

27-6-2018

De ontwikkeling van een lipidomic methode voor het meten van oxylipiden in dierlijk weefsel en plasma

Martijn Schaap



hogeschool
Leiden



VRIJE
UNIVERSITEIT
AMSTERDAM

Faculty of Science

Samenvatting

For research to the composition of oxylipids in human plasma and tissue it was necessary to have an analytical method that can measure these lipids on very low concentrations.

In this bachelor thesis the development of a LC-MS method will be discussed. The development method consisted of the optimization of both an extraction method for lipids by means of a Liquid liquid extraction (LLE) and Solid-phase extraction (SPE) and the optimization of a LC-MS method.

The main step of the sample treatment consist of a extraction. For the optimal extraction, two methods has been tested for performance in recovery and clean-up namely SPE and LLE. SPE was used for the extraction of plasma/serum and had a recovery of <70% for the different oxylipin standards used. LLE was used for tissue samples and had a recovery of <85% for the different standards. Both the SPE and LLE cleaned the samples sufficiently enough with no increase in mass spectrometry background signal.

After the sample treatment the samples were ready to be measured by LC-MS. For the LC part of the optimization a method from the literature was used. The optimization of the MS settings started with standard settings and some adjustments were made. The first adjustment was to lower the electrospray voltage from -3500 (V) to -4500 (V). Also the nebulizer flow and probe flow were reduced (about 50%) to maximize the ionization effectiveness. Three solvents were tested to maximize the intensity of the peaks with methanol/miliQ giving the best results.

After optimization the intensity of the peaks increased at a concentrations level around 0.5ppb of 700% to 3700% for the different lipids used.

As a final step to complete the method it was necessary to have a compound list that contained as much oxylipins in MRM-mode as possible. To create the list as much oxylipins were collected from the literature. The MRM transitions of the oxylipin list were included in the analysis method and was used to measure these in mice brain samples. After different measurements a final list of 94 peaks were identified of with 47 were connected to a theoretical oxylipin from the list.

Inhoud

Gebruikte afkortingen	4
Inleiding.....	5
Doel	6
Probleemstelling	7
Lipidomics	7
Analyse	9
High performance liquid chromatografie	10
Massa spectrometrie	12
Valideren.....	12
Methoden	13
Chemicalien	13
Instrumenten	13
Methoden	13
Resultaten/Discussie	15
LC-MS optimalisatie	15
Matrix effecten.....	19
Identificatie	22
Extraheren.....	Fout! Bladwijzer niet gedefinieerd.
Vetzuren.....	30
Conclusie	32
Aanbevelingen	32
Literatuurlijst	33
Bijlagen.....	34

Gebruikte afkortingen

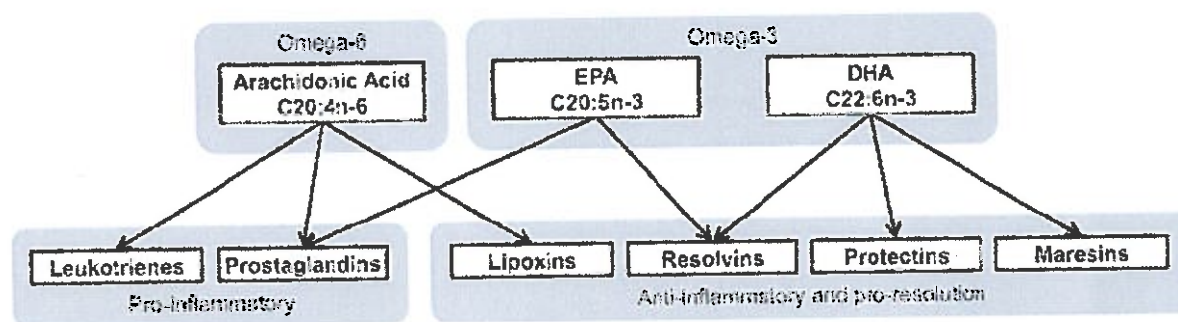
AA	Arachidonic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids (Vetzuren)
ESI	Electrospray ionisatie
HPLC	High performance liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
SIM	Selected ion monitoring
TIC	Total ion current
RP	Reversed phase
NP	Normal Phase
LLE	Liquid-liquid extraction
SPE	Solid-phase extraction
LOD	Limit of detection
IPA	Isopropanol
MeOH	Methanol
ACN	Acetonitrile
MRM	Multiple reaction monitoring

Inleiding

Lipiden zijn vetachtige stoffen die onder andere een belangrijke rol spelen in celmembranen en veel essentiële rollen spelen bij diverse cel functies. Over het algemeen hebben lipiden drie functies: energieopslag, structuur en cellulaire signalering. Er is geen echte definitie van wat een lipiden is maar over het algemeen beschouwd men lipiden als vetachtige stoffen die niet oplosbaar zijn in water. Het totale overzicht aan lipiden wordt het lipidome genoemd en de lipiden kunnen worden verdeeld in acht hoofdklassen, fatty acids (vetzuren), glycerolipids, glycerophospholipids, sphingolipids, sterol lipids, prenol lipids, saccharolipids en polyketides. Er bestaan honderdduizenden soorten lipiden moleculen die in concentraties van amol (attomol) tot nmol/mg proteïne voorkomen in cellen.^{1 2}

In dit onderzoek zal het gaan over een kleine klasse lipiden die oxylipiden genoemd worden. Hierbij gaat het vooral om zes groepen oxylipiden: Leukotrienes (LTs), Prostaglandins (PGs), Lipoxins (LXs), Resolvins (Rv's), Protectins (PDs) en Maresins (Mar's). Deze oxylipiden lipiden zijn de mono, di- en tri-hydroxy van de vetzuren 'Arachidonic acid' (AA), 'eicosapentaenoic acid' (EPA) en 'docosahexaenoic acid' (DHA) waarvan in Figuur 1 een schematisch overzicht te zien is. AA, DHA en EPA vallen onder de Polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

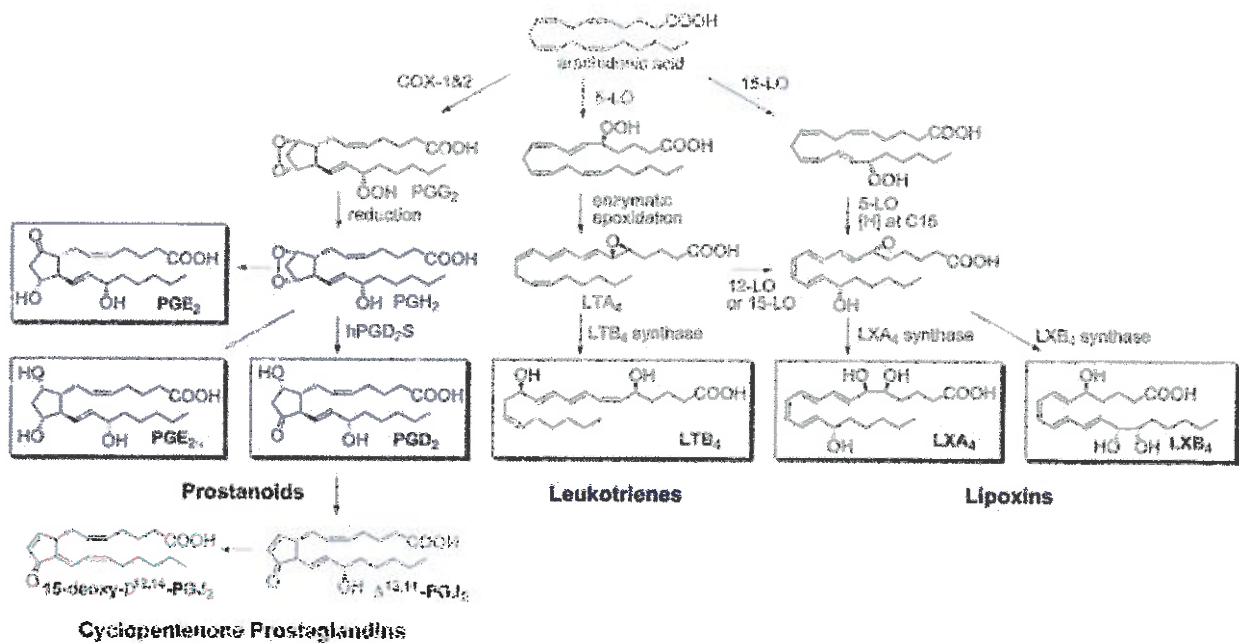
Oxylipiden zijn signaal lipiden die belangrijk zijn bij onder andere de ontspanning en samentrekking van zacht spierweefsel, bloedstolling en in het bijzonder ontstekingen.³ Leukotrienes en prostaglandins zijn ontstekingsbevorderend en de andere vier groepen oxylipiden zijn ontstekingsremmend.



Figuur 1: Schematisch overzicht van drie vetzuren waaruit zes groepen oxylipiden ontstaan.

De drie PUFAs zijn allemaal opgebouwd uit lange alkeen staarten bestaand uit 20 of 22 koolstofatomen met aan het eind een zuur groep. Het oxideren van deze PUFAs wordt grotendeels gedaan door drie enzymesystemen: cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX) en cytochrome P450 (CYP450). Doordat het oxideren op verschillende plekken aan de PUFAs kan plaatsvinden door middel van meerdere enzymen ontstaan er vele soorten oxylipiden. Er zijn tot nu toe een paar honderd oxylipiden geïdentificeerd maar er wordt tot op heden nog steeds onderzoek hiernaar gedaan om er meer te ontdekken en identificeren.

Hieronder in Figuur 2 is te zien hoe de drie groepen prostanoids, leukotrienes en lipoxins ontstaan door de oxidatie van de PUFA 'AA'. Twee groepen ontstaan door de oxidatie met het LOX enzym en de derde groep is ontstaan uit de oxidatie met het COX enzym. In het figuur zijn per groep enkele of meerdere oxylipiden als voorbeeld aangegeven.



Figuur 2: Drie verschillende oxidatieroutes van het vetzuur arachidonic acid (AA) door zowel de COX als LOX enzym tot de bijbehorende groepen oxylipiden.⁴

Een van de producten van de oxidatie van AA door het LOX enzym zijn bijvoorbeeld de 'hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acids', afgekort als HETEs. Van HETEs is bekend dat ze onder andere bioactieve lipid mediators zijn in het chemotaxis proces, dit proces houdt in dat stoffen/cellen zich verplaatsen als gevolg van concentratieverschillen van specifieke stoffen. Een bekend voorbeeld hiervan is dat macrofagen zich naar ontstekingen verplaatsen doordat ze worden aangetrokken door stoffen die worden uitgescheiden door in dit geval bacteriën die de ontsteking veroorzaken.⁵

Doel

Binnen het onderzoek van Gijs Kooij werkzaam bij het VUmc wordt onderzoek gedaan naar de samenstelling van onder andere oxylipiden in cellen/plasma van gezonden mensen en mensen met de spierziekte MS. Voor dit onderzoek is het noodzakelijk dat er zoveel mogelijk lipiden binnen de verschillende groepen oxylipiden kunnen worden geanalyseerd in menselijke cellen en plasma. Daarnaast is binnen het onderzoek van Pim Leonards aangetoond dat knaagdieren blootgesteld aan bepaalde pesticiden ontstekingen kunnen veroorzaken. Voor beide onderzoeken is daarom een analysemethode voor oxylipiden nodig. Het hoofddoel van de opdracht is om een methode te ontwikkelen om zoveel mogelijk oxylipiden in menselijke en dierlijke cellen en weefsel kwantitatief te kunnen analyseren. De methode moet in staat kunnen zijn om minimaal concentraties van 0.1ppb te kunnen meten. Om tot dit doel te komen is dit doel opgesplitst in drie subdoelen met mogelijk extra

subdoelen voor wanneer er tijd over is. Het eerste subdoel is om een LC-MS-methode te optimaliseren voor het meten van de oxilipiden, hierbij zullen bij zowel de HPLC als de MS kant verschillende combinaties van instellingen moeten worden uitgetest om te kijken wat de beste resultaten geeft. Het tweede subdoel is om de geoptimaliseerde methode toe te passen op het analyseren van menselijke cellen/plasma (verkregen van de VUmc) dan wel weefsels van muizen, hierbij zal een voorbewerking moeten plaatsvinden. Het laatste subdoel zal bestaan uit het maken van een lijst met zoveel mogelijk van de bekende oxylipiden met de bijbehorende massa's, fragmenten en retentietijden. Overige subdoelen als valideren en identificeren (van niet bekende stoffen) kunnen uitgevoerd worden als er tijd over is.

Probleemstelling

Hoe meer er over lipiden bekend wordt hoe meer bewijzen er komen dat lipiden geassocieerd worden met ziektes zoals diabetes, obesitas, kanker, psychiatrische stoornissen en neurologische stoornissen zoals MS.

Professor Charles N. Serhan heeft veel onderzoek gedaan naar lipiden^{6 7} en ontdekt hoe bepaalde groepen lipiden ontstekingsreacties kunnen stoppen. Nadat de ontstekingen zijn verminderd kan het immuunsysteem tot rust komen en kan kapot weefsel hersteld worden, dit proces wordt 'resolutie van ontstekingen genoemd'. Een van de kenmerken van de ziekte MS zijn de vele ontstekingen die plaats vinden in de hersenen en ruggenmerg, dit duidt erop dat het resolutie systeem bij deze mensen niet werkt. Gijs Kooij van het VUmc heeft onderzoek gedaan naar welk groepen ontstekingsremmende lipiden bij gezonden mensen aanwezig waren en welke juist niet aanwezig zijn bij mensen met MS. Het bleek dat mensen met MS bepaalde groepen van deze ontstekingsremmende lipiden niet hebben die wel aanwezig zijn bij gezonden mensen.⁸ In het onderzoek van Pim Leonards werden ratten en muizen blootgesteld aan verschillende pesticiden. Met behulp van 'immunologische parameters' is aangetoond dat bepaalde pesticiden ontstekingen geven in de hersenen. Met behulp van een metabolomics onderzoek werd aangetoond dat de samenstellingen van bepaalde vetzuren veranderd was ten vergeleken met de controle groep. Wat nu nog onderzocht moet worden is of de ontstekingen gerelateerd zijn aan de veranderingen in vetzuren en aan de 'immunologische parameters'.

Lipidomics

Metabolomics is de studie naar de chemische processen van metabolieten die zich in de cel afspelen. Een van de groepen metabolieten zijn de lipiden, maar omdat de groep lipiden zo groot en complex zijn is er een nieuwe richting binnen de metabolomics ontstaan genaamd lipidomics.

Lipidomics is een relatieve nieuwe richting met als doel om door analytisch gebaseerd onderzoek zoveel mogelijk van het lipidome in kaart te brengen. Het lipidome is de gehele verzameling van alle lipiden. Voor langere tijd, voor 2000, was het probleem dat instrumenten niet gevoelig en selectief genoeg waren om de vele verschillende type lipiden te kunnen meten. In de eerste jaren werd er veel gebruik gemaakt van dunnelaagchromatografie (TLC) om verschillende klassen lipiden van elkaar te kunnen scheiden. Door de vele technologische

verbeteringen, met namen die in (ESI)-MS, steeg de gevoeligheid en selectiviteit van deze apparaten waardoor de kennis van lipiden sterk is gestegen.¹

Tegenwoordig richten veel studies zich op de volgende onderwerpen:

- De identificatie van zowel klassen als individuen lipiden.
- Het ontwikkelen van kwantitatieve methodes voor het analyseren van lipiden in biologische matrices.
- Het in kaart brengen van lipid veranderingen bij ziektes en gebruik van biomarkers voor het vaststellen van ziektes.
- Structuurbepalingen van individuen lipiden.

Zoals in een van de onderwerpen die hiervoor beschreven staat speelt lipidomics een essentiële rol in het vaststellen van het biochemische mechanisme aan lipide gerelateerde ziektes. Dit wordt gedaan door het identificeren van veranderingen in de lipiden samenstelling van cellen. Elk type cel heeft een vaste lipiden samenstelling, men vindt steeds meer bewijzen dat lipiden een rol spelen bij bepaalde ziekten doordat te zien is dat de lipiden samenstelling veranderd bij bepaalde ziekten.

Bij het onderzoeken van lipiden kunnen er op twee manieren gezocht worden, dit zijn targeted lipidomics en non-targeted lipidomics, vergelijkbaar met selective ion monitoring (SIM) en totaal ion (TIC) massaspectrometrie. Bij targeted lipidomics wordt ervan tevoren bepaald welke lipiden er geanalyseerd moet worden. Een goede manier om een hoge gevoeligheid te behalen is het gebruik van targeted lipidomic met een LC-triple quadropole MS, wanneer deze in MRM-mode wordt gebruikt (multiple reaction monitoring). In non-targeted wordt de MS-instellingen zo ingesteld dat er een breed scala aan lipiden gemeten kan worden, dit is handig bij het zoeken naar nog niet ontdekte lipiden. Hiervoor wordt vaak time-of-flight (TOF) of Orbitrap massaspectrometrie gebuikt.

Een van de grote verschillen tussen lipidomics en metabolomics is dat de meeste lipiden makkelijk te extraheren en te scheiden zijn door middel van organische oplosmiddelen van andere wateroplosbare metabolieten. Een van de problemen is dat lipiden in verschillende meer polaire oplosmiddelen opeenhopen tot bijvoorbeeld micellen, vooral bij hogere concentraties, waardoor een kwantitatieve analyses moeilijk is uit te voeren.^{1 2 9}

Er zijn twee methodes om lipiden te meten 'direct infusion' MS ook wel shotgun lipidomics genoemd en LC-MS. Het verschil tussen beide methodes is dat bij direct infusion het monster direct geïnjecteerd wordt op een ESI-MS en bij LC-MS het sample eerst op een HPLC-kolom wordt gescheiden. Shotgun lipidomics is gebaseerd op het scheiden van verschillende klassen lipiden van elkaar met behulp van hoge resolutie massaspectrometrie doordat elke klasse lipiden een andere 'hoofdgroep' heeft welke een andere lading krijgen tijdens het ioniseren. Dit verschil in lading geeft elke klasse zijn eigen specifieke fragmenten. Het voordeel van shotgun lipidomics is dat er geen problemen zijn met concentratie veranderingen en chromatografische afwijking die kunnen ontstaan bij het gebruik van een HPLC kolom. Het nadeel is dat er veel ion suppressie kan plaatsvinden door de grote aantal ionen in de MS.

Het voordeel van HPLC is dat dit een extra scheidingsfactor geeft waardoor het mogelijk wordt om verschillende soorten lipiden binnen een klasse van elkaar te kunnen scheiden,

daarnaast geeft HPLC extra selectiviteit in de vorm van retentietijd. Deze extra scheiding zorgt ervoor dat lipiden beter geïdentificeerd kunnen worden maar het maakt de kwantificatie juist moeilijker doordat elke spectrum beschouwd wordt als een individuele gebeurtenis met een eigen matrix effect en eluens samenstelling.¹

Analyse

Lipiden zijn apolaire stoffen die goed oplossen in apolaire oplossingen, dankzij deze eigenschap zijn lipiden goed te scheiden door middel van Reversed-phase (RP) HPLC. In dit onderzoek zal een triple quadropole (QqQ) massaspectrometer voor de identificatie en kwantificatie gebruikt worden vanwege de hoge gevoeligheid, selectiviteit en reproduceerbaarheid.

Voor het analyseren van menselijke en dierlijke cellen en plasma zijn over het algemeen niet veel voorbereidings stappen nodig. Het is van groot belang dat de extractie tijdens alle stappen bij lage temperatuur gehouden wordt om de lipiden stabiel te houden. Voor het extraheren kan gekozen worden voor Liquid-liquid extraction (LLE) of Solid-phase extraction (SPE). Veel gebruikte extractie oplossing zijn bijvoorbeeld methanol (MeOH)/chloroform of methanol/acetonitril (ACN).¹⁰

Problemen die kunnen optreden²

Er zal veel tijd gaan zitten in het optimaliseren van de LC-MS-methode, dit is omdat oxylipiden een complexe groep van stoffen zijn die moeilijk te meten zijn en ook nog in lage concentraties voorkomen. De belangrijkste factoren waaraan gedacht moeten worden zijn:

- Lage concentraties.
- Grote concentratie verschillen tussen de laagste en hoogste concentratie lipiden.
- Het gelijktijdig kwantificeren van verschillende analieten die chemisch en structureel op elkaar lijken zoals isomeren.
- Correct identificeren van de pieken.

De eerste twee factoren kunnen door de QqQ-MS systemen van tegenwoordigen verholpen worden. Voor de derde factor moeten goede fragment spectra verkregen kunnen worden om verschillen tussen bijv. isomeren te kunnen zien, dit waar alleen retentietijd niet goed genoeg zal zijn. Voor de laatste factor zijn goede efficiënte chromatografische scheidingen en detectiemethoden nodig.¹¹

Er zijn verschillende instellingen op zowel de HPLC als MS die aangepast kunnen worden om de verschillende doelen te behalen, in Tabel 1 staan enkele instellingen voor zowel de HPLC als MS die aangepast kunnen worden.

Tabel 1: Voorbeelden van instellingen die bij de HPLC en MS aangepast kunnen worden.

HPLC	MS
De kolom	Nebulizer gas
Het eluens	Probe gas
Het gradiënt	Ion spray voltage
De temperatuur	Probe temperatuur
De flow	

Voor de HPLC geldt dat er zoveel mogelijk lipiden van elkaar gescheiden moeten worden. Bij vrijwel alle analyses naar oxylipiden worden verschillende versies van C₁₈ kolommen gebruikt.

De meest voorkomende eluens oplossingen die gebruikt worden bij lipiden analyses zijn een mix van onder andere licht aangezuurd water in combinatie met methanol, isopropanol (IPA) of ACN (eventueel aangezuurd).

Bij de MS zijn er vele instellingen die aangepast kunnen worden, het belangrijkste hier zal de ionisatie zijn. De effectiviteit van de ionisatie van lipiden ligt niet hoog, om aan de gevoeligheid te kunnen komen moet de ionisatie zo effectief mogelijk verlopen. Hiervoor zullen de MS instellingen uit Tabel 1 een belangrijke rol gaan spelen om deze efficiëntie te verhogen.

Een ander probleem bij het ioniseren wanneer er tissue geanalyseerd wordt is dat door de matrix ion-suppression plaats kan vinden.

Contaminatie

Contaminatie is bij elke analyse een punt om aandacht aan te besteden. Voor lipiden geldt dat alleen glaswerk gebruikt mag worden omdat in plastic weekmakers kunnen zitten en dat lipiden veelal binden aan plastic. Daarnaast is het belangrijk om zoveel mogelijk het glaswerk af te dekken met aluminiumfolie. Een belangrijke bron van vervuiling kan een persoon zelf zijn, daarom moet altijd handschoenen gedragen worden om vervuiling van bijvoorbeeld huidcellen tegen te gaan. Andere bronnen van contaminatie kunnen mineraalrijke oliën, vetten, weekmakers of wasmiddelen zijn.

Opslag

Lipiden oplossingen (meestal in MeOH/ACN) worden bewaard in vriezers bij een temperatuur van -80°C (tot 4 jaar lang), bij minder lange opslag is -20°C voldoende. De oplossingen worden in glazen vials opgeslagen, voor extra zekerheid kan Parafilm gebruikt worden. Om oxidatie te voorkomen is het belangrijk om al het zuurstof uit de vials te halen, dit kan worden gedaan door de vials te spoelen met stikstofgas voor het sluiten.

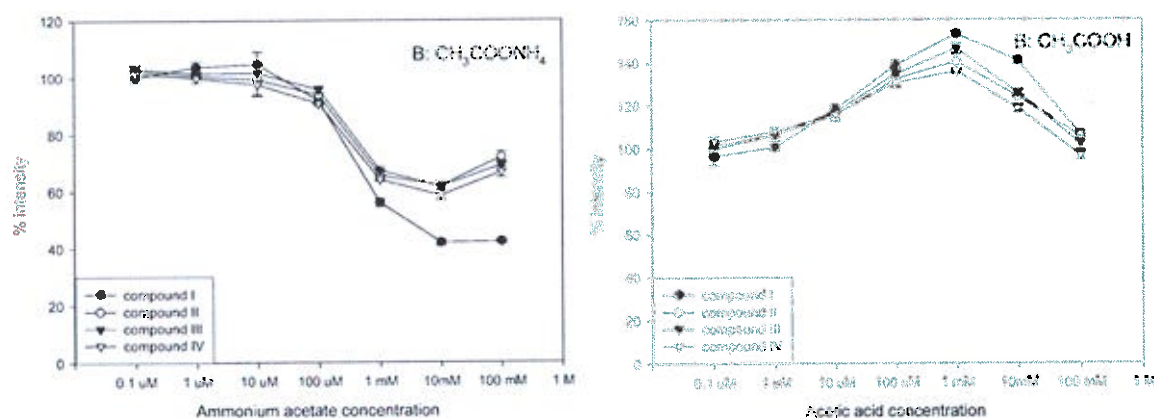
High performance liquid chromatografie

Voor het meten van lipiden door middel van MS kan er gekozen worden voor direct infusion of door middel van LC-MS. Beide technieken worden veel gebruikt bij het meten van lipiden, maar omdat direct infusion beter is in het scheiden van hele groepen lipiden¹ en het doel in dit onderzoek is om zoveel mogelijk lipiden binnen de groepen te meten is LC-MS in dit geval beter. Bij het gebruik van HPLC zijn er vele richtingen qua methodes. Over het algemeen geldt dat normal-phase net als direct infusion beter is in het scheiden van hele groepen, dit is omdat elke groep een eigen karakteristieke polaire kop heeft die op een polaire kolom van elkaar gescheiden kunnen worden. Bij RP-HPLC wordt er een apolaire kolom gebruikt waardoor je losse lipiden kan scheiden op basis van de apolaire staart. Wanneer er zoveel mogelijk lipiden van een klasse gescheiden moeten worden is RP-HPLC dus de beste optie.

GC-MS-methodes worden ook gebruikt voor het meten van lipiden alleen vereist deze methode om de lipiden eerst te derivatiseren om deze vluchtiger te maken. GC-MS wordt vooral voor de analyse van vetzuren gebruikt.

- Eluens

Elk gebruikte oxylipiden methode in de literatuur gebruikt aangezuurd water als een van de eluens oplossingen terwijl deze allemaal in negatieve ESI-mode meten. Dit klinkt als een rare combinatie gezien het feit dat het over het algemeen geaccepteerd is dat een zwak zuur de protonering van je analiet bevordert in positieve ESI-mode en dat daarom aangenomen kan worden dat het toevoegen van een base of zout de deprotonering tijdens negatieve ESI-mode bevordert.



Figuur 3: De effecten op de intensiteit van de pieken van verschillende analieten tijdens negatieve ESI-mode in oplopende concentraties ammoniumacetaat (links) en azijnzuur (rechts).¹²

Er is onderzoek gedaan naar de effecten van het toevoegen van zwakke zuren tijdens negatieve ESI-mode, zoals rechts in Figuur 3 te zien is neemt de intensiteit van de pieken tot een bepaald punt toe naarmate de concentratie azijnzuur toe neemt. Wanneer dit wordt vergeleken met bijvoorbeeld een veel gebruikt zout bij negatieve ESI-mode 'ammoniumacetaat' welke links in Figuur 3 te zien is, is te zien dat azijnzuur op een bepaalde concentratie hogere intensiteit geeft dan de intensiteit die met ammoniumacetaat is verkregen. Om een effectieve ESI analyse uit te kunnen voeren is het belangrijk dat bij de punt van de spray een overmaat aan lading op de druppels wordt aangebracht door middel van een elektrochemische reactie. De hypothese die werd gesteld voor het fenomeen is dat in negatieve ESI-mode, reductie de dominante reactie is. In oplossingen van water en ACN worden protonen die van het water of analiet afkomen waarschijnlijk gereduceerd tot waterstofgas. De extra protonen die vrijkomen door een zuur toe te voegen bevorderen de reductie, waardoor het makkelijker wordt voor de druppels om een negatieve lading te dragen. Deze overmatige negatieve lading gaat zich ophopen op de buitenkant van een druppel tijdens de negatieve ESI, dit verhoogt de pH waardoor deprotonatie van het analiet makkelijker kan plaatsvinden.¹²

Massaspectrometrie

MS is de beste techniek om lipiden te detecteren. Een MS (QqQ) geeft een methode veel selectiviteit en gevoeligheid welke lipidomic methodes over het algemeen nodig hebben. Om de gevoeligheid van een QqQ-MS goed te benutten kan de 'Multiple Reaction Monitoring' (MRM) mode gebruikt worden. In deze mode wordt de eerste quadrapole gebruikt om alleen van tevoren ingevoerde massa's door te laten. De tweede quadrapole zorgt voor fragmentatie waarnaar de laatste quadrapole weer alleen van tevoren geselecteerde fragmenten doorlaat. De MRM-mode zorgt voor goede gevoeligheid, afhankelijk van het doel van de methode kan deze mode gebruikt worden.

De meeste lipidomic onderzoeken hebben als doel het identificeren en kwalificeren van lipiden, bij kwantificatie is van tevoren bekend welke stoffen er gemeten moeten worden en daarbij kan dus MRM gebruikt worden. Het hoofddoel van deze methode zal kwantificeren zijn, in dit geval is MRM dus handig. Bij de MRM mode is het van belang dat van te voren alle bekende lipiden in het systeem moeten worden gezet met de bijbehorende fragmenten en retentietijd. Hiervoor zal in de literatuur op zoek moeten worden gegaan om te kijken welke transitie (molmassa → fragment) er zijn gebruikt voor de verschillende oxylipiden. Literatuuronderzoek is belangrijk omdat analytische standaarden van niet alle oxylipiden verkrijgbaar zijn.

Een ander belangrijk onderdeel van de MS is de ionisatie, er zijn 2 belangrijke instellingen waar naar gekeken kunnen worden. De eerste is de 'nebulizer flow', deze flow zorgt ervoor dat de oplossing die uit de spray komt in een goede kegel vorm geblazen wordt. De tweede instelling is de 'probe flow' (in combinatie met de 'probe temperatuur'), deze flow blaast (meestal stikstof) haaks door de gevormde kegel en zorgt voor het verdampen van de oplossing waardoor de moleculen een lading krijgen.

Valideren

Nadat er een goed werkende methode is ontwikkeld voor de scheiding van de lipiden zal de methode worden gevalideerd. Een methode wordt gevalideerd aan de hand van het doel van waar de methode voor bedoeld is, zodra de methode gevalideerd is wilt dit zeggen dat de methode geschikt is voor het bepalen van het gewenste doel en dat de resultaten betrouwbaar zijn. Enkele punten die bepaald kunnen worden tijdens het valideren zijn de blanco, de limit of detection (LOD), de reproduceerbaarheid, de herhaalbaarheid en de recovery.

Omdat in dit onderzoek deze stap alleen zal worden uitgevoerd wanneer er tijd over zullen er nog geen doelen aan worden gesteld behalve dat het gewenst is om minimaal concentraties (en dus LOD) van 0.01ppb te kunnen meten. Hoewel er geen eisen zijn gesteld zouden er wel richtlijnen gesteld kunnen worden, een herhaalbaarheid van 5-10% en een recovery van <80% zijn meestal goede eigenschappen voor een methode.

Methoden

Chemicalien

Acetonitril (99,95%, Biosolve BV, Nederland), isopropanol (99,95%, Biosolve BV, Nederland) en acetic acid glacial (99,95%, Biosolve BV, Nederland) werden gebruikt als eluens. Methanol (99,95%, Biosolve BV, Nederland) en chloroform (99.0-99.4%, Sigma Aldrich, Duitsland) werden gebruikt als extractie oplossing.

Resolvin D1 (>95%, Cayman Chemical, USA), Resolvin D2 (>95%, Cayman Chemical, USA), Resolvin D 3(>95%, Cayman Chemical, USA), Protectin D1 (>98%, Cayman Chemical, USA), Marsein 1 (>95%, Cayman Chemical, USA), Leukotriene B4 (>97%, Cayman Chemical, USA) en Lipoxin B4 (>95%, Cayman Chemical, USA) werden als standaarden gebruikt. 5(S)-HETE-d8 (<99%, Sanbio, Nederland), Leukotriene B4-d4 (<99%, Sanbio, Nederland), Prostaglandin E2-d4 (<99%, Sanbio, Nederland), Resolvin D2-d5 (<95%, Sanbio, Nederland) en Lipoxin A4-d5 (<99%, Sanbio, Nederland) werden gebruikt als interne standaard.

Instrumenten

Voor het meten werd een LC-MS gebruikt. De HPLC bestond uit een 'Bruker Elute Ole HPLC' en bevatte een 'kinetex EVO C18, 100Å (2.1 x 150 mm, 2,6 µm)' kolom en een ingebouwde autosampler. De MS bestond uit een 'Bruker EvoQ elite MS'. Voor het extraheren werd een Precellys 24 schudmachine gebruikt en C18 SPE cartridges (J.T bruker C18 kolom, 6ml - 500mg per kolom)

Methoden

- Voorbewerking

Weefsels

Voor weefsel monsters werd een LLE uitgevoerd. Een halve gram tissue werd samen met ong. 10 keramische beads in een sample buis gedaan waaraan 150 µL methanol en chloroform werd toegevoegd om vervolgens gespiked te worden met 50 µL interne standaard (IS) mix. De buis werd vervolgens twee keer geschud in het Precellys apparaat middels een methode welke voor twee keer 10 seconden op 6500 rpm schud. De verkregen oplossing werd in een centrifuge gezet voor 5 min op 17000 rpm. 150 µL van de chloroform/methanol laag werd overgebracht in een vial. De chloroform/methanol werd ingedampt tot droog om deze vervolgens opnieuw op te lossen in 50 µL MeOH/MiliQ (1:1).

Tussen alle stappen in werd de oplossing op ijs gezet om af te koelen.

Plasma/serum

Voor plasma/serum monsters werd een SPE uitgevoerd. Aan 100 µL serum/plasma werd 400 µL ijskoud MeOH toegevoegd, de oplossing werd gecentrifugeerd voor 10 min op 3000 rpm waarna het supernatant werd gescheiden van de rest.

Een SPE cartridge werd gewassen met 6 mL MeOH en 6 mL water, voor het aanbrengen van het monster aan de cartridge werd er 9 mL miliQ (pH 3.5) aan het monster toegevoegd. Na het aanbrengen van het extract op de cartridge werd de cartridge gewassen met 6 mL hexaan en werd het monster geëluëerd met 6 mL methylformaat. De verkregen oplossing werd in een

waterbad gedroogd door middel van een stikstof flow waarbij elke 10 min de randen werden schoongespoeld met MeOH. Zodra de oplossing was opgedroogd werd er 50 μ L MeOH/miliQ (1:1) toegevoegd om vervolgens te meten. Tussen alle stappen in werd de oplossing op ijs gezet om af te koelen.

- Muisexperiment

Verschillende Muizen werden blootgesteld aan de pesticide endosulfan en een fluorverbinding (perflour hexaan sulfonaat, PFHxS). Daarnaast was er een controle groep zonder blootstelling. De muizen werden 10 dagen na geboorte eenmalig blootgesteld. Na 4 maanden werden de muizen opgeofferd voor onderzoek waaronder voor metabolomics. De cortex en hippocampus werden verwijderd en direct ingevroren bij -80°C . Extracten werden gemaakt zoals bovenbeschreven onder 'weefsels'. De extracten werden bij -80°C opgeslagen.

- Kalibratielijn

Tijdens het meten van de rattenmonsters werd een zeven punten kalibratielijn gebruikt van alle zeven de standaarden. De concentraties voor de kalibratielijn bedroegen 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 en 20ppb. Aan elk punt werd een IS mix met een concentratie van 10ppb toegevoegd.

- Analyse

De samples werden gemeten door middel van LC-MS. Het gebruikte eluens was (A): 0.1% azijnzuur in water en (B): ACN/IPA (90:10), de flow werd gezet op 0.35mL/min en de kolomtemperatuur bedroeg 40°C . Het gradiënt bestond uit: 15% (B) tot 33% van 0-3.5 min, 38% (B) op 5.5 min, 42% (B) op 7 min, 48% (B) op 9 min, 65% (B) op 15 min, 75% (B) op 17 min, 85% (B) op 18.5 min, 95% (B) op 19.5 min en dit houden tot 23.5 min, 15% (B) op 25 min en dit houden voor 5 min.

De electrospray ionisatie werd uitgevoerd door middel van argon gas op -4500 (V), zowel de Probe als nebulizer flow stonden op 25 psi met een Probe temperatuur van 400°C . De Cone temperatuur bedroeg 350°C en de Cone flow 20 psi.

Resultaten/Discussie

De eerste helft van het onderzoek zou zich focussen op de optimalisatie van de LC-MS methode, waarbij meerdere onderdelen aan bod zouden komen. Het eerste onderdeel stond in het teken van het optimaliseren van de verschillende instellingen van de LC-MS. Het tweede onderdeel zou gaan over het toepassen van de geoptimaliseerde methode op test samples, met als doel om de effecten van het toevoegen van een matrix op de pieken te bekijken. Het laatste onderdeel zou zich focussen op het samenstellen van een lijst met zoveel mogelijk oxylipiden en deze vervolgens in de software te kunnen zetten om gemeten te worden.

Het tweede deel van het onderzoek zal zich richten op het optimaliseren van de monstervoorbewerking.

LC-MS optimalisatie

Het eerste onderdeel, het optimaliseren van de HPLC en MS instellingen, werd gedaan aan de hand van de verschillende oxylipiden standaarden. (de structuurformules van deze standaarden zijn terug te vinden op bijlage 1 en 2)

Omdat er MRM mode werd gebruikt voor het meten moest elke standaard geoptimaliseerd worden om tot de beste fragmentatie spectra te komen, hiervoor werd een standaard oplossing door middel van 'direct infusion' de MS in gespoten. Aan de hand van de software werd automatisch bepaald bij welke 'collision energy' de fragmenten met de meeste intensiteit ontstonden, hieruit werden de drie beste fragmenten gekozen. De instellingen voor het fragmenteren zijn de enigste instellingen aan de MS kant die door middel van direct infusion geoptimaliseerd konden worden. De rest van de MS instellingen zoals het ionisatie gedeelte werd geoptimaliseerd door middel van LC-MS metingen.

Als richtlijn voor de HPLC kant zoals het eluens en gradiënt werd er gekeken naar een onderzoek gedaan door Karin Strassburg et al.⁵, voor de MS instellingen werd er begonnen de standaard waarden die worden gegeven door de gebruiksaanwijzingen van het apparaat. Er werd gekozen om te gaan voor de HPLC opstelleng uit het desbetreffende artikel omdat er in dit artikel in een relatief korte meting 104 verschillende oxylipiden werden gekwantificeerd.

Voor de HPLC waren meerdere factoren die aangepast konden worden zoals de kolom, het eluens, de temperatuur en het gradiënt. Het was al snel duidelijk dat de gebruikte C18 kolom uit het artikel niet aangepast zou hoeven worden, omdat zoals eerder besproken lossen lipiden gescheiden moeten worden aan de hand van de apolaire staarten waar een C18 kolom geschikt voor is en elk gevonden artikel een C18 kolom gebruikten.

Aan de hand van de software kon voor de MS enkele instellingen aangepast worden, deze instellingen hadden voornamelijk te maken met de ionisatie.

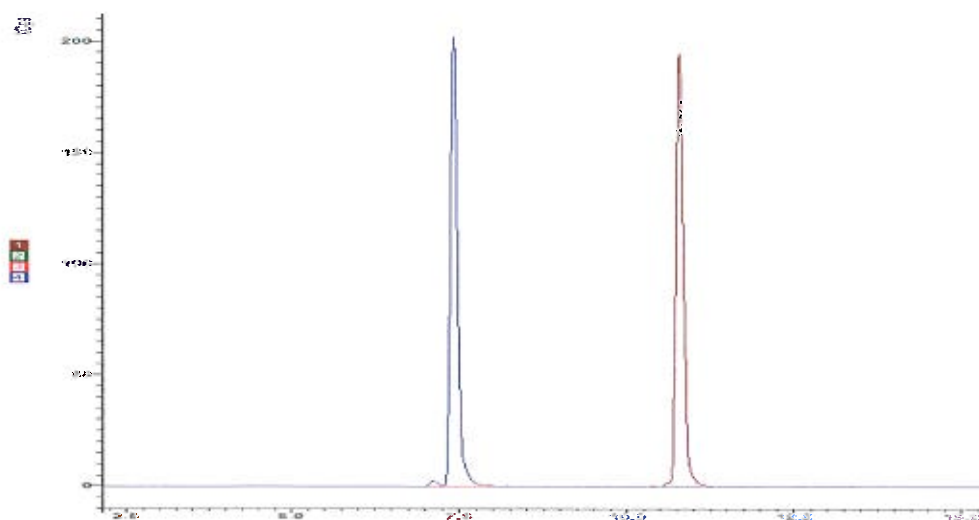
HPLC

Er werd eerst gekeken naar de HPLC kant, de belangrijkste eigenschappen waar de methode aan moest voldoen waren dat de pieken symmetrisch waren (geen fronting of tailing) en dat de pieken niet te breed waren. Voor de eerste meting werd een eluens gebruikt van 0.1% azijnzuur in combinatie met ACN/IPA (90:10, v/v), de keuze voor ACN tegenover bijvoorbeeld het veelgebruikte MeOH is omdat ACN apolairder is dan MeOH wat voor een betere scheiding kan zorgen bij lipiden met lange apolaire staarten. De kolomtemperatuur werd gesteld op 40 graden en het gebruikte gradiënt is terug te zien in Tabel 2.

Tabel 2: het gebruikte gradiënt tijdens de eerste meting.

Tijd (min)	ACN/IPA (%)	Aantal min. vasthouden
0	15	
3,5	33	
5,5	38	
7	42	
9	48	
15	65	
17	75	
18,5	85	
19,5	95	
21	12	5

Met deze instellingen werden een paar standaarden gemeten waaruit bleek dat het gradiënt in combinatie met het eluens goede pieken gaven, zo waren de pieken symmetrisch en niet breed (ong. 15 seconden). In Figuur 4 zijn van twee standaarden de pieken te zien uit deze eerste metingen. Na het zien van de pieken werd ervoor gekozen dat de HPLC kant geen verdere optimalisatie nodig had en alleen nog verder te focussen op de MS kant.



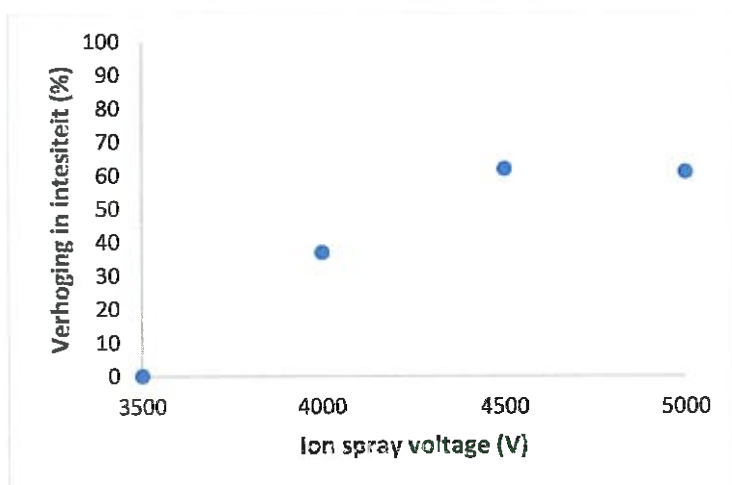
Figuur 4: Het chromatogram van de eerste meting van twee verschillende lipiden standaarden (RvD3 links en PD1 rechts) met het begin gradiënt (Tabel 2) en eluens.

MS

Na de HPLC werd er begonnen met de optimalisatie van de MS, de instellingen hadden vooral te maken met de ionisatie, de belangrijkste instellingen hiervoor waren de 'Ion spray voltage', de 'Heatprobe temperture', de 'Nebulizer flow' en de 'Probe flow'.

- Ion Spray Voltage

De eerste aanpassing die werd gedaan aan de MS instellingen was die aan de Ion Spray Voltage, de basis instelling hiervan lag op -3500 (V). De verwachtingen was dat wanneer deze waarde zou worden verlaagd, de intensiteit van een piek zou toenemen omdat er meer lading aanwezig is en de ionisatie daarom beter zou kunnen verlopen. Tijdens de test zijn verschillende voltages getest van -3500 (V) tot en met -5000 (V), zoals werd verwacht nam de intensiteit van de verschillende pieken toe tot en met een voltage van -4500 (V) zoals te zien is in Figuur 5. In Figuur 24 op bijlagen 3 zijn de pieken te zien van een van de gebruikte standaarden voor de verschillenden waarden.



Figuur 5: De gemiddelde toenames in intensiteit van de verschillende standaarden naarmate het aantal volt wordt verhoogd vergeleken met de begin waarde van -3500 (V).

Alleen deze aanpassing bleek op sommige lipiden zoveel verhoging in piekhoogte te geven dat de oorspronkelijke pieken bij -3500 (V) bijna niet meer te zien waren wanneer vergeleken met -4500 (V), op andere lipiden waren de effecten ook positief maar minder groot.

Probe- en Nebulizer Flow

Na de 'Ion spray voltage' waren de probe- en nebulizer flow aan de beurt. Deze twee flows zorgen samen voor het verdampen van de druppels tijdens de ionisatie. De beginwaardes van deze instellingen lagen op 50 psi. Beide instellingen werden zowel los van elkaar als tegelijk aangepast om zo verschillende combinaties te testen.

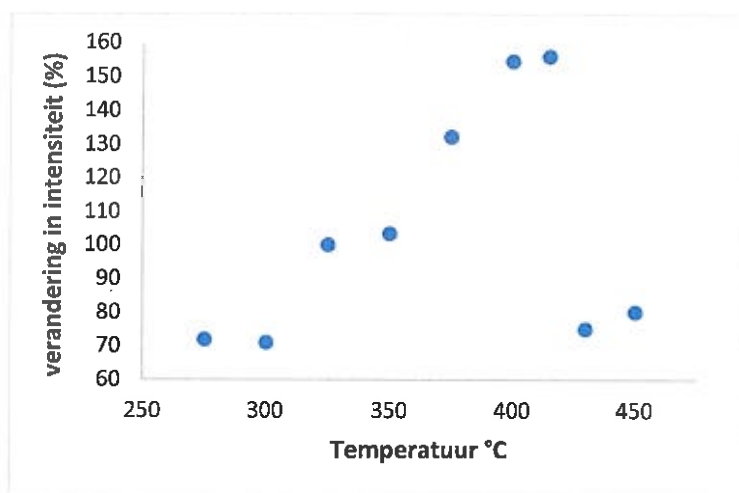
Er was de mogelijkheid om beide flows van 0 tot en met 70 psi in te stellen. Beide flows zijn getest tussen 15 en 60 psi waarbij de hoogste intensiteit werd gevonden waarbij beide flows op 25 psi werden gezet. In Figuur 25 op bijlagen 3 zijn de pieken voor een paar instellingen terug te zien.

Het was al bekend dat lipiden een lage ionisatie efficiëntie hadden. Uit deze testen bleek dat het omlaag brengen van de 'nebulizer/probe flow' veel positief effect had op de ionisatie. Dit kan erop duiden dat een van de factoren voor de lage ionisatie efficiëntie is dat lipiden niet stabiel genoeg zijn bij hogere gas flows en dus lagere flows gebruikt moeten worden om tot een hogere efficiëntie te komen.

Heatprobe Temperatuur

De Heatprobe Temperatuur geeft de temperatuur van de probe flow aan. Gezien het feit dat de probe flow ervoor zorgt dat het oplosmiddel verdampt zal hogere temperaturen een betere verdamping geven.

Deze instelling kon van 0 °C tot en met 700 °C worden ingesteld waarbij de begin temperatuur 325 °C was. Tijdens het testen is de temperatuur van 275 °C tot en met 450 °C gemeten.



Figuur 6: De gemiddelde toe en afnamen in intensiteit voor alle standaarden naarmate de temperatuur wordt veranderd vergeleken met de beginwaarde van 325 °C.

Tot de 400 °C nam voor alle lipiden de intensiteit toe, na de 400 °C begon voor sommige lipiden de intensiteit af te nemen maar voor sommige lipiden ging de intensiteit nog steeds omhoog. Vanwege de verschillen tussen lipiden is er voor gekozen om in de eindmethode te gaan voor 400 °C welke een 55% meer intensiteit verkreeg vergeleken met de beginwaarden van 325 °C.

Na deze aanpassingen en er standaarden gemaakt van 0.1 tot en met 1ppb en gemeten om de prestaties van de methode te bekijken. Het was met deze aangepaste instellingen mogelijk om pieken te zien voor alle standaarden op concentraties van 0.1ppb.

Omdat het hier ging om standaard oplossingen ging de verwachtingen dat wanneer er monster gemeten worden zoals tissue of plasma de baseline niet zo laag zou liggen en er eventueel ook ion-suppressie zou kunnen optreden door voornamelijk alle overige vetten. Door deze effecten zou het mogelijk zijn om geen pieken te kunnen zien bij dezelfde concentraties in monsters.

De volgende stap werd om te kijken wat er gebeurd wanneer er samples zoals plasma of tissue gemeten worden, en welke voorbewerkings stappen er eventueel nodig zijn om de matrix effecten te verminderen.

Matrix effecten

Bij de matrix effecten gaat het erom of overige stoffen in het monster verandering geven in de baselijn en ion suppressie van de pieken. Voordat deze effecten getest kunnen worden werd uitgezocht welk oplosmiddel de monsters uiteindelijk het best opgelost konden worden.

Er werden drie verschillende oplosmiddelen getest, methanol, methanol/acetonitril (1:1) en methanol/miliQ (1:1). Methanol was gekozen omdat alle lipiden standaarden in methanol worden gemaakt aangezien deze het meest stabiel zijn in methanol. Methanol/acetonitril en methanol/miliQ werden gekozen omdat het eluens zowel acetonitril als miliQ bevat en het monster op deze manier betere interactie heeft met het eluens.

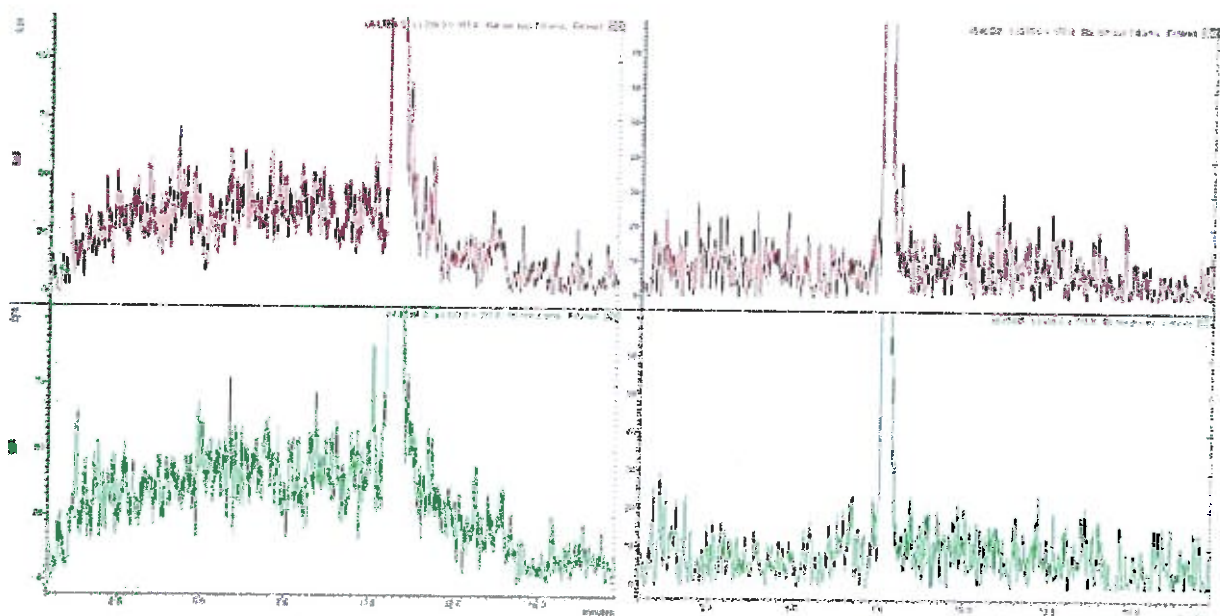
Verschillende standaarden werden met de drie verschillende oplossingen gemeten. Alleen methanol als oplosmiddel gaf de laagste pieken, de oplossing van methanol/acetonitril gaf gemiddeld over drie samples 22% hogere pieken dan alleen methanol en methanol/miliQ gaf nog eens 17% hogere pieken dan methanol/acetonitril. Acetonitril/miliQ zou misschien logischer zijn omdat het een nog betere overeenkomst heeft met de start van de mobiele fase maar dit oplosmiddel werd niet getest omdat lipiden hierin niet stabiel genoeg in zijn.

Nu bekend was welk oplosmiddel de beste pieken gaven was de volgende stap om dit toe te passen op test samples.

Om de matrix effecten te bekijken werden als test matrix voorbereide monsters van ratten hersenen opgelost in MeOH/ACN (1:1) uit een ander onderzoek gemeten.

Om een beter beeld te krijgen van de matrix effecten over de hele run werd de lijst van de zeven lipiden standaarden die aanwezig waren vergroot tot twintig met lipiden uit de literatuur. Op deze manier werden meerdere MRM transitieën op meerdere retentietijden gemeten. In Figuur 7 zijn voor twee lipiden de pieken te zien van de meting van de rattenmonsters en die van een standaard oplossing zonder matrix. Wanneer de baselijn van beide metingen worden vergeleken is er geen verhoging te zien bij de verschillende transitieën. Hieruit kon worden geconcludeerd dat er geen matrix effecten plaats vinden die invloed hebben op de baselijn.

Om de ion-suppressie te onderzoeken werden ratten samples en een referentieoplossing gespiked. Door het vergelijken van de piek hoogte, vorm en retentietijd van beide metingen kon er gekeken worden of de matrix invloed heeft op de pieken. Voor de zeven verschillende standaarden bedroegen de intensiteiten 81-96% voor de rattensamples vergeleken met de referentieoplossing wat erop duidt dat er weinig ion-suppressie plaats vond.

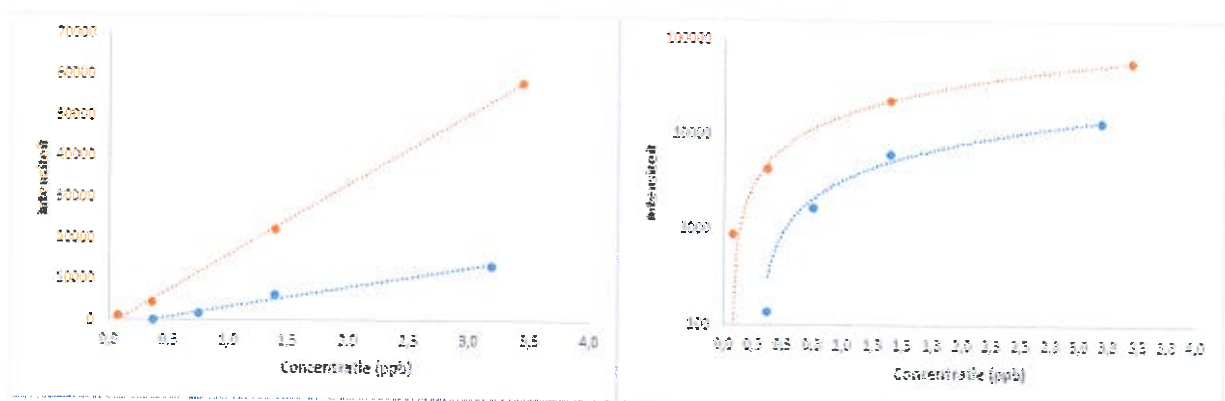


Figuur 7: Link en rechts twee verschillende standaarden gemeten met boven in een rattensample en onder in een referentieoplossing (links LTB4 en rechts RvD2).

Geoptimaliseerde methode

Om uiteindelijk de invloed van de optimalisatie in kaart te brengen is een kalibratielijn gemaakt van 0.1 tot en met 15ppb gemaakt in MeOH/miliQ (1:1). Deze kalibratielijn is daarna gemeten met zowel de geoptimaliseerde methode als met de begin methode.

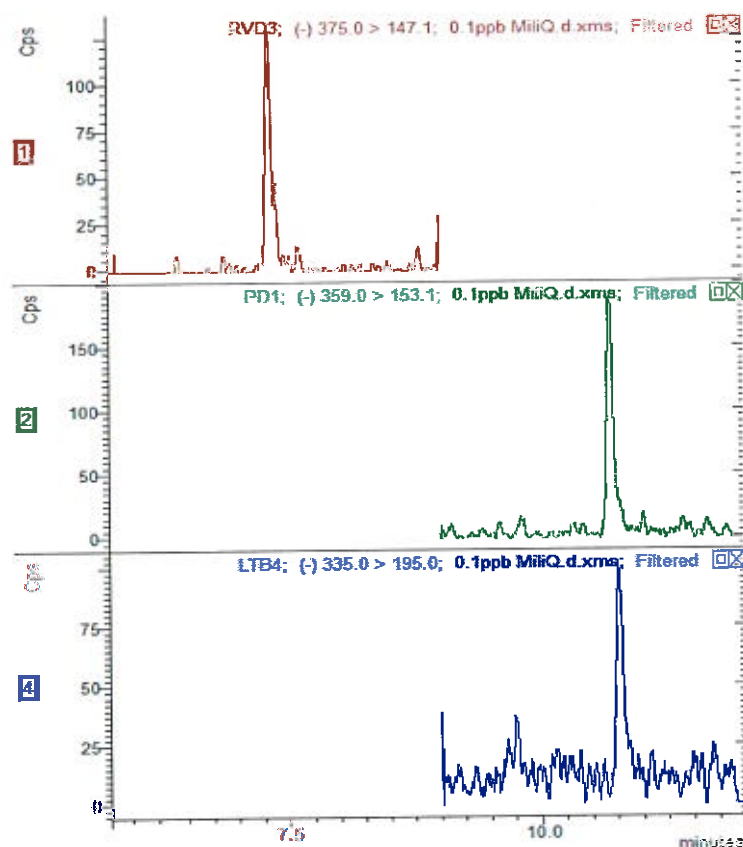
In Figuur 8 zijn de resultaten van de metingen met de geoptimaliseerde methode (oranje) en begin methode (blauw) te zien. Alleen het onderste deel van de kalibratielijnen is te zien waarbij de rechter grafiek een logaritmische schaal heeft. In deze grafieken valt duidelijk te zien dat de intensiteit van de pieken bij de aangepaste methode hoger liggen dan bij de standaard methode. Kijkend naar de pieken van het eerste punt van de kalibratielijn waarvan er drie in Figuur 9 te zien zijn, blijkt dat op concentraties van 0.08ppb de pieken nog ruim boven de ruis aanwezig zijn en er dus nog lager gemeten zou kunnen worden.



Figuur 8: Links de kalibratielijn van 0.1 tot 3.5ppb (PD1) gemeten met de eindmethode (oranje) en begin methode (blauw). Recht dezelfde kalibratielijn maar dan met de y-as als logaritmische schaal om het verschil in intensiteit bij de eerste punten duidelijker te maken.

Omdat bij de oude methode er voor de meeste standaarden geen pieken te zien waren bij 0.1ppb werd er gekeken naar de toename in intensiteit bij een concentratie van 0.5ppb, deze toename bedroegen 700% tot 3700% voor de zeven verschillende standaarden.

Zoals in het onderste chromatogram van Figuur 9 te zien is hangt het per transitie en lipiden af hoeveel ruis er aanwezig is en wat de intensiteit van de pieken is, dit maakt dat niet voor alle lipiden even laag gemeten zou kunnen worden.



Figuur 9: Chromatogrammen van 3 standaarden bij concentraties van 0.08ppb (van boven naar beneden: RvD3, PD1 en LTB4).

Om de uiteindelijk aanpassingen aan de instellingen duidelijk te maken is er in Tabel 3 voor alle instellingen de bijbehorende waarden van zowel voor als na de optimalisatie te zien, hier is te zien dat er aan de HPLC kant niks is aangepast.

Tabel 3: De verschillende LC-MS instelling van voor de optimalisatie en na de optimalisatie.

Instellingen	Begin methode	Geoptimaliseerde methode
Temperatuur	40 °C	40 °C
Flow	0,35 mL/min	0,35 mL/min
Eluens (A)	0,1% acetic acid	0,1% acetic acid
Eluens (B)	ACN/IPA (90/10)	ACN/IPA (90/10)
Oplosmiddel	Methanoi	Methanol/MiliQ (1:1)
Ion Spray (V)	-3500 (V)	-4500 (V)
Cone temp	350 °C	350 °C
Cone flow	20 psi	20 psi
Heatprobe temp	300 °C	400 °C
Nebulizer flow	50 psi	25 psi
Probe flow	50 psi	25 psi

Identificatie

De laatste stap om de methode compleet te maken is om een lijst met componenten te hebben. Vanwege de gevoeligheid zullen deze componenten in MRM-mode moeten worden opgenomen. Omdat er getest werd met de rattensamples werd er gekozen om zoveel mogelijk oxylipiden uit deze monsters te identificeren en in de componenten lijst te zetten.

Om een overzicht te krijgen van welke oxylipiden er allemaal bestaan werden uit verschillende artikelen^{3, 6, 13, 14, 15} in totaal 249 verschillende genoemde oxylipiden verzameld en in een lijst geplaatst. De beste optie is om alle oxylipiden te kopen en deze individueel te optimaliseren maar dit is onhaalbaar en onrealistisch voor dit onderzoek, in plaats daarvan werden van alle gevonden oxylipiden uit de lijst zoveel mogelijk informatie verzameld zoals massa, fragmenten en de groep waar deze bij horen. In Figuur 10 zijn de eerste oxylipiden van deze lijst terug te zien, op bijlagen 6 is de rest van deze lijst terug te zien.

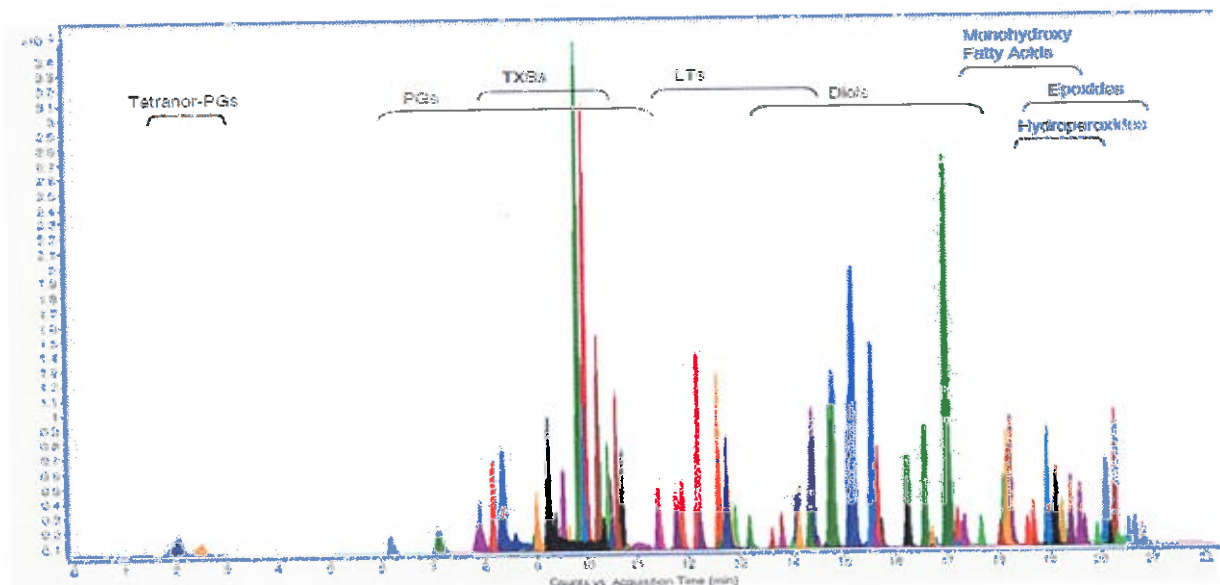
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1		Compound name	Precursor	Fragment	Group	Class	Cone V	Collision V	Dwell	ng/ml Human
2	1	Tetranor-PGEM	319.2	311.2/299.2	AA	Prostanoid				
3	2	Tetranor-PGEM	317.1	309.2/291.2	AA	Prostanoid				
4	3	20-hydroxy PGE2	327.2	287.2/169.2	AA	Prostanoid				
5	4	217-6-keto PGF1a	367.2	163.1	AA	Prostanoid	60	24	0.6	
6	5	6-keto PGF1a	369.2	163.1	AA	Prostanoid	70	36		
7	6	3,8-dinor-11b PGF1a	313.2	143.1	AA	Prostanoid				
8	7	20-carboxy LTSA	363.2	347.2/193.1	AA	Leukotriene	30	25		
9	8	6-keto PGE1	267.2	143.1	AA	Prostanoid				
10	9	20-hydroxy LTSA	331.2	193.1	AA	Leukotriene	30	25		4.6 ± 3
11	10	TXB2	367.2	165.1	SPA	Thromboxane				
12	11	PGF2a	331.2	193.2	SPA	Prostanoid				
13	12	TXB1	371.2	171.1	DGLA	Thromboxane				
14	13	PGE2	343.2	263.2	SPA	Prostanoid	60	13/22		
15	14	8-iso PGF1a	339.2	153.2	AA	Isoprostan				
16	15	TXB2	369.2	169.1/153.2	AA	Thromboxane	60	22/23	0.4	1061 ± 1036.3
17	16	PGD2	349.2	269.2	SPA	Prostanoid	60			
18	17	11b-PGF1a	333.2	193.2	AA	Prostanoid		22		
19	18	(+/-) 3-IPF1a-VI	339.2	113.1	AA	Isoprostan				
20	19	9,12,13-TriHOME	329.2	211.2	LA	Triol	60	13/29/32	0.4	
21	20	9,10,13-TriHOME	329.2	171.1	LA	Triol	60	15/32	0.4	
22	21	PGF1a	339.2	139.2/309.2	AA	Prostanoid	60	23/23/26	0.4	75.5 ± 13.2
23	22	PGF1a	333.2	293.2	DGLA	Prostanoid				
24	23	PGE2	331.2	271.2/173.1/169.3	AA	Prostanoid	60	12/24/13	0.4	72.5 ± 10.5
25	24	11b-PGE2	331.2	271.2	AA	Prostanoid				
26	25	PGI2	343.2	203.1	AA	Prostanoid				
27	26	13-keto PGF2a	331.2	219.1/113.2	AA	Prostanoid				
28	27	5(S),14(R)-Lipoxin A4	331.2	221.2	AA	Lipoxin				
29	28	PGE1	339.2	279.2/317.2	DGLA	Prostanoid	60	20		
30	29	PGD2	331.2	271.2	AA	Prostanoid	60	26/24		371 ± 37.7
31	30	PGD1	339.2	279.2/317.2	DGLA	Prostanoid	60	20		
32	31	11b-13,14-dihydro-13-keto-PG	339.2	113.2	AA	Prostanoid				
33	32	13-keto PGF1a	339.2	221.2/113.2	DGLA	Prostanoid				
34	33	13,14-dihydro PGF1a	333.2	273.2	AA	Prostanoid				
35	34	13,14-dihydro-13-keto PGE2	331.2	175.2/207.2	AA	Prostanoid				
36	35	13,14-dihydro-13-keto PGF1a	339.2	169.1/291.2	AA	Prostanoid				
37	36	3(S),6(S)-Lipoxin A4	331.2	113.1	AA	Lipoxin	60	21		
38	37	5(S),6(S)-Lipoxin A4	331.2	113.1	AA	Lipoxin	60	21		
39	38	13,14-dihydro-13-keto PGF1a	333.2	193.2	AA	Prostanoid				
40	39	13,14-dihydro-13-keto PGD2	331.2	175.2/207.2	AA	Prostanoid				
41	40	1a,1b-dihomo PGF1a	321.3	337.2/221	ADA	Prostanoid				
42	41	14,15-LTE3	439.2	559.2	AA	Leukotriene				

Figuur 10: Een deel van de lijst van alle oxylipiden die zijn verzameld uit de literatuur. Weergegeven zijn de verzamelde informatie over het precursor en fragment ionen, oxylipide klasse, cone voltage, collision energy, dwell time en wat de gevonden concentratie is in human plasma. .

Het plan was om alle oxylipiden onder te verdelen in de groep waar zij bij horen waarbij elke groep een eigen methode kreeg, verschillende ratten samples zouden dan worden gemeten met deze verschillende methoden.

Voor elke methode werd een componenten lijst opgesteld waarbij alle oxylipiden uit een specifieke groep werden opgenomen. Omdat er in MRM-mode gemeten werd werden voor alle oxylipiden de precursor en fragmenten uit de lijst opgenomen. Voor de collision energy werd er gekozen om voor een standaardwaarde van 10 (V) te gaan (de collision energy voor de fragmenten van de geoptimaliseerde standaarden lagen rond de 10 en 20 (V)).

Verschillende ratten samples werden gemeten met de verschillende groepen om op die manier een beeld te krijgen van welke oxylipiden terug te vinden zijn. Als leidraad werd er gekeken naar hetzelfde artikel als waar het gradiënt en eluens van werd overgenomen⁵. In dit artikel werden 104 verschillende oxylipiden gemeten waarbij ook de retentietijden werden benoemd. In theorie zouden de gemeten lipiden uit die lijst op dezelfde plek terug te vinden moeten zijn in de rattenmonsters omdat hetzelfde eluens en gradiënt gebruikt werden. In Figuur 11 is een chromatogram uit het referentie artikel te zien met verschillende groepen oxylipiden weergegeven.



Figuur 11: Chromatogram uit het referentie artikel waarin verschillende groepen oxylipiden zijn aangegeven.⁵ Tetranor-PGs en PGs zijn prostanoids, TXBs zijn thromboxanen en LTs zijn leukotrienes

Deze stap bleek lastiger dan vooraf werd gedacht vanwege meerdere factoren.

Het eerste probleem lag bij de MRM-mode dit probleem bestaat uit twee delen. Het eerste deel is dat een MRM mode is gebaseerd op het meten van transitie, voor de meeste oxylipiden uit de lijst was er maar één fragment bekend, wanneer dit fragment niet ontstaat omdat de collision energy niet overeenkomt met die welke nodig is voor de fragmentatie is er ook geen piek te zien. Het tweede deel gaat over dat er honderden oxylipiden zijn die structureel heel veel op elkaar lijken waardoor veel verschillende lipiden dezelfde massa en soms ook dezelfde fragmenten vormen, hierdoor zullen er bij sommige transitie meerdere pieken te zien zijn.

Het tweede probleem bleek de retentietijd te zijn, het leek logisch dat wanneer hetzelfde eluens, gradiënt en type kolom gebruikt werd dat de retentietijden niet veel zouden verschillen met het artikel. In praktijk bleek dit niet het geval te zijn. Een paar van de standaarden waarmee de methode werd geoptimaliseerd werden ook in het artikel gemeten. Het verschil in retentietijden van deze standaarden vergeleken met die van uit het artikel liepen uiteen van 3 tot 5 minuten, waarbij het enigste verschil tussen de gebruikte kolommen op het merk na was dat de deeltjes grootte van de kolom uit het artikel 2,7 μm was tegen de gebruikte 2,6 μm . Het laatste probleem had te maken dat de ratten samples waarmee werd getest, de monsters bevatten lang niet alle theoretische oxylipiden uit de lijst en juist wel weer andere vetten of nog onbekende oxylipiden die ook pieken gaven op dezelfde transitities.

Er waren een paar manieren bedacht om zoveel mogelijk pieken aan de juiste oxylipiden uit de lijst te kunnen combineren.

Omdat veel oxylipiden dezelfde massa's hebben maar andere fragmenten werden er acht precursor ionen uitgekozen die bij elkaar de helft van alle oxylipiden uit de lijst omvatten. Voor elke precursor ion werd er een methode aangemaakt, het enigste wat de methode meette was dus een precursor met alle fragmenten die alle oxylipiden met deze precursor hadden.

Deze stap werd meerdere keren uitgevoerd met verschillende collision energy waarden om zo de meeste pieken te kunnen zien.

Er werd gekozen om niet op full scan te meten voor het identificeren omdat er zoveel verschillende vetten in de samples aanwezig zijn dat er niets te zien zal zijn behalve een hoge baselijn door alle overlapping die er zal plaatsvinden.

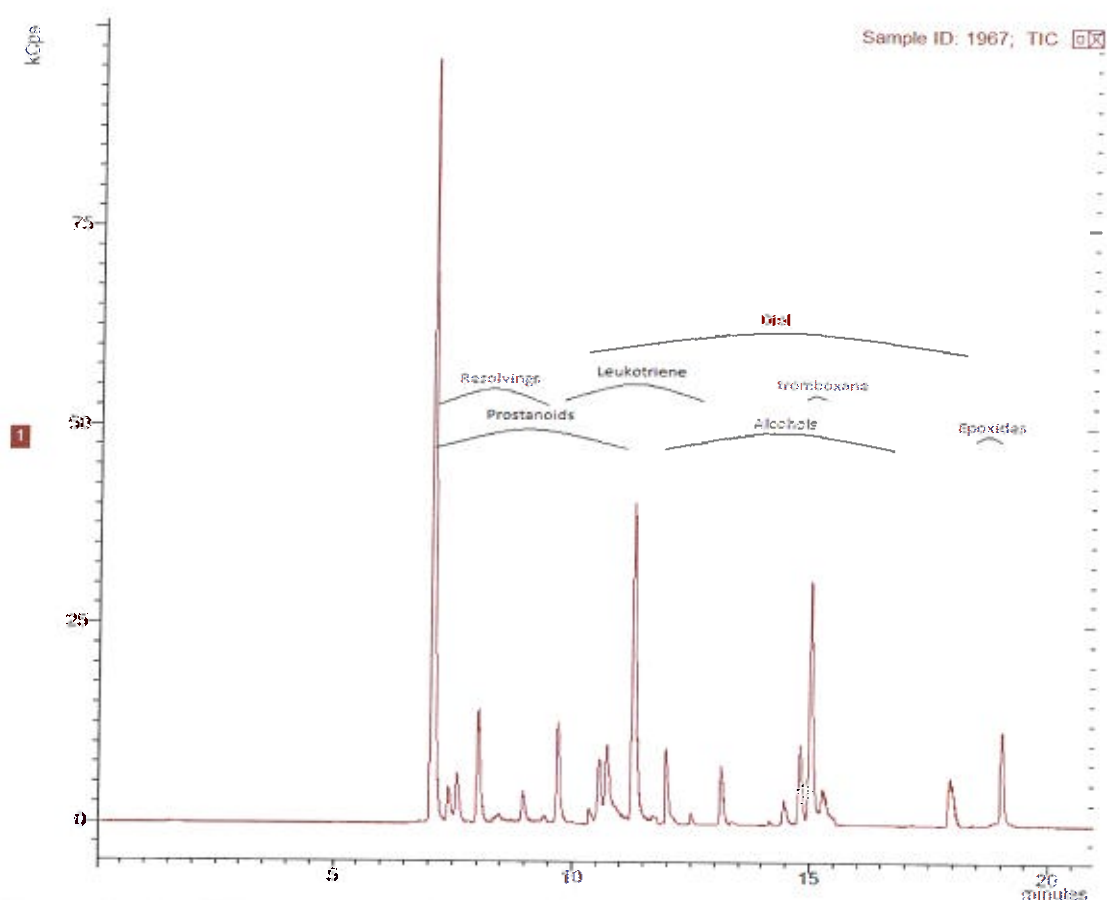
Uiteindelijk waren er uit de metingen van alle theoretische oxylipiden 94 pieken in de rattenmonsters geïdentificeerd, waarvan er 46 ook daadwerkelijk zijn gekoppeld aan een oxylipiden uit de lijst. Alle 94 pieken werden in de eind methode gemeten (Figuur 12 laat het begin van de lijst zien zoals die is opgenomen in de methode). In bijlage 7, Figuur 29 is de bijbehorende 'compound graph' te zien waarin alle componenten staan weergegeven met de bijbehorende retentietijd en in welke tijd window deze werden gemeten. Elk lipiden werd gemeten in een window van 0.5 min, met een piek breedte van ongeveer 0.2 min gaf dit nog een deel baseline aan beide zeiden om te kunnen zien wat deze doet rond de piek.

	Name	Retention Time	RT Window	CAS Number	Retention Index	Scan Type	Scan Time (ms)	Polarity
1	X2 DIHODE	8.97	0.50		0	MRM		50.0 Negative
2	X1 DIHODE	11.28	0.50		0	MRM		50.0 Negative
3	TXB3	15.43	0.50		0	MRM		50.0 Negative
4	TXB1	15.34	0.50		0	MRM		50.0 Negative
5	RVD3	7.34	0.50		0	MRM		50.0 Negative
6	RVD2	7.64	0.50		0	MRM		50.0 Negative
7	RVD1	8.21	0.50		0	MRM		50.0 Negative
8	PGJ2	7.52	0.50		0	MRM		50.0 Negative
9	PGF2a	6.87	0.50		0	MRM		50.0 Negative
10	PGB2	7.48	0.50		0	MRM		50.0 Negative
11	PGB2	10.34	0.50		0	MRM		50.0 Negative
12	PD1	10.89	0.50		0	MRM		50.0 Negative
13	MAR111	10.90	0.50		0	MRM		50.0 Negative
14	LXB4	11.00	0.50		0	MRM		50.0 Negative
15	LTB4	10.77	0.50		0	MRM		50.0 Negative
16	LTB3	11.55	0.50		0	MRM		50.0 Negative
17	Dihydro PD1	14.06	0.50		0	MRM		50.0 Negative
18	DIHOMO PGJ2	16.57	0.50		0	MRM		50.0 Negative
19	d8-S(S)-HETE	15.28	0.50		0	MRM		50.0 Negative
20	d8-RVD2	7.60	0.50		0	MRM		50.0 Negative
21	d8-LXA4	8.05	0.50		0	MRM		50.0 Negative
22	d4-PGE2	7.07	0.50		0	MRM		50.0 Negative
23	d4-LTB4 2	10.73	0.50		0	MRM		50.0 Negative
24	9-HOTF	12.28	0.50		0	MRM		50.0 Negative
25	9-HODE	14.15	0.50		0	MRM		50.0 Negative

	Precursor	Product	Collision Energy	Q1 Resolution	Q3 Resolution	Scan Time (%)	Qualifier Ion	Qualifier Ratio	Qualifier Ion
1	351.00	271.00	15.00	Unit (0.7)	Unit (0.7)	33.33%			
2	351.00	189.00	15.00	Unit (0.7)	Unit (0.7)	33.33%			
3	351.00	233.00	15.00	Unit (0.7)	Unit (0.7)	33.33%			
4									
5									
6									
7									

Figuur 12: De component lijst uit de eind methode waarin per lipiden de retentietijd, window en fragmenten zijn weergegeven.

De overige ratten monsters zijn met deze lijst gemeten waarvan in Figuur 13 het totaal ionen chromatogram (TIC) te zien is met de plekken van de verschillende groepen oxylipiden aangegeven. De ratten monsters bestonden zoals eerder vermeld uit twee groepen, in Figuur 30 op Bijlagen 7 zijn de (TIC) chromatogrammen van zowel de hippocampus (boven) en de cortex (onder) terug te zien. Kijkend naar het chromatogrammen van Figuur 13 lijken er geen 100 pieken aanwezig te zijn, dit komt door de vele overlappings welke plaatsvinden omdat het om een TIC chromatogram gaat. Vanaf bijlagen 9 zijn alle lossen pieken uit een meting van de hippocampus per tien in een chromatogram terug te zien. De reden dat de groepen uit Figuur 13 niet goed overeen komen met die uit Figuur 11 heeft te maken met dat de retentietijden van verschillende groepen zijn verschoven maar ook omdat er maar 47 pieken daadwerkelijk werden gevonden die gekoppeld konden worden aan een naam van een oxylipiden. Dit in vergelijking met de literatuur waarbij 107 oxylipiden werden gevonden. Gelijktijdig met het meten van alle ratten monsters werd er een kalibratielijn van de zeven standaarden gemeten. Deze kalibratielijn liep van een concentratie van 0.1ppb tot en met 20ppb met een concentratie interne standaard van 10ppb. Deze lijn werd gebruikt om een globaal beeld te krijgen van wat de concentratie's zijn van de verschillende pieken, de berekende concentraties werden verder niet gebruikt omdat de meeste oxylipiden niet gekoppeld konden worden aan de gebruikte interne standaarden en de oxylipiden uit de lijst niet geoptimaliseerd waren.



Figuur 13: Het TIC van een van de ratten hippocampus monsters waarbij de meest voorkomende groepen oxylipiden zijn aangegeven.

Het koppelen van de pieken aan de naam van een oxylipide uit de lijst werd alleen gedaan als het echt zeker was dat dit klopten (juiste precursor en fragmenten op ongeveer de verwachte retentietijd). Maar helemaal zeker is het nooit, zo is te zien dat de groep thromboxane (TXBs) van ong. 9 min uit de literatuur naar 15 min lijkt te zijn geschoven terwijl de meeste groepen er eerder van af kwamen vergeleken met de literatuur. Ter confirmatie zullen uiteindelijk van alle oxylipiden standaarden gekocht moeten worden.

Optimalisatie extractie

In het algemeen is het doel van een extractie om de gewenste component te scheiden en te extraheren van het matrix waar het in zit. In deze methode is het van belang dat er zoveel mogelijk lipiden (en dus ook oxylipiden) uit de cellen/plasma worden gehaald met zo min mogelijk overige componenten. De twee punten waarnaar gekeken moet worden bij deze stap is hoe hoog zijn de recovery's voor de lipiden en hoe veel vervuiling blijft erachter.

Er werden twee methoden getest, een SPE en een LLE methoden. De SPE met een C18 cartridge werd gebruikt voor het testen van plasma/serums monsters, de LLE methode werd gebruikt voor het testen van tissue monsters. Als test matrix werden serum monsters van ratten gebruikt en als tissue werd zebravis embryo's gebruikt.

De gebruikte LLE methode is een veel gebruikte methode op het VU lab voor de extracties van dierlijk weefsels. De SPE methode is een methode die Dhr. Kooij in zijn eigen onderzoek gebruikten. Tijdens de LLE methode werd een monster samen met keramische beads geschud, deze beads zijn kleine balletjes die aan het monster werden toegevoegd om tijdens het schudden het weefsel/cellen kapot te maken en op die manier gelijk te homogeniseren.

De verwachtingen waren dat de SPE methode betere recovery's zou geven dan de LLE methode vanwege de resultaten in een onderzoek van 'Annika I. Ostermann et al'¹³. In dit onderzoek werden verschillende voorbereidingstechnieken getest voor het extraheren van groepen lipiden. Er werden zowel een LLE methode als verschillende SPE methodes getest. Hieruit bleek dat SPE met C18 cartridges de beste resultaten gaven en LLE de slechtste voor plasma monsters.

In het huidige onderzoek werd de LLE extractie test uitgevoerd door 20 zebravis embryo's samen met beads in een sample buis te stoppen waaraan 150 μ L MiliQ werd toegevoegd. Een sample buis werd in het Precellys apparaat gezet waarin deze twee keer werden geschud voor 10 seconden op 6500 rpm. Aan de verkregen oplossing werd 150 μ L methanol/chloroform (1:1) toegevoegd en gespiked met 50 μ L van de verschillende standaarden en 50 μ L van de IS mix. De buis werd vervolgens opnieuw geschud voor twee keer 10 seconden op 6500 rpm, op deze manier zouden alle polaire componenten in de miliQ/methanol laag gaan zitten en alle vetten en dus ook oxylipiden in de chloroform laag. De buis werd in een centrifuge gezet voor 5 min op 5000 rpm waarna de chloroform laag werd gescheiden van de methanol/miliQ laag. De chloroform laag werd drooggedampt om vervolgens opnieuw op te lossen in 100 μ L MeOH/miliQ (1:1). Gelijktijdig aan het voorbereiden van de monsters werd een referentieoplossing gemaakt van 50 μ L standaarden mix met 50 μ L IS mix om tot een oplossing te komen met dezelfde concentraties als die werd verwacht na de LLE.

Voor het berekenen van de gemiddelde recovery's werd de test in triplo uitgevoerd, naast de triplo werd er ook een ongespiked monster mee genomen.

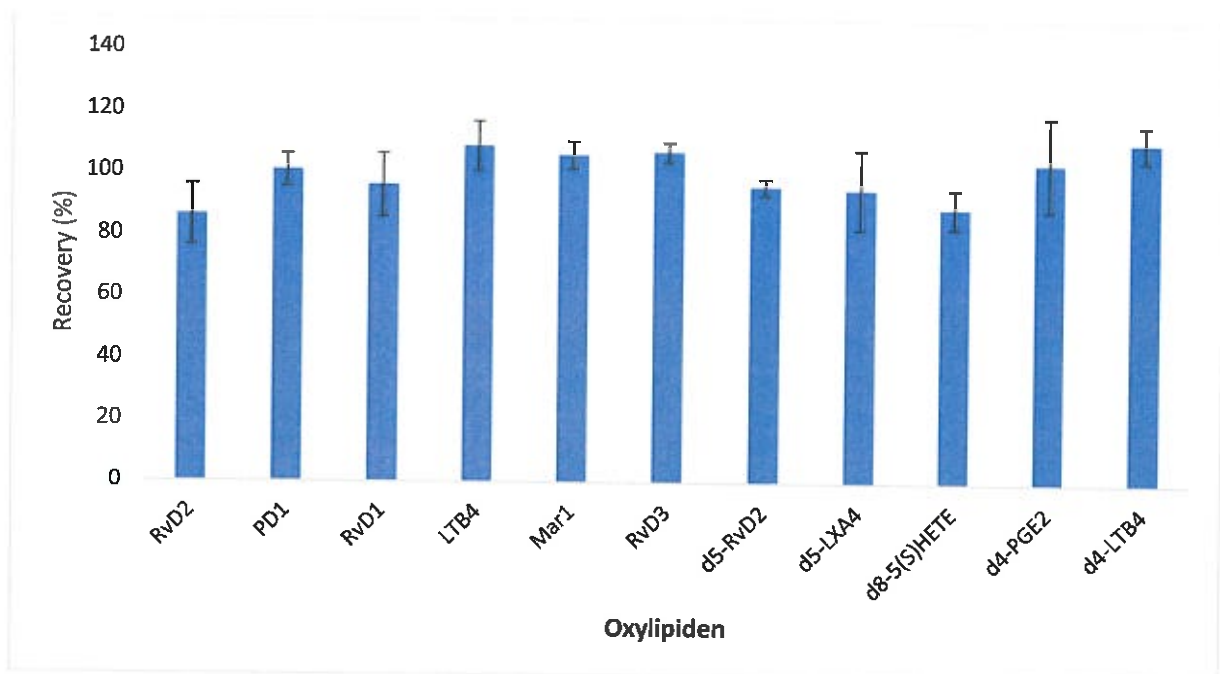
De eerste LLE test gebaseerd op een MeOH/H₂O/chloroform extractie lieten lage recovery's zien (<20%). Een van de verklaringen die werd bedacht was dat de methode was bedoeld voor lipiden in het algemeen. De meeste lipiden hebben lange apolaire staarten waardoor deze goed in de chloroform laag zullen gaan zitten.

Oxylipiden daarin tegen zijn de geoxideerde producten van vetzuren, hierdoor zitten er meerdere hydroxy groepen aan de apolaire staarten. De hypothese die werd gesteld was dat de oxylipiden tijdens de extractie liever in de methanol/miliQ laag zouden gaan zitten in plaats van de chloroform laag.

Om dit te testen werden twee testen uitgevoerd, de eerste test was hetzelfde als de oorspronkelijke methode alleen werd er in plaats van de chloroform laag de methanol/miliQ laag apart genomen om te meten. In de tweede test werd de eerste stap waarbij er eerst miliQ aan het monster werd toegevoegd weggelaten, zo werden de oxylipiden gedwongen om in de methanol/chloroform laag te zitten.

De resultaten uit de eerste test waren beter dan met de oorspronkelijke methode maar nog steeds laag en zeer wisselvallig. Naast de methanol/miliQ laag die apart werd genomen om te meten werd er voor de zekerheid ook gelijk een deel van de chloroform laag meegenomen. Hoewel voor de meeste oxylipiden de hoogste recoveries in de methanol/miliQ laag te vinden waren, bleken er voor drie oxylipiden (PD1, Mar1 en d8-5(S)HETE) vrijwel niet terug te vinden waren in deze laag en juist nog wel in de chloroform laag. Wanneer alle oxylipiden gemeten moeten worden zullen de oxylipiden dus verdeeld worden over beide lagen wat niet wenselijk is.

De tweede test waarbij er geen miliQ aan het monster werd toegevoegd gaf hoge (<85%) en consistente (>10%) recovery's welke in Figuur 14 terug te zien zijn.



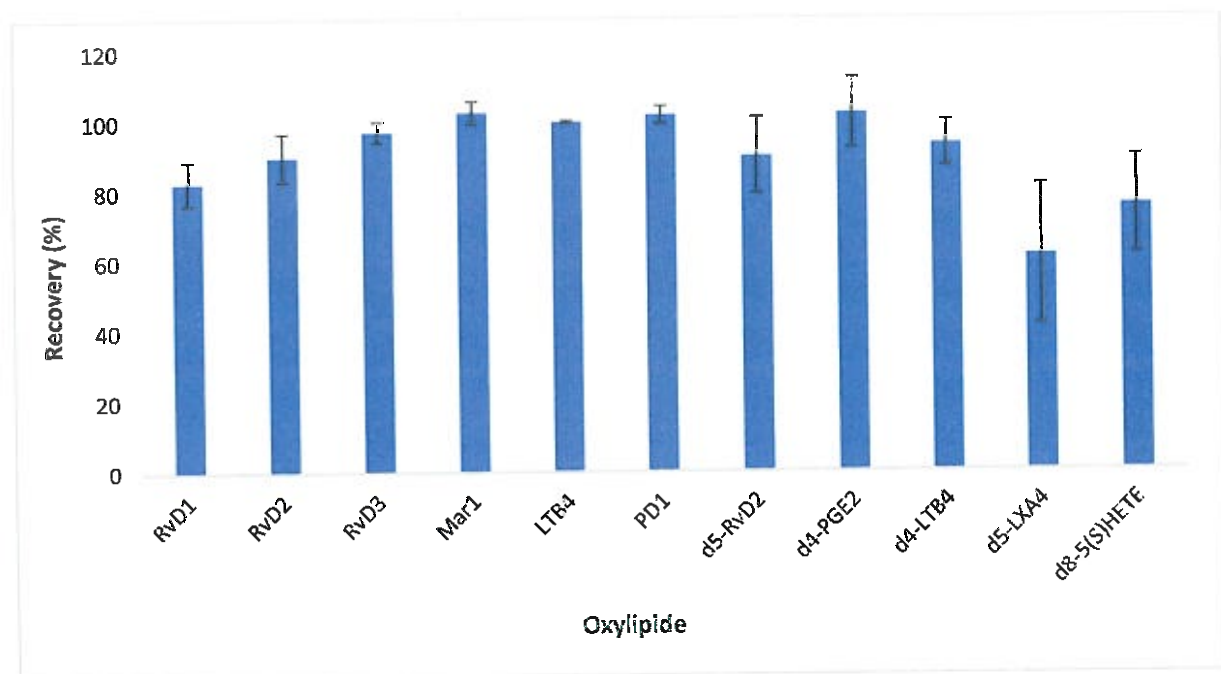
Figuur 14: De gemiddelde recovery's met standaarddeviatie van de LLE methode per standaard, berekend uit drie test monsters.

Ondanks het verwijderen van de polaire laag waardoor er meer vervuiling mee kon komen in het monster werden er geen verhogingen in de baseline waargenomen.

Voor plasma/serum werd een SPE methode gebruikt met C18 cartridges. Aan het ratten plasma werd ijskoud MeOH toegevoegd, de oplossing werd gecentrifugeerd voor 10 min waarna het supernatant werd verwijderd.

Een SPE cartridge werd gewassen met 6 mL MeOH en 6 mL water. Aan het supernatant werd 9 mL water (pH 3.5) toegevoegd waarnaar het op de cartridge werd aangebracht. De cartridge werd gewassen met 6 mL hexaan en geëluëerd met 6 mL methylformaat, de oplossing werd in ijs gezet voor afkoeling. De verkregen oplossing werd in een 37°C waterbad gedroogd door middel van een stikstof flow waarbij elke 10 min de randen werden schoongespoeld met een klein beetje MeOH. Zodra de oplossing was drooggedampt werd er 50 µL MeOH/miliQ (1:1) toegevoegd en overgebracht in een vial om vervolgens te meten.

Net zoals voor de LLE test werd er voor de SPE test een triplo uitgevoerd met in Figuur 15 de berekende recovery's plus standaarddeviatie.



Figuur 15: De gemiddelde recovery's met standaarddeviatie van de SPE methode per standaard, berekend uit drie test monsters.

Zoals al werd verwacht bleek de SPE methode voor de analyse van oxylipiden in plasma/serum hoge (> 80%) en consistente (>10%) recovery's te geven.

In conclusie, de LLE methode gaf zoals verwacht minder hoge recovery's, maar na een kleine aanpassing in de methode werden alsnog hoge recovery's verkregen. Naast de goede recovery's voor zowel de SPE als LLE werd er geen verhogingen in de MS baseline of andere vormen van vervuiling geconstateerd. Dit is niet helemaal tegen de verwachtingen omdat er in MRM-mode gemeten wordt en er dus alleen specifieke massa's doorgelaten worden waardoor minder snel vervuiling op zal treden.

Er besloten dat de methoden niet verder getest hoeven te worden.

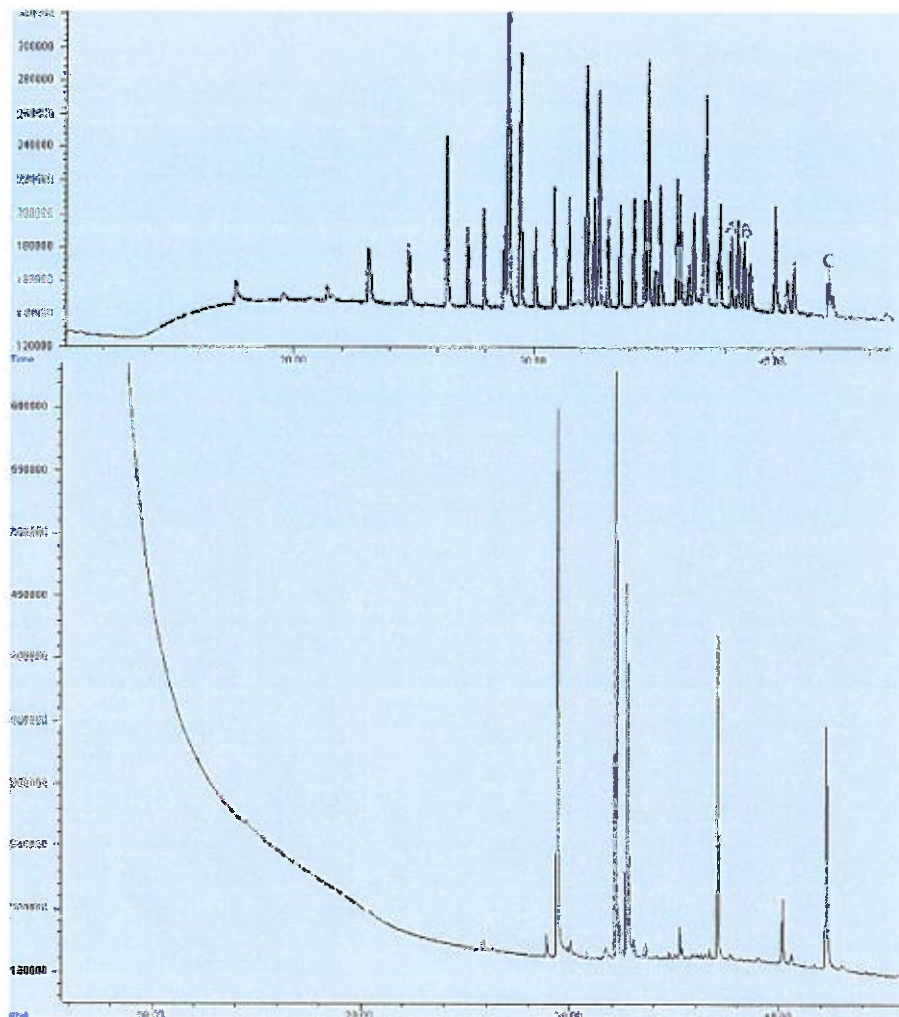
Vetzuren

Oxylipiden zijn zoals eerder vermeld metabolieten van de vetzuren AA, EPA en DHA, maar deze drie vetzuren werden niet in de eindmethode gemeten omdat het geen oxylipiden zijn en beter zijn te bepalen met GC-MS. Omdat het belangrijk is voor het onderzoek om ook de vetzuurgehalten van AA, EPA en DHA te weten werden de drie vetzuren ook geanalyseerd.

Er werden al vetzuren gemeten op het lab middels een GC-MS methode, onder de vetzuren die gemeten werden bevonden zich ook de drie AA, EPA en DHA. Tijdens de monstervoorbewerking werd een gedeelte van het monster apart gehouden voor de analyse van de drie vetzuren.

De monster voorbewerking voor deze methode is hetzelfde als die voor de oxylipiden. Er was alleen een extra derivatisatie stap nodig om de vetzuren vluchtig genoeg te maken voor de GC-MS.

In Figuur 16 is boven het chromatogram te zien van de analyse van een vetzuren kalibratielijn waarbij AA, EPA en DHA zijn weergegeven, onder is een chromatogram van een van de rattenmonsters terug te zien.



Figuur 16: De Chromatogrammen van een vetzuur analyse met GC-MS waarbij de vetzuren AA, EPA en DHA als A, B en C zijn weergegeven, de bovenste chromatogram is van een kalibratielijn en de onderste van een ratten monster.

Samengevat is er een LC-MS methode ontwikkeld en geoptimaliseerd om 47 oxylipiden (en 50 onbekende lipiden) in dierlijk weefsel en plasma/serum te analyseren. Het doel om minimaal een detectielimit van 0.1ppb te behalen is gehaald waarbij in theorie nog lagere concentraties gemeten kunnen worden. Kijkend naar de literatuur zijn er verschillende concentraties voor kalibratielijnen gebruikt voor het meten van oxylipiden die uit één lopen van 1ppb als laagste punt⁵ tot 0.01ppb als laagste punt¹⁵. Deze ontwikkelde methode is dus vergelijkbaar met de meest gevoelige methode in de literatuur.

Voor zowel weefsel als plasma/serum zijn er respectievelijk een LLE als een SPE methode getest. Uit deze testen kwam een recovery van <85% voor LLE en <80% voor SPE.

Als extra werd er gekeken naar de analyse van vetzuren. Omdat vetzuren al vaker op het lab geanalyseerd werden waarbij ook de drie vetzuren AA, EPA en DHA toe behoorden werd de hiervoor gebruikte methode genomen.

Conclusie

Voor het kunnen analyseren van oxylipiden in dierlijk weefsel is een LC-MS methode geoptimaliseerd, de geoptimaliseerde methode levert op lage concentraties 700% tot 3700% meer intensiteit voor de verschillende gebruikte standaarden. De methode is in staat om in 21 min 97 lipiden te meten waarvan 47 oxylipiden en 50 onbekende lipiden, dat op concentraties van 0.08ppb en eventueel lager. Voor de extractie zijn een SPE en een LLE methode getest waaruit bleek dat deze een recovery van zowel <80% als <85% hadden.

Aanbevelingen

Voor vervolgonderzoek aan deze methode zijn er nog een aantal punten waaraan gewerkt moet worden.

In dit onderzoek is er gebruik gemaakt van ratten en muismonsters om testen mee te doen, de oxylipiden componenten lijst is opgesteld aan de hand van deze monsters. Omdat het doel van de methode ook is om menselijke monster te analyseren zou het kunnen zijn dat er andere oxylipiden terug te vinden zijn. De componenten lijst moet daarom mogelijk worden aangevuld.

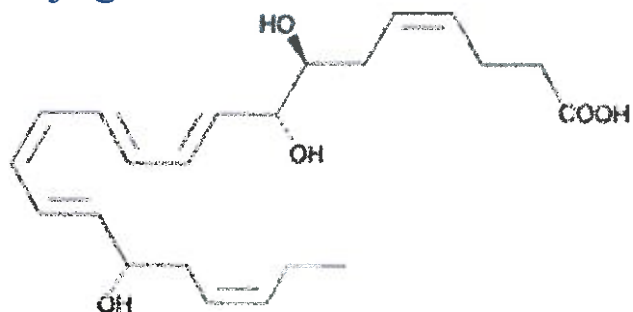
Het grootste deel van de component lijst bestaat uit oxylipiden die in de literatuur zijn gevonden. Om een component kwantitatief te meten zouden de gevonden oxylipiden gekocht moet worden en individueel geoptimaliseerd moeten worden. Op deze manier zal per component de ideale fragmentatie met bijbehorende collision energy bepaald kunnen worden.

Het tweede punt is dat er meer interne standaarden nodig zijn dan de vijf die nu gebruikt zijn. Om voor alle oxylipiden die nu gemeten worden een interne standaard te hebben die hetzelfde reageert zijn er in totaal 15 nodig welke hieronder in Tabel 4 op bijlagen 2 zijn aangegeven.^{5, 3} Nadat de vorige stappen zijn uitgevoerd zou de methode gevalideerd moeten worden voordat deze gebruikt kan gaan worden.

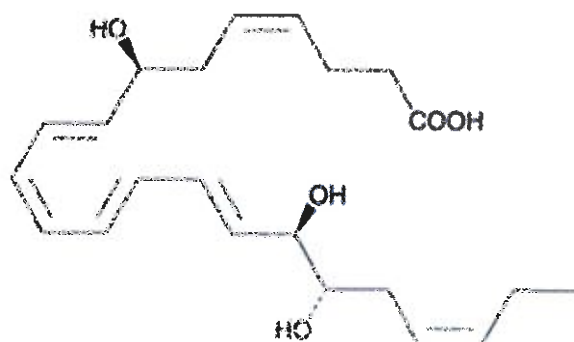
Literatuurlijst

1. Köfeler, H. C., Fauland, A., Rechberger, G. N. & Trötz Müller, M. Mass Spectrometry Based Lipidomics: An Overview of Technological Platforms. *Metabolites* **2**, 19–38 (2012).
2. Han, X. *Lipidomics: Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids*. (John Wiley & Sons, Inc, 2016). doi:10.1002/9781119085263
3. Strassburg, K. *et al.* Targeted Lipidomics of Oxylipins (Oxygenated Fatty Acids). *Waters Application Note* 1–11 (2015). doi:10.13140/RG.2.1.3943.9207
4. Vlasakov, I. *et al.* BRIGHAM AND WOMEN'S Lipid Mediator Metabololipidomics LC-MS-MS Spectra Book 2016 Correspondence should be addressed to: 1–122 (2016).
5. Strassburg, K. *et al.* Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: Application in cardiac surgery. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 1413–1426 (2012).
6. Colas, R. A., Shinohara, M., Dalli, J., Chiang, N. & Serhan, C. N. Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue. *AJP Cell Physiol.* **307**, C39–C54 (2014).
7. Serhan Lab. Available at: <http://research.bwhanesthesia.org/research-groups/cetri/serhan-lab>. (Accessed: 11th June 2018)
8. Verstoorde rem op ontstekingen: drijvende factor achter ziekte progressie in MS. Available at: <https://www.vumc.nl/afdelingen/mscentrum/Nieuws2/20662071/>. (Accessed: 19th January 2018)
9. Yang, K. & Han, X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 954–969 (2016).
10. Armstrong, D. *Lipodomics. Methods in Molecular Biology* **579**, (2009).
11. Willenberg, I., Ostermann, A. I. & Schebb, N. H. Targeted metabolomics of the arachidonic acid cascade: current state and challenges of LC-MS analysis of oxylipins. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2675–2683 (2015).
12. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. Favorable Effects of Weak Acids on Negative-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **76**, 839–847 (2009).
13. Ostermann, A. I., Willenberg, I. & Schebb, N. H. Comparison of sample preparation methods for the quantitative analysis of eicosanoids and other oxylipins in plasma by means of LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 1403–1414 (2015).
14. Bojic, L. A. *et al.* Quantitative profiling of oxylipins in plasma and atherosclerotic plaques of hypercholesterolemic rabbits. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 97–105 (2016).
15. Yang, J., Schmelzer, K., Georgi, K. & Hammock, B. D. C. P. Quantitative profiling method for oxylipin metabolome by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **81**, 8085–8093 (2009).
16. RvD1. Available at: <https://www.caymanchem.com/product/10012554>. (Accessed: 18th June 2018)
17. RvD2. Available at: <https://www.caymanchem.com/product/10007279>. (Accessed: 18th June 2018)
18. RvD3. Available at: <https://www.caymanchem.com/product/13834>. (Accessed: 18th June 2018)
19. PD1. Available at: <https://www.caymanchem.com/product/10008128>. (Accessed: 18th June 2018)
20. Maresin 1. Available at: <https://www.caymanchem.com/product/10878>. (Accessed: 18th June 2018)
21. LTB4. Available at: <https://www.caymanchem.com/product/20110>. (Accessed: 18th June 2018)
22. LXB4. Available at: <https://www.caymanchem.com/product/90420>. (Accessed: 18th June 2018)

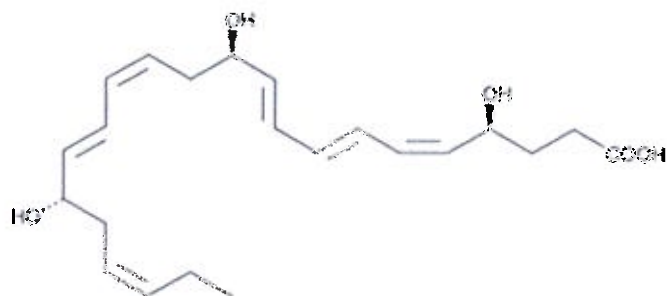
Bijlagen



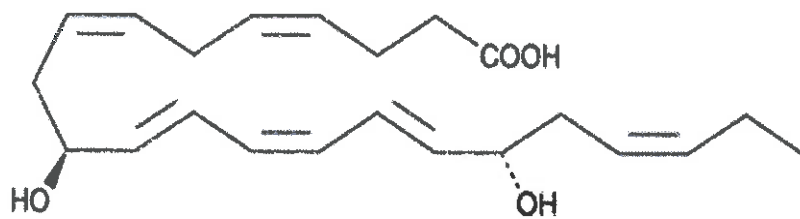
Figuur 17: Structuurformule van Resolvin D1¹⁶



Figuur 18: Structuurformule van Resolvin D2¹⁷

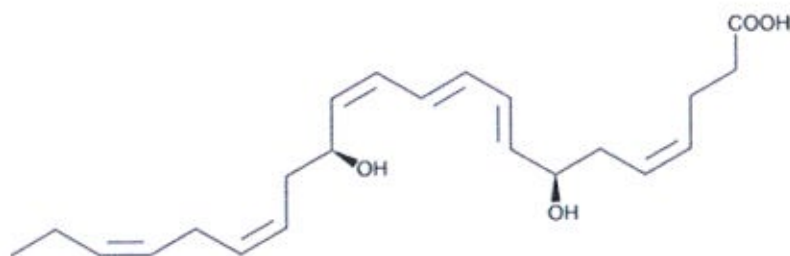


Figuur 19: Structuurformule van Resolvin D3¹⁸

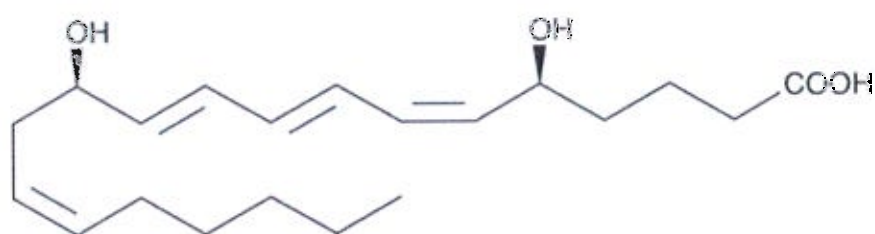


Figuur 20: Structuurformule van Protectin D1¹⁹

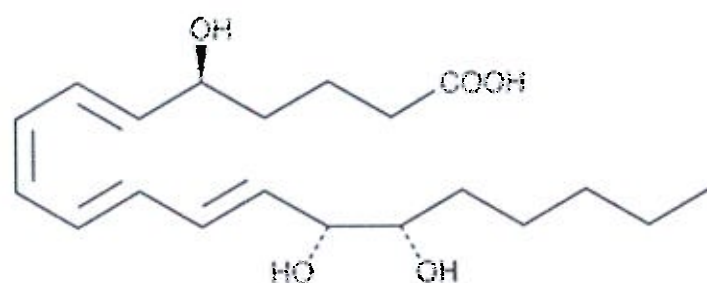
Bijlagen 2



Figuur 21: Structuurformule van Maresins 1²⁰



Figuur 22: Structuurformule van Leukotriene B4²¹

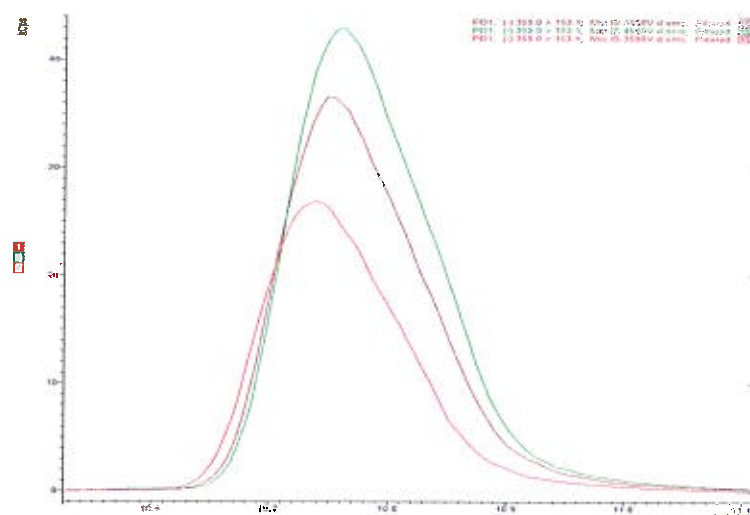


Figuur 23: Structuurformule van Lipoxin B4²²

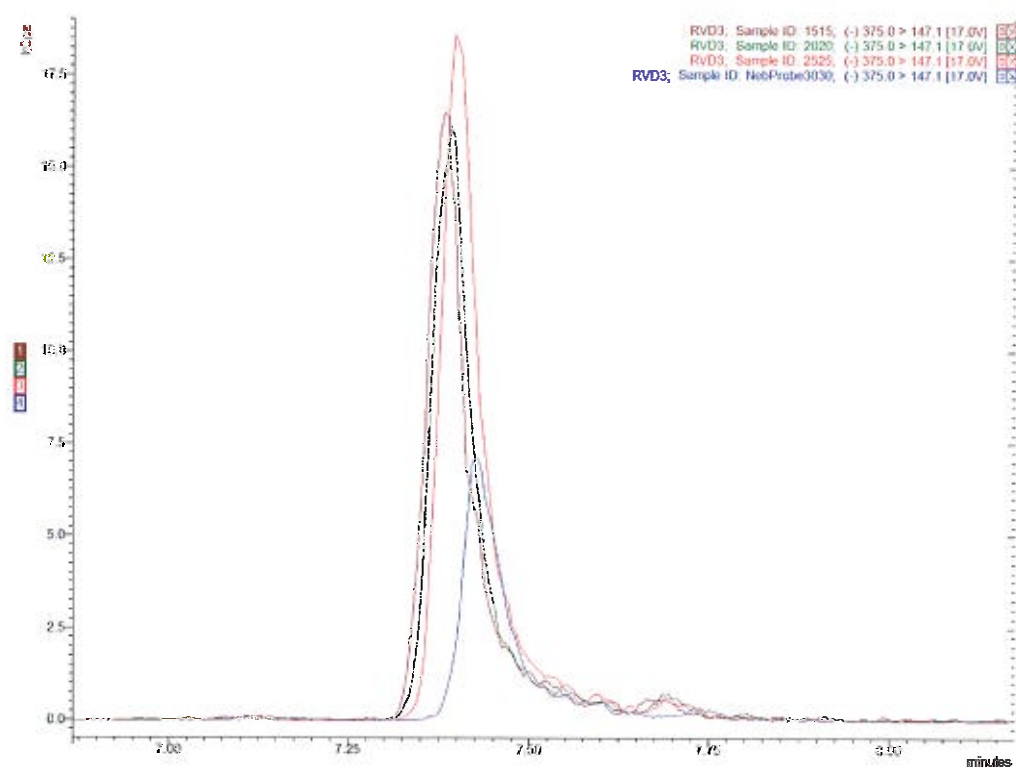
Tabel 4: alle 15 interne standaarden die nodig zouden zijn om alle oxylipiden kwantitatief te kunnen meten

(d4) 6-keto PGF1 α	(d5) LTE4	(d4) 15-deoxy- Δ 12,14-PGJ2
(d4) TXB2	(d4) LTB4	(d6) 20-HETE
(d4) PGF2 α	(d4)($\pm$)12,13-DiHOME	(d4) 9(S)-HODE
(d4) PGE2	(d4)-($\pm$)9,10-DiHOME	(d8) 12(S)-HETE
(d4) PGD2	(d11) 14,15-DiHETrE	(d8) 5(S)-HETE

Bijlagen 3

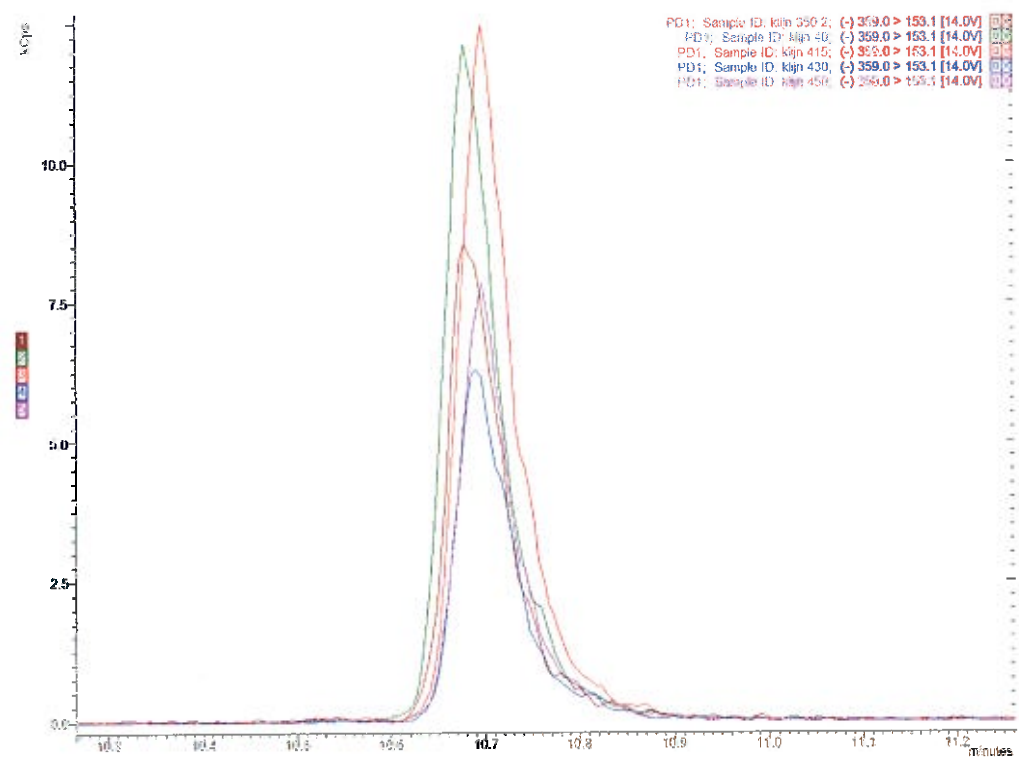


Figuur 24: Pieken van een van de lipiden standaarden bij verschillende spray voltages, lichtrood is - 3500 (V), bruin is -4000(V) en groen hoort bij -4500(V).

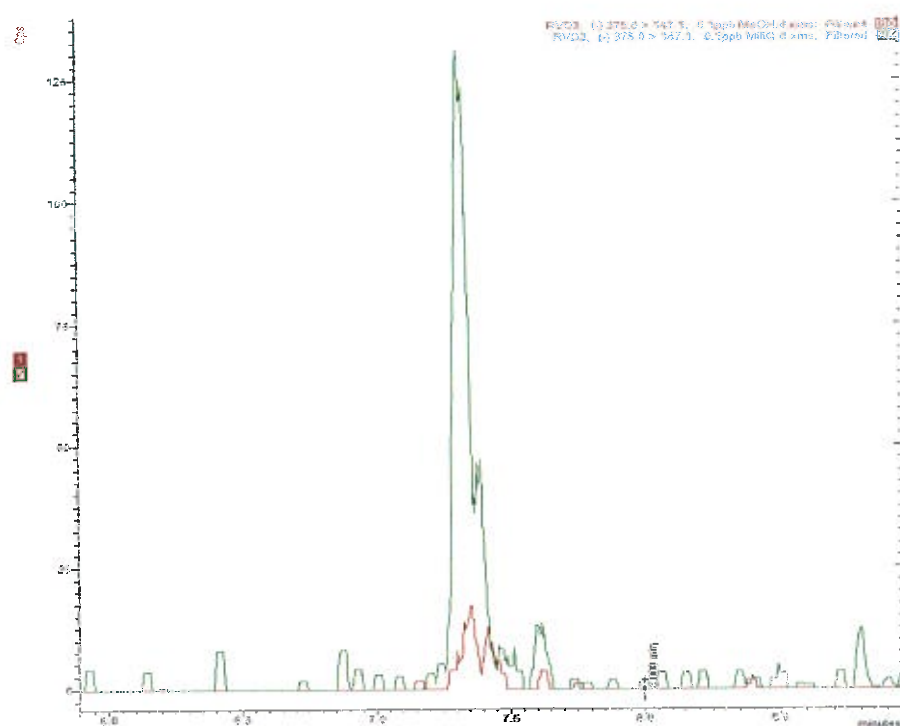


Figuur 25: De pieken van de RvD3 standaard bij verschillende Probe- en Nebulizer. Met blauw voor 30 psi, groen voor 20 psi, bruin voor 15 psi en lichtrood voor 25 psi.

Bijlagen 4

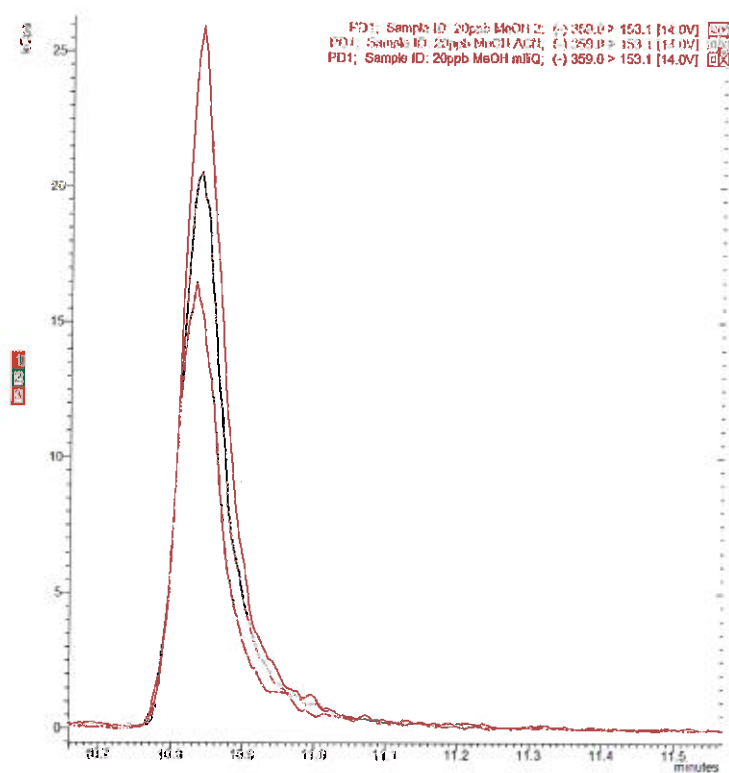


Figuur 26: De pieken van de PD1 standaard bij verschillende Probe temperaturen. Van onder naar boven: 430 °C, 450 °C, 350 °C, 400°C en 415°C.



Figuur 27: De pieken van de RvD3 standaard gemeten met de begin methode (rood) en de eind methode (groen) bij een concentratie van 0.1ppb.

Bijlagen 5



Figuur 28: De pieken van een de PD1 standaard waarbij de bruine piek bij een methanol oplossing hoort, groen bij een methanol/acetonitril oplossing en lichtrood bij methanol/miliQ.

Bijlagen 6 Lijst van opgenomen oxylipiden in de analysemethoden.

Weergegeven zijn de oxylipiden naam, precursor ion, fragment ionen, vetzuur waarvan de oxylipiden afkomt, groep van oxylipiden,

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		Compound name	Precursor	Fragment	Group	Class	Cone V	Collision V	Dwell	pg/ml Hserum
2	1	Tetranor-PGE ₁ M	329,2	311,2/293,2	AA	Prostanoid				
3	2	Tetranor-PGE ₁ M	327,2	309,2/291,2	AA	Prostanoid				
4	3	20-hydroxy PGE ₂	367,2	349,2/349,2	AA	Prostanoid				
5	4	6-keto PGF _{1α}	367,2	149,1	AA	Prostanoid	60	24	0,6	
6	5	6-keto PGF _{1α}	369,2	149,1	AA	Prostanoid	70	25		
7	6	13-epi-11b-PGF _{2α}	329,2	149,1	AA	Prostanoid				
8	7	20-carboxy LTB ₄	365,2	347,2/329,2	AA	Leukotriene	80	25		
9	8	6-keto PGE ₁	367,2	149,1	AA	Prostanoid				
10	9	20-hydroxy LTB ₄	361,2	149,1	AA	Leukotriene	60	25		4,6 ± 3
11	10	TXB ₂	367,2	169,1	BPA	Thromboxane				
12	11	PGF _{2α}	331,2	169,2	BPA	Prostanoid				
13	12	TXB ₂	371,2	171,1	DGLA	Thromboxane				
14	13	PGE ₂	369,2	269,2	BPA	Prostanoid	60	15/22		
15	14	8-iso-PGF _{2α}	333,2	169,2	AA	Isoprostane				
16	15	TXB ₂	369,2	169,1/169,2	AA	Thromboxane	60	22/25	0,4	1061 ± 1035,8
17	16	PGD ₂	345,2	269,2	BPA	Prostanoid	60	22		
18	17	11β-PGF _{2α}	369,2	169,2	AA	Prostanoid				
19	18	(+/-) 5-IPF _{2α} -VI	369,2	115,1	AA	Isoprostane				
20	19	5,12,19-TriHOME	329,2	311,2	LA	Triol	60	15/20/32	0,4	
21	20	9,10,19-TriHOME	329,2	371,1	LA	Triol	60	15/32	0,4	
22	21	PGF _{1α}	335,2	199,2/309,2	AA	Prostanoid	60	19/26/26	0,4	75,9 ± 23,2
23	22	PGF _{1α}	335,2	299,2	DGLA	Prostanoid				
24	23	PGE ₂	331,2	271,2/175,1/169,3	AA	Prostanoid	60	12/24/25	0,4	72,5 ± 10,9
25	24	11β-PGE ₂	331,2	271,2	AA	Prostanoid				
26	25	PGH ₂	345,2	205,1	AA	Prostanoid				
27	26	15-keto PGF _{2α}	351,2	215,1/115,2	AA	Prostanoid				
28	27	5(S),14(R)-Lipoxin B ₄	351,2	211,2	AA	Lipoxin				
29	28	PGE ₁	369,2	279,2/317,2	DGLA	Prostanoid	60	20		
30	29	PGD ₁	331,2	271,2	AA	Prostanoid	60	16/24		271 ± 57,7
31	30	PGD ₁	333,2	275,2/317,2	DGLA	Prostanoid	60	20		
32	31	11β-13,14-dihydro-15-keto-PG	359,2	115,2	AA	Prostanoid				
33	32	15-keto PGF _{1α}	339,2	221,1/115,2	DGLA	Prostanoid				
34	33	13,14-dihydro-PGF _{2α}	333,2	275,2	AA	Prostanoid				
35	34	13,14-dihydro-15-keto PGE ₂	351,2	175,2/207,2	AA	Prostanoid				
36	35	13,14-dihydro-15-keto PGF _{2α}	333,2	169,1/291,2	AA	Prostanoid				
37	36	5(S),6(R)-Lipoxin A ₄	331,2	115,1	AA	Lipoxin	60	21		
38	37	5(S),6(S)-Lipoxin A ₄	333,2	115,1	AA	Lipoxin	60	21		
39	38	13,14-dihydro-15-keto PGF _{1α}	335,2	169,2	AA	Prostanoid				
40	39	13,14-dihydro-15-keto PGD ₂	331,2	175,2/207,2	AA	Prostanoid				
41	40	12,15-dihomo PGF _{2α}	381,2	337,2/221	AOA	Prostanoid				
42	41	14,15-LTE ₄	439,2	399,2	AA	Leukotriene				

Vervolg bijlagen 6

42	LTD4	435,2	177,1	AA	Leukotriene				
43	Resolvin D1	375,2	141	DHA	Resolving	15			30,9 ± 7
44	Resolvin E1	349,2	135	EPA	Resolving	55	17/22		15,5 ± 2,3
45	13,14-dihydro-15-keto PGD1	353,2	209,1	AA	Prostanoid				
46	PGI2	353,2	271,2	AA	Prostanoid				
47	Δ12-PGJ2	353,2	233,1	AA	Prostanoid				
48	PGJ2	353,2	5,1/159,2/253,3/27	AA	Prostanoid	50	23/23		
49	LTB5	353,2	193,1	EPA	Leukotriene	55	22		
50	11-trans LTD4	435,2	177,1	AA	Leukotriene				
51	LTE4	435,2	333,1	AA	Leukotriene				
52	5(S),15(S)-DIHETE	353,2	255,2/127,2	AA	Diol	55	22		
53	12,13-DIHOME	311,2	293/135,1	ALA	Diol	30	30		
54	bicyclo-PGE2	353,2	115,2	AA	Prostanoid				
55	12-trans LTE4	435,2	333,2	AA	Leukotriene				
56	10(S),17(S)-DIHOME	353,2	133,2	DHA	Protectin				
57	Neuroprotectin D1	353,2	205	DHA	Protectin				
58	17,18-DIETE	353,2	147,2	EPA	Diol	55	24		
59	5(S),15(S)-DIHETE	353,2	115,2/175,2/201,2	AA	Diol	50	21		789,4 ± 133,4
60	5-trans-LTE4	353,2	193,1	AA	Leukotriene	55	23		744 ± 119,9
61	14,15-DIETE	353,2	207,1	EPA	Diol	55	23		
62	15-deoxy-Δ12,14-PGD2	353,2	271,2	AA	Prostanoid				
63	Hepoxilin A3	353,2	273,2/127,2	AA	Hepoxilin				
64	LTB4	335,2	195,1	AA	Leukotriene	55	23/17		
65	12,13-DIHOME	313,2	133,2	LA	Diol	50	23/32/30	0,4	
66	9,10-DIHOME	313,2	201,1	LA	Diol	50	23/30/29	0,4	
67	18,20-DIHOME	351,2	173,3	DHA	Diol				
68	14,15-DIETE	357,2	207,2	AA	Diol	60	17/24/23	0,5	
69	12α-HHTE	279,2	179,2/153,2	AA	Alcohol				
70	12,13-DIETE	357,2	157,2	AA	Diol	50	20/23/25	0,5	
71	5,8-DIETE	357,2	145,1	AA	Diol	50	17/28	0,4	
72	9-HOTE	293,2	171,1	ALA	Alcohol	55	22		
73	17(18)-EpETE	317,2	189,2/213,2	EPA	Epoxide	55	20		
74	20-HETE	319,2	189,2/273,1	AA	Alcohol	50	15/23	0,4	
75	15(S)-HEPE	317,2	219,2	EPA	Alcohol	50	20		
76	12(13)-HpETE	317,1	155	AA	Hydroperoxide				
77	3,8-DIETE	357,2	117	AA	Diol	50	20/30	0,4	
78	5(S),8(S)-DIETE	353,2	115,1/145,1/183,2	AA	Diol	50	21		
79	12(S)-HEPE	317,2	179,1	EPA	Alcohol	55	20		
80	13-HODE	293,2	133,2	LA	Alcohol	55	17/25/13	0,4	
81	5(S)-HEPE	317,2	113,1	EPA	Alcohol	50	20		
82	9-HODE	293,2	171,1	LA	Alcohol	55	17/25/13	0,4	
83	15-HETE	319,2	219,2/301,4/175,2	AA	Alcohol	50	13/18/10/20	0,4	
84	15(17)-EpDPE	349,2	153,2/173,3	DHA	Epoxide	55	20		
85	15-HpODE	293,2	133/135,2/113	LA	Hydroperoxide	50	23/23/20	0,4	
86	15-HODE	293,2	113,1	LA	Ketone				
87	17-HODE	349,2	253,3/243,1	DHA	Alcohol				
88	9-HpODE	293,1	133	LA	Hydroperoxide	50	22/28	0,35	
89	15-HpETE	317,2	113	AA	Hydroperoxide		24		
90	15-HETE	317,2	113,2/273,2	AA	Ketone				
91	11-HETE	319,2	167,1	AA	Alcohol	50	14/23/15/20	0,35	
92	14(15)-EpETE	317,2	207,1/247,3	EPA	Epoxide	55	20		
93	9-HODE	293,2	133,2	LA	Ketone				
94	11-HETE	319,2	179,2	AA	Alcohol	50	14/20/10	0,35	
95	9-HETE	319,2	133,1/301,2	AA	Alcohol	50	17/10/20/1	0,35	
96	15(S)-HETE	321,2	221,2	DGLA	Alcohol	55	23		
97	9-HETE	319,2	157,1/123,1/151,2	AA	Alcohol	50	14/20/23	0,35	
98	5-HETE	319,2	113,1	AA	Alcohol	50	14/11/13/20	0,35	
99	19(20)-EpDPE	349,2	251,3/241,2	DHA	Epoxide	55	20		
100	12(13)-EpOME	295,2	133,2	LA	Epoxide	55	17/20/23	0,5	
101	14(15)-EpETE	319,2	219,2	AA	Epoxide	55	13/18/20	0,5	
102	5(S)-HpETE	317,1	205,1/273,2	AA	Hydroperoxide	55	20/22		
103	9(10)-EpOME	295,2	171,2	LA	Epoxide	55	17/22/23	0,5	
104	12-HETE	317,2	173,3	AA	Ketone				
105	5-HETE	317,2	203,2/273,2	AA	Ketone				
106	13(12)-EpETE	319,2	157,1/203,1	AA	Epoxide	50	13/20	0,5	
107	5(S)-EpETE 2	319,2	153,1/123	AA	Epoxide	55	13/20	0,5	
108	3(S)-EpETE	319,2	191,2	AA	Epoxide	50	10*20	0,5	

Vervolg bijlagen 6

109	17-epi-RvD1	373,2	231,1	DHA	Resolving			40,7 ± 13,9
110	RvD2	375,2	141,2	DHA	Resolving			42,6 ± 13,9
111	RvD3	375,2	147,1	DHA	Resolving			34,3 ± 9,4
112	17-epi-RvD3	373,2		DHA	Resolving			13,3 ± 4,6
113	RvD5	359,2	199,1	DHA	Resolving			86,8 ± 42,2
114	RvD6	359,2	159,1	DHA	Resolving			687 ± 156,2
115	PD1	359,2	153,1/206	DHA	Protecting	15		5,6 ± 3,4
116	17-epi-PD1	359,2		DHA	Protecting			7,7 ± 1,4
117	115-trans-PD1	359,2	133,2	DHA	Protecting			207,9 ± 61,6
118	10-epi/115-trans-PD1	359,2		DHA	Protecting			223,1 ± 33,1
119	10S,17S-diHDHA	359,2		DHA				227,4 ± 68,2
120	22-OH-PD1	375,2	153,1	DHA	Protecting			
121	22-COOH-PD1	359,2	133,1	DHA	Protecting			
122	MaR1	359,2	250,1	DHA	Maresins			21,2 ± 7,2
123	112-trans-MaR1	359,2		DHA	Maresins			241,8 ± 64,6
124	7-epi/112-trans-MaR1	359,2		DHA	Maresins			101,8 ± 42,7
125	7S,14S-diHDHA	359,2		DHA				131,1 ± 52,3
126	13R,14S-diHDHA	359,2		DHA				53,6 ± 22,3
127	4S,14S-diHDHA	359,2	221,1	DHA				1579,7 ± 282,8
128	14S,21-diHDHA	359,2		DHA				122,9 ± 2,7
129	4-HDHA	343,2	101,1	DHA				
130	7-HDHA	343,2	141,1	DHA				
131	14-HDHA	343,2	205,1	DHA				
132	17-HDHA	343,2	245,1/281	DHA		15		
133	RvE2	333,3	233,2	EPA	Resolving			2212,6 ± 1587,6
134	RvE3	333,3	201,1	EPA	Resolving			361,8 ± 187,3
135	LXA5	349,2	215,1	EPA	Lipoxin			
136	LXB5	349,2	221,2	EPA	Lipoxin			
137	3S,15S-diHEPE	333,2	233,2	EPA				1746,1 ± 627,6
138	18-HEPE	317,2	219,1/133	EPA	Alcohol	23		
139	LXA4	351,2	1/115,2/2	AA	Lipoxin	20		115,6 ± 45,5
140	13-epi-LXA4	349,2	233,1	AA	Lipoxin			59,2 ± 49,6
141	LXB4	351,2	221,1	AA	Lipoxin			48,7 ± 25,2
142	13-epi-LXB4	351,2		AA	Lipoxin			106,6 ± 67
143	12-epi/16-trans-LTB4	333,2	195,2	AA	Leukotriene			662,5 ± 193,3
144	3S,12S-diHETE	333,2		AA	Diol			2162,6 ± 515,5
145	3S,6R-diHETE	333,2		AA	Diol			150,5 ± 51,8
146	13,14-dihydro-LXA4	333,2	253,1	AA	Lipoxin			
147	3-oxo-LXB4	349,2	219,1	AA	Lipoxin			
148	18-oxo-RvE1	347,2	213,1	EPA	Resolving			
149	19-OH-RvE1	363,2	205,1	EPA	Resolving			
150	10-OH-RvE1	363,2	205,1	EPA	Resolving			

Vervolg bijlagen 6

150	20-OH-RvE1	365,2	291,1	EPA	Resolving				
151	20-COOH-RvE1	373,2	237,1	EPA	Resolving				
152	Dihydro-RvE1	351,2	225,1	EPA	Resolving				
153	8-oxo-RvD1	373,2	231,1	DHA	Resolving				
154	Dihydro-RvD1	377,2	279,1	DHA	Resolving				
155	7-oxo-RvD2	373,2	260,1	DHA	Resolving				
156	15-oxo-RvD2	373,2	260,1	DHA	Resolving				
157	22-OH-RvD2	391,2	249,1	DHA	Resolving				
158	Dihydro-RvD2	377,2	279,1	DHA	Resolving				
159	14-oxo-MaR1	357,2	211,1	DHA	Maresins				
160	7-oxo-MaR1	357,2	219,1	DHA	Maresins				
161	22-OH-MaR1	373,2	177,1	DHA	Maresins				
162	22-COOH-MaR1	389,2	177,1	DHA	Maresins				
163	Dihydro-MaR1	361,2	223,1	DHA	Maresins				
164	Dihydro-PD1	361,2	263,1	DHA	Protecting				
165	6-keto-PGF1 α	369,3	63,2/313,1	AA	Prostanoid				
166	11,12,13-TriHETE	353,2	167,1	AA		80	25		
167	PGG2	353,3	1/235,3/2	AA	Prostanoid	60	28		
168	THF diol	353,2	127,1/167,1	AA	Diol	80	32		
169	15,16-DiHODE	311,2	123,2/235,1	ALA	Diol	80	29		
170	9,10-DiHODE	311,2	201,2	ALA	Diol	65	27		
171	11,12-DiHETE	353,2	167,1	EPA	Diol	65	26		
172	8,9-DiHETE	353,2	127,1	EPA	Diol	65	26		
173	19,20-DiHDPE	361,2	273,2	DGLA		65	24		
174	16,17-DiHDPE	361,2	233,2	DHA		65	24		
175	LTB4	337,2	195,2	AA	Leukotiene	65	22		
176	13,14-DiHDPE	361,2	193,2	DHA		65	24		
177	10,11-DiHDPE	361,2	133,2	DHA		65	24		
178	EkODE	309,2	291,1	LA		65	20		
179	13-HOTE	293,2	193,1	ALA	Alcohol	70	24		
180	7,8-DiHDPE	361,2	113,1	DHA		65	24		
181	15-deoxy-PGJ2	313,2	271,2	AA	Prostanoid	65	20		
182	8-HEPE	317,2	133,2	EPA	Alcohol	60	18		
183	4,5-DiHDPE	361,2	229,3	DHA		65	24		
184	13(16)-EpODE	293,3	135,2/273,1	ALA		65	20		
185	9(10)-EpODE	293,3	171,2/273,1	ALA		65	20		
186	12(13)-EpODE	293,2	183,1	ALA		65	24		
187	11(12)-EpETE	317,2	167,2	EPA	Epoxide	65	20		
188	8(9)-EpETE	317,2	127,2	EPA	Epoxide	65	20		
189	13(14)-EpDPE	343,2	193,2	DHA	Epoxide	65	20		
190	10(11)-EpDPE	343,2	153,2	DHA	Epoxide	65	20		
191	9(8)-EpETE	319,3	167,2	AA	Epoxide	60	20		
192	10,11-DiHep	301,2	283,2			60	24/32	0,4	
193	19-HETE	319,2	273,2	AA	Alcohol	60	16/24	0,4	
194	3(5)-EpETE	317,2		EPA	Epoxide				

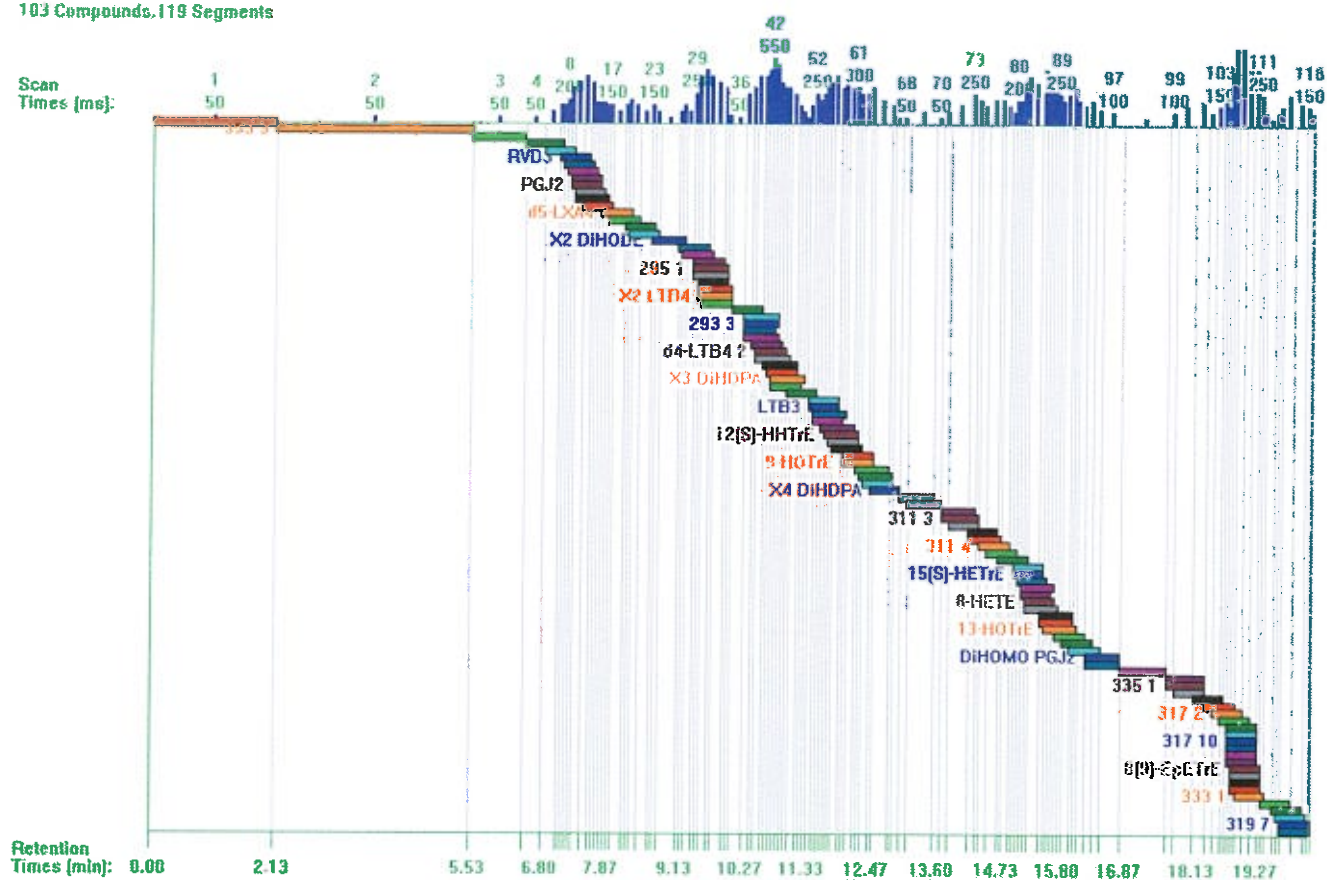
Vervolg bijlagen 6

195	11-HEPE	317,2		EPA	Alcohol				
196	16-HEPE	319,2		AA	Alcohol				
197	18-HEPE	319,2		AA	Alcohol				
198	8-HpEPE	333,2		AA	Hydroxyperoxide				
199	11-HpEPE	333,2		AA	Hydroxyperoxide				
200	15-HpEPE	333,2		AA	Hydroxyperoxide				
201	12-Oxo-LTB ₄	333,2		AA	Leukotriene				
202	13,14-dihydro LTB ₄	333,2		AA	Leukotriene				
203	8-HpETE	333,2		AA	Hydroxyperoxide				
204	9-HpETE	333,2		AA	Hydroxyperoxide				
205	11-HpETE	333,2		AA	Hydroxyperoxide				
206	4-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
207	7-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
208	8-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
209	11-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
210	13-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
211	14-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
212	16-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
213	20-HDoHE	343,2		DHA	Alcohol				
214	7(8)-EpDRE	343,2		DHA	Epoxide				
215	8-Iso-15-keto-PGE ₂	349,2		AA	Prostanoid				
216	19-hydroxy-PGE ₂	349,2		AA	Prostanoid				

117	15-Keto-PGE ₂	349,2		AA	Prostanoid				
118	8-Iso-15-keto-PGF _{2α}	351,2		AA	Prostanoid				
219	Δ ¹² -PGD ₂	351,2		AA	Prostanoid				
220	Δ ¹⁷ -PGE ₁	351,2		AA	Prostanoid				
221	15-keto-PGE ₁	351,2		AA	Prostanoid				
222	8-Iso-PGF _{3α}	351,2		EPA	Prostanoid				
223	8-Iso-PGE ₁	353,2		DGLA	Prostanoid				
224	8-Iso-13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}	353,2		AA	Prostanoid				
225	19-hydroxy-PGF _{2α}	359,2	193,1	AA	Prostanoid				
226	20-hydroxy-PGF _{2α}	369,2	193,1	AA	Prostanoid				
227	19-hydroxy-PGE ₁	369,2		DGLA	Prostanoid				
228	Resolvin D ₄	373,2		DHA	Resolving				
229	11-dehydro-TXB ₂	387,2	303,2	AA	Thromboxane				
230	12,12,13-THET-1	393,2	167,1					31	
231	10,11-DHN	329,2	311,4					33	
232	14,15-LTC ₄	624,3	272,1	AA				29	
233	11-trans LTC ₄	624,3	272,1	AA					
234	19-hydroxy-PGE ₂	367,2	189,2						
235	6,15-diketo-dihydro-PGF _{1α}	368,2	133,2	AA	Prostanoid				
236	8-Iso-PGF _{2α} VI	353,2	115,2	AA	Prostanoid				
237	ENC ₄	624,6	272,2	AA					
238	15-keto-PGE ₂	349,2	113,2	AA	Prostanoid				
239	EXD ₄	493,2	177,2	AA					
240	EXE ₄	436,2	333,2	AA					
241	DIHOMO-PGE ₂	379,2	299,2	AA	Prostanoid				
242	DIHOMO-PGD ₂	379,2	299,2	AA	Prostanoid				
243	DIHOMO-PGJ ₂	361,2	299,2	AA	Prostanoid				
244	DIHOMO-15-deoxy-PGD ₂	361,2	299,2	AA	Prostanoid				
245	Hepokittin B3	363,2	183,2	AA					
246	15-deoxy-PGA ₂	315,2	271,2	AA	Prostanoid				
247	9-HEPE	317	123	EPA	Alcohol			20	
248	15-HEPE	317	175	EPA	Alcohol			18	
249	15-HEPE	317	179	EPA	Alcohol			20	

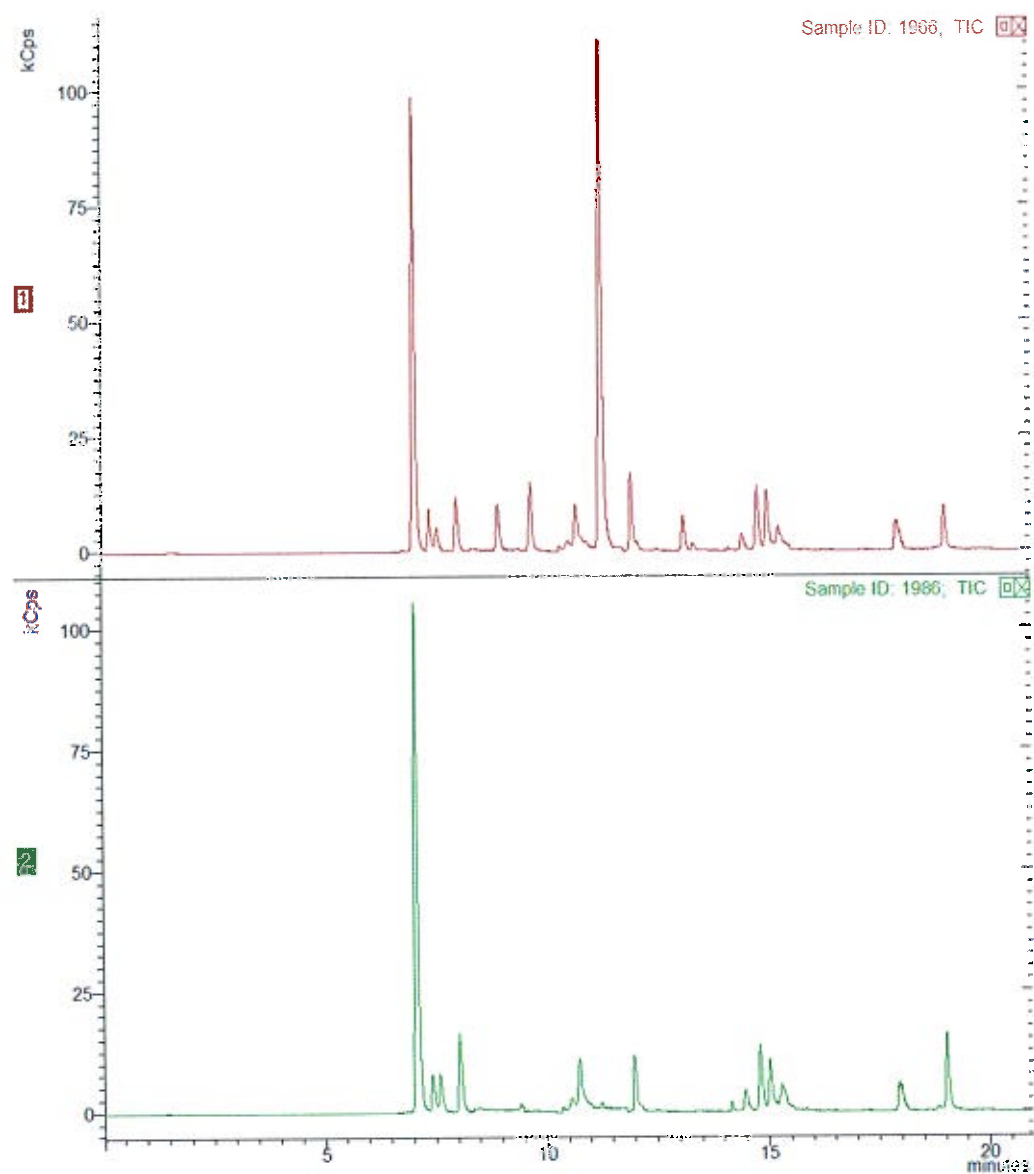
Bijlagen 7

103 Compounds, 119 Segments



Figuur 29: Een overzicht van het tijdschema waarin alle oxylipiden staan aangegeven met de tijds window waarin deze gemeten worden.

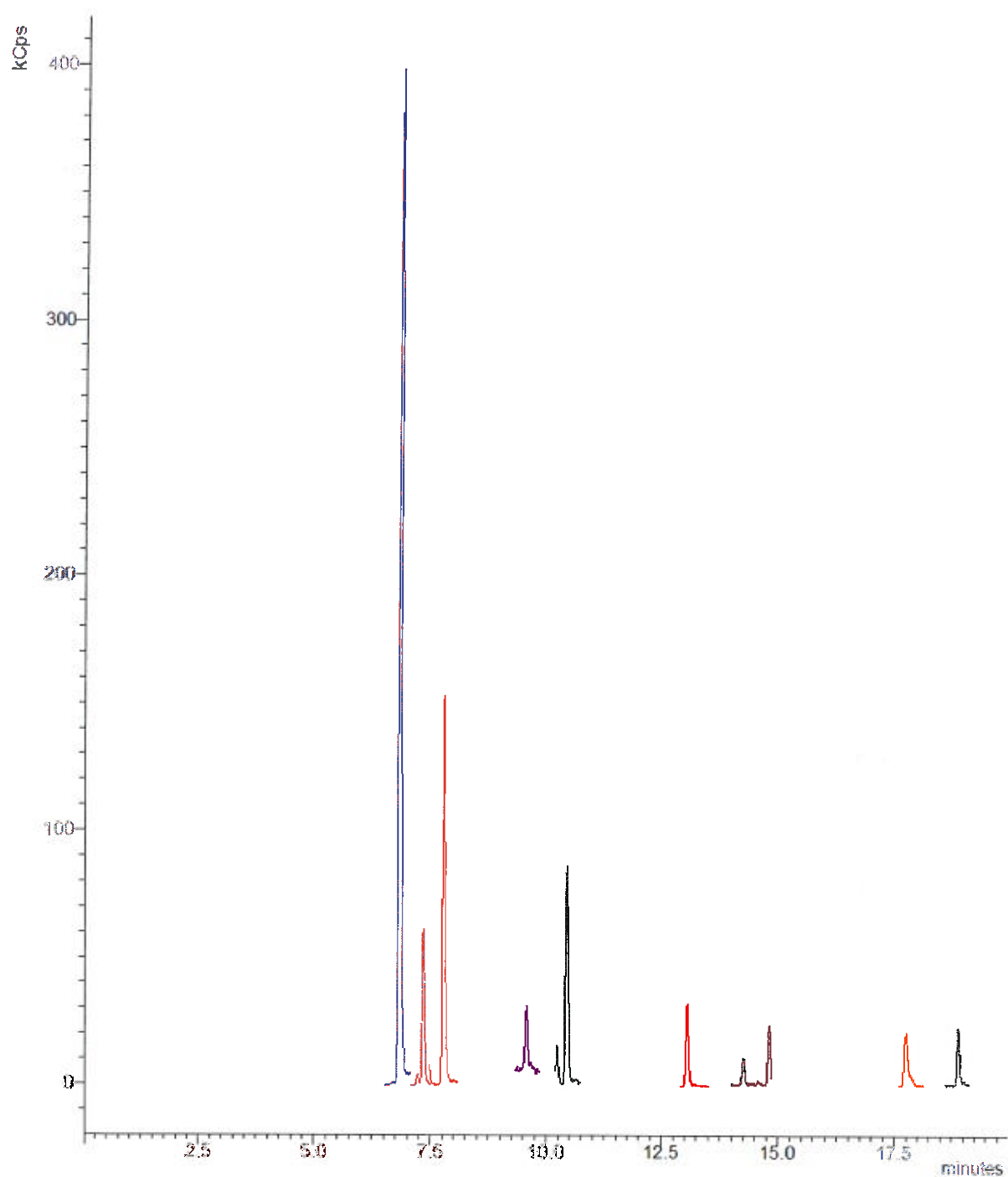
Bijlagen 8



Figuur 30: Het verkregen chromatogram van een ratten monster gemeten met de eind methode. De bovenste is van een meting van de hippocampus en onderste van de cortex.

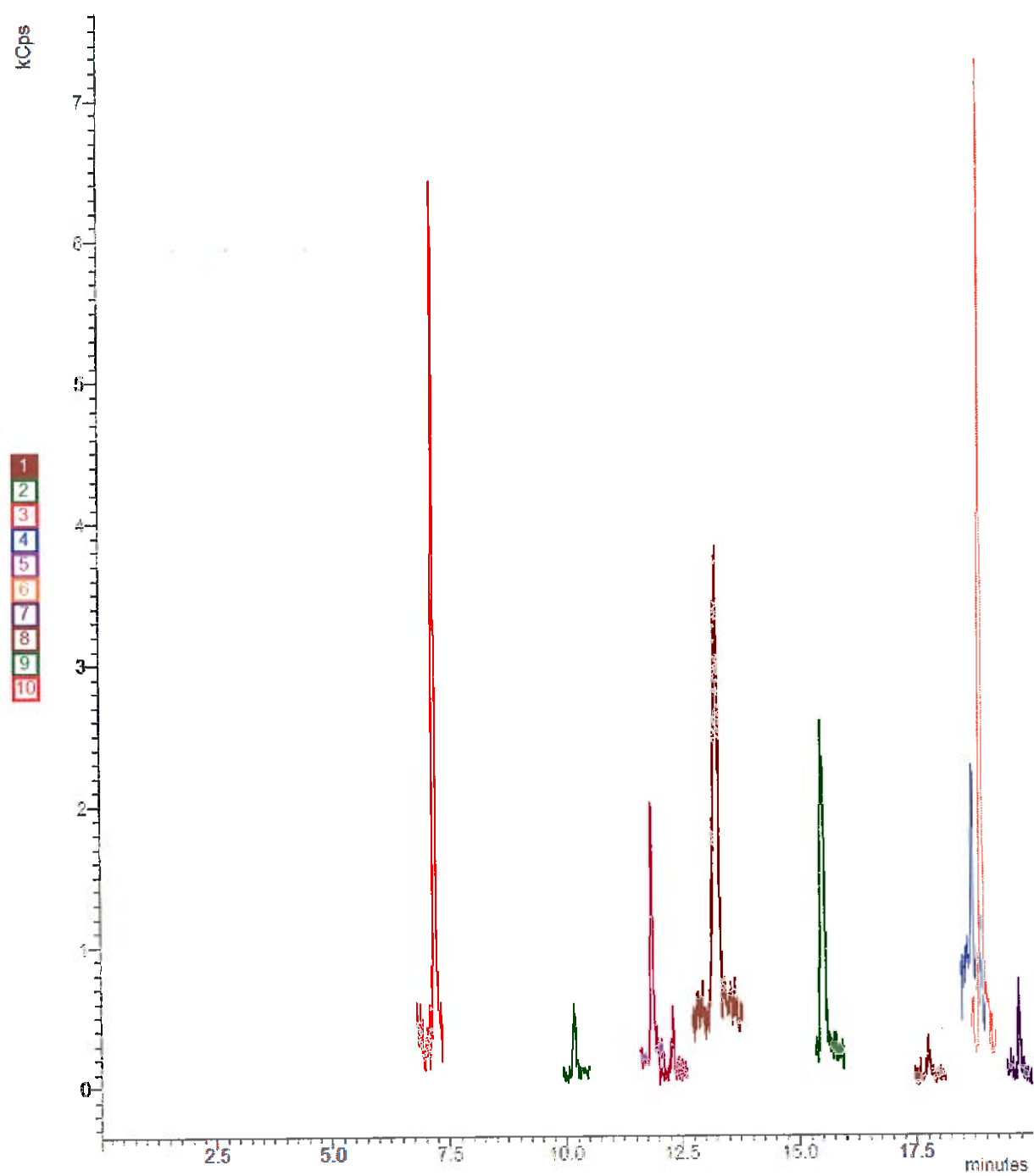
Bijlagen 9

De meeste pieken die zijn gevonden uit de metingen van de verschillende een muismonsters (hippocampus) zijn hier per 10 in een chromatogram weergegeven. Van de pieken die zijn gekoppeld aan een oxylipiden daar is de naam van weergegeven in een tabel onder de chromatogram.



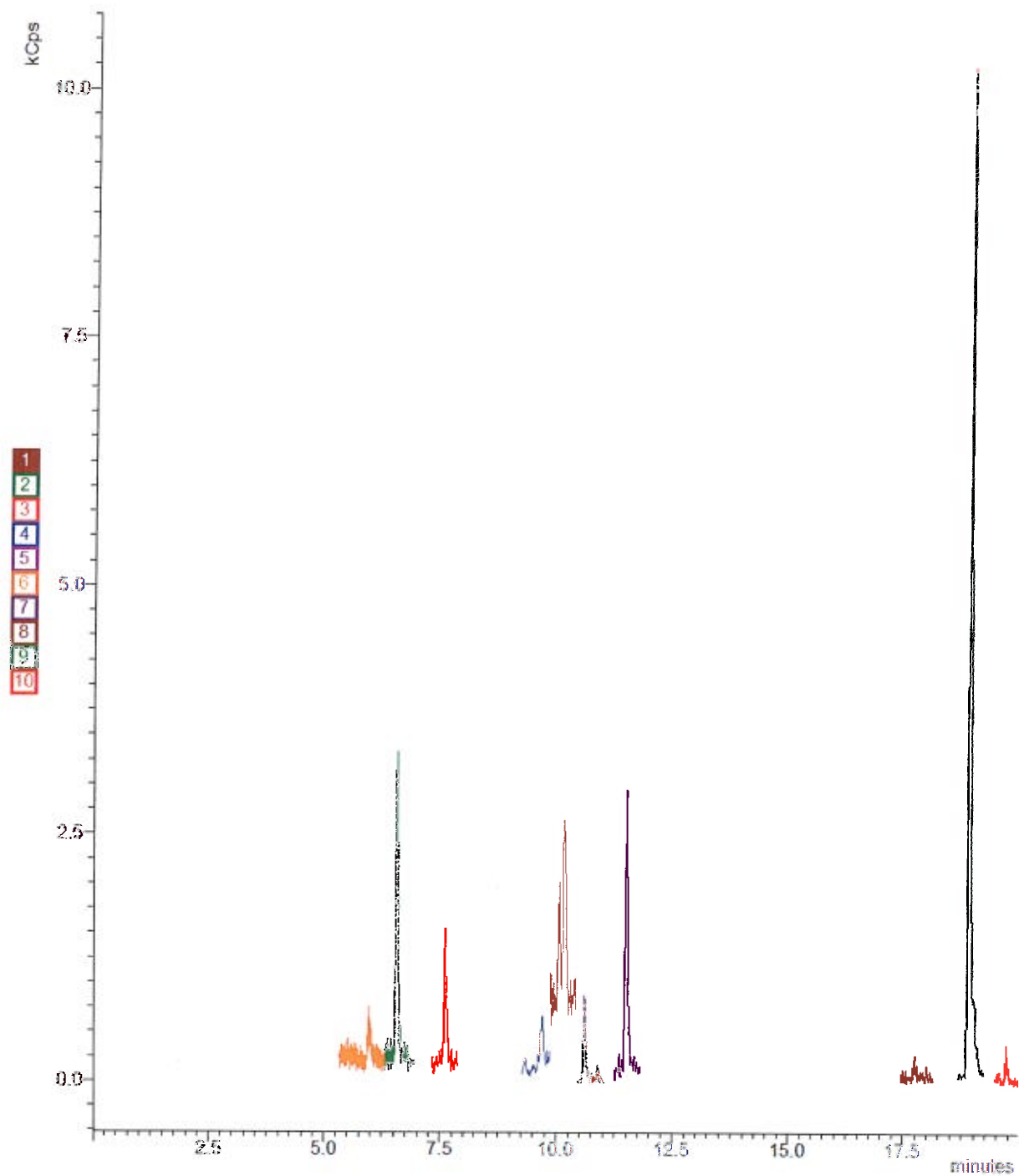
Naam	12-HETE	9(10)-EpODE	15-HETE	11(12)-EpETrE
Kleur	Bruin	Roze	Paars	Donker groen
Retentietijd (min)	14.59	9.58	14.26	18.87

Vervolg bijlage 9



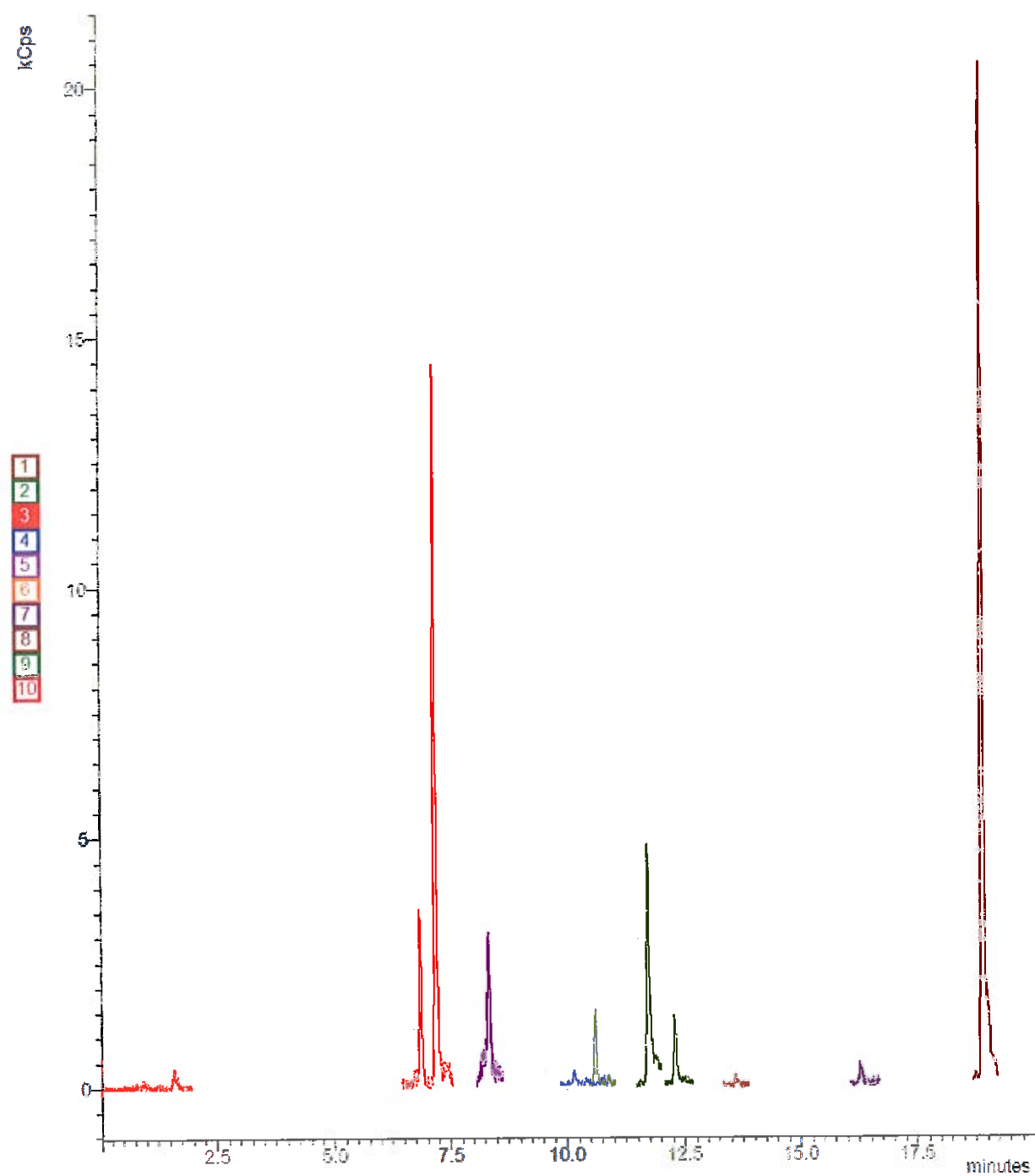
Naam	PGJ2	PGB2	9-HOTrE	13-HOTrE	5(S),15(S)-DiHEPE	18-HEPE	8(9)-EpETrE
Kleur	Rood	Groen	Roze	Groen	Bruin	Blauw	Geel
Retentietijd (min)	7.08	10.18	11.87	15.63	17.83	18.57	18.93

Vervolg bijlage 9



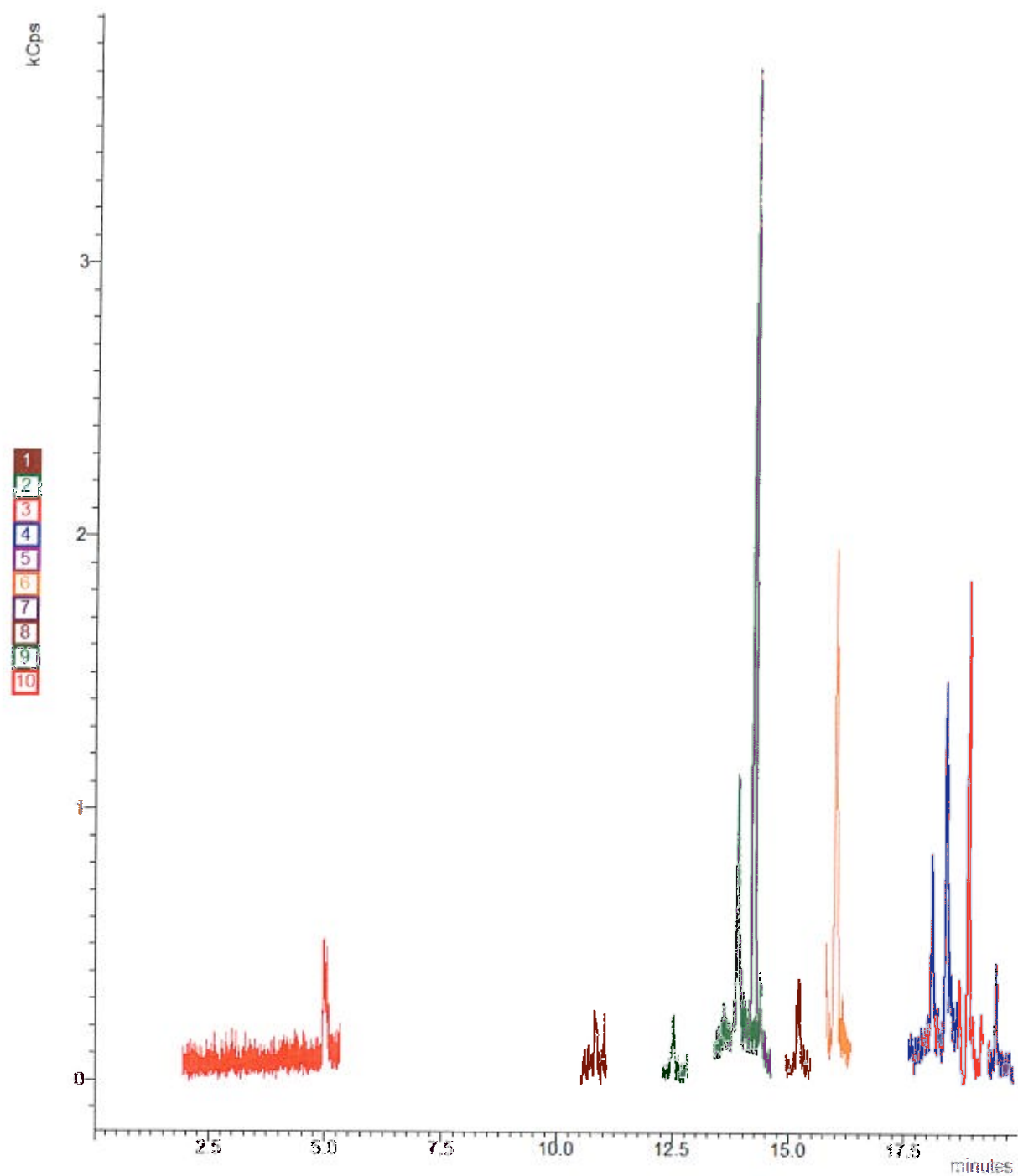
Naam	PGF2a	X-LTB4	X-LTB4	Hepoxilin B3	X-LTB4	5(6)-EpETre
Kleur	Groen	Blauw	Bruin 1	Paars	Roze	Groen
Retentietijd (min)	6.67	9.56	10.15	10.73	11.51	18.92

Vervolg bijlage 9



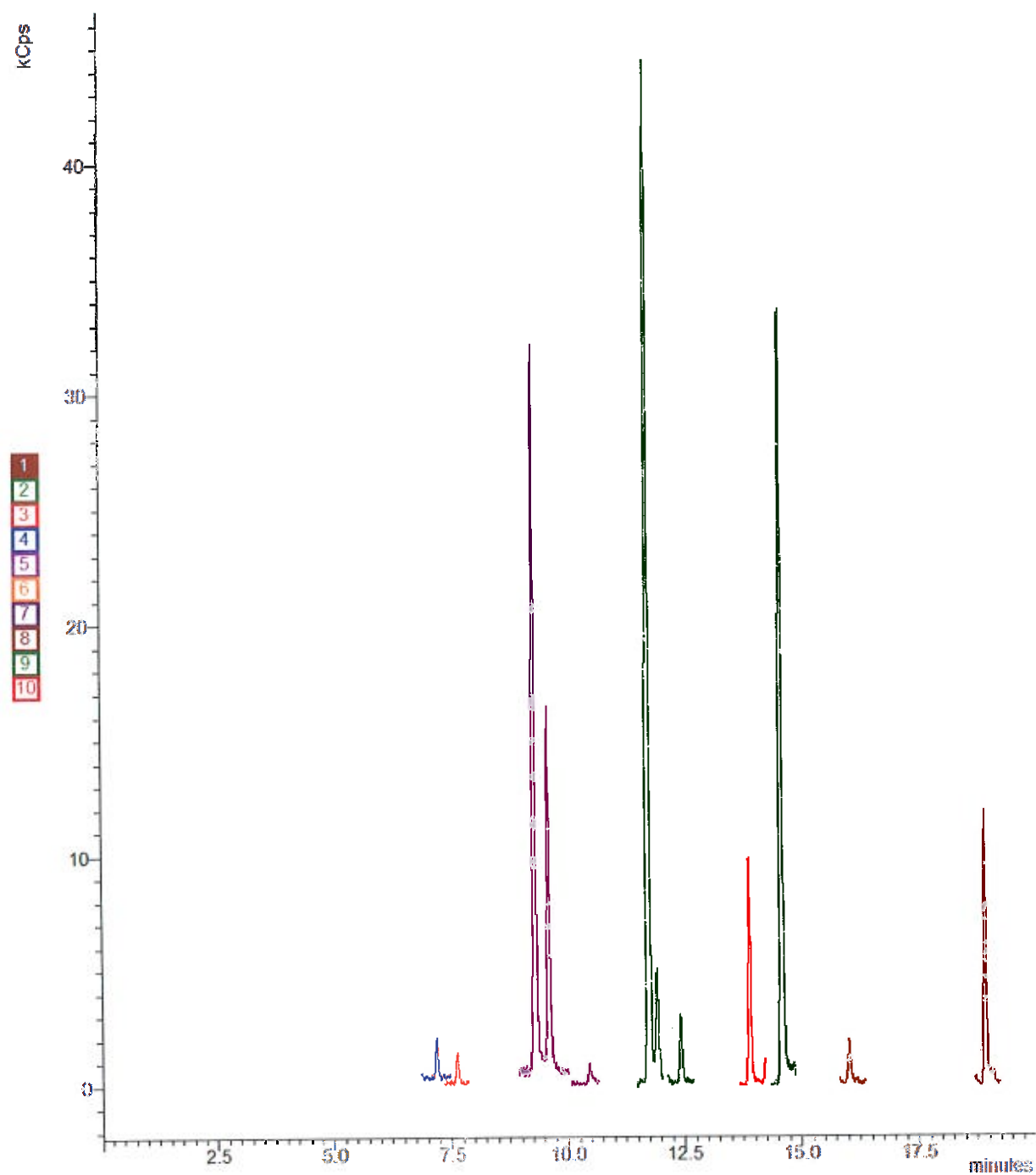
Naam	PGD2	13,14-dihydro-15-keto PGD1	dihydro PD1	DiHOMO PGJ2
Kleur	Rood	Roze	Bruin	Paars
Retentietijd (min)	7.01	8.43	13.01	16.37

Vervolg bijlage 9



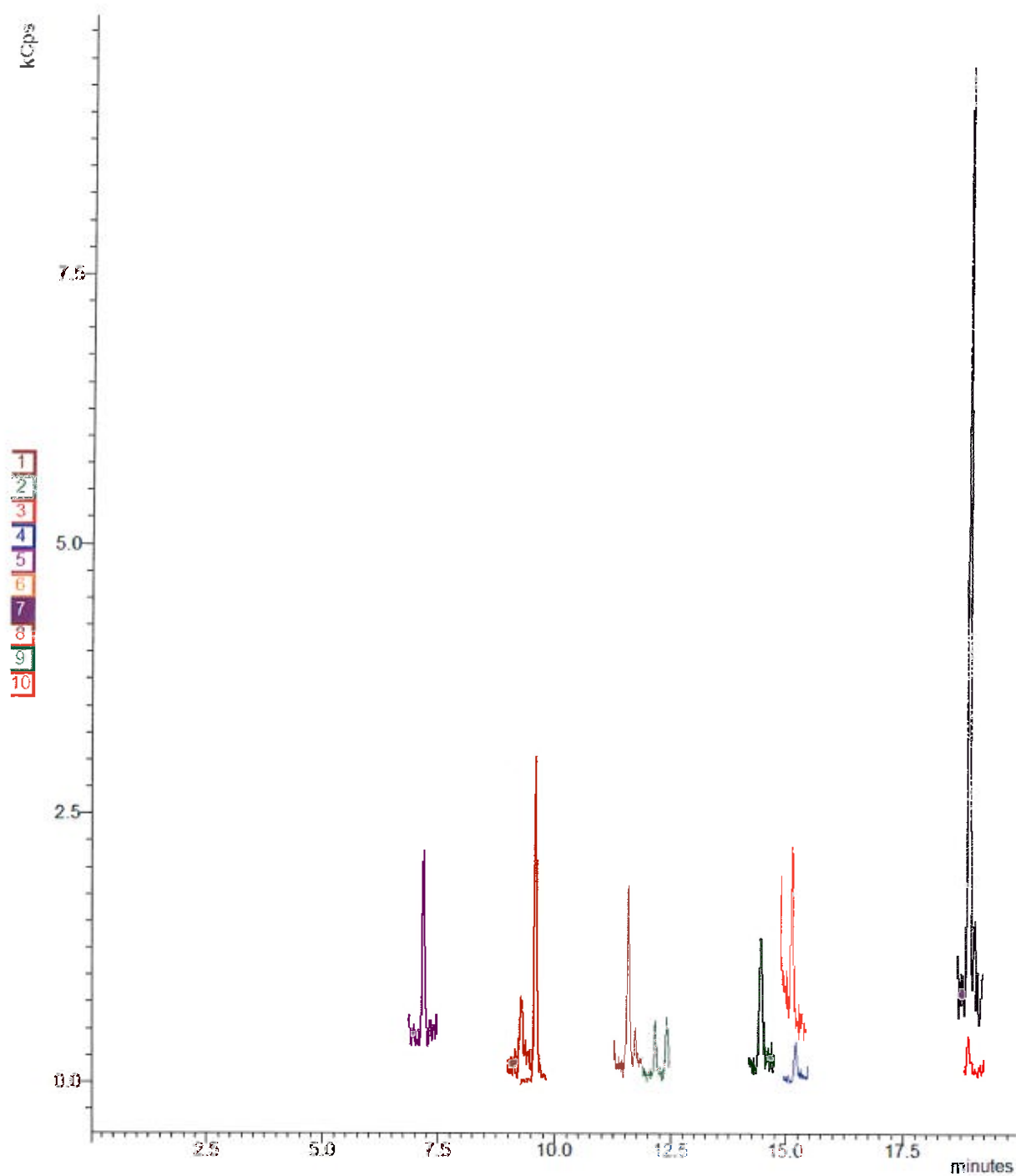
Naam	X-DiHDPA	X-DiHDPA	l-HODE	TXB1
Kleur	Bruin	Groen	Roze	Bruin 2
Retentietijd (min)	10.80	12.51	14.30	15.21

Vervolg bijlage 9



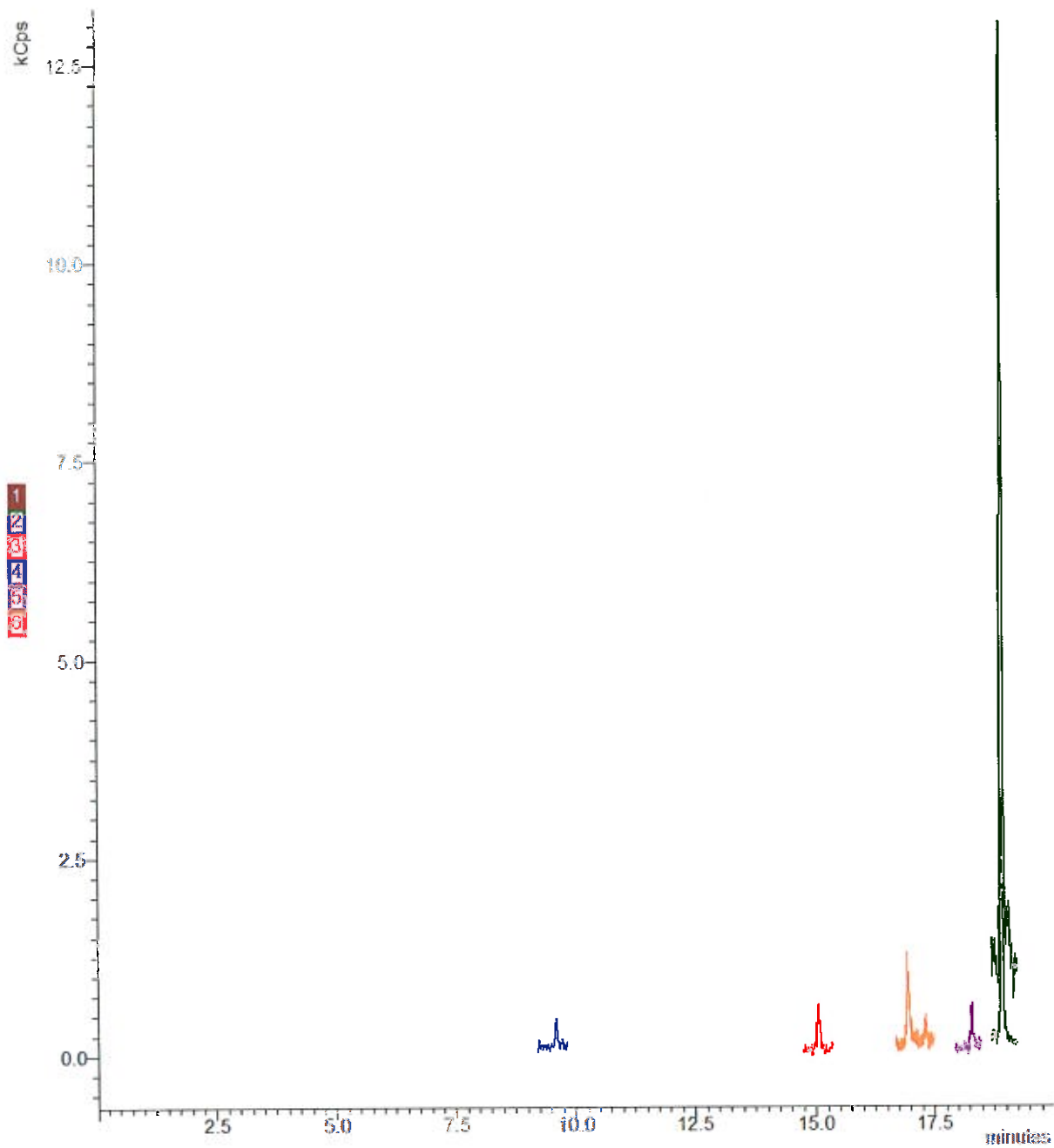
Naam	12(S)-HHTrE	9-HODE	11-HETE
Kleur	Groen	Rood	Groen
Retentietijd (min)	11.73	13.95	14.60

Vervolg bijlage 9



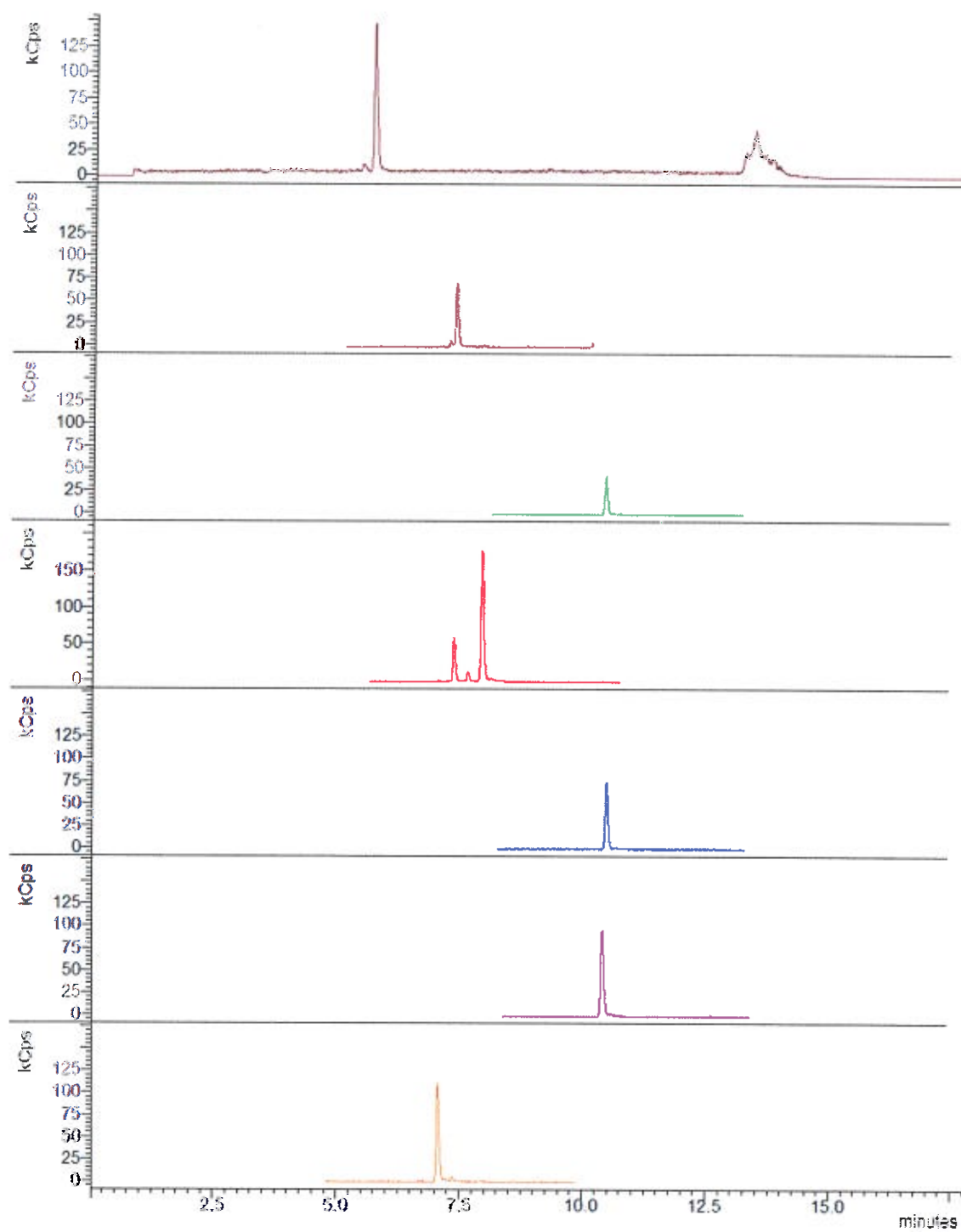
Naam	22-hydroxy RvD2	8-HETE	TXB2
Kleur	Geel	Rood	Blauw
Retentietijd (min)	9.51	15.12	15.19

Vervolg bijlage 9



Naam	15-deoxy PGJ2	15(S)-HETrE	12,13- DiHOME	8,9-DiHETrE	15(S)- HEPE	15-KETE
Kleur	Blauw	Rood	Oranje	Roze	Bruin	Groen
Retentietijd (min)	9.50	15.03	17.21	18.22	18.93	18.93

Vervolg bijlage 9



Naam	LXB4	Rvd2	Mar1	RvD1	PD1	LTB4	RvD3
Retentietijd (Min)	7.49	7.44	10.70	8.01	10.49	10.57	7.14

