

1

LC/MS-Kopplung

Oliver Schmitz, Markus M. Martin, Alban Muller, Andreas Hofmann

1.1

Stand der Technik in der LC/MS-Kopplung

Oliver Schmitz

1.1.1

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, Naturprodukte oder Umweltproben) erfüllen nur chromatographische 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], siehe dazu auch Abschnitt 1.1.2.

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 „atmospheric pressure chemical ionization“ (APCI)-Quelle als Energiequelle für die Verdampfung eingesetzt und die einzige Änderung gegenüber einer APCI-Quelle ist die Installation einer Einschiebmöglichkeit, 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 Atomen enthält, die mit der Probe interagieren können und so eine Desorption mit anschließender Ionisation der Probe mittels Penning-Ionisation [8] oder Protonentransfer 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] beschrieben, 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 Accurate-Mass Q-TOF eingesetzt. Im oberen Teil der Abbildung ist der TIC der gesamten Analyse und im unteren Teil exemplarisch das Massenspektrum zum Zeitpunkt 2,7 min dargestellt. Die Analyse wurde bei 40 °C gestartet und die Probe mit 1 °/s auf eine finale Temperatur von 400 °C aufgeheizt.

So nützlich und zeitersparend diese Ionenquellen auch sein mögen, um komplexe Proben quantitativ und qualitativ analysieren zu können, ist eine chromatographische 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).

1.1.2

Ionisationsmethoden bei Atmosphärendruck-Massenspektrometern

In den letzten 10 Jahren wurden einige neue Ionisationsmethoden für Atmosphärendruck (AP)-Massenspektrometer entwickelt. Davon stehen manche nur in

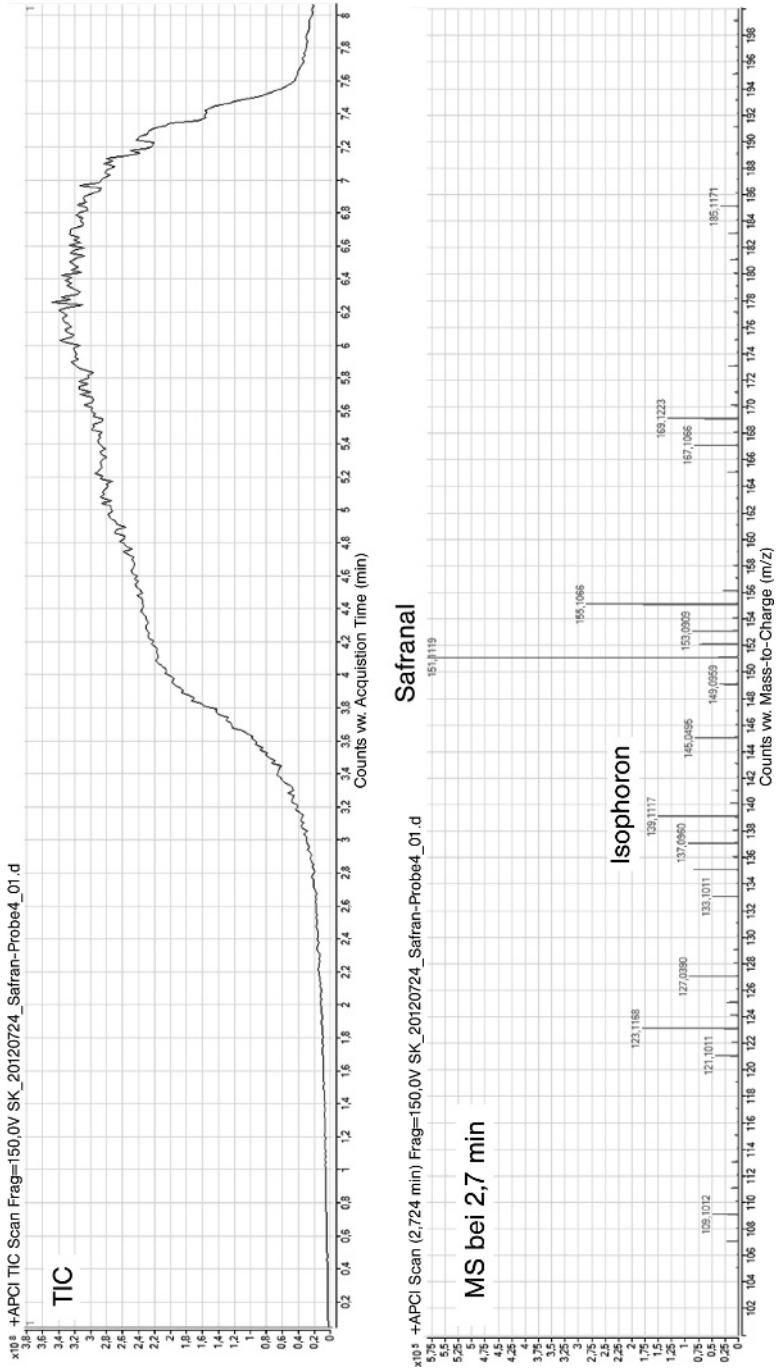


Abb. 1.1 Analyse von Safran mittels DIP-APCI und einem hochauflösenden qTOF-MS

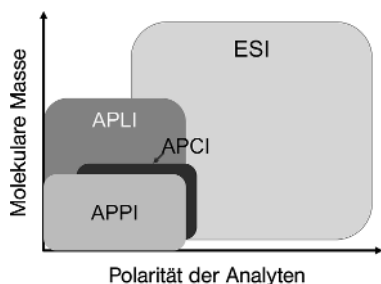


Abb. 1.2 Geeigneter Polaritätsbereich von Analyten für die Ionisation mit verschiedenen API-Techniken. Hinweis: Der erweiterte Massenbereich der APLI gegenüber APPI und APCI ergibt sich aus der Ionisation von unpolaren aromatischen Analyten in einem Elektrospray.

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 Atmosphärendruck-Photoionisation (APPI). Eine deutlich geringere Bedeutung hat die „atmospheric pressure laser ionization“ (APLI), die allerdings für aromatische Verbindungen hervorragend geeignet ist und z. B. für die PAK-Analytik den Gold-Standard 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 nicht-polaren Verbindungen. Für die Ionisation solcher Substanzen ist ESI weniger geeignet.

1.1.2.1 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 [16–19]. Durch diese API-Techniken können chromatographische Trennverfahren, wie beispielsweise die Flüssigchromatographie (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 findet die Ionisierung bereits in der flüssigen Phase statt. Beim ESI-Prozess werden in der Regel protonierte bzw. deprotonierte Molekülonen 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 Coronaentladung 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 [20–31], das „coordination ion-spray“ [31–46] oder die „dissociative electron-capture ionization“

[37–41]. Die von Syage et al. [42, 43] vorgestellte Atmosphärendruck-Photoionisation (APPI) bzw. die von Robb et al. [44, 45] als dopant-assisted (DA) APPI weiterentwickelte Methode, stellen ein relativ neues Verfahren zur Photoionisation (PI) von unpolaren Substanzen mittels Vakuum-UV (VUV)-Strahlung dar. Beide Techniken basieren auf der Einphotonenionisation, die schon seit Längerem in der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie [46–49] und im Photoionisationsdetektor (PID) [50–52] eingesetzt wird.

1.1.2.2 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 Hydrolyse 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 [53], Wilson und Taylor [54, 55] im 20. Jahrhundert erzeugten Dole und Mitarbeiter hochmolekulare Polystyrolionen in der Gasphase aus einer Benzol/Aceton-Mischung des Polymers mittels Elektrospray [56]. Diese Ionisationsmethode wurde schließlich durch die Arbeiten von Fenn 1984 [57] 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, der Kathode, gezogen werden. Dieser sog. 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 (sog. Mikrotropfen) emittiert (Abb. 1.3). Dies geschieht aufgrund elastischer Oberflächenvibrationen der Tropfen, die zur Bildung Taylor cone ähnlicher Strukturen führen.

Am Ende solcher Ausstülpungen werden kleinere Tropfen mit einem erheblich reduzierten Masse/Ladungs-Verhältnis gebildet. Durch Wiederholung dieses Prozesses erhöht sich das Verhältnis von Oberflächenladung zur Zahl der gepaarten 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 + Mode oder Subtraktion eines Protons im – Mode) unterscheiden.

Für die eigentliche Bildung der gasförmigen Analytionen werden zurzeit zwei Mechanismen diskutiert. Zum einen der von Cole [58] und Kobarle und Peschke [59] vorgeschlagene „charged residue mechanism“ (CRM) und der von Thomason und Iribarne [60] 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 sog. kritischen Radius ($r < 10$ nm) reduziert und dann geladene Analytionen aus diesen Tropfen emittiert [61].

Essenziell für den Anwender ist, dass genügend Ladungsträger im Eluat vorhanden ist. 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

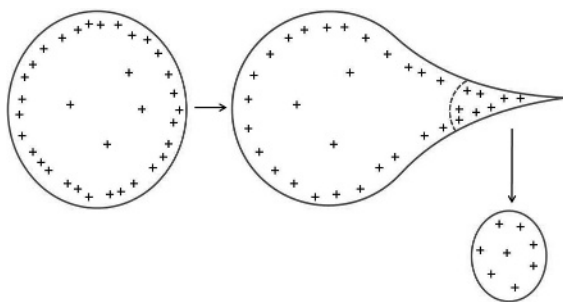


Abb. 1.3 Reduzierung der Tröpfchengröße

stabileres und reproduzierbareres Elektrospray mit einer höheren Ionenausbeute gelingt aber nur durch Zugabe von Ladungsträgern vor oder nach der HPLC-Trennung.

1.1.2.3 APCI

Bei dieser von Horning 1974 [62] 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 beobachtet, da die Energie für die Verdampfung des Lösungsmittels verbraucht wird und die Probe sich normalerweise nicht über 80–100 °C erwärmt [63]. Im Austrittsbereich des Gasstroms (Eluat und Analyt) ist eine Metallnadel (Corona) 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 Filaments (CI) bei der GC-MS eine Coronaentladung zur Emission von Elektronen eingesetzt (der Atmosphärendruck würde zum schnellen Durchbrennen des Filamentes führen).

Mit Stickstoff als Sheath- und Nebulizer-Gas und atmosphärischem Wasserdampf (ist auch im 5.0 Stickstoff in ausreichender Menge vorhanden) in der APCI-Quelle werden durch Elektronenionisation primär $N_2^{+ \cdot}$ - und $N_4^{+ \cdot}$ -Ionen gebildet. Diese kollidieren mit den verdampften Lösungsmittelmolekülen und formen sekundäre Reaktantgasionen, wie z. B. H_3O^+ und $(H_2O)_nH^+$ (Abb. 1.4).

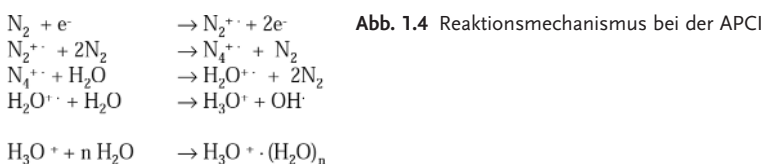
Das häufigste Sekundär-Clusterion ist $(H_2O)_2H^+$ zusammen mit signifikanten Mengen an $(H_2O)_3H^+$ und H_3O^+ . Diese geladenen Wassercluster kollidieren mit den Analytmolekülen, wodurch es zur Bildung von Analytationen kommt:



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

Im Negativ-Mode bilden die Elektronen, die bei der Coronaentladung emittiert werden, mit Wassermolekülen in Gegenwart großer Mengen von N_2 OH^- -Ionen. Da die Gasphasenazidität von H_2O sehr gering ist, bilden die OH^- -Ionen in der Gasphase durch Protonentransferreaktion mit den Analyten H_2O und $[M - H]^-$ (mit M = Analyt) [63].

Problematisch bei der APCI ist die simultane Bildung von unterschiedlichen Adduktionen. So können je nach Eluentzusammensetzung und Matrixkomponen-



ten beispielsweise Na^+ - und NH_4^+ -Addukte neben protonierten Analytmolekülen auftreten, wodurch die Auswertung erschwert wird.

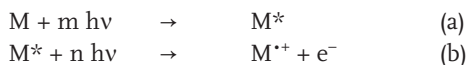
1.1.2.4 APPI

Die APPI ist für die Ionisation von unpolaren Analyten geeignet, wobei die Photoionisation eines Moleküls M zur Bildung des Molekül-Radikalkations $M^{+\bullet}$ führt. Wenn die Ionisierungspotenziale (IP) aller anderen Matrixbestandteile größer als die Photonenenergie sind, ist dieser Ionisationsprozess spezifisch für den Analyten. In der APPI können allerdings sehr unterschiedliche Prozesse die Detektion von $M^{+\bullet}$ stark beeinflussen. Zum einen können in der Gegenwart von Lösungsmittelmolekülen und/oder anderen im großen Überschuss vorhandenen Komponenten Ionen-Molekül-Reaktionen ablaufen. Zum anderen werden VUV-Photonen effizient von der Gasphasenmatrix absorbiert. So wurde z. B. beobachtet, dass in der APPI in Gegenwart von Acetonitril (häufiger Eluent in der HPLC) hauptsächlich $[M + H]^+$ gebildet wird, obwohl das IP von CH_3CN mehr als 2,2 eV über der vorhandenen Photonenenergie liegt [64]. Generell wird in der APPI bei polaren, in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ -Mischungen gelösten Verbindungen meistens die Bildung von $[M + H]^+$ beobachtet, während unpolare Verbindungen, wie beispielsweise Naphthalin, normalerweise $M^{+\bullet}$ bilden [65]. Ein detaillierter Mechanismus zur Bildung von $[M + H]^+$ wurde von Syage vorgeschlagen [66]. Die Ionenausbeute ist bei der APPI aufgrund des limitierten VUV-Photonenflusses und den Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen eingeschränkt. Daher wurde von Bruins und Mitarbeitern die „dopant-assisted atmospheric-pressure photoionization“ (DA-APPI) [65] als neue Ionisationsmethode eingeführt. Hier wird die Gesamtzahl an Ionen, die durch die VUV-Strahlung gebildet wird, durch Zugabe einer direkt zu ionisierenden Komponente (Dopant) deutlich erhöht. Wird der Dopant so ausgewählt, dass die resultierenden Dopantphotoionen eine relativ hohe Rekombinationsenergie bzw. eine geringe Protonenaffinität haben, dann kann das Dopantion durch Ladungsaustausch oder Protonentransfer die zu analysierenden Verbindungen ionisieren. Neben Aceton und Toluol erwies sich Anisol als sehr effektiver Dopant bei der APPI [67]. Durch Zugabe eines Dopants kann zwar die Sensitivität erhöht werden, aber die möglichen Adduktbildungen führen oftmals zu deutlich komplizierteren APPI-Massenspektren [44, 65, 67]. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der direkte Protonentransfer von primär gebildeten Dopantionen nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt, vielmehr scheint eine sehr komplexe, thermodynamisch kontrollierte Clusterchemie zu dominieren.

1.1.2.5 APLI

Die „atmospheric pressure laser ionization“ (APLI) wurde 2005 entwickelt [68]. Dabei handelt es sich um eine weiche Ionisierungsmethode mit einfach zu interpretierenden Spektren für unpolare aromatische Substanzen, bei der Fragmentierungen der Analyten nur untergeordnet auftreten. APLI basiert auf der resonanzverstärkten Mehrphotonenionisation (REMPI), allerdings bei Atmosphärendruck.

Die REMPI-Methode erlaubt die empfindliche und selektive Ionisierung von zahlreichen Verbindungen. Dabei wird z. B. folgender Ansatz genutzt:



Die Reaktionen (a) und (b) repräsentieren einen klassischen $(m + n)$ resonanzverstärkten Mehrphotonen-Ionisations (REMPI)-Prozess, der mit $n = m = 1$ häufig sehr vorteilhaft zur Ionisierung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) eingesetzt wird. Da die Absorptionsbanden von PAK bei Raumtemperatur relativ breit sind, können aufgrund der hohen molekularen Absorptionskoeffizienten im nahen UV und der relativ langen Lebensdauer der S_1 - und S_2 -Zustände häufig Festfrequenzlaser für die Anregung genutzt werden, beispielsweise die 248 nm Linie eines KrF-Excimerlasers. Unter diesen Bedingungen kann eine nahezu selektive Ionisation von aromatischen Kohlenwasserstoffen erreicht werden. Ein großer Vorteil der APLI im Vergleich zur APPI ist, dass weder Stickstoff und Sauerstoff noch die typischerweise in der HPLC eingesetzten Lösungsmittel (z. B. Wasser, Methanol, Acetonitril) im verwendeten Wellenlängenbereich merkliche Absorptionsquerschnitte aufweisen. Eine Schwächung der Photonendichte innerhalb der Ionenquelle, d. h. eine merkliche Einkopplung von elektronischer Energie in die Matrix, wie in der APPI beobachtet, findet in der APLI nicht statt. Die APLI ist sehr sensitiv bei der Bestimmung von PAKs und stellt daher eine wertvolle Alternative zur APCI und APPI dar. Die APLI ist aber nicht nur auf die Analyse einfacher aromatischer Verbindungen beschränkt. Es können auch komplexere oligo- oder polymere Strukturen sowie metallorganische Verbindungen analysiert werden [69]. Zudem besteht die Möglichkeit Analyten über ihre funktionelle Gruppe mit sog. Ionisationsmarkern, in Analogie zu Fluoreszenzderivatisierung, zu modifizieren und dann über den aromatischen Ionisationsmarker auch nicht-aromatische Substanzen mittels APLI zu ionisieren [70]. Dabei profitiert man von der Selektivität der Ionisierung (nur aromatische Systeme) und der herausragenden Sensitivität der Methode. Auch wurde bereits die parallele Ionisation von Probenbestandteilen mit ESI bzw. APCI und APLI realisiert [71, 72]. Dadurch können sowohl polare (ESI) bzw. nicht-aromatische mittelpolare Analyten (APCI) gemeinsam mit Aromaten (APLI) einer massenspektrometrischen Detektion zugänglich gemacht werden.

1.1.2.6 Bestimmung der Ionensuppression

Bei vielen massenspektrometrischen Analysen von komplexen Proben erschwert die Ionensuppression die Quantifizierung und erfordert oftmals eine aufwendige Probenvorbereitung. Es sollte deshalb immer im Vorfeld untersucht werden, ob es zu einem signalreduzierenden Einfluss der Matrix kommt.

Für diese Untersuchung wird hinter der Trennsäule über ein T-Stück eine mittels HPLC-Pumpe geförderte Analytlösung mit dem durch die Trennsäule transportierten Eluat/Matrix-Gemisch vermischt und die Massenspur des Analyten detektiert. Nach dem Passieren der Säule werden die getrennten Matrixbestandteile im T-Stück mit der Analytlösung vermischt und gelangen dann gemeinsam in die Ionenquelle. Die Intensitätsänderung der Analyt-Massenspur vor und nach der Injektion der Matrix gibt Auskunft über eine evtl. stattfindende Ionensuppression.

Abbildung 1.5 zeigt die Ionensuppressionsbestimmung einer PAK-Analyse in Urin mit APCI-qTOF. Im Analysenbereich von 80 und 400 s sinkt die Massenspur deutlich ab und erreicht erst ab ca. 450 s wieder das normale Niveau. Somit eluieren zwischen 80 und 400 s störende, also Ionensuppression verursachende, Matrixbestandteile des Urins von der Trennsäule.

1.1.2.7 Beste Ionisationsmethode für die jeweilige Fragestellung

Anhand von Abb. 1.2 kann grob abgeschätzt werden, mit welcher Methode die interessierenden Analyten am effektivsten ionisiert werden können. Je nach Polarität werden die Analyten dabei sinnvollerweise mit ESI (polare), APCI (mittelpolare), APPI (unpolare) oder mit APLI (Aromaten) ionisiert. Allerdings spielt auch die Matrix bei dieser Entscheidung eine wichtige Rolle. Bei komplexen Proben ist eine mögliche Ionensuppression bei der Elektrospray-Ionisation wahrscheinlicher bzw. stärker ausgeprägt als bei den anderen hier besprochenen Ionisationsmethoden. Auch spielt die Ionenstrahlführung im Einlassbereich des Massenspektrometers eine wichtige Rolle. So zeigen ESI-Ionenquellen mit einem Z-Spray-Einlass oftmals weniger Ionensuppression als normale ESI-Ionenquellen. Auch der Eluatfluss muss der jeweiligen Ionenquelle angepasst werden. So können bei APCI-Quellen oftmals etwas höhere Flüsse als bei ESI-Quellen eingesetzt werden. Auch wenn Gerätehersteller andere Flussraten versprechen, ist es hinsichtlich Spraystabilität, Reproduzierbarkeit und Ionensuppression sicherlich sinnvoll ESI-Quellen mit Flüssen unter 300 µL/min und APCI-, APPI- und APLI-Quellen mit Flüssen unter 500 µL/min zu betreiben. Natürlich können applikationsbedingt auch größere Flüsse eingesetzt werden, woraus sich allerdings oftmals die genannten Probleme ergeben.

1.1.3

Massenanalysatoren

Am häufigsten werden folgende Massenspektrometer routinemäßig mit der LC gekoppelt:

- Quadrupol
- Triplequad
- IonTrap
- oaTOF
- Orbitrap

Hinsichtlich Empfindlichkeit und Preis-Leistungs-Verhältnis (inkl. Wartung) ist ein Quadrupol-MS eine sehr sinnvolle Anschaffung. Im Single Ion Mode (SIM) werden sehr gute Sensitivitäten erreicht und bei einem schnellen Quadrupol (ab ca. 25–50 Hz) kann sogar die UHPLC als schnelle Trennmethode mit dem Quadrupol gekoppelt werden.

Eine auf dem Quadrupol-MS basierende Weiterentwicklung stellen die Triple-quadrupol-Massenspektrometer dar, die vor allem bei der Targetanalytik in kom-

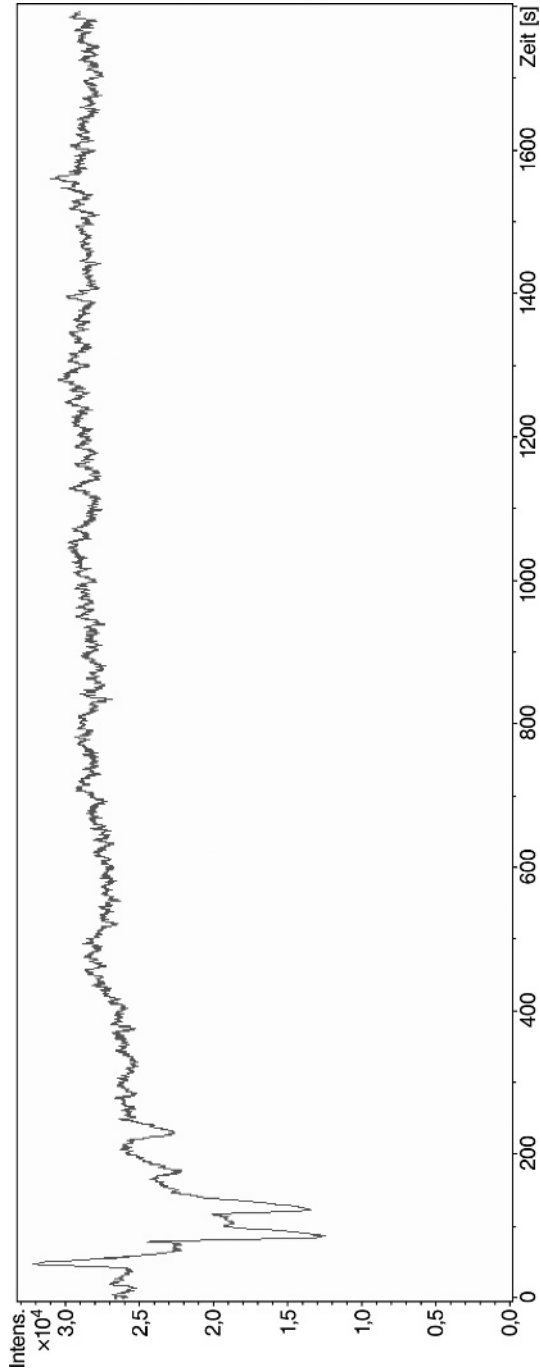


Abb. 1.5 Ionensuppression von PAK im Urin bei APCI-MS Analysen

plexen Proben eine immer größere Rolle spielen. Es wird weitestgehend auf Probenvorbereitung und Vortrennung verzichtet und die Potenziale des ersten und dritten Quadrupols werden so eingestellt, dass jeweils nur eine bestimmte Masse durchgelassen wird. Dabei handelt es sich beim ersten Quadrupol um das Ion des Targetanalyten und im dritten Quadrupol um ein charakteristisches Fragment dieses Ions, welches im zweiten Quadrupol durch Stöße mit Argon induziert wird. Durch die Analyse des Fragmentions wird das chemische Rauschen (Matrix) stark reduziert und Triplequadrupol-Massenspektrometer zählen somit zu den sensitivsten und selektivsten Massenspektrometern. Für einige Analyten sind bereits Nachweisgrenzen im Zeptomol-Bereich (Stoffmenge auf der Trennsäule) realisiert worden.

Ähnlich wie ein Quadrupol ist ein Ionenfallen-Massenspektrometer oder Ion-Trap-MS aufgebaut. Die Ionen werden allerdings in der Trap gesammelt und dann kann entweder ein Massenscan oder eine ein- bzw. mehrfache Fragmentierung des Targetanalyten durchgeführt werden. Moderne IonTrap-MS-Systeme zeichnen sich durch eine sehr gute Linearität und Sensitivität und eine schnelle Datenaufnahme (z. B. 20 Hz) aus und können somit sogar mit der UHPLC gekoppelt werden. Besonders geeignet sind sie für Strukturaufklärung von Biomolekülen (Zuckern, Peptide etc.).

Time-of-Flight (TOF)-Massenspektrometer erfahren seit ca. 20 Jahren eine ungebrochene Renaissance, was mit der orthogonalen Ionenstrahlführung im Gerät zusammenhängt. Dadurch wurde es möglich, auch kontinuierliche Ionenquellen, wie z. B. ESI und APCI ohne Auflösungsverlust an ein TOF-MS zu koppeln. In letzter Zeit wurde durch die Einführung von Repellern, Ion Funneln, leistungsstärkere Elektronik etc. die Auflösung immer weiter verbessert, sodass mittlerweile mehrere Hersteller TOF-MS-Systeme mit Auflösungen zwischen 40 und 50.000 anbieten und dabei Aufnahmezeiten von 20 Hz und mehr realisieren. Somit sind diese Geräte hervorragend für die Kopplung von schnellen Trennverfahren, wie UHPLC, geeignet und können aufgrund der hohen Auflösung und Massengenauigkeit (< 1 ppm) auch Hilfestellungen bei der Identifizierung von unbekannten Probenbestandteilen geben.

Der neueste Massenanalysator ist das LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer (LTQ = linear trap quadrupole). Bei diesem wird die handelsübliche LTQ mit einer von Makarov entwickelten Ionenfalle gekoppelt [73, 74]. Die Ionen werden in der Orbitrap nicht, wie bei üblichen Ionenfallen mit magnetischen, sondern mit elektrischen Feldern gesammelt. Aufgrund des Auflösungsvermögens (> 100.000) und der hohen Massengenauigkeit (2–5 ppm) kann die Orbitrap beispielsweise zur Identifikation von Peptiden in Proteinanalysen oder für Metabolom-Studien eingesetzt werden. Zusätzlich kann die Selektivität durch MS/MS-Experimente noch stark verbessert werden. Allerdings ist die Kopplung mit der UHPLC für eine schnelle chromatographische Vortrennung nicht sinnvoll, da die Datenaufnahmerate zu gering ist, um die schmalen Signale der UHPLC reproduzierbar integrieren zu können.

Neben einigen weiteren Massenspektrometern werden auch noch FT-ICRMS-Geräte eingesetzt. Letztere hat neben sehr hohen Anschaffungs- und Betriebskosten (z. B. Helium) noch den Nachteil einer geringen Datenaufnahmerate

(gleiches Problem wie beim Orbitrap), weshalb die Kopplung mit einer schnellen Analytik, wie beispielsweise die UHPLC, nicht realisiert werden kann. Allerdings sind sie hinsichtlich Auflösung ungeschlagen und ein extrem nützliches Werkzeug in der Metabolom-Forschung.

1.1.4

Zukünftige Entwicklungen

Der Trend im Bereich Massenspektrometer geht zurzeit eindeutig in Richtung höherer Auflösung und schnellerer Datenaufnahme.

Bei TOF-MS werden zukünftig sicher Auflösungen von über 100.000 und Datenraten von 20–40 Hz erzielt werden können. Bei der Orbitrap ist zu vermuten, dass durch eine noch präzisere Produktion der Zelle Auflösungen über 1.000.000 möglich sein werden. Dadurch könnte dann durch eine Verkürzung der Scangeschwindigkeit, die mit einem Auflösungsverlust einhergeht, auch eine schnelle Vortrennung (UHPLC) eingesetzt werden, die hinsichtlich Auflösung mit den TOF-MS-Systemen konkurrieren kann.

Durch Vorschalten einer Ionenmobilitätsspektroskopie (IMS) vor einem qTOF-MS wird eine weitere Trenndimension realisiert. Durch die strukturabhängige Driftzeit durch das IMS können auch vor der Ionisation nicht getrennte Isobare voneinander getrennt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt in den zukünftigen Entwicklungen wird die Optimierung der Ionenquellen hinsichtlich Ionenerzeugung und Ionentransport bei unterschiedlichen Flüssen (Nano-, Mikro-HPLC, LCxLC) und für den Einsatz der wieder an Bedeutung gewinnenden super critical fluid chromatography (SFC) sein, um die Sensitivität weiter zu verbessern.

1.1.5

Worauf sollten Sie beim Kauf eines Massenspektrometers achten?

Neben dem zur Verfügung stehenden Budget spielen meiner Auffassung nach folgende Punkte bei der Kaufentscheidung eine zentrale Rolle:

- 1) Soll eine Targetanalyse oder eine umfassende Analyse der Probe durchgeführt werden?
- 2) Notwendige Sensitivität
- 3) Software
- 4) Probendurchsatz
- 5) MS-Analyse mit oder ohne vorgeschaltete Trennverfahren?

Sollten nur Targetanalysen (also z. B. Analytik von bekannten Verunreinigungen in einem Produkt oder Pestizidanalytik) geplant sein, so würde ein Quadrupol- oder Triplequad-MS die beste Wahl darstellen. Mit diesen Geräten kann eine sehr sensitive Analyse gewährleistet werden und auch eine schnelle Vortrennung (z. B. UHPLC) ist bei vielen Geräten mittlerweile möglich.

Sollen unbekannte Proben auf Inhaltsstoffe untersucht werden, würden hochauflösende Massenspektrometer, wie das qTOF oder die Orbitrap die Analyse merklich erleichtern. Wenn auch noch ein hoher Probendurchsatz notwendig ist, würde das qTOF den Vorrang vor dem im hochauflösenden Modus langsamen Orbitrap bekommen. Hinsichtlich Auflösung ist die Orbitrap den qTOF-Systemen allerdings etwas überlegen. Die Sensitivität eines qTOFs und der Orbitrap ist ca. Faktor 10–50 schlechter als die eines Quadrupols bzw. Triplequads, aber Nachweisgrenzen im unteren ppb-Bereich sind sehr wohl möglich.

Wenn, z. B. aufgrund eines hohen Probenaufkommens auf eine Vortrennung verzichtet werden soll, ist darauf zu achten, dass geeignete sog. Ambient Desorption Ionization Techniques wie DESI, DART, ASAP, DIP-APCI etc. an das MS gekoppelt werden können.

Schließlich gibt es noch große Unterschiede bei der jeweiligen MS-Software. Hier sollte sich der User vorab einen Überblick über die Stärken und Schwächen der Software geben lassen.

Neben dem Preis sollten auch die Betriebskosten bei der Anschaffung berücksichtigt werden: neben einem hohen Stickstoffverbrauch beispielsweise auch die jährliche Wartung des Massenspektrometers. Allein die Wartung führt je nach Aufwand und Hersteller zu jährlichen Kosten in Höhe von 5–20.000 €.

1.2

Technische Aspekte und Fallstricke der LC/MS-Kopplung

Markus M. Martin

Seit fast zwei Dekaden ist die Kopplung der Flüssigchromatographie (LC) mit der Massenspektrometrie (MS) nun kommerzialisiert. Erforderten die ersten marktverfügbaren Anlagen noch ausgeprägtes Expertenwissen und kamen dadurch ausschließlich in hochspezialisierten Forschungslaboratorien zum Einsatz, so wurden über die Jahre durch intensive Forschungs- und Entwicklungsarbeit die Robustheit und Benutzerfreundlichkeit von LC/MS-Systemen so sehr verbessert, dass LC/MS-Techniken auch aus vielen Routineanwendungen heutzutage nicht mehr wegzudenken sind. Dies ist umso bemerkenswerter, wenn man sich vor Augen führt, wie unterschiedlich die Welten der Trennung in der Flüssigphase via LC und in der Gasphase via MS sind. Sowohl Flüssigchromatographen als auch Massenspektrometer haben heutzutage einen hohen Grad an technischer Perfektion erreicht, der es auch dem weniger erfahrenen Anwender ermöglicht, in moderater Einarbeitungszeit zu verlässlichen Ergebnissen zu kommen, und doch ist die Liste der möglichen Fehlerquellen in der LC/MS-Kopplung bis heute umfangreich. Sie beginnt mit der Auswahl einer ungeeigneten Instrumentierung und endet mit der falschen Interpretation von Messergebnissen. Während manche Fehlerquellen instrumenten-, methoden- oder anwendungsspezifisch sind – man denke als Beispiel nur an die zahllosen Varianten von Matrixeffekten im Bereich der Lebensmittelanalytik –, deren individuelle Behandlung den Umfang dieses Abschnitts sprengen würde, sind andere Aspekte eher grundlegender Natur. Ihnen soll dieses Kapitel gewidmet sein.

1.2.1

Apparative Gesichtspunkte**1.2.1.1 Das passende Massenspektrometer zur analytischen Fragestellung**

Jeder Handwerker weiß: Das richtige Werkzeug macht den Unterschied. Wer einmal versucht hat, eine zöllige Sechskantschraube mit einem metrischen Gabelschlüssel anzuziehen, wird diese Aussage aus eigener Erfahrung bestätigen. Gleiches gilt für den Analytiker im Laboralltag. Fünf verschiedene Funktionsprinzipien von Massenanalysatoren teilen sich gegenwärtig den Markt für LC/MS-Anwendungen: Quadrupol (Q), Ionenfalle (IT), Flugzeit (TOF), Orbitrap und Ionencyclotronresonanz (ICR). Diese Lösungen bewähren sich in den meisten LC/MS-Instrumenten, häufig in unterschiedlicher Bauweise (z. B. sphärische Ionenfalle, QIT vs. lineare Ionenfalle, LIT) oder Kombination (wie Tripel-Quadrupol, QqQ, Quadrupol-Flugzeit, Qq-TOF, Ionenfalle-Orbitrap, LIT-Orbitrap u. v. m.). Jede Gerätelösung hat Stärken und Schwächen, die sie für bestimmte Einsatzzwecke mehr, für andere weniger empfehlen. Einen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Technik gibt der vorangehende Abschnitt 1.1 ebenso wie weiterführende Fachliteratur [75, 76]. Ungeachtet des jeweiligen Anwendungsgebietes lässt sich jedoch jede analytische Fragestellung, die nach massenspektrometrischer Detektion verlangt, auf eine der beiden folgenden Aspekte zurückführen: das möglichst empfindliche und selektive Detektieren bereits bekannter Verbindungen zur Quantifizierung oder die Identifizierung und Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen. Kombiniert man diese Aufgaben mit den Möglichkeiten der UHPLC, also hohe Trennleistung und/oder hohe Analysengeschwindigkeit, bekommen diese beiden Anwendungsszenarien den Charakter eines Screenings, bei dem komplexe Proben mit möglichst geringem Aufarbeitungsaufwand (dilute-and-shoot) und hohem Durchsatz untersucht werden. Mit der Komplexität der Probenzusammensetzung und der geforderten Analysengeschwindigkeit müssen auch die Fähigkeiten des verwendeten Massenspektrometers wachsen. Es spricht grundsätzlich wenig dagegen, in einer vergleichsweise schlichten Probe mit einer geringen Anzahl von Komponenten einen simplen Single-Quadrupol zur Quantifizierung einzusetzen. Die meisten dieser Geräte erreichen im Single Ion Monitoring Modus (SIM) sehr niedrige Nachweisgrenzen, und solange es zu einer bestimmten Masse eines ionisierten Moleküls nur eine einzige bekannte molekulare Spezies in der Probe geben *kann*, erhält man bereits mit diesem MS-Typ ein verlässliches Ergebnis. Um ein Extrem vom anderen Ende der MS-Leistungsskala zu bemühen: Ist die Messdauer kein limitierender Faktor, kann prinzipiell auch mit einem Fourier-Transformation-Ionencyclotronresonanz-(FTICR-)Massenspektrometer außerordentlich nachweisstark in der Routine quantifiziert werden, selbst wenn dies angesichts der hohen Gesamtkosten dieses Gerätetyps an Dekadenz grenzen mag. Sobald jedoch der Bedarf entsteht, möglichst viele Informationen über eine komplexe Probe in einer geringen Anzahl von Analysenläufen zusammenzutragen, bedarf es zusätzlicher technischer Möglichkeiten für eine möglichst spezifische Detektion bei der Quantifizierung oder eine exakte Substanzinformation bei hoher Analysengeschwindigkeit. Der erste Fall

wird häufig als Targeted Screening bezeichnet, der zweite, das „Fischen im Trüben nach Unbekanntem“, als Screening for Unknowns. Für beide Gebiete werden Tandem-MS-taugliche Massenspektrometer unterschiedlicher Bauart eingesetzt.

Für das *Targeted Screening*, bei dem der Fokus vollständig auf der Quantifizierung der Zielanalyten liegt, empfehlen sich alle MS-Bautypen, bei denen zwei Massenanalysatoren eine Stoßzelle zur kollisionsinduzierten Fragmentierung („collision-induced dissociation“, CID) flankieren – also Geräte, die Tandem-MS im Raum ermöglichen. Von allen MS/MS-Betriebsmodi, die diese Instrumente anbieten, kommt beim Targeted Screening das „selected reaction monitoring“ (SRM), gelegentlich auch „multiple reaction monitoring“ (MRM) genannt, am häufigsten zum Einsatz. Kennt man die idealerweise spezifischen Zerfallsprodukte (fragment ions) der gesuchten Analytionen, nachdem diese in der Stoßzelle durch Kollision mit einem inerten Stoßgas (man bevorzugt hier das schwerere Argon gegenüber dem deutlich leichteren Stickstoff) zur Schwingung und Dissoziation angeregt wurden, so programmiert man die beiden Massenanalysatoren als Filter, und zwar den Filter vor der Stoßzelle auf die Masse des intakten Ions der gesuchten Verbindung (Vorläuferion, sog. precursor ion) und den danach auf die Massen der Fragmentionen. Dadurch wird neben der Substanzspezifität der Detektion dank der eindeutigen Kombination aus Precursor- und Fragmentionen auch eine außerordentliche Empfindlichkeit erzielt: Zum einen steht der gesamte Messzyklus des Massenspektrometers (duty cycle) nur dem ausgewählten Analyten zur Verfügung, womit mehr Ionen detektiert werden als in einem Fullscanbetrieb. Zum anderen werden ungewünschte Störionen, die ansonsten zum Untergrundrauschen beitragen, bestmöglich ausgefiltert. Bis heute ist dieser Einsatzzweck die Domäne von Tripel-Quadrupol-Massenspektrometern, die Qq-TOF-Geräten oder anderen Bautypen hinsichtlich Empfindlichkeit überlegen sind. Insbesondere Ionenfallen-Massenspektrometer, die prinzipiell dank ihrer Fähigkeit zu Tandem-MS bzw. MS^n in Zeit ebenfalls sehr spezifisch Substanzinformationen sammeln können, sind aufgrund ihres begrenzten linearen Messbereichs für Quantifizierungsaufgaben wenig geeignet. Zudem versagen Ionenfallen prinzipbedingt bei allen MS/MS-Betriebsmodi, die als ersten MS-Experimentschritt einen Scanprozess voraussetzen. Wer für seine Analytik einen „echten“ Vorläuferionenscan (precursor ion scan) oder Neutralverlustscan (constant neutral loss scan) einsetzen will oder muss (und keine softwareaufbereiteten Ergebnisse von sequenziellen MS^n -Experimenten einer Ionenfalle, die diese Modi simulieren sollen), ist auf ein Tandem-MS-in-Raum-Gerät vom Schlage eines Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers oder artverwandter Maschinen angewiesen. Ergänzend sei angemerkt, dass je nach Molekülgröße der Zielanalyten verschiedene MS/MS-Bauarten den Vorzug erhalten. Bei kleinen Molekülen, gemeinhin leichter als 1000–1200 Da, spielt ein Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer seine Vorteile hinsichtlich Robustheit, Empfindlichkeit und Kosten aus. Bei größeren und Makromolekülen hingegen erweist sich der nach oben hin recht begrenzte Massenbereich von Tripel-Quadrupolen als Nachteil, sodass hier auch und gerade Qq-TOF- und Orbitrap-Maschinen für die Quantifizierung besser geeignet sind.

Einen anderen Schwerpunkt setzt das *Screening for Unknowns*. Hier gilt es primär, möglichst viele Informationen zu einer unbekannten Substanz aus dem Massenspektrum zu gewinnen. Die wichtigsten Angaben hierzu sind

- die *Elementarzusammensetzung*, die aus einer möglichst exakten und hochauflösten Massenmessung (HR/AM, high resolution/accurate mass) ermittelt werden kann,
- *molekulare Substrukturen*, die durch MS/MS- oder MSⁿ-Experimente nach CID bestimmt werden können sowie
- die *Intensitätsverteilung der Isotopensignale* der Verbindung, die in Kombination mit der Akkuratmassenmessung die berechnete Elementarzusammensetzung absichert.

Wie bereits in Abschnitt 1.1 geschildert, sind bis heute zur HR/AM-Messung nur Flugzeit-(TOF-), Orbitrap- und Ionencyclotronresonanz-(FTICR-)Massenanalysatoren mit hinreichender Massengenauigkeit (< 5 ppm) und -auflösung imstande. In Kombination mit vorgeschalteten Quadrupolfiltern und einer Kollisionszelle wird zusätzlich die Messung von CID-Fragmentspektren möglich, welche Hinweise auf Teilstrukturen geben und damit eine Strukturaufklärung erleichtern. Messgeschwindigkeit und Auflösung R verhalten sich bei diesen drei MS-Typen gegenläufig: Während TOF-Geräte bis heute die schnellsten MS-Geräte darstellen (bis zu 200 Hz), gefolgt von Orbitraps (bis zu 12 Hz) und FT-ICR (ggf. 1 Hz und darunter), sind Letztere die mit Abstand auflösungsstärksten ($R > 10^6$), gefolgt von Orbitraps (R bis zu 450.000) und TOFs (R bis zu 80.000). Flugzeit-Massenanalysatoren sind dabei sehr anfällig gegenüber minimalen Änderungen der Umgebungsbedingungen. Dehnt sich (oder schrumpft) durch Temperaturschwankungen das Flugrohr auch nur im Mikrometerbereich, leidet darunter die Genauigkeit der Massenbestimmung (korrekt: der Messung des Masse/Ladungs-Verhältnisses) erheblich, ebenso die Auflösung. Eine exakte Massenbestimmung erfordert bei TOF-Geräten daher neben einer optimalen Raumthermostatisierung (man beachte z. B. die Sonneneinstrahlung durch Laborfenster!) eine regelmäßige Kalibrierung, u. U. im Stundenrhythmus oder häufiger. Da die Massendrift bei Flugzeitgeräten oft schon innerhalb des Zeitfensters eines chromatographischen Laufs messbar wird, ist für höchste Genauigkeit neben der externen Kalibrierung der Massenzuordnung die interne Kalibrierung, bei der bekannte Massenkalisationssubstanzen kontinuierlich der Messung zugeführt werden, meist unvermeidlich. Manche TOF-Geräte bieten dazu die Möglichkeit, mittels einer Revolverblende in der Ionenquelle kontinuierlich eine Massenkalisationslösung als sog. Lock-Spray zuzuführen. Alternativ kann die Kalibrationslösung auch über ein T-Stück nach der Trennsäule dem LC-Eluat beigemischt werden. Zur Auswertung wird dann quasi jedes m/z -Verhältnis innerhalb eines Spektrums bzw. eines LC/MS-Chromatogramms mit den zeitgleich gemessenen, bekannten m/z -Verhältnissen der Massenkalisanten abgeglichen. Nur so ist bei TOF-Geräten tatsächlich die höchste spezifizierte Massengenauigkeit gewährleistet. Orbitrap-Geräte dagegen zeichnen sich aufgrund ihrer fundamental anderen Bau- und Funktionsweise durch

eine deutlich höhere Robustheit gegenüber wechselnden Umgebungsbedingungen aus, sodass in der Regel eine Kalibrierung pro Woche (je nach Anwendung) ausreicht. FTICR-Massenspektrometer sind zwar außerordentlich empfindlich, eine Detektion ist bis zu zehn einzelnen Ionen in der Messzelle möglich. Allerdings sorgen die meist sehr geringe Datenrate, der limitierte lineare Bereich, die beachtliche Gerätegröße und nicht zuletzt die massiven Anschaffungs- und Betriebskosten sowie der hohe technische Aufwand dafür, dass diese Geräte auf absehbare Zeit hochspezialisierte Expertensysteme bleiben, die keinen Einsatz in der Routineanalytik finden. Ionenfallen-Massenspektrometer, die Tandem-MS in Zeit und damit MS^n -Experimente mit $n \geq 2$ ermöglichen, sind die vielseitigsten Instrumente, wenn es um Gasphasenfragmentierungen und die Bestimmung von Substrukturen geht. Aufgrund ihrer begrenzten Massengenauigkeit (meist > 10 ppm) und -auflösung eignen sie sich jedoch im Allgemeinen kaum zur HR/AM-Messung. Sie finden daher bevorzugt Anwendung bei Aufgaben, bei denen die allgemeine Struktur des Analyten aus einem begrenzten Repertoire an Teilstrukturen besteht, wie beispielsweise in der Peptid-, Protein- oder Nukleinsäureanalytik.

Eine Sonderstellung in der MS-Welt nehmen die vergleichsweise schlichten Single-Quadrupol-Massenspektrometer ein. Mit einer recht geringen Massengenauigkeit von > 100 ppm und Auflösung (R ca. 1000 bei $m/z = 1000$) eignen sie sich weder für Strukturaufklärung im Screening for Unknowns noch für ein spezifisches Targeted Screening im Ultraspurenbereich. Allerdings sind sie robust und günstig in der Anschaffung und liefern mit ihrer Massenaussage zumindest einen Negativbeweis, also im Rahmen ihrer Nachweisgrenze eine Aussage über das eventuelle Nichtvorhandensein eines gesuchten Analyten. Sie werden daher gerne als Screeningdetektor für wenig komplexe Proben, z. B. in der Prozesskontrolle kombinatorischer Synthesansätze, eingesetzt. Aufgrund ihrer eingeschränkten Möglichkeiten werden sie von Anwendern oft nicht als vollwertiges Massenspektrometer, sondern als ein massenselektiver Detektor (MSD) wahrgenommen und daher von manchen Herstellern konsequenterweise als fortschrittlicher LC-Detektor vermarktet.

Tabelle 1.1 gibt einen groben Überblick über die Eignung der gängigsten Massenspektrometertypen in der Kombination mit (U)HPLC für verschiedene Einsatzzwecke. In Ergänzung zu den bereits angesprochenen Anwendungsszenarien des Targeted Screenings bzw. des Screening for Unknowns sind hier zusätzlich die verallgemeinerte Eignung für die Aspekte der Strukturaufklärung und der Gehaltsbestimmung aufgeführt. Angemerkt sei, dass diese Tabelle zweifellos eine gewisse Pauschalisierung mit sich bringt. Die diversen Gerätehersteller haben bei der Vielzahl an MS-Geräten in unterschiedlichen Leistungsklassen vereinzelte Spitzenmodelle hervorgebracht, die dieser Kategorisierung zuwiderlaufen. Dies sollte aber an der allgemeinen Einschätzung, die für die breite Masse an Geräten eines Funktionsprinzips getroffen wurde und sich am jeweils durchschnittlichen Leistungsvermögen orientiert, nichts ändern.

Tabelle 1.1 Eignung und Einsatzzweck verschiedener Massenspektrometertypen; + = sehr gut geeignet, o = mäßig geeignet, – = ungeeignet

	Strukturaufklärung Elementar- zusammensetzung	Teilstruktur- bestimmung	Screening for Unknowns	Quantifizierung	Targeted Screening
Q	–	–	–	+	o
QqQ	–	o	o	+	+
QIT	–	+	o	–	o
LIT	–	+	o	o	o
QTRAP	–	+	o	+	+
TOF	+	–	–	o	o
Qq-TOF	+	+	+	o	+
Orbitrap	+	o	o	+	o
Q-Orbitrap	+	+	+	+	+
LIT-Orbitrap	+	+	+	o	+
FTICR	+	+	–	o	–

1.2.1.2 (U)HPLC und Massenspektrometrie

Nicht nur im Einzelbetrieb hat sich die Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie (UHPLC) mittlerweile an breiter Front etabliert. Die Möglichkeit, wahlweise dieselbe analytische Information einer herkömmlichen HPLC-Trennung in deutlich kürzerer Zeit zu gewinnen oder in der Zeitspanne klassischer HPLC-Trennungen dank deutlich gesteigerter chromatographischer Auflösung ein detailliertes Abbild einer Probe zu erhalten, macht UHPLC auch für MS-Kopplung attraktiv. Eine auf kurze Analysenzeiten optimierte Trennung erlaubt Hochdurchsatz-Screenings (HTS) und verringert die Leerlaufzeit sowie die Amortisierungsfrist eines Massenspektrometers. Eine besser aufgelöste Trennung hingegen, die Koelution von Substanzen vermeidet, verringert Konkurrenzionisation und Ionensuppressionseffekte bei der Signalentstehung in der MS-Quelle, was eine empfindlichere Detektion im Massenspektrometer zur Folge hat (siehe auch Abschnitt 1.2.3.3). Gerade aber die hohe Analysengeschwindigkeit und Effizienz der UHPLC erfordern eine sorgfältige Optimierung der Geräte, um die hohe Trennleistung einer UHPLC-Säule möglichst verlustfrei in ein LC/MS-Chromatogramm zu übersetzen.

LC/MS-Analytik und Geschwindigkeit I: der Kampf um die Gradientenverzögerung

Hochdurchsatzanalytik ist ein Schwerpunkt von LC/MS-Applikationen, so z. B. in der Wirkstoffforschung und -entwicklung in der pharmazeutischen Industrie. Analysenzeiten, die für Proben mittlerer Komplexität unter 2–5 min liegen, ermöglichen im ununterbrochenen Routinebetrieb das zügige Abarbeiten großer Probenmengen, z. B. aus der kombinatorischen Synthese oder aus Kinetik- und Metabolisierungsstudien (DMPK). Bei solch kurzen Analysenzyklen kommt dem Gradientenverzögerungsvolumen (engl. gradient delay volume, GDV) einer UHPLC-Anlage hohe Bedeutung zu. Definiert als die Summe aller Volumina

innerhalb einer (U)HPLC-Apparatur, die zwischen dem Ort der Gradientenerzeugung und dem Säulenkopf liegen, ist das GDV maßgeblich verantwortlich für die Gestalt einer chromatographischen Trennung. Schließlich beginnt dadurch jede Gradientenelution mit einer isokratischen Trennphase, deren Dauer davon abhängt, wie lange eine geänderte Zusammensetzung der mobilen Phase benötigt, um am Säulenkopf in die Trennung einzugreifen. Gerade die LC/MS-Kopplung verlangt nach Trennsäulen mit kleinem Innendurchmesser (typischerweise 2,1 mm für analytisch dimensionierte Trennungen bis hin zu einigen Dutzend bis Hunderten Mikrometern bei Nano- und Kapillar-LC-Anwendungen) und entsprechend angepassten, niedrigen Flussraten, die in der Regel bei analytischen Trennungen deutlich unter 1 mL/min, meist zwischen 50 und 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, betragen. Ein geringes GDV ist hier sehr von Vorteil: Das schnellste Gradientenprogramm ist wertlos, wenn bei einem GDV von 500 μL und einer Flussrate von 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ die geänderte Abmischung mit 1 min Verzögerung den Kopf der Trennsäule erreicht. Man lasse sich dabei nicht vom Marketing der Hersteller in die Irre führen: Das GDV schließt zwar den Eluentenmischer ein, besteht aber darüber hinaus auch aus allen Volumina von der Mischung der Komponenten der mobilen Phase bis zur Säule. Dazu trägt die Probenschleife des Autosamplers ebenso bei wie Anschlusskapillaren oder bei Niederdruckgradientenpumpen der gesamte Pumpenkopf. Ein kleinvolumiger Mischer ist daher nur dann sinnvoll, wenn auch der Rest der UHPLC-Anlage darauf abgestimmt wurde und zugleich die Mischeffizienz noch gewahrt ist. Ein GDV von 250 μL oder weniger ist mit modernen Pumpen leicht zu erreichen. Bauartbedingt sind binäre Hochdruckgradientenpumpen (high-pressure gradient pump, HPG) hier klar im Vorteil, sodass eine LC/MS-Anlage bevorzugt mit einer HPG ausgestattet sein sollte. Die Verwendung einer Niederdruckgradientenpumpe (low-pressure gradient pump, LPG) setzt der Trennmethodebeschleunigung in der LC/MS Grenzen, die nur durch Verringerung der GDV-Beiträge sinnvoll überwunden werden können, so z. B. durch Einbau kleinerer Eluentenmischer. Manche Anwender scheuen mitunter gerade diesen Schritt, weil sie um die Effizienz der Eluentenabmischung fürchten. Dazu muss man unterscheiden, welche Form der Mischung durch ein verkleinertes Mischervolumen beeinträchtigt würde: die *radiale* Durchmischung der mobilen Phase (im Querschnitt der durchströmten Kapillaren und der Säule) bzw. die *axiale* (oder *longitudinale*, längs der Fließrichtung). Radiale Durchmischung erzielt man meist durch komplexe Strömungsführung, z. B. mittels einer Mischerhelix in einer speziellen Mischkapillare oder verzweigte Kanalstrukturen auf Mischern mit Chip-Design. Sie erfordert ein vergleichsweise geringes Mischvolumen und ist aufgrund des Förderprinzips besonders bei HPG-Pumpen wichtig. Die axiale Mischeffizienz hingegen ist diejenige, die am effektivsten über ein großes Mischvolumen erfolgt. Aufgrund des Funktionsprinzips ist axiale Durchmischung bei LPG-Pumpen besonders vonnöten. Eine Verringerung des reinen Mischervolumens macht sich demnach bei HPG-Pumpen weniger kritisch bemerkbar als bei LPG-Systemen. Zugleich ist die MS-Detektion hinsichtlich der Stabilität der Basislinie wie Drift und Rauschen weniger anfällig gegenüber Schwankungen in der axialen Mischung als viele UV-detektionsbasierte LC-Me-

thoden. Die erwähnte Zurückhaltung beim Einbau kleinerer Mischsysteme in der LC/MS-Analytik ist daher in der Regel, je nach verwendetem Pumpentyp, nicht berechtigt.

Die GDV-Problematik ist besonders für Pumpen kritisch, die nicht auf einen Membran-Pulsationsdämpfer verzichten können – bei ihnen ist das GDV zusätzlich druck- und damit (auch) flussabhängig [77]. Während moderne UHPLC-Pumpen aller namhaften Hersteller in der Geräteoberklasse und den meisten Standardsystemen durch Regelmechanismen auf Pulsationsdämpfer verzichten können, sind diese in manchen Einstiegsmodellen und in älteren Pumpentypen noch eher anzutreffen. Ihr Einsatz in der LC/MS-Analytik ist daher nur bedingt zu empfehlen.

Ein Notbehelf bei einem großen GDV kann die verzögerte Probeninjektion darstellen, bei der die Probe zeitverzögert nach dem Start des Gradientenprogramms injiziert wird. Formal ist dies zunächst ein gangbarer Weg, wenn es gilt, ein kleineres GDV an einer LC-Anlage zu simulieren, verkürzt sich so doch der Effekt der isokratischen Vortrennung. Zur Durchsatzsteigerung erweist sich diese Möglichkeit allerdings als eine Mogelpackung: Man verkürzt zwar die im Chromatogramm wiedergegebene Zeitspanne – das Chromatogramm beginnt mit der Datenaufzeichnung stets zum Zeitpunkt der Injektion, unabhängig davon, wie lange bereits zuvor ein Pumpenprogramm lief –, es ändert aber nichts an der gesamten Dauer eines analytischen Laufs, der sog. Zykluszeit. Zur Durchsatz-erhöhung ist eine solche delayed injection daher keine Option.

Auch dem Probengeber sollte man seine Aufmerksamkeit schenken. Je nach verwendetem UHPLC-Gerät kann der Anwender meist zwischen mehreren Probenschleifen- (und damit Volumenbeiträgen zum GDV) und auch Injektionsspritzengrößen wählen, sofern der Probengeber nicht mit einem motorisierten Kolbendosierungssystem (wie das sog. metering device von Agilent Technologies) arbeitet. Die vorinstallierte Probengeberfluidik ist vom Hersteller so universell gewählt, dass sie Injektionsvolumina von wenigen μL bis hinauf zu 100 μL oder mehr abdeckt, was zwangsläufig mit Probenschleifen von deutlich über 100 μL Eigenvolumen einhergeht. Gerade bei UHPLC-MS-Trennungen, die bevorzugt mit Säuleninnendurchmessern von 2,1 mm (oder weniger) durchgeführt werden (siehe auch Abschnitt 1.2.2.1), wird man im Allgemeinen mit deutlich weniger als 10 μL Injektionsvolumen arbeiten, um eine Volumen- und ggf. Massenüberladung der stationären Phase zu vermeiden. Eine angemessen kleine Probenschleife von unter 30 μL vermindert hier den Beitrag zum GDV spürbar. Bei Probengebern mit teilbarer Probenschleife (sog. Split-loop-Prinzip, gelegentlich auch Flow-through-needle-Prinzip genannt) kann zudem eine möglichst kleinvolumige Nadelsitzkapillare dabei helfen, den Beitrag des Probengebers zum GDV im Vergleich zum Auslieferungszustand weiter einzudampfen.

Häufig überschätzt wird hingegen der Beitrag der Kapillarverbindungen zwischen Pumpe und Säule zum GDV – gerade bei einem aufsteigenden Flusspfad mit Pumpe oder Probengeber am Sockel des (U)HPLC-Turms wird diese Kapillare mitunter etwas länger als beim konventionellen Aufbau, was auf manche Anwender abschreckend wirkt. Aber keine Sorge – selbst 50 cm einer Kapillare mit 0,18 mm Innendurchmesser machen „nur“ knapp 15 μL aus, mithin meist weit

weniger als ein Zehntel des gesamten GDV einer UHPLC-Anlage. Schmerzlicher scheint dies auf den ersten Blick als bandenverbreiternder Beitrag zum Extrasäulenvolumen zu sein. Die meisten LC/MS-Trennungen arbeiten jedoch mittels Elutionsgradienten. Dieser verringert durch die niedrige Eingangssolvensstärke die Bandenverbreiterung erheblich, da das Probengemisch dank einer zu Beginn quasi unendlich hohen Retention am Kopf der Trennsäule sehr effektiv refokussiert wird. Insgesamt macht sich damit der Volumenbeitrag der Kapillarverbindungen *vor* der Säule weder bei der Gradientenverzögerung noch der Bandenverbreiterung gravierend bemerkbar. Diese Aussage gilt in dieser Deutlichkeit für analytisch dimensionierte Trennungen – bei Kapillar- und Nano-UHPLC-Anwendungen ist die Bedeutung dieser Volumina ungleich größer.

■ Merke

- Möglichst kleine Gradientenverzögerungsvolumina (GDV) verkürzen die Analysengeschwindigkeit spürbar. Hochdruckgradientensysteme sind hier bauartbedingt im Vorteil.
- Das GDV ist mehr als nur der Pumpenmischer. Alle Volumina von der Gradientenformung bis zum Säulenkopf sind dabei zu minimieren, ohne die Mischeffizienz zu beeinträchtigen.
- Der Beitrag von Verbindungskapillaren zum GDV ist im analytischen Maßstab in der Regel nicht spürbar.

LC/MS-Analytik und Geschwindigkeit II: Gesamtzyklenzeit oder wie schnell kann ich überhaupt werden?

Wie zuvor bei der delayed injection bereits angesprochen, spielt für die Zyklenzeit nicht die Geschwindigkeit der Trennung allein eine Rolle. Vielmehr addieren sich zu der eigentlichen Trennung, in der Regel mittels eines Gradientenprogramms, auch alle Schritte des Probenhandlings wie Probenaufziehen oder Waschen der Probengeberfluidik (Injektionsnadel und ggf. Injektorspritze) sowie die Säulenreäquilibration.

Bereits die Vorbereitung des Injektionsvorgangs ist vergleichsweise zeitaufwendig und zudem von mehreren instrumentellen Gegebenheiten abhängig. Schnelle Probengeber sind heute in der Lage, unter günstigsten Bedingungen eine Injektionsdauer von 15–30 s zu erzielen. Diese beeindruckende Geschwindigkeit ist jedoch nur mit schneller Probenaufzugsgeschwindigkeit und unter Verzicht auf externe Nadelreinigung möglich, was sich ungünstig auf die Injektionspräzision sowie die Probenverschleppung (Carry-Over) auswirkt. Viele UHPLC-Steuersoftware bieten die Möglichkeit, die Probe bereits in die Probenschleife aufzuziehen, während die vorangehende Trennung noch läuft und die Probenschleife in den Nebenstrom geschaltet ist. Diese teilweise Parallelisierung von Injektionsvorbereitung und LC-Trennung (idealerweise während der Säulenreäquilibrationsphase) erlaubt zwar durchaus eine kurze Dauer der Injektionsphase, in der Praxis wird aber ein präziser und verschleppungsarmer Injektionsvorgang trotz allem nicht sinnvoll unter 30 s zu erzielen sein. Zudem erfordert diese Verschachtelung, dass zu einem beliebigen Zeitpunkt der Trennung die Probenschleife bereits wieder

von der Inject- auf die Load-Position und damit aus dem Flusspfad ausgeschaltet wird. Moderne Split-Loop-Sampler, deren niedrige Probenverschleppung darauf fußt, dass die Probenschleife während der gesamten Trenndauer von mobiler Phase durchspült wird, bedingen, dass dies zu einem Zeitpunkt geschieht, an dem die Probenschleife mit mobiler Phase der Gradientenanfangszusammensetzung gefüllt ist, um die nächste Trennung nicht negativ zu beeinflussen und um nicht ein bestimmtes Volumensegment des laufenden Gradientenprogramms herauszuschneiden. Sinnvollerweise legt man daher diesen Schritt in die Rekonkonditionierungsphase der analytischen Säule zum Ende der Trennung hin.

Die Zeit, die zum Befüllen der Probenschleife benötigt wird, kann dabei sowohl über die Kolbengeschwindigkeit der Injektionsspritze als auch über ihr Volumen beeinflusst werden. Dank der kleinen Injektionsvolumina von 2–5 µL erlaubt bereits eine moderate Kolbenaufzugsgeschwindigkeit von 250 nl/s selbst bei höherviskosen Proben oder leichtsiedenden Probenlösungsmitteln eine zügige und trotzdem reproduzierbare Probendosierung. Soll aber nach erfolgter Injektion, während das Injektionsventil noch in der Inject-Position verharret, der Teil der Probengeberfluidik mit der Probenspritze gespült werden, der zuvor mit Probe in Kontakt kam und nicht durch die mobile Phase ausgewaschen wird (vor allem bei Split-Loop-Samplern), so dauern diese Waschschrte umso länger, je kleiner die Injektorspritze ist. Das Waschen einer Samplerfluidik von 40 µL, die mit dem vierfachen Eigenvolumen, mithin 160 µL, gespült werden soll, dauert bei Verwendung einer 25 µL-Injektions-spritze viermal so lange wie bei Verwendung einer 100 µL-Spritze. Im ungünstigsten Fall, sprich große Probenschleife in Verbindung mit kleinem Kolbenhubvolumen bei Trennungen von unter 2 min Dauer, kann das Reinigen der Probengeberfluidik länger dauern als die eigentliche analytische Trennung.

Nicht nur vor, sondern auch nach der eigentlichen Trennung lauert noch ein heimlicher Zeitfresser, und sogar ein beträchtlicher: die Säulenreäquilibration. Bei Gradiententrennungen ist es unvermeidlich, die stationäre Phase nach Erreichen der Endzusammensetzung der mobilen Phase wieder auf die Ausgangsbedingungen zu konditionieren. Nur so befindet sich das Phasensystem eingangs in einem Gleichgewicht, das eine reproduzierbare Trennung sicherstellt. Als Faustregel empfiehlt sich generell, die Trennsäule vor der Injektion mit mindestens dem fünffachen Durchflussvolumen V_m an mobiler Phase zu spülen, um einen stabilen Gleichgewichtszustand herzustellen. Bei besonders kritischen Trennungen, die z. B. mit sehr niedrigen Organikgehalten < 5 % oder Analyten einhergehen, deren Retention sehr empfindlich auf geringe Schwankungen in der Phasenkonditionierung reagieren – häufig betrifft dies Analyten mit geringen Retentionsfaktoren $k < 1$ oder pH-sensitive Trennungen –, ist das Acht- bis Zehnfache des Durchflussvolumens erforderlich. Was dies an Zeit ausmacht, ist in Tab. 1.2 an zwei Beispielen durchgerechnet. Zur Berechnung des Durchflussvolumens V_m aus dem geometrischen Säulenvolumen V_c gilt:

$$V_m = \varepsilon_t \cdot V_c \quad (1.1)$$

mit ε_t = totale Porosität, r = Säulenradius, L = Säulenlänge und $V_c = \pi \cdot r^2 \cdot L$

Tabelle 1.2 Empfohlenes Reäquilibrationvolumen für eine Hochdurchsatz- und eine hochauflösende Trennsäule unter MS-tauglichen Bedingungen

Säulendimension ID × L [mm]	V_m	benötigtes Reäquilibrationsvolumen (gerundet)	Zeitbedarf für $5-8 \cdot V_m$ bei 0,5 mL/min
2,1 × 50	113 µL	570–900 µL	1,1–1,8 min
2,1 × 250	563 µL	2800–4500 µL	5,6–9,0 min

Man sieht leicht, dass selbst eine Hochdurchsatztrennsäule der Dimensionen 2,1 × 50 mm und einer totalen Porosität von $\varepsilon_t = 0,65$, wie sie für sub 2 min-Trennungen mit einer MS-tauglichen Flussrate von 500 µL/min oft zum Einsatz kommt, unter den gegebenen Trennbedingungen zwischen 1,1 und 1,8 min Reäquilierungszeit benötigt. Für eine höherauflösende Trennsäule unter gleichen Bedingungen ver-

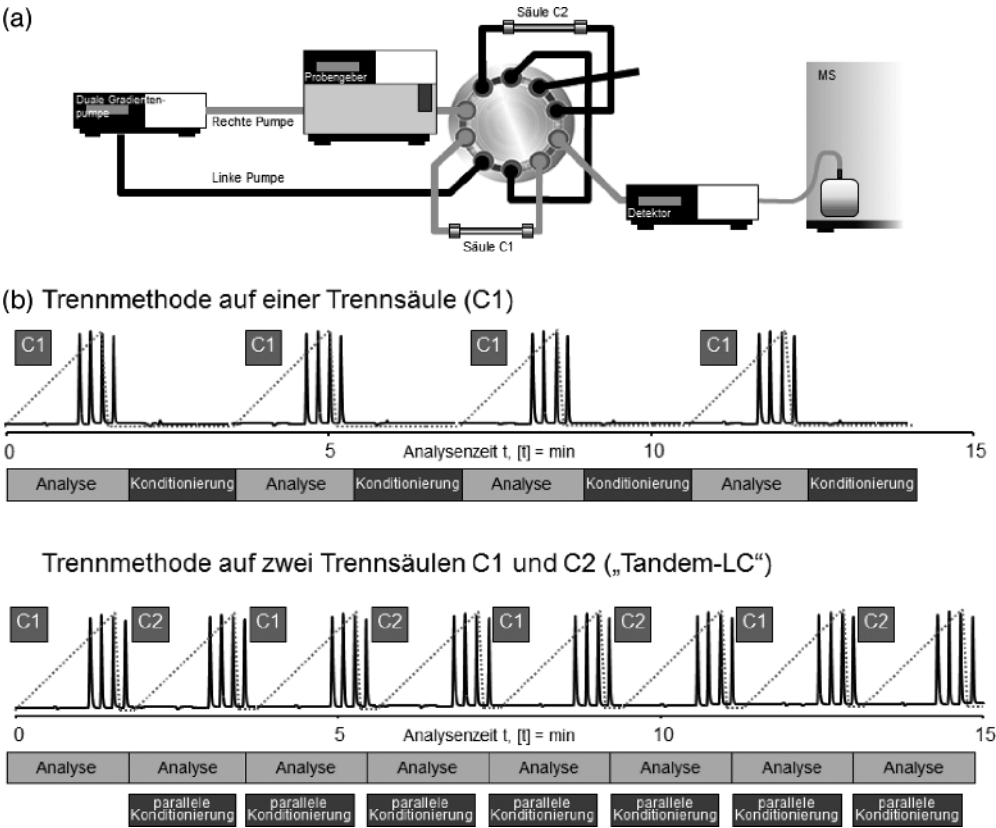


Abb. 1.6 Verkürzung der Rekonditionierungszeit und Durchsatzsteigerung durch Verwendung einer zweiten Trennsäule und alternierender Probeninjektion (Tandem-LC) (a) Flusschema, (b) zeitliche Staffelung der Injektionen

fünffacht sich die Dauer entsprechend. Diese Zeitspanne addiert sich bei einem üblichen UHPLC-System zwangsläufig zu jeder einzelnen Trennung hinzu, gleichgültig wie schnell das eigentliche Gradientenprogramm abläuft. Eine Gesamtanalysendauer von 2 min ist damit schon von vorneherein nahezu unmöglich. Abhilfe schafft bei dieser Problematik lediglich eine zweite, identische Trennsäule, die über eine zweite Pumpe und ein Schaltventil eine Konditionierung parallel zur Trennung auf der ersten Säule ermöglicht. Die Injektion der Proben erfolgt dadurch alternierend auf beiden Säulen, von denen eine immer zeitgleich zu der gerade aktiven Trennsäule äquilibriert wird (Abb. 1.6).

Betrachtet man abschließend alle Begleitschritte zu der eigentlichen (U)HPLC-Trennung, kommt man rasch zu einem eher nüchternen Ergebnis. Auch wenn sich manche dieser Abläufe parallel zu einer laufenden Trennung legen lassen, wie z. B. die Vorbereitung der folgenden Probeninjektion, so ist ein schnelles Trennprogramm allein noch längst kein Garant für einen hohen Probendurchsatz. Der zeitraubendste Schritt ist in der Regel die Säulenkonditionierung, an der sich aber nur zulasten der Reproduzierbarkeit sparen lässt. Lassen wir alle Prozessverschachtelungen einmal außen vor, so addieren sich zu jeder UHPLC-Hochdurchsatztrennung im Mittel etwa 0,5 min für die Injektionsvorbereitung und 1,5 min für die Säulenrekonditionierung – längere Zeiten sind je nach Art der Probeninjektion, Waschschritte und Säulenabmessung schnell erreicht. Ein schnelles Analysenprogramm mit einer Trenndauer von 2 min (was schon recht ambitioniert ist) verdoppelt sich dadurch in seiner Gesamtlänge, und auch das Aufziehen der nächsten Probe in die Probenschleife, während die eigentliche Trennung noch läuft, spart hier nur mäßig Zeit ein. Eine minimale Zyklendauer von 4–5 min ist daher auch bei UHPLC-Hochdurchsatzanalysen kaum zu unterbieten.

Merke

- Eine schnelle Trennung ist mehr als ein ultrakurzes Trennprogramm.
- Schnelle Probengeber verkürzen die Wartezeit zu Beginn eines Trennprogramms. Vorbereiten der nächsten Injektion, während die aktuelle Trennung noch läuft, kann zudem den Zeitverlust durch die Injektion minimieren.
- Die Säulenrekonditionierung ist ein Zeitgrab, das sich allerdings kaum umgehen lässt.

Außersäulenvolumina

Wie bei UHPLC-Anlagen allgemein, so spielen auch in der LC/MS-Kopplung die Außersäulenvolumina (extra column volume, ECV) eine große Rolle. Die allgemeine Empfehlung, das gesamte Außersäulenvolumen zwischen Probenaufgabe und Detektion solle nicht mehr als 10–15 % des Peakvolumens einer eluierenden Substanz betragen, ist hier genauso gültig wie bei Stand-Alone-Anlagen. Ein Zahlenbeispiel verdeutlicht das Problem: Ein Substanzpeak, der bei einer Flussrate von 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ an der Basis 10 s breit ist (ein Beispiel, das in ultraschneller Chromatographie noch spürbar unterboten wird), eluiert in einem Peakvolumen von rund 83 μL , sodass das empfohlene Außersäulenvolumen 8–10 μL nicht

überschreiten sollte. Diese Problematik wird durch die Kopplung zwischen LC-Auslass und MS-Einlass verschärft. Der LC-Anwender muss diese Distanz mit einer Verbindungskapillare überbrücken, die ein möglichst kleines Volumen besitzen muss, um die Probenzone nicht unnötig zu verbreitern. Dies erreicht man am einfachsten durch eine englumige Kapillare, die zudem so kurz wie möglich gehalten werden sollte. Aufgrund der Konstruktionsweise der einzelnen MS-Geräte kann eine solche Kapillare aber nicht beliebig kurz werden. Gleichzeitig bedeutet eine englumige Kapillare automatisch auch einen höheren Rückdruck im System – erinnert sei an das Gesetz von Hagen-Poiseuille (Gl. 1.2), demzufolge der Druck einer Kapillare umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Kapillarradius steigt:

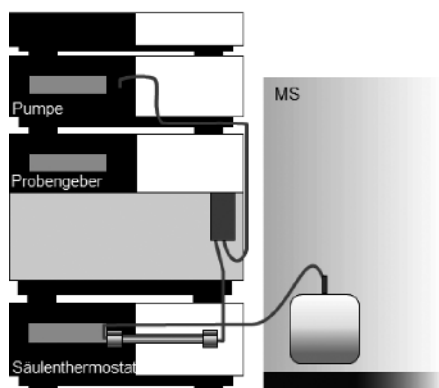
$$F = \frac{V}{t} = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot L} \quad (1.2)$$

mit F = Flussrate, V = Volumen, t = Zeit, Δp = Druckdifferenz, r = Kapillarradius, η = Viskosität des fluidischen Mediums, L = Kapillarlänge

Aus diesen Randbedingungen lassen sich drei Empfehlungen ableiten:

- 1) Bereits bei der Installation einer UHPLC-Anlage lässt sich der Verbindungsweg zwischen LC und MS minimieren. Klassische LC-Aufbauten folgen dem Flusspfad der mobilen Phase von oben nach unten (Abb. 1.7a): Auf dem LC-Stack stehen die Eluentenflaschen, darunter Entgaser, Pumpe, Probengeber, Säulenthermostat und Detektor. Die meisten handelsüblichen MS-Geräte besitzen den fluidischen Anschluss ihrer Quelle jedoch in einer gewissen Höhe über der Laborbankoberfläche, meist zwischen 30 und 60 cm. Hier kann es hilfreich sein, den Flusspfad aufsteigend von unten nach oben abzubilden, idealerweise mit der Pumpe am Sockel, darüber in steigender Reihenfolge Probengeber, Säulenthermostat und, falls vorhanden, Detektor (Abb. 1.7b). Moderne Kompaktanlagen sind häufig bereits so konstruiert. Bei modularen LC-Systemen kann der Anwender die Konfiguration mit gewissen Einschränkungen frei wählen, wodurch sich die Länge der LC-MS-Verbindungskapillare durchaus um 20–30 cm gegenüber einem herkömmlichen Systemaufbau verkürzen lässt. Dies spart z. B. bei einer Kapillare mit einem Innendurchmesser (ID) von 100 μm bereits bis zu 2,4 μL ein. Je nach Bauweise der Module bedingt dieses Vorgehen geringfügig längere Kapillarverbindungen zwischen Probenaufgabe und Trennsäule. Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 angesprochen, wirkt sich dies bei einer Gradient-Elution jedoch nicht messbar auf die Qualität der Trennung aus.
- 2) Die Verbindungskapillare sollte den kleinstmöglichen Innendurchmesser besitzen, ohne zu viel von der Druckreserve des UHPLC-Systems in Anspruch zu nehmen. Eine 750 mm lange Verbindungskapillare mit einem ID von 0,13 mm erzeugt bei 25 °C, einer Viskosität von $1,2 \cdot 10^{-4}$ Pa·s (mehr als dem Viskositätsmaximum von Wasser/Acetonitril-Gemischen) und einer Flussrate von 0,5 mL/min einen Rückdruck von moderaten 11 bar, besitzt zugleich aber ein

(a) Absteigender Flusspfad



(b) Aufsteigender Flusspfad

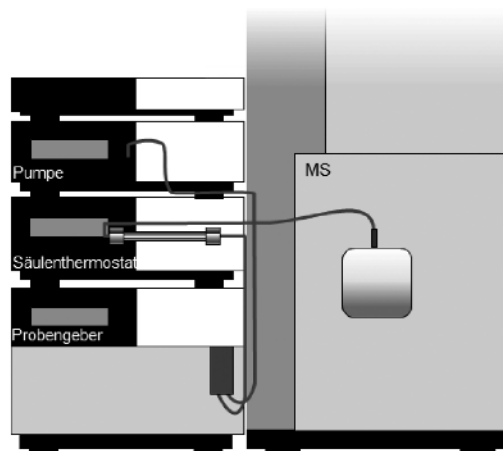


Abb. 1.7 Absteigender (a) bzw. aufsteigender (b) Flusspfad zur Minimierung der Kapillarverbindung Säule-Massenspektrometerquelle

Volumen von 10 μL . Bei einem ID von 0,10 mm sinkt das Volumen auf 5,9 μL , während der Druck bereits auf 31 bar ansteigt; Bei 0,075 mm ID liegen die Werte gar bei nur 3,3 μL Volumen, aber auch erheblichen 97 bar Rückdruck. Eine Modellrechnung hierzu ist in Tab. 1.3 zusammengefasst. Eine deutliche Beschleunigung der LC-Trennung mit Flussraten von 1 mL/min ist hier nur noch eingeschränkt möglich (unabhängig von der Frage, ob dies hinsichtlich der Empfindlichkeit bei hohen Flussraten sinnvoll ist). Wenn vor das Massenspektrometer noch ein UV-Detektor eingebunden wird, ist zudem das Drucklimit der UV-Messzelle zu beachten. Dies gilt besonders, wenn zwischen LC-Zuführung und MS-Quelle noch ein Schaltventil eingesetzt wird, wie es manche Massenspektrometer zur Einspeisung von Kalibrationslösungen verwenden.

Tabelle 1.3 Volumen und Rückdruck einer 750 mm-Kapillare verschiedener Innendurchmesser in den Viskositätsmaxima von Wasser/Acetonitril- und Wasser/Methanol-Gemischen

		0,13 mm ID	0,10 mm ID	0,075 mm ID
		10,0 μL	5,9 μL	3,3 μL
Wasser/Acetonitril 91/9 v/v, $\eta = 1,06 \text{ cP @ } 25^\circ\text{C}$	Rückdruck bei	9,5 bar	27 bar	85 bar
	F = 0,5 mL/min			
	Rückdruck bei	19 bar	54 bar	171 bar
Wasser/Methanol 40/60 v/v, $\eta = 1,56 \text{ cP @ } 25^\circ\text{C}$	F = 1,0 mL/min			
	Rückdruck bei	14 bar	40 bar	125 bar
	F = 0,5 mL/min			
	Rückdruck bei	28 bar	80 bar	251 bar
	F = 1,0 mL/min			

- 3) Neben dem Volumen der Kapillarverbindung selbst ist auch die Qualität der Verschraubung von großer Bedeutung – ein Aspekt, dem in der Praxis häufig zu wenig Beachtung geschenkt wird. Meist wird für die Verbindung zwischen UHPLC und MS eine Kapillare aus PEEK-Meterware eingesetzt, die auf Länge zugeschnitten und mit PEEK-Fingertight-Verschraubungen befestigt wird. Durch unsaubere Schnittkanten und nicht exakt rechtwinklige Schnittflächen wird dabei ebenso unnötiges Totvolumen eingebaut wie durch nachlässige Verschraubung. Totvolumenoptimierte Verbindungssysteme werden von verschiedenen Herstellern angeboten, zumeist sind diese aber speziell zugeschnitten auf die jeweils eigene Hardware. Universelle UHPLC-Fittingsysteme mit minimiertem Totvolumen sind rar. Zwei Systeme sind hier zu nennen: die Viper™ Fitting-Technologie von Thermo Scientific [78] und Sure-Fit™ von MicroSolv Technology Corporation [79] (IDEX). Mit solchen Verbindungen erreicht man einen deutlichen Gewinn an Auflösung, wie Abb. 1.8 veranschaulicht: Das obere LC/MS-Chromatogramm wurde mit einer handelsüblichen PEEK-Kapillare erzeugt, die mittels Schneidwerkzeug zugeschnitten und mit PEEK-Fingertights zwischen LC-Säule und MS-Einlass montiert wurde. Das untere Chromatogramm zeigt die gleiche Trennung unter identischen Bedin-

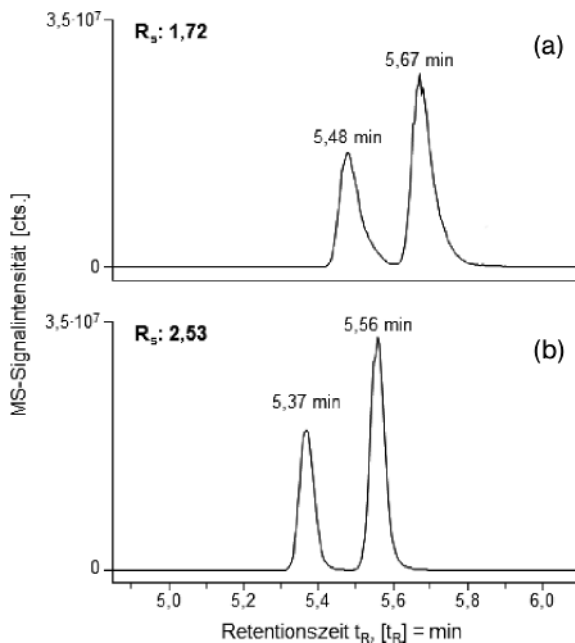


Abb. 1.8 LC/MS-Chromatogramm zweier Isomere mit $m/z = 240,10$ (a) Kapillare nach der Säule PEEK-Meterware ($130 \mu\text{m ID}$), PEEK-Fingertight-Verschraubungen; (b) Edelstahlkapillare

nach der Säule mit totvolumenfreier Verschraubungstechnik (Viper™ Fingertight-Fitting-Technologie, $130 \mu\text{m ID}$)

gungen, allerdings wurde die Verbindungskapillare durch eine Viper-Edelstahlkapillare mit identischen Abmessungen (Länge und Innendurchmesser) ersetzt. Der Anstieg an chromatographischer Auflösung R um 47 % von 1,72 auf 2,53 sowie die sichtlich verringerte Peakasymmetrie zeigen deutlich, wie viel Trennleistung in den meisten LC/MS-Installationen allein durch unzureichend gefertigte Verbindungskapillaren verschenkt wird.

Merke

- Bereits beim Systemaufbau ist das Augenmerk auf kürzestmögliche Distanz zwischen LC-Säulenauslass und MS-Quelleneinlass zu richten.
- Der bandenverbreiternde Effekt des Außersäulenvolumens vor der Trennsäule ist im Gradientenmodus dank Probenrefokussierung meist zu vernachlässigen.
- Hinter der Säule gilt: je kürzer und englumiger die Fluidik, desto besser. Man beachte allerdings stets den Rückdruck sehr enger Kapillaren, insbesondere wenn eine druckempfindliche Messzelle vor dem Massenspektrometer verwendet wird.
- Jeglicher unkontrollierte Beitrag zum Außersäulenvolumen durch unpräzise Kapillarverbindungen etc. sollte so gut als möglich vermieden werden.

Datenraten und Zykluszeiten von Massenspektrometern

Eine genaue Quantifizierung erfordert bekanntlich die möglichst exakte Berechnung des Flächenintegrals eines chromatographischen Peaks (und ggfs. des Peaks interner Standards etc.) – eine Gehaltsangabe basierend auf Berechnungen über die Peakhöhe ist in aller Regel zu sehr fehlerbehaftet. Dazu benötigt man ein möglichst häufig durch Messwerte des Detektors abgetastetes Elutionsprofil des jeweiligen Analyten. Um dies zu gewährleisten, sollte das Peakprofil der Substanz durch mindestens 25–30 Datenpunkte erfasst sein. Im Unterschied zu spektroskopischen Detektoren, bei denen Spitzenmodelle heute bereits eine Datenerfassungsrate von bis zu 200 Hz ermöglichen, bleiben Massenspektrometer oft deutlich hinter dieser Vorgabe zurück. Die Datenerfassungsrate sowie die Arbeitszyklen (duty cycles) des Massenspektrometers verhalten sich dabei gegenläufig zur Datenqualität: Hohe Datenraten und kurze Arbeitszyklen gehen je nach Art des Massenanalysators meist zulasten der Massenauflösung und der Massengenauigkeit. Insbesondere bei komplexen MS/MS- und MSⁿ-Experimenten steht die Zykluszeit zur Abarbeitung der einzelnen MS-Fragmentierungsexperimente einer hohen Spektrenaufzeichnungsrate im Weg, da das Massenspektrometer in der Zeit der Prozessierung eines Analytionenpakets „blind“ bleibt für die weiterhin von der Säule eluierenden Substanzen. Der Anwender muss daher für seine Anwendung den bestmöglichen Kompromiss finden zwischen LC/MS-Chromatogrammen hoher Qualität, die eine hohe Datenrate zur bestmöglichen Beschreibung der Konzentrationsverteilung in einer eluierenden Bande erfordern, und möglichst gut aufgelösten Massenspektren, die zu einer Substanzidentifizierung beitragen. Die genaue Spektrenakquisitionsrate eines Massenspektrometers hängt dabei von vielen Parametern ab; neben dem verwendeten Massenanalysator

und technischen Eigenschaften des Massenspektrometers wie der Geräteelektronik auch von experimentellen Bedingungen wie dem Messprinzip (full-scan, SIM, SRM, Vorläuferionenscan etc.), der Breite des Messbereichs oder der Art und Anzahl aufeinanderfolgender Gasphasenexperimente (MS^n -Schritte, datenabhängige bzw. -unabhängige MS/MS-Schritte). Als allgemeine Einschätzung mag hier gelten, dass Flugzeitmassenspektrometer bis heute die schnellsten Massenanalysatoren darstellen, mit spezifizierten Datenraten von nominell 200 Hz für MS- oder 100 Hz für MS/MS-Messungen [75]. In der Praxis wird bei solch hohen Datenraten jedoch nicht die höchste Massenauflösung bzw. Spektrenqualität erreicht. Die in der Routine zur Quantifizierung weit verbreiteten Tripel-Quadrupol-Geräte erreichen typische Datenraten von 5–15 Hz, was bereits für hochoptimierte konventionelle HPLC-Anwendungen eine Limitierung darstellen kann, für ultraschnelle Chromatographie aber eindeutig nicht mehr ausreicht. Für eine Betrachtung der Problematik, welche Datenrate für welche Trenngeschwindigkeit minimal erforderlich respektive empfohlen ist, sei an dieser Stelle auch auf das Kapitel 3 verwiesen.

Komplementäre Informationen durch zusätzliche Detektoren oder:

Massenspektrometrie ist kein Allheilmittel

Gerne wird die Massenspektrometrie gelegentlich als eine der mächtigsten verfügbaren Analytikwerkzeuge bejubelt. Zweifellos sind die Menge, der Detailgrad und die Genauigkeit der Informationen, die Massenspektrometer bereitstellen, sehr beeindruckend – Wunder jenseits des gesunden Menschenverstandes (GMV) vollbringen diese Geräte aber keine. Hier eine Auswahl der am weitesten verbreiteten Pauschalurteile:

- *Ein Massenspektrometer ist ein universeller Detektor.*

Diese Aussage liest man immer wieder, doch leider wird sie auch durch häufige Wiederholung nicht korrekt. Zur Begründung dieses Satzes wird gerne die UV-Absorptionsmessung als Vergleich bemüht und darauf verwiesen, dass eine spektroskopische Detektion ja nur Substanzen erfassen könne, die mittels geeigneter Chromophore mit den eingestrahlten elektromagnetischen Wellen einer bestimmten Energie (ausgedrückt durch die Wellenlänge) in Wechselwirkung treten. Dies ist zwar völlig korrekt, aber nur ein Beleg für die Selektivität der UV-Detektion, nicht jedoch für die angebliche Universalität der MS-Detektion. Die Behauptung lässt leider eine ganz grundlegende Bedingung außer Acht: Die Detektionsfähigkeit in der Massenspektrometrie richtet sich immer nach der Ionisierbarkeit der gesuchten Analyten, und diese hängt neben dem Energieeintrag in der Ionenquelle auch maßgeblich von den zu bestimmenden Substanzen ab. Moleküle, die keine nennenswerte Protonenaffinität in der Gasphase besitzen, werden mittels ESI oder APCI nur mit geringer Ausbeute ionisiert, und so stehen auch kaum Ionen der Detektion zur Verfügung. Somit hat jeder Analyt im Massenspektrometer seinen individuellen Responsefaktor, und für zahlreiche Substanzen ist dieser, je nach gewähltem Ionisationsprinzip, leider zu gering, um mit der Massenspektrometrie erfasst zu werden. Vereinfacht kann man sagen, dass ESI und APCI selektiv für Moleküle mit einer bestimmten Gas-

phasenbasizität bzw. -acidität sind. Massenspektrometer sind sehr flexibel und breitbandig in ihrer Anwendung und können durch Wechsel des Ionisationsmodus an unterschiedliche Erfordernisse angepasst werden – den Anspruch nach universeller Detektion erfüllen sie nicht.

Im allgemeinen Sprachgebrauch und in der Literatur wird gelegentlich nicht sauber unterschieden zwischen *universeller* und *uniformer* Detektion. Letztere beschreibt die Anforderung, für alle Analyten eine homogene, gleich große Response, die unabhängig von den molekularen Eigenschaften einer Substanz ist, zu erbringen. Prinzipiell ist diese Forderung nicht an eine universelle Detektion geknüpft, sie tritt aber in der Praxis als eine erweiterte Eigenschaft von (quasi) universellen Detektoren auf. Ist ein Massenspektrometer schon nicht universell im strengeren Sinne, so detektiert es aufgrund der Unterschiede in der Ionisierbarkeit der Analytspezies erst recht nicht uniform. Dies impliziert, dass für eine Gehaltsaussage selbstverständlich auch Massenspektrometer für jeden einzelnen Analyten kalibriert werden müssen, was einen z. T. erheblichen Messaufwand nach sich zieht. Echte universelle Detektoren, bzw. die Detektionstechniken, die diesem Ideal am nächsten kommen, wie Charged-Aerosol (CAD)- oder Lichtstreuungsdetektion (ELSD), können zumindest für semiquantitative Aussagen bei gleichbleibender Matrix auf den Kalibrierungsaufwand weitgehend verzichten bzw. ihn für exakte Gehaltsaussagen deutlich verringern – siehe dazu Kapitel 11.

- *Ein Massenspektrometer ist der empfindlichste aller Detektoren.*

Dies berührt dieselbe Fehleinschätzung wie der vorangehende Punkt. Die Empfindlichkeit eines Massenspektrometers und damit die erreichbaren Nachweisgrenzen sind nicht per se so gut wie bei keinem anderen Detektor. Unter guten Voraussetzungen – leichte Ionisierbarkeit der Analyten, hohe Transmission durch den Massenanalysator zum Detektor etc. – sind Massenspektrometer tatsächlich sehr nachweisstark mit Nachweisgrenzen im Femto- bis Attomolbereich. Treffen hingegen im ungünstigsten Fall ein schlecht geeignetes Ionisationsprinzip und suboptimal konstruierte Instrumente aufeinander, so gibt es andere Detektionsverfahren, die der Massenspektrometrie überlegen sind, wie z. B. Elektrochemie oder Fluoreszenz.

- *Mit Massenspektrometrie kann man Substanzen zweifelsfrei identifizieren.*

Auch diese Aussage ist in dieser Pauschalität nicht zu halten. Bei allen ausgefuchsten Experimenten, die man mit modernen Massenspektrometern durchführen kann, bleibt ein solches Gerät zunächst einmal „nur“ eine Art hochgenaue Waage für Molmassen. Gleiche (Mol-)Massen aber bedingen noch längst keine identische Gestalt, sprich Struktur. Bei isobaren Verbindungen, die gleichzeitig in ein Massenspektrometer gelangen, ist selbst das akkurateste Gerät zunächst einmal hilflos – jegliche Form von Isomeren, sei es E-/Z-Isomere, Diastereomere o. a., sind durch ein MS-Experiment zunächst nicht zu unterscheiden, da alle Isomere eine identische Molmasse besitzen. Sofern die isomeren Spezies verschieden fragmentieren, bestünde eine gewisse Chance der Unterscheidbarkeit im Massenspektrum – oft ist dies aber nicht gegeben.

Diese Gesichtspunkte zeigen deutlich auf, dass andere, klassische Detektionsprinzipien durch Massenspektrometrie längst nicht obsolet werden. Gerade bei der Strukturaufklärung kleiner Moleküle liefern Spektroskopie (UV-Absorption, Fluoreszenz) oder Elektrochemie wertvolle, komplementäre Informationen, die helfen, die MS-Ergebnisse richtig zu interpretieren. Ein Beispiel zur Isobarenproblematik: Viele Isomere unterscheiden sich messbar in ihrem UV-Spektrum und in der RP-Chromatographie natürlich aufgrund der strukturellen Erkennung durch den Retentionsmechanismus auch in ihrer Retentionszeit. Das Fallbeispiel in Abb. 1.9 macht dies anschaulich. Hier galt es, die Reaktionsausbeute einer Arylkupplung zu verfolgen, bei der das Edukt (und damit potenziell auch Produkt) nicht vollständig isomerenrein vorliegt. Die Kupplungsreaktion verläuft zwar

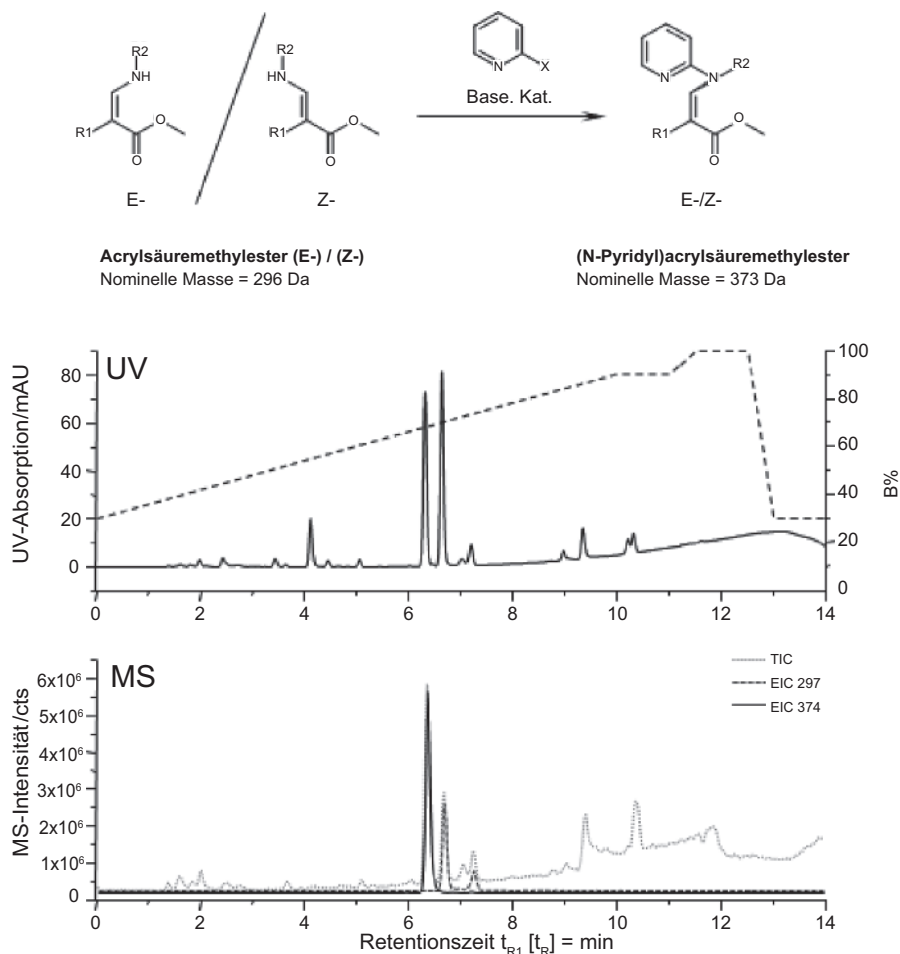


Abb. 1.9 Isobarenunterscheidung mittels Chromatographie und UV-Detektion am Beispiel der Reaktionskontrolle einer N-Arylierung eines E-/Z-Acrylsäureestergemischs

stereoselektiv (es entsteht nachweislich nur ein Produkt), dennoch bleibt beim Screening des Reaktionsgemisches die Frage, welcher Peak welchem Eduktisomer entspricht – das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC) zeigt ja nur zwei Peaks für E- und für Z-Spezies. Dank der chromatographischen Unterscheidung und der Bestätigung über das simultan in einem Diodenarray-Detektor gemessene UV-Spektrum gelingt die Peakzuordnung mühelos.

Wie die Kombination eines Massenspektrometers mit einem weiteren Detektor realisiert wird, hängt maßgeblich vom verwendeten zweiten Detektionsprinzip ab. Da das Massenspektrometer die Probe bei der Detektion zerstört, muss es am Ende der Messkette stehen. Ein zerstörungsfreier Detektor – alle spektroskopischen Detektoren fallen hierunter – kann am einfachsten in Reihe zwischen Trennsäule und Massenspektrometer eingefügt werden. Dabei ist zu beachten, dass das Eigenvolumen handelsüblicher Messzellen einen merklichen Beitrag zur chromatographischen Bandenverbreiterung leistet. Die Zelle sollte daher so klein wie möglich bei optimaler Lichtweglänge sein. Mit klassischen Messzellen sind hier Volumina von etwa 2–5 μL erhältlich. Sehr für Furore in Bezug auf hohe Empfindlichkeit bei kleinem Innenvolumen sorgen in jüngerer Zeit Zelldesigns, die auf Lichtleitertechnik und innere Totalreflexion setzen. Damit lassen sich Lichtweglängen von bis zu 60 mm bei moderatem Innenvolumen erzielen, was sich in bemerkenswert niedrigen Nachweisgrenzen niederschlägt. Neben dem spürbar höheren Anschaffungspreis für solche Zellen bezieht sich der Terminus „hohe Empfindlichkeit“ aber auch auf deren mechanische Stabilität, was insbesondere kritisch werden kann, wenn nach dem UV-Detektor noch ein druckerzeugendes Gebilde sitzt. Eine Alternative stellen speziell optimierte Kapillarmesszellen dar, die wie herkömmliche Flusszellen gehandhabt werden können, aber dank ihres Aufbaus aus Quarzkapillaren (fused-silica) mit geringen Innenvolumina von unter 50 nL auskommen. Allerdings sind diese Zellen wegen ihrer eingeschränkten Linearität für Quantifizierungen weniger geeignet, sie sollten vornehmlich qualitativen Aussagen vorbehalten bleiben.

Zerstörende Messprinzipien wie vernebelungsbasierte Detektoren (CAD, ELSD etc.) müssen dagegen mittels eines T-Stücks im Parallelbetrieb zum Massenspektrometer laufen. Dies muss kein grundsätzlicher Nachteil sein, da sich je nach LC-Bedingungen ein Nachsäulensplit zum verringerten Eluenteneintrag in die MS-Quelle ohnehin anbietet. Nicht verschwiegen werden soll dabei, dass auch die Splitkonstruktion als solche ein zusätzliches Totvolumen aufbaut, das sich in einer verringerten chromatographischen Auflösung ausdrückt. Dafür erhält man aber im Gegenzug ein äußerst vielseitiges Analytikwerkzeug: Die Kombination z. B. aus Massenspektrometrie und einem Detektor mit uniformer Response (CAD) beschleunigt Screeningexperimente erheblich, weil in einem einzigen chromatographischen Lauf eine semiquantitative Gehaltsaussage aus einem der unspezifischsten aller momentan erhältlichen Detektoren gewonnen werden kann, während ein HR/AM-taugliches Massenspektrometer im Parallelbetrieb bestmögliche qualitative Daten zur Substanzidentifikation gewährleistet. Eine Sonderrolle nehmen in dieser Betrachtung die elektrochemischen Detektoren ein. Wenn sie die Redoxaktivität von Analyten zur Signalerzeugung ausnutzen, verändern sie

dabei den Analyten – ein seriell nachgeschaltetes Massenspektrometer wird dann nicht mehr die Molekülionenmasse des ursprünglich vorliegenden Moleküls ermitteln, sondern die des Redoxproduktes. In diesem Fall wäre der elektrochemische Detektor in einem Parallelsplit besser aufgehoben. Allerdings bietet ein serieller, sozusagen als MS-Inlet geschalteter elektrochemischer Detektor die reizvolle Option, Substanzen durch Redoxvorgänge in eine Form zu überführen, die empfindlicher im Massenspektrometer detektiert werden kann. Zudem bietet dies die Möglichkeit, speziell bei biologischen Anwendungen bestimmte Stoffwechselprozesse zur Metabolisierung von Analyten elektrochemisch zu imitieren und diese Vorgänge direkt im Massenspektrometer zu untersuchen.

■ Merke

- Massenspektrometer sind keine universellen Detektoren.
- Massenspektrometer detektieren zwar je nach Betriebsmodus hochselektiv, aber nicht spezifisch.
- Zur zweifelsfreien Bestätigung von Substanzidentifizierungen, die anhand von MS(/MS)-Messungen erfolgen, ist immer (mindestens) eine weitere strukturaufklärende Analysenmethode erforderlich (z. B. NMR-Spektroskopie).
- In allen Fällen, in denen Moleküle nicht anhand ihrer molekularen Masse im Rahmen der Messgenauigkeit hinreichend unterschieden werden können (Isobare), sind ergänzende, komplementäre Detektionsprinzipien unverzichtbar. Die entsprechenden Detektoren können je nach Messprinzip seriell oder mittels Split parallel zur Massenspektrometrie betrieben werden.

1.2.2

MS-Kompatibilität von LC-Methoden – die Trennchemie passt sich an

In der Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie treffen buchstäblich zwei Welten aufeinander. Schon die physikalischen Bedingungen, unter denen sich flüssigchromatographische Trennungen und Massenspektrometrie abspielen, könnten unterschiedlicher nicht sein: Während eine LC-Trennung am Apparatusauslass gegen Atmosphärendruck arbeitet, verlangt ein Massenspektrometer nach einem für seinen Bautyp optimalen Vakuum. Die Schnittstelle dazwischen, die Ionenquelle, muss dabei mehrere Aufgaben zugleich erfüllen: die Überführung der Analyten in die Gasphase, die Abtrennung der mobilen Phase (was üblicherweise ebenfalls über die Gasphase geschieht), das kontrollierte Ionisieren der Analytmoleküle sowie der gerichtete Transport der Analytionen in den Massenanalysator im evakuierten Bereich des Massenspektrometers. Allein die Solvensentfernung ist schon eine Herausforderung: Bekanntlich beträgt das Molvolumen eines gasförmigen Stoffes 22,4 L unter Normal- bzw. 24,5 L unter Standardbedingungen. Bei einer Flussrate von 1 mL/min Wasser, entsprechend 1/18 mol/min, entstehen damit jede Minute einer Trennung 1,2 L Dampfphase, die es effizient von den Analytmolekülen abzutrennen gilt. Damit alle diese

Prozesse bestmöglich ablaufen können, muss das Trennsystem, insbesondere die mobile Phase, einige Randbedingungen einhalten, die maßgeblichen Einfluss auf das MS-Ergebnis haben.

1.2.2.1 Flussrate und Ionisationsprinzip

Als Einstieg vorweg eine Anmerkung: Der Begriff „Empfindlichkeit“ beschreibt nicht nur per definitionem die Steilheit der Responsefunktion eines Detektors, also die Signaländerung pro Konzentrations- oder Massenänderung, sondern damit zusammenhängend auch das Verhältnis aus Signalintensität zu Basislinienrauschen. Bessere Empfindlichkeit kann damit jenseits der Analyt- und Detektoreigenschaften auch z. B. über eine Senkung des Rauschens bei konstantem Signal erzielt werden. Im weiteren Verlauf dieser Diskussion sind immer beide Aspekte gemeint, wenn von Empfindlichkeit die Rede ist.

Bereits das verwendete Ionisationsverfahren diktiert dem Anwender, mit welcher Flussrate er das Massenspektrometer bestenfalls konfrontieren sollte. Elektrospray-Ionisation (ESI), die zurzeit in rd. 82 % aller publizierten Online-LC/MS-Kopplungen eingesetzt wird (der Rest verteilt sich zu 16 % auf APCI und zu 2 % auf APPI – LC-MALDI-MS dagegen ist ein klassisches Beispiel für Offline-Kopplungen) [75], lässt sich mit pneumatischer Unterstützung eines Vernebelungsgases im Flussbereich von etwa 50–300 $\mu\text{L}/\text{min}$ bei bestmöglicher Empfindlichkeit betreiben [80]. Selbstverständlich verkraften alle kommerziellen ESI-Quellen (mit Ausnahme von Nanospray-Quellen) auch deutlich höhere Flussraten bis zu 1 mL/min und darüber. Als konzentrationsempfindlicher Prozess bleibt ESI grundsätzlich von der Flussrate unbeeindruckt, die Peakhöhe sollte sich mit der Flussrate nicht signifikant verändern. Tatsächlich gibt es zahlreiche Beispiele in der Literatur, die belegen, dass die Empfindlichkeit von ESI-Methoden erst dann zu leiden beginnt, wenn es nicht mehr gelingt, die Menge an mobiler Phase effektiv zu entfernen. Je nach Quellenkonstruktion und der Effektivität von Quellenheizung oder pneumatischer Unterstützung ist dies erst bei Flussraten jenseits von 1 mL/min zu beobachten [81]. Häufig wird jedoch ab einem Arbeitsbereich oberhalb von 300–500 $\mu\text{L}/\text{min}$, abhängig von den experimentellen Bedingungen wie Zusammensetzung und zeitliche Änderung der mobilen Phase, eine Abnahme der Empfindlichkeit beobachtet. Wie stark diese auftritt, ist von Fall zu Fall verschieden, eine Regel kann dazu nicht verallgemeinert werden. Es empfiehlt sich daher ausdrücklich, während der LC/MS-Methodenentwicklung in Form einer Fließinjektionsanalyse die Signalintensität und das Signal/Rauschen-Verhältnis für die gesuchten Analyten bei unterschiedlichen Flussraten zu ermitteln. Abhängig von der Trocknungsleistung der ESI-Quelle wird das Empfindlichkeitsoptimum bei einer Flussrate erhalten, die unterhalb des Van-Deemter-Minimums des verwendeten chromatographischen Trennmateri- als liegt. Hier gilt es im Einzelfall zu entscheiden, wie sehr man an Empfindlichkeit einbüßt, wenn die HPLC-Säule unter optimalen fluidischen Bedingungen betrieben wird.

Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) ist höheren Flussraten gegenüber deutlich toleranter, schließlich braucht sie gar eine Mindestmenge an Lösungsmitteldampf, um das Reaktantgas zu bilden, welches für die Analytisation

tion verantwortlich ist. APCI ist zudem ein massensensitiver Ionisationsprozess [82], der von steigenden Flussraten profitiert (auch hier gibt es Ausnahmen [83]), weil damit mehr Analytmoleküle pro Zeit in der APCI-Quelle eintreffen, was zu größeren Peakhöhen mit steigender Flussrate führt. Der Arbeitsbereich von APCI beginnt etwa bei 150–200 $\mu\text{L}/\text{min}$; arbeitsfähig ist das Verfahren bis ca. 2 mL/min , doch riskiert man je nach Design und Verdampfungsleistung der APCI-Quelle hier ebenfalls Empfindlichkeitseinbußen, falls die Flussrate zu hoch wird. Wie bei ESI sollte man durch Untersuchung der Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der Flussrate den Verwendungsbereich der LC/MS-Methode für die Zielanalyten charakterisieren. Tabelle 1.4 fasst die nutzbaren und die effektivsten Arbeitsbereiche der beiden Ionisationsverfahren zusammen.

So gesehen spräche gerade bei schnellen UHPLC-MS-Trennungen viel für APCI als Interface-Methode. Zu erwähnen sei hier nebenbei, dass APCI in vielen Anwendungsfällen zudem weniger Matrixeffekte zeitigt und damit eine höhere Robustheit und Richtigkeit aufweist als ESI (siehe auch Abschnitt 1.2.3.4). Der Anwender hat jedoch meist nicht die freie Wahl, schließlich hängt das verwendete Ionisationsverfahren maßgeblich von den Analyteigenschaften ab. Aufgrund der Polarität der zu detektierenden Verbindungen kommt in der Regel ESI zum Einsatz. Eine geeignete Trennsäulenhardware kommt hierbei den niedrigen MS-kompatiblen Flussraten entgegen: Mit englumigen Säulen von 2,1 oder gar 1 mm Innendurchmesser können auch UHPLC-Phasenmaterialien mit mittleren Teilchengrößen von unter 2 μm bei optimaler Lineargeschwindigkeit betrieben und gleichzeitig Flussraten im unteren bis mittleren $\mu\text{L}/\text{min}$ -Bereich erhalten werden. Sollte der Empfindlichkeitsverlust mit einer ESI-Technik bei optimaler Lineargeschwindigkeit der Chromatographie zu hoch ausfallen, ist ein Nachsäulensplit des Eluates eine Lösung, die Elektrospray-Ionisation bei geeignetem Fluss zu betreiben. Dieser Split lässt sich sehr einfach mittels eines T-Stücks und zweier Restriktionskapillaren, deren Dimensionen das Splitverhältnis zwischen dem Primärfluss ins MS und dem Nebenstrom in den Abfall bestimmen, verwirklichen. Der abgezweigte Anteil der mobilen Phase muss nicht zwangsläufig im Abfall landen – zumindest nicht sofort: Er lässt sich gut für einen zweiten Detektor nutzen. Kombiniert man mittels Nachsäulensplit Massenspektrometrie mit einem vernebelungsbasierten Detektor wie Lichtstreuung (ESLD) oder Charged-Aerosol-Detektion (CAD), der ein nahezu uniformes, analytunabhängiges Ansprechverhalten besitzt, erhält man ein mächtiges Werkzeug zur Identifizierung und gleichzeitigen (Semi-)Quantifizierung. Achtgeben sollte man aber wieder bei den ver-

Tabelle 1.4 Nutzbare und optimale Arbeitsbereiche verschiedener Ionisationsverfahren

	Nutzbarer Arbeitsbereich	Optimaler Arbeitsbereich
Nano-ESI-Quelle (ohne Vernebelung)	< 5 $\mu\text{L}/\text{min}$	20–800 nL/min
Standard-ESI-Quelle (vernebelungsunterstützt)	0,01–1,5 mL/min	0,05–0,3 mL/min
APCI-Quelle	0,2–2 mL/min	0,3–1 mL/min

wendeten Bauteilen für den Split, da er, insbesondere bei nicht sorgfältigem Zusammenbau, eine Quelle für bandenverbreiterndes Totvolumen darstellt.

1.2.2.2 Eluentenzusammensetzung

Eine MS-kompatible mobile Phase erfordert, dass *alle* Bestandteile der mobilen Phase leichtflüchtig sind. Für die Solventien selbst ist dies in der RP-Chromatographie praktisch immer hinreichend erfüllt – das Fließmittel mit der höchsten Verdampfungsenthalpie, Wasser, ist mit ESI- und APCI-Verfahren sehr gut kompatibel und oft sogar unverzichtbar für das Funktionieren der Ionisationsverfahren. Organische Lösungsmittel fördern die Trocknung des Sprays nicht nur durch ihren höheren Dampfdruck, sondern auch, indem sie die Oberflächenspannung der Flüssigkeitströpfchen während des Elektrosprays herabsetzen und dadurch das Verdampfen der Lösungsmittelmoleküle begünstigen. So beobachtet man eine Verbesserung in der Spraystabilität und des Signal/Rauschen-Verhältnisses bei steigendem Organikgehalt. Bei ESI verläuft der Zusammenhang der Signalintensität mit dem Organikanteil in der mobilen Phase in der Regel linear bis hinauf zu 80 % [81]. Dabei unterscheiden sich reine Lösungsmittel teilweise signifikant von Lösungsmittelgemischen – für weiterführende Betrachtungen zu diesem Thema sei auf die Literatur [84] verwiesen.

Die leichte Flüchtigkeit muss jedoch auch für alle Zusätze zur mobilen Phase gegeben sein. Sämtliche Additive, die schwerflüchtige Salze bilden, führen zu verstärkter Unterdrückung der Ionenbildung in der Quelle (Ionensuppression) und zudem zu starker Verschmutzung der MS-Quelle mit Salzablagerungen. Neben dem mitunter täglich fälligen erhöhten Reinigungsaufwand der Quelle führt dies, den Beteuerungen aller MS-Hersteller zum Trotz, meist rasch zu einer spürbaren Abnahme in der Empfindlichkeit der Detektion. Zur pH-Einstellung und Pufferung sowie zur Verbesserung der Chromatographie sind daher HPLC-Klassiker wie Phosphate und Borate oder generell natriumhaltige Salze zu vermeiden. Stattdessen bieten sich leichtflüchtige organische Säuren, Basen sowie deren Salze an: Für saure pH-Werte kommen Ameisensäure, Essigsäure oder Trifluoressigsäure zum Einsatz. Als Basen haben sich wässrige Ammoniaklösungen oder Alkylamine wie Triethylamin bewährt. Zur Pufferung empfehlen sich Ammoniumsalze wie Ammoniumformiat, -acetat oder -carbonat. Auch auf die Verwendung oxidativer Zusätze sollte zweckmäßigerweise verzichtet werden: Gegen Chloride als Eluentenzusatz spricht neben der Ionensuppression, dass unter dem Einfluss des Elektrosprays oxidativ wirkendes Chlor die Analyten chemisch verändern kann [85]. Der Einsatz von leichtflüchtigen ionischen Detergentien wird nicht empfohlen, da sich diese beim Eintreten in das Massenspektrometer auf den Oberflächen der Ionenoptik und des Massenanalysators ablagern und mittelfristig eine Funktionsstörung des Gerätes auslösen können.

Ein oft diskutiertes Thema sei in diesem Zusammenhang kurz angeschnitten, und zwar das Für und Wider der Verwendung von Ameisensäure (FA) bzw. Trifluoressigsäure (TFA) als Eluentenzusatz. Diese moderaten organischen Säuren haben zunächst die Aufgabe, den pH-Wert der Trennung auf 2–3, je nach Konzentration, herabzusetzen und zugleich MS-kompatibel zu sein, indem sie wäh-

rend des Trocknungsvorgangs in der Quelle keine schwerflüchtigen Salze bilden. Mit ihren Säureanionen, Formiat bzw. Triflat, erfüllen sie jedoch zusätzlich noch die Aufgabe eines Ionenpaarbildungsreagenzes, welches den Retentionsmechanismus vieler Analyten aktiv steuert. Kationische Analyten können dadurch eine höhere Retention auf RP-Phasen erfahren. Zugleich stellt man meist auch eine symmetrischere Peakform fest. Diese für die Chromatographie positive Wirkung als Ionenpaarbildner wirkt sich gleichzeitig jedoch ungünstig auf die Signalerzeugung in der MS-Quelle aus, da sie die Bildung von Ionen in der Gasphase beeinträchtigt oder gar unterdrückt. Eine verbesserte Chromatographie steht dabei in einem Zielkonflikt mit der maximalen Ionenausbeute in der Massenspektrometrie. Trifluoressigsäure ist ein deutlich effektiveres Ionenpaarreagenz als Ameisensäure. Diese verbessert zwar in der Chromatographie Retention und Peakform, führt aber dagegen durch verstärkte Unterdrückung der Ionenfreisetzung in der Ionenquelle meist für gegebene Analyten zu einem spürbar schlechteren Signal/Rauschen-Verhältnis im MS-Chromatogramm. Bei der Trennung kleiner Moleküle ist der retentionssteigernde Effekt von TFA meist nicht sehr ausgeprägt, wohl aber

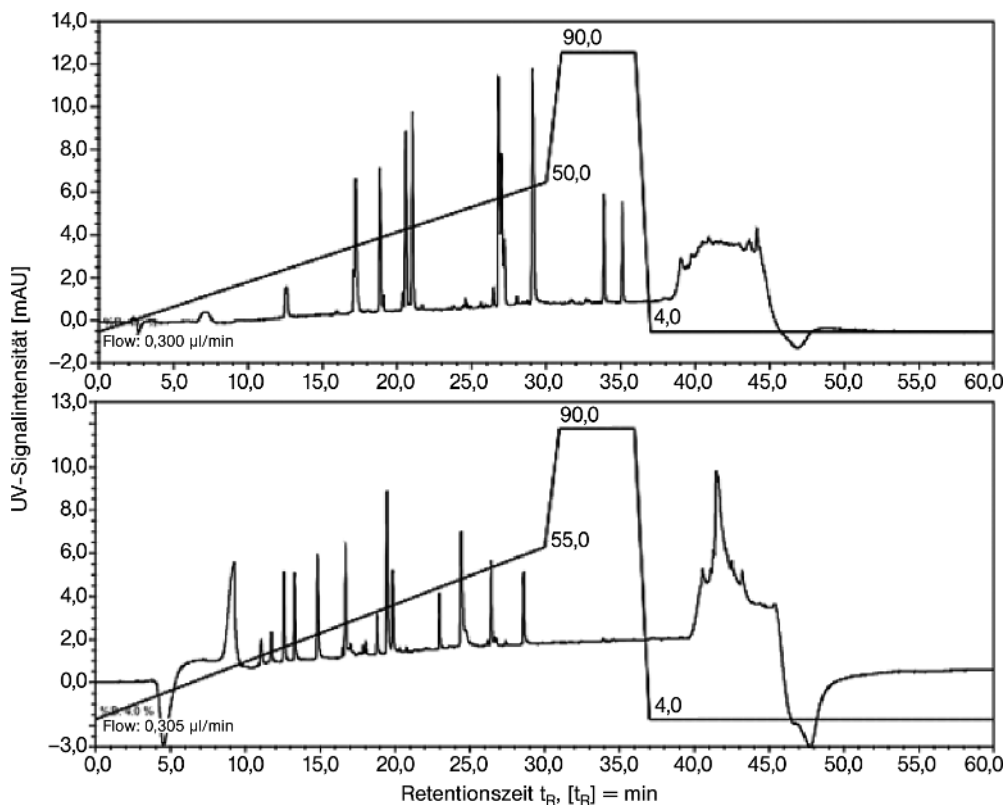


Abb. 1.10 Trennung eines Cytochrom-C-Verdaus unter Zusatz von 0,05 % TFA (a) bzw. 0,1 % FA (b) bei ansonsten identischen chromatographischen Bedingungen

die Ionensuppression. Bei Small-Molecule-Analysen ist deshalb Ameisensäure meist das geeignetere Säuerungsmittel. Im Fall von Biomolekülen wie Peptiden oder Proteinen, die oft in sehr niedrigen Mengen detektiert werden müssen, ist MS-seitig ebenfalls FA vorzuziehen, allerdings kann hier TFA die Chromatographie meist spürbar verbessern. Daher sollte auch in der Biochromatographie TFA bevorzugt im Bereich der Trapsäulen, nicht aber in der eigentlichen analytischen Trennung verwendet werden, man wird aber je nach Applikation nicht immer um den Einsatz in der eigentlichen Trennung herumkommen. Die Trennung einer Cytochrom-C-Verdauprobe in Abb. 1.10 belegt anschaulich den retentionsverändernden Effekt von TFA.

1.2.3

Qualität der MS-Spektren und der LC/MS-Chromatogramme

Während die zuvor geschilderten Aspekte grundlegende Überlegungen betreffen, die zu Beginn einer Geräteauswahl oder einer Methodenentwicklung stehen und nach einmaliger Entscheidung und Ausarbeitung für die gewählte Analytik generell gültig bleiben, treten im Laboralltag spontan unvorhergesehene Änderungen im Bild einer Analyse auf. Von falsch zugeordneten oder unbekannten Massensignalen über verrauschte MS-Spektren bis hin zur völligen Blindheit des Massenspektrometers und blankem Basislinienrauschen reicht die Palette der unschönen Alltagsüberraschungen im Labor. Die gängigsten Problembilder zu beschreiben und mögliche Abhilfen aufzuzeigen soll Gegenstand der nächsten Abschnitte sein.

1.2.3.1 Kein Signal

Das auffälligste aller Problembilder bei einer Probenanalyse ist am schnellsten beschrieben. Man sieht in einer mühevoll ausgearbeiteten LC/MS-Methode: „nichts“. Dieses „Nichts“ tritt jedoch in vielfältiger Gestalt auf, und dank der Kopplung zweier Verfahren kann logischerweise der Fehler entweder auf der LC- oder der MS-Seite begründet sein. Im ungünstigsten Fall trifft beides zu, und fast immer liegt kein Gerätedefekt vor. Die Diagnosetools des Herstellers zeigen eine ordnungsgemäße Funktion aller elektrischen und elektronischen Bauteile an. In den allermeisten Fällen, in denen zu schwache oder keine Signale im Massenspektrometer aufgezeichnet werden, liegt der Fehler in der unzureichenden Ionen-erzeugung, mithin im Bereich der Ionenquelle einschließlich Ionentransferkapillare oder der vorangehenden Probenzuführung. Technische Defekte hinter der Quelle, sei es in der Ionenoptik, dem Massenanalysator oder dem Detektor, treten hingegen eher selten auf.

Zur Fehlereinkreisung hilft als Erstes ein Blick auf die Basislinie sowohl im LC/MS-Chromatogramm als auch im MS-Spektrum des Online-Fensters der Kontrollsoftware, um dort das Ausmaß des Rauschens bzw. den Signalpegel zu beobachten. Liegt die Signalintensität nur bei wenigen Hundert Counts und sieht das Rauschen nicht nach einem konstanten Grundsignal, sondern nur nach einem unregelmäßigen Aufflackern von vereinzelt Signalen aus, so kommen praktisch überhaupt keine Ionen im Massenanalysator bzw. im MS-Detektor an. Dies wird

fast immer durch einen größeren elektrischen oder mechanischen Defekt an der LC oder der Spraykonstruktion verursacht. Zur Untersuchung der Chromatographie ist ein UV-Detektor von unschätzbarem Wert – kein Detektionsverfahren ist vergleichbar robust und unverwundlich. Spezielle UV-Monitorzellen mit Zellvolumina von nur wenigen Dutzend Nanolitern ermöglichen heutzutage sogar das permanente Monitoring einer LC/MS-Trennung ohne sichtbaren Verlust an Trenneffizienz durch exzessive Bandenverbreiterung. So lässt sich rasch und zweifelsfrei feststellen, ob zumindest die Trennung funktioniert. Hat man sichergestellt, dass die Chromatographie die Analytsubstanzen sauber getrennt bis zum Auslass der LC-MS-Verbindungs kapillare transportiert, muss der Fehler im Bereich der MS-Quelle selbst liegen. Eine verformte oder gar gebrochene Spraykapillare lässt das LC-Eluat nicht in die Quelle eintreten, womit sich auch kein stabiles Spray ausbilden kann. Bei MS-Quellen, die die Sprayeinheit auf Hochspannung (HV) legen (AB Sciex, Thermo Scientific), kann auch die Elektrik zum Anschluss der HV-Versorgung an die Spraynadel durch unsachgemäße Behandlung beschädigt sein.

Sind die Chromatographie und die Sprayeinheit intakt bzw. sieht man in der Basislinie ein Rauschen, das auf ein halbwegs stabiles Spray schließen lässt, dann funktioniert offensichtlich der Prozess der Spraybildung und der Ionenerzeugung prinzipiell, es kommen nur zu wenig Analytionen im Massenanalysator an. Der Strom, der im Bereich der Ionentransferkapillare in den Vakuumbereich des Massenspektrometers gemessen wird, ist hier ein guter Indikator für einen ausreichend großen Transport an Ionen. Als Erstes sollte die Quelle einschließlich Ionentransferkapillare gründlich gereinigt werden. Zahlreiche Ablagerungen auf den Oberflächen der Quelle, die manchmal mit bloßem Auge nicht auffallen, können die Ionenbildung unterdrücken und werden durch eine Komplettreinigung entfernt. Es empfiehlt sich dabei, den Zustand der Spraykapillare, insbesondere die Spitze, mit einer Lupe zu überprüfen. Im Fall einer deformierten Kapillarspitze muss die gesamte Spraynadel ausgetauscht werden. Je nach Hersteller hilft es auch, die Position der Spraykapillare zu überprüfen und ggf. neu zu justieren. Wie weit die Spraykapillare aus der umgebenden Vernebelungskapillare heraussteht, kann die Empfindlichkeit der Detektion unter Umständen um Größenordnungen verändern.

1.2.3.2 Schlecht angepasste Quellenbedingungen und ihre Auswirkung auf das Chromatogramm

Die Qualität der Basislinie im MS-Chromatogramm ist ein guter Indikator für die Abläufe innerhalb der Ionenquelle. Gleiches gilt im weiteren Sinne für die Basis-signale in einem MS-Spektrum. Auftretende Fehlerbilder lassen sich dabei grob einer von zwei folgenden Kategorien zuordnen: erhöhtes Rauschen der Basislinie oder Stabilität derselben. Beide Phänomene deuten auf Probleme in der selektiven Erzeugung von Analytionen bzw. der gleichmäßigen Lösungsmittelentfernung und Spraystabilität hin. Wer ein erhöhtes Rauschen der Basislinie beobachtet, hat fast immer ein Quellen-Verschmutzungsproblem, da hier zu viele Ionen gleichzeitig in einem weiten m/z -Bereich erzeugt werden und in das Massenspektro-

meter eintreten. Man spricht hierbei von einem „chemical noise“, dessen Ursachen jedoch vielfältig sein können. Es ist zunächst zu prüfen, ob die Ionenquelle sauber ist bzw. wann sie zum letzten Mal gründlich gereinigt wurde. Hierbei können Ablagerungen an der Spraynadel, im Inneren des Quellengehäuses, an den Metallblenden und Bauteilen der Einlassöffnung, an der Ionentransferkapillare oder den ersten elektrischen Linsen der Ionenoptik für verstärktes Rauschen verantwortlich sein. Woher diese Ablagerungen stammen, ist offensichtlich: Nicht nur Probenrückstände und Matrixbestandteile hinterlassen ihre Spuren in der MS-Quelle, sondern auch die mobile Phase und das Trocknungsgas sind ausgezeichnete Eintragsquellen für chemischen Unrat. Die zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittel sollten deshalb stets einem MS-tauglichen Reinheitsgrad entsprechen (je nach Hersteller „LC-MS grade“, „ULC/MS“ o. Ä.). Das beliebte Reinheitssiegel „gradient grade“ beschreibt dagegen Lösungsmittel, bei denen nur speziell der Gehalt an Verunreinigungen, die für eine verstärkte UV-Absorption sorgen, minimiert wurde, was für MS-Anwendungen oftmals nicht ausreicht.

Das zur Trocknung bzw. zur Vernebelung verwendete Gas, in der Regel Stickstoff, kann ebenfalls Verunreinigungen in die Quelle eintragen, die die Signalqualität verschlechtern. Seine Reinheit sollte mindestens 99,0 %, besser 99,5 % oder höher betragen. Je nach Stickstoffquelle variiert dabei die Art der Verunreinigungen. Da der Durchsatz an Trocknungs- und Vernebelungsgas gerade bei höheren Flussraten der LC-Trennung schnell in den Bereich von 10–25 L/min gerät, scheidet die Versorgung aus Gasflaschen, die eine sehr hohe Gasreinheit gewährleisten, meist von vornherein aus. Solche Verbrauchsmengen können wirtschaftlich nur mit Stickstoffgeneratoren oder aus verdampftem Flüssigstickstoff über eine festinstallierte Infrastruktur bereitgestellt werden. Letztere Variante stellt dabei im Allgemeinen die höchste Stickstoffreinheit sicher. Stickstoffgeneratoren werden mit Druckluft gespeist, aus der sie über Membranseparatoren den Luftsauerstoff abreichern. Die Druckluft allerdings, die durch einen Kompressor erzeugt wird, enthält häufig noch geringe Mengen an Ölrückständen und anderen Substanzen, die aus dem Kompressor ausdiffundieren. Geeignete Gasfilterkartuschen auf Basis von Aktivkohle oder anderen Adsorbentien entfernen diese Rückstände effektiv. Fehlt ein solcher Adsorber oder ist er bis zum Durchbruch beladen, steigt das Ausmaß des Rauschens sichtbar an.

Neben diesen „echten“ Verschmutzungen, die auf ungewollt vorhandene Chemikalien zurückzuführen sind, werden je nach Quellenbedingungen auch Aggregate (Cluster) aus Lösungsmittelmolekülen und Ladungsträgern gebildet, die in summa schwer genug sind, um im Messbereich des Massenspektrometers als permanenter Beitrag zum Rauschen in der Basislinie aufzutauchen. Dies kann jedoch durch eine geschickte Wahl der Quellentemperatur behoben werden. Abbildung 1.11 illustriert dieses Phänomen. Hier wurde in einer Fließinjektionsanalyse (FIA) das MS-Signal des Zielanalyten bei unterschiedlichen Trocknungstemperaturen untersucht. Wie Abb. 1.11a zeigt, bleibt die Signalintensität der Analytsubstanz im extrahierten Ionenchromatogramm nahezu unverändert. Die Temperatur wirkt sich offensichtlich nur unwesentlich auf die Ausbeute an Analytionen aus. Abbildung 1.11b belegt hingegen, dass sich das Rauschen im

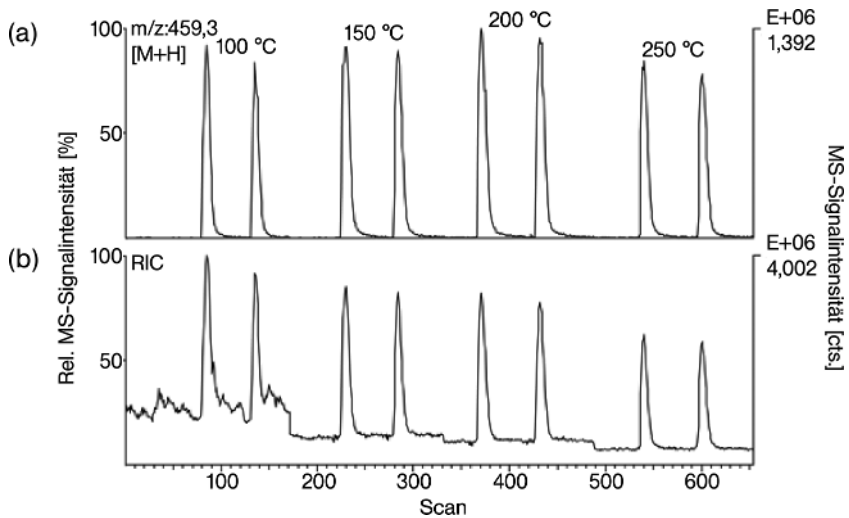


Abb. 1.11 Einfluss der Trocknungsgastemperatur auf die MS-Signalqualität mittels FIA von Astemizol in 10 mM wässriger Ammoniumacetat/Methanol 20/80 (v/v) bei 50 μ L/min auf einem Tripel-Quadrupol-Gerät (a) extrahiertes Ionenchromatogramm von Astemizol ($[M + H]^+$, m/z 459,3), (b) rekonstruiertes Totalionenchromatogramm

Totalionenchromatogramm deutlich mit der Trocknungstemperatur verändert, was auf eine effektivere Zerlegung der Gasphasencluster (Declustering) zurückzuführen ist.

Schließlich beobachtet man ein verstärktes Rauschen auch bei einer zu hohen Spannung zur Erzeugung des Elektrosprays (im Folgenden ESI-Spannung genannt). Dies geht in extremen Fällen einher mit einer leuchtenden Glimmentladung an der ESI-Nadelspitze und kann neben dem Abriss des Analytioneinstroms ins Massenspektrometer im ungünstigen Fall auch zu Spannungsüberschlägen in den Bauteilen der Ionenfokussierung führen. Begünstigt wird dies durch zu viele Ladungsträger in der mobilen Phase, z. B. bei Verwendung eines zu konzentrierten Pufferadditivs. Abhilfe schaffen hier die Verringerung der ESI-Spannung sowie, falls zutreffend, eine Verringerung der Pufferkonzentration des Eluenten.

Probleme mit der Stabilität der Basislinie, besonders Spikes oder spontane Einbrüche, weisen hingegen auf eine unzureichende Vernebelung bzw. ein instabiles Elektrospray hin. Mangelhaft angepasste Vernebelungsgasrate bzw. Gasdruck führen, ebenso wie eine falsch eingestellte ESI-Spannung, zur Bildung von größeren Tröpfchen oder Clustern, die entweder zu Einbrüchen in der Basislinie oder beim Zerplatzen durch die schlagartige Freisetzung einer größeren Zahl an ionisierten Spezies zu Spikes führen.

1.2.3.3 Ionensuppression

Werden nach erfolgreicher LC/MS-Methodenausarbeitung statt der zur Entwicklung verwendeten hochreinen Standards Realproben mit einem beträchtlichen

Anteil an Neben- und Matrixkomponenten untersucht, so beobachtet man bei gleicher Konzentration häufig eine deutliche Änderung in der Signalintensität für bestimmte Komponenten in einer komplexen Matrix, z. B. ein Blutprobenextrakt. Hervorgerufen werden diese Abweichungen durch mit dem Zielanalyten koeluiierende Begleitsubstanzen, deren gleichzeitige Anwesenheit in der Ionenquelle die Ausbeute an Analytionen im Vergleich zum Referenzfall beeinflusst. Dabei treten sowohl Signalverstärkungen als auch -unterdrückungen auf. Im letzteren Fall spricht man von Ionensuppression, auf die bereits im Abschnitt 1.2.1.1 eingegangen wurde. Die Gründe für eine verstärkende wie für eine unterdrückende Wirkung auf die Ionenerzeugung sind vielschichtig. Ihre ausführliche Diskussion würde den Rahmen dieses Abschnitts sprengen, daher sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen [86]. Signalunterdrückung wird sowohl bei ESI- als auch bei APCI-Interfaces beobachtet, bei Detektion mit positiver wie auch mit negativer Polarität. Es gibt aber zahlreiche Belege dafür, dass Ionensuppression bei APCI weniger stark ausgeprägt auftritt als bei ESI, im negativen Modus weniger intensiv als im positiven. Bereits beschrieben wurde ebenfalls die qualitative Bestimmung der Signalverstärkung bzw. -unterdrückung mittels post-column infusion. Für eine quantitative Evaluierung von Matrixeffekten bedarf es der Analyse und des anschließenden Vergleichs der Peakflächen der Analyten in matrixbelasteten sowie gespikten matrixfreien Proben. Gerade diese Intensitätsänderungen durch Matrixeinflüsse sind nach wie vor das beste Plädoyer dafür, dass eine robuste und verlässliche Quantifizierung im Massenspektrometer nur mit vorangehender Auftrennung des Probengemisches gelingt. Wird eine unbekannte, gelöste Probe unfraktioniert direkt ins Massenspektrometer infundiert, sind die intensitätsverändernden Wechselwirkungen der gleichzeitig zu ionisierenden Substanzen untereinander derart vielfältig, dass weder eine verlässliche Gehaltsbestimmung funktioniert, noch im Fall starker Suppressionseffekte gewährleistet ist, dass überhaupt alle vorhandenen Substanzen detektiert bzw. akkurat quantifiziert werden können.

1.2.3.4 Unbekannte Massensignale im Massenspektrum

Häufig ist man als Anwender mit dem Problem konfrontiert, bei der Suche nach einem Analyten die Signale in einem Massenspektrum nicht auf Anhieb plausibel zuordnen zu können. Entweder findet man andere Werte als die erwarteten, oder es treten zusätzlich zu den gefundenen Massen noch weitere m/z -Werte im Massenspektrum auf. Auf die vielfältigen Ursachen dafür soll im Folgenden näher eingegangen werden. Dennoch erlaubt der Rahmen dieses Buches keine erschöpfende Behandlung aller Aspekte. Zur tiefer gehenden Erörterung sei wiederum auf einschlägige MS-Fachliteratur verwiesen [76, 86, 88].

Gasphasenaddukte

Die mit Abstand häufigste Ursache für unbekannte Peaks im Massenspektrum ist die Entstehung von Addukten eines Analytmoleküls mit niedermolekularen Ionen und/oder Neutralspezies in der Gasphase. Art und Ausmaß dieser Adduktbildung variieren dabei stark mit dem gewählten Ionisationsverfahren, den Quellenbedin-

gungen, den Analyteigenschaften und der Qualität der mobilen Phase. Bei ESI und APCI ist die Bildung von Ionen einer Molekülspezies durch Gasphasenclustering wesentlich für die massenspektrometrische Analyse – typischerweise wird ein Analyt der Molmasse M durch Addition (bei positiver Polarität) oder Abstraktion (bei negativer Polarität) eines Protons in eine geladene Form $[M + H]^+$ bzw. $[M - H]^-$ überführt, deren m/z -Verhältnis dann um den Massenbeitrag eines Protons von dem des intakten Neutramoleküls abweicht. Neben dieser für die Detektierbarkeit essenziell notwendigen Adduktbildung treten oft noch weitere Spezies in Erscheinung. So findet man häufig Natrium- oder Kaliumaddukte $[M + Na]^+$ bzw. $[M + K]^+$, bei denen die quasi ubiquitären Alkalimetallkationen vornehmlich von den Glasoberflächen der Eluentenflaschen stammen. Man beobachtet sogar eine Zunahme dieser Addukte zulasten des Protonadduktes mit längerer Standzeit der Eluenten, sodass man die zeitliche Änderung des Intensitätsverhältnisses zwischen Proton- und Alkalimetalladdukt als einen groben Indikator für das Alter der Eluenten verwenden kann. Nimmt die Intensität des Natrium- oder Kaliumadduktes mit der Zeit überhand, ist es überfällig, die mobile Phase der UHPLC-Trennung neu anzusetzen. Die hinlänglich bekannte chemische Ähnlichkeit zwischen Alkalkationen und dem Ammoniumion führt dazu, dass bei Verwendung von Ammoniumsalzen als Pufferadditiv bevorzugt das Ammoniumaddukt $[M + NH_4]^+$ entsteht. Neben diesen Spezies findet man, je nach Güte der Trocknung in der Ionenquelle, auch höhere Aggregate, bei denen typischerweise noch Solvensmoleküle mit dem Analyten und dem Ladungsspender clustern, so z. B. $[M + H_2O + H]^+$ oder $[M + CH_3CN + H]^+$. Mitunter treten Cluster aus mehreren Analytmolekülen, die sich ein Proton oder Natriumkation teilen, in der Form $[2 M + H]^+$ bzw. $[2 M + Na]^+$ auf. Alle diese Addukte sind durch charakteristische Massendifferenzen im Vergleich zum einfachen Protonaddukt gekennzeichnet. Tabelle 1.5 listet weitverbreitete Gasphasenaddukte mit ihren jeweiligen nominellen Massendifferenzen zum einfach protonierten ($[M + H]^+$) bzw. deprotonierten Zustand ($[M - H]^-$) auf. Eine weiterführende Übersicht kann der Literatur entnommen werden [87].

Die Entstehung dieser Addukte lässt sich im Allgemeinen recht gut über die Quellenbedingungen steuern. Mit geeigneten Einstellungen für die Trocknungsbedingungen der Ionenquelle (Temperatur, Vernebelungsgasdruck etc.) können höher aggregierte Addukte effektiv in einfachere Varianten überführt werden. Auch ist in der Regel APCI weniger anfällig gegenüber höheren Addukten mit z. B. Alkalimetallionen, weil hier die Ladungsübertragung auf die Analytmoleküle erst nach der Verdampfung, also vollständig in der Gasphase, stattfindet, während bei ESI die Interaktion zwischen Ladungsträger und Analyt zumindest teilweise noch in der Flüssigphase geschieht. Aus demselben Grund sind auch Matrixeffekte bei APCI je nach Anwendung deutlich weniger ausgeprägt. Da die Adduktbildung auch von der Menge und Art der mobilen Phase beeinflusst wird, stellt man zudem eine Änderung der Intensitäten verschiedener Gasphasenspezies bei wechselnder Flussrate der (U)HPLC-Trennung fest.

Tabelle 1.5 Gängige Gasphasenaddukte bei positiver (links) bzw. negativer (rechts) Polarität. Massendifferenzen beziehen sich auf die Differenz zwischen $[M + H]^+$ (links) bzw. $[M - H]^-$ (rechts) und dem jeweiligen Gasphasenaddukt.

Positive Polarität Gasphasenaddukt	Nominelle Massen- differenz [Δ Da]	Negative Polarität Gasphasenaddukt	Nominelle Massen- differenz [Δ Da]
$[M + NH_4]^+$	+17	$[M - H + H_2O]^-$	+18
$[M + H_2O + H]^+$	+18	$[M - H + CH_3OH]^-$	+32
$[M + Na]^+$	+22	$[M + Cl]^-$	+36
$[M + CH_3OH + H]^+$	+32	$[M - H + CH_3CN]^+$	+41
$[M + K]^+$	+38	$[M + HCOO]^-$	+46
$[M + CH_3CN + H]^+$	+41	$[M + CH_3COO]^-$	+60
$[M + H_2O + CH_3OH + H]^+$	+50	$[M + Br]^-$	+80
$[M + CH_3CN + Na]^+$	+63	$[M + HSO_4]^-$	+98
$[2 M + H]^+$	–	$[M + H_2PO_4]^-$	+98
$[2 M + Na]^+$	–	$[M + CF_3COO]^-$	+114
$[2 M + K]^+$	–	$[2 M - H]^-$	–

Fragmentierung in der Quelle (In-Source Fragmentation)

Fragmentierungsreaktionen in der Gasphase sind ein fundamentaler Bestandteil massenspektrometrischer Untersuchungen. Sofern sie kontrolliert und reproduzierbar ablaufen, indem ein Analyt so wohldosiert angeregt wird, dass er selektiv an den schwächsten Bindungen im Molekül zerbricht und dadurch charakteristische Fragmente bildet, liefern Fragmentierungsreaktionen ein Massenspektrum, das gleichsam wie ein Fingerabdruck eine Substanz zu identifizieren vermag. Und selbst wenn das angewendete Messprinzip keine Aufzeichnung ganzer Fullscan-Spektren gestattet, weil hohe Empfindlichkeit gefordert ist, so stellt das Detektieren von möglichst vielen charakteristischen Fragmenten im SRM-Betrieb fast schon eine spezifische Detektion sicher. ESI und APCI gelten jedoch als vergleichsweise milde Ionisationsverfahren, die Analytmoleküle unfragmentiert in die Gasphase überführen – ein grundlegender Unterschied zur Elektronenionisation (EI) der GC/MS. Dies gestattet zwar die Bestimmung der Molmasse einer intakten Verbindung, man verliert jedoch die Möglichkeit, über die Fragmenten aufschluss über die chemische Natur einer Substanz zu erhalten. Mithilfe ausgefilterter Tandem-MS-Techniken lassen sich nach Belieben kontrollierte Zerfallsbedingungen, meist in Kollisionszellen, erzeugen – hier kennt der Anwender die zu erwartenden Produkt-Ionen recht gut, Überraschungen bleiben meist aus. Viele Jahre intensiver Forschungen haben zahlreiche Zerfalls- und Folgereaktionen wie Spaltungen und Umlagerungen in der Gasphase aufgeklärt [88, 89] – ein sehr informatives und ausführliches Tutorium von Holcapek et al. bietet eine hilfreiche Handreichung, Fragmentierungen von kleinen Molekülen in API-Massenspektrometern aufzuklären [87].

Neben diesen absichtlich herbeigeführten Fragmentierungsreaktionen besteht jedoch immer die Möglichkeit – oder die Gefahr – der Analytfragmentierung auf unkontrolliertem Weg, meist durch ungünstig eingestellte Quellen- oder Ionen-transferbedingungen. Solange sich die Ionen der Analytmolekülspezies noch nicht im Hochvakuumbereich des Massenspektrometers aufhalten, sprich in der Ionenquelle oder im Transferbereich der Ionenoptik, der typischerweise mit einer stufenweisen Absenkung des Innendrucks einhergeht, befinden sie sich in einer Umgebung, in der ihre mittlere freie Weglänge nicht bis zu mehreren Dutzend Zentimeter beträgt (ca. 50 cm für ein Vakuum von 10^{-4} mbar), sondern nur wenige Mikrometer (ca. 50 μm bei 1 mbar). Eine Kollision mit störenden Gasmolekülen ist dadurch sehr wahrscheinlich, und je höher der Impuls bei der Kollision, umso stärker tritt bereits im Einzugsbereich der Quelle ungewollte Fragmentierung auf. Kontrollieren lässt sich dies durch die Wahl geeigneter Beschleunigungsspannungen. Werden die Potenzialdifferenzen, die die Ionen durch die Ionenoptik hindurch beschleunigen, sehr hoch gewählt, z. B. die Spannung an der Ionen-transferkapillare oder an Skimmerelektroden, führen Stöße der Ionen mit überschüssigen Restgasmolekülen rasch zur Zunahme von Fragmentationssignalen im Massenspektrum. Bei der MS-Methodenoptimierung wird man sinnvollerweise mittels FIA stufenweise die Parameter von Quelle und Transferbereich optimieren und dabei die Signaländerung über die Zeit und die Spektrqualität beobachten, um exzessive Fragmentierung zu vermeiden. In manchen Fällen kann dieses Prinzip im Gegenzug aber auch dazu genutzt werden, um zusätzliche Substanzinformationen über Fragmentationen bei vergleichsweise schlichten und kostengünstigen Massenspektrometern wie Single-Quadrupol-Geräten zu gewinnen.

Eine sehr umfassende Tabelle zu den einzelnen Fragmentbildungen aus diversen funktionellen Gruppen ist der Literatur zu entnehmen [87]. Als Beispiele für häufig auftretende Fragmentierungen seien hier das Verhalten von Alkoholen, Aldehyden und Carbonsäuren genannt. Diese Substanzklassen zeichnen sich dank der hohen Elektronegativität von Sauerstoff durch eine starke Heteropolarität der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung(en) aus. Abhängig von der chemischen Konstitution des Analyten ist der Neutralverlust von Wasser unter geeigneten Bedingungen eine unmittelbare Folge davon, der Verlust von Kohlenstoffoxiden eine weitere. Im positiven Modus protoniert, spalten Alkohole ($\text{R}-\text{OH}_2^+$ aus $\text{R}-\text{OH}$) bevorzugt Wasser ab und erzeugen ein Fragment R^+ (entspricht $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$), das im Vergleich zum erwarteten Ion der intakten Molekülspezies $[\text{M} + \text{H}]^+$ um nominell 18 Da leichter ist. Aldehyde setzen unter Verlust von Kohlenmonoxid (CO) ein Fragment $[\text{M} + \text{H} - \text{CO}]^+$ frei. Aliphatische Carbonsäuren verlieren nach Protonierung bevorzugt das thermodynamisch sehr stabile Kohlendioxid, während aromatische Carbonsäuren unter diesen Bedingungen oftmals „nur“ Wasser abspalten und als Acyliumion detektiert werden.

Verunreinigungen aus der Apparatur

Falls es nicht gelingt, mithilfe bekannter Fragmentierungsreaktionen und chemischem Sachverstand eine plausible Begründung für das Zustandekommen bestimmter Massensignale zu finden, falls die Zahl an Peaks im MS-Spektrum so

ungewöhnlich hoch ist, dass sie mit Molekülzerfall allein nicht zufriedenstellend erklärt werden kann oder Störungen im Spektrum auftreten, die sich nicht in einem konkreten Massensignal äußern, bleibt immer noch ein ganz banaler Grund: Verunreinigungen, die aus der Anlage, also dem Chromatographen oder dem Massenspektrometer stammen. Wurde Letzteres erst zuvor gründlich gereinigt, bleibt als Übeltäter noch die (U)HPLC-Apparatur und alles, was fluidisch mit ihr verbunden ist; hier können die Eintragsquellen mitunter mannigfaltig sein:

- *Säulenbluten* einer alternden oder für MS ungeeigneten Trennsäule führt zum vermehrten Auswaschen von Bondingresten der stationären Phase, die sich vom Trägermaterial ablösen und ein erhöhtes Rauschen im MS-Chromatogramm zur Folge haben.
- *Weichmacher* sind in praktisch allen modernen Kunststoffen enthalten, angefangen von Plastikvials über Eluentenansaugschläuche und Kolbendichtungen bis hin zu Filterfritten und anderen Bauteilen. Weitverbreitet sind Phthalsäureester, die sich anhand ihrer charakteristischen Massen (m/z 279, 391, 413, 429, 454 u. v. m.) meist schnell identifizieren lassen. Auch Gleitstoffe oder Trennmittel wie Erucamid (m/z 338, 360) werden häufig beobachtet.
- Ebenfalls rasch zu identifizieren anhand ihres charakteristischen Auftretens im MS-Spektrum sind *Polyether* wie *Polyethylen(PEG)*- und *Polypropylenglykole (PPG)*. Sie kommen nahezu ubiquitär in Kunststoffen vor, können aber auch durch unsorgfältiges Arbeiten aus Einweghandschuhen oder Hautpflegemitteln in die Anlage eingebracht werden. Diese Substanzen treten als Polymere nie mit nur einem einzigen Massensignal auf, sondern zeigen stets ein charakteristisches Verteilungsprofil [93]. Die Massenabstände der Monomereinheiten betragen bei PEGs $\Delta m/z = 44$, bei PPGs 58, womit sich diese Verunreinigungen sehr schnell verraten.
- *Polysiloxane (Silicone)* sind Hauptbestandteil zahlreicher Hochleistungsöle und Vakuumfette. Dringen Spuren von Öldämpfen aus dem Wirkungsbereich der Vorvakuumpumpe in das Massenspektrometer ein, so finden sich charakteristische Signale z. B. bei $m/z = 371$, 445 oder 519. In einem solchen Fall empfiehlt sich auch ein prüfender Blick auf die Ionenoptik, z. B. auf die fokussierenden Multipole. Mitunter ist der Ölnebeleintrag in das Massenspektrometer so stark, dass sich über einen Zeitraum von einigen Tagen bis Wochen ein dünner Ölfilm auf den Metalloberflächen abscheidet. Spätestens dann ist mit einem deutlichen Abfallen der Empfindlichkeit zu rechnen und eine Reinigung des Massenspektrometers unvermeidlich. In einem solchen Fall hilft es manchmal bereits, die Abluftschläuche von Vorvakuumpumpe und Quellendrainage präventiv nicht in dieselbe Abluftabsaugung des Labors zu hängen, sondern sie möglichst weit (0,5–1 m) voneinander entfernt anzubringen.
- *Metallionen* können gelegentlich zu größeren Gasphasenaggregaten mit Analytmolekülen führen oder auch durch Reaktion mit Probenbestandteilen die Detektion bestimmter Substanzen unmöglich machen. Bereits diskutiert wurde die Bildung von Alkalimetalladdukten. Bei groben Anlagendefekten, bei denen es, z. B. infolge eines erheblich beschädigten Injektionsventils, zur umfassenden

Freisetzung von Eisenionen kommt, können in seltenen Fällen Eisenionencluster detektiert werden, die sich aber anhand der Isotopenverteilung des Eisens, die sich stark von den „üblichen Verdächtigen“ der organischen Chemie (C, H, N, O, S) unterscheidet, und seiner Mehrfachladung erkennen lassen. Schwerer wiegt bei biochemischen Anwendungen die Neigung vieler biologischer Substanzen, mit Eisen schwerlösliche bzw. -flüchtige Verbindungen zu bilden. Oft beschrieben wurde der Effekt, dass phosphorylierte Proteine und Peptide in einer eisenhaltigen Apparatur nach der Injektion auf Nimmerwiedersehen verschwinden. Abhilfe schafft in diesem Fall das Ausweichen auf eine stahlfreie Fluidik aus Titan, biokompatible Metalllegierungen oder PEEK-Kunststoff, wobei Letzter nicht sehr druckbeständig ist und keine UHPLC-Applikationen erlaubt.

- *Gelöste Restgase* wiederum sind eher ein Phänomen, das sich in Sprayinstabilität und störenden Spikes im MS-Chromatogramm bzw. -Spektrum äußert.

Die hier vorgestellten Aspekte können nur die wichtigsten allgemeinen Phänomene ansprechen und im Hinblick auf eine Begrenzung des Umfangs keinesfalls eine erschöpfende Auflistung aller bislang beobachteten Verunreinigungssignale [90] bieten. Keller et al. publizierten bereits vor einigen Jahren ein äußerst umfassendes Kompendium mit ausführlichem Tabellenmaterial zu bis dahin literaturbekannten MS-Kontaminanten [91]. Diverse Gerätehersteller gehen mit diesem Thema sehr offen um und haben eigene Unterlagen über MS-Kontaminationssignale zusammengestellt [92, 93], und nicht zuletzt ermöglicht auch das externe Gedächtnis der Menschheit zahlreiche Recherchemöglichkeiten. So bietet z. B. die Internetdatenbank MaConDa (Mass spectrometry Contaminant Database) der Universität Birmingham [94] eine Suchfunktion, die es erlaubt, nach über 300 Verunreinigungen anhand der exakten Masse, Substanzklasse der Kontaminanten und verwendetem Massenspektrometer (Bautyp und Fabrikat) zu suchen. Abgerundet wird das Angebot durch zahlreiche Literaturverweise.

1.2.3.5 Apparative Gründe für Fehlinterpretation von Massenspektren

Abschließend soll es nun darum gehen, welche apparativen Ursachen zu einer Fehlinterpretation von Massenspektren führen können. Wie schon eingangs diskutiert, haben die einzelnen MS-Bautypen ihre Stärken und Schwächen, die sich auch in der Qualität des analytischen Ergebnisses niederschlagen. Anhand dreier Szenarien soll dies im Folgenden diskutiert werden.

- *Irrtümliche Massenzuordnung je nach Ionisationsverfahren:*

Wie auch im Abschnitt 1.2.3.4 besprochen, beeinflusst schon die Art des Ionisationsverfahrens den im Spektrum erhaltenen Wert für das m/z -Verhältnis eines unbekannten Analyten. Bereits die vorherrschende Art der Ladungsübertragung durch Protonen führt ja nicht zur Molmasse des intakten Moleküls, sondern des um eine Protonenmasse korrigierten Werts. Bei Verfahren wie APPI, bei denen auch (ähnlich der in der LC/MS kaum angewandten EI) Ladungsübertragung durch Elektronen erfolgen kann, unterscheidet sich hingegen der Messwert vom theoretischen Wert des intakten Analytmoleküls nur

um den signifikant niedrigeren Beitrag einer Elektronenmasse. Die Bildung weiterer Addukte aus Alkalimetallionen und Solvensmolekülen kann zusätzlich dazu führen, dass irrtümlich eine Molmasse als $[M + H]^+$ interpretiert wird, obwohl man gerade womöglich de facto eine $[M + H_2O + Na]^+$ -Spezies auswertet. Ein Blick in das Massenspektrum hilft hier oft schon weiter, denn meist tritt nie nur eine Adduktspezies exklusiv auf, und die diversen Aggregate unterscheiden sich durch charakteristische m/z -Unterschiede.

- *Fehlinterpretation durch mangelnde Massenauflösung:*

Eine unzureichende Massenauflösung verleitet mitunter dazu, Massensignale nicht korrekt zu interpretieren. Treffen zwei Analytspezies zugleich im Massenanalysator ein, die sich nur um Bruchteile ihres m/z -Verhältnisses unterscheiden, so wird ein niedrigauflösendes Massenspektrometer diese Massensignale nicht voneinander getrennt erfassen können. Stattdessen erhält man ein Spektrum, das als Ergebnis der Überlagerung zweier Massenmuster die einhüllende Kurve zeigt, deren Peakmaxima nicht identisch sein müssen mit der Lage der jeweiligen Massenpeaks in den Spektren der Reinsubstanzen. Zudem ist mit niedrigauflösenden Massenspektrometern auch die Bestimmung höherer Ladungszustände nicht mehr möglich: Der Abstand der Isotopensignale zueinander beträgt bekanntlich $1/n$ -tel des Ladungszustandes n , sodass bei Analytationen mit drei oder mehr Ladungen bereits die Unterscheidbarkeit der Isotopensignale scheitern kann. Dies führt in summa zum Nichtentdecken von koelutierenden Verunreinigungen oder der irrtümlichen Angabe von falschen Substanzzuordnungen oder -identifizierungen. Wie gut die Auflösung eines Massenspektrometers sein muss, um diese Probleme zu vermeiden, hängt – neben der Geldbörse des Anwenders – von der Komplexität der zu untersuchenden Proben und der Qualität der Vortrennung ab. Je besser die Chromatographie, umso eindeutiger wird die Aussage eines Massenspektrums werden. Generell sollte ein Massenspektrometer, das zur Bestimmung von akkuraten Massen verwendet wird, eine Auflösung R von mindestens 10–15.000 bieten (in der Literatur wird $R = 10.000$ gemeinhin als Grenze zur Hochauflösung und $R > 100.000$ zur Ultrahochauflösung betrachtet [75]).

- *Falsche Massenbestimmung durch ungeeignete oder instabile Messbedingungen:*

Es liegt auf der Hand: Da eine Massenbestimmung stets über eine Vergleichsmessung mit bekannten Kalibriersubstanzen erfolgt, entscheidet die Güte der Gerätekalibrierung und ihre Langzeitstabilität über Wohl und Wehe. Abgelaufene oder verschmutzte Kalibrierlösungen mit partiell zersetzten Referenzsubstanzen sind hier wenig hilfreich. Bei einer unklaren Zahl an Massensignalen während der Kalibrierung gerät die Autotuningfunktion des Massenspektrometers, sofern vorhanden, rasch ins Straucheln und scheitert womöglich ganz. Einmal erfolgreich kalibriert, muss regelmäßig durch einen Tuningcheck die Güte der Kalibrierung überprüft werden. Wie bereits diskutiert, sind insbesondere TOF-Geräte anfällig gegenüber einer Drift der Massenkalibrierung, bereits im Zeitraum weniger (Viertel-)Stunden. Hier ist eine interne Kalibrierung mit permanenter Zuführung der Referenzsubstanzen unumgänglich. Bei ionenfallenartigen Massenspektrometern (QIT, LIT, FTICR, Orbitrap) sorgt zudem die

räumliche Dichte der in dem Ionenspeicher gefangenen Spezies für ungewollte Abweichungen vom theoretischen Ergebnis. Die zirkulierenden Ionenpakete aller Analytmoleküle wirken als eine Raumladung (space charge), die eigene elektrische Felder erregt und dadurch wie eine Abschirmung das von außen angelegte elektromagnetische Feld lokal erheblich verzerrt. Dieser Effekt, der bei einer hohen Teilchenzahldichte in der Speicherzelle sowie bei vielfach geladenen Ionen spürbar wird, sorgt für eine Verschiebung der Resonanzbedingung der jeweiligen Ionensorten in der Ionenfalle. Darunter leiden Massengenauigkeit und Auflösung mitunter deutlich. Ein zu hoher Füllgrad der Speicherzelle beeinflusst das Messergebnis somit negativ. Ist die Falle hingegen zu gering gefüllt, verliert der Anwender Empfindlichkeit. Den optimalen Füllgrad berechnen Steuersoftwares heute dynamisch in Echtzeit (je nach Hersteller ICC, AGC oder anderweitig benannt). Bei konzentrierten Probenzonen allerdings wird der maximale Füllstand mitunter überschritten. Bauartbedingt leiden lineare Ionenfallen (LIT) aufgrund ihrer längeren räumlichen Ausdehnung weniger unter dem Raumladungseffekt als zylindrische (QIT).

1.2.4

Fazit

Seit den Anfängen in den 1990er-Jahren ist nun die Kopplung der Flüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie mittlerweile in vielen Bereichen erfolgreich im Einsatz. Nach der ersten Sturm-und-Drang-Phase haben sich viele ausgereifte LC/MS-Lösungen am Markt etabliert, die präzise und robust ihren Dienst im Laboralltag verrichten. Während bestimmte MS-Techniken bis heute dem reinen Forschungsbetrieb mit entsprechend umfangreichem Betreuungsaufwand vorbehalten sind, drängen andere stark in die Routineanwendung, nachdem heutzutage kein ausgeprägter Wagemut des Analytikers mehr vonnöten ist, um sich an der LC/MS-Kopplung zu versuchen. In dieser Zeit der Marktreifung haben sich nicht nur neue MS-Technologien wie die Orbitrap etabliert, auch die Flüssigchromatographie hat sich weiterentwickelt und mit der UHPLC einen großen Schritt nach vorn, hin zu kürzeren Analysendauern bzw. deutlich höherer Trennleistung gemacht. Alles in allem stellt die LC/MS heute ein mächtiges, zugleich aber angesichts der Komplexität der Geräte erstaunlich benutzerfreundliches Analytikwerkzeug dar, auch wenn Massenspektrometrie keine analytische Allzweckwaffe ist und es auch absehbar nicht sein wird. Voraussetzung für den höchsten Nutzen einer LC/MS-Installation ist die sorgfältige physikochemische Abstimmung der beiden Welten LC und MS aufeinander, wozu dieses Kapitel einen Beitrag zu leisten versucht. In der Zukunft wird mit Sicherheit noch manches technologische Neuland betreten, sei es zur Steigerung der Instrumentenleistung hin zu noch mehr Auflösung und Geschwindigkeit, sei es zur Miniaturisierung der Geräte oder zur Verbesserung der Bedienerfreundlichkeit durch neuartige, leistungsfähige Softwareumgebungen. Eine Konstante bleibt jedoch: Nicht nur die Trenntechnik profitiert von der umfassenden Information durch die Massenanalyse. Auch die Massenspektrometrie bleibt ohne sorgfältig optimierte Chromato-

graphie weit hinter ihren Möglichkeiten zurück. Beide Systeme, Chromatographie wie Massenspektrometrie, werden daher noch lange aufeinander angewiesen bleiben.

1.2.5

Abkürzungen

APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl. atmospheric pressure chemical ionization)
CAD	Charged-Aerosol-Detektion
CID	Stoßinduzierte Fragmentierung (engl. collision-induced dissociation)
EI	Elektronionisation (früher auch: Elektronenstoßionisation)
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESLD	Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (engl. evaporative light scattering detector)
FA	Ameisensäure
FIA	Fließinjektionsanalyse
FT	Fourier-Transformation
GDV	Gradientenverzögerungsvolumen (engl. gradient delay volume)
HPG	Hochdruckgradientenpumpe (engl. high-pressure gradient pump)
HR/AM	Hochauflösung/Exaktmassenmessung (engl. high resolution/accurate mass)
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl. high throughput screening)
HV	Hochspannung (engl. high voltage)
ICR	Ionencyclotron-Resonanz
LIT	Lineare Ionenfalle (engl. linear ion trap)
LPG	Niederdruckgradientenpumpe (engl. low-pressure gradient pump)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MSD	Massenselektiver Detektor
QIT	Zylindrische Ionenfalle (engl. quadrupole ion trap; Begriff nicht mehr zeitgemäß)
SIM	Single Ion Monitoring
SRM	Selected Reaction Monitoring
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeitmassenanalysator (engl. time of flight)

1.3

LC/MS-Kopplung in der Praxis – Anwender berichten

Alban Muller, Andreas Hofmann

Bei der LC/MS-Kopplung müssen im Vergleich mit der LC/UV-Kopplung einige wichtige Veränderungen an den LC-Konditionen vorgenommen werden, um die Kompatibilität mit der massenspektrometrischen Detektion zu gewährleisten. Es

werden häufig Wasser/Methanol- oder Wasser/Acetonitril-Gradienten für die Umkehrphasenchromatographie bei der LC/MS-Kopplung verwendet. Bei der Einstellung des pH-Werts ist darauf zu achten, dass am besten nur flüchtige Puffersysteme verwendet werden, um eine Kontamination des Massenspektrometers zu verhindern. So können zum Beispiel Ameisensäure oder Essigsäure im sauren und Ammoniak im basischen pH-Bereich verwendet werden. Bei Proben mit höherem Salzgehalt kann der LC-Fluss nach der Chromatographiesäule für die ersten Minuten über ein Schaltventil in den Abfall gelenkt werden, um das Massenspektrometer nicht mit Salzen zu kontaminieren. Als Alternative für die Analyse von salzhaltigen Proben kann auch ein zweidimensionales LC-System mit einer Anreicherungssäule verwendet werden. Bei komplexen biologischen Proben ist mit einem verringerten Signal/Rausch-Verhältnis aufgrund von Matrixeffekten zu rechnen. Es ist sehr empfehlenswert Standards mit schweren Isotopen zur Probe zu geben, um sowohl Extraktionsverluste als auch Matrixeffekte quantifizieren zu können. Häufig werden ^2H , ^{13}C und ^{15}N für die Isotopenmarkierung verwendet. Eine Markierung mit ^{13}C oder ^{15}N hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu ^2H keine Verschiebung der Retentionszeit auftritt.

Die Flussraten von LC-Systemen für die MS-Kopplung reichen von nl/min bis hin zu einigen mL/min. Das am besten geeignete LC-System kann abhängig von Faktoren wie der notwendigen Sensitivität und der gewünschten Analysedauer der Methode ausgewählt werden. Da die Intensität des massenspektrometrischen Signals konzentrationsabhängig ist, werden Nano-LC-Systeme vor allem dann verwendet, wenn eine möglichst hohe Sensitivität der Methode wichtig ist. Dies ist häufig beim Nachweis niedrigkonzentrierter endogener Moleküle der Fall, wie zum Beispiel im Bereich der Proteom-Forschung. Die Chromatographiesäulen besitzen dabei oft einen nur 75 μm oder noch geringeren Innendurchmesser. Die lange Analysedauer der Nano-LC-Methoden von unter Umständen bis über eine Stunde wird für die hohe Sensitivität der Methode in Kauf genommen. Für den Nachweis und die Quantifizierung von höher konzentrierten Substanzen werden meist höhere Flussraten verwendet. Im U(H)PLC Bereich finden häufig Chromatographiesäulen mit 1 mm und 2,1 mm Innendurchmesser Anwendung und die Analyse kann in wenigen Minuten durchgeführt werden.

Abhängig von den Eigenschaften des Analyten und der Flussrate können unterschiedliche Ionisationsmethoden gewählt werden. Die ESI (electro spray ionization) ist für ein breites Spektrum von Analyten und Flussraten geeignet. Polare und auch unpolare Analyten lassen sich sehr gut mit ESI massenspektrometrisch analysieren. Neben ESI stehen APCI (atmospheric pressure chemical ionization) und APPI (atmospheric pressure photo ionization) zur Verfügung, die vor allem für die Analyse von sehr unpolaren Substanzen zur Anwendung kommen. In der Regel müssen mit steigenden Flussraten die Temperatur und die Menge der Trockengase in der Ionenquelle gesteigert werden, um eine vollständige Verdampfung der Lösungsmittel gewährleisten zu können. In den Gebrauchsanweisungen der Ionenquellen werden häufig Parameter für unterschiedliche Lösungsmittelflussraten vorgeschlagen. Diese Parameter stellen in der Regel einen guten Ausgangspunkt für die eigene Optimierung da. Neben den von den Lösungsmittel-

flussraten abhängigen Parametern müssen auch die von der Substanz abhängigen Parameter der Ionenquelle und des Massenspektrometers optimiert werden. Hierbei kann eine Stammlösung der zu analysierenden Substanz direkt per Spritzenpumpe in das Massenspektrometer infundiert werden, um alle Einstellungen für ein maximales Signal/Rausch-Verhältnis optimieren zu können. Durch das Zusammenführen des Flusses aus der Spritzenpumpe und der LC über ein T-Stück kann man sehr ähnliche Bedingungen zur späteren Analyse simulieren und so die bestmöglichen fluss- und substanzabhängigen Parameter der Ionenquelle und des Massenspektrometers finden. Da bei der direkten Infusion relativ hohe Konzentrationen verwendet werden müssen, sollte man sicherstellen, dass durch ausreichendes Waschen das Hintergrundsignal des Analyten gering genug für anschließende Analysen ist. Die kurze Analysedauer bei U(H)PLC Systemen und die schnelle Scanfrequenz moderner Massenspektrometer ermöglichen auch zahlreiche unterschiedliche Parameter direkt innerhalb einer LC/MS-Analyse zu variieren. Durch ein direktes Variieren der Parameter während der LC/MS-Analyse können weniger konzentrierte Lösungen verwendet werden. Viele Schritte der Optimierung können von der Gerätesoftware oder einer geräteunabhängigen Software automatisiert werden. Jedoch sollte immer kritisch überprüft werden, ob die von der Software gefundenen Parameter auch plausibel sind. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen, ist bei Massenspektrometern in den letzten Jahren ein Trend zu vergrößerten Einlassöffnungen zu beobachten. Da nicht nur mehr Ionen, sondern auch mehr Neutralteilchen über eine größere Einlassöffnung in das Massenspektrometer gelangen, sind starke Vorvakuum- und Turbopumpen notwendig. Darüber hinaus wurden bei einigen Massenspektrometern auch Änderungen an der Geometrie der Ionenoptik vorgenommen, wie z. B. bei StepWave™ oder iFunnel, sodass geladene Moleküle noch effizienter von Neutralteilchen abgelenkt werden können. Die erhöhte Ionentransmission führt zu einem erhöhten Signal/Rausch-Verhältnis, robusteren MS-Methoden und einer vereinfachten Optimierung der Geräteparameter.

Massenspektrometer unterscheiden sich abhängig vom verwendeten Massenanalysator deutlich in ihren Eigenschaften wie Massengenauigkeit, Massenauflösung, Scangeschwindigkeit und Sensitivität. Je nach Anwendung sind unterschiedliche Eigenschaften von besonderer Bedeutung. Massenbestimmungen in wenig komplexen Proben können mit einfachen Massenanalysatoren wie einem einfachen Quadrupol, einer Ionenfalle oder einem TOF (time of flight)-Instrument durchgeführt werden. Für die Analyse von komplexeren biologischen Proben werden in der Regel Hybridinstrumente verwendet. Sie kombinieren verschiedene Massenanalysatoren miteinander. Für die Identifikation von unbekannten Substanzen werden häufig Hybridgeräte mit hoher Massengenauigkeit und Massenauflösung, wie zum Beispiel ein Q-TOF-, ein TOF-TOF-, ein Ionenfalle-Orbitrap- oder ein Quadrupol-Orbitrap-Instrument verwendet. Für die Quantifizierung werden häufig dreifache Quadrupol-Massenspektrometer mit hoher Scangeschwindigkeit und exzellenter Sensitivität eingesetzt. Ein dreifaches Quadrupol-Instrument besteht aus drei hintereinander angeordneten Quadrupolen (Abb. 1.12a). Der erste Quadrupol dient als Massenfilter, der das ionisierte Analytmolekül herausfiltert.

Das intakte ionisierte Analytmolekül wird auch Vorläuferion genannt. Im zweiten Quadrupol wird das Vorläuferion dann durch eine kollisionsinduzierte Dissoziation fragmentiert. Ein spezifisches Fragmentation des Analyten wird abschließend im dritten Quadrupol herausgefiltert. Das zweifache Filtern im ersten und dritten Quadrupol verleiht den dreifachen Quadrupol-Massenspektrometern eine exzellente Sensitivität und sehr hohe Selektivität.

Zum Beispiel lassen sich zwei Isomere der Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) nur schwer chromatographisch trennen und die einfache Massenbestimmung führt zu überlappenden Peaks (Abb. 1.12c). Bei der Verwendung von spezifischen Fragmentationen lassen sich die beiden Isomere jedoch problemlos massenspektrometrisch mittels eines dreifachen Quadrupol-Massenspektrometers auflösen [95].

Für polare Moleküle können Ionenpaarbildner, wie zum Beispiel Trifluoressigsäure im sauren und Triethylamin im basischen Bereich, für die Trennung mittels Umkehrphasenchromatographie verwendet werden. Bei der Verwendung von Ionenpaarbildnern ist jedoch generell mit einem verringerten Signal/Rausch-Verhältnis und zudem bei der Polarisationsumkehr mit hohen Hintergrundsignalen von Trifluoressigsäure bzw. Triethylamin zu rechnen. Eine weitere Möglichkeit um sehr polare Moleküle zu trennen, ist die Ionenchromatographie. Die Ionenchromato-

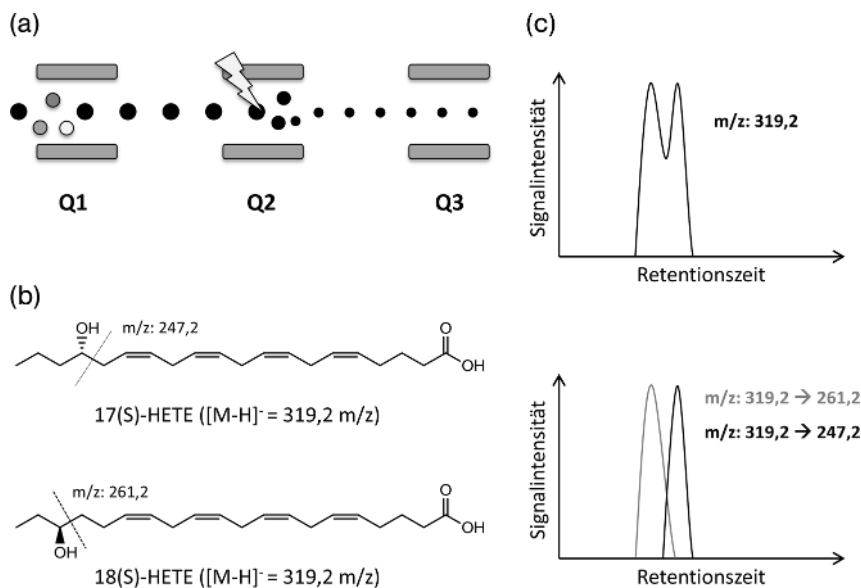


Abb. 1.12 (a) Schematische Darstellung der Quadrupole eines dreifachen Quadrupol-Massenspektrometers. Zur vereinfachten Darstellung sind jeweils nur zwei der vier Elektroden der Quadrupole gezeigt. Im ersten Quadrupol (Q1) wird das Vorläuferion herausgefiltert, im Q2 wird das Vorläuferion durch kollisionsinduzierte Dis-

soziation fragmentiert und im Q3 werden dann spezifische Fragmentationen herausgefiltert, (b) Isomere der Hydroxyeicosatetraensäure (HETE), (c) schematische Darstellung der massenspektrometrischen Auflösung von HETE-Isomeren

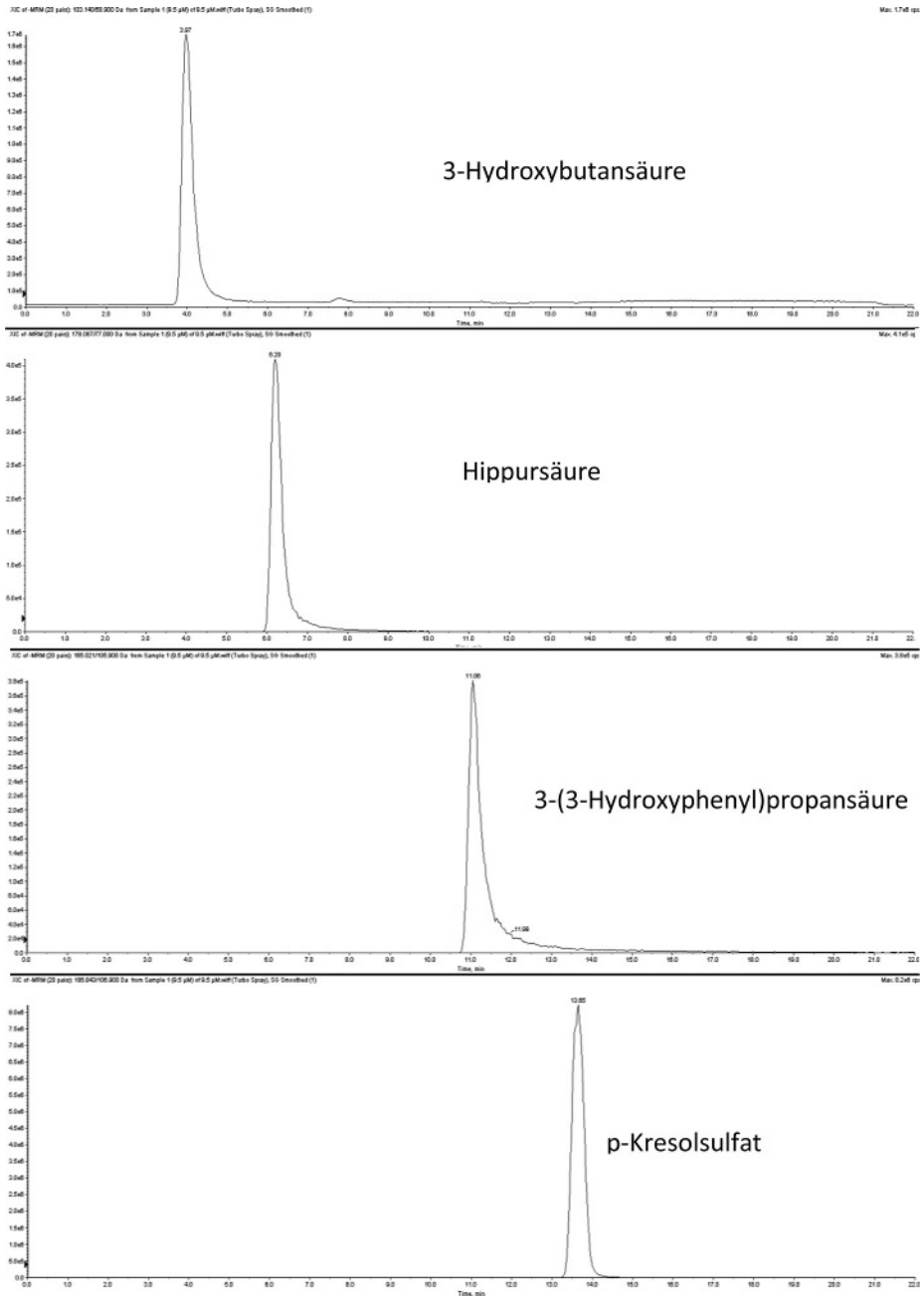


Abb. 1.13 Chromatogramme der Trennung von vier polaren Molekülen mittels IC und Detektion mithilfe eines dreifachen Quadrupol-Massenspektrometers

graphie (IC) ist eine zuverlässige Lösung, um geladene Moleküle zu trennen, die auf Umkehrphasen nicht retardiert werden. Die Trennung erfolgt bei der Ionenchromatographie auf der Grundlage der Ladung und der Größe der Analyten. Die stationäre Phase der IC basiert auf Polymeren, wodurch die Chromatographiesäulen, im Gegensatz zu Kieselgelsäulen, eine hervorragende Stabilität im alkalischen pH-Bereich besitzen. Für die Anionen-Austauschchromatographie wird häufig ein Gradient von Kaliumhydroxid verwendet und die Elutionskraft ist direkt abhängig von der Konzentration der Hydroxidionen. Bei der Kationen-Austauschchromatographie werden Eluenten wie z. B. Methansulfonsäure verwendet.

Nachfolgend ist ein praktisches Beispiel der LC/MS-Kopplung einer Anionen-Austauschchromatographie mit einem dreifachen Quadrupol-Instrument beschrieben (Abb. 1.13). Mit einem IC-System wird zuerst ein KOH-Gradient im Eluentengenerator erzeugt. Die Analyten werden auf der IC-Säule getrennt und anschließend die Kaliumionen im elektrochemischen Suppressor gegen Hydroniumionen H_3O^+ ausgetauscht. Ein konventioneller Detektor in der Ionenchromatographie ist der Leitfähigkeitsdetektor, der die elektrische Leitfähigkeit der Flüssigkeit misst. Die Leitfähigkeit ist direkt proportional zur Konzentration der gelösten Ionen. Die Messung der Leitfähigkeit ist vergleichsweise wenig empfindlich für biologische Anwendungen, wie zum Beispiel im Metabolom-Bereich. Außerdem ist die Leitfähigkeitsmessung auch nicht selektiv, sodass Analyten mit gleicher Retentionszeit nicht unterschieden werden können. Ein Massenspektrometer hingegen erlaubt eine sehr empfindliche und selektive Detektion. Ohne elektrochemischen Suppressor in der IC-Anlage würden die Kaliumionen zu einer starken Unterdrückung der Ionisation in der ESI-Quelle führen und das Massenspektrometer stark kontaminieren. Mit Suppressor jedoch wird eine wässrige Lösung mit geringer Salzkonzentration von einigen Mikrosiemens erzeugt, die massenspektrometrisch analysiert werden kann. Um die Effizienz der negativen Ionisation der Analyten zu erhöhen, ist es ratsam über ein T-Stück kurz vor dem Massenspektrometer ein organisches Lösungsmittel, wie zum Beispiel Methanol, zuzugeben. Bei der hier beschriebenen Analyse wurde ein Dionex ICS-3000 IC-System mit einer ESI-Ionenquelle und einem AB Sciex QTrap 5500 Massenspektrometer gekoppelt. Das dreifache Quadrupol-Massenspektrometer ermöglicht eine sehr sensitive und spezifische Detektion der Analyten mittels MS/MS-Experimenten.

Konditionen der Ionenchromatographie

Eluentengenerator	EGC III KOH
Vorsäule	Ion Pac AG20 2 × 50 mm
Analytische Säule	Ion Pac AS20 2 × 250 mm
Säulentemperatur	35 °C
IC-Pumpe	Isokratisch, 250 µL/min
Suppressorstrom	62 mA
Volumen der Probenschleife	2 µL
Methanolflussrate	50 µL/min

Gradientengenerator

Zeit (min)	[OH ⁻] (mM)
0	10
7,5	45
17,5	48
18,5	100
22,5	100
22,6	10
25	10

SRM-Übergänge

Verbindung	Q1 Masse (Da)	Q3 Masse (Da)
3-Hydroxybutansäure	103,1	58,9
Hippursäure	178,1	134,1
3-(3-Hydroxyphenyl)propansäure	165,0	105,9
p-Kresolsulfat	186,8	106,9

Literatur

- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. (2003) *Anal Chem*, **75**, 3019–3030.
- Annesley, T.M. (2003) *Clin Chem*, **49**, 1041–1044.
- McEwen, C.N., McKay, R.G., Larsen, B.S. (2005) *Anal Chem*, **77**, 7826–7831.
- McEwen, C., Gutteridge, S. (2007) *J Am Soc Mass Spec*, **18**, 1274–1278.
- Ray, A.D., Hammond, J., Major, H. (2010) *Eur J Mass Spectrom*, **16**, 169–174.
- Cody, R.B., Laramée, J.A., Durst, H.D. (2005) *Anal Chem*, **77**, 2297–2302.
- Takats, Z., Wiseman, J.M., Gologan, B., Cooks, R.G. (2004) *Science*, **306**, 471–473.
- Laramée, J.A., Cody, R.B. (2007) in *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*, vol 6, (Hrsg. M.L. Gross, R.M. Caprioli), Elsevier.
- Schurek, J., Vaclavik, L., Hooijerink, H., Lacina, O., Poustka, J., Sharman, M., Caldwell, M., Nielsen, M. W. F., Hajslova (2008) *J. Anal. Chem.*, **80**, 9567–9575.
- Lloyd, J.A., Harron, A.F., McEwen, C.N. (2009) *Anal. Chem.*, **81**, 9158–9162.
- Ahmed, A., Cho, Y.J., No, M.H., Koh, J., Tomczyk, N., Giles, K., Yoo, J.S., Kim, S. (2011) *Anal. Chem.* **2011**, **83**, 77–83.
- Pan, H.F., Lundin, G. (2011) *Eur. J. Mass Spectrom.*, **17**, 217–225.
- Maleknia, S.D., Vail, T.M., Cody, R.B., Sparkman, D.O., Bell, T.L., Adams, M.A. (2009) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 2241–2246.
- Edison, S.E., Lin, L.A., Gamble, B.M., Wong, J., Zhang, K. (2011) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25**, 127–139.
- Krieger, S., von Trotha, A., Leung, K.S.-Y., Schmitz, O. Analytical and Bioanalytical Chemistry DOI 10.1007/s00216-012-6531-4
- Cole, R.B. (Aufl.) (1997) *Electrospray ionization mass spectrometry*, John Wiley & Sons, New York.
- Cech, N.B., Enke, C.G. (2001) *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 362–387.
- Kebarle, P. (2000) *J. Mass. Spectrom.*, **35**, 804–817.
- Niessen, W.M.A. (Hrsg.) (1999) *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, Marcel Dekker, Inc., New York.

- 20 Van Berkel, G.J., McLuckey, S.A., Glish, G. L. (1991) *Anal. Chem.*, **63**, 2064–2068.
- 21 Van Berkel, G.J., McLuckey, S.A., Glish, G. L. (1992) *Anal. Chem.*, **64**, 1586–1593.
- 22 Van Berkel, G.J., Asano, K.G. (1994) *Anal. Chem.*, **66**, 2096–2102.
- 23 Van Berkel, G.J., Zhou, F. (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 2916–2923.
- 24 Van Berkel, G.J., Zhou, F. (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 3958–3964.
- 25 Van Berkel, G.J., Quirke, J.M.E., Tigani, R. A., Dilley, A.S., Covey, T.R. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 1544–1554.
- 26 Van Berkel, G.J., Quirke, J.M.E., Adams, C.L. (2000) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 849–858.
- 27 Williams, D., Young, M.K. (2000) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 2083–2091.
- 28 Quirke, J.M.E., Hsz, Y.-L., Van Berkel, G.J. *Nat. Prod.*, **63**, 230–237.
- 29 Williams, D., Chen, S., Young, M.K. (2001) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 182–186.
- 30 Quirke, J.M.E., Van Berkel, G.J. (2001) *J. Mass Spectrom.*, **36**, 179–187.
- 31 Kauppila, T.J., Kostianen, R., Bruins, A.P. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 808–815.
- 32 Rentel, C., Strohschein, S., Albert, K., Bayer, E. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 4394–4400.
- 33 Bayer, E., Gfrörer, P., Rentel, C. (1999) *Angew. Chem. Int.*, Ed. **38**, 992–995.
- 34 Takino, M., Daishima, S., Yamaguchi, K., Nakahara, T. (2001) *J. Chromatogr. A*, **928**, 53–61.
- 35 Roussis, S.G., Proulx, R. (2001) *Anal. Chem.*, **74**, 1408–1414.
- 36 Marwah, A., Marwah, P., Lardy, H. (2002) *J. Chromatogr. A*, **964**, 137–151.
- 37 Singh, G., Gutierrez, A., Xu, K., Blair, I.A. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 3007–3013.
- 38 Higashi, T., Takido, N., Yamauchi, A., Shimada, K. (2002) *Anal. Sci.*, **18**, 1301–1307.
- 39 Higashi, T., Takido, N., Shimada, K. (2003) *Analyst*, **128**, 130–133.
- 40 Hayen, H., Jachmann, N., Vogel, M., Karst, U. (2002) *Analyst*, **127**, 1027–1030.
- 41 Zwiener, C., Frimmel, F.H. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 851–861.
- 42 Syage, J.A., Evans, M.D. (2001) *Spectroscopy*, **16**, 15–21.
- 43 Syage, J.A., Hanold, K.A., Evans, M.D., Liu, Y. (2001) Atmospheric pressure photoionizer for mass spectrometry, Patent no. WO0197252
- 44 Robb, D.B., Covey, T.R., Bruins, A.P. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 3653–3659.
- 45 Robb, D.B., Bruins, A.P. (2001) Atmospheric pressure photoionization (APPI): A new ionization method for liquid chromatography–mass spectrometry, Patent No. WO0133605.
- 46 Baim, M.A., Eartherton, R.I., Hill, H.H. Jr. (1983) *Anal. Chem.*, **55**, 1761–1766.
- 47 Leasure, C.S., Fleischer, M.E., Anderson, G.K., Eiceman, G.A. (1986) *Anal. Chem.*, **58**, 2142–2147.
- 48 Spangler, G.E., Roehl, J.E., Patel, G.B., Dorman, A. (1994), U.S. Patent no. 5,338,931.
- 49 Kauppila, T.J., Kuuranne, T., Meurer, E.C., Eberlin, M.N., Kotiaho, T., Kostianen, R. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 5470–5479.
- 50 Discroll, J.N. (1976) *Am. Lab.*, **8**, 71–75.
- 51 Discroll, J.N. (1977) *J. Chromatogr.*, **134**, 49–55.
- 52 Locke, D.C., Dhingra, B.S., Baker, A.D. (1982) *Anal. Chem.*, **54**, 447–450.
- 53 Zeleny, J. (1917) *Phys. Rev.*, **10**, 1–6.
- 54 Wilson, C.T.R., Taylor, G. (1925) *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **22**, 728–730.
- 55 Taylor, G. (1964) *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A*, **280**, 383–397.
- 56 Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., Alice, M.B. (1968) *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240–2249.
- 57 Yamashita, M., Fenn, J.B. (1984) *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451–4459.
- 58 Cole, R.B. (2000) *J. Mass Spectrom.*, **35**, 763–772.
- 59 Kebarle, P., Peschke, M. (1994) *Anal. Chem.*, **66**, 712–718.
- 60 Thomson, B.A., Iribarne, J.V. (1979) *J. Chem. Phys.*, **71**, 4451–4463.
- 61 Molin, L., Traldi, P. (2007) Advances in LC–MS instrumentation, basic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography*, in C. Achille (Hrsg.), Library, vol. **72** Kapitel 1, S. 1–9.
- 62 Carrol, D.I., Dzidic, I., Stillwell, R.N., Horning, M.G., Horning, E.C. (1974) *Anal. Chem.*, **46**, 706–710.
- 63 Moini, M. in: Gross, M.L., Caprioli, R.M. (Hrsg.) (2007) *The Encyclopedia of Mass*

- Spectrometry, Atmospheric Pressure Chemical Ionization: Principles, Instrumentation, and Applications, Elsevier, vol 6, S. 344–354.
- 64 Lias, S.G. Ionization Energy Evaluation, in NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69 (Hrsg.) P.J. Linstrom, W.G. Mallard, March 2003, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899 (<http://webbook.nist.gov>).
 - 65 Raffaelli, A., Saba, A. (2003) *Mass Spectrom. Rev.*, **22**, 318–331.
 - 66 Syage, J.A. (2004) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 1521–1533.
 - 67 Kauppila, T.J., Kotiaho, T., Kostiainen, R., Bruins, A.P. (2004) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 203–211.
 - 68 Constapel, M., Schellenträger, M., Schmitz, O.J., Gäb, S., Brockmann, K.-J., Giese, R., Benter, Th. (2005) *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **19**, 326–336.
 - 69 Tian, N., Thiessen, A., Schiewek, R., Schmitz, O.J., Hertel, D., Meerholz, K., Holder, E. (2009) *Journal of Organic Chemistry*, **74**, 2718–2725.
 - 70 Schiewek, R., Mönnikes, R., Wulf, V., Gäb, S., Brockmann, K.J., Benter, Th., Schmitz, O.J. (2008) *Angewandte Chemie Int.*, Aufl. 2008 **47**, 9989–9992 und *Angewandte Chemie* 2008, **120**, 10138–10142.
 - 71 Schiewek, R., Schellenträger, M., Mönnikes, R., Lorenz, M., Giese, R., Brockmann, K.-J., Gäb, S., Benter, Th., Schmitz, O.J. (2007) *Analytical Chemistry*, **79**, 4135–4140.
 - 72 Schiewek, R., Lorenz, M., Brockmann, K. J., Benter, Th., Gäb, S., Schmitz, O.J. (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**, 87–96.
 - 73 Makarov, A. (2000) *Anal.Chem.*, **72**, 1156–1162.
 - 74 Perry, R.H., et al. (2008) *Mass Spectrometry Reviews*, **27**, 661–699. Beispiele (DIP-APCI mit TOF).
 - 75 Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M. (2012) *J. Chromatogr. A*, **1259**, 3–15.
 - 76 de Hoffmann, V., Stroobant, V. (2009) *Mass Spectrometry-Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
 - 77 Rogatsky, E., Zheng, Z., Stein, D. (2010) *J. Sep. Sci.*, **33**, 1513–1517.
 - 78 Thermo Fisher Scientific, „Dionex–Viper Fingertight Fitting“, Thermo Fisher Scientific, [Online]. Available: <http://www.dionex.com/en-us/products/accessories/reagents-accessories/viper-fingertight/lp-81335.html>. [Zugriff am 05 November 2012].
 - 79 MicroSolv Technology Corporation, „Sure-Fit Connectors“, [Online]. Available: http://www.microsolvtch.com/PDF/SureFit_Lit.pdf. [Zugriff am 2012 November 2012].
 - 80 Rodriguez-Aller, M. et al. (2012) *J. Chromatogr. A*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.061>.
 - 81 Schappler, J., Nicoli, R., Nguyen, D., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Guilleme, D. (2009) *Talanta*, **78**, 377–387.
 - 82 Hopfgartner, G., Bean, K., Henion, J. (1993) *J. Chromatogr.*, **647**, 51–61.
 - 83 Asperger, A., Efer, J., Koal, T., Engewald, W. (2001) *J. Chromatogr. A*, **937**, 65–72.
 - 84 Dams, R., Benijts, T., Günther, W., Lambert, W., De Leenheer, A. (2002) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1072–1077.
 - 85 Hoffmann, T., Martin, M.M. (2010) *Electrophoresis*, **31**(7), S. 1248–1255.
 - 86 Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., Gennaro, M.C. (2010) *J. Chromatogr. A*, **1217**, 3929–3937.
 - 87 Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M. (2010) *J. Chromatogr. A*, **1217**, 3908–3921.
 - 88 McLafferty, F.W., Turecek, F. (1993) *Interpretation of Mass Spectra*, University Science Books, Mill Valley, CA, USA.
 - 89 Smith, R.M. (2005) *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
 - 90 Guo, X.H., Bruins, A.P., Covey, T.R. (2006) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**(20), 3145–3150.
 - 91 Keller, B.O., Suj, J., Young, A.B., Whittall, R.M. (2008) *Analytica Chimica Acta*, **627** (1), 71–81.
 - 92 Agilent Technologies, What are the common contaminants in my GCMS. [Online] Link: <http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/FAQ232%20F05001.pdf>. [Zugriff am 05 November 2012].
 - 93 Waters Corporation, ESI+ Common Background Ions. [Online] Link: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/>

- bkgnd_ion_mstr_list.pdf. [Zugriff am 05 November 2012].
- 94 MaConDa Mass spectrometry Contaminant Database [Online] Link: <http://www.maconda.bham.ac.uk/search.php> [Zugriff am 05 November 2012].
- 95 Dumlao, D.S., Buczynski, M.W., Norris, P. C., Harkewicz, R., Dennis, E. (2011) High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acyl ethanolamines. *Biochimica et biophysica acta*, **1811**(11), 724–736. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.005.