

Ein universeller Ionisationsmarker für die APLI-(TOF)MS-Analyse von kleinen Molekülen und Polymeren**

Ralf Schiewek, René Mönnikes, Volker Wulf, Siegmar Gäb, Klaus Josef Brockmann, Thorsten Benter und Oliver Johannes Schmitz*

Der steigende Bedarf an qualitativen und quantitativen Bestimmungen von immer komplexeren Proben ist eine große Herausforderung an die moderne instrumentelle Analytik. Zurzeit können für organische Proben diese Anforderungen nur durch eine chromatographische oder elektrophoretische Trennung mit anschließender massenspektrometrischer (MS)-Detektion erfüllt werden. Für Analysen, bei der die Massenspektrometrie mit einer Trennung durch Gaschromatographie (GC), Flüssigchromatographie (LC) oder Kapillarelektrophorese (CE) gekoppelt ist, muss die Ionisation der getrennten Analytmoleküle so quantitativ wie möglich erfolgen. Für Analyten mit unterschiedlichen molaren Massen und Polaritäten werden deshalb unterschiedliche Ionisationsmethoden eingesetzt.^[1]

Für polare Substanzen ist die Elektrospray-Ionisation (ESI) der Goldstandard für kleine Moleküle und – aufgrund von Mehrfachladungen – auch für große Biomoleküle.^[2] Dagegen werden Analyte mit bis zu einigen tausend Dalton (kDa) und mit einer mittleren Polarität bevorzugt mit chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) ionisiert,^[3] während die Photoionisation bei Atmosphärendruck (APPI) oder die Dopant-assisted(DA)-APPI normalerweise für unpolare Substanzen eingesetzt werden.^[4] Die kürzlich von uns entwickelte Laserionisation bei Atmosphärendruck (APLI) zeigt dagegen eine herausragende Empfindlichkeit für mittelepolare bis unpolare aromatische Substanzen.^[5] Diese Selektivität für aromatische Verbindungen beruht auf dem Ionisationsmechanismus der APLI. So kann die Ionisation von Matrixkomponenten durch die eingestellte Photonendichte von ca. 1 MW cm⁻², die nahe bei der benötigten Mindestphotonendichte für eine resonante (1+1)-Multiphotonenanregung liegt, minimiert werden. Auch ist die lineare Absorption der meisten Matrixkomponenten zu vernachlässigen, wenn Photonen mit einer Wellenlänge von 248 nm zur Anwendung kommen. Bereits kleine und leicht verfügbare Ex-

cimer-Laser können dabei als leistungsstarke Lichtquellen fungieren. Vorteilhaft ist auch, dass die spektroskopischen Eigenschaften der aromatischen Kohlenwasserstoffe hinsichtlich einer effizienten resonanten Zwei-Photonen-Ionisation sehr ähnlich sind: Sie haben einen großen Absorptionsquerschnitt bei 248 nm, einen langlebigen Übergangszustand und große vertikale Ionisationsübergänge. Kaum eine andere Substanzklasse zeigt solche Eigenschaften, weshalb die APLI eine hohe Selektivität für Arene aufweist – allerdings ist diese Selektivität auch eine wesentliche Einschränkung für Anwendungen in der Analytik. Andererseits würden MS-Analysen komplexer Proben von einer selektiven Ionisation profitieren, da die Ionensuppression und der daraus resultierende Fehler bei der quantitativen Bestimmung beträchtlich reduziert würden.^[6] Dies ist zurzeit nur möglich, wenn entweder eine Basislinientrennung aller Matrixkomponenten durch eine vorgeschaltete und orthogonale Trennung mit kombinierten Techniken (GCxGC, LCxGC oder LCxLC)^[7] erzielt wird oder Stabilisotopen-markierte Standards (SIMS) eingesetzt werden.^[8] Trennungen mit kombinierten Techniken sind allerdings kostspielig, zeitaufwändig und wartungsintensiv, während SIMS die Analysekosten deutlich erhöhen und nur für eine limitierte Zahl von Analyten zur Verfügung stehen.

Hier wird eine Derivatisierungsstrategie vorgestellt, mit der die selektive Ionisation von polaren und unpolaren Verbindungen in komplexer Matrix ohne Einsatz von kombinierten Analysenmethoden oder SIMS möglich ist. Bei dieser Methode werden die Analyten ohne erwähnenswerte Interferenz mit der Matrix mithilfe von Massenanalysatoren detektiert. Derivatisierungen finden bei analytischen Verfahren häufig Verwendung. Beispielsweise kommen Methylierungs- oder Silylierungsreagentien bei der GC-Analyse von organischen Säuren und Alkoholen zum Einsatz,^[9] während bei der LC und CE oftmals Fluoreszenzmarker verwendet werden, um Analyten zu markieren, die dann selektiv und hochempfindlich in komplexer Matrix detektiert werden können.^[10] Werden aber unterschiedliche Analyten mit dem gleichen Fluoreszenzmarker derivatisiert, ist für eine quantitative Analyse eine Bestimmung von Korrekturfaktoren notwendig, die den negativen Einfluss der Analyten auf die Fluoreszenzeigenschaften des Markers (Fluoreszenzlösung) berücksichtigen.^[10]

Unseres Wissens werden – mit Ausnahme einiger Anwendungen bei der resonanzverstärkten Mehrphotonenionisations(REMPI)-MS^[11] – Derivatisierungen bei MS-Analysen nur 1) zur Bildung von GC-gängigen Analyten oder 2) zur Steigerung der Ionisationseffizienz eingesetzt.^[9] Nachteilig wirkt sich dabei aus, dass für eine quantitative Bestimmung

[*] R. Schiewek, R. Mönnikes, V. Wulf, Prof. Dr. S. Gäb, Dr. O. J. Schmitz
Analytische Chemie, Bergische Universität Wuppertal
Gaußstraße 20, 42119 Wuppertal (Deutschland)
Fax: (+49) 202-439-3915
E-Mail: olivers@uni-wuppertal.de
Homepage: <http://www.oliver-schmitz.de>

Dr. K. J. Brockmann, Prof. Dr. T. Benter
Physikalische Chemie, Bergische Universität Wuppertal
Gaußstraße 20, 42119 Wuppertal (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG, Cognis GmbH, Kratos Analytical PLC (Shimadzu Group Company) und Bruker Daltonics GmbH finanziert. APLI = Laserionisation bei Atmosphärendruck.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200804106> zu finden.

entweder eine zeitintensive Kalibrierung oder die Zugabe von SIMS notwendig ist. Hier stellen wir eine Alternative vor, die dieses Problem umgeht. In Analogie zu Fluoreszenzmarkern können Ionisationsmarker eingesetzt werden (Anthracen-9-ylmethoxyessigsäure (**1**) oder Anthracen-9-ylmethanol (**2**)), um Alkohole, Amine oder organische Säuren zu derivatisieren (Schema 1) und mithilfe von APLI, wie oben beschrieben, zu ionisieren und einer massenspektrometrischen Detektion zugänglich zu machen. Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Alkohol **2** wurde die Säure **1** durch die Reaktion mit Bromessigsäure synthetisiert.^[12]

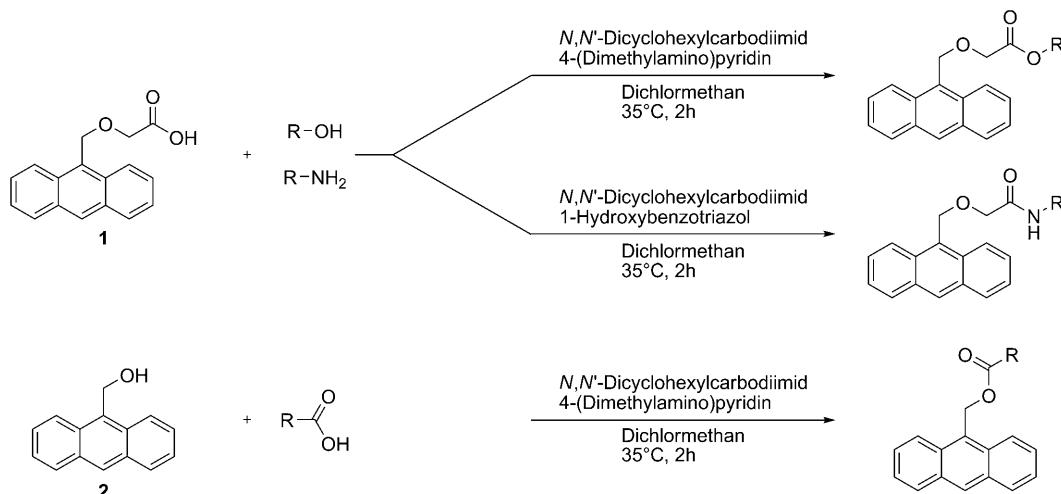
Bei der APLI handelt es sich um eine weiche Ionisationsmethode, weshalb die Spektren in Abbildung 1 immer den Peak des jeweiligen Radikalkations als Basispeak der Derivatisierungsprodukte von **1** oder **2** mit Ethanol, Cholesterin, Dodecylamin und Ölsäure zeigen. Bei den kleinen Nebensignalen handelt es sich entweder um Verunreinigungen oder um einige wenige Fragmente (z.B. m/z 191).

Um die spektroskopischen Eigenschaften einiger ausgewählter Substanzen abschätzen zu können, wurden die Atmosphärendruck(AP)-REMPI-Spektren von Anthracen, **1** und den in Abbildung 1a–c gezeigten Derivaten aufgenommen (Abbildung 2). Als durchstimmbare Lichtquelle diente ein ns-Nd:YAG-Laser-gepumpter und frequenzverdoppelter optisch-parametrischer Oszillator mit einer spektralen Auflösung von 0.04 nm bei 248 nm. Die Verläufe der REMPI-Spektren der derivatisierten Analytmoleküle unterscheiden sich nur geringfügig vom Spektrum des Ionisationsmarkers **1**. Der Vergleich des Spektrums von Anthracen mit dem von **1** oder mit denjenigen der derivatisierten Analytmoleküle zeigt, dass das Vorhandensein eines C-Atoms am Ringsystem das Spektrum ins Rote verschiebt, während weitere Substituenten hinter diesem ersten C-Atom keinen signifikanten Einfluss auf die Absorptionseigenschaften mehr haben. Deshalb sollte die Ionisationsausbeute von Analytmolekülen, die mit dem gleichen Ionisationsmarker derivatisiert wurden, nahezu identisch sein. Allerdings kann die Derivatisierungsausbeute von verschiedenen Analyten unterschiedlich sein. Aufgrund der ähnlichen Derivatisierungsausbeuten, die bei

homologen Verbindungen beobachtet werden, kann die Probe aber anstelle von teuren SIMS mit einem oder mehreren Homologen des Analyten in bekannter Konzentration versetzt werden, um eine quantitative Analyse zu gewährleisten. Diese Überlegungen wurden durch die Analyse von Palmitinsäure, Heptadecansäure und Stearinsäure verifiziert, indem äquimolare Mengen dieser drei Fettsäuren mit **2** derivatisiert und mit APLI-(TOF)MS analysiert wurden. Die Signalintensitäten der derivatisierten Säuren betragen 155513, 150620 bzw. 153296 Counts, woraus eine durchschnittliche Signalintensität von 153343 ± 2493 Counts (relative Standardabweichung 1.6%) resultierte. Die Derivatisierungsausbeute der Reaktion betrug dabei 67%.

Abbildung 3 zeigt die Analyse von ethoxyliertem 1-Octadecanol (Brij 72) mit APLI und MALDI. Für die APLI-Messung wurde die Probe lediglich in Dichlormethan gelöst, mit **1** derivatisiert und ohne weitere Vorbereitung mit einer Spritzenpumpe in die Quelle injiziert. Das resultierende Spektrum (Abbildung 3a) zeigt das für dieses homologe Polymer – im Falle einer für alle Moleküle vergleichbaren Derivatisierungsausbeute – erwartete Signalmuster. Diese Verteilung wurde durch ein MALDI-Experiment mit 2,5-Dihydroxybenzoësäure als Matrix und Silbertrifluoracetat als Kationisierungsreagens bestätigt (Abbildung 3b). Als ein weiteres Beispiel für die Analyse einer realen Probe zeigt Abbildung 4 die Analyse von freien Fettsäuren in Sonnenblumenöl. Die Ergebnisse wurden erhalten, nachdem ein Aliquot des Öls in Dichlormethan aufgenommen, mit **2** verestert und mithilfe von APLI-(TOF)MS analysiert wurde. Dabei wurde Heptadecansäure als interner Standard eingesetzt, was eine quantitative Bestimmung der freien Fettsäuren in der Probe ermöglichte. Tabelle 1 listet die Ergebnisse auf und vergleicht diese mit der Gesamtkonzentration an Säure, die nach DIN EN ISO 660 bestimmt wurde.

Freie Fettsäuren treten oftmals als unerwünschte Nebenprodukte bei der Synthese und Verarbeitung von Fettalkoholen auf, und die Säurezahl dient routinemäßig als Maß für die Konzentration der freien Fettsäuren in der Probe.^[13] Allerdings wird für eine effiziente Prozessoptimierung häufig



Schema 1. Derivatisierung von Säuren, Aminen und Alkoholen mit dem APLI-Ionisationsmarker.

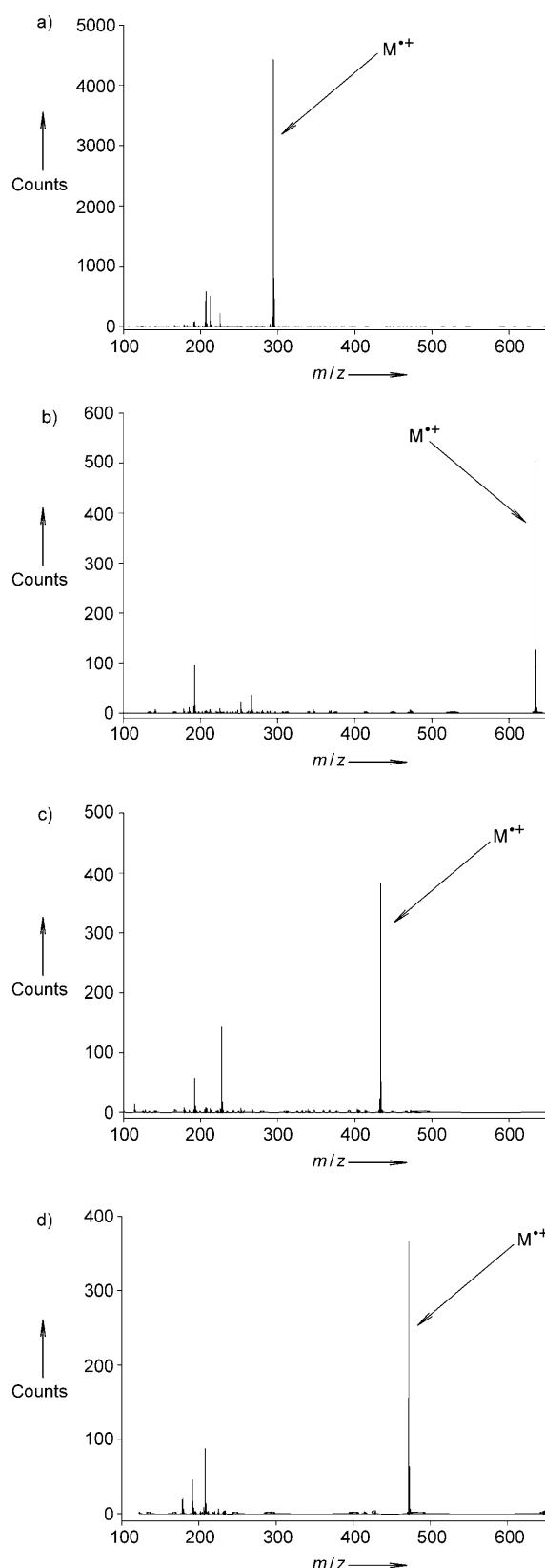


Abbildung 1. APLI-(TOF)MS von a) Ethanol, b) Cholesterin, c) Dodecylamin und d) Ölsäure nach Derivatisierung mit **1** oder **2** und Injektion mit einer Spritzenpumpe.

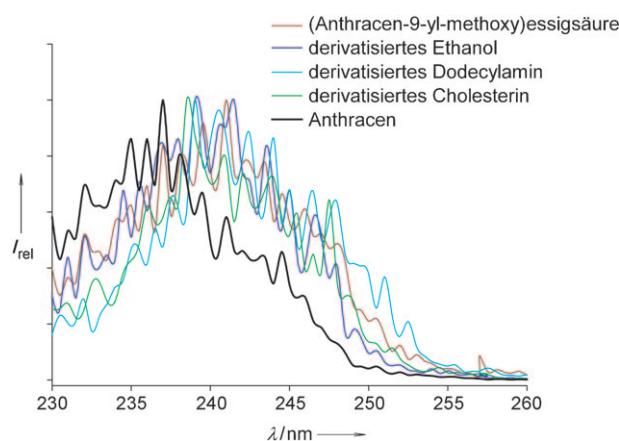


Abbildung 2. Vergleich verschiedener AP-REMPI-Spektren.

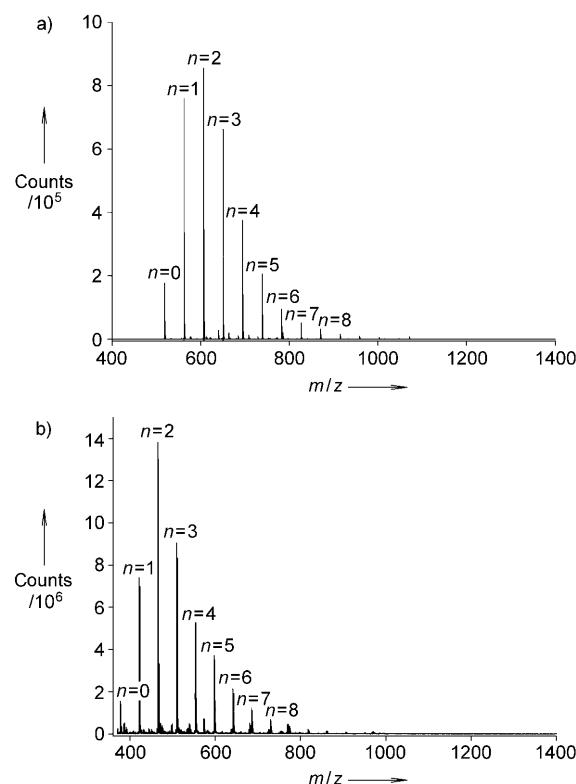


Abbildung 3. Analyse von Brij 72 mit a) APLI und b) MALDI mit 2,5-Dihydroxybenzoësäure als Matrix und Silbertrifluoracetat als kationisierendem Reagens. Die Signale im APLI-(TOF)MS wurden als Radikal-kation detektiert, während im MALDI-(TOF)MS die Silberaddukte der Analyten gebildet wurden.

die Kenntnis der Identität der freien Fettsäure sowie der individuellen Konzentration gewünscht. Leider können Fettsäuren in einer Fettalkohol-Matrix nicht mit **2** und nach dem beschriebenen Syntheseweg derivatisiert werden, da die Fettalkohole bei der Derivatisierungsreaktion mit dem Ionisationsmarker konkurrieren. Deshalb wurde in diesem Fall 9-Diazomethylanthracen (**3**), das auch als Fluoreszenzmarker für Fettsäuren bekannt ist,^[14] als Ionisationsmarker eingesetzt (Schema 2). Mit den in der Literatur beschriebenen Reaktionsparametern ist eine Umsetzung mit den Fettalkoholen

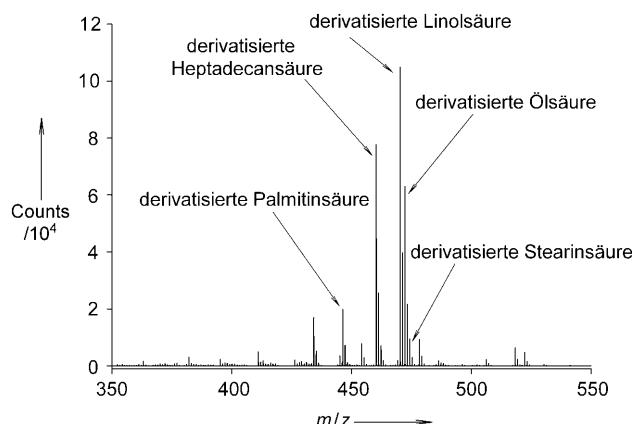
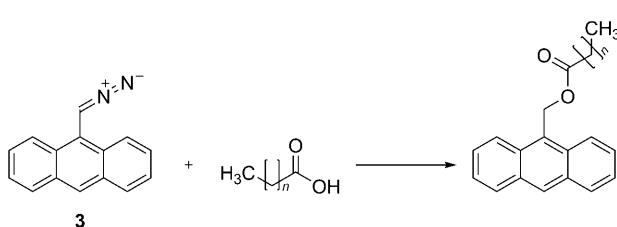


Abbildung 4. Analyse von freien Fettsäuren in Sonnenblumenöl nach Derivatisierung mit **2** und Injektion mit einer Spritzenpumpe.

Tabelle 1: Analyse von freien Fettsäuren in Sonnenblumenöl.

Fettsäure	Gehalt an freien Fettsäuren [%]
	API-(TOF)MS
Palmitinsäure	0.14
Linolsäure	0.80
Ölsäure	0.40
Stearinsäure	0.04
gesamte Säurekonz.	1.38
	DIN EN ISO 660
	n.b. ^[a]

[a] n.b.: nicht bestimmbar.



Schema 2. Derivatisierung von Fettsäuren mit 9-Diazomethylanthracen.

unmöglich.^[14] Um den Gehalt an Fettsäuren in einer Fettalkohol-Matrix eines Industrieproduktes zu bestimmen, wurde die Probe mit 9-Diazomethylanthracen derivatisiert und zweimal mit einem Gaschromatographen, der mit dem APLI-(TOF)MS gekoppelt wurde, analysiert. Das untersuchte Industrieprodukt wurde aus einem Kokosnussöl gewonnen. In pflanzlichen Produkten sind normalerweise nur geradzahlige Kohlenwasserstoffe enthalten, weshalb anstelle eines teuren SIMS eine Fettsäure mit ungeradzahliger Kettenlänge – Heptadecansäure – als interner Standard eingesetzt werden konnte. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse ($n=2$) im Vergleich mit der Gesamtkonzentration an Säure, die vom Hersteller angegeben wurde. Wegen der geringen Säurekonzentration war keine Analyse nach DIN EN 660 möglich.

Durch die beschriebene Derivatisierungsstrategie konnte die Bandbreite der analytischen Anwendungen der APLI-MS enorm erweitert werden. So sind die zu ionisierenden Analyten nicht mehr durch ihre spektroskopischen Eigenschaften und somit auf aromatische Kohlenwasserstoffe beschränkt,

Tabelle 2: GC-APLI-(TOF)MS von freien Fettsäuren in einem Industrieprodukt.

Fettsäure	Gehalt an freien Fettsäuren [%]
Dodecansäure	$1.05 \times 10^{-3} \pm 2.3 \times 10^{-5}$
Tetradecansäure	$2.23 \times 10^{-4} \pm 7.4 \times 10^{-5}$
Hexadecansäure	$1.86 \times 10^{-4} \pm 2.2 \times 10^{-5}$
Octadecansäure	$2.78 \times 10^{-4} \pm 2.8 \times 10^{-5}$
gesamte Säurekonz.	$1.73 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-5}$
angegebener Wert	$0-3.6 \times 10^{-2}$

sondern benötigen nur eine reaktive Ankergruppe und die Möglichkeit der Bindung mit einem Ionisationsmarker. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Analytmoleküle, die mit dem gleichen Marker derivatisiert wurden, nahezu identische spektroskopische Eigenschaften aufweisen wie der Marker selbst. Dies führt zu den beschriebenen Vorteilen bei einer quantitativen Analyse von Substanzen in komplexer Matrix. Zurzeit entwickeln wir weitere Synthesestrategien für unterschiedliche Ionisationsmarker, um selektiv unterschiedliche Zielmoleküle derivatisieren und die GC-APLI-MS zur Bearbeitung einer größeren Zahl von Fragestellungen einsetzen zu können.

Eingegangen am 20. August 2008
Online veröffentlicht am 13. November 2008

Stichwörter: Ionisationstechniken · Laserchemie · Massenspektrometrie · Photoaffinitätsmarkierung · Polymere

- [1] H. Hayen, U. Karst, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 549–565.
- [2] R. B. Cole, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals Instrumentation and Applications*, Wiley, New York, 1997.
- [3] W. M. A. Niessen, *Liquid Chromatography—Mass Spectrometry*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [4] a) J. A. Syage, M. D. Evans, K. A. Hanold, *Am. Lab.* **2000**, *32*, 24–29; b) J. A. Syage, M. D. Evans, *Spectroscopy* **2001**, *16*, 15–21; c) D. B. Robb, T. R. Covery, A. P. Bruins, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3653–3659.
- [5] a) M. Constapel, M. Schellenträger, O. J. Schmitz, S. Gäb, K. J. Brockmann, R. Giese, T. Benter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 326–336; b) S. Droste, M. Schellenträger, M. Constapel, S. Gäb, M. Lorenz, K. J. Brockmann, T. Benter, D. Lubda, O. J. Schmitz, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 4098–4103; c) R. Schiewek, M. Schellenträger, R. Mönnikes, M. Lorenz, R. Giese, K. J. Brockmann, S. Gäb, T. Benter, O. J. Schmitz, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4135–4140; d) M. Lorenz, R. Schiewek, K. J. Brockmann, O. J. Schmitz, S. Gäb, T. Benter, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 400–410; e) P. Schmitt-Kopplin, M. Englmann, R. Rossello-Mora, R. Schiewek, K. J. Brockmann, T. Benter, O. J. Schmitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2803–2809; f) W. Schrader, S. K. Panda, K. J. Brockmann, T. Benter, *Analyst* **2008**, *133*, 867–869; g) R. Schiewek, M. Lorenz, R. Giese, K. J. Brockmann, T. Benter, S. Gäb, O. J. Schmitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 87–96.
- [6] a) T. M. Annesley, *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 1041–1044; b) K. Georgi, K. S. Boos, *Chromatographia* **2006**, *63*, 523–531; c) L. L. Jessome, D. A. Vomer, *LCGC North Am.* **2006**, *24*, 498–510.
- [7] a) Z. Liu, J. B. Phillips, *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*, 227–231; b) T. Jiang, Y. Guan, *J. Chromatogr. Sci.* **1999**, *37*, 255–262;

- c) M. M. Bushey, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 161–167.
- [8] D. G. Burke, L. G. Mackay, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5071–5078.
- [9] a) K. Vosmann, E. Klein, N. Weber, *J. Chromatogr. A* **1997**, *773*, 239–247; b) M. Morvai-Vitányi, I. Molnárperl, D. Knausz, P. Sass, *Chromatographia* **1993**, *36*, 204–206.
- [10] O. Schmitz, C. Wörth, D. Stach, M. Wießler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 461–464; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 445–448.
- [11] a) M. Fernandes-Whaley, F. Mühlberger, A. Whaley, T. Adam, R. Zimmermann, E. Rohwer, A. Walte, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1–10; b) J. R. Srinivasan, L. J. Romano, R. J. Levis, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13272–13279.
- [12] N. Ouwerkerk, J. H. van Boom, J. Lugtenburg, J. Raap, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 861–866.
- [13] S. Mahajan, S. K. Konar, D. G. B. Boocock, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 567–570.
- [14] S. A. Barker, J. A. Monti, S. T. Christian, F. Benington, R. D. Morin, *Anal. Biochem.* **1980**, *107*, 116–123.
-