

# Koordinations-Ionenspray-MS (CIS-MS), eine universelle Methode zur Detektion und Charakterisierung für die Direktkopplung mit Trennmethoden\*\*

Ernst Bayer,\* Petra Gfrörer und Claus Rentel

Spraytechniken, wie die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)<sup>[1]</sup> oder die Elektrospray-Ionisierung (ESI)<sup>[2–5]</sup> haben in der Massenspektrometrie zunehmende Bedeutung erlangt. Insbesondere die leichte Kopplung mit Trennmethoden wie HPLC,<sup>[6]</sup> Kapillarelektrophorese (CE)<sup>[7]</sup> und Kapillarelektrochromatographie (CEC)<sup>[8]</sup> ist zur Charakterisierung, Analyse und Strukturaufklärung die Methode der Wahl. All diesen Methoden ist die Erzeugung von Nebeltröpfchen, aus denen Ionen freigesetzt werden, gemeinsam. Bei der APCI wird die Ionisierung durch die Ionen eines Reaktantgases erreicht, die durch Coronaentladung an einer Metallspitze gebildet werden. Bei der ESI wird die Probelösung durch ein hohes angelegtes Feld zerstäubt. Die Vernebelung wird meist durch ein coaxial austretendes Gas pneumatisch unterstützt. Je nach angelegtem Feld beruht die Ionisierung auf der Protonierung basischer oder der Deprotonierung saurer Gruppen der Analytmoleküle. Wenn auch die ESI-MS z.B. bei den wegen ihrer Aminogruppen leicht protonierbaren Peptiden und Proteinen und den leicht deprotonierbaren Oligonucleotiden eine breite Anwendung gefunden hat, ist diese Methode bei unpolaren organischen Verbindungen nicht anwendbar und bei wenig polaren Verbindungen mit schwach sauren oder schwach basischen Funktionen nur begrenzt von Bedeutung. Viele Klassen von Naturstoffen und Metaboliten, wie Terpene, Zucker, Alkohole, Arene sowie Vitamine und eine große Zahl organischer Verbindungen synthetischen Ursprungs wie der kombinatorischen Chemie entziehen sich den Spray-Techniken oder können nur mit niedriger Empfindlichkeit detektiert werden.

Wir haben nun eine neue Methode zur chemischen Ionisierung entwickelt, bei der durch Zugabe eines geeigneten Zentralatoms mit den Analyten positiv oder negativ geladene Koordinationsverbindungen entstehen, die massenspektrometrisch nachgewiesen werden können. Da sowohl polare als auch unpolare organische Verbindungen mit einem geeigneten Zentralatom positiv oder negativ geladene Koordinationsverbindungen bilden, ist diese Ionisierung sehr vielseitig einsetzbar. Der Reichtum des Wissens aus der Komplexchemie kann auf diese Technik übertragen werden, und neue Verbindungsklassen können mit der Spray-MS analysiert werden. Wir bezeichnen daher diese neue Technik als

Koordinations-Ionenspray-MS (CIS-MS). Ein elektrisches Feld oder die Erzeugung eines Reaktantgases durch Coronaentladung ist für die Ionisierung nicht notwendig. Allerdings muß durch die Ionenquelle eine gute Vernebelung der Probenlösung gewährleistet werden. Da die pneumatische Unterstützung der ESI-Quellen durch ein Vernebelungsgas bei ausgeschaltetem elektrischem Feld für eine optimale Vernebelung oft nicht ausreichend ist, wurde bei einigen Messungen eine unterstützende Spannung angelegt, um den Sprayvorgang zu stabilisieren.

Bei schwer ionisierbaren Verbindungen, z.B. vollständig geschützten Peptiden, führt die Bildung von unspezifischen Clustern oft zu komplexeren, schwer interpretierbaren Massenspektren und geringer Empfindlichkeit. Abbildung 1a

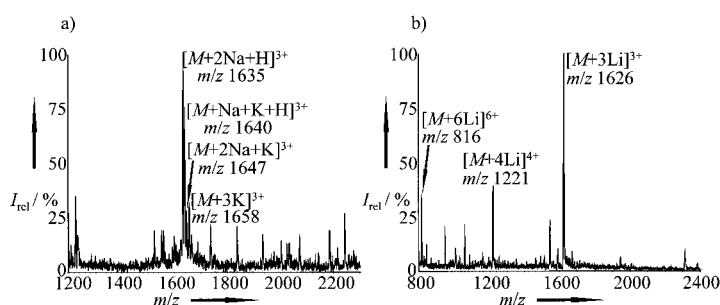


Abbildung 1. a) ESI-Massenspektrum des vollständig geschützten Transmembranpeptids  $[\text{NH}_2]\text{-Lys(Boc)}_{28}\text{-Ile-Val-Gly(Tmob)-Ser(Trt)-Leu-Cys(Trt)-Val-Val-Ala-Gly(Tmob)-Val-Leu-Thr(Trt)-Ile-Ala-Leu-Pro-Val-Pro-Val-Ile-Val-Ser(Trt)-Asn(Trt)-Phe-Asn(Trt)-Tyr(tBu)_1\text{-[COOH]}$  ( $m/z$  4857) aus *Drosophila melanogaster* unter Elektrospray-Normalbedingungen; 4,5 kV, Fluß  $3.5 \mu\text{L min}^{-1}$ . b) CIS-Massenspektrum nach Zusatz von  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  Lithiumiodid und niedrigerem Feld von 1,5 kV; Fluß  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ .

zeigt ein vollständig geschütztes 28er Peptid des Kaliumkanals der Transmembransequenz von *Drosophila melanogaster*.<sup>[9,10]</sup> Da alle basischen Aminogruppen mit Ausnahme der terminalen Aminogruppe geschützt sind und für eine Protonierung nicht zur Verfügung stehen, treten nur die Cluster mit Natrium- und Kaliumionen im Massenbereich des Quadrupol-Massenspektrometers hervor. Die Ionenausbeute ist sehr gering und eine Interpretation der Spektren erschwert.

Es ist bekannt, daß Lithiumsalze mit Peptiden Komplexe bilden, die sogar eine Assoziation zwischen Peptidketten verhindern. Seebach und Mitarbeiter<sup>[11]</sup> haben Lithiumsalze zur Erhöhung der Löslichkeit und zur Verbesserung der Ausbeuten bei der Festkörpersynthese von leicht zur Assoziation unter Bildung von  $\beta$ -Strukturen neigenden Peptiden angewendet. Der Zusatz von Lithiumiodid zum Transmembranpeptid führt zu definierten, stabileren Metallkomplexen, die mit hoher Ionenausbeute detektiert werden können und eine einfache Bestimmung der Molekülmasse ermöglichen (Abbildung 1b). Eine Erniedrigung des elektrischen Feldes von 4,5 auf 1,5 kV führt zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis, da andere Ionisierungsmechanismen und die Bildung von Lösungsmittelclustern zurückgedrängt werden.

Obwohl Metallkomplexe wie Metallproteine<sup>[12–16]</sup> sowie Alkali- und Erdalkali-Ionenaddukte<sup>[17–19]</sup> von polaren Analy-

[\*] Prof. Dr. E. Bayer, Dipl.-Chem. P. Gfrörer, Dipl.-Chem. C. Rentel  
Forschungsstelle für Nukleinsäure- und Peptidchemie  
Universität Tübingen  
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen  
Fax: (+49) 7071-29-5034  
E-mail: ernst.bayer@uni-tuebingen.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Quantitative Analyse und Charakterisierung pharmazeutisch und biochemisch relevanter Substanzen“ gefördert.

ten mit ESI-MS gemessen wurden, ist bisher nicht erkannt worden, daß die On-line-Überführung in geladene Koordinationsverbindungen ein allgemeines Prinzip der chemischen Ionisierung für die Massenspektrometrie ist, nicht der Anregung und Bedingungen der ESI-MS bedarf und daher auch bei unpolaren Analyten anwendbar ist. Anders als bei der APCI wird die Probe nicht thermisch belastet, und die Empfindlichkeit kann wesentlich verbessert werden. Für Carotinoide wurden untere Nachweisgrenzen im Bereich von 300–500 fmol erreicht.<sup>[20]</sup> Für Palmitoleinsäuremethylester lag die Nachweisgrenze bei 370 fmol im Single-ion-Modus und bei 37 fmol mit „multiple reaction monitoring“. Detektiert wurden die Verbindungen dabei als Silberkomplexe.

Da Olefine und Polyolefine, wie Terpene, Sesquiterpene, Carotinoide, Vitamine und Steroide, mit ESI-MS nicht oder nur mit geringer Empfindlichkeit detektiert werden können, sind sie für CIS-MS besonders interessant. Mit Metallen der ersten und der achten Nebengruppe des Periodensystems, z.B. Cu<sup>I</sup>, Ni<sup>II</sup>, Pd<sup>II</sup>, Pt und Ag<sup>I</sup>, bilden diese ungesättigten Verbindungen sehr stabile  $\pi$ - oder  $\pi$ -Allylkomplexe. Abbildung 2 zeigt das CIS-Massenspektrum des on-line

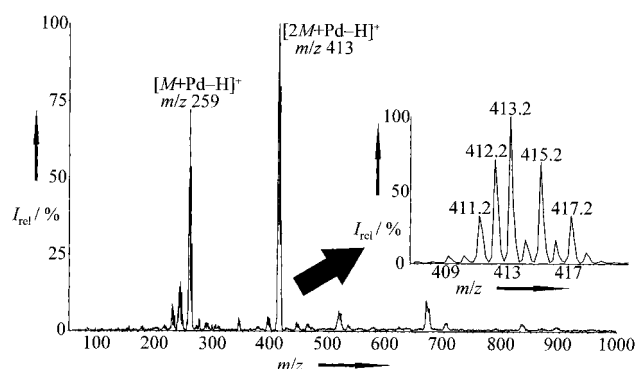
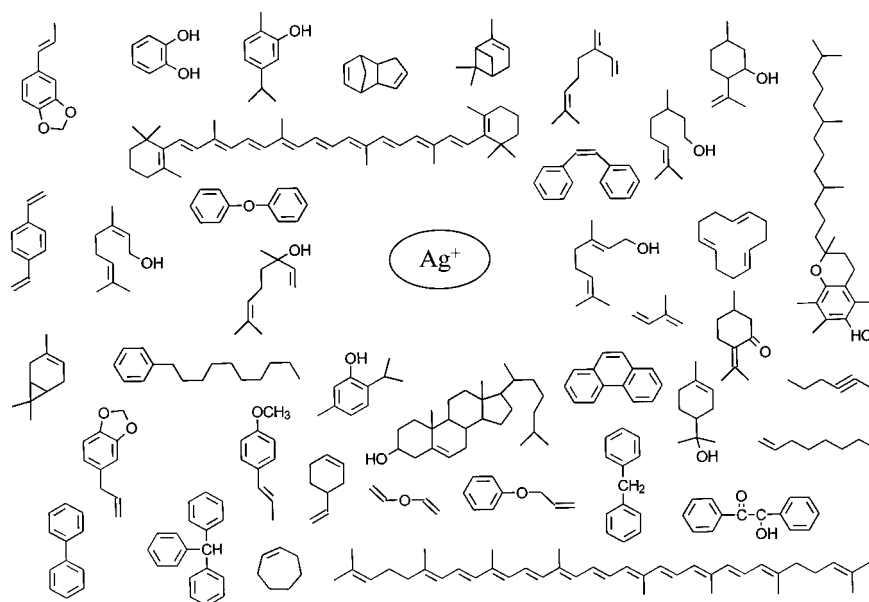


Abbildung 2. CIS-Massenspektrum von Isopulegol komplexiert mit 100 µg mL<sup>-1</sup> Pd<sup>II</sup>-Acetat; es liegt keine Spannung an, Fluß 10 µL min<sup>-1</sup>.

im Durchfluß gebildeten Palladium- $\pi$ -Allylkomplexes des Terpenalkohols Isopulegol ohne Anlegen eines elektrischen Feldes, wie dies bei ESI-MS unverzichtbar ist. Die  $[M+Pd-H]^+$ -Ionen mit der Isotopenverteilung des Palladiums sind die prominenten Spezies. Bei Anwendung von Silber(I) als koordinierendem Zentralatom werden nicht die  $\pi$ -Allylkomplexe, sondern die  $\pi$ -Komplexe detektiert. Die Vermeidung anderer Ionisierungsmechanismen führt auch bei den Olefinen zu übersichtlichen Spektren mit geringem Rauschpegel.

Eine große Zahl von Olefinen, Polyolefinen und Arenen sind von uns mit CIS-MS untersucht worden, darunter Steroide, Vitamine der D- und der E-Reihe, Carotinoide, Polystyrole, Terpene und ungesättigte Fettsäuren. Schema 1



Schema 1. Auswahl an getesteten Verbindungen, die mit Ag<sup>+</sup> durch CIS-MS als positive  $\pi$ -Komplexe detektiert werden konnten.

zeigt eine Auswahl der mit Ag<sup>I</sup> untersuchten Analyte. Die On-line-Bildung der geladenen Spezies wird, wie im experimentellen Teil beschrieben ist, nach der säulenchromatographischen Trennung durchgeführt, da in den meisten Fällen eine vor der Trennsäule stattfindende Komplexbildung auch bei relativ stabilen Metallkomplexen keine optimalen Trennungen erlaubt.

Bei Polyolefinen treten neben den  $[M+Ag]^+$ -Peaks oft  $[M]^{++}$ -Radikale als Nebenprodukte auf, wie Abbildung 3 bei Carotinoiden für eine HPLC-Trennung mit CIS-MS-Detektion zeigt.<sup>[20]</sup> Aus Abbildung 3 wird auch deutlich, daß die On-

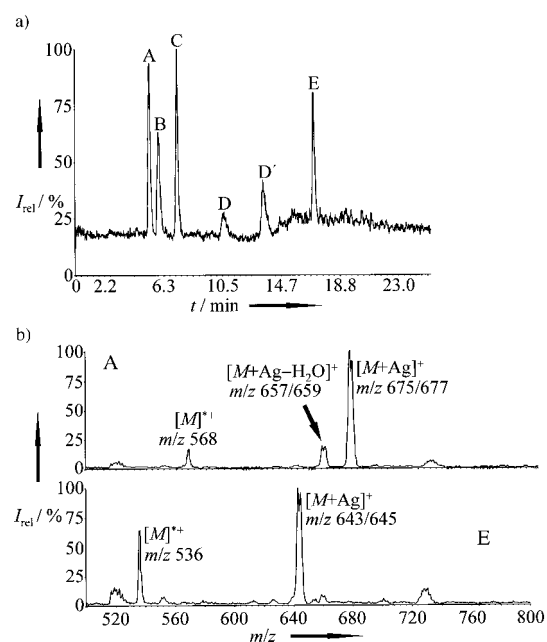


Abbildung 3. a) HPLC-CIS-MS-Ionenchromatogramm von Lutein (A), Zeaxanthin (B), Canthaxanthin (C), Echinonon (D, D') und  $\beta$ -Carotin (E). b) CIS-Spektren der getrennten Carotinoide A und E.

line-Komplexbildung und die massenspektrometrische Detektion nicht zu einer Verbreiterung der chromatographischen Banden im Vergleich zur Situation bei der UV-Detektion führen. Die Kinetik der Komplexbildung ist unter den gewählten experimentellen Bedingungen schnell. Nach den Erfahrungen der Komplexchemie können neben den Zentralatomen der ersten und achten Nebengruppe des Periodensystems auch viele andere Metalle als Zentralatom für die Analyte ausgewählt werden. Tabelle 1 gibt eine Auswahl potentieller Reagentien für verschiedene Liganden an.

Tabelle 1. Reagentien für CIS-MS.

Zentralatom	Reagens	Lösungsmittel	Analyte
B <sup>III</sup>	BF <sub>3</sub>	org. Lösungsmittel	Alkohole, Ether, Ester
B <sup>III</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O, Alkohol	Zucker, Polysaccharide, Alkohole
B <sup>III</sup>	B(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O, Alkohol	Ether, Alkohole
Ag <sup>I</sup>	AgNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O, Alkohol, Acetonitril	Arene, Olefine, Polyolefine, Carotinoide
Pd <sup>II</sup>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O, Alkohol, Acetonitril	Vitamine A, D und E, Östrogene
Li <sup>I</sup>	Li-Halogenide	H <sub>2</sub> O, Alkohol, Acetonitril	Peptide, Zucker, Alkohole

CIS-MS ist nicht nur auf positive Ionen beschränkt, sondern auch im negativen Modus anwendbar, vor allem wenn die Komplexbildung der Analyten mit Zentralatomen mit Elektronenlücke erfolgt. Ein solches Zentralatom ist Bor(III). Aliphatische Alkohole und Zucker sind mit ESI-MS schwer zu detektieren. Nach Umsetzung mit Bor(III)-fluorid sind die negativen Borkomplexe jedoch im CIS-MS sehr gut nachzuweisen, wie Abbildung 4a für Cholesterin zeigt. Auch hier führt eine Erniedrigung des elektrischen Feldes (Abbildung 4b) zur Unterdrückung von anderen Ionisierungsme-

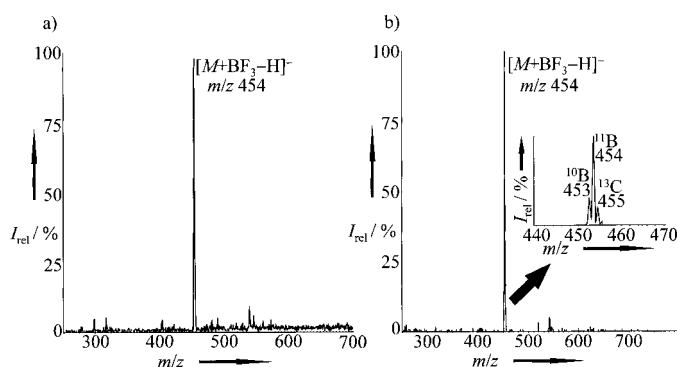


Abbildung 4. CIS-Massenspektren von Cholesterin nach Komplexbildung mit BF<sub>3</sub> in Diethylether a) bei -4.5 kV und einem Fluß von 3 µL min<sup>-1</sup> sowie b) bei -1.2 kV und einem Fluß von 10 µL min<sup>-1</sup>.

chanismen, einfacheren Spektren und besserer Nachweisgrenze. Borsäure ist ein Reagens, das in der Zuckerchemie für Strukturuntersuchungen verbreitet ist. Benachbarte Hydroxygruppen bilden mit Borsäure stabilere Borkomplexe als isolierte Hydroxygruppen. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen sind im CIS-MS nur die Borkomplexe mit

benachbarten Hydroxygruppen, z. B. von Fructose (Abbildung 5a) stabil und massenspektrometrisch nachweisbar, während Glucose nicht detektiert wird. Auch führt die Erniedrigung der angelegten Spannung und die dadurch bedingte Unterdrückung unspezifischer Ionen zu übersichtlicheren Spektren (Abbildung 5b), da die unspezifische Bildung von Lösungsmittelclustern im unteren Massenbereich

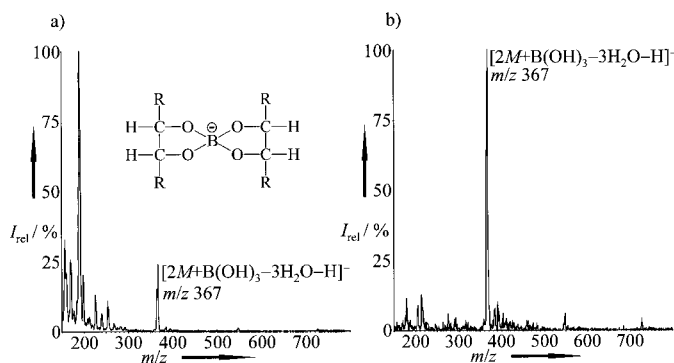


Abbildung 5. CIS-Massenspektren von Fructose als Borkomplex a) bei -3.7 kV und b) bei -1.7 kV. Fließgeschwindigkeiten wie in Abbildung 4.

verhindert wird. Die CIS-MS von Oligosacchariden eröffnet relativ einfache Wege zu deren Charakterisierung und Strukturaufklärung, vor allem auch bei komplexen Gemischen durch vorangehende Trennung mit HPLC, CEC und CZE.

Interessant ist auch die Fragmentierung der Komplexe und die Analyse der Tochterionen, da die Metallkomplexe interessante Fragmentierungsmuster aufweisen, wie bei Konjugaten mit Alkaliionen gezeigt worden ist.<sup>[18]</sup>

Die Direktkopplung der CIS-MS ist mit allen gängigen Trennmethoden möglich. Besonderes Interesse gewinnen in jüngerer Zeit die miniaturisierten Kapillarmethoden, wie Kapillar-HPLC (CHPCL), CZE und CEC.

Abbildung 6 zeigt die Trennung von ungesättigten Fettsäureestern mit der für die Gradientenelution von uns entwickelten druckgestützten CEC<sup>[21-23]</sup> mit Detektion in Form von Silberkomplexen durch CIS-MS. Die Silberkomplexe werden nach der Trennung vor Eintritt in die Ionenquelle gebildet. In Abbildung 6b sind die on-line aufgenommenen CIS-Massenspektren der getrennten Fettsäureester gezeigt.

Die Kombination von Trennungen in flüssiger Phase und CIS-MS ist eine auf viele Analyte anwendbare neue analytische Methode, deren vielfältige Möglichkeiten sich durch die konsequente Anwendung der Kenntnisse der Komplexchemie in vollem Umfang erschließen werden.

## Experimentelles

Für die CIS-MS gibt es noch keine optimierte, kommerzielle Ionenquelle. Da bei Ionenquellen für die ESI-MS das starke elektrische Feld nicht nur für die Erzeugung der Ionen, sondern auch für die Bildung eines möglichst monodispersen Nebels mitverantwortlich ist, können nur Ionenquellen mit guter mechanischer Vernebelung einen guten Ionenspray bei abgeschaltetem oder niedrigem elektrischem Feld unterhalten. Außerdem ist eine leichte Temperaturerhöhung des Vorhangsgases bis 80 °C empfehlenswert. Nicht alle kommerziell für ESI verfügbaren Geräte entsprechen diesen Grundforderungen. Geeignet, wenn auch nicht optimiert für CIS-MS ist die Ionenquelle des APIIII und API3000 von PE SCIEX (Toronto,

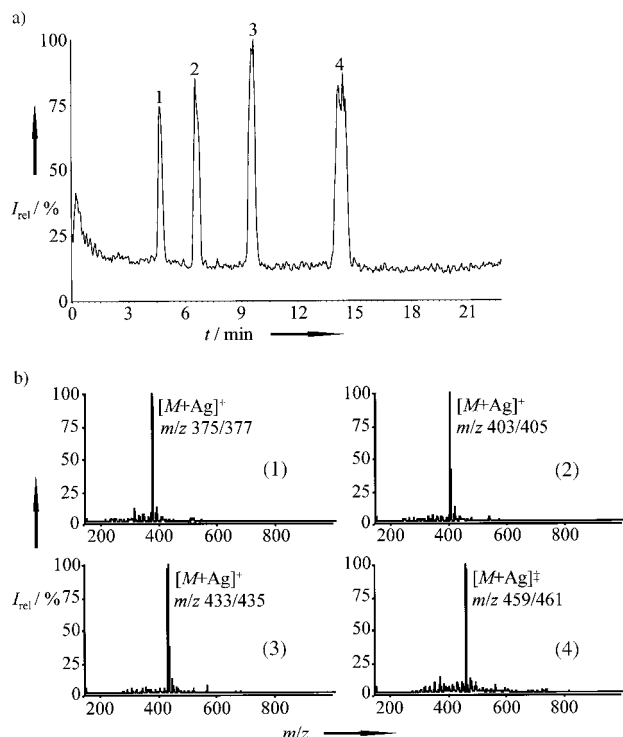


Abbildung 6. Direktkopplung der Trennung ungesättigter Fettsäureester mit druckunterstützter Elektrochromatographie (pCEC) mit CIS-MS als Detektion. 1) Hexadecensäuremethylester, 2) Ölsäuremethylester, 3) *cis*-Eikosen(9)säuremethylester, 4) Erucasäuremethylester. a) Totalionenstrom und b) CIS-Massenspektren der Silberkomplexe.

Kanada), mit denen die hier beschriebenen Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Vernebelung erfolgt durch einen Gasstrom pneumatisch.

Abbildung 7 zeigt schematisch den Aufbau der Kopplung der Trennmethode mit dem Interface für die Zuführung des Hilfsreagens zur Herstellung der ionischen Koordinationsverbindungen. Für die Kapillare-HPLC, die Kapillarelektrophorese und die Gradienten-Kapillarelektrophorese wurde das von uns entwickelte, früher beschriebene Instrument eingesetzt, das für alle drei Methoden alternativ eingesetzt werden kann.<sup>[21–23]</sup> Bewährt hat sich die in Abbildung 7 dargestellte Zuführung durch den von Smith und Mitarbeitern<sup>[7]</sup> für die Kopplung Kapillarelektrophorese-ESI-MS beschriebenen „sheath flow“. Dabei ist das Ende der Trennsäule von einer Stahlkapillare (Innendurchmesser 210 µm) umgeben, durch die die Reagenslösung mit dem koordinierenden Zentralatom mit einer Spritzenpumpe zugeführt wird. Eine weitere Stahlkapillare für die Zuführung des Vernebelungsgases umhüllt die beiden Kapillaren. Die Reagenslösung mit dem koordinierenden Zentralatom kann auch durch ein T-Stück zugeführt werden. Als Reagenslösungen

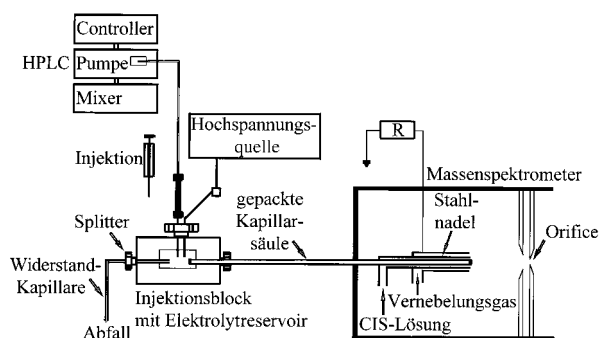


Abbildung 7. Instrumenteller Aufbau für die Direktkopplung von CHPLC, CZE oder pCEC mit CIS-MS. Zugabe des koordinierenden Zentralatoms über den „sheath flow“.

mit dem koordinierenden Zentralatom werden verwendet: 20 µg mL<sup>-1</sup> LiI-, 100 µg mL<sup>-1</sup> Pd<sup>II</sup>-Acetat-, 50 µg mL<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>-, 100 µg mL<sup>-1</sup> Borsäure-Lösung. Der Durchfluß vor Eintritt in die Ionenquelle beträgt zwischen 3 und 40 µL min<sup>-1</sup>. An der Mündung (Orifice) werden Spannungen zwischen 80 und 150 V angelegt. Weitere experimentelle Details sind in den Legenden der Abbildungen enthalten.

Die HPLC-Trennung der Carotinoide (Abbildung 3a) an einer C30-RP-Phase wurde nach der Vorschrift in Lit. [24] durchgeführt.

Für die CEC-CIS-MS-Kopplung wird eine mit Gromsil ODS-OAB (Partikelgröße 3 µm) gepackte Fused-silica-Kapillare mit 100 µm Innendurchmesser und 25 cm Länge verwendet. Der Eluent enthält 40 mmol Ammoniumacetat (pH 9) und Acetonitril (5/95). Als „sheath flow“ wird eine wäßrige 100 µg mL<sup>-1</sup> Silbernitratlösung mit einem Durchfluß von 3 µL min<sup>-1</sup> über eine Spritzenpumpe zugeführt. Das Verhältnis von „sheath flow“ und CEC-Fluß beträgt etwa 3:1.

Eingegangen am 17. September 1998 [Z12423]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 992–995

**Stichwörter:** Analytische Methoden • Massenspektrometrie • Olefine • Vitamine

- [1] C. R. Blakely, M. J. Adams, M. J. Vestal, *J. Chromatogr.* **1978**, 158, 261–276.
- [2] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. L. Mobley, I. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, 49, 2250–2249.
- [3] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4451–4459.
- [4] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 4671–4675.
- [5] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, 246, 64–70.
- [6] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 675–679.
- [7] R. D. Smith, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 1948–1952.
- [8] K. Schmeer, B. Behnke, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3656–3658.
- [9] C. Miller, *Science* **1991**, 252, 1092–1096.
- [10] K. Jauch, Dissertation, Universität Tübingen, **1997**.
- [11] D. Seebach, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 1363–1409; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1320–1367.
- [12] V. Katta, S. A. Chowdhury, B. I. Chait, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5348–5349.
- [13] G. J. van Berkel, S. A. Mc Luckey, G. L. Glish, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1098–1109.
- [14] T. W. Hutchens, R. W. Nelson, C. M. Li, T. T. Yip, *J. Chromatogr.* **1992**, 604, 125–132.
- [15] M. Przybilski, M. O. Glocker, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 878–899; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 807–826.
- [16] X. Yu, M. Wojciechowski, C. Fenselau, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1355–1359.
- [17] K.-E. Karlson, *J. Chromatogr. A* **1998**, 794, 359–366.
- [18] M. Kohler, J. A. Leary, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3501–3508.
- [19] A. Fura, J. Leary, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2805–2811.
- [20] C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4394–4400.
- [21] K. Pusecker, J. Schewitz, P. Gfrörer, L.-H. Tseng, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3280–3285.
- [22] B. Behnke, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **1994**, 680, 93–98.
- [23] B. Behnke, E. Grom, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 207–213.
- [24] M. Pursch, S. Strohschein, H. Händel, K. Albert, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 386–393.