

Elektrochemie/Massenspektrometrie (EC/MS) – eine Technik für Metabolismusstudien und die Untersuchung von Reaktionsmechanismen

Uwe Karst*

Stichwörter:

Derivatisierungen · Elektrochemie · Flüssigkeitschromatographie · Massenspektrometrie · Metabolismus

Die Simulation des oxidativen Metabolismus von Pharmazeutika ist ein wesentlicher Grund für die steigende Attraktivität der On-line-Kopplung von elektrochemischen Methoden mit der Elektrospray-Massenspektrometrie (EC/ESI-MS) in Industrie und Wissenschaft. Obwohl diese Kombination aus einigen Publikationen seit langem bekannt ist und kürzlich auch in Übersichtsartikeln zusammengefasst wurde,^[1] endet nun aus gutem Grund ihre lange Ruhephase. In letzter Zeit wurden einige sehr interessante neue Anwendungen für die EC/MS, teilweise in Kombination mit der Flüssigchromatographie (LC), beschrieben. Hier werden die wichtigsten Charakteristika der EC/MS zusammengefasst, Anwendungen dieser Methode vorgestellt und Zukunftsperspektiven diskutiert.

Neben der offensichtlichen Tatsache, dass die massenspektrometrische Detektion eine wesentlich höhere Informationsdichte liefert als die elektrochemische Detektion, können auch einige weitere Nachteile der elektrochemischen Detektion vermieden werden. Da die Quantifizierung auf der Integration von massenspektrometrischen Signalen und nicht von gemessenen Strömen beruht, ist die Grundlinie stabil und

geringfügige Änderungen der Lösungsmittelzusammensetzung werden problemlos toleriert. Dies ist vor allem für die Kopplung mit der LC bedeutsam.

Für zwei verschiedene Aufgaben ist die Kopplung der EC/MS mit der LC besonders vielversprechend: Einerseits können Einzelsubstanzen aus einem komplexen Gemisch nach der Trennung elektrochemisch umgewandelt werden. Dabei wird zunächst die LC-Trennung und anschließend on-line die elektrochemische Reaktion sowie die massenspektrometrische Detektion durchgeführt (Abbildung 1, Weg a). Auf diese Weise werden die Reaktionsprodukte von reinen Einzelverbindungen gleichzeitig detektiert. Andererseits liefert auch die Trennung der Produkte nach der elektrochemischen Oxidation wertvolle Informationen, beispielsweise über die Polarität der einzelnen Produkte. In diesem Fall wird eine reine Verbindung zunächst oxidiert, und die Produkte werden anschließend durch LC getrennt und massenspektrometrisch detektiert (Abbildung 1, Weg b). In beiden Fällen ist die zusätzliche Ein-

gliederung eines UV/Vis-Detektors möglich. Gegenüber der elektrochemischen Detektion hat diese Methode den Vorteil einer uneingeschränkten Kompatibilität mit der Gradientenelution in der LC, wodurch wesentlich bessere Trennungen erhalten werden.

Die meistverwendeten Flusszellen für die elektrochemische Detektion, Wall-Jet- oder Dünnschichtzellen, werden wegen ihrer geringen Oberfläche verhältnismäßig leicht durch Nebenprodukte der elektrochemischen Reaktionen (z.B. Polymere) verunreinigt. Die erforderliche häufige Reinigung erschwert oftmals den Einsatz der elektrochemischen Detektion in der LC. Pulstechniken, die aus Mess- und Reinigungsschritten bestehen, können hier Abhilfe schaffen. Andererseits erhält man nach einer vollständigen Umsetzung der Zielverbindungen Massenspektren, die nur wenige Signale enthalten und einfach zu interpretieren sind. Dies ist bei Pulstechniken aber prinzipiell nicht möglich. In elektrochemischen Zellen mit großen Elektrodenoberflächen gelingt dagegen im Idealfall

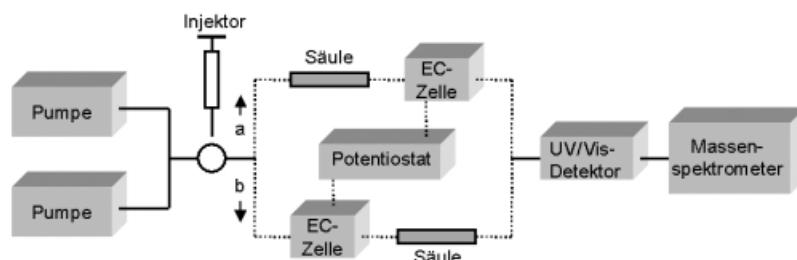


Abbildung 1. Aufbau eines LC/EC/MS- (Weg a) und eines EC/LC/MS-Systems (Weg b) inklusive eines optionalen UV/Vis-Detektors vor dem Massenspektrometer.

[*] Prof. Dr. U. Karst
University of Twente
Department of Chemical Analysis and
MESA⁺ Institute for Nanotechnology
P.O. Box 217
7500 AE Enschede (Niederlande)
Fax: (+31) 53-489-4645
E-mail: u.karst@utwente.nl

eine quantitative Umsetzung bei geringem Wartungsaufwand, sodass ein hoher Probendurchsatz erreicht wird. Aus diesem Grund verwenden die meisten Gruppen, die auf dem Gebiet EC/MS arbeiten, käufliche elektrochemische Zellen mit großflächiger Glaskohlenstoff-Arbeits Elektrode, Pd-Gegenelektrode und Pd/H₂-Referenzelektrode. Gegenwärtig werden sowohl an Hochschulen als auch in der Industrie elektrochemische Zellen intensiv untersucht, in denen große Oberflächen mit anderen Arbeitselektrodenmaterialien (z.B. Pt) und geringeren Flussraten kombiniert sind.

Bruins et al.^[2] haben kürzlich einen interessanten Ansatz zur Simulation von Cytochrom-P450-katalysierten Oxidationen durch On-line-EC/MS beschrieben. Obwohl nicht alle bekanntermaßen durch Cytochrom P450 katalysierten Reaktionen in der EC/MS beobachtet wurden, konnten durch Einelektronen-oxidationen ausgelöste Vorgänge wie Dehydrierungen, Alkohol-Oxidationen, S- und P-Oxidationen und N-Desalkylierungen nachgewiesen werden. Durch direkte H-Abstraktionen initiierte Reaktionen wie die Hydroxylierungen nichtsubstituierter Arene oder O-Desalkylierungen wurden dagegen wegen ihres hohen Oxidationspotentials nicht beobachtet.^[2] Die EC/MS könnte trotzdem eine wertvolle Technik für die frühen Phasen des pharmazeutischen Hochdurchsatz-Screenings von kombinatorischen Substanzbibliotheken werden, weil mit dieser Methode die Stabilität potenzieller Pharmazeutika gegenüber Oxidationen rasch und einfach untersucht werden kann.

Ebenfalls Bruins et al. haben ein EC/MS-System zur schnellen Analyse der Oxidationsprodukte von Peptiden beschrieben.^[3] Die Ergebnisse bestätigen, dass tyrosinhaltige Peptide unter Bildung verschiedener Produkte oxi-

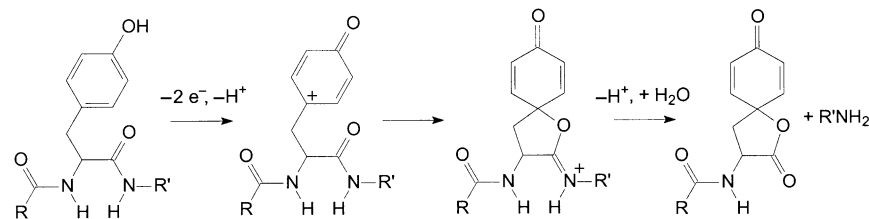
diert werden (entsprechende Daten wurden bereits in früheren Untersuchungen erhalten – allerdings mit wesentlich aufwändigeren Techniken). Unter anderem werden Peptidfragmente beobachtet, die durch Hydrolyse am C-Terminus des Tyrosins gebildet werden (Schema 1). Ein Vergleich von phosphorylierten mit nichtphosphorylierten Tyrosinresten zeigt, dass die Spaltung ausschließlich am nativen Tyrosin erfolgt. So gelingt eine einfache Unterscheidung zwischen phosphorylierten und nichtphosphorylierten Peptiden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse könnte eine leistungsfähige EC/MS-Methode für Proteinverdau und Peptidmapping entwickelt werden.

Der Einsatz spezieller Derivatisierungsreagentien für die EC/MS wurde von Van Berkel et al. eingeführt.^[4] Beim Elektrospray-Prozess werden selektiv Ferrocen-derivatisierte Analyten oxidiert und ionisiert. In der ersten Publikation zu diesem Thema wurden auch ohne zusätzliche elektrochemische Zelle und ohne LC-Trennung gute Resultate erhalten. Das Verfahren hat sich für die Bestimmung von Alkoholen (mit Ferrocenoylazid) und von Diolen (mit Ferrocenboronsäure) bewährt.^[4] Später wurde Ferrocenoylazid in Kombination mit EC/MS zur Analyse von Naturstoffgemischen verwendet, und das Fragmentierungsverhalten wurde für die Derivate von primären, sekundären und tertiären Alkoholen untersucht.^[5] Unsere Arbeitsgruppe setzte Ferrocenoylchlorid zur Bestimmung von Alkoholen und Phenolen ein. Die Derivate wurden durch Umkehrphasen-LC getrennt, und es wurde nach Oxidation in einer elektrochemischen Zelle ein käufliches ACPI-Interface (ACPI = atmospheric pressure chemical ionization) mit ausgeschalteter Coronaentladung eingesetzt.^[6] Für die quantitative Analyse könnten diese Techniken in Zukunft

wegen ihrer hervorragenden Selektivität und der niedrigen Nachweisgrenzen erheblich an Bedeutung gewinnen. Auch weitere spezielle Derivatisierungsreagentien für die EC/MS werden sicherlich in naher Zukunft eingeführt.

Gun et al. untersuchten die Reduktion von [(C₅Me₅)₂Mo₂O₅] und verwandten Komplexen mit On-line-EC/MS unter Verwendung einer elektrochemischen Durchflusszelle. Es gelang den Autoren, ein- bis vierkernige Molybdän-Oxokomplexe zu identifizieren.^[7] Diese Arbeiten eröffnen neue Analysemöglichkeiten für Metallkomplexe, da die Redoxzustände der Analyten on-line in Abhängigkeit vom angelegten Potential ermittelt werden können. Wie bereits früher von Amster et al.^[8] beschrieben, liefert die hochauflösende Massenspektrometrie Aussagen über den Oxidationszustand von Metalloproteinen. Der Oxidationszustand der Metallzentren ändert sich dabei im Elektrospray-Interface nicht. Da diese Informationen mit keiner anderen Analyse-methode erhalten werden können, sind weitere Anwendungen in der Analytik von Metalloproteinen zu erwarten.


Die große Zahl von neuen EC/MS-Anwendungen, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, zeigt deutlich das schnelle Vordringen dieser Methode in die unterschiedlichsten Wissenschaftsgebiete. Angesichts der hervorragenden Perspektiven für die Bioanalytik sind Anwendungen der EC/MS in Metabolismusstudien sowie die gezielte Peptid- oder Proteinspaltung besonders vielversprechend. Hierzu ist die Entwicklung geeigneter elektrochemischer Zellen für die Mikro- und Nano-LC mit kleinsten Analytmengen von zentraler Bedeutung. Auch der Einsatz anderer Materialien (z.B. Pt) in Arbeitselektroden mit großen Oberflächen könnte den Anwendungsbereich der Methode erweitern. Das Potenzial der EC/MS ist noch längst nicht ausgeschöpft, und mit weiteren interessanten Entwicklungen und Anwendungen ist in naher Zukunft zu rechnen.



Schema 1. Elektrochemisch induzierte C-terminale Peptidspaltung an einem Tyrosinrest.^[3]

- [1] a) G. Hambitzer, J. Heitbaum, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1067–1070; b) K. J. Volk, M. S. Lee, R. A. Yost, A. Brajter-Toth, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 722–724; c) K. J. Volk, R. A. Yost, A. Brajter-Toth,

- J. Chromatogr.* **1989**, 474, 231–243; d) G. Diehl, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 390–398; e) H. Hayen, U. Karst, *J. Chromatogr. A* **2003**, 1000, 549–565.
- [2] a) U. Jurva, H. V. Wikström, A. P. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 529–533; b) U. Jurva, H. V. Wikström, L. Weidolf, A. P. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 800–810.
- [3] H. P. Permentier, U. Jurva, B. Barroso, A. P. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 1585–1592.
- [4] G. J. Van Berkel, J. M. E. Quirke, R. A. Tigani, A. S. Dilley, T. R. Covey, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1544–1554.
- [5] a) J. M. E. Quirke, Y. L. Hsu, G. J. Van Berkel, *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 230–237; b) J. M. E. Quirke, G. J. Van Berkel, *J. Mass Spectrom.* **2001**, 36, 179–187.
- [6] a) G. Diehl, A. Liesener, U. Karst, *Analyst* **2001**, 126, 288–290; b) G. Diehl, U. Karst, *J. Chromatogr. A* **2002**, 974, 103–109.
- [7] a) J. Gun, A. Modestov, O. Lev, D. Saurenz, M. A. Vorotyntsev, R. Poli, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 482–492; b) J. Gun, A. Modestov, O. Lev, R. Poli, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 2264–2272.
- [8] K. A. Johnson, B. A. Shira, J. L. Anderson, I. J. Amster, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 803–808.



WILEY InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT

Access some of the finest full text journals, reference works, books, and databases from around the globe. It's just what you need to make some important discoveries of your own.

Access your saved titles, articles, queries and alerts in My Profile.

USER NAME: PASSWORD:

☐ Remember Me

[Register Now](#) | [Athens Login](#)
[Forgot My Password](#)

▶ ABOUT US

▶ VIEW DEMO

▶ CONTACT US

▶ HELP

Manage your access easily with “MY PROFILE”

Key features available to registered users include:

Easy Access	Enhanced Tools
<ul style="list-style-type: none"> ● Save Titles, Articles & Queries for quick access ● Setup roaming access to access content outside of your institutions network ● Get free online sample copies ● Get free online trial subscriptions ● View a complete list of your subscriptions and accessible products 	<ul style="list-style-type: none"> ● Set E-Mail Alerts when new content is available ● Purchase individual articles online with Pay-Per-View ● Purchase Article Select Tokens online ● Track your manuscripts



Register now and sign up for “MY PROFILE”! Registration is fast and free!

www.interscience.wiley.com



WILEY InterScience®
DISCOVER SOMETHING GREAT