produkt-Ionen m/z 307 und 308 des Vorläufer-Ions m/z 336, der von PR0 stammt.

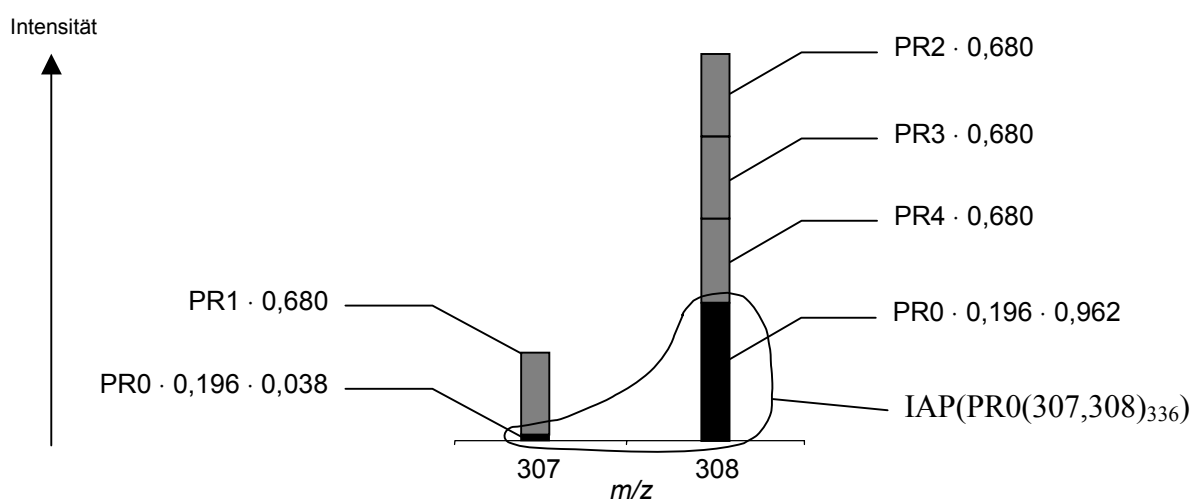


Abb. 25: Bestimmung des Intensitätsanteils in den Produkt-Ionen **d** (m/z 307 und 308) des Vorläufer-Ions **b** (m/z 336), der von Äpfelsäure mit natürlichem Isotopengehalt (hier PR0) stammt.

Mit Hilfe dieser berechneten Intensitätsanteile und den Wahrscheinlichkeitsfaktoren W (Kap. 4.4.7.2) lassen sich die Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen so korrigieren, daß mit den vorgestellten Gleichungssystemen (Kap. 4.4.3) die Konzentrationsanteile der isoto-penmarkierten Äpfelsäuren berechnet werden können.

Zur Korrektur des Intensitätsverhältnisses der Produkt-Ionen ($R_{\text{kor}})$ muß $IAP(PR0(307,308)_{336})$ anteilig von den jeweiligen Intensitäten der Produkt-Ionen-Signale abgezogen werden. Die Anteile entsprechen den Wahrscheinlichkeitsfaktoren W , mit denen eine Markierung aus dem natürlichen Isotopengehalt im eliminierten Neutralteilchen bzw. im entstehenden Produkt-Ion lokalisiert ist.

$$R_{\text{kor}}(307,308)_{336} = \frac{\text{Int}(307) - W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} \cdot IAP(PR0(307,308)_{336})}{\text{Int}(308) - W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} \cdot IAP(PR0(307,308)_{336})}$$

$$R_{\text{kor}}(307,308)_{336} = \frac{\text{Int}(307) - 0.038 \cdot IAP(PR0(307,308)_{336})}{\text{Int}(308) - 0.962 \cdot IAP(PR0(307,308)_{336})} = \frac{PR1}{PR2 + PR3 + PR4}$$

$R_{\text{kor}}(307,308)_{336}$ = Intensitätsverhältnis (R) der Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions \mathbf{b} (m/z 336) bei m/z 307 und m/z 308, korrigiert um den Intensitätsanteil, der von Äpfelsäure mit natürlichen Isotopengehalt stammt.

Man erhält so das Intensitätsverhältnis, wie es von den ausschließlich positionsspezifisch markierten Äpfelsäuren gebildet wird.

Analog erhält man die korrigierten Intensitätsverhältnisse für die weiteren Produkt-Ionen \mathbf{f} und \mathbf{e} des Vorläufer-Ions \mathbf{b} (Anhang) und kann mit diesen die Konzentrationsanteile der einzelnen markierten Äpfelsäuren berechnen (Gl. 7 bis Gl. 10).

Die in Tab. 32 dargestellten gefundenen und eingesetzten Konzentrationsanteile zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Die in der Spalte MS/MS 336 unterstrichenen Werte sind die zur Berechnung bzw. Korrektur (IAP) der Intensitätsverhältnisse benötigten Werte in Gl. 7 bis Gl. 10 (PR1fach, PR0). Sie entsprechen den aus der ¹³C-Einbauratenbestimmung im Massenspektrum gefundenen Werten (Kap. 4.3).

Äpfelsäuren	Gefunden [%]		Eingesetzt [%] Mischung G
	MS	MS/MS 336	
Unmarkiert	79,7	<u>79,7</u>	80,0
1-fach markiert	20,5	<u>20,5</u>	20,0
2-fach markiert	-0,2	-	0,0
3-fach markiert	-0,3	-	0,0
4-fach markiert	0,3	-	0,0
[1- ¹³ C]1	4,9	5,2	5,0
[2- ¹³ C]1	15,6	5,0	5,0
[3- ¹³ C]1		5,2	5,0
[4- ¹³ C]1		5,1	5,0
[1,2- ¹³ C ₂]1		-	0,0
[1,3- ¹³ C ₂]1	-0,1	-	0,0
[1,4- ¹³ C ₂]1		-	0,0
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂]1		0,0	0,0
[2,3,4- ¹³ C ₃]1	0,0	-	0,0
[1,2,3- + 1,2,4- + 1,3,4- ¹³ C ₃]1	-0,3	-	0,0

Tab. 32: Gegenüberstellung der aus dem Massenspektrum und Produkt-Ionen-Spektrum experimentell ermittelten und eingesetzten Konzentrationsanteile ¹³C-markierter Äpfelsäuren.

Die Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen der anderen Vorläufer-Ionen werden in gleicher Weise korrigiert, so daß mit den Gleichungen Gl. 1 bis Gl. 25 die Konzentrationsanteile der genannten ¹³C-markierten Äpfelsäuren berechnet werden können (Kap. 4.4.3 bis 4.4.5). Eine detaillierte Besprechung der erforderlichen Korrekturen für die einzelnen Produkt-Ionen findet sich im Anhang.

4.5 Bestimmung der ^{13}C -Einbaurate und -position in Äpfelsäure (1)

Mit Hilfe der in Kap. 4.4.7 erläuterten Korrekturverfahren können die aus MS/MS-Messungen gewonnenen Intensitätsverhältnisse isotopomerer Produkt-Ionen um den vom natürlichen Isotopengehalt stammenden Intensitätsanteil korrigiert werden. Aus den damit erhaltenen, ausschließlich durch positionsspezifisch markierte Äpfelsäuren erzeugten Intensitätsverhältnissen, werden mit Hilfe von Gleichungssystemen (Kap. 4.4.3 bis Kap. 4.4.5) die relativen Konzentrationsanteile bestimmter ^{13}C -markierter Äpfelsäuren berechnet. Zusammen mit den ^{13}C -Einbauratenbestimmungen, die aus dem Massenspektrum möglich sind, können somit die Konzentrationsanteile folgender ^{13}C -markierter Äpfelsäuren bestimmt werden:

- Unmarkierte Äpfelsäure (PR0fach = PR0)

- [1- ^{13}C]-Äpfelsäure (PR1)
- [2- ^{13}C]-Äpfelsäure (PR2)
- [3- ^{13}C]-Äpfelsäure (PR3)
- [4- ^{13}C]-Äpfelsäure (PR4)

- [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-Äpfelsäure (PR12)
- [1,3- $^{13}\text{C}_2$]-Äpfelsäure (PR13)
- [1,4- $^{13}\text{C}_2$]-Äpfelsäure (PR14)
- Summe der Konzentrationsanteile von:
[2,3- $^{13}\text{C}_2$]-Äpfelsäure + [2,4- $^{13}\text{C}_2$]-Äpfelsäure + [3,4- $^{13}\text{C}_2$]-Äpfelsäure (PR2fn1m)

- [2,3,4- $^{13}\text{C}_3$]-Äpfelsäure (PR234 = PR3fn1m)
- Summe der Konzentrationsanteile von:
[1,3,4- $^{13}\text{C}_3$]-Äpfelsäure + [1,2,4- $^{13}\text{C}_3$]-Äpfelsäure + [1,2,3- $^{13}\text{C}_3$]-Äpfelsäure (PR3f1m)

- [1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$]-Äpfelsäure (PR1234)

Bei der Durchführung der Berechnungen ist jedoch eine Reihenfolge zu beachten (Tab. 33, Tab. 34). Diese ergibt sich dadurch, daß zur Bestimmung der Konzentrationsanteile der isobaren s-fach markierten Äpfelsäuren (PRp) über die Produkt-Ionen-Spektren und die Gleichungen Gl. 1 bis Gl. 25 die Gesamtkonzentration der verschiedenen s-fach markierten

Äpfelsäuren (PR0fach, PR1fach, PR2fach, PR3fach, PR4fach) bekannt sein muß. Diese ist anhand der Massenspektren über die Isotopenmuster der Ionen **b**, **g** und **h** zu bestimmen (Kap. 4.3). Weiterhin müssen zur Korrektur der Produkt-Ionen-Verhältnisse verschiedene Konzentrationsanteile unmarkierter wie markierter Äpfelsäuren bekannt sein.

Einige ^{13}C -Einbauraten lassen sich zudem aus den Produkt-Ionen-Spektren und dem Isotopenmuster der Massenspektren bestimmen (PR1f1m = PR1, PR1fn1m, PR2f1m, PR2fn1m, PR3f1m, PR3fn1m = PR234) (Tab. 33, Tab. 34). Die Vorgehensweise zur Bestimmung der ^{13}C -Einbaurate und -position, d. h. der Konzentrationsanteile unterschiedlich markierten Äpfelsäuren wird im Folgenden erklärt.

4.5.1 Bestimmung der Konzentrationsanteile s-fach markierter Äpfelsäuren

Aus dem Massenspektrum der TMS-derivatisierten Äpfelsäuren lassen sich anhand der Isotopenmuster der Ionen **b** (m/z 335), **g** (m/z 319), und **h** (m/z 245) die relativen Anteile 1-fach, 2-fach, 3-fach und 4-fach markierter ^{13}C -Äpfelsäuren bestimmen (^{13}C -Gesamteinbaurate) (Kap. 4.3). Über die Ionen **c** (m/z 233) und **d** (m/z 307) können anschließend die Anteile in 1-Position markierter bzw. nicht in 1-Position markierter Äpfelsäuren (PR1, PR2f1m, PR3f1m, PR1fn1m, PR2fn1m, PR234) berechnet werden (Tab. 33) (Kap. 4.3.3).

4.5.2 Positionsspezifische ^{13}C -Einbauratenbestimmung der 1-fach markierten Äpfelsäuren

Aus dem Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (m/z 336) lassen sich über die Intensitätsverhältnisse der Isotopomere der Ionen **d**, **e** und **f** mit Hilfe eines Gleichungssystems (Gl. 7 bis Gl. 10, Kap. 4.4.3.1) die Konzentrationsanteile an $[1-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$), $[2-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[2-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$), $[3-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[3-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$) und $[4-^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[4-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$) bestimmen (PR1, PR2, PR3, PR4). Hierzu ist die Kenntnis des Anteils 1-fach markierter Äpfelsäuren (PR1fach) und zur Korrektur der Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen die Kenntnis des Anteils unmarkierter Äpfelsäure (**1**) (PR0fach) erforderlich (Tab. 34 und Tab. 32).

4.5.3 Positionsspezifische ¹³C-Einbauratenbestimmung der 2-fach markierten Äpfelsäuren

Vorläufer-Ion **b** (*m/z* 337)

Aus dem Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (*m/z* 337) wird der Anteil 2-fach markierter Äpfelsäure bestimmt, der in 1-Position markiert (PR2f1m) bzw. nicht markiert ist (PR2fn1m) (Gl. 2 und Gl. 17, Kap. 4.4.4.1). Die MS/MS-Methode stellt damit neben der Bestimmung aus dem Massenspektrum (Kap. 4.3.3) eine zweite Möglichkeit dar, diese Anteile zu bestimmen. Zur Berechnung müssen der Anteil 2-fach markierter Äpfelsäuren bekannt sein (PR2fach) und zur Korrektur der Produkt-Ionen-Verhältnisse die Konzentrationsanteile PR0fach, PR1f1m und PR1fn1m (Tab. 34).

Vorläufer-Ion **d** (*m/z* 308) und **c** (*m/z* 234)

Die Produkt-Ionen-Spektren der Vorläufer-Ionen **d** (*m/z* 308) und **c** (*m/z* 234) lassen sich zur Bestimmung von PR12, PR13 und PR14 heranziehen (Gl. 20 bis Gl. 22, Kap. 4.4.4.2). Die hierfür erforderlichen Konzentrationsanteile sind PR2f1m sowie zur Korrektur des Produkt-Ionen-Verhältnisses die Konzentrationsanteile PR0fach, PR1, PR2, PR3 und PR4 (Tab. 34).

In Abwesenheit 2-fach markierter Äpfelsäure können die Produkt-Ionen-Spektren auch zur Bestimmung der Konzentrationsanteile PR2, PR3 und PR4 herangezogen werden. Dies ist jedoch bei den biologischen Proben nicht der Fall, so daß das Spektrum in der Praxis nur zur Bestimmung der 2-fach markierten Äpfelsäuren eingesetzt werden kann.

4.5.4 Positionsspezifische ¹³C-Einbauratenbestimmung der 3-fach markierten Äpfelsäuren

Über das Intensitätsverhältnis der im Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (*m/z* 338) gebildeten Produkt-Ionen **d** (*m/z* 308 und 309) kann der Anteil 3-fach markierter Äpfelsäure bestimmt werden, der in 1-Position markiert (PR3f1m), bzw. nicht markiert ist (PR3fn1m = PR234) (Gl. 3 und Gl. 25, Kap. 4.4.5.1). Erforderliche Konzentrationsanteile sind PR3fach sowie zur Korrektur der Produkt-Ionen-Verhältnisse PR0fach, PR1, PR1fn1m, PR2f1m und PR2fn1m (Tab. 34).

Abfolge der Berechnungen	Zur Bestimmung der ¹³ C-Einbaurrate verwendete Ionen	Zur Berechnung erforderliche Konzentrationsanteile	Bestimmbare Konzentrationsanteile ¹³ C-markierter Äpfelsäure
1.	b (<i>m/z</i> 335), g (<i>m/z</i> 319), h (<i>m/z</i> 245)	Keine	PR0fach, PR1fach, PR2fach, PR3fach, PR4fach
2.	d (<i>m/z</i> 307), c (<i>m/z</i> 233)	PR0fach, PR1fach, PR2fach, PR3fach	PR1f1m (= PR1), PR1f1m PR2f1m, PR2f1m PR3f1m, PR3f1m (= PR234)

Tab. 33: Aus dem Massenspektrum bestimmbare Konzentrationsanteile ¹³C-markierter Äpfelsäuren.

Abfolge der Berechnungen	Vorläufer-Ion	Verwendete Produkt-Ionen-Verhältnisse	Zur Berechnung erforderliche Konzentrationsanteile	Bestimmbare Konzentrationsanteile ¹³ C-markierter Äpfelsäure
3.	b (<i>m/z</i> 336)	R(307,308) ₃₃₆ , R(265,266) ₃₃₆ , R(263,264) ₃₃₆	PR0fach, PR1fach	PR1, PR2, PR3, PR4
4., 5., 6.	b (<i>m/z</i> 337)	R(308,309) ₃₃₇	PR0fach, PR2fach, PR1, PR1f1m	PR2f1m, PR2f1m
4., 5., 6.	d (<i>m/z</i> 308) c (<i>m/z</i> 234)	R(265,266) ₃₀₈ , R(263,264) ₃₀₈ R(192,191) ₂₃₄ , R(190,189) ₂₃₄	PR0fach, PR2f1m, PR1, PR2, PR3, PR4	PR12, PR13, PR14
4., 5., 6.	b (<i>m/z</i> 338)	R(309,310) ₃₃₈	PR0fach, PR3fach, PR1f1m, PR1, PR2f1m, PR2f1m	PR234, PR3f1m

Tab. 34: Mit der MS/MS-Technik bestimmbare Konzentrationsanteile ¹³C-markierter Äpfelsäuren.

4.5.5 Untersuchung verschiedener Mischungen

Zur Überprüfung der entwickelten Methode wurden die beschriebenen Messungen (Kap. 4.5.1 bis Kap. 4.5.4) an verschiedenen Mischungen ¹³C-markierter Äpfelsäure durchgeführt (Tab. 35). Bei Mischungen, die keine mehrfach markierten Äpfelsäuren enthalten, wurde zusätzlich das Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **d** (*m/z* 308) und teilweise die des Vorläufer-Ions **c** (*m/z* 234) zur Bestimmung von PR2, PR3 und PR4 herangezogen.

Mischung	PR0	PR1	PR2	PR3	PR4	PR14	PR134
G	80,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-
H	90,0	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-
I	95,0	1,25	1,25	1,25	1,25	-	-
J	75,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-
K	65,0	11,0	2,0	2,0	11,0	7,0	2,0
P	20,0	20,0	20	20	20	-	-
Q	85,0	3,75	3,75	3,75	3,75	-	-

Tab. 35: Zur Überprüfung der ¹³C-Einbauratenbestimmung über Produkt-Ionen-Verhältnisse herangezogene Mischungen.

Unterwirft man die gemessenen Signalintensitäten der Produkt-Ionen den beschriebenen Korrekturen (Kap. 4.4.7), erhält man die Konzentrationsverhältnisse der isobaren, positionspezifisch ¹³C-markierten Äpfelsäuren. Über die entsprechenden Gleichungssysteme (Kap. 4.4.3 bis Kap. 4.4.5) lassen sich daraus die relativen Konzentrationsanteile und damit die Zusammensetzung der Äpfelsäure-Mischungen bestimmen (Tab. 36 bis Tab. 38, Mischung K siehe Tab. 42, Mischung H siehe Tab. 43, Kap. 4.6). Die bei den einzelnen MS/MS-Messungen zur Berechnung der ¹³C-Einbauraten verwendeten Konzentrationsanteile sind unterstrichen dargestellt.

Die über MS/MS-Messungen der Vorläufer-Ionen **b** (*m/z* 336, 337, 338) und **d** (*m/z* 308) erhaltenen Konzentrationsanteile zeigen eine gute Übereinstimmung mit den eingesetzten Konzentrationen. Die absoluten Abweichungen liegen bei den Mischungen mit ähnlicher Zusammensetzung wie die zu erwartenden biologischen Proben [73] (Tab. 35, außer Mischung P) bei maximal 0,9 % (Mischung K). Die Standardabweichungen (STAW) für die einzelnen Messungen betragen im Mittel ca. 3 % (B Experimenteller Teil, Kap. 7). Konzentrationsanteile, die sowohl über das Massenspektrum als auch über die MS/MS-Methode bestimmt werden können (Kap. 4.5), zeigen bei letzterer meist eine größere Übereinstim-

mung mit den eingesetzten Konzentrationsanteilen, da störende Einflüsse vorgelagerter Ionen hier entfallen (Kap 4.3).

Die Abweichungen bei der ¹³C-Einbauratenbestimmung über das Vorläufer-Ion **c** (*m/z* 234) sind besonders bei hohen Konzentrationsanteilen unmarkierter Äpfelsäure (**1**) groß (maximal 2,6 %, Mischung G und Q). Die Ergebnisse sind zudem schlecht reproduzierbar. Dies ist auf Intensitätsschwankungen der Produkt-Ionen-Signale für **i** und **j** zurückzuführen, die auch eine reproduzierbare experimentelle Bestimmung der Wahrscheinlichkeitsfaktoren **W** verhindern (Kap. 8.5). Die über Vorläufer-Ion **c** (*m/z* 234) bestimmbaren Konzentrationsanteile isotopenmarkierter Äpfelsäuren sind ebenso über Vorläufer-Ion **d** (*m/z* 308) zu erhalten, so daß keine Einschränkungen bei der ¹³C-Einbauratenbestimmung entstehen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung der relativen Konzentrationsanteile von Mischungen ¹³C-markierten Äpfelsäuren ist somit für die Untersuchung biologischer Proben geeignet.

Äpfelsäuren	Mischung				
	Gefunden				Mischung Q
	MS	MS/MS 336	MS/MS 308	MS/MS 234	
Unmarkiert	84,3	<u>84,3</u>	<u>84,3</u>	<u>84,3</u>	85,0
1-fach markiert	15,7	<u>15,7</u>	<u>15,7</u>	<u>15,7</u>	15,0
2-fach markiert	0,2	-	-	-	0,0
3-fach markiert	-0,2	-	-	-	0,0
4-fach markiert	0,0	-	-	-	0,0
[1- ¹³ C] 1	4,7	3,9	<u>3,9</u>	<u>3,9</u>	3,75
[2- ¹³ C] 1	11,0	3,6	3,8	2,1	3,75
[3- ¹³ C] 1		3,7	3,9	4,1	3,75
[4- ¹³ C] 1		4,5	4,1	5,6	3,75
[1,2- ¹³ C ₂] 1	0,2	-	-	-	0,0
[1,3- ¹³ C ₂] 1		-	-	-	0,0
[1,4- ¹³ C ₂] 1		-	-	-	0,0
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂] 1	0,0	-	-	-	0,0
[2,3,4- ¹³ C ₃] 1	-0,3	-	-	-	0,0
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- ¹³ C ₃] 1	0,1	-	-	-	0,0

Tab. 36: Experimentell ermittelte Konzentrationsanteile von Mischungen unmarkierter und ¹³C-markierter Äpfelsäuren.

Äpfelsäuren	Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ¹³ C-markierter Äpfelsäuren											
	Gefunden					Mi- schung	Gefunden					Mi- schung
	MS	MS/MS 336	MS/MS 308	MS/MS 234	P		MS	MS/MS 336	MS/MS 308	MS/MS 234	G	
Umarkiert	19,6	<u>19,6</u>	<u>19,6</u>	<u>19,6</u>	20,0	79,7	<u>79,7</u>	<u>79,7</u>	<u>79,7</u>	80,0		
1-fach markiert	81,2	<u>81,2</u>	<u>81,2</u>	<u>81,2</u>	80,0	20,5	<u>20,5</u>	<u>20,5</u>	<u>20,5</u>	20,0		
2-fach markiert	-0,4	-	-	-	0,0	-0,2	-	-	-	0,0		
3-fach markiert	-0,5	-	-	-	0,0	-0,3	-	-	-	0,0		
4-fach markiert	0,1	-	-	-	0,0	0,3	-	-	-	0,0		
[1- ¹³ C]1	21,3	19,9	<u>19,9</u>	<u>19,9</u>	20,0	4,9	5,2	<u>5,2</u>	<u>5,2</u>	5,0		
[2- ¹³ C]1		20,1	19,4	19,3	20,0		5,0	4,9	2,6	5,0		
[3- ¹³ C]1	59,9	21,4	21,9	21,1	20,0	15,6	5,2	5,5	5,1	5,0		
[4- ¹³ C]1		19,8	20,2	20,9	20,0		5,1	5,0	7,6	5,0		
[1,2- ¹³ C ₂]1		-	-	-	0,0		-	-	-	0,0		
[1,3- ¹³ C ₂]1	-0,4	-	-	-	0,0	-0,1	-	-	-	0,0		
[1,4- ¹³ C ₂]1		-	-	-	0,0		-	-	-	0,0		
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂]1	-0,1	-	-	-	0,0	0,0	-	-	-	0,0		
[2,3,4- ¹³ C ₃]1	0,3	-	-	-	0,0	0,0	-	-	-	0,0		
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- ¹³ C ₃]1	-0,8	-	-	-	0,0	-0,3	-	-	-	0,0		

Tab. 37: Experimentell ermittelte Konzentrationsanteile von Mischungen unmarkierter und ¹³C-markierter Äpfelsäuren.

Äpfelsäuren	Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ¹³ C-markierter Äpfelsäuren									
	Gefunden				Mi- schung	Gefunden				Mi- schung
	MS	MS/MS 336	MS/MS 308	I		MS	MS/MS 336	MS/MS 337	MS/MS 308	
Unmarkiert	94,2	<u>94,2</u>	<u>94,2</u>	95,0	75,0	<u>75,0</u>	<u>75,0</u>	<u>75,0</u>	75,0	
1-fach markiert	5,5	<u>5,5</u>	<u>5,5</u>	5,0	20,8	<u>20,8</u>	<u>20,8</u>	<u>20,8</u>	20,0	
2-fach markiert	0,2	-	-	0,0	4,6	-	<u>4,6</u>	<u>4,6</u>	5,0	
3-fach markiert	0,2	-	-	0,0	-0,2	-	-	-	0,0	
4-fach markiert	-0,1	-	-	0,0	-0,2	-	-	-	0,0	
[1- ¹³ C]1	2,3	1,9	<u>1,9</u>	1,25	4,9	5,4	<u>5,4</u>	<u>5,4</u>	5,0	
[2- ¹³ C]1		1,4	1,4	1,25		4,9	<u>4,9</u>	<u>4,9</u>	5,0	
[3- ¹³ C]1	3,2	0,9	1,0	1,25	16,0	4,7	<u>4,7</u>	<u>4,7</u>	5,0	
[4- ¹³ C]1		1,3	1,2	1,25		5,7	<u>5,7</u>	<u>5,7</u>	5,0	
[1,2- ¹³ C ₂]1		-	-	0,0		-	-	-0,4	0,0	
[1,3- ¹³ C ₂]1	0,1	-	-	0,0	4,0	-	5,2	0,8	0,0	
[1,4- ¹³ C ₂]1		-	-	0,0		-		4,7	5,0	
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂]1	-0,4	-	-	0,0	0,5	-	-0,6	<u>-0,5</u>	0,0	
[2,3,4- ¹³ C ₃]1	0,0	-	-	0,0	-0,5	-	-	-	0,0	
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- ¹³ C ₃]1	0,2	-	-	0,0	0,3	-	-	-	0,0	

Tab. 38: Experimentell ermittelte Konzentrationsanteile von Mischungen unmarkierter und ¹³C-markierter Äpfelsäuren.

4.6 Biologische Proben

Die untersuchten biologischen Proben stammen von den CAM-Pflanzen *Kalanchoe pinnata* und *Clusia minor*, die unter Lichteinstrahlung während der Dunkelperiode (12 h) bei 30 °C mit $^{13}\text{CO}_2$ gefüttert wurden [73]. Von *Kalanchoe pinnata* standen zwei Proben zur Verfügung (*Kalanchoe pinnata* I und II), von *Clusia minor* drei Proben (*Clusia minor* I, II und III). Die Bestimmung der Einbauraten wurde in gleicher Weise durchgeführt wie bei den Mischungen positionsspezifisch markierten Äpfelsäuren (Kap. 4.5.5). Die zur Bestimmung der Konzentrationsanteile der 2-fach und 3-fach markierten Äpfelsäuren erforderlichen MS/MS-Messungen (MS/MS 337, MS/MS 308, MS/MS 338) wurden nicht durchgeführt, wenn ihr Konzentrationsanteil in der Mischung so gering war (*Kalanchoe pinnata* I und *Clusia minor* I), daß die zu erwartenden Ergebnisse für die einzelnen Isotopomere innerhalb des absoluten Fehlers von ca. 1 % lagen (Kap. 4.5.5). Die gefundenen ^{13}C -Einbauraten der biologischen Proben sind in Tab. 39 zusammengefaßt. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen werden in Tab. 40 und Tab. 41 dargestellt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden Mischungen der unmarkierten und positionsspezifisch ^{13}C -markierten Äpfelsäuren mit ähnlicher Zusammensetzung wie die biologischen Proben vermessen (Mischungen Tab. 42 und Tab. 43). Von besonderem Interesse war hierbei die Überprüfung der in 2- und 3-Position gefundenen Einbauraten.

4.6.1 ^{13}C -Gesamteinbauraten

Der Konzentrationsanteil der unmarkierten Äpfelsäure (**1**) reicht bei den vermessenen Proben von 48 % (*Kalanchoe pinnata* II) bis 86 % (*Kalanchoe pinnata* II), die Konzentrationsanteile der markierten Äpfelsäuren fallen von den 1-fach ^{13}C -markierten zur 4-fach ^{13}C -markierten Äpfelsäure ab (Tab. 39).

Die niedrigsten Anteile markierter Äpfelsäuren weist die Probe *Kalanchoe pinnata* I mit 11 % 1-fach markierten und 2,5 % 2-fach markierten Äpfelsäuren auf. 3-fach und 4-fach markierte Äpfelsäuren liegen hier nicht vor. Die Probe *Clusia minor* I zeigt kein gesichertes Vorliegen von 2-fach, 3-fach und 4-fach markierten Äpfelsäuren.

Bis auf die Probe *Kalanchoe pinnata* I enthalten die weiteren Proben die 1-fach markierten Äpfelsäuren im Bereich von 24 %.

Nur für die Probe *Kalanchoe pinnata* II (2,8 % [1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$]Äpfelsäure ([1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$]**1**)) kann eine gesicherte Aussage über die Anwesenheit von 4-fach markierter Äpfelsäure getroffen werden.

Die erhaltenen ^{13}C -Gesamteinbauraten stimmen mit den auf einem Varian MAT 212 Sektorfeld-Massenspektrometer im Rahmen einer früheren Arbeit gemessenen Ergebnissen überein [73].

Äpfelsäuren	Biologische Proben				
	<i>Kalanchoe pinnata</i> I	<i>Kalanchoe pinnata</i> II	<i>Clusia minor</i> I	<i>Clusia minor</i> II	<i>Clusia minor</i> III
Unmarkiert	86,4	48,2	72,5	64,8	63,2
1-fach markiert	11,0	22,4	26,0	23,2	24,7
2-fach markiert	2,5	17,7	1,3	8,7	7,5
3-fach markiert	0,2	9,0	0,4	2,8	2,8
4-fach markiert	0,1	2,8	-0,2	0,5	1,7
[1- ^{13}C]1	3,2	8,9	13,3	10,3	11,3
[2- ^{13}C]1	2,8	2,2	-1,3	1,1	0,0
[3- ^{13}C]1	2,4	2,9	1,0	1,3	1,5
[4- ^{13}C]1	2,6	8,4	13,0	10,5	11,9
[1,2- $^{13}\text{C}_2$]1		2,4		1,0	1,3
[1,3- $^{13}\text{C}_2$]1	-	2,3	-	2,1	0,8
[1,4- $^{13}\text{C}_2$]1		7,9		3,4	4,2
[2,3+2,4+3,4- $^{13}\text{C}_2$]1	-	5,1	-	2,2	1,2
[2,3,4- $^{13}\text{C}_3$]1	-	2,0	-	0,6	0,2
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- $^{13}\text{C}_3$]1	-	7,0	-	2,2	2,6

Tab. 39: ^{13}C -Einbauraten bei CAM-Pflanzen nach Fütterung mit $^{13}\text{CO}_2$.

4.6.2 1-fach markierte Äpfelsäuren

Die Konzentrationsanteile der 1-fach markierten Äpfelsäuren (Tab. 39) zeigen eindeutig, daß neben dem erwarteten Einbau in 4-Position vor allem die 1-Position und in geringerem Maße auch die 2- und 3-Position einen ^{13}C -Einbau aufweisen. Mit Ausnahme der Probe *Kalanchoe pinnata* I, wo die vier 1-fach markierten Äpfelsäuren mit ungefähr gleichen Konzentrationsanteilen vorliegen, zeigen die anderen Proben jeweils zwischen der [1- ^{13}C]1 und [4- ^{13}C]1 bzw. der [2- ^{13}C]1 und [3- ^{13}C]1 ein 1:1-Verhältnis.

Die Vergleichsmessungen mit den Mischungen R, K, H und S (Tab. 42 und Tab. 43) zeigen, daß der Einbau in der 2- und 3-Position der 1-fach markierten Äpfelsäuren nur für die Proben *Kalanchoe pinnata* I und II abgesichert ist. Die ^{13}C -Einbauraten bei den Proben von *Clusia minor* liegen im Bereich des absoluten Fehlers von maximal 1,3 %, der in 2- und 3-Position bei den synthetischen Vergleichsproben R, K, H und S gefunden wird.

4.6.3 2-fach markierte Äpfelsäuren

Die Einbauratenbestimmungen aus den Massenspektren zeigen eindeutig, daß mindestens 65 % der 2-fach markierten Äpfelsäuren eine der beiden Markierungen in 1-Position tragen. Die bei den Proben *Kalanchoe pinnata* II, *Clusia minor* II und III durchgeführten Messungen zur Bestimmung der Einbauraten der 2-fach markierten Äpfelsäuren zeigen eindeutig, daß die $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ Äpfelsäure ($[1,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$) hierbei jeweils mit dem größten Konzentrationsanteil vorliegt.

4.6.4 3-fach markierte Äpfelsäuren

Der größte Teil der 3-fach markierten Äpfelsäuren trägt eine Markierung in 1-Position. Der Anteil an $[2,3,4-^{13}\text{C}_3]$ Äpfelsäure ($[2,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$) ist ca. 3 mal bis 4 mal kleiner als der Anteil der 3-fach markierten Äpfelsäuren, die eine Markierung in 1-Position tragen.

Während der Einbau in 1-Position auf die statistische Umverteilung durch Fumarase zurückgeführt wird [5, 7], liegt für den Einbau in 2- und 3-Position keine biosynthetische Interpretation vor. Diese Ergebnisse können nicht mit dem bisher formulierten CO_2 /Äpfelsäure-Metabolismus [1] erklärt werden. Weitere Fütterungsexperimente sind erforderlich, um den CO_2 -Metabolismus bei CAM-Pflanzen zu interpretieren. Ein von der Pflanzenart abhängiges Einbaumuster konnte nicht festgestellt werden.

Äpfelsäuren	Biologische Proben									
	Clusia minor II					Clusia minor III				
	MS	MS/MS 336	MS/MS 337	MS/MS 308	MS/MS 338	MS	MS/MS 336	MS/MS 337	MS/MS 308	MS/MS 308
Unmarkiert	64,8	<u>64,8</u>	<u>64,8</u>	<u>64,8</u>	<u>64,8</u>	63,2	<u>63,2</u>	<u>63,2</u>	<u>63,2</u>	<u>63,2</u>
1-fach markiert	23,2	<u>23,2</u>	<u>23,2</u>	<u>23,2</u>	<u>23,2</u>	24,7	<u>24,7</u>	<u>24,7</u>	<u>24,7</u>	<u>24,7</u>
2-fach markiert	8,7	-	<u>8,7</u>	<u>8,7</u>	<u>8,7</u>	7,5	-	<u>7,5</u>	<u>7,5</u>	<u>7,5</u>
3-fach markiert	2,8	-	-	-	<u>2,8</u>	2,8	-	-	-	<u>2,8</u>
4-fach markiert	0,5	-	-	-	-	1,7	-	-	-	-
[1- ¹³ C]1	9,4	10,3	<u>10,3</u>	<u>10,3</u>	<u>10,3</u>	10,6	11,3	<u>11,3</u>	<u>11,3</u>	<u>11,3</u>
[2- ¹³ C]1		1,1	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>	<u>1,1</u>		0,0	<u>0,0</u>	<u>0,0</u>	<u>0,0</u>
[3- ¹³ C]1	13,7	1,3	<u>1,3</u>	<u>1,3</u>	<u>1,3</u>	14,1	1,5	<u>1,5</u>	<u>1,5</u>	<u>1,5</u>
[4- ¹³ C]1		10,5	<u>10,5</u>	<u>10,5</u>	<u>10,5</u>		11,9	<u>11,9</u>	<u>11,9</u>	<u>11,9</u>
[1,2- ¹³ C ₂]1		-		1,0			-		1,3	
[1,3- ¹³ C ₂]1	5,5	-	6,6	2,2	<u>6,6</u>	6,3	-	6,3	0,8	<u>6,3</u>
[1,4- ¹³ C ₂]1		-		3,4			-		4,2	
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂]1	3,2	-	2,1	2,1	<u>2,1</u>	1,2	-	1,2	<u>1,2</u>	<u>1,2</u>
[2,3,4- ¹³ C ₃]1	0,5	-			0,6	-0,6	-	-	-	0,2
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- ¹³ C ₃]1	2,3	-	-	-	2,2	3,4	-	-	-	2,6

Tab. 40: Ergebnisse, der an biologischen Proben durchgeführten Messungen.

Äpfelsäuren	Biologische Proben											
	Kalanchoe pinnata I				Kalanchoe pinnata II				Clusia minor I			
	MS	MS/MS 336	MS	MS/MS 336	MS/MS 337	MS/MS 308	MS/MS 338	MS	MS/MS 336			
Unmarkiert	86,4	<u>86,4</u>	48,2	<u>48,2</u>	<u>48,2</u>	<u>48,2</u>	<u>48,2</u>	75,5	<u>75,5</u>			
1-fach markiert	11,0	<u>11,0</u>	22,4	<u>22,4</u>	<u>22,4</u>	<u>22,4</u>	22,4	26,0	<u>26,0</u>			
2-fach markiert	2,5	-	17,7	-	<u>17,7</u>	<u>17,7</u>	17,7	1,3	-			
3-fach markiert	0,2	-	9,0	-	-	-	<u>9,0</u>	0,4	-			
4-fach markiert	-0,1	-	2,7	-	-	-	-	-0,2	-			
[1- ¹³ C]1	4,2	3,2	9,1	8,9	<u>8,9</u>	<u>8,9</u>	<u>8,9</u>	13,3	13,3			
[2- ¹³ C]1		2,8		2,2	<u>2,2</u>	<u>2,2</u>	<u>2,2</u>		-1,3			
[3- ¹³ C]1	6,8	2,4	13,5	2,9	<u>2,9</u>	<u>2,9</u>	<u>2,9</u>	12,6	1,0			
[4- ¹³ C]1		2,6		8,4	<u>8,4</u>	<u>8,4</u>	<u>8,4</u>		13,0			
[1,2- ¹³ C ₂]1		-		-	2,4				-			
[1,3- ¹³ C ₂]1	1,5	-	11,4	-	12,6	2,3	<u>12,6</u>	1,7	-			
[1,4- ¹³ C ₂]1		-		-	7,9				-			
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂]1	1,0	-	6,3	-	5,1	<u>5,1</u>	<u>5,1</u>	-0,3	-			
[2,3,4- ¹³ C ₃]1	0,0	-	2,4	-	-	-	2,0	0,2	-			
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- ¹³ C ₃]1	0,2	-	6,5	-	-	-	7,0	0,2	-			

Tab. 41: Ergebnisse, der an biologischen Proben durchgeführten Messungen.

Äpfelsäuren	Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ¹³ C-markierter Äpfelsäuren													
	Gefunden						Mi- schung R	Gefunden						Mi- schung K
	MS	MS/MS 336	MS/MS 337	MS/MS 308	MS/MS 338	MS		MS/MS 336	MS/MS 337	MS/MS 308	MS/MS 338			
Unmarkiert	65,8	<u>65,8</u>	<u>65,8</u>	<u>65,8</u>	<u>65,8</u>	65,0	64,8	<u>64,8</u>	<u>64,8</u>	<u>64,8</u>	<u>64,8</u>	65,0		
1-fach markiert	23,0	<u>23,0</u>	<u>23,0</u>	<u>23,0</u>	<u>23,0</u>	22,0	26,2	<u>26,2</u>	<u>26,2</u>	<u>26,2</u>	<u>26,2</u>	26,0		
2-fach markiert	8,2		<u>8,2</u>	<u>8,2</u>	<u>8,2</u>	9,0	7,3		<u>7,3</u>	<u>7,3</u>	<u>7,3</u>	7,0		
3-fach markiert	3,2				<u>3,2</u>	4,0	1,7				<u>1,7</u>	2,0		
4-fach markiert	-0,2					0,0	0,0					0,0		
[1- ¹³ C]1	12,3	10,9	<u>10,9</u>	<u>10,9</u>	<u>10,9</u>	11,0	11,5	11,2	<u>11,2</u>	<u>11,2</u>	<u>11,2</u>	11,0		
[2- ¹³ C]1		0,4	<u>0,4</u>	<u>0,4</u>	<u>0,4</u>	0,0	1,7	1,7	<u>1,7</u>	<u>1,7</u>	<u>1,7</u>	2,0		
[3- ¹³ C]1	10,7	0,4	<u>0,4</u>	<u>0,4</u>	<u>0,4</u>	0,0	14,7	1,4	<u>1,4</u>	<u>1,4</u>	<u>1,4</u>	2,0		
[4- ¹³ C]1		11,3	<u>11,3</u>	<u>11,3</u>	<u>11,3</u>	11,0	11,9	<u>11,9</u>	<u>11,9</u>	<u>11,9</u>	<u>11,9</u>	11,0		
[1,2- ¹³ C ₂]1				-1,7		0,0			0,1			0,0		
[1,3- ¹³ C ₂]1	8,4		8,2	-0,1	<u>8,2</u>	0,0	7,5		6,6	0,2	<u>6,6</u>	0,0		
[1,4- ¹³ C ₂]1				10,0		9,0			6,3			7,0		
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂]1	-0,2		0,0	<u>0,0</u>	<u>0,0</u>	0,0	-0,2		0,7	<u>0,7</u>	<u>0,7</u>	0,0		
[2,3,4- ¹³ C ₃]1	0,2				0,0	0,0	0,0					0,0		
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- ¹³ C ₃]1	3,0				3,0	4,0	1,7				1,7	2,0		

Tab. 42: Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ¹³C-markierter Äpfelsäuren ähnlicher Zusammensetzung wie biologische Proben *Clusia minor* I, II, III und *Kalanchoe pinnata* II.

Äpfelsäuren	Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ¹³ C-markierter Äpfelsäuren							
	MS	Gefunden		Mischung H	Gefunden		Mischung S	
		MS/MS 336	MS/MS 308		MS	MS/MS 336		
Unmarkiert	89,6	<u>89,6</u>	<u>89,6</u>	90,0	86,0	<u>86,0</u>	87,0	
1-fach markiert	10,1	<u>10,1</u>	<u>10,1</u>	10,0	10,7	<u>10,7</u>	10,0	
2-fach markiert	0,2	-	-	0,0	3,1		3,0	
3-fach markiert	0,2	-	-	0,0	0,2		0,0	
4-fach markiert	-0,1	-	-	0,0	0,0		0,0	
[1- ¹³ C]1	3,5	2,8	<u>2,8</u>	2,5	6,6	4,9	5,0	
[2- ¹³ C]1		2,5	2,5	2,5		0,8	0,0	
[3- ¹³ C]1	6,6	1,7	2,0	2,5	4,0	-1,3	0,0	
[4- ¹³ C]1		3,2	2,9	2,5		6,4	5,0	
[1,2- ¹³ C ₂]1		-	-	0,0			0,0	
[1,3- ¹³ C ₂]1	0,4	-	-	0,0	3,7		0,0	
[1,4- ¹³ C ₂]1		-	-	0,0			3,0	
[2,3+2,4+3,4- ¹³ C ₂]1	-0,2	-	-	0,0	-0,6		0,0	
[2,3,4- ¹³ C ₃]1	0,1	-	-	0,0	0,3		0,0	
[1,2,3+1,2,4+1,3,4- ¹³ C ₃]1	0,1	-	-	0,0	-0,1		0,0	

Tab. 43: Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ¹³C-markierter Äpfelsäuren ähnlicher Zusammensetzung wie biologische Probe *Kalanchoe pinnata* I

5 Zusammenfassung

Die Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC-MS) bzw. der Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) stellt eine ideale Analysenmethode zur Untersuchung des Äpfelsäuremetabolismus von CAM-Pflanzen dar. Sie ermöglicht bei geringsten Substanzmengen aus der biologischen Matrix Trennung und Detektion des unzersetzt verdampfenden TMS-Derivates der Äpfelsäure (TMS-1) in einem Arbeitsgang. Weiterhin erlaubt sie die Bestimmung der Einbaurate sowie der Einbauposition der ^{13}C -Isotope in Äpfelsäure (**1**).

Zur Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode, mit deren Hilfe die relativen Konzentrationsanteile ^{13}C -markierter Äpfelsäuren untersucht werden können, wurde über Hochauflösungsmessungen, Spektren metastabiler Ionen und Markierungsexperimente ein massenspektrometrisches Fragmentierungsschema der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) erstellt. Die von der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) gebildeten Fragment-Ionen erlauben im Massenspektrum aufgrund von Peaküberlagerungen nur die Bestimmung der Konzentrationsanteile 1-fach, 2-fach, 3-fach und 4-fach markierter Äpfelsäuren sowie der jeweiligen Anteile der in 1-Position markierten bzw. nicht markierten 1-fach, 2-fach und 3-fach ^{13}C -markierten Äpfelsäure. Die absolute Abweichung zwischen gemessenen und eingesetzten Konzentrationsanteilen liegt für Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ^{13}C -markierter Äpfelsäuren mit ähnlicher Zusammensetzung wie die biologischen Proben in der Regel unter 1,2 %.

Die Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht durch die Isolierung eines Vorläufer-Ions und dessen stoßaktivierte Fragmentierung, daß störende Überlagerungen anderer Ionen ausgeblendet werden. Dadurch können im Produkt-Ionen-Spektrum auch Fragment-Ionen zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung herangezogen werden, bei denen dies im Massenspektrum aufgrund von Überlagerungen mit isobaren Ionen nicht möglich ist.

Durch gezielte Auswahl isobarer Vorläufer-Ionen können die Intensitätsverhältnisse isotopomerer Produkt-Ionen zur Bestimmung der Einbauposition der ^{13}C -Isotope in den jeweiligen 1-fach, 2-fach und 3-fach markierten Äpfelsäuren herangezogen werden. Nach Korrektur der Intensitätsverhältnisse um den vom natürlichen Isotopengehalt stammenden Intensitätsanteil, ermöglichen Gleichungssysteme die Berechnung der Konzentrationsanteile der $[1-^{13}\text{C}]$ -, $[2-^{13}\text{C}]$ -, $[3-^{13}\text{C}]$ -, $[4-^{13}\text{C}]$ - sowie der doppelt markierten $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -, $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ -, $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ - und der dreifach markierten $[2,3,4-^{13}\text{C}_3]$ Äpfelsäure. Für die weiteren 2-fach ($[2,3-^{13}\text{C}_2]$ **1**, $[2,4-^{13}\text{C}_2]$ **1**, $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ **1**) und 3-fach ($[1,2,3-^{13}\text{C}_3]$ **1**,

[1,3,4-¹³C₃]**1**, [1,2,4-¹³C₃]**1**) markierten Äpfelsäuren kann jeweils nur die Summe der Konzentrationsanteile bestimmt werden. Der absolute Fehler dieser Methode liegt für Mischungen unmarkierter und positionsspezifisch ¹³C-markierter Äpfelsäuren mit ähnlicher Zusammensetzung wie biologische Proben in der Regel unter 1,0 %.

Mit aus den CAM-Pflanzen *Kalanchoe pinnata* und *Clusia minor* gewonnenen biologischen Proben liefert diese Methode den eindeutigen Beweis, daß neben der erwarteten Markierung in 4-Position auch ¹³C-markierte Äpfelsäuren mit Markierungen in 1-, 2- und 3-Position auftreten. Während der Einbau in 1-Position auf die statistische Umverteilung durch Fumarase zurückgeführt wird [5, 7], liegt für den Einbau in 2- und 3-Position keine biosynthetische Interpretation vor. Diese Ergebnisse geben damit zu neuen Forschungsarbeiten im Bereich der Stoffwechselphysiologie von CAM-Pflanzen Anlaß.

6 Synthese isotopenmarkierter Äpfelsäuren

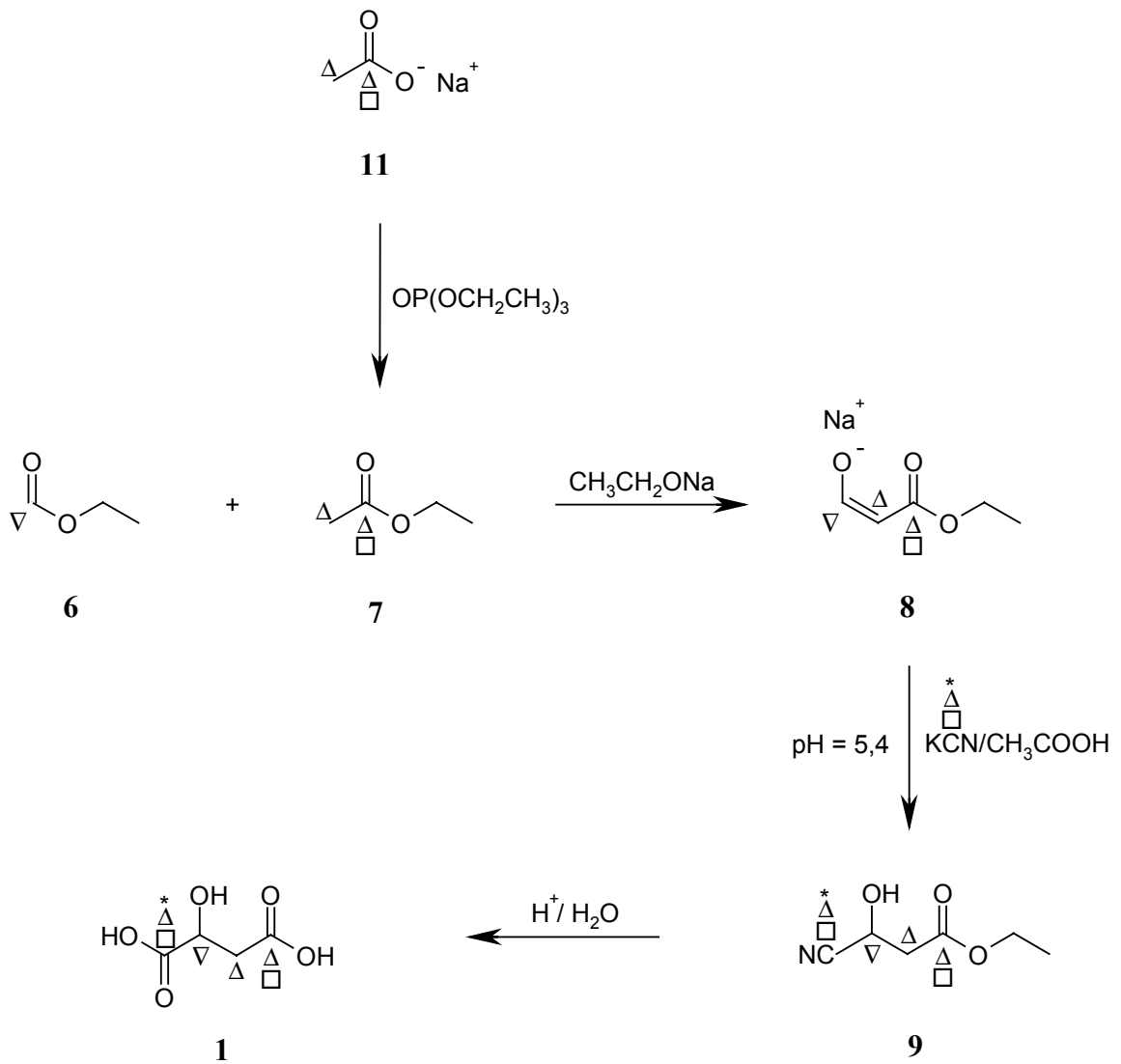
6.1 [1-¹³C]Äpfelsäure ([1-¹³C]1), [2-¹³C]Äpfelsäure ([2-¹³C]1), [1,4-¹³C₂]Äpfelsäure ([1,4-¹³C₂]1), [1,3,4-¹³C₃]Äpfelsäure ([1,3,4-¹³C₃]1)

Die Darstellung der isotopenmarkierten Äpfelsäuren [1-¹³C]1, [2-¹³C]1, [1,4-¹³C₂]1 und [1,3,4-¹³C₃]1 erfolgte ausgehend von entsprechend markierten Ameisensäureethylestern (6) und Essigsäureethylestern (7), die in einer Claisen-Esterkondensation zum Natriumsalz des Formylessigesters (8) umgesetzt wurden [79] (Tab. 44, Schema 17). Dieses wurde direkt mit KCN bzw. K¹³CN zu den entsprechenden Cyanhydrinen 9 umgesetzt [80 - 82]. Saure Hydrolyse führte zu den ¹³C-markierten Äpfelsäuren [1-¹³C]1, [2-¹³C]1, [1,4-¹³C₂]1 und [1,3,4-¹³C₃]1.

Die zur Darstellung der [1,4-¹³C₂]Äpfelsäure ([1,4-¹³C₂]1) und [1,3,4-¹³C₃]Äpfelsäure ([1,3,4-¹³C₃]1) erforderlichen ¹³C-markierten Essigsäureethylester [1-¹³C]7 und [1,2-¹³C₂]7 wurden durch Veresterung der entsprechenden Natriumsalze der Essigsäure [1-¹³C]11 und [1,2-¹³C₂]11 mit Triethylphosphat erhalten [83].

Edukte			Produkte	Symbol im Schema
Ameisensäureethylester (6)	Essigsäureethylester (7)	KCN		
6	7	K ¹³ CN	[1- ¹³ C]1	*
[1- ¹³ C]6	7	KCN	[2- ¹³ C]1	∇
6	[1- ¹³ C]7	K ¹³ CN	[1,4- ¹³ C ₂]1	□
6	[1,2- ¹³ C ₂]7	K ¹³ CN	[1,3,4- ¹³ C ₃]1	Δ

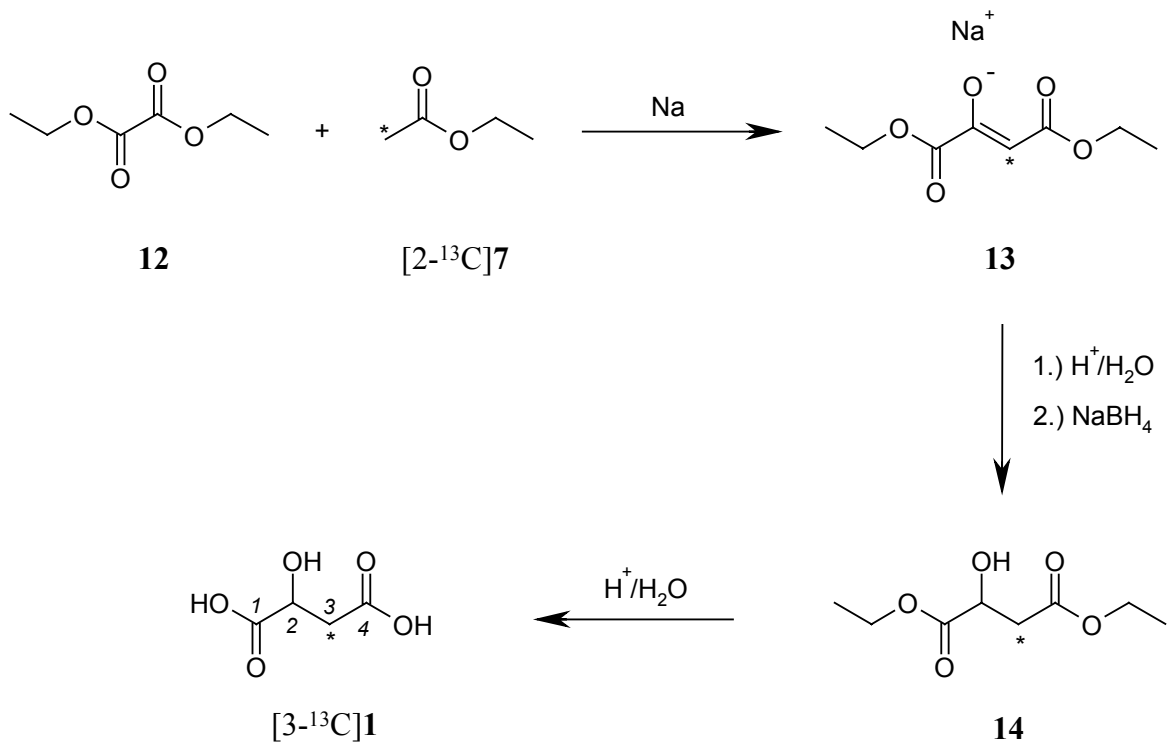
Tab. 44: Erforderliche Edukte zur Darstellung verschiedener ¹³C-markierter Äpfelsäuren und deren Markierungs-Symbolik in Schema 17.



Schema 17: Darstellung der [1-¹³C]Äpfelsäure ([1-¹³C]1), [2-¹³C]Äpfelsäure ([2-¹³C]1), [1,4-¹³C₂]Äpfelsäure ([1,4-¹³C₂]1), [1,3,4-¹³C₃]Äpfelsäure ([1,3,4-¹³C₃]1).

6.2 [3-¹³C]Äpfelsäure ([3-¹³C]1)

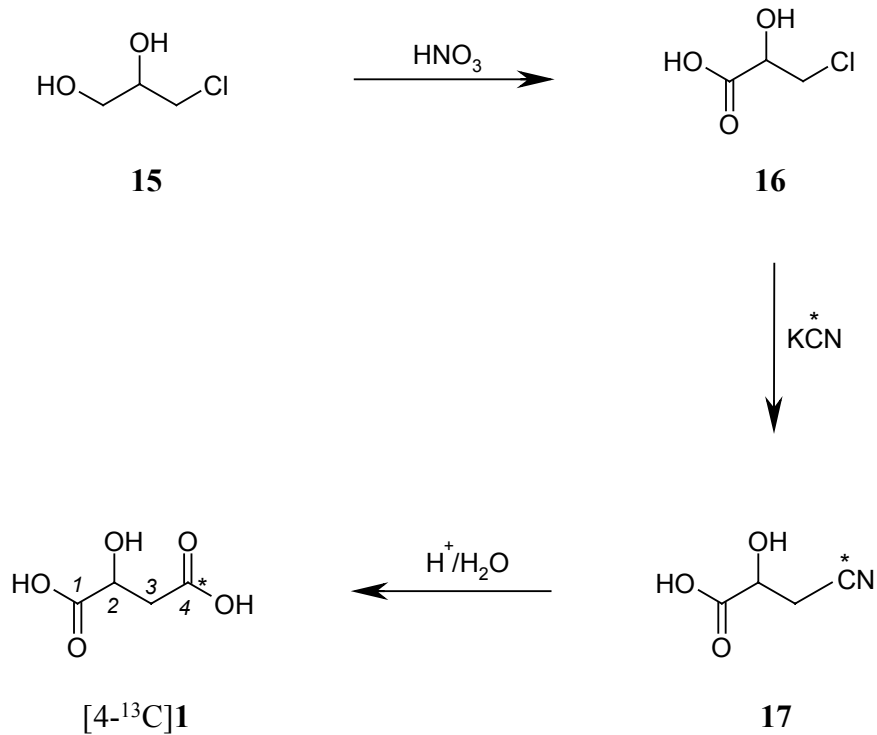
Die Darstellung der [3-¹³C]Äpfelsäure ([3-¹³C]1) erfolgte ausgehend von Oxalsäurediethylester (**12**) und [2-¹³C]Essigsäureethylester ([2-¹³C]7), die in einer Esterkondensation nach Claisen mit metallischem Natrium zum Natriumsalz des Oxalessigsäurediethylesters **13** umgesetzt wurden [84]. [2-¹³C]7 konnte zuvor aus [2-¹³C]11 durch Veresterung mit Triethylphosphat erhalten werden [83]. Nachdem der [3-¹³C]Oxalessigsäurediethylester aus seinem Salz **13** befreit war, wurde er mit NaBH₄ zum [3-¹³C]Äpfelsäurediethylester (**14**) reduziert [85]. Anschließend wurde **14** zur [3-¹³C]Äpfelsäure ([3-¹³C]1) verseift.



Schema 18: Darstellung der [3-¹³C]Äpfelsäure ([3-¹³C]1).

6.3 [4-¹³C]Äpfelsäure ([4-¹³C]1)

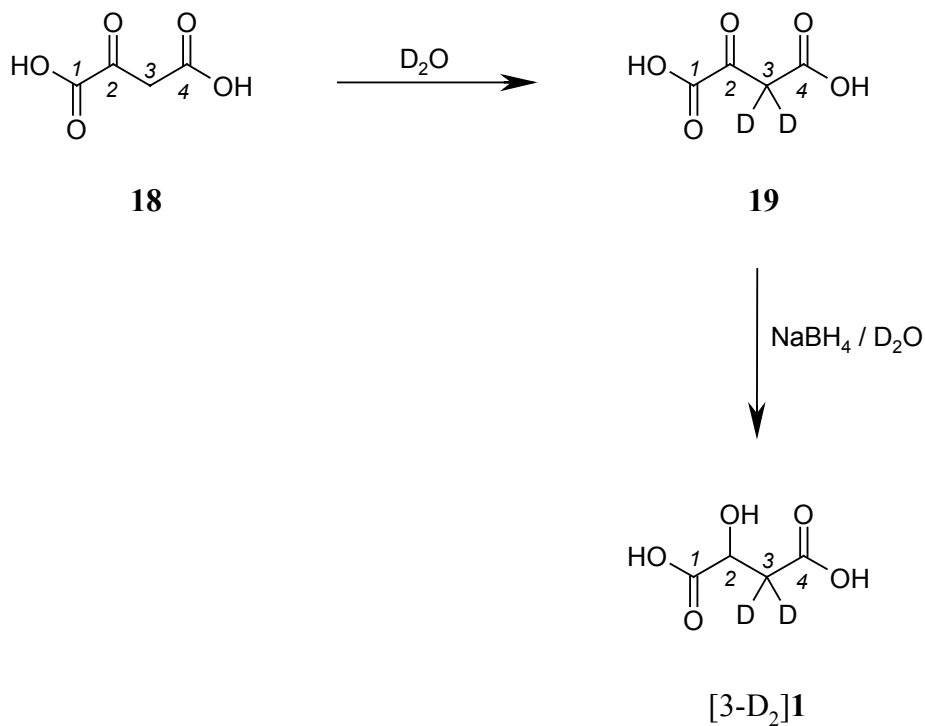
Zur Darstellung von [4-¹³C]1 wurde 3-Chlor-1,2-propandiol (**15**) mit rauchender Salpetersäure zur 3-Chlor-2-hydroxypropansäure (**16**) umgesetzt [86]. Die anschließende Reaktion mit K¹³CN in wässriger, schwach basischer Lösung führte zur 3-[¹³C]Cyano-2-hydroxypropansäure (**17**) [87]. Nach saurer Hydrolyse wurde [4-¹³C]Äpfelsäure ([4-¹³C]1) erhalten.



Schema 19: Darstellung der [4-¹³C]Äpfelsäure ([4-¹³C]1).

6.4 [3-D₂]Äpfelsäure ([3-D₂]1)

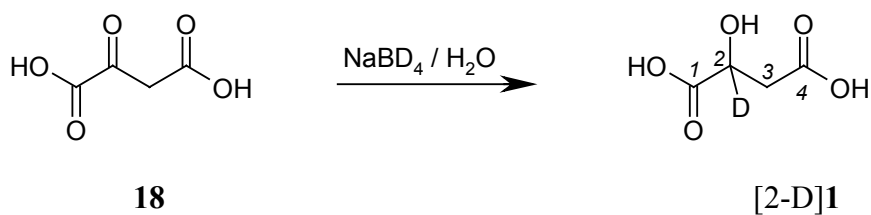
Zur Darstellung der [3-D₂]Äpfelsäure ([3-D₂]1) wurde Oxallessigsäure (**18**) in D₂O geschüttelt und die entstandene deuterierte Oxallessigsäure **19** mit NaBH₄ in D₂O reduziert [88].



Schema 20: Darstellung der [3-D₂]Äpfelsäure ([3-D₂]1).

6.5 [2-D]Äpfelsäure ([2-D]1)

Die Darstellung der [2-D]Äpfelsäure ([2-D]1) erfolgte durch die Umsetzung von Oxallessigsäure (**18**) mit NaBD₄ [88].



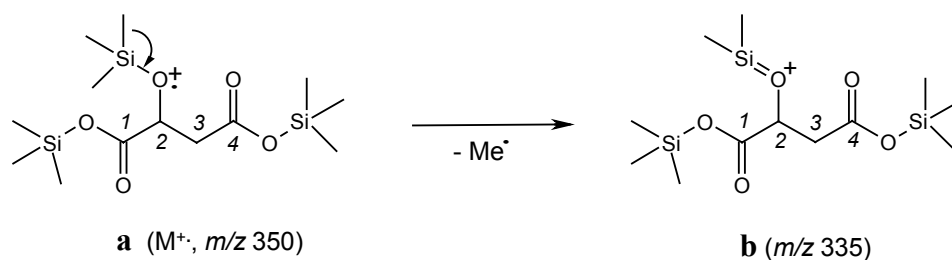
Schema 21: Darstellung der [2-D]Äpfelsäure ([2-D]1).

7 Interpretation des Massenspektrums der TMS-Äpfelsäure (TMS-1)

7.1 Zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung geeignete Fragment-Ionen

7.1.1 Bildung des Fragment-Ions **b** (m/z 335)

Ion **b** $[\text{M}-15]^+$ entsteht aus dem Molekül-Ion **a** (M^+ , m/z 350) durch radikalische Abspaltung (α -Spaltung zum Silylester- bzw. Silylether-Sauerstoffatom) eines Methylradikals aus einer der TMS-Gruppen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) (Schema 22) [69, 89]. Folglich ist bei Einsatz des deuterierten Derivatisierungsreagenzes $[\text{D}_{18}]\text{BSA}$ das entsprechende Fragment bei m/z 359 ($[\text{M}-\text{CD}_3]^+$, M^+ bei m/z 377) zu finden. Die Position der radikalisch abgespaltenen Methyl-Gruppe läßt sich nicht bestimmen. Sowohl für die TMS- als auch $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Derivatisierung stimmen die gefundenen mit den berechneten Ionenmassen überein (B Experimenteller Teil, Kap. 4). Es handelt sich um eine für TMS-derivatisierte Substanzen typische Fragmentierungsreaktion [69, 89]. Da es sich hierbei um eine sehr schnelle radikalische Reaktion handelt, ist diese nicht B/E-Scan-Spektrum des metastabilen Ions **a** (m/z 350) zu erkennen. Auch bei der stoßaktivierten Fragmentierung von M^+ in der Ionenfalle ist dieser Zerfall nicht zu beobachten. Wie Tab. 1 (Seite 18) bestätigt, sind noch alle C- und H-Positionen der Äpfelsäure (**1**) in diesem Fragment enthalten.

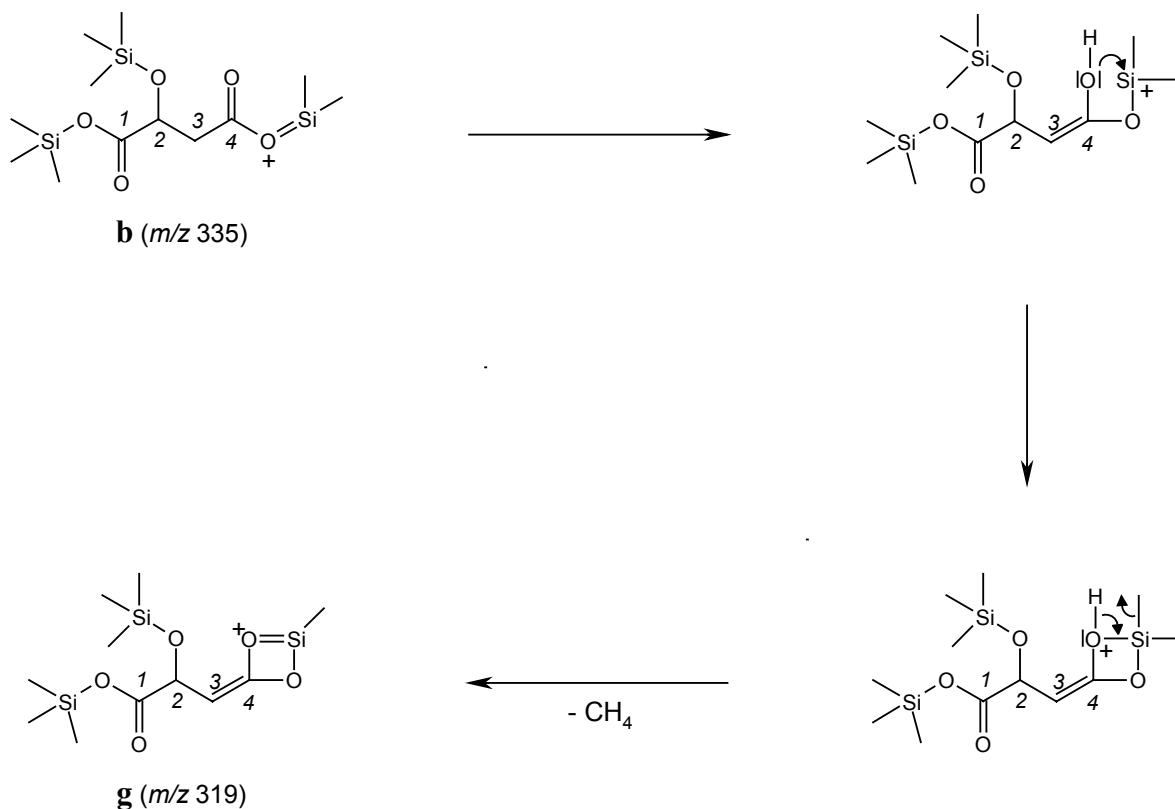


Schema 22: Bildung des Fragment-Ions **b** (m/z 335).

7.1.2 Bildung des Fragment-Ions **g** (m/z 319)

Das B/E-Linked-Scan-Spektrum der metastabilen Ionen **b** (m/z 335) und dessen stoßinduzierte Fragmentierungen im Ionenfallen-Massenspektrometer zeigen, daß **g** (m/z 319) aus **b** (m/z 335) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ gebildet wird. Die Hochauflösungsmessungen weisen dem Fragment die Zusammensetzung $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{Si}_3$ zu. Das entspricht einem Verlust von Methan zu $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CH}_4]^+$. Anhand der Massenverschiebungen, die **g** in den Massenspektren der isotonenmarkierten Äpfelsäuren erfährt (Kap. 4.3, Tab. 1), ist zu erkennen, daß noch alle vier

C-Atome der Äpfelsäure (**1**) in der Fragmentstruktur enthalten sein müssen. Dagegen zeigen die Spektren der in 2- und 3-Position deuterierten TMS-Äpfelsäuren, daß im Falle der $[\text{D}_2]$ -Markierung in 3-Position nur eine Verschiebung um eine Masse vorliegt, d. h. ein Wasserstoffatom des abgespaltenen Methans muß aus dieser Position stammen. Die Methylgruppe wird dagegen aus den TMS-Gruppen zur Verfügung gestellt (Schema 23). Die Verschiebungen des korrespondierenden Ions bei m/z 340 in den Spektren der $[\text{D}_{27}]$ TMS-Äpfelsäuren bestätigen die Abspaltung von HCD_3 , ausgehend von m/z 359 $[[\text{D}_{27}]\text{M-CD}_3\text{-HCD}_3]^+$. Im Falle der $[\text{3-D}_2]$ -Markierung liegt demzufolge eine Verschiebung auf m/z 341 vor (Anhang). Das Hochauflösungsspektrum weist dem Ion bei m/z 340 die Zusammensetzung $\text{C}_{11}\text{H}_2\text{D}_{21}\text{O}_5\text{Si}_3$ zu, im B/E-Spektrum des Ions m/z 359 ist bei m/z 340 ein deutliches Signal zu erkennen.

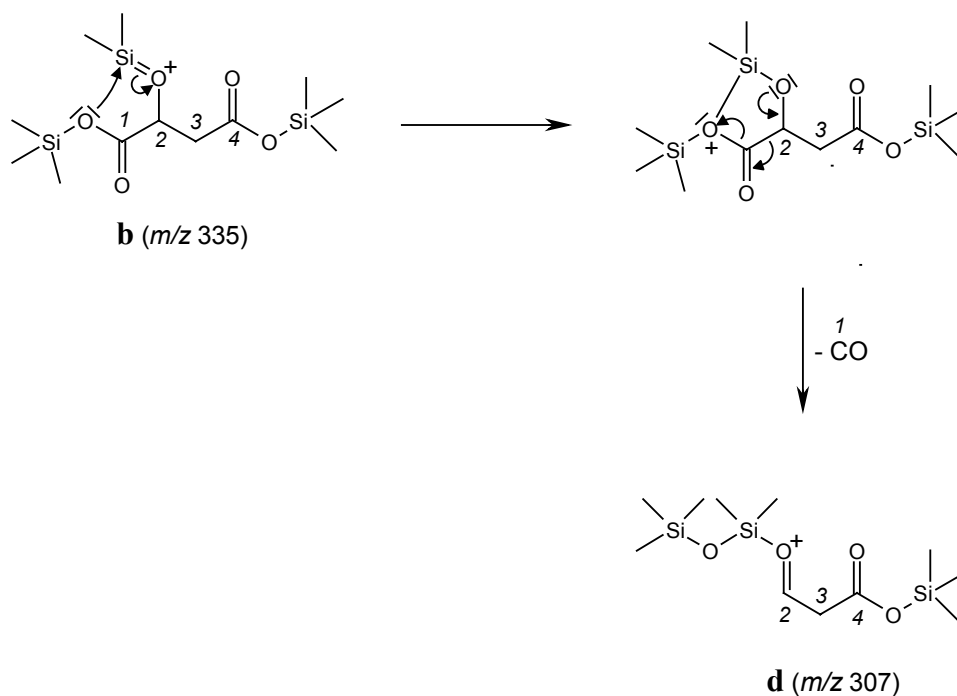


Schema 23: Bildung des Fragment-Ions **g** (m/z 319).

7.1.3 Bildung des Fragment-Ions **d** (m/z 307)

Wie die Linked-Scan-Spektren am Sektorfeldgerät und die CID-Spektren mit der Ionenfalle zeigen, wird Ion **d** (m/z 307) aus **b** (m/z 335) gebildet. Die Hochauflösungsmessungen des TMS- und $[\text{D}_{27}]$ TMS-Äpfelsäurederivats bestätigen den Verlust von CO und schreiben dem Fragment die Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{Si}_3$ zu. Anhand der Peakverschiebungen in den Spektren der isotopenmarkierten Äpfelsäuren ist zu erkennen, daß das damit eliminierte Kohlenstoffatom des Kohlenmonoxids aus der 1-Position der Äpfelsäure (**1**) stammt.

Bei der Bildung des Fragment-Ions **d** $[\text{M}-15-28]^+$ handelt es sich um eine literaturbekannte [90] Fragmentierungsreaktion von TMS- α -Hydroxycarbonsäureestern. Auch bei Trimethylsilanoether-derivatisierten α -Hydroxycarbonsäuremethylestern [91] und TMS-Aminosäuren [92] wird diese Fragmentierungsreaktion beobachtet. Fehlt die TMS-Hydroxy- oder Aminofunktion, kommt es nicht zu diesem Fragmentierungstyp, wie ein Vergleich der Massenspektren von TMS-Propandisäure und TMS-Milchsäure belegt [90].

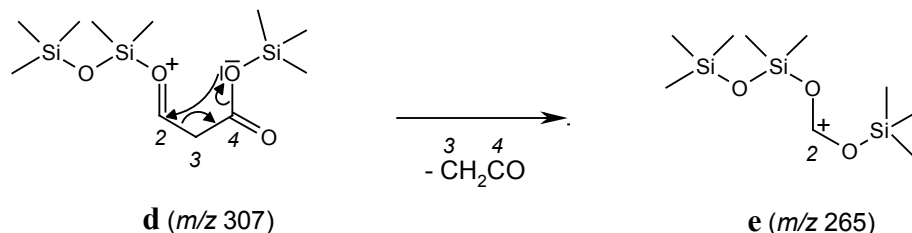


Schema 24: Bildung des Fragment-Ions **d** (m/z 307).

7.1.4 Bildung des Fragment-Ions **e** (m/z 265)

Das B^2/E - sowie das B/E -Scan-Spektrum und das am Ionenfallen-Massenspektrometer aufgenommene CID-Produkt-Ionen-Spektrum von **d** (m/z 307) zeigen eindeutig, daß das Ion **e** (m/z 265) aus **d** (m/z 307) gebildet wird. Die aus den Hochauflösungsspektren gewonnenen Summenformeln $\text{C}_9\text{H}_{25}\text{O}_3\text{Si}_3$ für das TMS- bzw. $\text{C}_9\text{HD}_{24}\text{O}_3\text{Si}_3$ für das $[\text{D}_{27}]$ TMS-Derivat der Äpfelsäure belegen den Verlust von Keten (CH_2CO). In Übereinstimmung mit den Massenverschiebungen innerhalb der Spektren für die isotopenmarkierten TMS-Äpfelsäuren ergibt sich eine Abspaltung der Kohlenstoffatome in 3- und 4-Position der Äpfelsäure sowie der beiden an 3-Position gebundenen Wasserstoffatome. Nur die Massenspektren der in 2-Position isotopenmarkierten Äpfelsäuren zeigen eine Verschiebung nach m/z 266.

Der von Petersson [69] vorgeschlagene Fragmentierungs-Mechanismus, der von einem nukleophilen Angriff des Silylester-Sauerstoffatoms am positivierten Kohlenstoffatom in 2-Position ausgeht, deckt sich demzufolge mit diesen Befunden. Auch Untersuchungen zum Fragmentierungsverhalten des Äpfelsäuremethylesters zeigen die Bildung entsprechender Fragmente, denen der gleiche Reaktionsmechanismus zugrunde liegt [93].



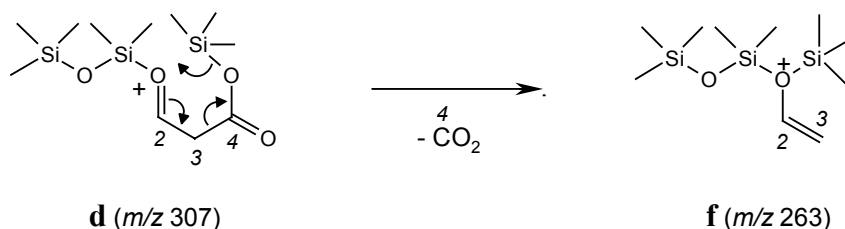
Schema 25: Bildung des Fragment-Ions **e** (m/z 265).

7.1.5 Bildung des Fragment-Ions **f** (m/z 263)

Die HR-Messungen und das Verschiebungsverhalten (Tab. 1, Seite 18) des Signals bei m/z 263 zeigen, daß bei diesem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis zwei Ionen mit nominal gleicher Masse, jedoch unterschiedlicher Summenformel vorliegen müssen. So enthält eines der Fragment-Ionen nur die 2- und 3-Position der Äpfelsäure (**1**) mit allen gebundenen Wasserstoffatomen (Fragment-Ion **f**, 263/I) und das andere Fragment-Ion die 1- bis 4-Position sowie das Wasserstoffatom in 2-Position und eines der Wasserstoffatome in 3-Position (263/II). Durch die Derivatisierung mit $[\text{D}_{18}]$ BSA können die beiden Ionen nach m/z 287 (Ion **f**) bzw. 278 verschoben werden.

Linked-Scan- und CID-Spektren zeigen, daß Ion **f** (m/z 263) aus Ion **d** (m/z 307) gebildet wird. Aus den HR-Messungen kann **f** die Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{Si}_3$ zugeschrieben werden, was der Eliminierung von CO_2 aus dem Vorläufer-Ion **d** entspricht. Die Massenverschiebungen und auch die Ergebnisse der HR-Untersuchungen des entsprechenden $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -derivatisierten Ions (m/z 287) bestätigen die Anwesenheit der drei Wasserstoffatome in 2- und 3-Position. Die Summenformel lautet hier $\text{C}_{10}\text{H}_3\text{O}_2\text{D}_{24}\text{Si}_3$.

Bei der Bildung von **f** handelt es sich um eine der McLafferty-Umlagerung ähnlichen Fragmentierungsreaktion, wobei eine TMS-Gruppe an Stelle eines Wasserstoffatoms umgelagert wird. Hierbei wird CO_2 eliminiert, was zum Verlust der 4-Position der Äpfelsäure (**1**) führt [69].



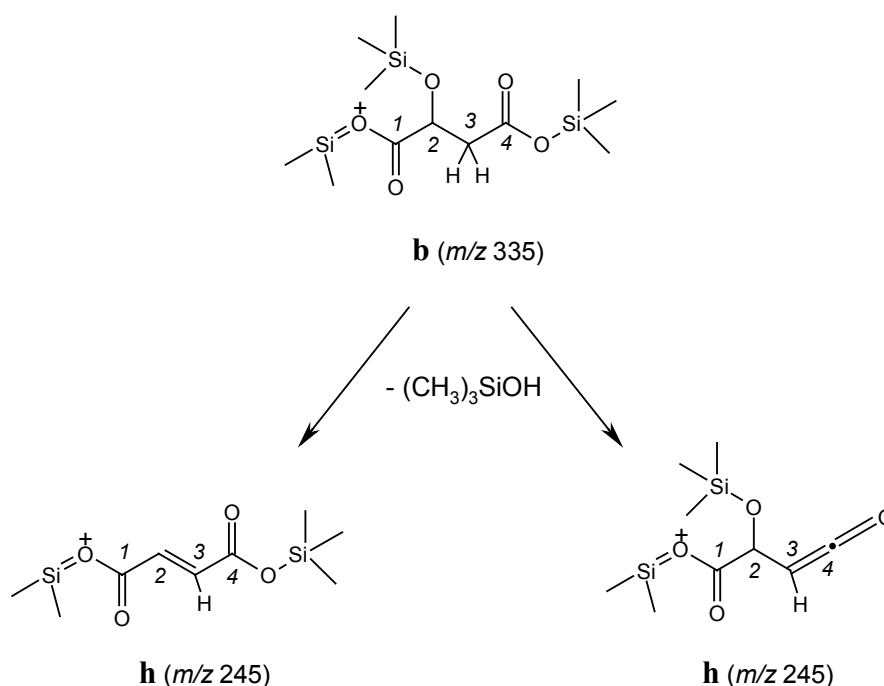
Schema 26: Bildung des Fragment-Ions **f** (m/z 263).

7.1.6 Bildung des Fragment-Ions **h** (m/z 245)

Die Massenverschiebungen, die Ion **h** in den Massenspektren der markierten Äpfelsäuren erfährt, zeigen eindeutig, daß noch alle vier C-Atome sowie das Wasserstoffatom in 2-Position und eines der Wasserstoffatome in 3-Position der Äpfelsäure (**1**) im Fragment vorhanden sind. HR-Messungen des Ions **h** (m/z 245) liefern die Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_4\text{Si}_2$. HR-Messungen des entsprechenden $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Derivats weisen dem Ion bei m/z 260 die Summenformel $\text{C}_9\text{H}_2\text{O}_4\text{D}_{15}\text{Si}_2$ zu und bestätigen damit die Anwesenheit zweier Wasserstoffatome. Das B^2/E -Scan-Spektrum des Ions **h** (m/z 245) zeigt deutliche Signale bei m/z 335 und 263. Im B/E -Spektrum von **b** (m/z 335) ist m/z 245 als ausgeprägtes Signal zu sehen, wogegen es im B/E -Spektrum von m/z 263 nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Das B/E -Spektrum von m/z 278 (korrespondierendes Ion zu 263/II der TMS-1) der $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Äpfelsäure zeigt ein deutliches Signal bei m/z 260. Die CID-Spektren von **b** (m/z 335) und m/z 263 zeigen nur sehr schwache Signale bei m/z 245.

Die Bildung aus **b** läßt sich plausibel durch eine Trimethylsilanol-Abspaltung erklären (Schema 27). Wie die Verschiebungen der deuterierten und ^{13}C -markierten Äpfelsäuren

zeigen, werden hierbei ein H in 3-Position der Äpfelsäure und eine Trimethylsilyloxy-Gruppe eliminiert. Letztere kann aus der Trimethylsilanoether-Funktion in 2-Position oder aus den Trimethylsilanoester-Funktionen in 1- und 4-Position stammen, wobei die Eliminierung aus 4-Position mit größerer Wahrscheinlichkeit eintritt. Im Falle einer Eliminierung aus 2-Position ist die Bildung der E/Z-Isomere möglich (vgl. Bildung des Ions m/z 147, Kap. 7.2.2.2, Schema 32). Die Eliminierung von Trimethylsilanol ist charakteristisch für trimethylsilylierte Hydroxycarbonsäuren [69].

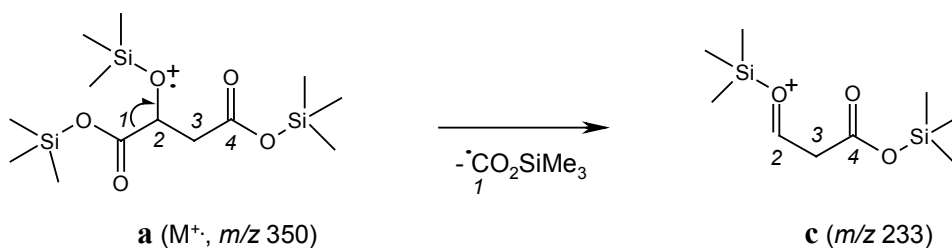


Schema 27: Bildung der isomeren Fragment-Ionen **h** (m/z 245).

7.1.7 Bildung des Fragment-Ions **c** (m/z 233)

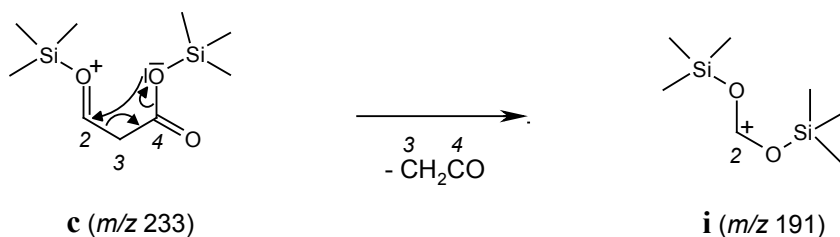
Ion **c** (m/z 233) entsteht aus **a** (M^+ , m/z 350) durch α -Spaltung der TMS-Esterfunktion zur TMS-Ethergruppe. Es handelt sich bei dieser Fragmentierung um eine für trimethylsilylierte Hydroxycarbonsäuren typische Reaktion, die besonders bei 2-Deoxyaldarsäuren Signale hoher Intensität bilden [69]. Auch der Methyl ester der Äpfelsäure (**1**) zeigt diese Fragmentierungsreaktion [93].

Linked-Scan- sowie Hochauflösungs-Spektren und das Verschiebungsverhalten der Ionsignale markierter TMS- und $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Äpfelsäuren bestätigen die Reaktion (Schema 28).

Schema 28: Bildung des Fragment-Ions **c** (m/z 233).

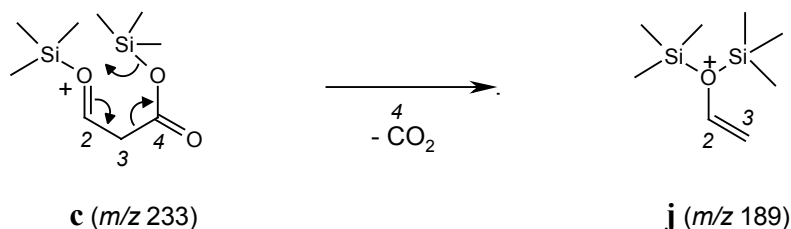
7.1.8 Bildung des Fragment-Ions **i** (m/z 191)

Aus dem Verschiebungsverhalten des Ions **i** (m/z 191) in den Massenspektren isotopenmarkierter Äpfelsäuren (Tab. 1) ist klar zu erkennen, daß **i** nur noch das Kohlenstoff- und Wasserstoffatom in 2-Position der Äpfelsäure (**1**) enthält. Die Linked-Scan- und CID-Spektren zeigen eindeutig seine Entstehung aus **c** (m/z 233). In den HR-Messungen des Ions **i** (m/z 191) wird die Summenformel $\text{C}_7\text{H}_{19}\text{O}_2\text{Si}_2$ ermittelt, was des Verlust von Keten belegt. HR-Messungen des entsprechenden $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Derivats (m/z 209) weisen die Summenformel $\text{C}_7\text{HD}_{18}\text{O}_4\text{Si}_2$ zu und bestätigen damit die Anwesenheit eines Wasserstoffatoms. Die Bildungsreaktion verläuft nach dem gleichen Mechanismus wie die Bildung des Ions **e** (m/z 265) aus **d** (m/z 307) (Kap. 7.1.4).

Schema 29: Bildung des Fragment-Ions **i** (m/z 191).

7.1.9 Bildung des Fragment-Ions **j** (m/z 189)

Linked-Scan- und CID-Spektren belegen, daß **j** (m/z 189) aus **c** (m/z 233) gebildet wird. Aus den Verschiebungen des Signals in den Spektren der isotopenmarkierten Äpfelsäuren (Tab. 1) ist ersichtlich, daß die Kohlenstoffatome in 2- und 3-Position mit den gebundenen Wasserstoffatomen noch im Fragment vorhanden sind. Das HR-Spektrum der $[\text{D}_{27}]$ TMS-Äpfelsäure bestätigt mit der Summenformel $\text{C}_8\text{H}_3\text{D}_{18}\text{OSi}_2$ die Anwesenheit der drei Wasserstoffatome. Erwartungsgemäß wird in den HR-Messungen des Ions **j** die Summenformel $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{OSi}_2$ ermittelt. Folglich entsteht **j** durch CO_2 -Eliminierung des Vorläufer-Ions **c** [69]. Hierbei liegt der gleiche, der McLafferty-Umlagerung analoge Fragmentierungsmechanismus vor, wie bei der Bildung des Ions **f** (m/z 263) aus Ion **d** (m/z 307). Dies führt zum Verlust der 4-Position der Äpfelsäure (**1**) (Kap. 7.1.5).



Schema 30: Bildung des Fragment-Ions **j** (m/z 189).

7.2 Zur ^{13}C -Einbauratenbestimmung nicht geeignete Fragment-Ionen

7.2.1 Molekül-Ion **a** (m/z 350)

Die Molekül-Ionen TMS-derivatisierter Hydroxycarbonsäuren zeigen bei schwachen Intensitäten [69, 89] eine vollständige Verschiebung in den Spektren der positionsspezifisch markierten TMS-Äpfelsäuren. Die durch HR-Messungen erhaltenen Massen des TMS- sowie des $[\text{D}_{27}]$ TMS-Derivates entsprechen den berechneten Massen.

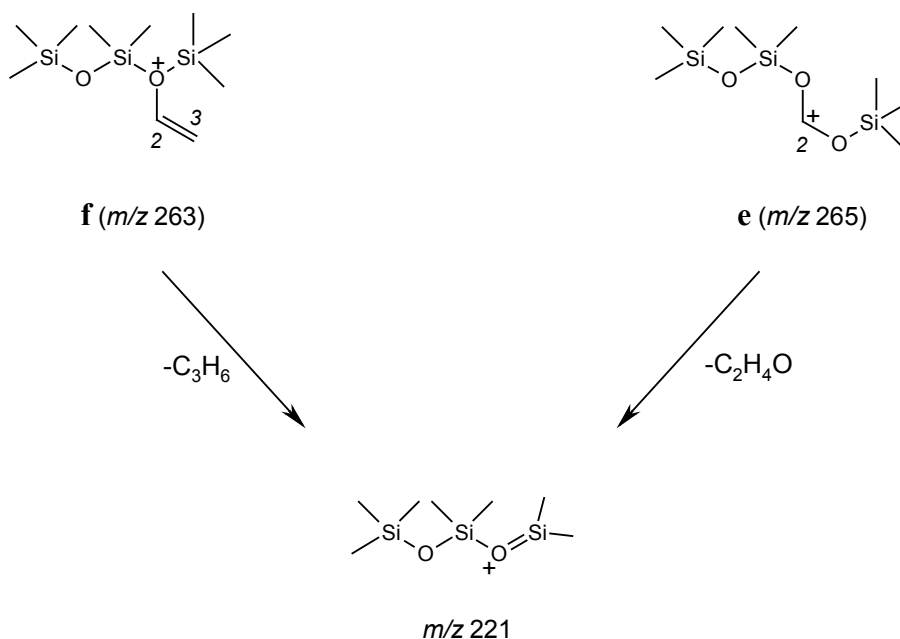
7.2.2 Die Fragment-Ionen bei m/z 221, 149, 147 und 73

Bei den Fragment-Ionen m/z 221, 149, 147 und 73 handelt es sich um Ionen, die aus den Trimethylsilanol-Gruppen der TMS-Äpfelsäure (TMS-**1**) gebildet werden. Die Bildung dieser Ionen ist für TMS-Derivate von Hydroxycarbonsäuren typisch [69, 70]. Mit Hilfe

von Linked-Scan-Spektren wurden die Fragmentierungswege, die zur Bildung der Ionen m/z 221 und 147 im Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure führen, untersucht.

7.2.2.1 Bildung des Fragment-Ions bei m/z 221

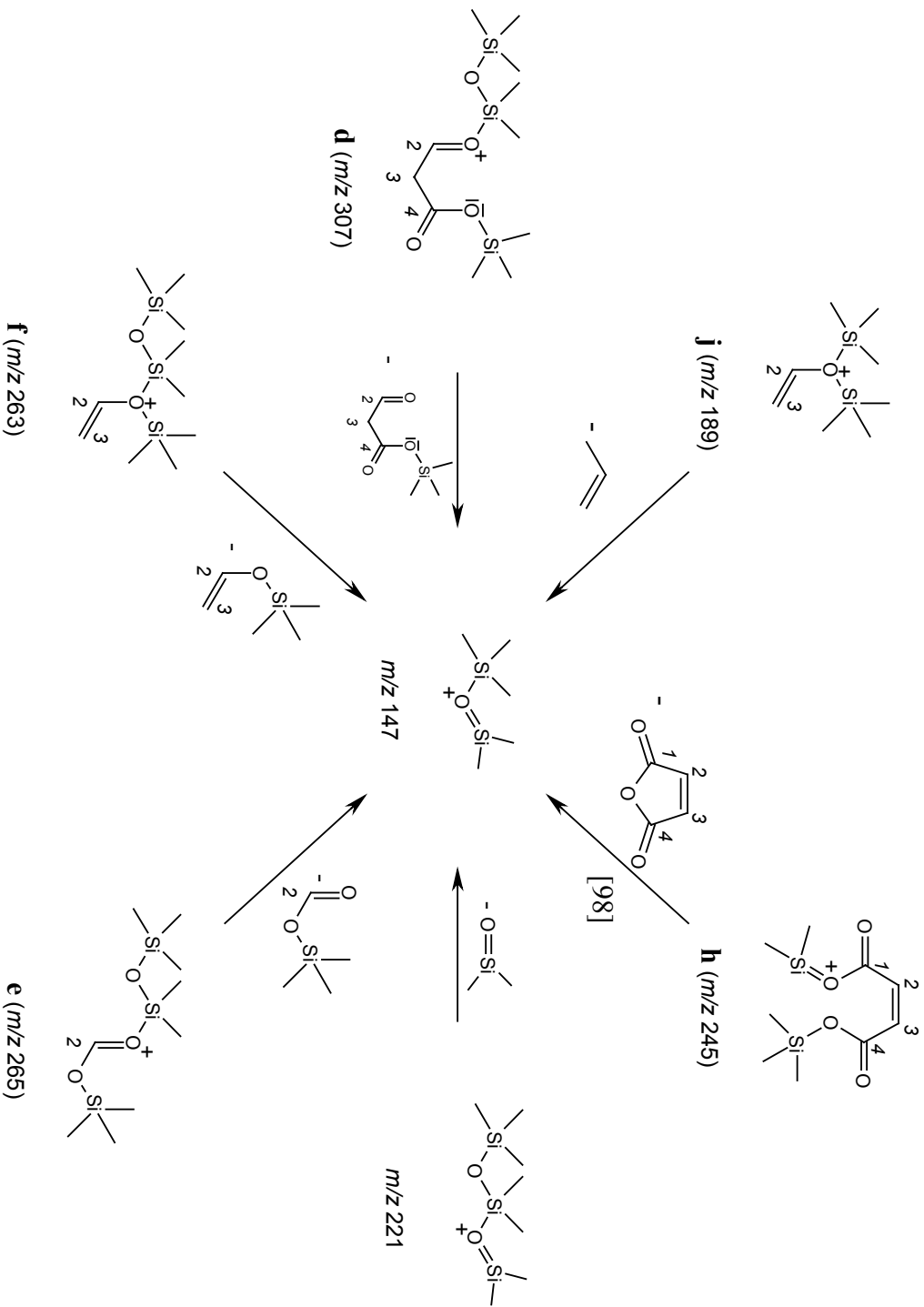
Die Spektren metastabiler Ionen (B/E- und B^2/E -Scan) und der stoßinduzierten Zerfälle zeigen, daß m/z 221 nur von Vorläufer-Ionen gebildet werden kann, die noch drei Siliziumatome enthalten (**b**, **g**, **h**, **e**, **f**). HR-Messungen bestätigen die Summenformel $\text{C}_7\text{H}_{21}\text{O}_2\text{Si}_3$ [69].



Schema 31: Bildung des Fragment-Ions bei m/z 221.

7.2.2.2 Bildung der Fragment-Ionen bei m/z 147 und 149

Wie das B^2/E -Spektrum des Fragment-Ions bei m/z 147 ($\text{C}_5\text{H}_{15}\text{OSi}_2$) zeigt, ist seine Bildung aus den meisten mindestens 2-fach trimethylsilylierten Vorläufer-Ionen möglich (Schema 32). Dieses Ion wurde von Petersson [69, 90] in den Massenspektren aller von ihm untersuchten Hydroxycarbonsäuren gefunden. Aber auch andere Trimethylsilyl-derivatisierte Substanzklassen wie Aminosäuren [94] oder Dirole [95, 96] bilden Ion m/z 147, selbst dann, wenn die beiden TMS-Gruppen durch starre Systeme wie *p*-Benzyl- oder Alkin-Gruppen sterische voneinander getrennt sind [97].

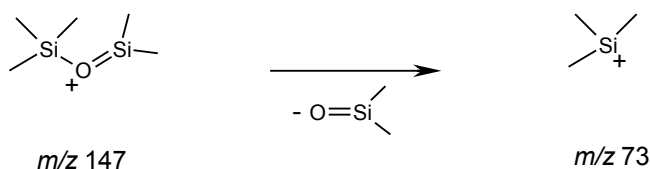


Schema 32: Auswahl verschiedener Bildungswege, die zum Fragment-Ion bei m/z 147 führen.

In den auf Sektorfeldgeräten aufgenommenen Massenspektren der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) stellt m/z 147 den Basispeak dar. Im Ionenfallen-Massenspektrometer erscheint aus bisher unbekanntem Gründen das Ion bei m/z 149 als Basispeak. Die am Ionenfallen-Massenspektrometer aufgenommenen Massenspektren des $[\text{D}_{27}]$ TMS-Derivates der Äpfelsäure (**1**) zeigen eine Verschiebung des Ions bei m/z 147 nach m/z 161, statt wie zu erwarten nach m/z 162. Diese Beobachtung bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen.

7.2.2.3 Bildung des Fragment-Ions bei m/z 73

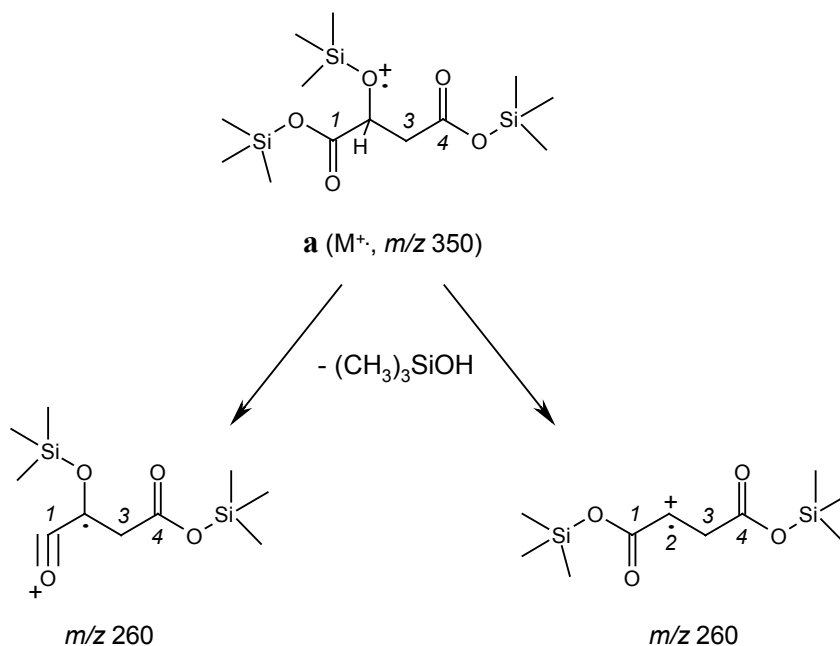
Das Ion bei m/z 73 bildet sich aus dem Ion bei m/z 147 durch Abspaltung von $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$ [69] (Schema 33).



Schema 33: Bildung des Ions bei m/z 73.

7.2.3 Bildung des Fragment-Ions bei m/z 260

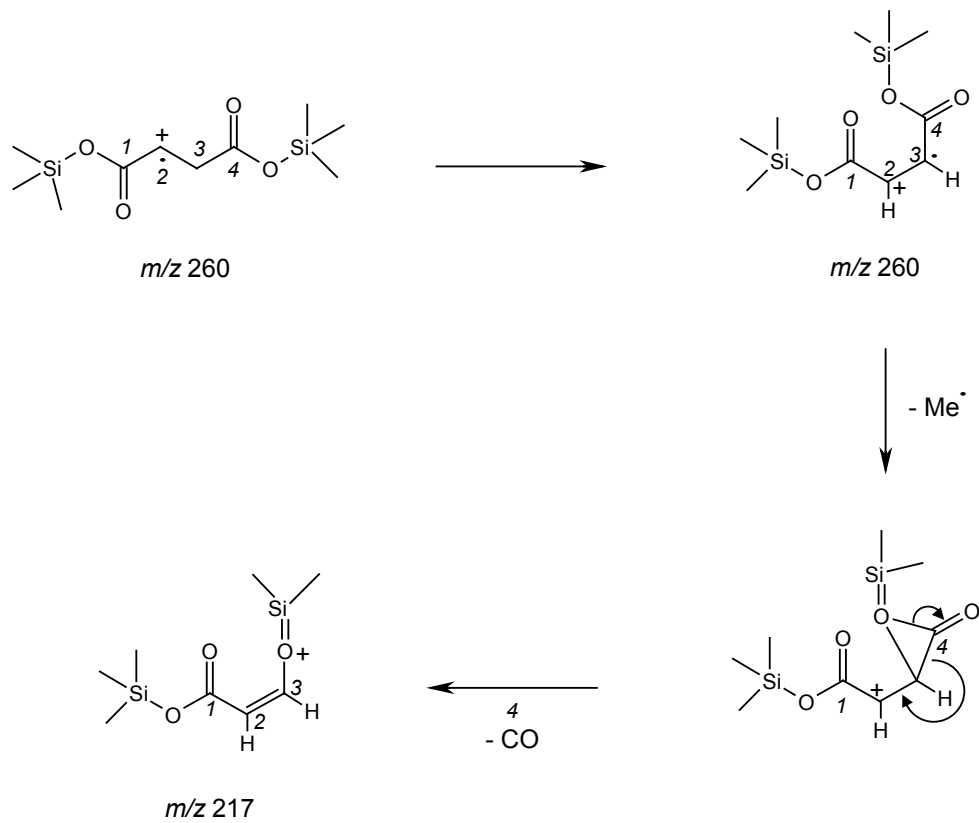
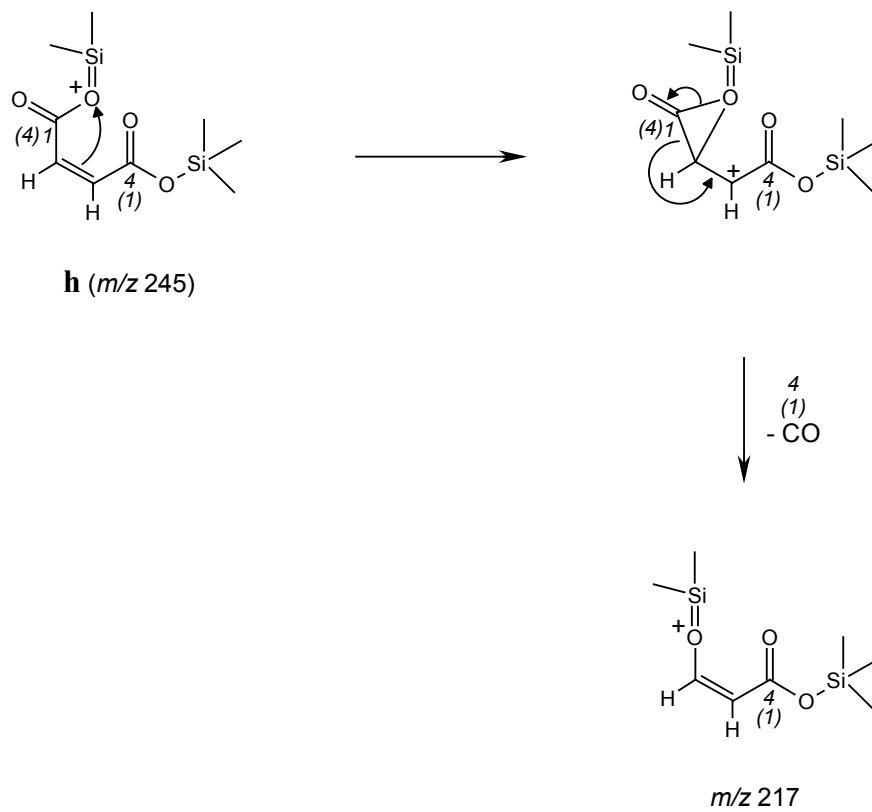
Anhand der Verschiebungen, die das Signal bei m/z 260 in den Massenspektren ^{13}C -markierter TMS-Äpfelsäuren erfährt, ist zu erkennen, daß noch alle vier Kohlenstoffatome der Äpfelsäure (**1**) im Fragment-Ion enthalten sind. Die TMS-Derivate der deuterierten Substanzen $[2\text{-D}]\mathbf{1}$ und $[3\text{-D}_2]\mathbf{1}$ zeigen jedoch, daß der in 2-Position gebundene Wasserstoff abgespalten wird. In den CID- und Linked-Scan-Spektren ist deutlich die Bildung aus dem Molekül-Ion M^+ (m/z 350) zu erkennen, was für eine radikal-induzierte Trimethylsilanol-Abspaltung spricht. Entsprechend findet man in den HR-Messungen die Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}_2$. Hierbei kann nicht festgestellt werden, welche der TMS-Gruppen abgespalten wird, so daß mindestens zwei isomere Ionenstrukturen formuliert werden können (Schema 34). Im Falle einer $[\text{D}_{27}]$ TMS-Derivatisierung wird das Ion auf m/z 278 verschoben und überlagert so mit Ion 263/II, das ebenfalls nach m/z 278 verschoben wird.

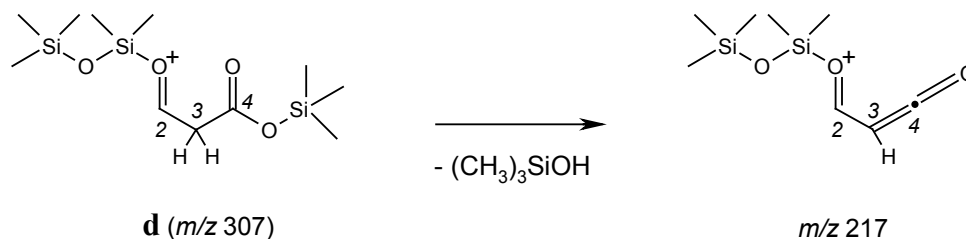
Schema 34: Bildung des Fragment-Ions bei m/z 260.

7.2.4 Bildung des Fragment-Ions bei m/z 217

Die ^{13}C -markierten Äpfelsäuren zeigen bei einigen Markierungspositionen Teilverschiebungen des Signals bei m/z 217. Nur wenn die 2- oder 3-Position markiert ist, bzw. eine doppelte Markierung in 1- und 4-Position enthalten ist, kann eine vollständige Verschiebung beobachtet werden. Auch bei den deuterierten Äpfelsäuren [2-D]**1** und [3-D₂]**1** ist nur eine Teilverschiebung zu beobachten. Die HR-Messung zeigt, daß es sich um isomere Ionen der Summenformel $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}_3\text{Si}_2$ handelt. Die gleichen Teilverschiebungen sind auch bei den [D₂₇]TMS-Derivaten der markierten Äpfelsäuren zu beobachten. Die hier erhaltene Summenformel $\text{C}_8\text{H}_2\text{D}_{15}\text{O}_3\text{Si}_2$ zeigt, daß jeweils 2 Wasserstoffatome vorliegen müssen, die von der Äpfelsäure (**1**) stammen.

Sowohl die mittels B²/E- und B/E-Scan untersuchten metastabilen, als auch die stoßinduzierten Zerfälle, liefern das übereinstimmende Ergebnis, daß die Bildung der Ionen bei m/z 217 auf mindestens vier Wege aus den Vorläufer-Ionen **c** (m/z 233), **d** (m/z 307), **h** (m/z 245) und m/z 260 zurückzuführen ist (Schema 35 bis Schema 37). Diese erlauben auch die Erklärung der ungewöhnlichen Massenverschiebungen den Ions bei m/z 217 bei isotopenmarkierten Äpfelsäuren.

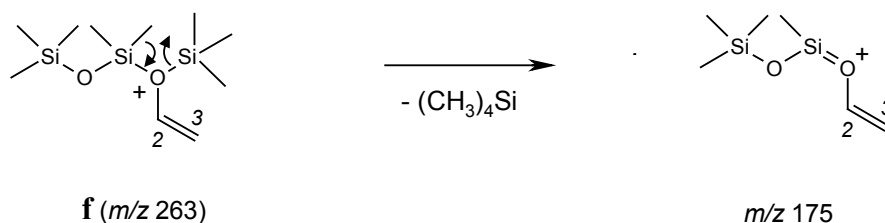
Schema 35: Bildung des Fragment-Ions bei m/z 217 aus dem Vorläufer-Ion bei m/z 260.Schema 36: Bildung des Fragment-Ions bei m/z 217 aus dem Vorläufer-Ion **h** (m/z 245).



Schema 37: Bildung des Fragment-Ions bei m/z 217 aus dem Vorläufer-Ion **d** (m/z 307).

7.2.5 Bildung des Fragment-Ions bei m/z 175

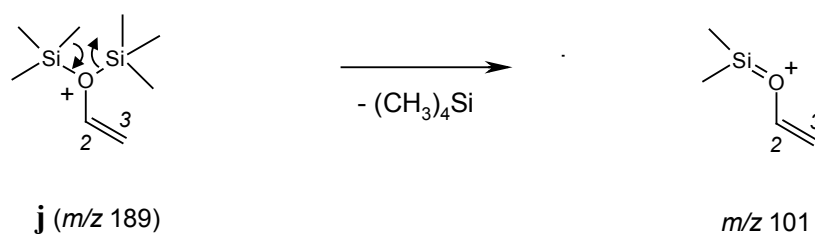
Der über Linked-Scan Spektren am besten abgesicherte Bildungsweg des Ions m/z 175 ist der über Ion **f** (m/z 263). Im B^2/E -Scan-Spektrum von m/z 175 sind als Vorläufer-Ionen die Ionen der Fragmentierungsreihe **b** (m/z 335), **d** (m/z 307) und **f** (m/z 263) deutlich zu erkennen. Die CID- und B/E-Scan-Spektren dieser Ionen zeigen ebenfalls Signale bei m/z 175. Die Signalverschiebungen bei isotonenmarkierten Äpfelsäuren zeigen wie bei Ion **f** übereinstimmend die Gegenwart der 2- und 3-Position mit den daran gebundenen Wasserstoffatomen der Äpfelsäure (**1**) an. Die aus HR-Messungen erhaltenen Summenformeln für das TMS-Derivat ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_2\text{Si}_2$) sowie für das $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Derivat ($\text{C}_6\text{H}_3\text{D}_{12}\text{O}_2\text{Si}_2$) bestätigen die Abspaltung von Tetramethylsilan aus den Derivatisierungsgruppen [69] sowie die Gegenwart der drei an die Äpfelsäure (**1**) gebundenen Wasserstoffatome.



Schema 38: Bildung des Fragment-Ions bei m/z 175.

7.2.6 Bildung des Fragment-Ions bei m/z 101

Linked-Scan und CID-Spektren belegen die Bildung des Ions bei m/z 101 aus Ion **j** (m/z 189). Die ermittelte Summenformel $\text{C}_4\text{H}_9\text{OSi}$ zeigt hierbei den Verlust von Tetramethylsilan an. Die für das $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Derivat ermittelte Summenformel $\text{C}_4\text{H}_3\text{D}_6\text{OSi}$ stellt die Gegenwart von drei Wasserstoffatomen aus der Äpfelsäure (**1**) sicher. Beim zugrundeliegenden Bildungsmechanismus muß es sich demnach um die gleiche Fragmentierungsreaktion wie bei der Bildung des Ions bei m/z 175 aus **f** (m/z 263) handeln. Die 2- und 3-Position der Äpfelsäure sowie die an diese gebundenen Wasserstoffatome sind noch im Fragment-Ion enthalten. Die Verschiebung um 6 u beim $[\text{D}_{27}]\text{TMS}$ -Derivat sichert die Gegenwart von sechs Wasserstoffatomen aus den TMS-Gruppen ab.



Schema 39: Bildung des Fragment-Ions bei m/z 101.

Die Vorläufer-Ionen **c** (m/z 307) und **d** (m/z 233) unterscheiden sich strukturell nur durch eine Trimethylsilyloxy-Gruppe, so daß beide grundsätzlich die gleichen Fragmentierungsreaktionen eingehen können, soweit die zusätzliche Trimethylsilyloxy-Gruppe nicht involviert ist. Auch die Produkt-Ionen dieser beiden Ionen unterscheiden sich dann nur durch diese eine Trimethylsilyloxy-Gruppe. Dies trifft ausgehend von den Vorläufer-Ionen **c** (m/z 233) und **d** (m/z 307) für folgende Ionen zu:

e (m/z 265) und **i** (m/z 191), **f** (m/z 263) und **j** (m/z 189), m/z 175 und m/z 101.

8 Berechnung der Wahrscheinlichkeitsfaktoren

In einer Fragmentierungsreaktion entstehen das Produkt-Ion (m_2^+) sowie das Neutralteilchen (n) aus dem Vorläufer-Ion (m_1^+):



V, N und P charakterisieren die jeweilige Anzahl der Markierungen des Vorläufer-Ions (m_1^+), des eliminierten Neutralteilchen (n) und des Produkt-Ions (m_2^+), die durch das natürliche Isotopenverhältnis der Elemente hervorgerufen werden. Es gilt daher:

$$V = N + P$$

Zur Kennzeichnung der relativen natürlichen Isotopenhäufigkeiten (NH) der s-fach positionsspezifisch markierten Isotopomere bei den m/z -Werten m/z wurde folgende Konvention gewählt (vgl. Kap. 4.4.7.1):

$$\text{NHsfach}(m_1^+_{m/z})_V \quad \text{NHsfach}(m_1^+_{m/z})_{V,N,P} \quad \text{NHsfach}(n)_N \quad \text{NHsfach}(m_2^+_{m/z})_P$$

$\text{NHsfach}(m_1^+_{m/z})_{V,N,P}$ ist die relative natürliche Häufigkeit der s-fach positionsspezifisch markierten Vorläufer-Ionen m_1^+ des m/z -Wertes m/z , die durch das natürliche Isotopenverhältnis der Elemente V-fach markiert sind, davon N dieser Markierungen im eliminierten Neutralteilchen und P im entstehenden Produkt-Ion tragen.

8.1 Vorläufer-Ion **b** (m/z 336)

8.1.1 Fragmentierung des Ions **b** (m/z 336) nach **d** (m/z 307 und m/z 308)

Anhand der ersten Fragmentierungsreaktion der Vorläufer-Ionen $m_1^+ = \mathbf{b}$ (m/z 336) zu den Produkt-Ionen $m_2^+ = \mathbf{d}$ (m/z 307 bzw. m/z 308) soll das Verfahren zur Berechnung der Wahrscheinlichkeitsfaktoren W demonstriert werden.

Hier ist die Wahrscheinlichkeit W zu berechnen, mit der das durch die natürliche Isotopenverteilung 1-fach markierte Vorläufer-Ion $m_1^+ = \mathbf{b}$ das schwerere Isotop im Neutralteilchen $n = \text{CO}$ oder im Produkt-Ion $m_2^+ = \mathbf{d}$ trägt (Abb. 26). Die zur Berechnung von W benötigten relativen natürlichen Isotopenhäufigkeiten sind in Tab. 45 angegeben.

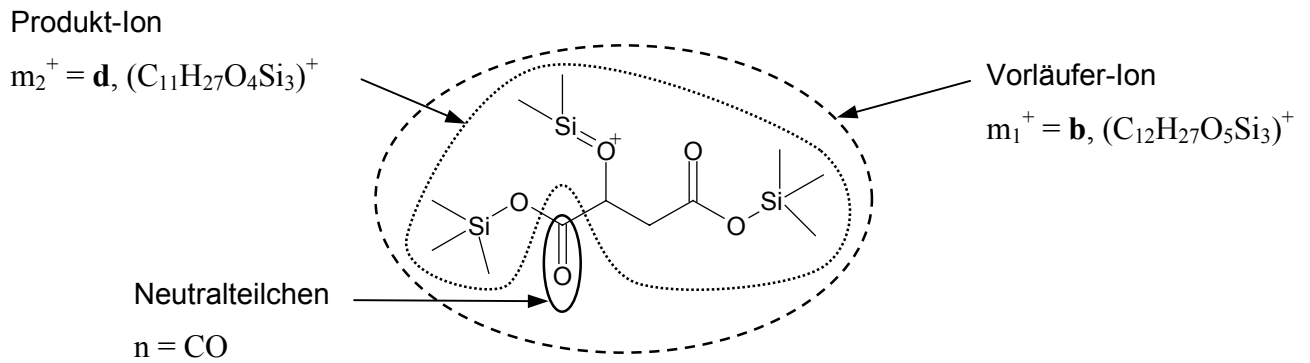


Abb. 26: Produkt-Ion ($m_2^+ = \mathbf{d}$) und eliminiertes Neutraltelchen ($n = \text{CO}$) des Vorläufer-Ions bei m/z 335 ($m_1^+ = \mathbf{b}$).

Natürliche Isotopenhäufigkeit		
NHsfach($m_1^+_{m/z}$) _V	= NH0fach(\mathbf{b}_{336}) ₁	= 19,550 %
NHsfach (n) _N	= NH0fach(CO) ₁	= 1,086 %
NHsfach ($m_2^+_{m/z}$) _P	= NH0fach(\mathbf{d}_{307}) ₀	= 68,176 %

Tab. 45: Zur Berechnung des Wahrscheinlichkeitsfaktors $W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0}$ benötigte Daten.

Das austretende Neutraltelchen $n = \text{CO}$ ist zu $\text{NH0fach}(\text{CO})_1 = 1,086\%$ 1-fach durch die natürliche Isotopenhäufigkeit der Elemente markiert (Tab. 45). Da dieses CO Teil des Vorläufer-Ions $m_1^+ = \mathbf{b}$ ist, bedeutet dies, daß auch 1,086 % der Vorläufer-Ionen \mathbf{b} in diesem Teil des Ions 1-fach natürlich markiert sind. Gleichzeitig jedoch können die anderen Atome des Vorläufer-Ions \mathbf{b} noch weitere Markierungen aus der natürlichen Isotopenverteilung tragen. Will man von den insgesamt $\text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 = 19,550\%$ 1-fach markierten Vorläufer-Ionen nur den Anteil berechnen, der im Bereich des späteren Produkt-Ions gleichzeitig keine weiteren Markierungen trägt ($\text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_{1,1,0}$), muß $\text{NH0fach}(\text{CO})_1 = 1,086\%$ mit der Wahrscheinlichkeit multipliziert werden, daß der Rest des Moleküls 0-fach markiert ist. Diese Wahrscheinlichkeit entspricht dem Anteil unmarkierter Produkt-Ionen \mathbf{d} ($\text{NH0fach}(\mathbf{d}_{307})_0 = 68,175\%$) geteilt durch 100.

$$\text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_{1,1,0} = \text{NH0fach}(\text{CO})_1 \cdot (\text{NH0fach}(\mathbf{d}_{307})_0 / 100)$$

Bezieht man dieses Produkt auf den Gesamtanteil $V = 1$ -fach markierter Vorläufer-Ionen \mathbf{b} ($\text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 = 19,550\%$), erhält man die Wahrscheinlichkeit W , daß $V = 1$ -fach

markierte Vorläufer-Ionen **b**, im eliminierten Neutralteilchen N = 1-fach und im Rest des Ions P = 0-fach markierte sind:

$$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} = \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_{1,1,0} / \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 = 0,038$$

Die Wahrscheinlichkeit, daß sich die Markierung im verbleibenden Produkt-Ion **d** befindet, berechnet sich in diesem Fall einfach, da für eine Markierung nur zwei Möglichkeiten bestehen:

$$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} = 1 - W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} = 0,962$$

8.1.2 Fragmentierung des Ions **d** (*m/z* 308) nach **e** (*m/z* 263 und *m/z* 264)

Nur die Ionen **d** (*m/z* 308) tragen noch eine Markierung, die aus der natürlichen Isotopenverteilung stammt, so daß für diese der Wahrscheinlichkeitsfaktor W berechnet werden muß. Die unmarkierten Ionen **d** (*m/z* 307) fragmentieren nur zu **e** (*m/z* 263).

Für die Wahrscheinlichkeitsfaktoren W der Fragmentierung des Ions **d** bei *m/z* 308 erhält man mit den in Tab. 46 wiedergegebenen natürlichen Isotopenhäufigkeiten für den Fragmentierungsweg der CO₂-Abspaltung:

$$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{263})_{1,1,0} = 0,039$$

$$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{264})_{1,0,1} = 1 - W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{263})_{1,1,0} = 0,961$$

Natürliche Isotopenhäufigkeit		
NHsfach($m_1^+ m/z$) _V	= NH0fach(d ₃₀₈) ₁	= 19,055 %
NHsfach (n) _N	= NH0fach(CO ₂) ₁	= 1,084 %
NHsfach ($m_2^+ m/z$) _P	= NH0fach(f ₂₆₃) ₀	= 69,209 %

Tab. 46: Zur Berechnung des Wahrscheinlichkeitsfaktors $W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{263})_{1,1,0}$ benötigte Daten.

8.1.3 Fragmentierung der Ionen **d** (*m/z* 308) nach **e** (*m/z* 265 und *m/z* 266)

Für den Fragmentierungsweg der Ketten-Abspaltung berechnen sich die Wahrscheinlichkeitsfaktoren W mit den in Tab. 47 gegebenen natürlichen Isotopenhäufigkeiten zu:

$$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{e}_{265})_{1,1,0} = 0,079$$

$$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{e}_{266})_{1,0,1} = 1 - W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{e}_{265})_{1,1,0} = 0,921$$

Natürliche Isotopenhäufigkeit		
NHsfach ($m_1^+ m/z$) _V	= NH0fach(d ₃₀₈) ₁	= 19,055 %
NHsfach (n) _N	= NH0fach(C ₂ H ₂ O) ₁	= 2,148 %
NHsfach ($m_2^+ m/z$) _P	= NH0fach(e ₂₆₅) ₀	= 69,827 %

Tab. 47: Zur Berechnung des Wahrscheinlichkeitsfaktors $W(\mathbf{b}_{308}, \mathbf{e}_{265})_{1,1,0}$ benötigte Daten.

Die Wahrscheinlichkeitsfaktoren für die konsekutiven Fragmentierungsreaktionen nach **e** und **f** ausgehend vom Vorläufer-Ion **b** (m/z 336) berechnen sich aus den Wahrscheinlichkeitsfaktoren für die einzelnen Fragmentierungsreaktionen wie folgt:

$$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{e}_{265})_{1,1,0} = W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} + W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} \cdot W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{e}_{265})_{1,1,0} = 0,113$$

$$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{e}_{266})_{1,0,1} = W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} \cdot W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{e}_{266})_{1,0,1} = 0,886$$

$$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{f}_{263})_{1,1,0} = W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} + W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} \cdot W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{263})_{1,1,0} = 0,075$$

$$W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{f}_{264})_{1,0,1} = W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} \cdot W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{264})_{1,0,1} = 0,924$$

Mit Hilfe dieser Wahrscheinlichkeitsfaktoren W lassen sich nun die theoretischen Intensitätsverhältnisse der isotopomeren Ionen **d** (m/z 307/308) sowie **e** (m/z 263/264) und **f** (m/z 265/266) vorausberechnen. Dies geschieht zunächst durch Addition der Produkte aus natürlicher Häufigkeit (NH), Konzentrationsanteil (PRp) und Wahrscheinlichkeitsfaktor W für jeden m/z -Wert. Die Summen für die isotopomeren Produkt-Ionen werden dann ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Int}(307) = \text{PR0} \cdot \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 \cdot W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} + \\ \text{PR1} \cdot \text{NH1fach}([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{336})_0$$

$$\text{Int}(307) = \text{PR0} \cdot 0,196 \cdot 0,038 + \\ \text{PR1} \cdot 0,680$$

$$\text{Int}(308) = \text{PR0} \cdot \text{NH0fach}(\mathbf{b}_{336})_1 \cdot W(\mathbf{b}_{336}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} + \\ (\text{PR2} + \text{PR3} + \text{PR4}) \cdot \text{NH1fach}([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{336})_0$$

$$\text{Int}(308) = \text{PR0} \cdot 0,196 \cdot 0,962 + \\ (\text{PR2} + \text{PR3} + \text{PR4}) \cdot 0,680 +$$

$$R(307,308)_{336} = \text{Int}(307) / \text{Int}(308)$$

Entsprechend gilt für die Intensitätsverhältnisse der Ionen e und f:

$$R(263,264)_{336} = \text{Int}(263) / \text{Int}(264)$$

$$R(265,266)_{336} = \text{Int}(265) / \text{Int}(266)$$

Schema 15 (Seite 69) zeigt, wie die Intensitätsverhältnisse bei gegebenen Anteilen unmarkierter (PR0) sowie der 1-fach markierten Äpfelsäuren (PR1, PR2, PR3, PR4) vorausberechnet werden können.

8.2 Vorläufer-Ion b (m/z 337)

Die Vorausberechnung der Intensitätsverhältnisse für den Fall einer 2-fachen Markierung gestaltet sich umfangreicher als im Falle der 1-fachen Markierung. Neben den 2-fach durch den natürlichen Isotopengehalt markierten TMS-Äpfelsäuren liegen auch die hierdurch 1-fach markierten Isotopomere der positionsspezifisch 1-fach markierten TMS-Äpfelsäuren im Vorläufer-Ion vor. Zudem muß im Falle der 2-fach durch den natürlichen Isotopengehalt markierten Äpfelsäuren unterschieden werden, ob beide zusätzliche Neutronen, nur ein Neutron oder kein zusätzliches Neutron im eliminierten Neutralteilchen anzutreffen sind.

Fall 1: 2-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt

Fall 1a: 2-fache Markierung im Neutralteilchen

Natürliche Isotopenhäufigkeit		
NHsfach($m_1^+ m/z$) _V	= NH0fach(b ₃₃₆) ₂	= 10,411 %
NHsfach (n) _N	= NH0fach(CO) ₂	= 0,197 %
NHsfach ($m_2^+ m/z$) _P	= NH0fach(d ₃₀₇) ₀	= 68,176 %

$$W(\mathbf{b}_{337}, \mathbf{d}_{307})_{2,2,0} = 0,013$$

Fall 1b: 1-fache Markierung im Neutralteilchen und 1-fache Markierung im Produkt-Ion

Natürliche Isotopenhäufigkeit		
NHsfach ($m_1^+ m/z$) _V	= NH0fach(b ₃₃₆) ₂	= 10,411 %
NHsfach (n) _N	= NH0fach(CO) ₁	= 1,086 %
NHsfach ($m_2^+ m/z$) _P	= NH0fach(d ₃₀₇) ₁	= 19,055 %

$$W(\mathbf{b}_{337}, \mathbf{d}_{308})_{2,1,1} = 0,020$$

Fall 1c: 2-fache Markierung im Produkt-Ion

Natürliche Isotopenhäufigkeit		
NHsfach ($m_1^{+ m/z}$) _V	= NH0fach(b ₃₃₆) ₂	= 10,411 %
NHsfach (n) _N	= NH0fach(CO) ₁	= 98,715 %
NHsfach ($m_2^{+ m/z}$) _P	= NH0fach(d ₃₀₇) ₁	= 10,199 %

$$W(\mathbf{b}_{337}, \mathbf{d}_{309})_{2,0,2} = 0,967$$

**Fall 2: 1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt,
1-fache positionsspezifische Markierung**

Fall 2a: 1-fache positionsspezifische Markierung in 1-Position,

1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Neutralteilchen.

$$W([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{337}, \mathbf{d}_{307})_{1,1,0} = 0,001$$

Fall 2b: 1-fache positionsspezifische Markierung in 1-Position,

1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Produkt-Ion.

$$W([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{337}, \mathbf{d}_{308})_{1,0,1} = 0,999$$

Fall 2c: 1-fache positionsspezifische Markierung in 2-, 3- oder 4-Position,

1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Produkt-Ion.

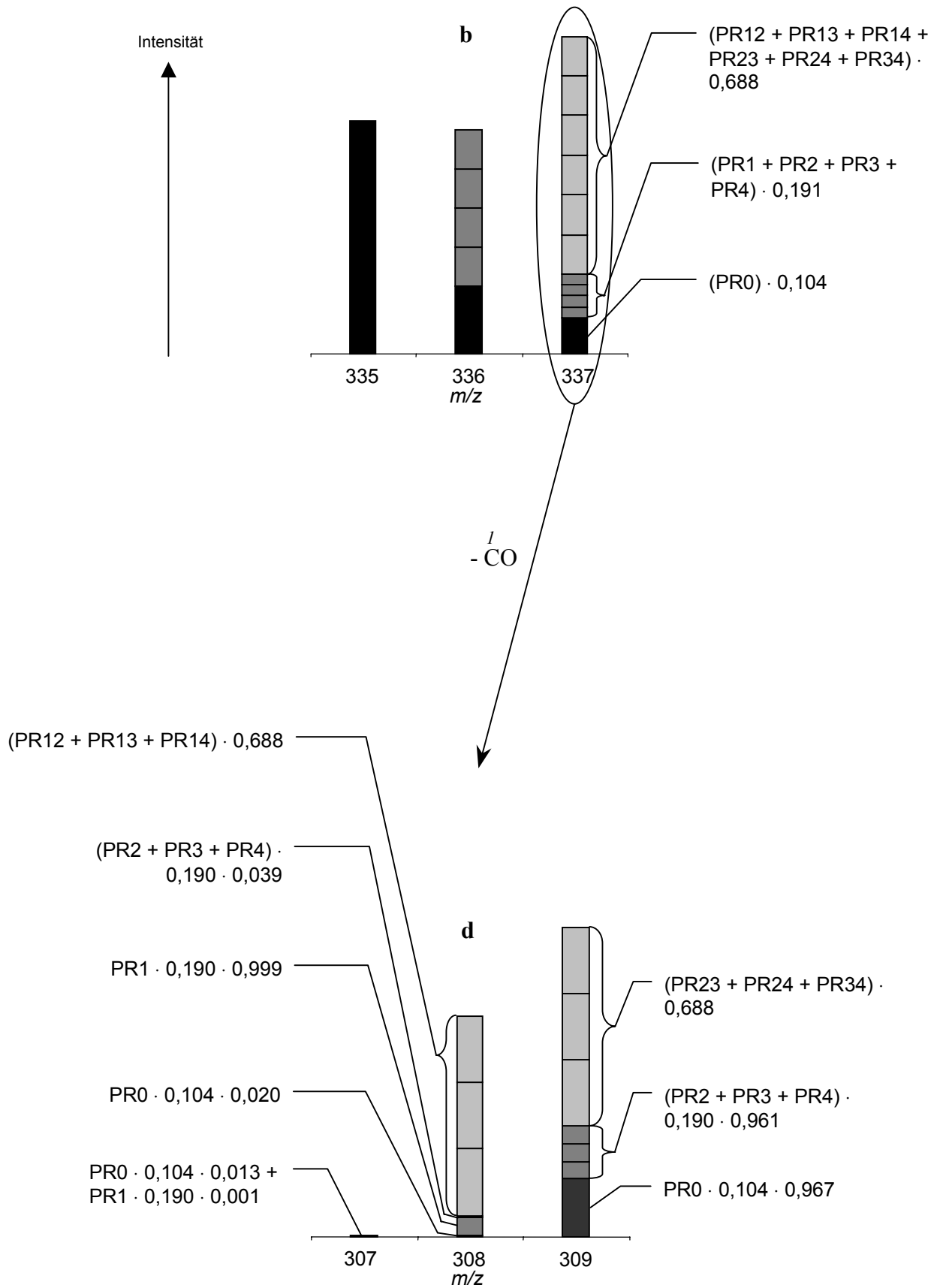
$$W([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{337}, [\text{C}^{13}]\mathbf{d}_{309})_{1,0,1} = 0,961$$

Fall 2d: 1-fache positionsspezifische Markierung in 2-, 3- oder 4-Position,

1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Neutralteilchen.

$$W([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{337}, [\text{C}^{13}]\mathbf{d}_{308})_{1,1,0} = 0,039$$

Anhand der Wahrscheinlichkeitsfaktoren W kann das theoretische Intensitätsverhältnis der Produkt-Ionen **d** bei m/z 307, 308 und 309 berechnet werden (Schema 40).



Schema 40: Berechnung der Intensitätsverhältnisse im Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (m/z 337).

8.3 Vorläufer-Ion **b (m/z 338)**

Bei der Vorausberechnung der Intensitätsverhältnisse der Produkt-Ionen **d** für die stoßinduzierte Fragmentierung des Ions **b** bei m/z 338, sind neben den natürlichen Isotopomeren der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-1) auch die der 1- und 2-fach positionsspezifisch markierten TMS-Äpfelsäuren zu beachten (Schema 41).

Fall 1: 3-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt

Fall 1a: Neutralteilchen 0-fach markiert, Produkt-Ion 3-fach markiert.

$$W(\mathbf{b}_{338}, \mathbf{d}_{310})_{3,0,3} = 0,929$$

Fall 1b: Neutralteilchen 1-fach markiert, Produkt-Ion 2-fach markiert.

$$W(\mathbf{b}_{338}, \mathbf{d}_{309})_{3,1,2} = 0,053$$

Fall 1c: Neutralteilchen 2-fach markiert, Produkt-Ion 1-fach markiert.

$$W(\mathbf{b}_{338}, \mathbf{d}_{308})_{3,2,1} = 0,018$$

Fall 1d: Neutralteilchen 3-fach markiert, Produkt-Ion 0-fach markiert.

$$W(\mathbf{b}_{338}, \mathbf{d}_{307})_{3,3,0} = 0,001$$

**Fall 2: 2-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt,
1-fache positionsspezifische Markierung**

Fall 2a: Produkt-Ion 2-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Neutralteilchen 1-fach positionsspezifisch markiert (1-Position).

$$W([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{338}, \mathbf{d}_{309})_{2,0,2} = 0,986$$

Fall 2b: Produkt-Ion 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Neutralteilchen 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Neutralteilchen 1-fach positionsspezifisch markiert (1-Position).

$$W([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{338}, \mathbf{d}_{308})_{2,1,1} = 0,001$$

Fall 2c: Neutralteilchen 2-fach durch natürliche Isotopenverteilung markiert,
Neutralteilchen 1-fach positionsspezifisch markiert (1-Position).

$$W([\text{C}^{13}]\mathbf{b}_{338}, \mathbf{d}_{307})_{2,2,0} = 0,013$$

Fall 2d: Produkt-Ion 2-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Produkt-Ion 1-fach positionsspezifisch markiert (2-, 3- oder 4-Position).

$$W([\text{^{13}C}]b_{338},[\text{^{13}C}]d_{310})_{2,0,2} = 0,967$$

Fall 2e: Produkt-Ion 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Neutralteilchen 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Produkt-Ion 1-fach positionsspezifisch markiert (2-, 3- oder 4-Position).

$$W([\text{^{13}C}]b_{338},[\text{^{13}C}]d_{309})_{2,1,1} = 0,019$$

Fall 2f: Neutralteilchen 2-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Produkt-Ion 1-fach positionsspezifisch markiert (2-, 3- oder 4-Position).

$$W([\text{^{13}C}]b_{338},[\text{^{13}C}]d_{308})_{2,2,0} = 0,013$$

**Fall 3: 1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt,
2-fache positionsspezifische Markierung**

Fall 3a: Produkt-Ion 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Produkt-Ion 1-fach positionsspezifisch markiert (2-, 3- oder 4-Position),
Neutralteilchen 1-fach positionsspezifisch markiert (1-Position).

$$W([\text{^{13}C}_2]b_{338},[\text{^{13}C}]d_{309})_{1,0,1} = 0,999$$

Fall 3b: Neutralteilchen 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Produkt-Ion 1-fach positionsspezifisch markiert (2-, 3- oder 4-Position),
Neutralteilchen 1-fach positionsspezifisch markiert (1-Position).

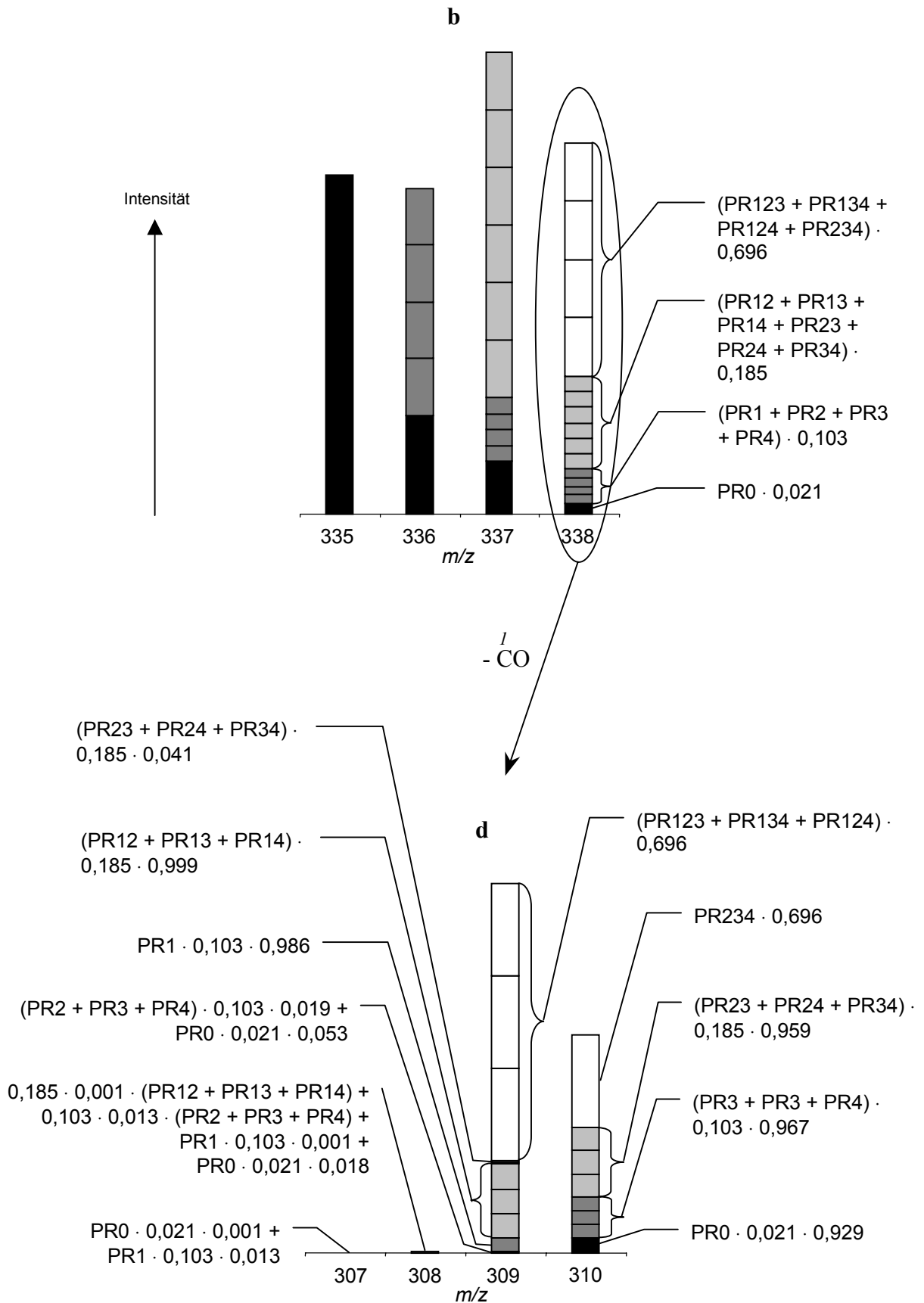
$$W([\text{^{13}C}_2]b_{338},[\text{^{13}C}]d_{308})_{1,1,0} = 0,001$$

Fall 3c: Produkt-Ion 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Produkt-Ion 2-fach positionsspezifisch markiert (2-, 3- oder 4-Position).

$$W([\text{^{13}C}_2]b_{338},[\text{^{13}C}_2]d_{310})_{1,0,1} = 0,959$$

Fall 3d: Neutralteilchen 1-fach durch natürlichen Isotopengehalt markiert,
Produkt-Ion 2-fach positionsspezifisch markiert (2-, 3- oder 4-Position).

$$W([\text{^{13}C}_2]b_{338},[\text{^{13}C}_2]d_{309})_{1,1,0} = 0,041$$



Schema 41: Berechnung der Intensitätsverhältnisse im Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **b** (m/z 338).

8.4 Vorläufer-Ion **d** (m/z 308)

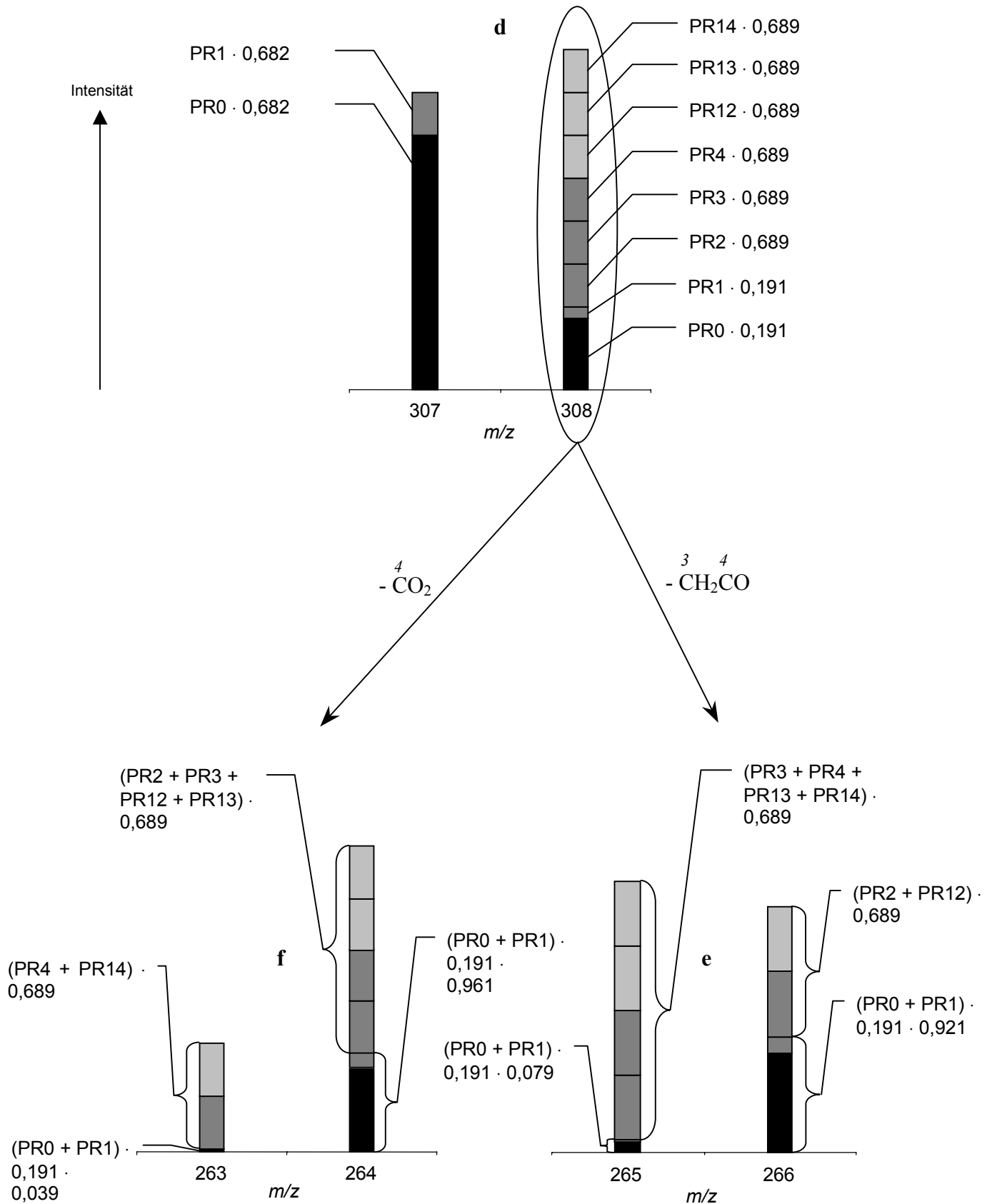
Ion **d** entsteht durch CO-Verlust aus **b**, wobei die 1-Position der Äpfelsäure (**1**) abgespalten wird. Unter dem Vorläufer-Ion **d** bei m/z 308 sind demzufolge die Ionen der 1-fach markierten TMS-Derivate der $[2-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$, $[3-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ und $[4-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ zu finden, sowie die der 2-fach und in 1-Position markierten TMS-Äpfelsäuren $[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$, $[1,3-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$ und $[1,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$. Beide besitzen die gleichen natürlichen Isotopenhäufigkeiten (NH) und verhalten sich bei den weiteren Fragmentierungen gleich. Eine Unterscheidung nach ursprünglich 1-fach oder ursprüngliche 2-fach markierter Äpfelsäure ist nicht mehr möglich.

Die durch den natürlichen Isotopengehalt 1-fach markierten Ionen der TMS- $[1-^{13}\text{C}]\mathbf{1}$ bei m/z 308, verhalten sich wie die 1-fach markierten Ionen der unmarkierten TMS-Äpfelsäure. Auch sie besitzen die gleichen natürlichen Isotopenhäufigkeiten (NH) und Wahrscheinlichkeitsfaktoren, die aus Kap. 8.1.2 und 8.1.3 übernommen werden können. Diese stimmen mit den experimentell ermittelten Wahrscheinlichkeitsfaktoren gut überein (Tab. 48) und erlauben daher die Verwendung der theoretischen Wahrscheinlichkeitsfaktoren W für weitere Berechnungen.

Vorläufer-Ion d (m/z 308)				
Produkt-Ion	Norm. Int.	W	W (Experiment)	W (Berechnet)
e (m/z 265)	90570	$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{e}_{265})_{1,1,0}$	0,091	0,079
e (m/z 266)	909430	$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{e}_{266})_{1,0,1}$	0,909	0,921
f (m/z 263)	48565	$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{263})_{1,1,0}$	0,049	0,039
f (m/z 264)	951435	$W(\mathbf{d}_{308}, \mathbf{f}_{264})_{1,0,1}$	0,951	0,961

Tab. 48: Experimentell bestimmte und berechnete Intensitätsverhältnisse und Wahrscheinlichkeitsfaktoren W für Vorläufer-Ion **d** (m/z 308) der unmarkierten TMS-Äpfelsäure (TMS-**1**)

Mit den Faktoren der relativen Isotopenhäufigkeiten (NH) der Ionen **d** ergeben sich zur Vorausberechnung der Intensitätsverhältnisse die in Schema 42 dargestellten Intensitäten der Produkt-Ionen **e** und **f**.



Schema 42: Berechnung der Intensitätsverhältnisse im Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **d** (*m/z* 308).

8.5 Vorläufer-Ion c (m/z 234)

Bei der stoßinduzierten Fragmentierung der Ionen **c** (m/z 234) liegt die gleiche Situation wie für die Fragmentierung der Ionen **d** bei m/z 308 vor. Auch hier ist im Vorläufer-Ion **c** die 1-Position bereits abgespalten, so daß eine Unterscheidung nach ursprünglich 0-fach oder 1-fach (PR0, PR1) bzw. 1-fach oder 2-fach (PR2, PR3, PR4, PR12, PR13, PR14) markierter Äpfelsäure nicht mehr möglich ist.

Die experimentell ermittelten Wahrscheinlichkeitsfaktoren W für das Vorläufer-Ion **d** zeigen starke Schwankungen von Messung zu Messung und liefern keine reproduzierbaren Ergebnisse. Eine Eignung der Produkt-Ionen-Verhältnisse der Ionen **i** und **j** zur Bestimmung der Einbauraten ist daher nicht zu erwarten. Zur Berechnung der Produkt-Ionen-Verhältnisse sowie zur Bestimmung der Einbauraten wurden die theoretischen Wahrscheinlichkeitsfaktoren W herangezogen (Schema 43).

Fall 1: Abspaltung von CO₂

Fall 1a: 1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Neutralteilchen,

0-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Produkt-Ion.

$$W(\mathbf{c}_{234}, \mathbf{j}_{189})_{1,1,0} = 0,053$$

Fall 1b: 0-fach Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Neutralteilchen,

1-fach Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Produkt-Ion.

$$W(\mathbf{c}_{234}, \mathbf{j}_{190})_{1,0,1} = 0,947$$

Fall 2: Abspaltung von C₂H₂O

Fall 2a: 1-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Neutralteilchen,

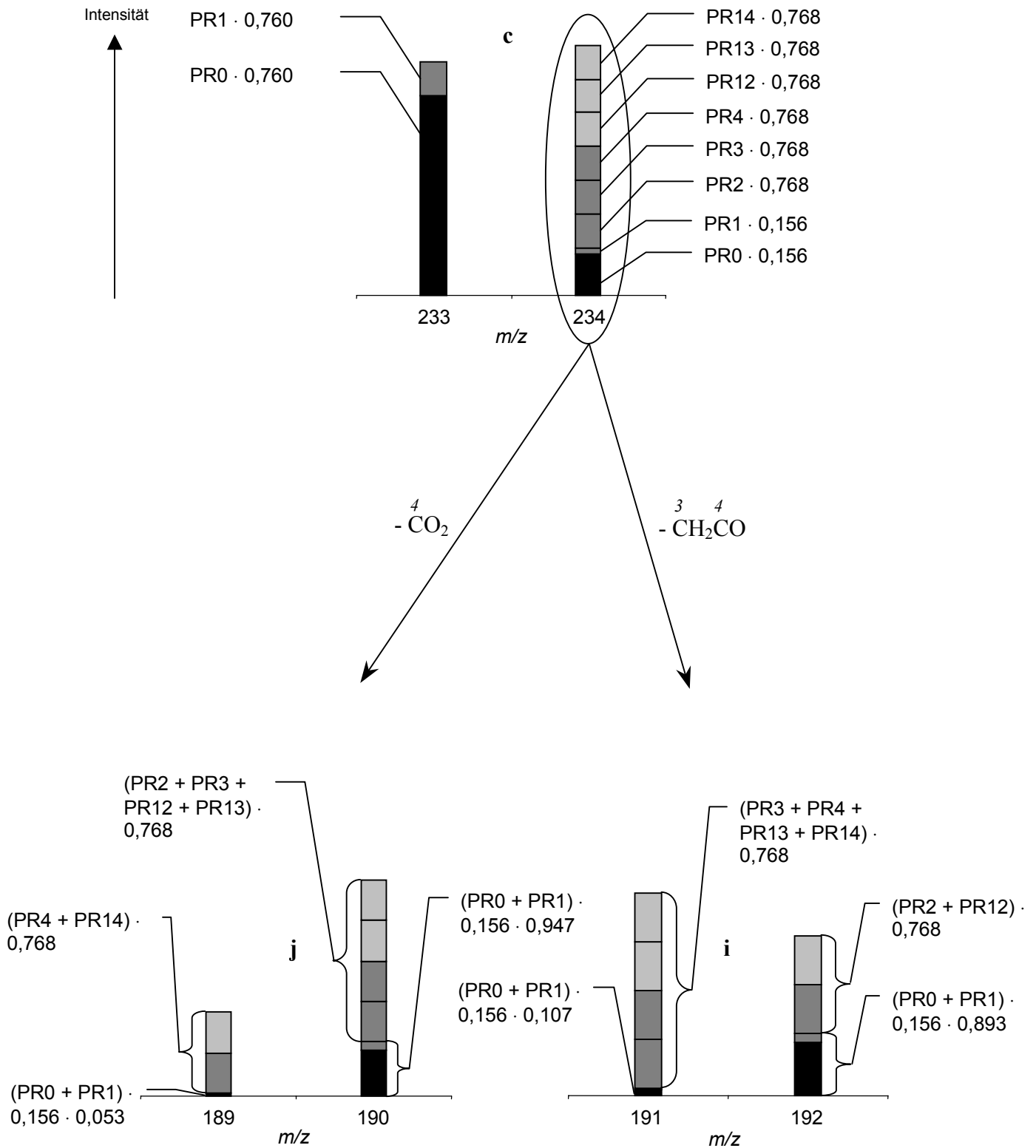
0-fache Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Produkt-Ion.

$$W(\mathbf{c}_{234}, \mathbf{j}_{191})_{1,1,0} = 0,107$$

Fall 2b: 0-fach Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Neutralteilchen,

1-fach Markierung durch natürlichen Isotopengehalt im Produkt-Ion.

$$W(\mathbf{c}_{234}, \mathbf{j}_{192})_{1,0,1} = 0,893$$



Schema 43: Berechnung der Intensitätsverhältnisse im Produkt-Ionen-Spektrum des Vorläufer-Ions **c** (*m/z* 234).

9 Automatisierung der ^{13}C -Einbauratenberechnung

Die Berechnung der ^{13}C -Einbauraten, sowohl aus den Massenspektren (Kap. 4.3), als auch aus den Produkt-Ionen-Spektren (Kap. 4.4), besteht aus umfangreichen Rechenoperationen. Da für die Berechnung der ^{13}C -Einbauraten mehrere Scans herangezogen werden, ist diese ohne eine computergestützte Datenauswertung sehr zeitaufwendig und durch möglicherweise falsche Dateneingabe und Fortpflanzung von falschen Zwischenergebnissen fehlerbehaftet. Die Dateneingabe sollte daher so gestaltet werden, daß nur ein Minimum an Daten manuell eingegeben wird, während der größte Teil automatisch aus den Dateien des GC-MS-Laufes ausgelesen wird. Zum Einsatz der Auswertungs-Software im Routine-Betrieb, sollte die Benutzeroberfläche bedienerfreundlich aufgebaut sein und die Ergebnisse in einem Standard-Format vorliegen, das leicht weiterverarbeitet und exportiert werden kann.

Das Tabellenkalkulationsprogramm Excel97 der Firma Microsoft erfüllt diese Forderungen. Es bietet bereits integrierte Funktionen wie Standardabweichung- oder Mittelwert-Berechnung und reichhaltige Möglichkeiten der Datenvisualisierung in Diagrammen. Alle Daten liegen in Zellen vor, die leicht zu weiteren Berechnungen herangezogen und schnell zu einem Ergebnisreport zusammengefaßt werden können. Außerdem steht mit Visual Basic for Applications (VBA) eine vollwertige Programmiersprache zur Verfügung. Daten können zwischen Excel-Zellen und VBA-Variablen ausgetauscht oder von externen Datenquellen (z.B. GC-MS-Dateien) eingelesen werden. Auch die Gestaltung von Benutzeroberflächen mit Schaltknöpfen (Buttons) und Menüleisten (Pull-Down-Menüs) ist auf sehr einfache Weise möglich.

Zur Durchführung der Berechnungen wurden die Daten der GC-MS-Läufe in das für VBA lesbare ASCII-Format umgewandelt. Dies geschah mit Hilfe des Programms MASSTransit (Version 1.01g, Fa. Palisade, Newfield, NY, USA).

Die Dateneingabe wurde so angelegt, daß die einzelnen, zur Berechnung erforderlichen Konzentrationsanteile in Prozent eingegeben werden, die Dateinamen der GC-MS-Läufe, die Anzahl und Nummer der zur Auswertung herangezogenen Scans und die höchste im Massenspektrum gemessene Masse. Bei der Einbauratenberechnung aus dem Massenspektrum ist zusätzlich der erste m/z -Wert des gewählten Isotopenmusters und die m/z -Wert-Verschiebung bei maximalem Einbau einzugeben (Abb. 27).

Berechnung der Einbaurate aus GC-MS-Messung

Scan	Intensity	Scan	Intensity
Scan 1	140	Scan 1	138
Scan 2	141	Scan 2	139
Scan 3	142	Scan 3	140
Scan 4	143	Scan 4	141
Scan 5	144	Scan 5	142
Scan 6	145	Scan 6	143
Scan 7	146	Scan 7	144
Scan 8	147	Scan 8	145
Scan 9	148	Scan 9	146
Scan 10	149	Scan 10	147
Scan 11		Scan 11	
Scan 12		Scan 12	
Scan 13		Scan 13	
Scan 14		Scan 14	
Scan 15		Scan 15	
Scan 16		Scan 16	
Scan 17		Scan 17	
Scan 18		Scan 18	
Scan 19		Scan 19	
Scan 20		Scan 20	

Dateiname der unmarkierten Probe: 12cap101.txt
 Anzahl der Scans für unmarkierte Probe: 10
 Dateiname der markierten Probe: 1213ap90.txt
 Anzahl der Scans für markierte Probe: 10

Gesamt bis Masse: 300
 Einbaurate berechnen für Ion: 245
 Verschiebung des Ions bei maximalem Einbau: 4

Individuelle Auswertung starten
 Auswertung für m/z 335, 319, 245, 307, 233 starten

Abb. 27: Arbeitsblatt zur Berechnung der ^{13}C -Einbaurate aus den GC-MS-Läufen markierter und unmarkierter Äpfelsäure (1).

In der Ergebnisausgabe werden die normierten Mittelwerte der Intensitäten bei den einzelnen m/z -Werten im Massenchromatogramm, die Einbauraten der einzelnen Säuren und die Standardabweichung ausgegeben (Abb. 28).

Microsoft Excel - MalicXExcel mit STABW+Tabelleneinlesen

Berechnung der Einbauraten aus GC-MS/MS 336

Erforderliche Daten aus MS/MS 336 Messung

Dateiname des GC-MS/MS 336-Laufes: msms109.txt
 Gescannt bis Masse: 300
 Anzahl der herangezogenen Scans: 17

Scan 1: 132
 Scan 2: 133
 Scan 3: 134
 Scan 4: 135
 Scan 5: 136
 Scan 6: 137
 Scan 7: 138
 Scan 8: 139
 Scan 9: 140
 Scan 10: 141
 Scan 11: 142
 Scan 12: 143
 Scan 13: 144
 Scan 14: 145
 Scan 15: 146
 Scan 16: 147
 Scan 17: 148

Erforderliche Daten aus MS-Messung

%-Anteil unmarkierte Äpfelsäure: 74,68
 %-Anteil 1-fach markierter Äpfelsäure: 20,8
 %-Anteil 1-13C-Äpfelsäure aus MS: 4,66

Auswertung starten

Ausgabe der Ergebnisse

Durchschnittliche normierte Counts: Intensitätsverhältnisse:

m/z 263: 301130,852 Int(m/z 263): 0,430883025
 m/z 264: 698869,148 Int(m/z 264):
 m/z 265: 431024,991 Int(m/z 265): 0,757546437
 m/z 266: 568975,009 Int(m/z 266):
 m/z 307: 147338,121 Int(m/z 307): 0,172797828
 m/z 308: 852661,879 Int(m/z 308):

Konzentrationsverhältnisse:

Pr1 / Pr2+Pr3+Pr4: 0,354122905
 Pr1+Pr3+Pr4 / Pr2: 3,203157233
 Pr1+Pr4 / Pr2+Pr3: 1,156149222

	1-13C aus MS/MS	1-13C aus MS
Prozentualer Anteil 1-13C-Äpfelsäure:	5,4	4,6
Prozentualer Anteil 2-13C-Äpfelsäure:	4,9	4,9
Prozentualer Anteil 3-13C-Äpfelsäure:	4,7	4,7
Prozentualer Anteil 4-13C-Äpfelsäure:	5,7	6,6

Einbauraten MS / Mittel MS / Einbauraten 1-fach / Mittel 1-fach / Einbauraten 2-fach / Mittel 2-fach / Einbauraten 3-fach / Mittel 3-fach / Zus

Abb. 28: Arbeitsblatt zur Bestimmung der prozentualen Anteile der 1-fach markierten Äpfelsäuren aus der GC-MS/MS-Messung des Vorläufer-Ions **b** bei m/z 336.

Für alle Auswertungsverfahren in denen Intensitätsverhältnisse herangezogen werden, werden die Intensitäten vor der Mittelung normiert.

B Experimenteller Teil

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker XRC 300 (Fa. Bruker, Rheinstetten) aufgenommen (^1H -NMR bei 300 MHz und ^{13}C -NMR bei 75 MHz). Tetramethylsilan wurde als interner Standard bei allen NMR-Spektren verwendet. Die Chemische Verschiebung ist in parts per million (ppm) relativ zu Tetramethylsilan ($\delta = 0,0$ ppm) angegeben. Für die Multiplizität werden die Abkürzungen s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quadruplett) und m (Multipllett) verwendet. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz angegeben.

GC-MS-Messungen wurden mit dem GC-MS-System GCQ (GC gekoppelt mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer, Software Version 2.2, Fa. Finnigan MAT, Bremen) durchgeführt (GC-Parameter: Kapillar-Säule HT5 (Fa. SGE, Langen), $25\text{ m} \times 0,22\text{ mm ID}$, Trägergas He, Säulenvordruck 1 bar, Splitfluß 40 ml/min, Injektortemperatur $275\text{ }^\circ\text{C}$, Transferline $275\text{ }^\circ\text{C}$). Wenn keine anderen Angaben gemacht sind, wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: $50\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), $5\text{ }^\circ\text{C/min}$ bis $145\text{ }^\circ\text{C}$, $25\text{ }^\circ\text{C/min}$ bis $300\text{ }^\circ\text{C}$. Bei diesen GC-Parametern erstreckt sich die Elutionsdauer der TMS-Äpfelsäuren (t_{R} 18:30 min) bei einer Scanrate von 1 Spektren/s über ca. 10 zur Auswertung geeignete Spektren. Die Kalibrierung des Ionenfallen-Massenspektrometers wurde mit den vom Hersteller empfohlenen MS-Parametern durchgeführt [99]. Die GC-MS-Messungen wurden im EI-Modus mit AGC = 10, High Mass Adjust = 50 %, Injection Waveform off und der automatisch gewählten SEV-Spannung (1200 V) durchgeführt. Für die GC-MS/MS-Messungen wurden bei AGC = 10 die SEV-Spannung auf 1400 V erhöht und folgende Parameter gewählt: Excitation Volts = 0,5 V, q = 0,225, Excitation Time = 15 ms, Peak Width = 1,0, Isolation Time = 16 ms, High Mass Adjust = 50 %, Injection Waveform off.

Hochauflösungsmessungen wurden an einem doppelfokussierenden Varian MAT 311A (Fa. Finnigan MAT, Bremen) Sektorfeld-Massenspektrometer mit umgekehrter Nier-Johnson-Geometrie im Peak-Matching-Verfahren gegen Perfluorkerosin (PFK) durchgeführt. Die Primärelektronenenergie betrug 70 eV, die Ionenquellentemperatur $200\text{ }^\circ\text{C}$ und die Auflösung lag bei $m/\Delta m = 10000$. Für niederaufgelöste Einzelproben lag die Auflösung bei $m/\Delta m = 1000$.

Die Untersuchungen metastabiler Zerfälle erfolgten am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg an einem JEOL JMS-700 (Fa. JEOL, Tokyo, Japan) Sektorfeld-Massenspektrometer. Das Gerät von umgekehrter Nier-Johnson-Geometrie wurde im 70 eV EI-Modus bei einer Auflösung von $m/\Delta m = 1000$ betrieben. Die Ionenquellentemperatur betrug $200\text{ }^\circ\text{C}$, die Beschleunigungsspannung war 10 kV. Die Kalibrierung der

Massenskala erfolgte vor den Messungen mittels PFK und Helium im Bereich m/z 4-600. Die Zerfälle der Ionen in der ersten feldfreien Region wurden durch Linked Scans nach $B/E = \text{const.}$ für die Produkt-Ionen bzw. $B^2/E = \text{const.}$ für die Vorläufer-Ionen registriert. Für die typischen Massenbereiche dieser Scans ergaben sich 5-6 s pro Scancyclus. Die Proben wurden mit dem wassergekühlten Direkteinlaßsystem zugeführt.

Massenspektren werden als Liste in der Form m/z (rel. Int.) angegeben. Die Angabe der rel. Int. erfolgt in Prozent des intensivsten Peaks (Basispeak). Neben dem Molekularpeak (M^+) werden alle Peaks angegeben, deren rel. Int. mindesten 5 % beträgt oder die charakteristisch für die Verbindung sind.

Die eingesetzten Reagenzien und Lösungsmittel wurden nach gängigen Vorschriften vor Gebrauch gereinigt [100], sofern sie nicht frisch für die betreffende Verwendung gekauft waren. Alle isotoopenmarkierten Edukte wurden von der Fa. Promochem, Hamburg bezogen, unmarkierte Edukte von der Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen. Flash-Chromatographie wurde an Kieselgel 60 F 254 der Fa. Merck, Darmstadt (Korngröße 0,040-0,063 mm) durchgeführt. Für alle Dünnschichtchromatogramme wurden Fertigplatten (Kieselgel 60 F 254) der Fa. Merck, Darmstadt verwendet. Die Komponenten wurden mit UV-Licht (254 und 375 nm), einer Kieselgel-Iod-Mischung und im Falle organischer Säuren mit ethanolischer Bromphenolblau-Lösung sichtbar gemacht. Kugelrohrdestillationen wurden an einem Kugelrohr der Fa. Büchi, Konstanz durchgeführt.

1 Massenspektrum der TMS-Äpfelsäure (TMS-1)

Zur Aufnahme des Massenspektrums der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) wurden 30 μl einer Äpfelsäurelösung in Aceton (1,5 mmol/l) mit 20 μl MSTFA gemischt und aus dieser Lösung 1 μl injiziert.

GC-MS: t_R 18:29 min.

Scanbereich: m/z 50 – m/z 400.

MS (EI, GCQ): 350 (2, M^+), 335 (24), 319 (12), 307 (57), 265 (54), 263 (78), 260 (6), 245 (28), 233 (57), 221 (7), 217 (25), 191 (19), 190 (17), 189 (22), 175 (17), 149 (100), 147 (44), 143 (4), 133 (8), 101 (3), 73 (77), 55 (5).

2 Synthese isotopenmarkierter Äpfelsäuren

2.1 [1-¹³C]Äpfelsäure ([1-¹³C]1)

2.1.1 Formylessigester-Natriumsalz (8)

Nachdem 920 mg (13,5 mmol) Natriumethanolat in 10 ml Ether unter N₂ auf -30 bis -40 °C abgekühlt waren, wurde innerhalb von 30 min. 1,00 g (13,5 mmol) in 5 ml Ether gelöster und auf -30 °C gekühlter Ameisensäureethylester (6) zugetropft und 1,5 h bei -30 °C gerührt. In die entstehende zähe Masse wurden innerhalb von 30 min. 1,20 g (13,6 mmol) in 5 ml Ether gelöster und auf -30 °C abgekühlter Essigsäureethylester (7) zugetropft. Nach 5 h bei -30 °C wurde das Kältebad nicht mehr erneuert und nach 48 h der Ether i. Vak. entfernt. Man erhielt 1,70 g eines hellgelben Pulvers als Rohprodukt 8.

2.1.2 3-[¹³C]Cyano-3-hydroxypropansäureethylester ([4-¹³C]9)

1,00 g (15,4 mmol) K¹³CN wurden in 51 ml einer Ethanol/Wasser-Mischung (1/1) gelöst und dann soviel 98 %ige Essigsäure zugegeben bis pH = 5,4 erreicht war. Nach Zugabe von 1,70 g der Rohsubstanz 8 wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit NaHCO₃ neutralisiert, mit Methylenchlorid (4 × 50 ml) extrahiert, getrocknet (Mg₂SO₄) und das Lösungsmittel entfernt. Man erhielt 640 mg (4,5 mmol, 29 % d. Th. bezogen auf K¹³CN) leicht verunreinigtes [4-¹³C]9 als gelbes Öl.

GC-MS (50 °C, 2 min, 5 °C/min, 140 °C, 25 °C/min, 300 °C): *t*_R 9:59 min.

MS (EI, GCQ): 144 (2, M⁺), 116 (6), 99 (25), 89 (9), 88 (8), 71 (15), 70 (13), 61 (15), 60 (12), 54 (100).

2.1.3 [1-¹³C]Äpfelsäure ([1-¹³C]1)

640 mg (4,5 mmol) leicht verunreinigtes [4-¹³C]9 wurden 15 h mit 10 ml HCl konz. zum Rückfluß erhitzt. Die wäßrige Lösung wurde dreimal i. Vak. bis zur Trockene eingedampft und wieder in Wasser aufgenommen. Nachdem zum vierten Mal eingedampft war, wurde der Rückstand in Aceton gelöst, filtriert und das Aceton i. Vak. entfernt. Das erhaltene Rohprodukt [1-¹³C]1 (400 mg) wurde an Kieselgel (2,7 × 40,0 cm, Ether/Ameisensäure = 20/1) chromatographiert und man erhielt 350 mg (2,612 mmol, 58 % d. Th.) [1-¹³C]1.

¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 2,69 (ddd, ²J(3-H', 3-H) = 16,1, ³J(3-H', 2-H) = 7,3, ³J(3-H', 1-¹³C) = 2,6, 1H, CH₂HCHOH), δ = 2,84 (ddd, ²J(3-H, 3-H') = 16,1, ³J(3-H, 2-H) = 4,4,

$^3J(3\text{-H}, 1\text{-}^{13}\text{C}) = 4,0$, 1H, $\text{CH}'\underline{\text{H}}\text{CHOH}$), $\delta = 4,53$ (ddd, $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 4,4$), $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}') = 7,3$, $^2J(2\text{-H}, 1\text{-}^{13}\text{C}) = 4,5$, 1H, $\text{CH}'\text{H}\underline{\text{C}}\text{HOH}$).

^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ Aceton): $\delta = 39,3$ (s, $\underline{\text{C}}\text{H}'\text{HCHOH}$), $\delta = 67,9$ (d, $^1J(\text{C-1}, \text{C-2}) = 59,25$, $\text{CH}'\text{H}\underline{\text{C}}\text{HOH}$), $\delta = 172,6$ (s, $\underline{\text{C}}\text{OOHCH}'\text{H}$), $\delta = 174,6$ (s, $\underline{\text{C}}\text{OOHCHOH}$).

GC-MS (TMS-Derivat): t_{R} 18:29.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 351 (2, M^+), 336 (30), 320 (14), 307 (64), 265 (52), 264 (36), 263 (43), 261 (6), 246 (24), 233 (49), 221 (8), 218 (11), 217 (13), 191 (20), 190 (11), 189 (23), 175 (16), 172 (5), 149 (100), 147 (60), 143 (6), 133 (16), 116 (4), 101 (5), 73 (97), 59 (4), 56 (5).

2.2 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure($[2\text{-}^{13}\text{C}]$ 1)

2.2.1 $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ Formylessigester-Natriumsalz ($[3\text{-}^{13}\text{C}]$ 8)

Analog 2.1.1 wurden 1,00 g (13,5 mmol) $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Ameisensäureethylester ($[1\text{-}^{13}\text{C}]$ 6) mit 1,20 g (13,6 mmol) Essigsäureethylester (7) umgesetzt. Man erhielt als Rohprodukt $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ 8 1,70 g eines hellgelben Pulvers.

2.2.2 3-Cyano-3-hydroxy- $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ propansäureethylester ($[3\text{-}^{13}\text{C}]$ 9)

Analog 2.1.2 wurden 1,70 g Rohprodukt $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ 8 mit 1,00 g (15,4 mmol) KCN umgesetzt. Nach der Aufarbeitung wurden 640 mg (4,5 mmol, 29 % d. Th. bezogen auf KCN) leicht verunreinigtes $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ 9 als gelbes Öl erhalten.

GC (50 °C, 2 min, 5 °C/min, 140 °C, 25 °C/min, 300 °C): t_{R} 9:59 min.

2.2.3 $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Äpfelsäure ($[2\text{-}^{13}\text{C}]$ 1)

Analog 2.1.3 erhielt man aus 640 mg (4,5 mmol) $[3\text{-}^{13}\text{C}]$ 9 nach Hydrolyse mit HCl konz. und Chromatographie 350 mg (2,6 mmol, 58 % d. Th.) $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ 1.

^1H -NMR ($[\text{D}_6]$ Aceton): $\delta = 2,69$ (ddd, $^2J(3\text{-H}', 3\text{-H}) = 16,1$, $^3J(3\text{-H}', 2\text{-H}) = 7,3$, $^3J(3\text{-H}', 1\text{-}^{13}\text{C}) = 2,4$, 1H, $\text{C}\underline{\text{H}}'\text{HCHOH}$), $\delta = 2,84$ (ddd, $^2J(3\text{-H}, 3\text{-H}') = 16,1$, $^3J(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 4,4$, $^3J(3\text{-H}, 1\text{-}^{13}\text{C}) = 4,1$, 1H, $\text{CH}'\underline{\text{H}}\text{CHOH}$), $\delta = 4,53$ (ddd, $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 4,4$), $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}') = 7,3$, $^2J(2\text{-H}, 1\text{-}^{13}\text{C}) = 145,8$, 1H, $\text{CH}'\text{H}\underline{\text{C}}\text{HOH}$).

^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ Aceton): $\delta = 39,3$ (d, $^1J(2\text{-C}, 3\text{-C}) = 38,15$, $\underline{\text{C}}\text{H}'\text{HCHOH}$), $\delta = 67,9$ (s, $\text{CH}'\text{H}\underline{\text{C}}\text{HOH}$), $\delta = 172,3$ (s, $\underline{\text{C}}\text{OOHCH}'\text{H}$), $\delta = 174,6$ (d, $^1J(2\text{-C}, 1\text{-C}) = 61,0$, $\underline{\text{C}}\text{OOHCHOH}$).

GC-MS (TMS-Derivat): t_R 18:29.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 351 (4, M^+), 336 (40), 320 (15), 308 (80), 266 (53), 264 (76), 261 (7), 246 (30), 234 (54), 221 (9), 218 (26), 192 (16), 191 (7), 190 (34), 176 (15), 172 (5), 149 (100), 147 (70), 144 (7), 133 (17), 117 (5), 102 (6), 73 (99), 59 (4), 56 (5).

2.3 [1,4- $^{13}C_2$]Äpfelsäure ([1,4- $^{13}C_2$]1)

2.3.1 [1- ^{13}C]Essigsäureethylester ([1- ^{13}C]7)

1,00 g (12,2 mmol) [1- ^{13}C]Natriumacetat ([1- ^{13}C]11) wurden in 3,75 ml frisch destilliertem Triethylphosphat mit etwas Glaswolle 1,5 h unter Rückfluß auf 210 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde im Kugelrohr destilliert (60 °C/0,3 Torr), wobei die Kugelrohre zum Auffangen des [1- ^{13}C]Essigsäureethylesters ([1- ^{13}C]7) mit fl. N_2 gekühlt waren. Man erhielt 910 mg (10,3 mmol, 85 % d. Th.) [1- ^{13}C]6.

GC (40 °C (3,0 min), 10,0 °C/min, 300 °C (5,0 min)): t_R 2:43.

2.3.2 [1- ^{13}C]Formylessigester-Natriumsalz ([1- ^{13}C]8)

Analog 2.1.1 wurden 1,00 g (13,5 mmol) Ameisensäureethylester (6) mit 910 mg (10,3 mmol) [1- ^{13}C]Essigsäureethylester ([1- ^{13}C]7) umgesetzt. Man erhielt 1,70 g eines hellgelben Pulvers als Rohprodukt [1- ^{13}C]8.

2.3.3 3-[^{13}C]Cyano-3-hydroxy-[1- ^{13}C]propansäureethylester ([1,4- $^{13}C_2$]9)

Analog 2.1.2 wurden nach Umsetzen von 1,70 g des Rohproduktes [1- ^{13}C]8 mit 1,00 g (15,4 mmol) $K^{13}CN$ 640 mg (4,5 mmol, 29 % d. Th. bezogen auf $K^{13}CN$) leicht verunreinigtes [1,4- $^{13}C_2$]9 als gelbes Öl erhalten.

GC-MS (50 °C, 2 min, 5 °C/min, 140 °C, 25 °C/min, 300 °C): t_R 9:59 min.

MS (EI, GCQ): 145 (2, M^+), 117 (6), 100 (29), 90 (7), 89 (7), 82 (5), 72 (13), 71 (10), 62 (14), 61 (10), 55 (100).

2.3.4 [1,4- $^{13}C_2$]Äpfelsäure ([1,4- $^{13}C_2$]1)

Analog 2.1.3 wurden aus 640 mg (4,5 mmol) [1,4- $^{13}C_2$]9 nach Hydrolyse mit $HCl_{konz.}$ und Chromatographie 350 mg (2,62 mmol, 58 % d. Th.) [1,4- $^{13}C_2$]1 erhalten.

1H -NMR ($[D_6]$ Aceton): δ = 2,69 (dddd, $^2J(3-H', 3-H) = 16,1$, $^3J(3-H', 2-H) = 7,3$, $^3J(3-H', 1-^{13}C) = 2,6$, $^2J(3-H', 4-^{13}C) = 6,8$, 1H, $CH'HCHOH$), δ = 2,84 (dddd, $^2J(3-H, 3-H') =$

16,1, $^3J(3\text{-H}, 2\text{-H}) = 4,4$, $^3J(3\text{-H}, 1\text{-}^{13}\text{C}) = 4,0$, $^2J(3\text{-H}, 4\text{-}^{13}\text{C}) = 7,0$, 1H, CH'HCHOH), $\delta = 4,53$ (dddd, $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 4,4$), $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}') = 7,3$, $^2J(2\text{-H}, 1\text{-}^{13}\text{C}) = 4,5$, $^3J(2\text{-H}, 4\text{-}^{13}\text{C}) = 5,3$, 1H, CH'HCHOH).

^{13}C -NMR ([D₆]Aceton): $\delta = 39,3$ (d, $^1J(4\text{-C}, 3\text{-C}) = 56,46$, ^{13}C , CH'HCHOH), $\delta = 67,9$ (d, $^1J(2\text{-C}, 1\text{-C}) = 59,51$, ^{13}C , CH'HCHOH), $\delta = 172,2$ (d, $^3J(1\text{-C}, 4\text{-C}) = 3,05$, ^{13}C , COOHCH'H), $\delta = 174,8$ (d, $3J(4\text{-C}, 1\text{-C}) = 3,05$, ^{13}C , COOHCHOH).

GC-MS (TMS-Derivat): t_R 18:29.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 352 (3, M⁺), 337 (32), 321 (16), 308 (76), 265 (87), 263 (64), 261 (8), 247 (44), 234 (70), 221 (12), 218 (33), 191 (34), 190 (7), 189 (30), 175 (20), 173 (7), 149 (87), 147 (100), 144 (9), 133 (18), 116 (5), 101 (7), 73 (90), 59 (3), 56 (7).

2.4 [1,3,4- $^{13}\text{C}_3$]Äpfelsäure ([1,3,4- $^{13}\text{C}_3$]1)

2.4.1 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Essigsäureethylester ([1,2- $^{13}\text{C}_2$]7)

Analog 2.3.1 wurden 1,00 g (12,2 mmol) [1,2- $^{13}\text{C}_2$]11 mit 3,75 ml Triethylphosphat umgesetzt. Nach Kugelrohrdestillation (60 °C/0.3 Torr) erhielt man 910 mg (10,3 mmol, 85 % d. Th.) [1,2- $^{13}\text{C}_2$]7.

2.4.2 [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Formylessigester-Natriumsalz ([1,2- $^{13}\text{C}_2$]8)

Analog 2.1.1 wurden 1,00 g (13,5 mmol) Ameisensäureethylester (6) mit 910 mg (10,3 mmol) [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Essigsäureethylester ([1,2- $^{13}\text{C}_2$]7) umgesetzt. Man erhielt 1,70 g eines hellgelben Pulvers als Rohprodukt [1,2- $^{13}\text{C}_2$]8.

2.4.3 3- ^{13}C Cyano-3-hydroxy-[1,2- $^{13}\text{C}_2$]propansäureethylester ([1,2,4- $^{13}\text{C}_3$]9)

Analog 2.1.2 wurden 1,70 g des Rohproduktes [1,2- $^{13}\text{C}_2$]8 mit 1,0 g (15,4 mmol) K ^{13}CN umgesetzt. Nach der Aufarbeitung wurden 640 mg (4,5 mmol, 29 % d. Th. bezogen auf K ^{13}CN) leicht verunreinigtes [1,2,4- $^{13}\text{C}_3$]9 als gelbes Öl erhalten.

GC-MS (50 °C (2 min), 5 °C/min, 140 °C, 25 °C/min, 300 °C): t_R 9:59 min

MS (EI, GCQ): 146 (3, M⁺), 118 (7), 101 (26), 91(8), 90 (8), 83 (7), 73 (17), 72 (13), 63 (12), (62 (15), 56 (100).

2.4.4 [1,3,4-¹³C₃]Äpfelsäure ([1,3,4-¹³C₃]1)

Analog 2.1.3 wurden nach Hydrolyse von 640 mg (4,5 mmol) leicht verunreinigtem [1,2,4-¹³C₃]9 und Chromatographie 350 mg (2,62 mmol, 58 % d. Th.) [1,3,4-¹³C₃]1 erhalten.

¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 2,69 (dddd, ²J(3-H', 3-H) = 16,1, ³J(3-H', 2-H) = 7,3, ³J(3-H', 1-¹³C) = 2,6, ²J(3-H', 4-¹³C) = 6,8, ¹J(3-H', 3-¹³C) = 130,19, 1H, CH'HCHOH), δ = 2,84 (dddd, ²J(3-H, 3-H') = 16,1, ³J(3-H, 2-H) = 4,4, ³J(3-H, 1-¹³C) = 4,0, ²J(3-H, 4-¹³C) = 7,0, ¹J(3-H, 3-¹³C) = 129,1, 1H, CH'HCHOH), δ = 4,53 (dddd, ³J(2-H, 3-H) = 4,4), ³J(2-H, 3-H') = 7,3, ²J(2-H, 1-¹³C) = 4,5, ³J(2-H, 4-¹³C) = 5,3, ²J(2-H, 3-¹³C) = 4,2, 1H, CH'HCHOH).

¹³C-NMR ([D₆]Aceton): δ = 39,3 (d, ¹J(3-C, 4-C) = 56,5, ¹³C, CH'HCHOH), δ = 67,9 3 (dd, ¹J(2-C, 3-C) = 39,7, ¹J(2-C, 1-C) = 59,51, ¹³C, CH'HCHOH), δ = 172,0 (dd, ¹J(4-C, 3-C) = 57,2, ³J(4-C, 1-C) = 3,05, ¹³C, COOHCH'H), δ = 174,8 (d, ³J(1-C, 4-C) = 3,05, ¹³C, COOHCHOH).

GC-MS (TMS-Derivat): *t_R* 18:29 min.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 353 (4, M⁺), 338 (45), 322 (21), 309 (99), 266 (59), 265 (77), 264 (64), 263 (10), 248 (38), 235 (68), 221 (13), 219 (33), 191 (33), 190 (28), 176 (22), 174 (5), 149 (100), 147 (78), 145 (8), 133 (17), 117 (5), 102 (6), 73 (77), 59 (3), 57 (4).

2.5 [3-¹³C]Äpfelsäure ([3-¹³C]1)

2.5.1 [3-¹³C]Oxalessigsäurediethylester Natriumsalz (13)

Einer Lösung von 1,64 g (11,2 mmol) Diethyloxalat (12) in 30 ml absolutem Ether wurde portionsweise unter Rühren 250 mg (11,2 mmol) Natrium zugegeben. Nach langsamem Zutropfen von 910 mg (10,2 mmol) [2-¹³C]Essigsäureethylester ([2-¹³C]7) bei RT, wurde bis zur Bildung eines gelbbraunen Niederschlages gerührt. Der entstandene Feststoff wurde mit Ether gewaschen und i. Vak. vom LM befreit. Man erhielt 1,65 g (7,8 mmol, 76 % d. Th.) des Rohproduktes 13.

2.5.2 [3-¹³C]Äpfelsäurediethylester (14)

Nachdem 1,65 g (7,8 mmol) Rohsubstanz 13 in 5 ml 2 N HCl gelöst waren, wurde extrahiert (Ether, 5 × 10 ml), getrocknet (MgSO₄) und der Ether i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde in 5 ml wasserfreiem Ethanol gelöst und unter Eiskühlung wurden 100 mg

(2,6 mmol) NaBH₄ so zugegeben, daß die Temperatur nicht über 6 °C steigt. Man rührte 1 h bei RT, gab 0,17 ml HCl konz. und 1,25 ml H₂O zu und entfernte das Ethanol i. Vak. Extraktion (Ether, 4 × 50 ml), Trocknen (MgSO₄) und Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. führten zu 1,40 g (7,4 mmol, 94,0 % d. Th.) Rohprodukt **14**.

GC-MS (40 °C, 1 min, 10 °C/min, 300 °C, 2 min): *t*_R 11,8 min.

MS (EI, GCQ): 146 (5, M⁺), 128 (10), 118 (80), 100 (7), 90 (35), 72 (100).

2.5.3 [3-¹³C]Äpfelsäure ([3-¹³C]1)

1,40 g (7,4 mmol) Rohprodukt **14** wurden in 10 ml 2 N HCl 16 h zum Rückfluß erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Reinigung analog 2.1.3 erhielt man 650 mg (4,8 mmol, 65 % d. Th.) [3-¹³C]Äpfelsäure ([3-¹³C]1).

¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 2,67 (ddd, ²J(3-H', 3-H) = 16,2, ³J(3-H', 2-H) = 7,3, ¹J(3-H', 3-¹³C) = 130,19, 1H, CH'HCHOH), δ = 2,83 (ddd, ²J(3-H, 3-H') = 16,2, ³J(3-H, 2-H) = 4,4, ¹J(3-H, 3-¹³C) = 129,1, 1H, CH'HCHOH), δ = 4,53 (ddd, ³J(2-H, 3-H) = 4,4, ³J(2-H, 3-H') = 7,3, ²J(2-H, 3-¹³C) = 4,2, 1H, CH'HCHOH).

¹³C-NMR ([D₆]Aceton): δ = 39,3 (s, ¹³C, CH'HCHOH), δ = 67,9 (d, ¹J(C-2, C-3) = 38,1, ¹³C, CH'HCHOH), δ = 172,6 (d, ¹J(C-4, C-3) = 57,9, ¹³C, COOHCH'H), δ = 174,6 (s, ¹³C, COOHCHOH).

GC-MS (TMS-Derivat): *t*_R 18:30.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 351 (4, M⁺), 336 (41), 320 (16), 308 (82), 265 (68), 264 (81), 261 (7), 246 (31), 234 (63), 221 (9), 218 (27), 191 (22), 190 (37), 176 (17), 172 (5), 149 (100), 147 (69), 144 (7), 133 (16), 117 (4), 102 (6), 73 (96), 59 (4), 56 (5).

2.6 [4-¹³C]Äpfelsäure ([4-¹³C]1)

2.6.1 3-Chlor-2-hydroxypropansäure (16)

5,00 g (45,0 mmol) 3-Chlor-1,2-propandiol (**15**) wurden im Eisbad gekühlt und innerhalb von 30 min. mit 15,4 ml HNO₃ konz. (65 %ig) versetzt. Unter Rühren wurde auf 80 °C erhitzt bis die Gasentwicklung nachließ, dann wurde die Temperatur für 2 h auf 100 °C erhöht. Nach Zugabe von 15 ml H₂O und 4,00 g NaHCO₃ wurde filtriert, mit Ether (10 × 50 ml) extrahiert und getrocknet (MgSO₄). Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man als Rohprodukt 3,06 g eines gelben Öls. Flash-Chromatographie an Kieselgel

(2,0 × 28,0 cm, Cyclohexan/Essigsäureethylester = 7/3) lieferte 2,50 g (20,1 mmol, 44 % d. Th.) 3-Chlor-2-hydroxypropansäure (**16**) in Form von gelben Kristallen.

¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 3,86 (dd, ³J(3-H, 2-H) = 3,6, ²J(3-H, 3-H') = 11,4, 1H, CH'HCHOH), δ = 3,91 (dd, ³J(3-H', 2-H) = 4,1, ²J(3-H', 3-H) = 11,4, 1H, CH'HCHOH), δ = 4,55 (dd, ³J(2-H, 3-H') = 4,1, ³J(2-H, 3-H) = 3,6, 1H, CH'HCHOH).

¹³C-NMR ([D₆]Aceton): δ = 47,5 (s, 1C, CHOH), δ = 71,1 (s, 1C, CH₂Cl), δ = 172,7 (s, 1C, COOH).

MS (TMS-Derivat, EI, 311A): 253 (5, M⁺-15), 225 (8), 190 (5), 147 (100), 116 (40), 101 (42), 73 (85), 59 (10), 45 (28).

2.6.2 3-[¹³C]Cyano-2-hydroxypropansäure (**17**)

820 mg (6,6 mmol) 3-Chlor-2-hydroxypropansäure (**16**) wurden mit 4 ml H₂O und 640 mg K₂CO₃ versetzt. Nach der Zugabe von 500 mg (7,7 mmol) K¹³CN wurde unter Rückfluß 2 h auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit 2 N HCl auf pH = 2 angesäuert und die wäßrige Phase i. Vak. entfernt. Flash-Chromatographie an Kieselgel (2,7 × 40,0 cm, Ether/Ameisensäure = 20/1) lieferte 480 mg (4,2 mmol, 46 % d. Th. bezogen auf K¹³CN) 3-[¹³C]Cyano-2-hydroxypropansäure (**17**).

¹H-NMR (CD₃CN): δ = 2,73 (ddd, ³J(3-H', 2-H) = 6,4, ²J(3-H', 3-H) = 16,9, ²J(3-H', 4-¹³C) = 9,7, 1H, CH'HCHOH), δ = 2,82 (ddd, ³J(3-H, 2-H) = 4,8, ²J(3-H, 3-H') = 16,9, ²J(3-H, 4-¹³C) = 9,7, 1H, CH'HCHOH), δ = 4,37 (ddd, ³J(2-H, 3-H) = 4,8, ³J(2-H, 3-H') = 6,4, ²J(2-H, 4-¹³C) = 7,1, 1H, CH'HCHOH).

¹³C-NMR (CD₃CN): δ = 23,6 (d, 1J(C-3, C-4) = 58,2, 1C, CH₂CN), δ = 67,3 (s, 1C, CHOH), δ = 117,9 (s, 1C, CN), δ = 173,1 (s, 1C, COOH).

MS (TMS-Derivat, EI, 311A): 245 (5, M⁺-15), 217 (10), 173 (15), 147 (100), 116 (18), 101 (25), 75 (45), 73(75), 60 (7), 44 (17).

HR-MS (TMS-Derivat): Gemessen 245,0858; Berechnet: 245,0857.

2.6.3 [4-¹³C]Äpfelsäure ([4-¹³C]**1**)

Analog 2.1.3 wurden aus 480 mg (4,2 mmol) **17** nach Hydrolyse und Chromatographie 440 mg (3,3 mmol, 78 % d. Th.) [4-¹³C]Äpfelsäure ([4-¹³C]**1**) erhalten.

¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 2,69 (ddd, ²J(3-H', 3-H) = 16,1, ³J(3-H', 2-H) = 7,3, ²J(3-H', 4-¹³C) = 6,8, 1H, CH'HCHOH), δ = 2,84 (ddd, ²J(3-H, 3-H') = 16,1, ³J(3-H, 2-H) = 4,5,

$^2J(3\text{-H}, 4\text{-}^{13}\text{C}) = 7,0$, 1H, CH'HCHOH), $\delta = 4,53$ (ddd, $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 4,4$), $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}') = 7,3$, $^2J(2\text{-H}, 3\text{-}^{13}\text{C}) = 5,3$, 1H, CH'HCHOH).

^{13}C -NMR ([D₆]Aceton): $\delta = 39,4$ (d, $^1J(\text{C-3}, \text{C-4}) = 57,9$, ^{13}C , CH'HCHOH), $\delta = 67,9$ (s, ^{13}C , CH'HCHOH), $\delta = 172,6$ (s, ^{13}C , COOHCH'H), $\delta = 174,6$ (s, ^{13}C , COOHCHOH).

GC-MS (TMS-Derivat): t_R 18:28.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 351 (3, M⁺), 336 (36), 320 (16), 308 (75), 265 (60), 264 (40), 263 (52), 261 (7), 246 (29), 234 (57), 221 (9), 218 (17), 217 (11), 191 (26), 190 (11), 189 (23), 175 (16), 172 (5), 149 (94), 147 (70), 144 (7), 133 (15), 117 (2), 116 (3), 101 (6), 73 (100), 59 (4), 55 (5).

2.7 [2-D]Äpfelsäure ([2-D]1)

Nachdem 500 mg (3,8 mmol) Oxallessigsäure (**18**) in 3 ml H₂O gelöst waren, wurde soviel K₂CO₃ zugegeben, bis pH = 8 erreicht war. Anschließend wurden unter Eiskühlung langsam 210 mg (5,0 mmol) NaBD₄ zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Wiederum unter Eiskühlung wurde mit 2 N HCl angesäuert und bis zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde mit kochendem Aceton extrahiert (4 × 50 ml) und die vereinigten Extrakte filtriert und einrotiert. Nach Flash-Chromatographie an Kieselgel (2,7 × 40,0 cm, Ether/Ameisensäure 20/1) wurden 300 mg (2,2 mmol, 59 % d. Th.) [2-D]Äpfelsäure ([2-D]1) erhalten.

^1H -NMR ([D₆]Aceton): $\delta = 2,69$ (d, $^2J(3\text{-H}', 3\text{-H}) = 16,1$, 1H, CH'HCHOH), $\delta = 2,84$ (d, $^2J(3\text{-H}, 3\text{-H}') = 16,1$, 1H, CH'HCHOH).

GC-MS (TMS-Derivat): t_R 18:30.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 351 (2, M⁺), 336 (18), 320 (11), 308 (39), 266 (43), 264 (81), 260 (4), 246 (28), 234 (47), 221 (8), 218 (16), 191 (13), 190 (30), 176 (16), 172 (5), 149 (73), 147 (76), 144 (6), 133 (12), 117 (2), 116 (2), 102 (6), 73 (100), 59 (4), 56 (8).

2.8 [3-D₂]Äpfelsäure ([3-D₂]1)

1,00 g (7,6 mmol) Oxallessigsäure (**18**) wurde 40 min. mit 6,0 ml D₂O bei RT gerührt. Nachdem das D₂O i. Vak. entfernt war, wurde der Rückstand erneut mit 6,0 ml D₂O 60 min. bei RT gerührt. Dann wurde soviel K₂CO₃ zugegeben, bis pH = 8 erreicht war. Unter Eiskühlung wurden langsam 420 mg (11,1 mmol) NaBH₄ zugegeben und 15 h bei RT gerührt. Wiederum unter Eiskühlung wurde mit 2 N HCl angesäuert (pH = 1) und bis zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde mit kochendem Aceton extrahiert

(4 × 50 ml) und die vereinigten Extrakte filtriert und einrotiert. Das Rohprodukt (1,04 g) wurde an Kieselgel (2,7 × 40,0 cm, Ether/Ameisensäure 20/1) chromatographiert und man erhielt 690 mg (5,1 mmol, 67 % d. Th.) [3-D₂]Äpfelsäure ([3-D₂]1).

¹H-NMR ([D₆]Aceton): δ = 4,53 (s, 1H, CH'HCH₂OH).

GC-MS (TMS-Derivat): *t_R* 18:30.

MS (TMS-Derivat, EI, GCQ): 352 (3, M⁺), 336 (30), 320 (14), 308 (62), 266 (54), 264 (74), 260 (4), 246 (26), 234 (49), 221 (8), 218 (16), 217 (6), 192 (16), 191 (11), 190 (27), 176 (15), 172 (5), 149 (95), 147 (53), 144 (6), 133 (9), 117 (2), 116 (3), 102 (5), 73 (100), 59 (3), 56 (6).

3 Massenspektren der [D₂₇]TMS-Derivate

Zur Aufnahme der Massenspektren der [D₂₇]TMS-Derivate der unmarkierten und isoto-
penmarkierten Äpfelsäuren wurden jeweils 30 µl einer 1,5 · 10⁻³ molaren Äpfelsäurelösung
in Aceton mit 10 µl des Derivatisierungsreagenzes [D₁₈]BSA gemischt. Unter den allge-
meinen GC-MS-Parametern wurde davon 1 µl injiziert.

[D₂₇]TMS-Äpfelsäure: 377 (6, M⁺), 359 (47), 340 (17), 331 (78), 289 (47), 287 (47), 278
(48), 260 (36), 251 (79), 242 (9), 232 (24), 209 (20), 208 (16), 207 (30), 187 (15), 160
(25), 161 (100), 162 (65), 152 (5), 142 (10), 107 (5).

[D₂₇]TMS-[1-¹³C]Äpfelsäure: 378 (4, M⁺), 360 (33), 341 (13), 331 (60), 289 (47), 287
(45), 279 (39), 261 (30), 251 (63), 242 (9), 232 (14), 233 (16), 209 (23), 208 (11), 207
(31), 187 (14), 160 (23), 161 (100), 162 (76), 152 (6), 142 (10), 107 (6).

[D₂₇]TMS-[2-¹³C]Äpfelsäure: 378 (4, M⁺), 360 (32), 341 (12), 332 (57), 290 (42), 288
(43), 279 (38), 261 (31), 252 (62), 242 (9), 233 (23), 210 (19), 209 (9), 208 (36), 188 (15),
160 (22), 161(100), 162 (76), 153 (6), 142 (10), 108 (6).

[D₂₇]TMS-[3-¹³C]Äpfelsäure: 378 (4, M⁺), 360 (33), 341 (13), 332 (57), 289 (49), 288
(46), 279 (38), 261 (29), 252 (60), 242 (9), 233 (23), 209 (22), 208 (36), 188 (14), 160
(21), 161(100), 162 (76), 153 (6), 142 (9), 108 (6).

[D₂₇]TMS-[4-¹³C]Äpfelsäure: 378 (4, M⁺), 360 (31), 341 (13), 332 (56), 289 (45), 287 (44), 279 (38), 261 (28), 252 (61), 242 (9), 232 (13), 233 (15), 209 (23), 208 (17), 207 (33), 187 (15), 160 (23), 161(100), 162 (80), 153 (6), 142 (10), 107 (6).

[D₂₇]TMS-[1,4-¹³C₂]Äpfelsäure: 379 (4, M⁺), 361 (31), 342 (13), 332 (56), 289 (45), 287 (44), 280 (38), 262 (28), 252 (61), 242 (9), 232 (13), 233 (15), 209 (23), 208 (17), 207 (33), 187 (15), 160 (23), 161(100), 162 (80), 153 (6), 142 (10), 107 (6).

[D₂₇]TMS-[1,3,4-¹³C₃]Äpfelsäure: 380 (4, M⁺), 362 (31), 343 (13), 333 (56), 289 (45), 288 (44), 281 (38), 263 (28), 253 (61), 242 (9), 234 (13), 233 (15), 209 (23), 208 (33), 188 (15), 160 (23), 161(100), 162 (80), 154 (6), 142 (10), 108 (6).

[D₂₇]TMS-[2-D]Äpfelsäure: 378 (4, M⁺), 360 (33), 341 (13), 332 (53), 290 (45), 288 (41), 279 (30), 261 (28), 252 (56), 242 (8), 232 (9), 233 (14), 210 (19), 207 (11), 208 (36), 188 (15), 160 (20), 161(100), 162 (82), 153 (6), 142 (9), 108 (6).

[D₂₇]TMS-[3-D₂]Äpfelsäure: 379 (4, M⁺), 361 (34), 341 (10), 333 (52), 289 (79), 289 (79), 279 (23), 261 (27), 253 (52), 242 (9), 233 (10), 234 (12), 209 (40), 208 (16), 209 (40), 189 (19), 160 (19), 161(100), 162 (87), 153 (4), 142 (10), 109 (6).

4 Hochauflösungsmessungen

4.1 Hochauflösungsmessungen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1)

Die bestimmten Massen und Summenformeln charakteristischer Fragment-Ionen der TMS-1 sind in Tab. 49 dargestellt. Für Ion II bei m/z 263 konnte keine Summenformel bestimmt werden.

Ion	m/z	Bestimmte Masse [u]	Summenformel	Abweichung von theoretischer Masse [Δ mmu]
a	350	350,1410	$C_{13}H_{30}O_5Si_3$	1
b	335	335,1163	$C_{12}H_{27}O_5Si_3$	0
g	319	319,0858	$C_{11}H_{23}O_5Si_3$	0
d	307	307,1214	$C_{11}H_{27}O_4Si_3$	0
e	265	265,1121	$C_9H_{25}O_3Si_3$	1
f	263/I	263,1323	$C_{10}H_{27}O_2Si_3$	0
-	263/II	-	-	-
-	260	260,0921	$C_{10}H_{20}O_4Si_2$	2
h	245	245,0691	$C_9H_{17}O_4Si_2$	3
c	233	233,1025	$C_9H_{21}O_3Si_2$	0
-	221	221,0852	$C_7H_{21}O_2Si_3$	0
-	217	217,0706	$C_8H_{17}O_3Si_2$	1
i	191	191,0922	$C_7H_{19}O_2Si_2$	0
j	189	189,1129	$C_8H_{21}OSi_2$	0
-	175	175,0615	$C_6H_{15}O_2Si_2$	0
-	101	101,0467	C_4H_9OSi	6

Tab. 49: Summenformelbestimmung der Ionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) über Hochauflösungsmassenspektrometrie im Peakmatching-Verfahren.

4.2 Hochauflösungsmessungen der [D₂₇]TMS-Äpfelsäure ([D₂₇]TMS-1)

Die ermittelten Massen und Summenformeln charakteristischer Fragment-Ionen der [D₂₇]TMS-1 sind in Tab. 50 dargestellt. Für die beiden sich überlagernden Ionen bei m/z 278 konnte keine Summenformel bestimmt werden, die mit den Verschiebungen dieser Signale im Falle einer Isotopenmarkierung in Einklang steht.

Entsprechendes Ion der TMS-1	m/z	Bestimmte Masse [u]	Summenformel	Abweichung von theoretischer Masse [Δ mmu]
b (m/z 335)	359	359,2674	C ₁₂ H ₃ D ₂₄ O ₅ Si ₃	0
g (m/z 319)	340	340,2120	C ₁₁ H ₂ D ₂₁ O ₅ Si ₃	-5
d (m/z 307)	331	331,2712	C ₁₁ H ₃ D ₂₄ O ₄ Si ₃	-1
e (m/z 265)	289	289,2616	C ₉ HD ₂₄ O ₃ Si ₃	0
f (m/z 263/I)	287	287,2818	C ₁₀ H ₃ D ₂₄ O ₂ Si ₃	-1
m/z 263/II	278	-	-	-
m/z 260		-	-	-
h (m/z 245)	260	260,1619	C ₉ H ₂ D ₁₅ O ₄ Si ₂	1
c (m/z 233)	251	251,2156	C ₉ H ₃ D ₁₈ O ₃ Si ₂	0
(m/z 221)	242	242,2166	C ₇ D ₂₁ O ₂ Si ₃	0
(m/z 217)	232	232,1637	C ₈ H ₂ D ₁₅ O ₃ Si ₂	-2
i (m/z 191)	209	209,2054	C ₇ HD ₁₈ O ₂ Si ₂	0
j (m/z 189)	207	207,2232	C ₈ H ₃ D ₁₈ OSi ₂	-3
(m/z 175)	187	187,1361	C ₆ H ₃ D ₁₂ O ₂ Si ₂	0
(m/z 101)	107	107,0802	C ₄ H ₃ D ₆ OSi	0

Tab. 50: Summenformelbestimmung charakteristischer Fragment-Ionen der [D₂₇]TMS-Äpfelsäure [D₂₇]TMS-1 über Hochauflösungsmassenspektrometrie im Peakmatching-Verfahren.

5 Massenspektren metastabiler Ionen

Die Massenspektren metastabiler Fragment-Ionen (B/E-Scan) der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) sind in Tab. 51 und deren Vorläufer-Ionen (B²/E-Scan) in Tab. 52 wiedergegeben. In Tab. 53 sind die Massenspektren metastabiler Fragment-Ionen (B/E-Scan) der [D₂₇]TMS-Äpfelsäure ([D₂₇]TMS-1) aufgeführt. Das B²/E-Scan-Spektrum des Ions bei m/z 278 der [D₂₇]TMS-1 zeigt keine Vorläufer-Ionen an.

B/E von <i>m/z</i>	<i>m/z</i> -Produkt-Ionen																Sonstige
	319	307	265	263	260	245	233	221	217	191	189	175	147	101	73		
350					100		33		15						2	133 (2)	
335	34	100	26	42		47		1	3			4	24		5	171 (17), 117 (3)	
319			29	29				23	3			6	51		21	229 (23), 171 (100), 306 (44), 291 (5), 143 (2), 133 (2), 117 (7), 116 (6)	
307			50	100					14			11	78		7	291 (3), 143 (12), 117 (7), 116 (6), 190 (36)	
265								12				8	21			246 (35), 235 (100), 221 (32), 173 (40), 147 (50)	
263								18				13	25			235 (87), 236 (100), 173 (31)	
260						12			100				90			235 (83), 232 (48), 173 (34), 133 (7), 117 (2), 55 (1)	
245									8			4	100		4	203 (6), 177 (4)	
233									13	35	100	9	41		14	219 (37), 163 (18), 177 (11), 193 (18), 203 (4), 143 (11), 117 (31), 116 (48)	
221													91		20	205 (50), 177 (100)	
217										2	12	17	100		5	203 (6), 177 (30), 143 (1), 55 (15)	
191												10	81		2	145 (28), 173 (100)	
189												50	100		50	145 (23), 113 (20), 160 (10), 161 (16)	
175													20			145 (26), 146 (22), 102 (22), 103 (12), 133 (100)	
101															2	59 (100), 75 (1)	

Tab. 51: Relative Intensitäten, der in den B/E-Spektren der TMS-Äpfelsäure (TMS-1) auftretenden Produkt-Ionen.

B ² /E von m/z	m/z Vorläufer-Ionen																Sonstige
	350	335	319	307	265	263	260	245	233	217	191	190	189	175	116	101	
265		87		100													
263/II		73		100													
260	100																278 (30), 291 (5)
245		63			100												
233	100																278 (20), 261 (99)
221		6	4		100												305 (10), 292 (25), 237 (72)
217	10	23		100		48	28	84									
191								100									305-308 (9)
190																	305-307 (33), 233-235 (100)
189								100									
175		13		15						Σ=100							247 (13), 235 (37), 219 (47)
147		14		20					44		Σ=100			5			235 (44), 177 (7), 162 (11), 204 (4)
101												10		40			145 (50), 161 (10), 173 (100)
59																100	131 (34), 75 (17)

Tab. 52: Mit B²/E-Scantechnik gefundene Vorläufer-Ionen von Fragment-Ionen der TMS-Äpfelsäure (TMS-1).

B/E von <i>m/z</i>	<i>m/z</i> -Produkt-Ionen													Sonstige			
	340	331	289	287	278	260	251	242	232	209	207	187	162		107	82	
377					100												
359	40	100	25	35		50			2			5	20		5		315 (10), 180 (15), 126 (1)
340																	323 (100)
331			60	100				10				10	50		2		206 (10), 152 (13), 126 (2)
289							55					15	100				
287							10					12	100				
278						33					5		5				250 (100), 231 (7), 208 (5), 179 (30)
260								15					100		7		215 (17)
251									35	65	25	80		7			234 (35), 231 (4), 208 (100), 206 (32), 189 (20), 181 (5), 180 (5), 151 (20), 126 (22), 125 (22)
242														100			
232											100	25					189 (70)
209												100	100		5		190 (65), 189 (24),
207												100	5	8			190 (15), 189 (12),
187																	179 (70), 145 (35), 142 (100)
107																	65 (100)

Tab. 53: Relative Intensitäten, der in den B/E-Spektren der [D₂₇]TMS-Äpfelsäure ([D₂₇]TMS-1) auftretenden Produkt-Ionen.

6 Äpfelsäuremischungen

Für die massenspektrometrischen Experimente zur Bestimmung von ^{13}C -Einbauraten wurden Lösungen mit unterschiedlichen relativen Anteilen unmarkierter und ^{13}C -markierter Äpfelsäuren benötigt (Tab. 54). Für die Stammlösungen, aus denen die Mischungen hergestellt wurden, wurden jeweils 500 ml einer $1,5 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung der jeweiligen Äpfelsäuren in Aceton hergestellt. Die verschiedenen Lösungen wurden mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette (10-100 μl) gemischt. Die Gesamtvolumina der Lösungen lagen im Bereich von 200-500 μl . Vor der Injektion in das GC-MS-System wurden die Mischungen zur Bildung des TMS-Derivates mit ca. 50 μl MSTFA versetzt.

Mischung	1	[1- ^{13}C] 1	[2- ^{13}C] 1	[3- ^{13}C] 1	[4- ^{13}C] 1	[1,4- $^{13}\text{C}_2$] 1	[1,3,4- $^{13}\text{C}_3$] 1
A	50,0	50,0	-	-	-	-	-
B	50,0	-	50,0	-	-	-	-
C	50,0	-	-	50,0	-	-	-
D	50,0	-	-	-	50,0	-	-
E	50,0	-	-	-	-	50,0	-
F	50,0	-	-	-	-	-	50,0
G	80,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-	-
H	90,0	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-
I	95,0	1,25	1,25	1,25	1,25	-	-
J	75,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-
K	65,0	11,0	2,0	2,0	11,0	7,0	2,0
L	-	25,0	25,0	25,0	25,0	-	-
M	-	-	50,0	50	-	-	-
N	-	-	50,0	-	50,0	-	-
O	-	-	-	50,0	50,0	-	-
P	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	-	-
Q	85,0	3,75	3,75	3,75	3,75	-	-
R	65,0	11,0	-	-	11,0	9,0	4,0
S	87,0	5,0	-	-	5,0	3,0	-

Tab. 54: Konzentrationsanteile [%] untersuchter Mischungen unmarkierter und ^{13}C -markierter Äpfelsäuren zur Bestimmung von ^{13}C -Einbauraten in Äpfelsäure (1).

7 ¹³C-Einbauratenbestimmung

Die rel. Int. der Isotopenmuster zur Bestimmung der ¹³C-Einbaurate aus dem Massenspektrum wird normiert auf 1,0 relativ zum Signal des unmarkierten Isotopomers angegeben.

Bei der Einbauratenberechnung über die Intensitätsverhältnisse in den Produkt-Ionen-Spektren sind die über die ausgewählten Scans gemittelten Intensitätsverhältnisse von Bedeutung. Die angegebenen Signalintensitäten der MS/MS-Messungen wurden daher aus den gemittelten Verhältnissen berechnet und in ihrer Summe auf 10⁶ Counts normiert.

Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, gelten für die Produkt-Ionen-Spektren der MS/MS-Messungen folgende Scanbereiche:

Vorläufer-Ion **b**: m/z 260 – m/z 312, 9 Microscans.

Vorläufer-Ion **d**: m/z 250 – m/z 280, 10 Microscans.

Vorläufer-Ion **c**: m/z 170 – m/z 200, 10 Microscans.

7.1 Mischung A

MS-Parameter: Scanbereich m/z 40 – 380, 7 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,290), 337 (0,158), 338 (0,028), 339 (0,010).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,276), 321 (0,144), 322 (0,023), 323 (0,011).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,212), 247 (0,142), 248 (0,021), 249 (0,010).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,282), 309 (0,149), 310 (0,026).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,203), 235 (0,098), 236 (0,014).

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (1,293), 337 (0,438), 338 (0,197), 339 (0,043).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (1,279), 321 (0,443), 322 (0,192), 323 (0,033).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (1,174), 247 (0,339), 248 (0,161), 249 (0,034).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,281), 309 (0,146), 310 (0,028).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,209), 235 (0,093), 236 (0,018).

7.2 Mischung B

MS-Parameter: Scanbereich m/z 50 – 650, 5 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,308), 337 (0,167), 338 (0,018), 339 (0,005).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,265), 321 (0,153), 322 (0,018), 323 (0,005).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,212), 247 (0,147), 248 (0,016), 249 (0,006).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,288), 309 (0,138), 310 (0,021).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,219), 235 (0,098), 236 (0,011).

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (1,277), 337 (0,433), 338 (0,179), 339 (0,020).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (1,277), 321 (0,387), 322 (0,115), 323 (0,016).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (1,295), 247 (0,368), 248 (0,149), 249 (0,021).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (1,151), 309 (0,364), 310 (0,140).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (1,233), 235 (0,288), 236 (0,104).

7.3 Mischung C

MS-Parameter: Scanbereich m/z 50 – 650, 5 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung B.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (1,303), 337 (0,411), 338 (0,119), 339 (0,004).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (1,344), 321 (0,413), 322 (0,164), 323 (0,019).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (1,251), 247 (0,347), 248 (0,161), 249 (0,021).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (1,194), 309 (0,363), 310 (0,145).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (1,236), 235 (0,296), 236 (0,103).

7.4 Mischung D

MS-Parameter: Scanbereich m/z 50 – 650, 5 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung B.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (1,274), 337 (0,409), 338 (0,157), 339 (0,015).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (1,318), 321 (0,415), 322 (0,154), 323 (0,014).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (1,243), 247 (0,350), 248 (0,159), 249 (0,031).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (1,200), 309 (0,364), 310 (0,142).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (1,253), 235 (0,309), 236 (0,103).

7.5 Mischung E

MS-Parameter: Scanbereich m/z 40 – 380, 7 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung A.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,326), 337 (1,137), 338 (0,312), 339 (0,161).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,262), 321 (1,058), 322 (0,290), 323 (0,153).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,253), 247 (1,179), 248 (0,210), 249 (0,161).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (1,111), 309 (0,352), 310 (0,147).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (1,127), 235 (0,293), 236 (0,102).

7.6 Mischung F

MS-Parameter: Scanbereich m/z 40 – 380, 7 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung A.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,371), 337 (0,196), 338 (1,048), 339 (0,287).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,288), 321 (0,178), 322 (1,002), 323 (0,225).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,204), 247 (0,181), 248 (0,953), 249 (0,187).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,397), 309 (1,031), 310 (0,276).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,256), 235 (1,047), 236 (0,200).

7.7 Mischung G

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,286), 337 (0,155), 338 (0,029), 339 (0,008).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,268), 321 (0,135), 322 (0,022), 323 (0,006).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,212), 247 (0,148), 248 (0,021), 249 (0,011).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,285), 309 (0,140), 310 (0,027).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,215), 235 (0,097), 236 (0,012).

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,525), 337 (0,224), 338 (0,058), 339(0,016).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,547), 321 (0,215), 322 (0,060), 323 (0,018).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,469), 247 (0,192), 248 (0,054), 249 (0,017).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,463), 309 (0,189), 310 (0,047).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,403), 235 (0,139), 236 (0,035).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (275973), 264 (724027), 265 (415982), 266 (584018), 307 (138166), 308 (861834).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	5,1	1,1
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	4,7	2,3
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	5,2	3,1
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	5,1	1,8

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (160692), 264 (839308), 265 (320759), 266 (679241).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	4,9	1,9
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	5,5	2,3
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	5,0	1,2

MS/MS von c (m/z 234):

m/z 189 (260034), 190 (739966), 191 (444441), 192 (555559).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	2,6	12,2
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	5,1	10,6
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	7,6	11,9

7.8 Mischung H

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung G.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,406), 337 (0,189), 338 (0,050), 339 (0,011).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,387), 321 (0,167), 322 (0,043), 323 (0,009).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,313), 247 (0,175), 248 (0,037), 249 (0,014).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,369), 309 (0,161), 233 (0,036).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,283), 235 (0,113), 236 (0,021).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (219583), 264 (780417), 265(293512), 266 (706488), 307 (103867), 308 (896132).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	2,8	0,6
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	2,4	1,4
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	1,7	1,6
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	3,2	1,2

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (118754), 264 (881246), 265 (209390), 266 (790610).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	2,5	2,0
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	2,0	1,8
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	2,9	1,2

7.9 Mischung I

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung G.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,356), 337 (0,171), 338 (0,042), 339 (0,008).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,329), 321 (0,165), 322 (0,034), 323 (0,011).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,259), 247 (0,156), 248 (0,032), 249 (0,010).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,329), 309 (0,146), 310 (0,030).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,251), 235 (0,104), 236 (0,019).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (160708), 264 (839292), 265 (218961), 266 (781039), 307 (88965), 308 (911035).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	1,9	0,5
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	1,0	0,8
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	0,9	0,9
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	1,3	0,8

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (74674), 264 (925326), 265 (141815), 266 (858185).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	1,4	1,5
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	1,0	0,9
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	1,2	1,1

7.10 Mischung J

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,280), 337 (0,151), 338 (0,029), 339 (0,010).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,278), 321 (0,134), 322 (0,022), 323 (0,013).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,189), 247 (0,139), 248 (0,021), 249 (0,009).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,274), 309 (0,133), 310 (0,026).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,216), 235 (0,088), 236 (0,012).

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,537), 337 (0,279), 338 (0,076), 339 (0,023).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,579), 321 (0,288), 322 (0,082), 323 (0,023).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,473), 247 (0,252), 248 (0,071), 249 (0,019).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,537), 309 (0,207), 310 (0,059).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,456), 235 (0,140), 236 (0,038).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (301131), 264 (698869), 265 (431025), 266 (568975), 307 (147338), 308 (852662).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	5,3	0,6
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	4,5	2,1
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	4,6	3,1
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	5,6	1,6

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (264473), 264 (735527), 265 (414277), 266 (585722).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C]Äpfelsäure ([1,2- ¹³ C]1)	-0,3	0,9
[1,3- ¹³ C]Äpfelsäure ([1,3- ¹³ C]1)	0,8	1,3
[1,4- ¹³ C]Äpfelsäure ([1,4- ¹³ C]1)	4,7	1,1

MS/MS von b (m/z 337):

m/z 307 (10387), 308 (317568), 309 (672045).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]1, [1,3- ¹³ C ₂]1, [1,4- ¹³ C ₂]1	$\Sigma = 5,2$	1,6
[2,3- ¹³ C ₂]1, [2,4- ¹³ C ₂]1, [3,4- ¹³ C ₂]1	$\Sigma = -0,6$	1,5

7.11 Mischung K

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,288), 337 (0,146), 338 (0,024), 339 (0,008).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,268), 321 (0,124), 322 (0,026), 323 (0,009).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,202), 247 (0,117), 248 (0,020), 249 (0,009).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,275), 309 (0,143), 310 (0,026).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,202), 235 (0,097), 236 (0,013).

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,663), 337 (0,386), 338 (0,143), 339 (0,038).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,705), 321 (0,351), 322 (0,134), 323 (0,042).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,602), 247 (0,309), 248 (0,129), 249 (0,031).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,555), 309 (0,253), 310 (0,073).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,497), 235 (0,174), 236 (0,045).

MS/MS von b (*m/z* 336):

m/z 263 (533298), 264 (466702), 265 (578928), 266 (421072), 307 (267974), 308 (732026).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	11,2	1,3
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	1,7	2,4
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	1,4	3,4
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	11,9	2,6

MS/MS von b (*m/z* 337):

m/z 307 (12633), 308 (404622), 309 (582745).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]1, [1,3- ¹³ C ₂]1, [1,4- ¹³ C ₂]1	Σ = 6,6	1,3
[2,3- ¹³ C ₂]1, [2,4- ¹³ C ₂]1, [3,4- ¹³ C ₂]1	Σ = 0,7	1,3

MS/MS von d (*m/z* 308):

m/z 263 (447327), 264 (552672), 265 (504671), 266 (495329).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,2- ¹³ C ₂]1)	0,1	1,0
[1,3- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,3- ¹³ C ₂]1)	0,2	1,5
[1,4- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,4- ¹³ C ₂]1)	6,3	1,3

MS/MS von b (*m/z* 338):

m/z 307 (248), 308 (2932), 309 (53897), 310 (42923).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2,3- ¹³ C ₃]1, [1,2,4- ¹³ C ₃]1, [1,3,4- ¹³ C ₃]1	Σ = 1,7	0,5
[2,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure ([2,3,4- ¹³ C ₃]1)	0,0	0,8

7.12 Mischung L**MS/MS von b (*m/z* 336):**

m/z 263, (486219), 264 (513781), 265 (728701), 266 (271299), 307 (239038), 308 (760962).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	23,9	1,9
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	27,1	4,9
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	24,2	6,1
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	24,7	2,5

7.13 Mischung M**MS/MS von b (*m/z* 336):**

m/z 263 (4587), 264 (995413), 265 (503641), 266 (496359), 307 (3888), 308 (996112).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	0,4	2,5
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	49,6	3,4
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	49,9	2,1
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	0,1	4,7

MS/MS von d (*m/z* 308):

m/z 263, (1196), 264 (998804), 265 (507167), 266 (492833).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	49,3	1,6
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	50,6	1,9
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	0,1	2,3

MS/MS von c (*m/z* 234):

m/z 189 (541), 190 (999459), 191 (525588), 192 (474412).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	47,4	1,6
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	52,5	1,2
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	0,1	2,1

7.14 Mischung N**MS/MS von b (m/z 336):**

m/z 263 (488724), 264 (511276), 265 (496278), 266 (503722), 307 (3729), 308 (996271).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	0,4	2,0
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	50,4	3,6
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	0,8	4,3
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	48,5	2,8

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (493822), 264 (506178), 265 (496645), 266 (503355).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	50,3	3,2
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	0,3	2,8
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	49,4	1,8

MS/MS von c (m/z 234):

m/z 189 (490492), 190 (509508), 191 (499587), 192 (8500413).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	50,0	2,0
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	0,9	1,9
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	49,1	2,6

7.15 Mischung O**MS/MS von b (m/z 336):**

m/z 263 (508515), 264 (491485), 265 (997834), 266 (2166), 307(3426), 308 (996574).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	0,3	2,6
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	0,2	2,5
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	48,9	4,3
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	50,5	5,1

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (501830), 264 (498170), 265 (987031), 266 (12969).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	1,3	1,2
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	48,5	1,7
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	50,2	2,3

MS/MS von c (m/z 234):

m/z 189 (495895), 190 (504105), 191 (999568), 192 (422).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	0,1	1,9
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	50,3	2,0
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	49,6	1,5

7.16 Mischung P

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,276), 337 (0,147), 338 (0,016), 339 (0,005).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,249), 321 (0,132), 322 (0,016), 323 (0,009).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,207), 247 (0,113), 248 (0,015), 249 (0,004).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,279), 309 (0,143), 310 (0,024).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,209), 235 (0,089), 236 (0,007).

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (3,972), 337 (1,143), 338 (0,542), 339 (0,079).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (6,088), 321 (1,482), 322 (0,525), 323 (0,064).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (4,423), 247 (1,003), 248 (0,563), 249 (0,073).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (1,638), 309 (0,480), 310 (0,209).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (1,778), 235 (0,422), 236 (0,163).

MS/MS von b (*m/z* 336):

m/z 263 (461813), 264 (538187), 265 (710520), 266 (289480), 307 (231467), 308 (768533).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	19,6	1,1
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	19,7	0,6
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	21,1	1,9
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	19,5	2,1

MS/MS von d (*m/z* 308):

m/z 263 (286066), 264 (713933), 265 (594465), 266 (405535).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	19,4	2,4
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	21,9	3,1
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	20,2	1,8

MS/MS von c (*m/z* 234):

m/z 189 (382368), 190 (617631), 191 (692676), 192 (307323).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	19,3	5,6
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	21,1	4,2
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	20,9	3,9

7.17 Mischung Q

MS-Parameter: Scanbereich *m/z* 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung G.

Probe:

Ion b: 335 (1,000), 336 (0,460), 337 (0,215), 338 (0,054), 339 (0,013).

Ion h: 319 (1,000), 320 (0,474), 321 (0,195), 322 (0,049), 323 (0,012).

Ion k: 245 (1,000), 246 (0,393), 247 (0,179), 248 (0,046), 249 (0,014).

Ion d: 307 (1,000), 308 (0,409), 309 (0,173), 310 (0,044).

Ion c: 233 (1,000), 234 (0,344), 235 (0,120), 236 (0,026).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (254635), 264 (745365), 265 (369131), 266 (630869), 307(120703), 308 (879297).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	3,9	0,6
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	3,2	1,3
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	3,6	1,5
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	4,4	1,0

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (140018), 264 (859982), 265 (273813), 266 (726187).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	3,8	0,9
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	3,9	1,1
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	4,1	1,3

MS/MS von c (m/z 234):

m/z 189 (221551), 190 (778449), 191 (391453), 192 (608546).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	2,1	8,7
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	4,1	11,3
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	5,6	9,8

7.18 Mischung R

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung K.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,645), 337 (0,383), 338 (0,198), 339 (0,056).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,599), 321 (0,362), 322 (0,156), 323 (0,045).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,547), 247 (0,281), 248 (0,123), 249 (0,039).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,530), 309 (0,236), 310 (0,071).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,454), 235 (0,177), 236 (0,039).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (572151), 264 (427849), 265 (599455), 266 (400545), 307 (276069), 308 (723931).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	10,9	1,1
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	0,4	2,3
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	0,4	3,2
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	11,3	2,1

MS/MS von b (m/z 337):

m/z 307 (12095), 308 (462507), 309 (525397).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]1, [1,3- ¹³ C ₂]1, [1,4- ¹³ C ₂]1	Σ = 8,2	1,2
[2,3- ¹³ C ₂]1, [2,4- ¹³ C ₂]1, [3,4- ¹³ C ₂]1	Σ = 0,0	0,8

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (521751), 264 (478249), 265 (548777), 266 (451223).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,2- ¹³ C ₂]1)	-1,7	1,2
[1,3- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,3- ¹³ C ₂]1)	-0,1	0,9
[1,4- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,4- ¹³ C ₂]1)	10,0	1,6

MS/MS von b (m/z 338):

m/z 307 (324), 308 (1002), 309 (67219), 310 (31454).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2,3- ¹³ C ₃]1, [1,2,4- ¹³ C ₃]1, [1,3,4- ¹³ C ₃]1	Σ = 3,0	1,5
[2,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure ([2,3,4- ¹³ C ₃]1)	0,0	1,3

7.19 Mischung S

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung K.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,417), 337 (0,207), 338 (0,068), 339 (0,015).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,405), 321 (0,229), 322 (0,063), 323 (0,020).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,327), 247 (0,192), 248 (0,035), 249 (0,012).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,365), 309 (0,162), 310 (0,039).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,289), 235 (0,110), 236 (0,025).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (368283), 264 (631717), 265 (364270), 266 (635730), 307 (164590), 308 (835410).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	4,9	0,8
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	0,8	1,9
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	-1,3	2,5
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	6,4	1,8

7.20 MS/MS-Referenzmessungen unmarkierter TMS-Äpfelsäure (TMS-1)

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (94304), 264 (905696), 265 (125068), 266 (874932), 307 (50020), 308 (949980).

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (48565), 264 (951435), 265 (90570), 266 (909430).

MS/MS von c (m/z 234):

Keine reproduzierbaren Ergebnisse.

8 Biologische Proben

Die TMS-Äpfelsäure (TMS-1) aus biologischen Proben von Pflanzen, die mit unmarkiertem CO₂ gefüttert wurden, zeigte in den relativen Intensitäten der Isotopensignale keine Unterschiede zum TMS-Derivat der käuflich erworbenen Äpfelsäure (**1**). Einflüsse der biologischen Matrix konnten ebenfalls nicht festgestellt werden. Als Referenzsubstanz wurde daher weiterhin käuflich erworbene Äpfelsäure (**1**) verwendet.

8.1 Clusia minor I

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung K.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,599), 337 (0,233), 338 (0,083), 339 (0,022).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,692), 321 (0,277), 322 (0,097), 323 (0,019).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,593), 247 (0,204), 248 (0,067), 249 (0,015).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,445), 309 (0,189), 310 (0,052).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,361), 235 (0,135), 236 (0,029).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (585137), 264 (414863), 265(616873), 266 (383127), 307 (294910), 308 (705090).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C] 1)	13,3	1,5
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C] 1)	-1,3	2,0
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C] 1)	1,0	2,9
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C] 1)	13,0	1,8

8.2 Clusia minor II

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,298), 337 (0,156), 338 (0,033), 339 (0,012).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,271), 321 (0,143), 322 (0,028), 323 (0,010).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,217), 247 (0,114), 248 (0,017), 249 (0,007).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,284), 309 (0,133), 310 (0,029).

Ion c: 233 (1,000), 234 (0,199), 235 (0,088), 236 (0,011).

Probe:

Ion b: 335 (1,000), 336 (0,644), 337 (0,402), 338 (0,174), 339 (0,059).

Ion h: 319 (1,000), 320 (0,656), 321 (0,394), 322 (0,162), 323 (0,061).

Ion k: 245 (1,000), 246 (0,585), 247 (0,336), 248 (0,129), 249 (0,048).

Ion d: 307 (1,000), 308 (0,555), 309 (0,283), 310 (0,095).

Ion c: 233 (1,000), 234 (0,453), 235 (0,216), 236 (0,067).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (520244), 264 (479756), 265 (569445), 266 (430555), 307 (262567), 308 (737433).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	10,3	1,6
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	1,1	2,9
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	1,3	4,0
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	10,5	2,3

MS/MS von b (m/z 337):

m/z 307 (9303), 308 (386747), 309 (603951).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]1, [1,3- ¹³ C ₂]1, [1,4- ¹³ C ₂]1	Σ = 6,6	0,9
[2,3- ¹³ C ₂]1, [2,4- ¹³ C ₂]1, [3,4- ¹³ C ₂]1	Σ = 2,1	1,3

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (366099), 264 (633901), 265 (470925), 266 (529074).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,2- ¹³ C ₂]1)	1,0	1,2
[1,3- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,3- ¹³ C ₂]1)	2,1	1,7
[1,4- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,4- ¹³ C ₂]1)	3,4	1,8

MS/MS von b (m/z 338):

m/z 307 (2054), 308 (6071), 309 (532428), 310 (459446).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2,3- ¹³ C ₃]1, [1,2,4- ¹³ C ₃]1, [1,3,4- ¹³ C ₃]1	Σ = 2,2	1,2
[2,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure ([2,3,4- ¹³ C ₃]1)	0,6	1,6

8.3 Clusia minor III

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,302), 337 (0,157), 338 (0,027), 339 (0,011).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,306), 321 (0,165), 322 (0,024), 323 (0,007).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,203), 247 (0,139), 248 (0,026), 249 (0,010).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,281), 309 (0,134), 310 (0,030).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,199), 235 (0,098), 236 (0,018).

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,651), 337 (0,369), 338 (0,176), 339 (0,169).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,693), 321 (0,393), 322 (0,158), 323 (0,059).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,614), 247 (0,359), 248 (0,142), 249 (0,058).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,544), 309 (0,279), 310 (0,101).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,482), 235 (0,226), 236 (0,072).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (571904), 264 (428096), 265 (621888), 266 (378112), 307 (27846), 308 (721535).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	11,3	1,0
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	0,0	1,9
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	1,5	3,3
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	11,9	2,5

MS/MS von b (m/z 337): m/z 307 (8858), 308 (401626), 309 (589515).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
$[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$, $[1,3-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$, $[1,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$	$\Sigma = 6,3$	1,6
$[2,3-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$, $[2,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$, $[3,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$	$\Sigma = 1,2$	2,3

MS/MS von d (m/z 308): m/z 263 (419836), 264 (580163), 265 (496020), 266 (503980).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
$[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Äpfelsäure ($[1,2-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$)	1,3	1,6
$[1,3-^{13}\text{C}_2]$ Äpfelsäure ($[1,3-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$)	0,8	1,9
$[1,4-^{13}\text{C}_2]$ Äpfelsäure ($[1,4-^{13}\text{C}_2]\mathbf{1}$)	4,2	1,8

MS/MS von b (m/z 338): m/z 307 (2054), 308 (6071), 309 (532429), 310 (459446).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
$[1,2,3-^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$, $[1,2,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$, $[1,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$	$\Sigma = 2,6$	1,3
$[2,3,4-^{13}\text{C}_3]$ Äpfelsäure ($[2,3,4-^{13}\text{C}_3]\mathbf{1}$)	0,2	1,6

8.4 Kalanchoe pinnata IMS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.**Referenz:** Siehe Mischung K.**Probe:**Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,406), 337 (0,198), 338 (0,052), 339 (0,019).Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,454), 321 (0,194), 322 (0,063), 323 (0,011).Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,318), 247 (0,158), 248 (0,039), 249 (0,012).Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,371), 309 (0,182), 310 (0,043).Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,299), 235 (0,118), 236 (0,024).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (205677), 264 (794323), 265 (302377), 266 (697623), 307 (104403), 308 (895597).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	3,2	0,8
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	2,8	1,8
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	2,4	2,4
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	2,6	1,8

8.5 Kalachoe pinnata II

MS-Parameter: Scanbereich m/z 220 – 380, 10 Microscans.

Referenz: Siehe Mischung K.

Probe:

Ion **b**: 335 (1,000), 336 (0,766), 337 (0,579), 338 (0,382), 339 (0,189).

Ion **h**: 319 (1,000), 320 (0,656), 321 (0,625), 322 (0,330), 323 (0,206).

Ion **k**: 245 (1,000), 246 (0,676), 247 (0,553), 248 (0,336), 249 (0,147).

Ion **d**: 307 (1,000), 308 (0,699), 309 (0,514), 310 (0,245).

Ion **c**: 233 (1,000), 234 (0,646), 235 (0,422), 236 (0,189).

MS/MS von b (m/z 336):

m/z 263 (503734), 264 (496266), 265 (588237), 266 (411763), 307 (252037), 308 (747963).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1- ¹³ C]Äpfelsäure ([1- ¹³ C]1)	8,6	1,0
[2- ¹³ C]Äpfelsäure ([2- ¹³ C]1)	2,6	1,8
[3- ¹³ C]Äpfelsäure ([3- ¹³ C]1)	2,5	3,3
[4- ¹³ C]Äpfelsäure ([4- ¹³ C]1)	8,6	2,7

MS/MS von b (m/z 337):

m/z 307 (3132), 308(492154), 309 (504713).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂] 1 , [1,3- ¹³ C ₂] 1 , [1,4- ¹³ C ₂] 1	Σ = 12,6	2,0
[2,3- ¹³ C ₂] 1 , [2,4- ¹³ C ₂] 1 , [3,4- ¹³ C ₂] 1	Σ = 5,1	1,6

MS/MS von d (m/z 308):

m/z 263 (404099), 264 (595901), 265 (542790), 266 (457210).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,2- ¹³ C ₂] 1)	2,4	1,3
[1,3- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,3- ¹³ C ₂] 1)	2,4	1,9
[1,4- ¹³ C ₂]Äpfelsäure ([1,4- ¹³ C ₂] 1)	7,9	1,5

MS/MS von b (m/z 338):

m/z 307 (1000), 308 (3147), 309 (639407), 310 (356446).

	Konzentrationsanteil [%]	STAW
[1,2,3- ¹³ C ₃] 1 , [1,2,4- ¹³ C ₃] 1 , [1,3,4- ¹³ C ₃] 1	Σ = 7,0	1,3
[2,3,4- ¹³ C ₃]Äpfelsäure ([2,3,4- ¹³ C ₃] 1)	2,0	2,1

9 Produkt-Ionen-Spektren

Die relativen Intensitäten der Produkt-Ionen isotopomerer Vorläufer-Ionen (Tab. 55 bis Tab. 68) schwanken für alle TMS-Äpfelsäuren um die gleichen Werte und werden deshalb in der jeweils letzten Zeile der Tabellen für alle Produkt-Ionen gemeinsam angegeben. Bei Ausnahmefällen werden sie in Klammern hinter dem m/z -Wert angegeben. Die Startmasse des Scanbereichs lag jeweils bei m/z 40.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen	
TMS-1	350	260	217
TMS-[1- ¹³ C]1	351	261	218
TMS-[2- ¹³ C]1	351	261	218
TMS-[3- ¹³ C]1	351	261	218
TMS-[4- ¹³ C]1	351	261	217
TMS-[2-D ₁]1	351	260	217
TMS-[3-D ₂]1	352	262	219
[D ₂₇]TMS-1	377	278	232
rel. Int. [%]		60	100

Tab. 55: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen a.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen							
TMS-1	335	319	307	265	263	245	217	175	143
TMS-[1- ¹³ C]1	336	320	307	265	263	246	217	175	143
TMS-[2- ¹³ C]1	336	320	308	266	264	246	218	176	144
TMS-[3- ¹³ C]1	336	320	308	265	264	246	218	176	144
TMS-[4- ¹³ C]1	336	320	308	265	263	246	218	175	144
TMS-[2-D ₁]1	336	320	308	266	264	246	218	176	144
TMS-[3-D ₂]1	337	320	309	265	265	246	218	177	144
[D ₂₇]TMS-1	359	340	331	289	287	260	232	187	152
rel. Int. [%]		6	100	35	39	1	8	2	2

Tab. 56: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen b.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen						
TMS-1	319	291	239	229	221	201	171	143
TMS-[1- ¹³ C]1	320	291	239	230	221	201	172	143
TMS-[2- ¹³ C]1	320	292	239	230	221	202	172	144
TMS-[3- ¹³ C]1	320	292	239	230	221	202	172	144
TMS-[4- ¹³ C]1	320	292	239	230	221	202	172	144
TMS-[2-D ₁]1	320	292	239	229	221	201- 202	172	144
TMS-[3-D ₂]1	320	293	239	230	221	202	172	144
[D ₂₇]TMS-1	340	312	260	241	242	213	180	152
rel. Int. [%]		11	13	100	54	25	50	13

Tab. 57: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen **g**.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen						
TMS-1	307	291	265	263	221	217	175	143
TMS-[1- ¹³ C]1	308	291	265	263	221	217	175	143
TMS-[2- ¹³ C]1	308	292	266	264	221	218	176	144
TMS-[3- ¹³ C]1	308	292	265	264	221	218	176	144
TMS-[4- ¹³ C]1	308	292	265	263	221	218	175	144
TMS-[2-D ₁]1	308	292	266	264	221	218	176	144
TMS-[3-D ₂]1	309	292	265	265	221	218	177	144
[D ₂₇]TMS-1	331	312	289	287	242	232	187	152
rel. Int. [%]		11	100	94	4	45	9	7

Tab. 58: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen **d**.

Äpfelsäure	<i>m/z</i> Vorläufer-Ion	<i>m/z</i> Produkt-Ionen		
TMS-1	265	239	221	147-151
TMS-[1- ¹³ C]1	265	239	221	147-151
TMS-[2- ¹³ C]1	266	239	221	147-151
TMS-[3- ¹³ C]1	265	239	221	147-151
TMS-[4- ¹³ C]1	265	239	221	147-151
TMS-[2-D ₁]1	266	239	221	147-151
TMS-[3-D ₂]1	265	239	221	147-151
[D ₂₇]TMS-1	289	260	242	161-164
rel. Int. [%]		27	100	13

Tab. 59: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen e.

Äpfelsäure	<i>m/z</i> Vorläufer-Ion	<i>m/z</i> Produkt-Ionen		
TMS-1	263	175	147-151	-
TMS-[1- ¹³ C]1	263	175	147-151	-
TMS-[2- ¹³ C]1	264	176	147-151	-
TMS-[3- ¹³ C]1	264	176	147-151	-
TMS-[4- ¹³ C]1	263	175	147-151	-
TMS-[2-D ₁]1	264	176	147-151	-
TMS-[3-D ₂]1	263	177	147-151	-
[D ₂₇]TMS-1	287	187 (13)	161	-
[D ₂₇]TMS-1	278	-	-	232 (100)
rel. Int. [%]		23	100	-

Tab. 60: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen f und Ion II bei *m/z* 263.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen
TMS-1	260	217
TMS-[1- ¹³ C]1	261	218
TMS-[2- ¹³ C]1	261	218
TMS-[3- ¹³ C]1	261	218
TMS-[4- ¹³ C]1	261	217
TMS-[2-D ₁]1	260	217
TMS-[3-D ₂]1	262	219
[D ₂₇]TMS-1	278	232
[D ₂₇]TMS-1	279	233
rel. Int. [%]		100

Tab. 61: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen bei m/z 260.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen				
TMS-1	245	217 (50)	-	147-149	133	73
TMS-[1- ¹³ C]1	246	217 (31)	218 (20)	147-149	133	73
TMS-[2- ¹³ C]1	246	-	218 (50)	147-149	133	73
TMS-[3- ¹³ C]1	246	-	218 (50)	147-149	133	73
TMS-[4- ¹³ C]1	246	217 (28)	218 (18)	147-149	133	73
TMS-[2-D ₁]1	246	-	218 (40)	147-149	133	73
TMS-[3-D ₂]1	246	-	218 (40)	147-149	133	73
[D ₂₇]TMS-1	260	232 (33)	-	161	142 (2)	82 (6)
rel. Int. [%]		-	-	100	7	7

Tab. 62: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen **h**.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen				
TMS-1	233	191	189	143	101	73
TMS-[1- ¹³ C]1	233	191	189	143	101	73
TMS-[2- ¹³ C]1	234	192	190	144	102	73
TMS-[3- ¹³ C]1	234	191	190	144	102	73
TMS-[4- ¹³ C]1	234	191	189	144	101	73
TMS-[2-D ₁]1	234	192	190	144	102	73
TMS-[3-D ₂]1	235	191	191	144	103	73
[D ₂₇]TMS-1	251	209	207	152	107	82
rel. Int. [%]		55	100	4	3	28

Tab. 63: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen c.

Äpfelsäure	m/z Vorläufer-Ion	m/z Produkt-Ionen			
TMS-1	217	189 (8)	147-149	133	73
TMS-[1- ¹³ C]1	217	189 (12)	147-149	133	73
TMS-[1- ¹³ C]1	218	189 (14)	147-149	133	73
TMS-[2- ¹³ C]1	218	190 (8)	147-149	133	73
TMS-[3- ¹³ C]1	218	190 (8)	147-149	133	73
TMS-[4- ¹³ C]1	217	189 (15)	147-149	133	73
TMS-[4- ¹³ C]1	218	189 (2)	147-149	133	73
		190 (2)			
TMS-[2-D ₁]1	217	189 (1)	147-149	133	73
	218	190 (12)	147-149	133	73
TMS-[3-D ₂]1	218	190 (1)	147-149	133	73
	219	191 (16)	147-149	133	73
[D ₂₇]TMS-1	232	204 (4)	161	142 (1)	82
rel. Int. [%]		-	100	2	4

Tab. 64: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen bei m/z 217.

Äpfelsäure	<i>m/z</i> Vorläufer-Ion	<i>m/z</i> Produkt-Ionen		
TMS-1	191	147-149	103	73
TMS-[1- ¹³ C]1	191	147-149	103	73
TMS-[2- ¹³ C]1	192	147-149	102-104	73
TMS-[3- ¹³ C]1	191	147-149	102-103	73
TMS-[4- ¹³ C]1	191	147-149	103	73
TMS-[2-D ₁]1	192	147-149	104	73
TMS-[3-D ₂]1	191	147-149	103	73
rel. Int. [%]		77	18	100

Tab. 65: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen i.

Äpfelsäure	<i>m/z</i> Vorläufer-Ion	<i>m/z</i> Produkt-Ionen			
TMS-1	189	147-151	101	73	59
TMS-[1- ¹³ C]1	189	147-151	101	73	59
TMS-[2- ¹³ C]1	190	147-151	102	73	59
TMS-[3- ¹³ C]1	190	147-151	102	73	59
TMS-[4- ¹³ C]1	189	147-151	101	73	59
TMS-[2-D ₁]1	190	147-151	102	73	60
TMS-[3-D ₂]1	191	147-151	103	73	59
[D ₂₇]TMS-1	207	162	107	82	65
rel. Int. [%]		3	29	100	3

Tab. 66: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen j.

Äpfelsäure	<i>m/z</i> Vorläufer-Ion	<i>m/z</i> Produkt-Ionen		
TMS-1	175	149	151	133
TMS-[1- ¹³ C]1	175	149	151	133
TMS-[2- ¹³ C]1	176	149	151	133
TMS-[3- ¹³ C]1	176	149	151	133
TMS-[4- ¹³ C]1	175	149	151	133
TMS-[2-D ₁]1	176	149	151	133
TMS-[3-D ₂]1	177	149	151	133
rel. Int. [%]		15	68	100

Tab. 67: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen bei *m/z* 175.

Äpfelsäure	<i>m/z</i> Vorläufer-Ion	<i>m/z</i> Produkt-Ionen	
TMS-1	101	75	59
TMS-[1- ¹³ C]1	101	75	59
TMS-[2- ¹³ C]1	102	75	59
TMS-[3- ¹³ C]1	102	75	59
TMS-[4- ¹³ C]1	103	75	59
TMS-[2-D ₁]1	102	75	60
TMS-[3-D ₂]1	103	75	59
rel. Int. [%]		30	100

Tab. 68: Produkt-Ionen der Vorläufer-Ionen bei *m/z* 101

Literaturverzeichnis

- [1] U. Lüttge, M. Kluge, G. Bauer, *Botanik, Ein grundlegendes Lehrbuch*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, **1988**, S. 428-435.
- [2] D. Heß, *Pflanzenphysiologie*, 8. Aufl., Ulmer, Stuttgart, **1988**, S. 99-115.
- [3] R. Carle, *Pharm. Unserer Zeit* **1991**, 2, 75-82.
- [4] W. Cockburn, A. McAulay, *Plant Physiol.* **1975**, 55, 87-98.
- [5] M. Popp, C. B. Osmond, R. E. Summons, *Plant Physiol.* **1982**, 69, 1289-1292.
- [6] D. Ritz, M. Kluge, H. J. Veith, *Planta* **1986**, 167, 284-291.
- [7] C. B. Osmond, J. A. M. Holtum, M. H. O'Leary, C. Roeske, O. C. Wong, R. E. Summons, P. N. Avadhani, *Planta* **1998**, 175, 184-192.
- [8] H. Kluge, S. Treichel, H. J. Veith, Ergebnisbericht SFB 199, **1993**, 75-78.
- [9] U. Lüttge, *Plant Cell Environ.* **1988**, 167, 284-291.
- [10] L. Stryer, *Biochemie*, 1. Aufl., Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, **1990**, S. 557.
- [11] I. T. Platzner, *Modern Isotope Ratio Mass Spectrometry*, 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 403-447.
- [12] O. Kalinowski, S. Berger, S. Braun, *¹³C-NMR-Spektroskopie*, 1. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1984**.
- [13] H.-O. Kalinowski, *Chem. Unserer Zeit* **1988**, 22, 172-171.
- [14] S. Berger, S. Braun, H.-O. Kalinowski, *NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen, Bd. 1-4*, 1. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1992-1994**.
- [15] P. D. Klein in *Stable Isotopes in the Life Sciences IAEA Symp. Proc.*, Leipzig, 14.-18. Feb. 1977, IAEA, Wien, **1977**, S. 313.
- [16] a) R. E. London, V. H. Kollman, N. A. Matwiyoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3565-3573.
b) P. E. Pfeffer, W. V. Gerasimowicz in *Nuclear Magnetic Resonance in Agriculture*, 1. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **1989**, S. 3-70.
- [17] a) G. J. Martin, M. L. Martin in *Annual Reports on NMR Spectroscopy, Vol. 31* (Hrsg.: G. A. Webb), Academic Press, London, **1995**, S. 81-104.
b) G. J. Martin, M. L. Martin, *Modern Methods of Plant Analysis, New Series, Vol. 6*, Springer, **1987**.
- [18] E. Gout, R. Bligny, N. Pascal, R. Douce, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 3986-3992.

- [19] M. Gascoyne, T. Kotzer, *Document AECL 11370*, Scientific Document Distribution Office, AECL, Chalk River, ON, Canada K0J 1J0, September **1995**.
- [20] R. H. Brill, J. M. Wampler, *Am. J. Archaeol.* **1967**, *71*, 63-77.
- [21] a) H. M. Crews, V. Ducros, J. Eagles, F. A. Mellon, P. Kastenmayer, J. B. Luten, B. A. McGaw, *Analyst* **1994**, *119*, 2491-2514.
b) R. Schwartz, C. C. Giesecke, *Clin. Chim. Acta* **1979**, *97*, 1-8.
- [22] L. W. Doner, J. G. Phillips, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1981**, *64*, 85-90.
- [23] P. Rauschenbach, H. Simon, W. Stichler, H. Moser, *Z. Naturforsch.* **1979**, *34c*, 1-4.
- [24] F. J. Winkler, H.-L. Schmidt, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1980**, *171*, 85-94.
- [25] a) J. Bricout, J. C. H. Fontes, L. Merlivat, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1974**, *57*, 713-715.
b) P. G. Hoffman, M. Salb, *J. Agric. Food Chem.* **1979**, *27*, 352-355.
- [26] D. Danho, N. Naulet, G. J. Martin, *Analisis* **1992**, *20*, 179-184.
- [27] a) H. J. Svec, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1985**, *66*, 3-29.
b) T. Matsuo, *Mass Spectrom. Rev.* **1989**, *8*, 203-236.
- [28] E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Application*, 1. Aufl., Wiley, New York, **1996**, S. 165-168.
- [29] J. Barker, R. C. Garner, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 285-293.
- [30] a) M. Sano, Y. Yotsui, H. Abe, S. Sasaki, *Biomed. Mass Spectrom.* **1976**, *3*, 1-3.
b) D. E. Matthews, J. M. Hayes, *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1465-1473.
- [31] H.-L. Schmidt, *Isotopeneffekte im pflanzlichen Stoffwechsel und Isotopenmuster bei Naturstoffen*, Vortrag 35, 29. Diskussionstagung der AGMS, Bremen, **1996**.
- [32] M. M. Bender, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1239-1244.
- [33] B. N. Smith, S. Epstein, *Plant Physiol.* **1971**, *47*, 380-384.
- [34] G. Dube, A. Henrion, R. Ohlendorf, *Unsicherheit bei der Isotopenhäufigkeitsmessung mit der GC/C/MS*, Vortrag 3, 32. Diskussionstagung der DGMS, Oldenburg, **1999**.
- [35] H.-J. Hübschmann, *Handbuch der GC/MS*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, **1996**, S. 130-186.
- [36] H. Budzikiewicz, *Massenspektrometrie, Eine Einführung*, 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, **1972**, S. 36.
- [37] E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, *Mass Spectrometry, Principles and Application*, 1. Aufl., Wiley, New York, **1996**, S. 72.
- [38] R. K. Boyd, J. H. Beynon, *Org. Mass Spectrom.* **1977**, *12*, 163-165.

- [39] E. A. I. M. Evers, A. J. Noest, O. S. Akkermann, *Org. Mass Spectrom.* **1977**, *12*, 419-420.
- [40] R. G. Cooks, J. H. Beynon, R. M. Caprioli, G. R. Lester, *Metastable Ions*, 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam, **1973**.
- [41] W. Paul, H. Steinwedel, *Z. Naturforsch.* **1963**, *8*, 448-450.
- [42] W. Paul, *Angew. Chem.* **1990**, *29*, 780-789.
- [43] R. G. Cooks, G. L. Glish, S. A. McLuckey, R. E. Kaiser, *Chem. & Eng. News* **1991**, *69*, 26-41.
- [44] R. E. March, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 351-369.
- [45] R. E. March, R. J. Hughes, *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*, 1. Aufl., Wiley, New York, **1989**.
- [46] H.-J. Hübschmann, *Erweiterte Bedienungsanleitung für Anwender des GCQ Ion-Trap-GC/MS-Systems*, Revision 3.1, Axel Semrau GmbH, Sprockhövel, **1996**.
- [47] R. E. March, J. F. J. Todd (Hrsg.), *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry, Vol 1*, CRC Press, Boca Raton, **1995**.
- [48] J. N. Louris, J. S. Brodbelt-Lustig, R. G. Cooks, G. L. Glish, G. J. van Berkel, S. A. McLuckey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1990**, *96*, 117-137.
- [49] a) W. J. Richter, H. Schwarz, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 449-469.
b) A. G. Harrison, *Chemical Ionisation Mass Spectrometry*, 1. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **1983**.
- [50] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten, *Chem. Unserer Zeit* **1976**, *10*, 163-174.
- [51] a) L. Prokai, *Field Desorption Mass Spectrometry*, 1. Aufl., Marcel Decker, New York, **1990**.
b) N. P. Lattimer, H.-R. Schulten, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1201A-1202A.
- [52] H. D. Beckey, *Field Ionisation Mass Spectrometry*, 1. Aufl., Pergamon Press, Oxford, **1971**.
- [53] W. D. Lehmann, *Chem. Unserer Zeit* **1991**, *25*, 183-194.
- [54] a) S. J. Gaskell, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 677-688.
b) R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmons, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 882-899.
c) W. D. Lehmann, *Chem. Unserer Zeit* **1991**, *25*, 308-316.
- [55] a) M. Karas, D. Bachmann, F. H. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935-2939.
b) M. Karas, U. Bahr, U. Giessmann, *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 335-357.
- [56] R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 653-659.

- [57] W. D. Lehmann, *Massenspektrometrie in der Biochemie*, 1. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **1996**, S. 157-175.
- [58] P. Roepstorff, J. Fohlmann, *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601-620.
- [59] K. Biemann, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 99-111.
- [60] D. F. Hunt, W. M. Shabanowitz, J. Rhodes, J. M. Ballard, *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1704-1706.
- [61] J. T. Stults, J. T. Watson, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1987**, *14*, 583-586.
- [62] L. J. Deterding, J. F. Curtis, K. B. Tomer, *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, *21*, 597-609.
- [63] P. Wheelan, J. A. Zirrolli, R. C. Murphy, *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 465-473.
- [64] K. Bernstorm, K. Kayganchi, R. C. Murphy, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 203-211.
- [65] J. W. Dallinga, W. Heerma, *Biol. Mass Spectrom.* **1991**, *20*, 215-231.
- [66] K. L. Duffin, J. K. Welply, E. Huang, J. D. Henion, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1440-1448.
- [67] V. N. Reinhold, B. B. Reinhold, C. E. Costello, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1772-1784.
- [68] M. Donike, *J. Chromatogr.* **1969**, *42*, 103-104.
- [69] G. Petersson, *Org. Mass Spectrom.* **1972**, *6*, 565-576.
- [70] G. H. Draffan, R. N. Stilwell, J. A. McCloskey, *Org. Mass Spectrom.* **1968**, *1*, 669-685.
- [71] H. Budzikiewicz, *Massenspektrometrie, Eine Einführung*, 1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, **1972**, S. 57-61.
- [72] K. Biemann, *Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications*, 1. Aufl., McGraw-Hill, **1962**, S. 204-250.
- [73] I. Güerere Quiroz, Dissertation, TU-Darmstadt, **1997**.
- [74] K. Levsen, *Fundamental Aspects of Organic Mass Spectrometry*, 1. Aufl., VCH, Weinheim, **1978**.
- [75] K. H. Homann, *Reaktionskinetik* (Hrsg.: R. Haase), 1. Aufl., Steinkopf, Darmstadt, **1975**.
- [76] P. J. Robinson, K. A. Holbrook, *Unimolecular Reactions*, 1. Aufl., Wiley, New York, **1972**.
- [77] A. V. Willi, *Isotopeneffekte bei chemischen Reaktionen*, 1. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1983**.
- [78] *Mass Spec Calculator*, Version 3.1, Quadtech Associates, **1995**.
- [79] M. Cogan, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1941**, *8*, 125-141.
- [80] Y. Lu, Ch. Miet, N. Kunesch, J. Poisson, *Tetrahedron Asym.* **1990**, *1*, 707-710.

- [81] Y. Lu, Ch. Miet, N. Kunesch, J. Poisson, *Tetrahedron Asym.* **1993**, *4*, 893-902.
- [82] J. Brussee, E. C. Roos, A. van der Gen, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4485-4488.
- [83] a) G. A. Ropp, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2299-2300.
b) A. Murray, D. L. Williams, *Organic Syntheses with Isotopes, Part I*, 1. Aufl., Interscience, New York, **1958**, S. 416-418.
- [84] A. W. Hillner, H. Jans, C. Winkel, *J. Prakt. Chem.* **1993**, *335*, 332-336.
- [85] V. D. Blinnikova, V. I. Pichuzhkin, G. P. Tokmakov, *Izv. Timiryazevsk. S-Kh. Akad.* **1990**, *6*, 195-201.
- [86] D. B. Hope, M. Wälti, *J. Chem. Soc. (C)* **1970**, 2475-2478.
- [87] a) F. Korte, H. Barkemeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1957**, *90*, 392-392.
b) M. B. Chkhaidze, Z. N. Morchiladze, Ts. I. Obolashvili, E. D. Oziashvile, *Anal. Chem. Symp. Ser.* **1982**, *11 (Stable Isot.)*, 753-757.
- [88] B. Sedgwick, J. W. Cornforth, S. J. French, R. T. Gray, E. Kelstrup, P. Willadsen, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *75*, 481-495.
- [89] S. P. Markey, W. G. Urban, S. P. Levine, *Mass Spectra of Compounds of Biological Interest NTIS, Vol. I, II, III*, US Department of Commerce, TID-26553.
- [90] G. Petersson, *Tetrahedron* **1970**, *26*, 3413-3428.
- [91] P. Capella, C. Galli, R. Fumagalle, *Lipids* **1968**, *3*, 431-437.
- [92] W. J. A. Vanden Heuvel, J. L. Smith, I. Putter, J. S. Cohen, *J. Chromatogr.* **1970**, *50*, 405-413.
- [93] I. Howe, D. H. Williams, *J. Chem. Soc. (C)* **1968**, 203-209.
- [94] K. R. Leimer, R. H. Rice, C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.* **1977**, *141*, 355-375.
- [95] H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, 1. Aufl., Holden-Day, San Francisco, **1967**, S. 471-476.
- [96] J. A. McCloskey, R. N. Stillwell, A. M. Lawson, *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 233-236.
- [97] J. Byun, M. L. Gross, M. George, D. M. Pares, A. Z. Kamzelsi, D. F. H. Swijter, D. A. Willcox, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 71-80.
- [98] R. Large, K. J. Saunders, *Org. Mass Spectrom.* **1973**, *7*, 291-293.
- [99] a) Finnigan MAT, *GCQ, Software Operator's Manual, Vol. 1 & 2, Instrument Control*, Rev B, **1995**.
b) Finnigan MAT, *GCQ MS Detector Operator's and Service Manual*, Rev. B, **1995**.
- [100] Autorenkollektiv, *Organikum*, 16. Aufl., VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1986**.