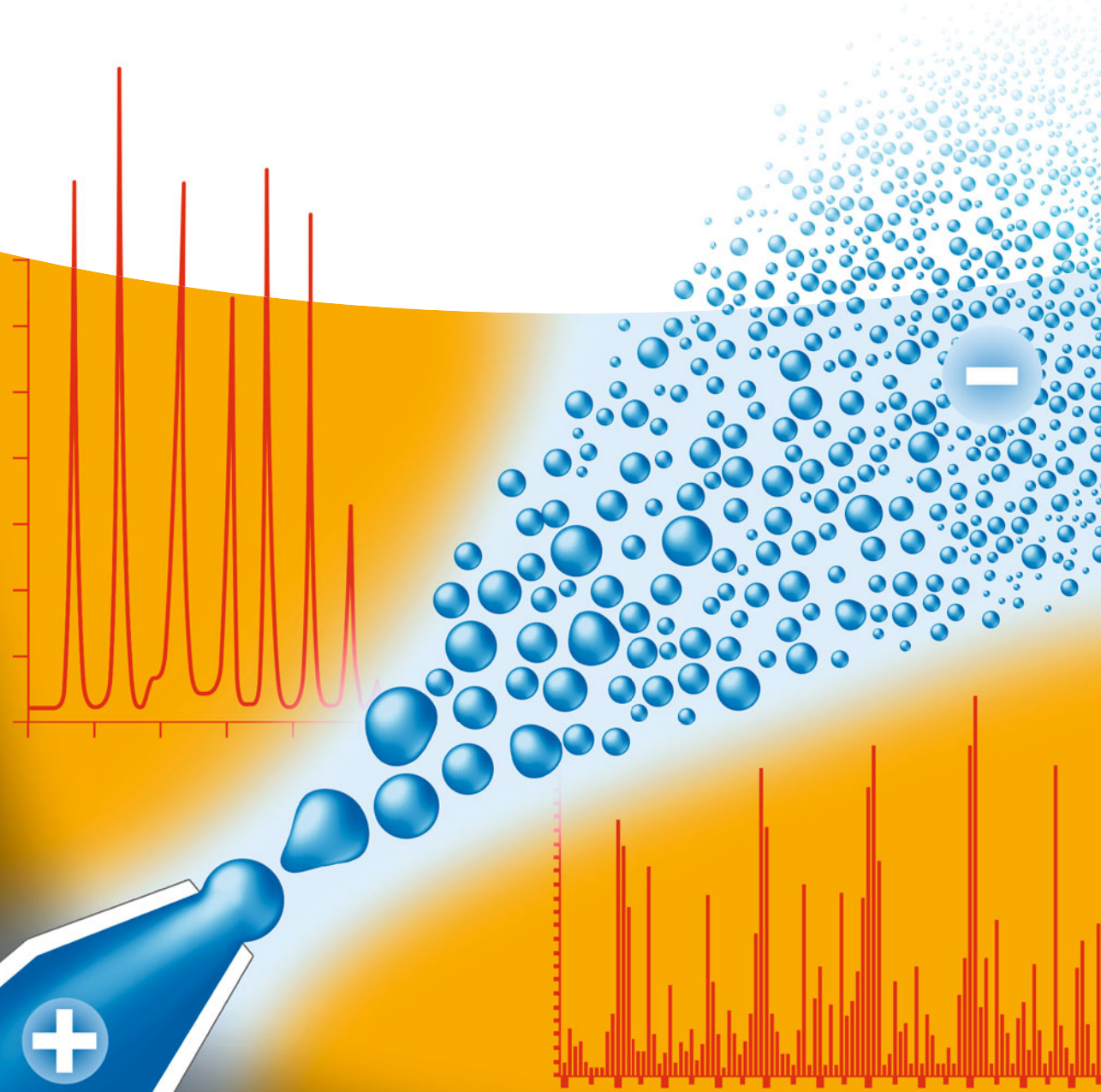


Herausgegeben von Stavros Kromidas

Das HPLC-MS-Buch für Anwender



*Herausgegeben von
Stavros Kromidas*

**Das HPLC-MS-Buch
für Anwender**

*Herausgegeben von
Stavros Kromidas*

Das HPLC-MS-Buch für Anwender

WILEY-VCH
Verlag GmbH & Co. KGaA

Herausgeber

Stavros Kromidas
Consultant, Saarbrücken
Breslauer Str. 3
66440 Blieskastel
Deutschland

Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2017 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

Umschlaggestaltung Formgeber, Mannheim, Deutschland

Satz le-tex publishing services GmbH, Leipzig, Deutschland

Print ISBN 978-3-527-34291-4

ePDF ISBN 978-3-527-80805-2

ePub ISBN 978-3-527-80803-8

Mobi ISBN 978-3-527-80804-5

oBook ISBN 978-3-527-80802-1

Gedruckt auf säurefreiem Papier.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort *XI*

Zum Aufbau des Buches *XIII*

Liste der Autoren *XV*

Teil I Überblick, Fallstricke, Hardwareanforderungen *I*

1 Stand der Technik in der LC-MS-Kopplung *3*

O. Schmitz

1.1 Einleitung *3*

1.2 Ionisationsmethoden bei
Atmosphärendruck-Massenspektrometern *5*

1.2.1 Übersicht API-Methoden *5*

1.2.2 ESI *6*

1.2.3 APCI *8*

1.2.4 APPI *10*

1.2.5 APLI *10*

1.2.6 Bestimmung der Ionensuppression *11*

1.2.7 Beste Ionisationsmethode für die jeweilige Fragestellung *12*

1.3 Massenanalytoren *13*

1.4 Zukünftige Entwicklungen *14*

1.5 Worauf sollten Sie beim Kauf eines Massenspektrometers achten? *16*

Literatur *17*

2 Technische Aspekte und Fallstricke der LC-MS-Kopplung *21*

M. M. Martin

2.1 Instrumentelle Voraussetzungen für LC-MS-Analytik – die richtige
Anlage zum Analysenproblem *22*

2.1.1 (U)HPLC und Massenspektrometrie – nicht bloß „irgendein
Frontend“ *22*

2.1.2	UHPLC-Systemoptimierung – Gradientenverzögerung und Außersäulenvolumina	23
2.1.3	Das passende Massenspektrometer zur analytischen Fragestellung	35
2.1.4	Datenraten und Zykluszeiten von Massenspektrometern	40
2.1.5	Komplementäre Informationen durch zusätzliche Detektoren oder: Massenspektrometrie ist kein Allheilmittel	41
2.2	LC-MS-Methodenentwicklung und HPLC-Methodenanpassung – wie mache ich meine Trennung fit für LC-MS?	45
2.2.1	Methodenentwicklung LC-MS – die Trennchemie passt sich an	46
2.2.2	Umrüsten von klassischen HPLC-Methoden auf LC-MS	55
2.3	Fehlerquellen und Fallstricke – wenn es mal nicht richtig läuft	56
2.3.1	Kein Signal	57
2.3.2	Schlecht angepasste Quellenbedingungen und ihre Auswirkung auf das Chromatogramm	58
2.3.3	Ionensuppression	60
2.3.4	Unbekannte Massensignale im Massenspektrum	61
2.3.5	Apparative Gründe für Fehlinterpretation von Massenspektren	67
2.4	Fazit	70
2.5	Abkürzungen	71
	Literatur	72
3	Aspekte der Methodenentwicklung bei der LC-MS-Kopplung	75
	<i>T. Teutenberg, T. Hetzel, C. Portner, S. Wiese, C. vom Eysler und J. Türk</i>	
3.1	Einleitung	75
3.2	Von der Targetanalytik zu Screeninguntersuchungen	76
3.2.1	Targetanalytik	76
3.2.2	Suspected-target screening	76
3.2.3	Non-target screening	77
3.2.4	Vergleichende Übersicht der verschiedenen Akquisitionsmodi	77
3.3	Optimierung chromatografischer und massenspektrometrischer Parameter	78
3.3.1	Anforderungen und Empfehlungen zur HPLC-MS-Analyse am Beispiel der DIN 38407-47	78
3.3.2	Definition kritischer Peakpaare im Kontext der HPLC-MS-Kopplung	80
3.3.3	Abtrennung polarer Komponenten von der Durchflusszeit	81
3.3.4	Festlegung der HPLC-Methodenparameter am Beispiel der Trennung ausgewählter Pharmazeutika	83
3.3.5	Durchführung der Screeningexperimente	88
3.3.6	Auswertung der Daten und Diskussion der Einflussparameter	90
3.3.7	Nutzung von Simulationssoftware für Feinoptimierung	102
3.3.8	Auswahl des chromatografischen Trägermaterials	104
3.3.9	Einfluss des Innendurchmessers und der Flussrate	108
3.3.10	Einfluss des Injektionsvolumens	109

- 3.3.11 Festlegung der massenspektrometrischen Parameter 121
- 3.3.12 Optimierung der massenspektrometrischen Parameter 123
- 3.4 Quantifizierung mittels LC-MS 128
- 3.5 Screening mittels LC-MS 135
- 3.6 Miniaturisierung – LC-MS quo vadis? 139
- Literatur 143

Teil II Tipps, Beispiele, Trends 145

- 4 LC-MS für alle(s)? – LC-MS-Tipps 147
 - F. Mandel*
 - 4.1 Einführung 147
 - 4.2 Tipp 1 148
 - 4.2.1 Die Qual der Wahl des LC-MS-Interfaces 148
 - 4.3 Tipp 2 154
 - 4.3.1 Welche mobilen Phasen passen zu LC-MS? 154
 - 4.4 Tipp 3 156
 - 4.4.1 Phosphatpuffer – die Ausnahme 156
 - 4.5 Tipp 4 157
 - 4.5.1 Gepaarte Ionen 157
 - 4.5.2 Welches Gegenmittel gibt es? 157
 - 4.5.3 Fazit 158
 - 4.6 Tipp 5 159
 - 4.6.1 Verbesserte Elektrospray-Ionisation durch Additive 159
 - 4.6.2 Additive für APCI 160
 - 4.6.3 Fazit 160
 - 4.7 Tipp 6 161
 - 4.7.1 Wie kann ich die Nachweisempfindlichkeit steigern? 161
 - 4.8 Tipp 7 162
 - 4.8.1 Nicht linear und wenig dynamisch? 162
 - 4.8.2 Die Gründe 163
 - 4.8.3 Lösungsansätze 163
 - 4.8.4 Fazit 164
 - 4.9 Tipp 8 164
 - 4.9.1 Wieviel MS^n brauchen Sie? 164
 - 4.9.2 Lösungsansätze 165
 - 4.9.3 Fazit 165
 - 4.10 Noch mehr Hilfe 174
 - Literatur 175

Teil III Anwender berichten 177

- 5 Ein praktisches Beispiel aus der Ionenchromatografie 179**
A. Müller und A. Hofmann
Literatur 183
- 6 Problemlösungen mittels HPLC-MS aus der Praxis für die Praxis 187**
E. Fleischer
- 6.1 Einführung und Aufgabenstellungen 187
- 6.2 Fallbeispiel 1 191
- 6.2.1 Aufklärung der Methohexitalverunreinigungen
und Zersetzungsprodukte 191
- 6.2.2 Probenvorbereitung 191
- 6.3 Fallbeispiel 2 193
- 6.3.1 Oligomerentrennung aus Caprolactam, Mehrkomponententrennung
von Verunreinigungen im Grammbereich 193
- 6.4 Fallbeispiel 3 194
- 6.4.1 Herstellung und Isolierung von Bis-Nalbuphin aus Nalbuphin 194
- 6.5 Fallbeispiel 4 197
- 6.5.1 Isolierung und Aufklärung von Dopaminverunreinigungen 197
- 7 LC-MS aus Sicht eines Wartungsingenieurs 199**
O. Müller
- 7.1 Einleitung und historischer Abriss 199
- 7.2 Spraytechniken 200
- 7.3 Durchgang durch den Ionenpfad 201
- 7.4 Der Analysator 202
- 7.5 Wartung 203
- Literatur 210

Teil IV Hersteller berichten 211

- 8 Agilent Massenspektrometrie, Vergangenheit,
Gegenwart und Zukunft ... 213**
T. L. Sheehan und F. Mandel
- 9 Hersteller berichten – SCIEX 217**
D. Schleuder

10	Hersteller berichten – Thermo Fisher Scientific	223
	<i>M. M. Martin</i>	
10.1	Flüssigchromatografie (LC) für LC-MS	224
10.2	Massenspektrometrie (MS) für LC-MS	225
10.3	Integrierte LC-MS-Lösungen	227
10.4	Software	227
	Literatur	229
	Über die Autoren	231
	Sachverzeichnis	237

Vorwort

Aus einem Verfahren für Spezialisten in der Forschung entwickelt sich die LC-MS-Kopplung immer schneller auch zu einer bewährten Technik für Anwender in der Routine. Vorliegendes Buch ist ausschließlich der LC-MS-Kopplung gewidmet.

Unser Ziel ist es, LC-MS-Anwendern möglichst detaillierte Informationen zu geben, damit sie *ihre* LC-MS-Applikation optimal durchführen können. Dazu haben Kollegen, die in früheren Büchern von mir LC-MS-Beiträge verfasst haben, ihre Beiträge überarbeitet und aktualisiert. Ferner wurden in das Buch neue Beiträge von LC-MS-Praktikern aufgenommen. Beim Verfassen des Textes hatten wir zweifelsohne die Praxis im Blick, aber auch theoretisches Hintergrundwissen wird verdichtet behandelt. Ich hoffe, dass sowohl der Analytiker in der Entwicklung als auch der Anwender in der Routine Anregungen und Tipps zum optimalen Einsatz von LC-MS-Kopplungen finden werden.

Mein besonderer Dank gilt Wolfgang Dreher für seine kritischen Hinweise zum Manuskript, ferner meinen Autorenkollegen dafür, dass sie trotz ihrer äußerst knappen Zeitressourcen es möglich gemacht haben, ihre Erfahrung und ihr Wissen zu Papier zu bringen. WILEY-VCH und speziell Reinhold Weber danke ich für die gute und enge Zusammenarbeit sowie seine Flexibilität.

Blieskastel, März 2017

Stavros Kromidas

Zum Aufbau des Buches

Das Buch enthält zehn Kapitel, die wie folgt aufgeteilt sind:

- 1–3: **Teil I Überblick, Fallstricke, Hardwareanforderungen**
- 4: **Teil II Tipps, Beispiele**
- 5–7: **Teil III Anwender berichten**
- 8–10: **Teil IV Hersteller berichten, Trends**

Teil I

Oliver Schmitz gibt im Einführungskapitel einen Überblick über den **Stand der Technik in der LC-MS-Kopplung** und stellt die unterschiedlichen Modi vor. Im zweiten Kapitel **Instrumentelle Voraussetzungen für LC-MS-Analytik – die richtige Anlage zum Analysenproblem** geht Markus Martin zunächst auf apparative Gesichtspunkte ein, bevor er sich mit LC-MS-Methodenentwicklung und -übertragung sowie schließlich mit Fallstricken beschäftigt. Das Autorenteam um Thorsten Teutenberg macht in Kap. 3 (**Anforderungen an LC-Hardware bei der Kopplung mit unterschiedlichen Massenspektrometern**) eine Reihe von Vorschlägen, um eine LC-MS-Kopplung möglichst optimal umzusetzen. Komplexe Proben und Miniaturisierung spielen dabei u. a. eine wichtige Rolle.

Teil II

Friedrich Mandel hat im Kap. 4 eine Reihe von **LC-MS-Tipps** zu unterschiedlichen Themen zusammengestellt.

Teil III

Alban Muller und Andreas Hofmann zeigen im Kap. 5 als etwas ungewohnte Anwendung der LC-MS-Kopplung **ein praktisches Beispiel aus der Ionenchromatografie**. Im Kap. 6 zeigt Edmond Fleischer anhand von vier Beispielen aus dem

Bereich der Synthese und Isolierung, wie unterschiedliche Fragestellungen angegangen werden können (**Problemlösungen mittels HPLC-MS aus der Praxis für die Praxis**). Oliver Müller (**LC-MS aus Sicht eines Wartungsingenieurs**) unternimmt mit den Augen eines Technikers im Kap. 7 einen virtuellen Gang durch einen MS-Detektor und gibt zum Schluss Tipps, wie mit Verschmutzungen umzugehen ist.

Teil IV

In Kap. 8–10 schließlich (**Gerätehersteller berichten**) stellen die Firmen Agilent, SCIEX und ThermoScientific ihre neuesten Produkte kurz vor und tun ihre Einschätzung zur Zukunft der LC-MS-Kopplung kund.

Das Buch muss nicht linear gelesen werden. Die einzelnen Kapitel wurden so verfasst, dass sie abgeschlossene Module darstellen – ein „Springen“ ist jederzeit möglich. Damit haben wir versucht, dem Charakter des Buches als Nachschlagewerk für LC-MS-Anwender gerecht zu werden. Wir hoffen, die Leser profitieren davon.

Liste der Autoren

Dr. Claudia vom Eyser

Institut für Energie- und
Umwelttechnik e. V.
Bliersheimer Straße 58–60
47229 Duisburg
Deutschland

Dr. Edmond Fleischer

Rheingaustraße 190–196
Haus E512
65203 Wiesbaden
Deutschland

Terence Hetzel

Institut für Energie- und
Umwelttechnik e. V.
Bliersheimer Straße 58–60
47229 Duisburg
Deutschland

Dr. Andreas Hofmann

Novartis
Institutes for BioMedical Research
Novartis Campus
4056 Basel
Schweiz

Dr. Friedrich Mandel

Friedrich-Speidel-Straße 43
76307 Karlsbad
Deutschland

Dr. Markus M. Martin

Thermo Fischer Scientific
Dornierstraße 4
82110 Germering
Deutschland

Oliver Müller

Fischer Analytics GmbH
Duhlwiesen 32
55413 Weiler bei Bingen
Deutschland

Alban Müller

Novartis
Institutes for BioMedical Research
Novartis Campus
4056 Basel
Schweiz

Dr. Christoph Portner

Tauw GmbH
Richard-Löchel-Straße 9
47441 Moers
Deutschland

Dr. Detlev Schleuder

AB SCIEX Deutschland GmbH
Landwehrstraße 54
64293 Darmstadt
Deutschland

Prof. Dr. Oliver J. Schmitz

University of Duisburg-Essen
Faculty of Chemistry
Applied Analytical Chemistry
Campus Essen, S05 T01 B35
Universitätsstraße 5
45141 Essen
Deutschland

Dr. Terry Sheehan

Director MS Business Development
Agilent Technologies
5301 Stevens Creek Blvd, 3U-WI
Santa Clara, CA 95051
USA

Dr. Thorsten Teutenberg

Institut für Energie- und
Umwelttechnik e. V.
Bliersheimer Straße 58–60
47229 Duisburg
Deutschland

Dr. Jochen Türk

Institut für Energie- und
Umwelttechnik e. V.
Bliersheimer Straße 58–60
47229 Duisburg
Deutschland

Dr. Steffen Wiese

Institut für Energie- und
Umwelttechnik e. V.
Bliersheimer Straße 58–60
47229 Duisburg
Deutschland

Teil I

Überblick, Fallstricke, Hardwareanforderungen

1

Stand der Technik in der LC-MS-Kopplung

O. Schmitz

1.1

Einleitung

Die drastisch gestiegenen Anforderungen an qualitative und quantitative Analysen von immer komplexeren Proben stellen eine immense Herausforderung für die moderne instrumentelle Analytik dar. Für komplexe organische Proben (z. B. Körperflüssigkeiten, natürliche Produkte oder Umweltproben) erfüllen nur chromatografische oder elektrophoretische Trennungen mit anschließender massenspektrometrischer Detektion diese Anforderungen. Aktuell ist jedoch ein Trend zu beobachten, bei dem eine komplexe Probenvorbereitung und Vortrennung durch hochauflösende Massenspektrometer mit Atmosphärendruck-Ionenquellen ersetzt werden.

Dabei sind jedoch zahlreiche Ionen-Molekül-Reaktionen in der Ionenquelle – vor allem bei komplexen Proben, aufgrund einer unvollständigen Trennung – möglich, weil die Ionisation in typischen Atmosphärendruck-Ionisationsquellen unspezifisch ist [1]. Somit führt diese Vorgehensweise oft zu einer Ionensuppression und Artefaktbildung in der Ionenquelle, vor allem bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) [2].

Trotzdem können Quellen wie die ASAP (atmospheric pressure solids analysis probe), DART (direct analysis in real time) und DESI (desorption electrospray ionization) oft sinnvoll eingesetzt werden. In ASAP wird ein heißer Stickstofffluss aus einer ESI oder APCI (atmospheric pressure chemical ionization)-Quelle als Energiequelle für die Verdampfung eingesetzt und die einzige Änderung gegenüber einer APCI-Quelle ist die Installation einer Einschubmöglichkeit, um die Probe in den heißen Gasstrom innerhalb der Ionenquelle zu platzieren [3]. Diese Ionenquelle ermöglicht eine schnelle Analyse von flüchtigen und schwerflüchtigen Verbindungen und wurde beispielsweise eingesetzt, um biologische Gewebe [3], Polymeradditive [3], Pilze und Zellen [4] und Steroide [3, 5] zu analysieren. ASAP hat viele Gemeinsamkeiten mit DART [6] und DESI [7]. Die DART-Ionenquelle erzeugt einen Gasstrom, der langlebige elektronisch angeregte Atome enthält, die mit der Probe interagieren können und so eine Desorption mit anschließender Ionisation der Probe mittels Penning-Ionisation [8] oder Proto-

nenstransfer von protonierten Wasserclustern [6] induzieren. Die DART-Quelle wird für die direkte Analyse von festen und flüssigen Proben eingesetzt. Ein großer Vorteil dieser Quelle ist die Möglichkeit der Analyse von Verbindungen auf Oberflächen, wie z. B. illegale Substanzen auf Dollarnoten oder Fungizide auf Weizen [9]. Im Gegensatz zu ASAP und DART ist der große Vorteil von DESI, dass – wie bei der klassischen ESI – die Flüchtigkeit der Analyten keine Voraussetzung für eine erfolgreiche Analyse ist. DESI ist am empfindlichsten für polare und basische Verbindungen und weniger empfindlich für Analyten mit einer geringen Polarität [10]. Diese sehr nützlichen Ionenquellen haben einen gemeinsamen Nachteil. Alle oder fast alle in der Probe befindlichen Substanzen sind in der Gasphase und während der Ionisation zeitgleich in der Ionenquelle vorhanden. Die Analyse komplexer Proben kann daher zu einer Ionensuppression und Artefaktbildung in der Atmosphärendruck-Ionenquelle aufgrund von Ionen-Molekül-Reaktionen auf dem Weg zum MS-Einlass führen. Aus diesem Grund werden einige ASAP-Anwendungen mit steigender Temperatur des Stickstoffgases in der Literatur beschrieben [5, 11, 12]. Auch wurden DART-Analysen mit verschiedenen Heliumtemperaturen [13] oder mit einem Heliumtemperaturgradienten [14] eingesetzt, um eine teilweise Trennung von Analyten aufgrund der unterschiedlichen Dampfdrücke der Analyten zu realisieren. Eine mit DART und ASAP verwandte und erst 2012 beschriebene Ionenquelle, die direct inlet probe-APCI (DIP-APCI) der Firma Scientific Instruments Manufacturer GmbH (SIM) nutzt eine temperierbare Schubstange zum Direkteinlass von festen und flüssigen Proben mit anschließender chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck [15]. Abbildung 1.1 zeigt eine DIP-APCI-Analyse einer Safranprobe (Feststoff, Gewürz) ohne Probenvorbereitung mit den safranspezifischen Biomarkern Isophoron und Safranal. Als Detektor wurde ein Agilent Technologies 6538 UHD

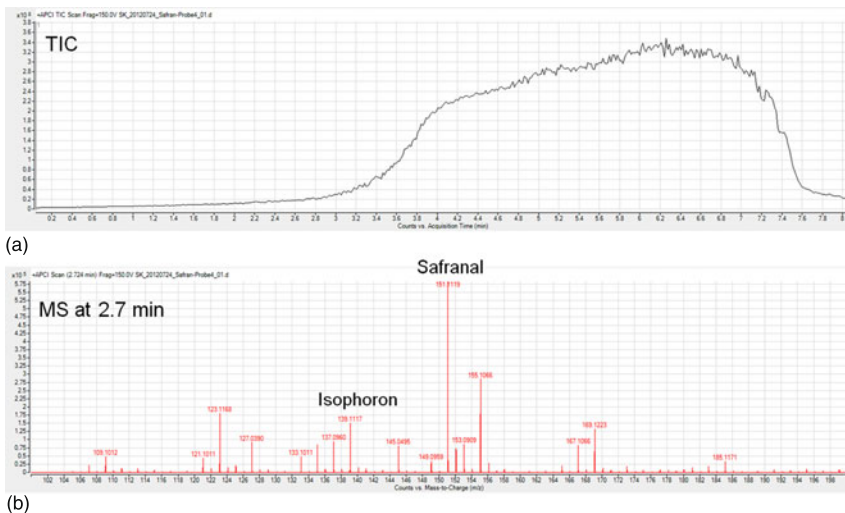


Abb. 1.1 Analyse von Safran mittels DIP-APCI und einem hochauflösenden qTOF-MS.

Accurate-Mass Q-TOF eingesetzt. In Abb. 1.1a ist der TIC der gesamten Analyse und in Abb. 1.1b exemplarisch das Massenspektrum zum Zeitpunkt 2,7 min dargestellt. Die Analyse wurde bei 40 °C gestartet und die Probe mit 1 °C/s auf eine finale Temperatur von 400 °C aufgeheizt.

So nützlich und zeytersparend diese Ionenquellen auch sein mögen, um komplexe Proben qualitativ und quantitativ analysieren zu können, ist eine chromatografische oder elektrophoretische Vortrennung sinnvoll. Neben der Reduzierung von Matrixeffekten ermöglicht der Vergleich der Retentionszeiten zudem noch eine Analyse von Isomeren (eine entsprechend leistungsstarke Trennung vorausgesetzt).

1.2

Ionisationsmethoden bei Atmosphärendruck-Massenspektrometern

In den letzten zehn Jahren wurden einige neue Ionisationsmethoden für Atmosphärendruck (AP)-Massenspektrometer entwickelt. Davon stehen manche nur in einigen Arbeitskreisen zur Verfügung, weshalb hier lediglich vier kommerziell erhältliche Ionenquellen näher vorgestellt werden sollen.

Die am weitesten verbreitete Atmosphärendruck-Ionisierungstechnik (API) ist ESI, gefolgt von APCI und APPI (atmospheric pressure photoionisation). Eine deutlich geringere Bedeutung hat die APLI (atmospheric pressure laser ionization), die allerdings für aromatische Verbindungen hervorragend geeignet ist und für z. B. die PAK (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe)-Analytik den Goldstandard darstellt. Dieses Ranking spiegelt mehr oder weniger die chemischen Eigenschaften der Analyten, die mit API-MS bestimmt werden, wider:

Die meisten Analyten aus dem pharmazeutischen und biowissenschaftlichen Bereich sind eher polar, wenn nicht sogar ionisch, und werden somit effizient mit ESI ionisiert (Abb. 1.2). Es besteht jedoch auch ein beträchtliches Interesse an API-Techniken zur effizienten Ionisierung von weniger oder gar nicht polaren Verbindungen. Für die Ionisation solcher Substanzen ist ESI weniger geeignet.

1.2.1

Übersicht API-Methoden

Ionisationsmethoden, die bei Atmosphärendruck arbeiten, wie z. B. die „atmospheric pressure chemical ionization“ (APCI) und die „electrospray ionization“ (ESI), haben den Anwendungsbereich der Massenspektrometrie sehr stark erweitert [17–20]. Durch diese API-Techniken können chromatografische Trennverfahren wie beispielsweise die Flüssigchromatografie (LC) leicht an Massenspektrometer gekoppelt werden.

Ein fundamentaler Unterschied zwischen APCI und ESI besteht im Ionisationsmechanismus. Bei der APCI erfolgt die Ionisierung des Analyten in der Gasphase nach der Verdampfung des Lösungsmittels. Bei ESI erfolgt die Ionisierung bereits in der flüssigen Phase. Beim ESI-Prozess werden i. d. R. durch Protonierung

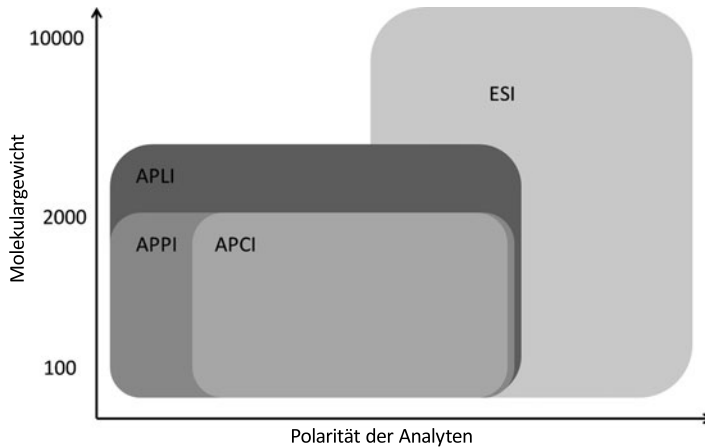


Abb. 1.2 Geeigneter Polaritätsbereich von Analyten für die Ionisation mit verschiedenen API-Techniken. Hinweis: Der erweiterte Massenbereich der APLI gegenüber APPI und APCI ergibt sich aus der Ionisation von unpolaren aromatischen Analyten in einem Elektrospray.

Reproduziert mit freundlicher Genehmigung von O.J. Schmitz, T. Benter, *Advances in LC-MS Instrumentation: Atmospheric pressure laser ionization*, *Journal of Chromatography Library*, Vol. 72 (2007), Chapter 6, Pages 89–113.

bzw. Deprotonierung Quasimolekülonen aus stark polaren Analyten gebildet. Eine Fragmentierung wird selten beobachtet. Dagegen erfolgt die Ionisierung von weniger polaren Substanzen bevorzugt mittels APCI durch Reaktion von Analyten mit Primärionen, die mithilfe einer Koronaentladung erzeugt werden. Die Ionisierungseffizienz von unpolaren Analyten ist mit beiden Techniken sehr gering.

Für diese Substanzklassen wurden andere Methoden entwickelt, wie beispielsweise die Kopplung der ESI mit einer elektrochemischen Vorstufe [21–32], das „coordination ionspray“ [32–47] oder die „dissociative electron capture ionization“ [38–42]. Die von Syage *et al.* [43, 44] vorgestellte Atmosphärendruck-Fotoionisation (APPI) bzw. die von Robb *et al.* [45, 46] als dopant-assisted (DA) APPI weiterentwickelte Methode stellen ein relativ neues Verfahren zur Fotoionisation (PI) von unpolaren Substanzen mittels Vakuum-UV (VUV)-Strahlung dar. Beide Techniken basieren auf der Einphotonenionisation, die schon seit Längerem in der Ionenmobilitätsmassenspektrometrie [47–50] und im Fotoionisationsdetektor (PID) [51–53] eingesetzt wird.

1.2.2 ESI

In der Vergangenheit war eines der Hauptprobleme massenspektrometrischer Analysen von Proteinen oder anderen Makromolekülen, dass deren Massen außerhalb des Massenbereiches der meisten Massenspektrometer lag. Um größere Moleküle wie beispielsweise Proteine analysieren zu können, musste eine Hydro-

lyse von Proteinen und dann die Analyse dieser Peptidmischungen durchgeführt werden. Durch ESI ist es nun möglich, auch große Biomoleküle ohne vorherige Hydrolyse ionisieren und mittels MS analysieren zu können.

Basierend auf Vorarbeiten von Zeleny [54], Wilson und Taylor [55, 56] im 20. Jahrhundert erzeugten Dole und Mitarbeiter hochmolekulare Polystyrolionen in der Gasphase aus einer Benzol-Aceton-Mischung des Polymers mittels Elektrospray [57]. Diese Ionisationsmethode wurde schließlich durch die Arbeiten von Fenn 1984 [58] etabliert und 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie belohnt.

Um den gesamten Vorgang der Ionenbildung bei ESI zu beschreiben, ist eine Unterteilung der Abläufe in drei Abschnitte sinnvoll:

- Bildung ladungstragender Tropfen
- Verkleinerung der Tropfen
- Bildung gasförmiger Ionen.

Um positive Ionen zu erzeugen, wird an die enge Kapillarspitze (10^{-4} m Außendurchmesser) eine Spannung von 2–3 kV zwischen Kapillare und dem MS-Eingang (Gegenelektrode) angelegt. In der aus der Kapillare austretenden Elektrolytlösung erfolgt eine Ladungstrennung, bei der Kationen an der Flüssigkeitsoberfläche angereichert und zur Gegenelektrode gezogen werden. Anionen wandern dagegen zum positiv geladenen Kapillarende und werden dort entladen bzw. oxidiert. Die Anreicherung von positiver Ladung an der Flüssigkeitsoberfläche ist Ursache der Bildung eines Flüssigkeitskonus, da die Kationen zum negativen Pol (Kathode) gezogen werden. Dieser sogenannte *Taylor-Konus* (Taylor cone) resultiert einerseits aus dem elektrischen Feld und andererseits aus der Oberflächenspannung der Lösung. Ab einer bestimmten Distanz zum Kapillarende erfolgt eine zunehmende Destabilisierung, und es werden Tropfen mit positiver Überschussladung in einem stabilen Spray emittiert. Die Größe der gebildeten Tropfen hängt ab von:

- der Flussrate der mobilen Phase und der Hilfsgase,
- der Oberflächenspannung,
- der Viskosität,
- der angelegten Spannung und
- der Konzentration des Elektrolyten.

Diese Tropfen verlieren durch Verdampfen Lösungsmittelmoleküle, und bei Erreichen des Raleigh-Limits (elektrostatische Abstoßung der Oberflächenladungen $>$ Oberflächenspannung) werden viel kleinere Tropfen (sogenannte Mikrotropfen) emittiert. Dies geschieht aufgrund von elastischen Oberflächenvibrationen der Tropfen die zur Bildung *Taylor cone*-ähnlicher Strukturen führen, s. Abb. 1.3.

Am Ende solcher Ausstülpungen werden kleine Tropfen gebildet, deren Masse-Ladungs-Verhältnis deutlich kleiner als beim „Muttertropfen“ sind. Durch diesen ungleichen Zerfall der „Muttertropfen“ erhöht sich pro Durchlauf von Tropfenbildung und Verdampfung bis zum Raleigh-Limit das Verhältnis von Oberflächenla-

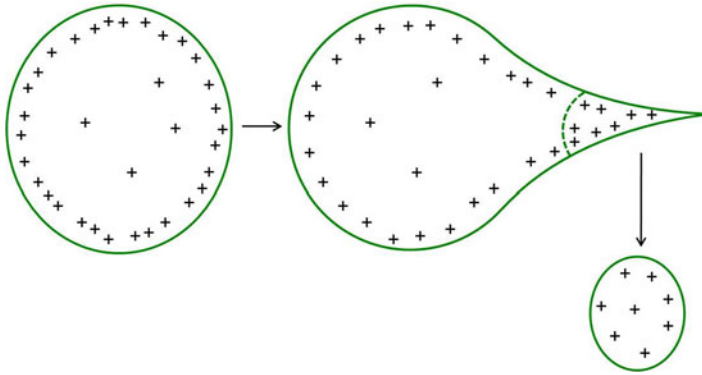


Abb. 1.3 Reduzierung der Tröpfchengröße.

dung zur Zahl gepaarter Ionen im Tropfen dramatisch. Somit sind nur die hochgeladenen Mikrotropfen für die letztlich erfolgende Ionenbildung verantwortlich.

Charakteristisch für den ESI-Prozess ist die Bildung von mehrfach geladenen Ionen bei großen Analytmolekülen. Daher findet man beispielsweise für Peptide und Proteine entsprechend ihrer Masse eine Serie von Ionensignalen, die sich jeweils um eine Ladung (normalerweise eine Addition eines Protons im Positivmodus oder Subtraktion eines Protons im Negativmodus) unterscheiden.

Für die eigentliche Bildung der gasförmigen Analytionen werden zurzeit zwei Mechanismen diskutiert. Zum einen der von Cole [59] und Kebarle und Peschke [60] vorgeschlagene „charged residue mechanism“ (CRM) und zum anderen der von Thomson und Iribarne [61] postulierte „ion evaporation mechanism“ (IEM). Beim CRM werden die Tropfen so lange reduziert, bis nur noch ein Analytmolekül im Mikrotropfen vorhanden ist, an das dann ein oder mehrere Ladungsträger addiert werden. Beim IEM werden die Tropfen bis zu einem sogenannten kritischen Radius ($r < 10$ nm) reduziert, und dann werden geladene Analytionen aus diesen Tropfen emittiert [62].

Essenziell für den Anwender ist, dass genügend Ladungsträger im Eluat vorhanden sind. Dies kann durch Zugabe von z. B. Ammoniumformiat zum Eluenten oder Eluat realisiert werden. Ohne diese Zugabe ist ESI zwar in Acetonitril-Wasser-Mischungen prinzipiell möglich (in MeOH/Wasser jedoch nicht), ein stabileres und reproduzierbareres Elektrospray mit einer höheren Ionenausbeute gelingt aber nur durch Zugabe von Ladungsträgern vor oder nach der HPLC (high performance liquid chromatography)-Trennung.

1.2.3

APCI

Bei dieser von Horning 1974 [63] eingeführten Ionisationsmethode wird das Eluat durch einen Verdampfer (400–600 °C) in die Ionenquelle eingebracht. Trotz der hohen Temperatur des Verdampfers wird nur selten eine Zersetzung der Probe

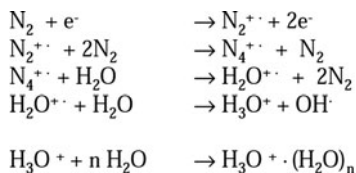


Abb. 1.4 Reaktionsmechanismus bei der APCI.

beobachtet, da die Energie für die Verdampfung des Lösungsmittels verbraucht wird und die Probe sich normalerweise nicht über 80–100 °C erwärmt [64]. Im Austrittsbereich des Gasstroms (Eluat und Analyt) ist eine Metallnadel (Korona) angebracht, an der eine Hochspannung angelegt ist. Gelangen die Lösungsmittelmoleküle in den Bereich der Hochspannung, bildet sich ein Reaktionsplasma nach dem Prinzip der chemischen Ionisation. Ist der Energieunterschied zwischen Analyten und Reaktantionen groß genug, werden die Analyten z. B. durch Protonentransfer oder Adduktbildung in der Gasphase ionisiert.

In der APCI wird anstelle des bei der GC-MS vorhandenen Filaments (CI) eine Koronaentladung zur Emission von Elektronen eingesetzt (Atmosphärendruck plus Sauerstoff würden zum schnellen Durchbrennen des Filamentes führen).

Mit Stickstoff als Sheath- und Nebulizer-Gas und atmosphärischem Wasserdampf (ist auch in Stickstoff 5.0 in ausreichender Menge vorhanden) in der APCI-Quelle werden durch Elektronenionisation primär N_2^+ und N_4^+ -Ionen gebildet. Diese kollidieren mit den verdampften Lösungsmittelmolekülen und formen sekundäre Reaktantgasen wie z. B. H_3O^+ und $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$ (Abb. 1.4).

Das häufigste Sekundärclusterion ist $(\text{H}_2\text{O})_2\text{H}^+$ zusammen mit signifikanten Mengen an $(\text{H}_2\text{O})_3\text{H}^+$ und H_3O^+ . Diese geladenen Wassercluster kollidieren mit den Analytmolekülen, wodurch es zur Bildung von Analytionen kommt:



Die hohe Kollisionsfrequenz resultiert in einer hohen Ionisationseffizienz der Analyten und führt zu Adduktionen mit nur wenig Fragmentierung.

Im Negativmodus bilden die Elektronen, die bei der Koronaentladung emittiert werden, mit Wassermolekülen in Gegenwart großer Menge von N_2 Hydroxidionen. Da die Gasphasenazidität von H_2O sehr gering ist, bilden die OH^- -Ionen in der Gasphase durch Protonentransferreaktion mit den Analyten H_2O und $[\text{M}-\text{H}]^-$ (mit $\text{M} = \text{Analyt}$) [64].

Problematisch bei der APCI ist die simultane Bildung von unterschiedlichen Adduktionen. So können je nach Eluentzusammensetzung und Matrixkomponenten beispielsweise Na^+ - und NH_4^+ -Addukte neben protonierten Analytmolekülen auftreten, wodurch die Auswertung erschwert wird. Und: MS/MS von Na^+ -Addukten liefert keine geladenen Fragmente.