

1

Stand der Technik in der LC-MS-Kopplung

O. Schmitz

1.1 Einleitung

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

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

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

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

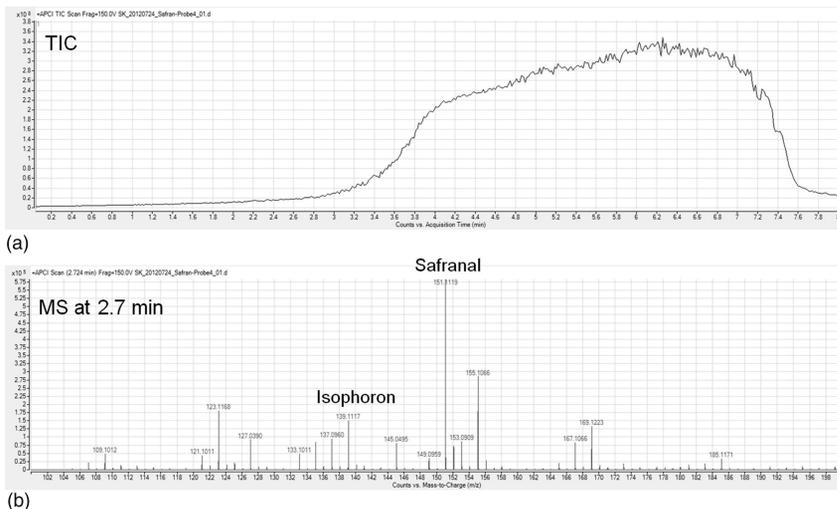


Abb. 1.1 Analyse von Safran mittels DIP-APCI und einem hochauflösenden qTOF-MS.

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

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

1.2

Ionisationsmethoden bei Atmosphärendruck-Massenspektrometern

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

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

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

1.2.1

Übersicht API-Methoden

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

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

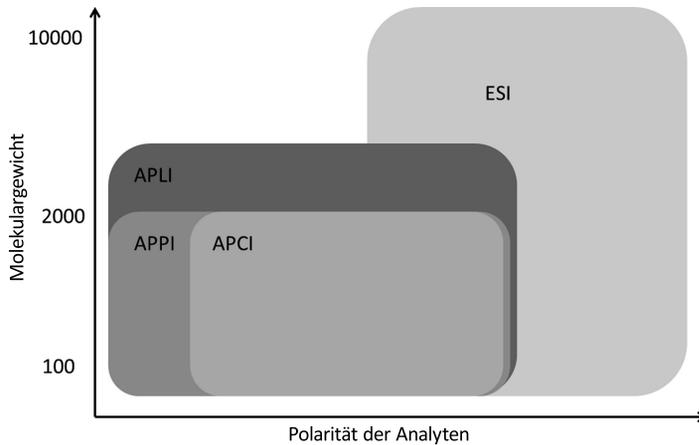


Abb. 1.2 Geeigneter Polaritätsbereich von Analyten für die Ionisation mit verschiedenen API-Techniken. Hinweis: Der erweiterte Massenbereich der APLI gegenüber APPI und APCI ergibt sich aus der Ionisation von unpolaren aromatischen Analyten in einem Elektrospray.

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

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

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

1.2.2

ESI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

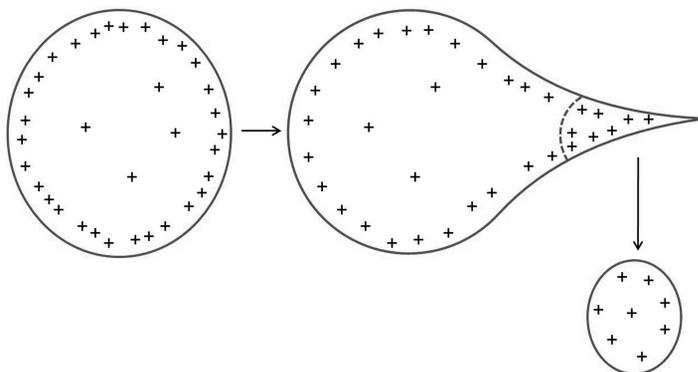


Abb. 1.3 Reduzierung der Tröpfchengröße.

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

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

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

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

1.2.3

APCI

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

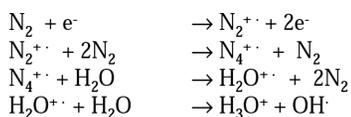


Abb. 1.4 Reaktionsmechanismus bei der APCI.

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

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

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

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



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

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

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

1.2.4

APPI

Die APPI ist für die Ionisation von unpolaren Analyten geeignet, wobei die Fotoionisation eines Moleküls M zur Bildung des Molekülradikalkations $M^{\bullet+}$ 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 [65]. Generell wird in der APPI bei polaren, in CH_3CN-H_2O -Mischungen gelösten Verbindungen meistens die Bildung von $[M + H^+]$ beobachtet, während unpolare Verbindungen, wie beispielsweise Naphthalin, normalerweise $M^{\bullet+}$ bilden [66]. Ein detaillierter Mechanismus zur Bildung von $[M + H]^+$ wurde von Syage vorgeschlagen [67]. 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) [66] 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 Dopant-Fotoionen 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 [68]. Durch Zugabe eines Dopants kann zwar die Sensitivität erhöht werden, aber die möglichen Adduktbildungen führen oftmals zu deutlich komplizierteren APPI-Massenspektren [45, 66, 68]. 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 [69].

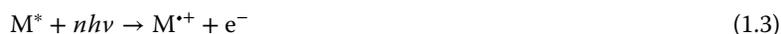
1.2.5

APLI

Die „atmospheric pressure laser ionization“ (APLI) wurde 2005 entwickelt [70]. 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 reso-

nanzverstärkten 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 Gln. (1.2) und (1.3) repräsentieren einen klassischen ($m + n$) resonanzverstärkten Mehrphotonenionisation (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 PAK und stellt daher eine wertvolle Alternative zu APCI und APPI dar. Die APLI ist aber nicht nur auf die Analyse solcher einfachen aromatischen Verbindungen beschränkt. Es können auch komplexere oligo- oder polymere Strukturen sowie metallorganische Verbindungen analysiert werden [71]. Zudem besteht die Möglichkeit, Analyten über ihre funktionelle Gruppe mit sogenannten Ionisationsmarkern – in Analogie zu Fluoreszenzderivatisierung – zu modifizieren und dann über den aromatischen Ionisationsmarker auch nicht aromatische Substanzen mittels APLI zu ionisieren [72–74]. 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 [75, 76]. Dadurch können sowohl polare (ESI) bzw. nicht aromatische mittelpolare Analyten (APCI) gemeinsam mit Aromaten (APLI) einer massenspektrometrischen Detektion zugänglich gemacht werden.

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 Signal reduzierenden Einfluss der Matrix kommt.

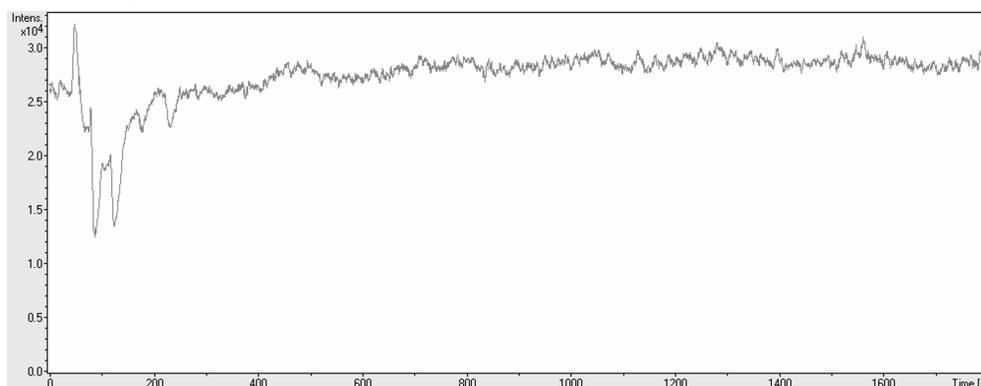


Abb. 1.5 Ionensuppression von PAK im Urin bei APCI-MS Analysen.

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 Analytmassenspur während der Elution der Matrix gibt Auskunft über eine eventuell 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.

1.2.7

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-Sprayeinlass 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, so ist es hinsichtlich Spraystabilität, Reproduzierbarkeit und Ionensuppression si-

cherlich sinnvoll, ESI-Quellen mit Flüssen unter 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ und APCI-, APPI- und APLI-Quellen mit Flüssen unter 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ zu betreiben. Natürlich können applikationsbedingt auch größere Flüsse eingesetzt werden, woraus sich allerdings oftmals die genannten Probleme ergeben. Durch Derivatisierung kann die Empfindlichkeit in Einzelfällen signifikant gesteigert werden.

1.3

Massenanalytoren

Am häufigsten werden folgende Massenspektrometer routinemäßig mit der LC gekoppelt:

- Quadrupol
- Triple-Quadrupol
- ion trap
- 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 (ultra high performance liquid chromatography) als schnelle Trennmethode mit dem Quadrupol gekoppelt werden.

Eine auf Quadrupol-MS basierende Weiterentwicklung stellen die Triple-Quadrupol-Massenspektrometer dar, die vor allem bei der Targetanalytik in komplexen Proben eine große Rolle spielen. Es wird weitestgehend auf Probenvorbereitung und Vortrennung verzichtet, und die Potenziale des ersten und dritten Quadrupols werden so eingestellt, dass jeweils nur ein bestimmtes (m/z) durchgelassen wird. Dabei handelt es sich beim ersten Quadrupol um das Ion des Targetanalyten und beim dritten Quadrupol um ein charakteristisches Fragment dieses Ions, welches im zweiten Quadrupol (eigentlich eine Stoßkammer) durch Stöße mit Argon oder Stickstoff induziert wird. Durch die Analyse des Fragmentations wird das chemische Rauschen (Matrix) stark reduziert, und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer zählen somit zu den sensitivsten und selektivsten Massenspektrometern. Für einige Analyten sind bereits Nachweisgrenzen im Zeptomolbereich (Stoffmenge auf der Trennsäule) realisiert worden. Meist werden 2–3 Fragmente gemessen, um die Intensitätsverhältnisse zu vergleichen und somit Überlagerungen auszuschließen (quantifier und qualifier).

Ähnlich wie ein Quadrupol ist eine Ionenfalle 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 Ion-trap-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 (Zucker, Peptide etc.). Zu beachten wäre hier der „low mass cutoff“

Time-of-flight (TOF)-Massenspektrometer erfahren seit mehr als 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 funnels, leistungsstärkere Elektronik etc. die Auflösung immer weiter verbessert, sodass mittlerweile mehrere Hersteller TOF-MS-Systeme mit Auflösungen zwischen 40 000–70 000 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 unbekanntem 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 [77, 78]. Die Ionen werden in der Orbitrap nicht wie bei üblichen Fr-ICR-Ionenfallen mit magnetischen, sondern mit elektrischen Feldern gesammelt. Aufgrund des Auflösungsvermögens (bis ca. 800 000) und der hohen Massengenauigkeit (1–3 ppm) kann die Orbitrap beispielsweise zur Identifikation von Peptiden in Proteinanalysen oder für Metabolomstudien eingesetzt werden. Zusätzlich kann die Selektivität durch MS/MS-Experimente noch stark verbessert werden. Allerdings ist die Kopplung mit der UHPLC für eine schnelle chromatografische 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 haben neben sehr hohen Anschaffungs- und Betriebskosten (z. B. Helium) den Nachteil einer geringen Datenaufnahmerate (gleiches Problem wie beim Orbitrap), weshalb die Kopplung mit einer schnellen Chromatografie wie beispielsweise der UHPLC nicht realisiert werden kann. Allerdings sind sie hinsichtlich Auflösung ($> 800 000$) ungeschlagen und ein extrem nützliches Werkzeug in der Metabolomforschung.

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 Spektren pro Sekunde und Datenraten von 20–40 erzielt werden können. Bei der Orbitrap ist zu vermuten, dass durch eine noch präzisere Produktion der Zelle routinemäßig Auflösungen über 500 000 möglich sein werden. Dadurch könnte dann durch eine Verkürzung der Scangeschwindigkeit, die mit einem Auflösungsver-

lust einhergeht, auch eine schnelle Vortrennung (UHPLC) eingesetzt werden, die hinsichtlich Auflösung mit den TOF-MS-Systemen konkurrieren kann.

Im Bereich der Non-target-Analytik stellt die Kombination der Ionenmobilitätspektrometrie (IMS) mit einem hochauflösenden qTOF-MS eine leistungsstarke Analysenplattform dar. Zurzeit sind zwei ausgereifte kommerzielle Systeme mit unterschiedlichen Spielarten der Ionenmobilität, die drift-time ion mobility spectrometry (DTIMS) beim Agilent 6560 und die traveling wave ion mobility spectrometry (TWIMS) beim Vion IMS qTOF von Waters kommerziell erhältlich. Durch die strukturabhängige Driftzeit in der Driftröhre des IMS können auch vor der Ionisation nicht getrennte isobare Substanzen voneinander separiert werden. Abbildung 1.6 zeigt die Trennung der isobaren Substanzen Glukose und Fruktose im IM-qTOF-MS-System (Agilent 6560) durch die unterschiedliche Wanderungszeit (Driftzeit in Millisekunden) durch die 80 cm lange Driftröhre des Systems. Besonders erwähnenswert ist, dass anhand der Driftzeit die collision cross section (CCS) direkt (beim Agilent-System) und indirekt über Vergleich mit einem Standard (beim Waters-System) der Substanzen bestimmt werden kann. Beim Einsatz einer Datenbank aus CCS-Werten und der präzisen Masse kann dann eine schnelle und zuverlässige Identifizierung der Signale bei einer Non-target-Analyse durchgeführt werden. Dazu gibt es interessante Lösungen seitens der Hersteller zur Reduzierung vom Untergrund bei der Quantifizierung (FA/MS von Thermo, Selex Ion von SCIEX).

Ein weiterer Schwerpunkt in den zukünftigen Entwicklungen wird die Optimierung der Ionenquellen hinsichtlich Ionenerzeugung und Ionentransport bei

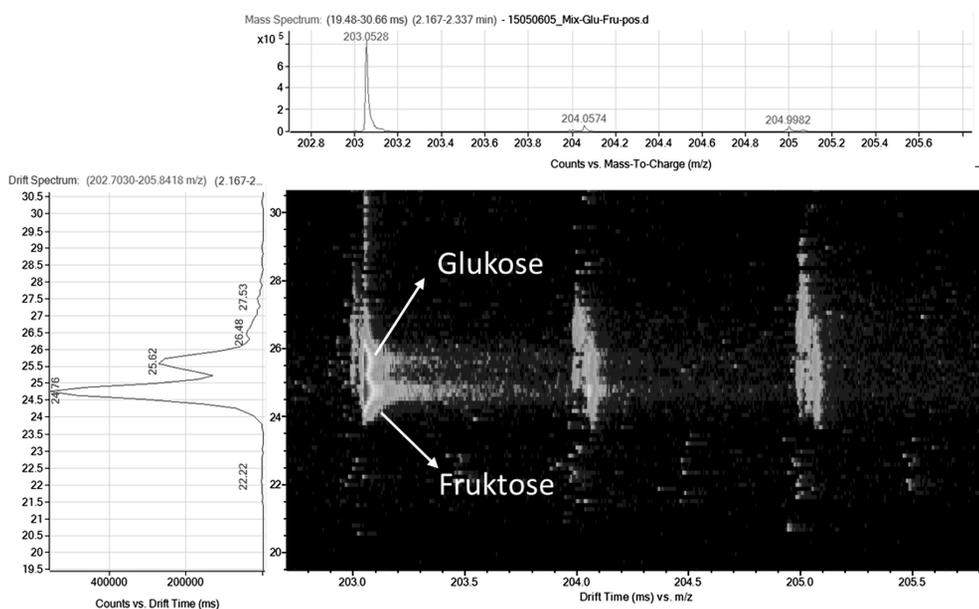


Abb. 1.6 Analyse einer Mischung aus Glukose und Fruktose mittels IM-qTF-MS.

unterschiedlichen Flüssen (Nano-, Mikro-HPLC, LC × LC) und für den Einsatz der wieder an Bedeutung gewinnenden supercritical fluid chromatography (SFC) sein, um die Sensitivität weiter zu verbessern.

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:

- a) soll eine Targetanalyse oder eine umfassende Analyse der Probe zur Strukturauflösung durchgeführt werden;
- b) notwendige Sensitivität;
- c) Software;
- d) Probendurchsatz;
- e) MS-Analyse mit oder ohne vorgeschalteter 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 (SIM, MRM = multiple reaction monitoring), und auch eine schnelle Vortrennung (z. B. UHPLC) ist bei vielen Geräten mittlerweile möglich.

Sollen unbekannte Proben auf Inhaltsstoffe untersucht werden („full scan“), würden hochauflösende Massenspektrometer wie das qTOF oder die Orbitrap die Analyse merklich erleichtern. Aufgrund der zusätzlichen Trenndimension, der CCS-Bestimmung und der damit einhergehenden Identifizierungsmöglichkeit sind auch die neuen Systeme mit einem vorgeschalteten Ionenmobilitätspektrometer sicherlich eine interessante Alternative. 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 deutlich überlegen. Die Sensitivität eines QTOF 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. Dies gilt im SIM oder MRM-Modus; im Falle von full scan sind QTOF empfindlicher als Triplequads.

Wenn – z. B. aufgrund eines hohen Probenaufkommens – auf eine Vortrennung verzichtet werden soll, so sollte darauf geachtet werden, dass geeignete sogenannte ambient desorption ionization techniques wie DESI, DART, ASAP, DIP-APCI etc. an das MS gekoppelt werden können. Einen guten Überblick ermöglichen einige Reviewartikel [79–82].

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 Anschaffungspreis sollten auch die Betriebskosten bei der Anschaffung berücksichtigt werden. Neben einem hohen Stickstoffverbrauch sollten die Massenspektrometer jährlich gewartet werden. Alleine die Wartung führt je nach Aufwand und Hersteller zu jährlichen Kosten in Höhe von 5000 bis 20 000 Euro.

Literatur

- 1 Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L. und Chavez-Eng, C.M. (2003) *Anal. Chem.*, **75**, 3019–3030.
- 2 Annesley, T.M. (2003) *Clin. Chem.*, **49**, 1041–1044.
- 3 McEwen, C.N., McKay, R.G. und Larsen, B.S. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 7826–7831.
- 4 McEwen, C. und Gutteridge, S. (2007) *J. Am. Soc. Mass. Spec.*, **18**, 1274–1278.
- 5 Ray, A.D., Hammond, J. und Major, H. (2010) *Eur. J. Mass. Spectrom.*, **16**, 169–174.
- 6 Cody, R.B., Laramee, J.A. und Durst, H.D. (2005) *Anal. Chem.*, **77**, 2297–2302.
- 7 Takats, Z., Wiseman, J.M., Gologan, B. und Cooks, R.G. (2004) *Science*, **306**, 471–473.
- 8 Laramee, J.A. und Cody, R.B. (2007) In: Gross ML, Caprioli RM (eds) *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*, vol. 6, Elsevier
- 9 Schurek, J., Vaclavik, L., Hooijerink, H., Lacina, O., Poustka, J., Sharman, M., Caldwell, M., Nielsen, M.W.F. und Hajslova, J. (2008) *Anal. Chem.*, **80**, 9567–9575.
- 10 Lloyd, J.A., Harron, A.F. und McEwen, C.N. (2009) *Anal. Chem.*, **81**, 9158–9162.
- 11 Ahmed, A., Cho, Y.J., No, M.H., Koh, J., Tomczyk, N., Giles, K., Yoo, J.S. und Kim, S. (2011) *Anal. Chem.*, **83**, 77–83.
- 12 Pan, H.F. und Lundin, G. (2011) *Eur. J. Mass. Spectrom.*, **17**, 217–225.
- 13 Maleknia, S.D., Vail, T.M., Cody, R.B., Sparkman, D.O., Bell, T.L. und Adams, M.A. (2009) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 2241–2246.
- 14 Edison, S.E., Lin, L.A., Gamble, B.M., Wong, J. und Zhang, K. (2011) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25**, 127–139.
- 15 Krieger, S., von Trotha, A., Leung, K.S.-Y. und Schmitz, O.J. *Anal. Bioanal. Chem.*, doi:10.1007/s00216-012-6531-4.
- 16 Schmitz, O.J. und Benter T (2007) In *Advances in LC-MS Instrumentation, Atmospheric pressure laser ionization*, (Hrsg. A. Cappiello), 72. Aufl., Kapitel 6, Journal of Chromatography Library, S. 89–113.
- 17 Cole, R.B. (Hrsg.) (1997) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 18 Cech, N.B. und Enke, C.G. (2001) *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 362–387.
- 19 Kebarle, P. (2000) *J. Mass. Spectrom.*, **35**, 804–817.
- 20 Niessen, W.M.A. (Hrsg.) (1999) *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 21 Van Berkel, G.J., McLuckey, S.A. und Glish, G.L. (1991) *Anal. Chem.*, **63**, 2064–2068.
- 22 Van Berkel, G.J., McLuckey, S.A. und Glish, G.L. (1992) *Anal. Chem.*, **64**, 1586–1593.
- 23 Van Berkel, G.J. und Asano, K.G. (1994) *Anal. Chem.*, **66**, 2096–2102.
- 24 Van Berkel, G.J. und Zhou, F. (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 2916–2923.
- 25 Van Berkel, G.J. und Zhou, F. (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 3958–3964.
- 26 Van Berkel, G.J., Quirke, J.M.E., Tigani, R.A., Dilley, A.S. und Covey, T.R. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 1544–1554.
- 27 Van Berkel, G.J., Quirke, J.M.E. und Adams, C.L. (2000) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 849–858.
- 28 Williams, D. und Young, M.K. (2000) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 2083–2091.
- 29 Quirke, J.M.E., Hsz, Y.-L. und Van Berkel, G.J. (2000) *Nat. Prod.*, **63**, 230–237.

- 30 Williams, D., Chen, S. und Young, M. K. (2001) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 182–186.
- 31 Quirke, J.M.E. und Van Berkel, G.J. (2001) *J. Mass Spectrom.*, **36**, 179–187.
- 32 Kauppila, T.J., Kostiaainen, R. und Bruins, A.P. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 808–815.
- 33 Rentel, C., Strohschein, S., Albert, K. und Bayer, E. (1998) *Anal. Chem.*, **70**, 4394–4400.
- 34 Bayer, E., Gfrörer, P. und Rentel, C. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 992–995.
- 35 Takino, M., Daishima, S., Yamaguchi, K. und Nakahara, T. (2001) *J. Chromatogr. A*, **928**, 53–61.
- 36 Roussis, S.G. und Proulx, R. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 1408–1414.
- 37 Marwah, A., Marwah, P. und Lardy, H. (2002) *J. Chromatogr. A*, **964**, 137–151.
- 38 Singh, G., Gutierrez, A., Xu, K. und Blair, I.A. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 3007–3013.
- 39 Higashi, T., Takido, N., Yamauchi, A. und Shimada, K. (2002) *Anal. Sci.*, **18**, 1301–1307.
- 40 Higashi, T., Takido, N. und Shimada, K. (2003) *Analyst*, **128**, 130–133.
- 41 Hayen, H., Jachmann, N., Vogel, M. und Karst, U. (2002) *Analyst*, **127**, 1027–1030.
- 42 Zwiener, C. und Frimmel, F.H. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 851–861.
- 43 Syage, J.A. und Evans, M.D. (2001) *Spectroscopy*, **16**, 15–21.
- 44 Syage, J.A., Hanold, K.A., Evans, M.D. und Liu, Y. (2001) Atmospheric pressure photoionizer for mass spectrometry, Patent no. WO0197252
- 45 Robb, D.B., Covey, T.R., und Bruins, A.P. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 3653–3659.
- 46 Robb, D.B. und Bruins, A.P. (2001) Atmospheric pressure photoionization (APPI): A new ionization method for liquid chromatography–mass spectrometry, Patent No. WO0133605.
- 47 Baim, M.A., Eartherton, R.I. und Hill, H.H. Jr. (1983) *Anal. Chem.*, **55**, 1761–1766.
- 48 Leasure, C.S., Fleischer, M.E., Anderson, G.K. und Eiceman, G.A. (1986) *Anal. Chem.*, **58**, 2142–2147.
- 49 Spangler, G.E., Roehl, J.E., Patel, G.B. und Dorman, A. (1994) U.S. Patent no. 5 338 931.
- 50 Kauppila, T.J., Kuuranne, T., Meurer, E.C., Eberlin, M.N., Kotiaho, T. und Kostiaainen, R. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 5470–5479.
- 51 Discroll, J.N. (1976) *Am. Lab.*, **8**, 71–75.
- 52 Discroll, J.N. (1977) *J. Chromatogr.*, **134**, 49–55.
- 53 Locke, D.C., Dhingra, B.S. und Baker, A.D. (1982) *Anal. Chem.*, **54**, 447–450.
- 54 Zeleny, J. (1917) *Phys. Rev.*, **10**, 1–6.
- 55 Wilson, C.T.R. und Taylor, G. (1925) *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **22**, 728–730.
- 56 Taylor, G. (1964) *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A*, **280**, 383–397.
- 57 Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D. und Alice, M.B. (1968) *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240–2249.
- 58 Yamashita, M. und Fenn, J.B. (1984) *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451–4459.
- 59 Cole, R.B. (2000) *J. Mass Spectrom.*, **35**, 763–772.
- 60 Kebarle, P. und Peschke, M. (1994) *Anal. Chem.*, **66**, 712–718.
- 61 Thomson, B.A. und Iribarne, J.V. (1979) *J. Chem. Phys.*, **71**, 4451–4463.
- 62 Molin, L. und Traldi, P. (2007) In *Advances in LC–MS Instrumentation, Basic Aspects of Electrospray Ionization*, (Hrsg. A. Cappiello), 72. Aufl., Kapitel 1, Journal of Chromatography Library, S. 1–9.
- 63 Carrol, D.I., Dzidic, I., Stillwell, R.N., Horning, M.G. und Horning, E.C. (1974) *Anal. Chem.*, **46**, 706–710.
- 64 Moini, M. (2007) In *The Encyclopedia of Mass Spectrometry, Atmospheric Pressure Chemical Ionization: Principles, Instrumentation, and Applications*, (Hrsg. M.L. Gross und R.M. Caprioli), 6. Aufl., Elsevier, S. 344–354.
- 65 Lias, S.G. (2003) Ionization energy evaluation. In *NIST Chemistry Web-Book, NIST Standard Reference Database Number 69*, (Hrsg. P.J. Linstrom und W.G. Mallard), March 2003, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899 (<http://webbook.nist.gov>), February 2017.

- 66 Raffaelli, A. und Saba, A. (2003) *Mass Spectrom. Rev.*, **22**, 318–331.
- 67 Syage, J.A. (2004) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 1521–1533.
- 68 Kauppila, T.J., Kotiaho, T., Kostianen, R. und Bruins, A.P. (2004) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15**, 203–211.
- 69 Klee, S., Albrecht, S., Derpmann, V., Kersten, H. und Benter, T. (2013) *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 6933–6951.
- 70 Constapel, M., Schellenträger, M., Schmitz, O.J., Gäb, S., Brockmann, K.-J., Giese, R. und Benter, T. (2005) *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **19**, 326–336.
- 71 Tian, N., Thiessen, A., Schiewek, R., Schmitz, O.J., Hertel, D., Meerholz, K. und Holder, E. (2009) *J. Organic Chem.*, **74**, 2718–2725.
- 72 Schiewek, R., Mönnikes, R., Wulf, V., Gäb, S., Brockmann, K.J., Benter, T. und Schmitz, O.J. (2008) *Angew. Chemie Int. Ed.*, **47**, 9989–9992.
- 73 Schiewek, R., Mönnikes, R., Wulf, V., Gäb, S., Brockmann, K.J., Benter, T. und Schmitz, O.J. (2008) *Angew. Chemie*, **120**, 10138–10142.
- 74 Deibel, E., Klink, D. und Schmitz, O.J. (2015) *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 7425–7434.
- 75 Schiewek, R., Schellenträger, M., Mönnikes, R., Lorenz, M., Giese, R., Brockmann, K.-J., Gäb, S., Benter, T., Schmitz, O.J. (2007) *Anal. Chem.*, **79**, 4135–4140.
- 76 Schiewek, R., Lorenz, M., Brockmann, K.J., Benter, T., Gäb, S. und Schmitz, O.J. (2008) *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**, 87–96.
- 77 Makarov A. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 1156–1162.
- 78 Perry R.H., *et al.* (2008) *Mass Spectrom. Rev.*, **27**, 661–699.
- 79 Fengguo, X., Li, Z., Ying, L., Zunjian, Z. und Choom N.O. (2011) *Mass Spectrom. Rev.*, **30**, 1143–1172, Wiley Periodicals Inc.
- 80 Truffeli, H., Palma, P., Famiaglioni, G. und Capiello, A. (2011) *Mass Spectrom. Rev.*, **30**, 491–509, Wiley Periodicals Inc.
- 81 Laphorn, C., Pullen, F. und Chowdhry, B.Z. (2013) *Mass Spectrom. Rev.*, **32**, 43–71, Wiley Periodicals Inc.
- 82 Donato, P., Cacciola, F., Tranchida, P.Q., Dugo, P. und Mondello, L. (2012) *Mass Spectrom. Rev.*, **31**, 523–559, Wiley Periodicals Inc.

