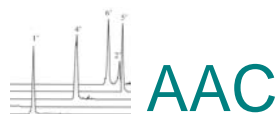


---

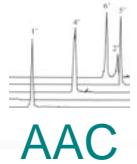
Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck  
(APCI):  
Eine unterschätzte Technik der LC-MS mit vielen  
Möglichkeiten aber auch Fallgruben

---

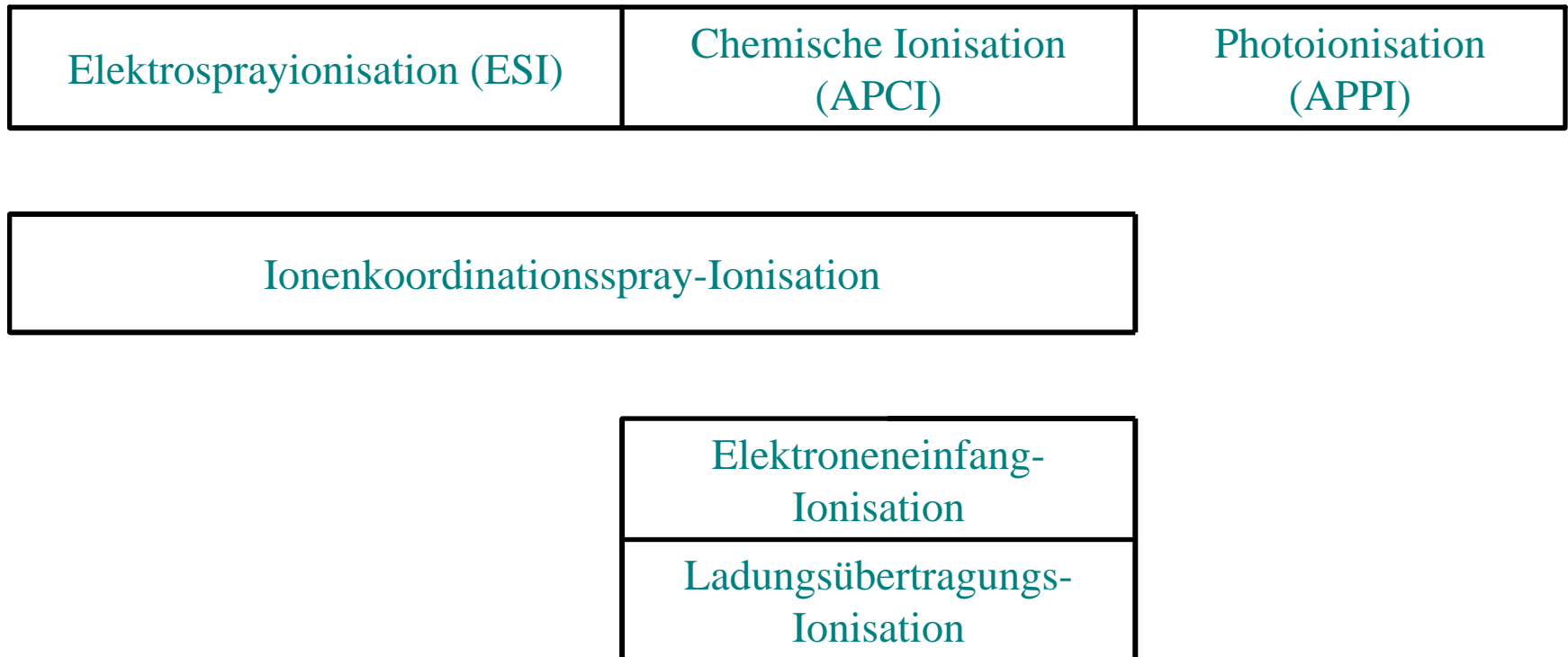


Michael Oehme  
Institut für Angewandte Analytische Chemie  
CH-9044 Wald AR

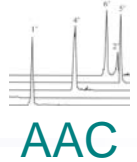
# Der Stammbaum der Ionisationstechniken in der LC-MS



Alle Ionisationen finden bei Atmosphärendruck statt.  
Bildung von: Protonierten/deprotonierten Molekülionen, Ion-Moleküladdukten, Molekülradikationen (sowie Fragmenten)



# Was wird für was verwendet?



## Generelle Auffassung:

- **ESI**
  - Moleküle mit protonierbaren/deprotonierbaren Gruppen
  - “Quasi-ionische” Strukturen
  
- **APCI**
  - Heteroatomhaltige (N, O etc.) Moleküle
  - “Semipolare” Strukturen
  
- **APPI**
  - Photoionisation bei z.B. 10,2 eV via Ionisationsvermittler (“dopant”)
  - Eher apolare (aromatische) Strukturen

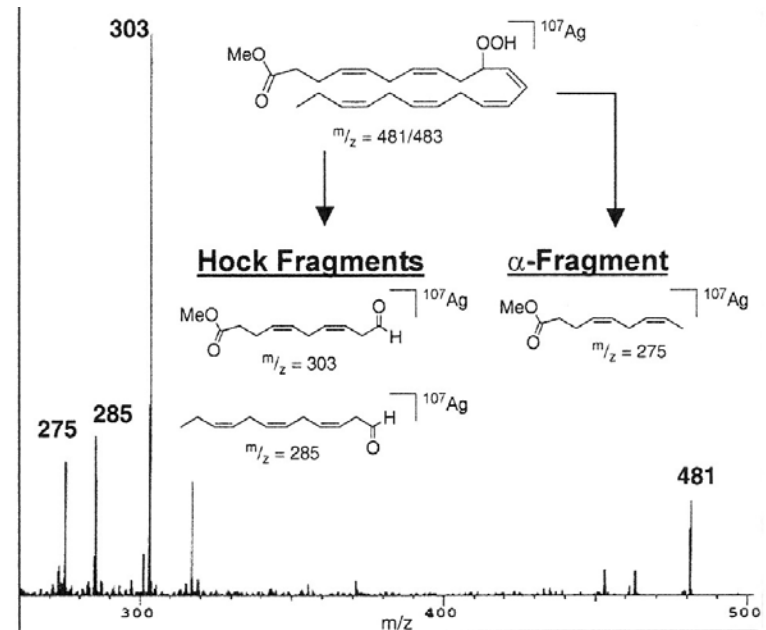
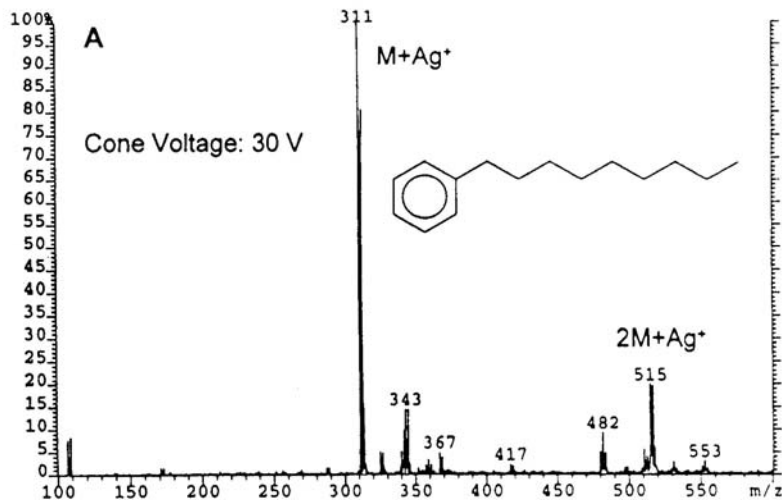
# Aber es gibt noch viel mehr Möglichkeiten:

## Koordinations-Ionenspray-Ionisation (CIS)

Zusatz von  $\text{AgNO}_3$  zu Eluat nach Trennung mit Spritzenpumpe

(z.B. 1,6 mg/ml, davon 10  $\mu\text{l/ml}$  Eluent)

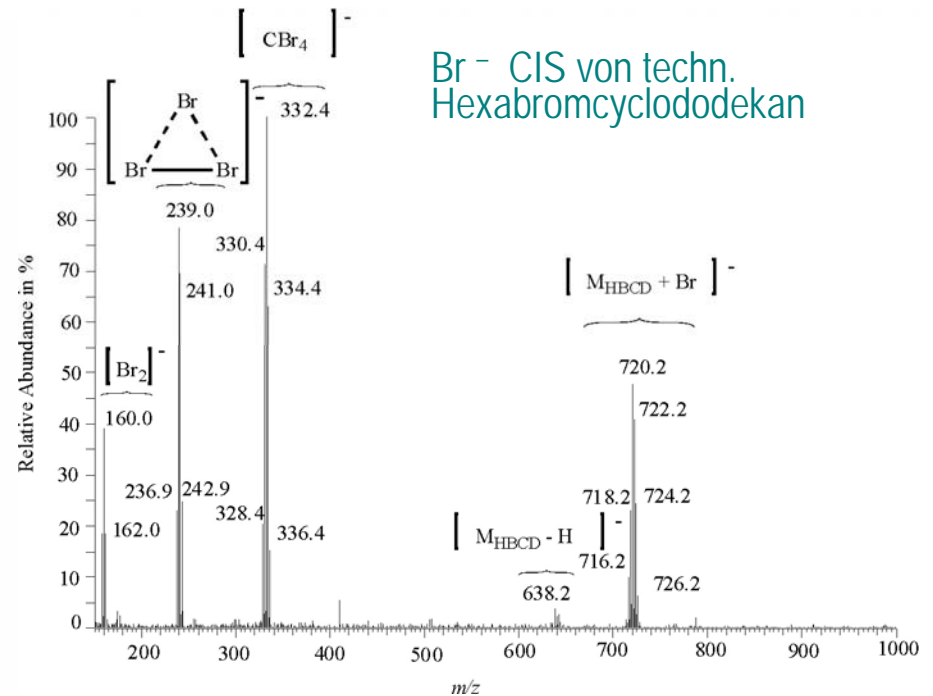
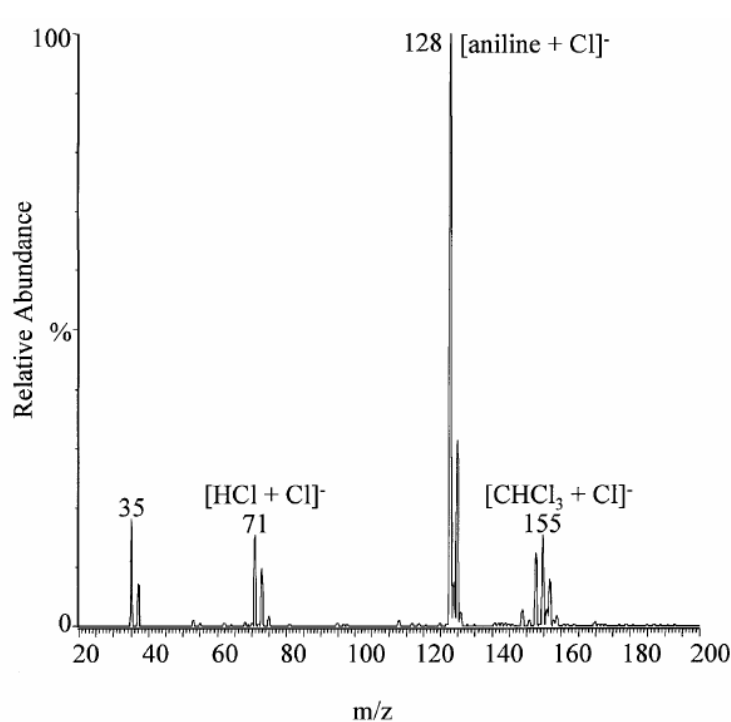
Erlaubt Detektion von eher apolaren (ungesättigten) Verbindungen wie polyzyklische Aromaten, Terpene, Ester



# Oder Cl<sup>-</sup> - Anlagerung CIS

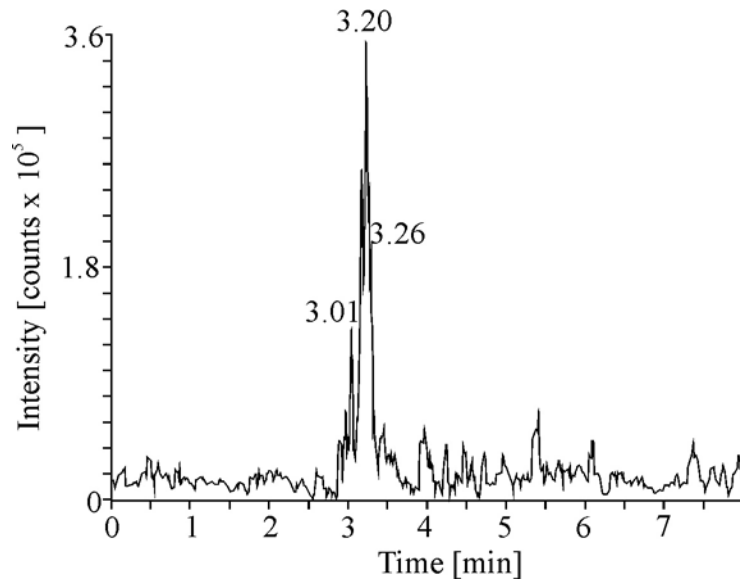
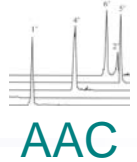
Verlangt Gemische von z.B. Methanol/Wasser 60+40 und Nachsäulenzusatz via T-Stück von ca. 10 % Chloroform

Erlaubt Ionisation durch [M+Cl]<sup>-</sup>-Addukte von Verbindungen, die keine oder nur schwer [M-H]<sup>-</sup> bilden (z.B. Chloraliphate, Aniline, Chlorphenole, Zucker)



Br - CIS von techn. Hexabromocyclododekan

# Screening von Hexabromcyclododekan in Fisch



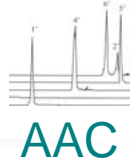
Signal entspricht 0,2 ng/g Fisch

40 g Einwaage, Extraktvolumen 100  $\mu$ l

Injektionsvolumen 25  $\mu$ l

Vergleichbare Empfindlichkeit und Präzision  
wie GC-MS

# Chemische Ionisation: Was läuft wirklich ab?



Ionisation durch Protonentransfer oder Deprotonierung durch Wechselwirkungen mit Ladungsträgern im gebildeten Plasma (Coronaentladung).

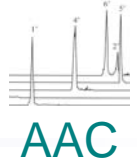
Verlangt, dass Protonenaffinität PA des Analyten M grösser ist als diejenige der mobilen Phase BH<sup>+</sup> (Bildung von Kationen):



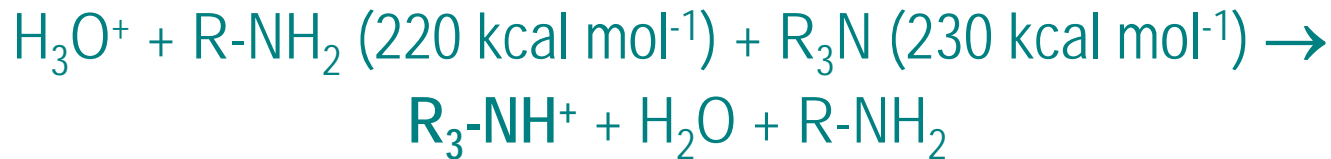
Oder: PA der Anionen aus dem Eluenten [B-H]<sup>-</sup> muss grösser sein als diejenige des Analyten M (Bildung von Anionen).

Aber: Nur wenn die Protonenaffinität des Analyten dominiert, findet eine Ionisation statt.

# Einige Ionisationsfallen in der APCI



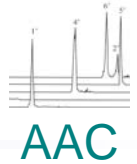
**Koelutionen:** APCI(+) bildet immer die schwächste Säure:



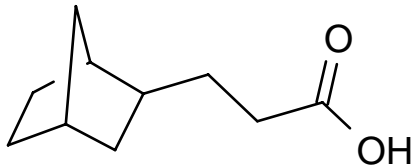
Konkurrenz zur Protonenaffinität des Puffers:

Beispiel: Nachweis organischer Säuren mit APCI(-) als [M-H]<sup>-</sup> verlangt einen Puffer, dessen Protonenaffinität grösser ist als diejenige der Säure.

# Ionisationsfallen APCI, Fortsetzung



Ionisation von Norbornanessigsäure mit APCI(-):



PA ca. 800 kJ/mol

Puffer: Formiat:

PA ca. 750 kJ/mol

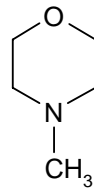
Rel. IA: 1

Ammoniumacetat :

PA ca. 800 kJ/mol

14

N-Methylmorpholin



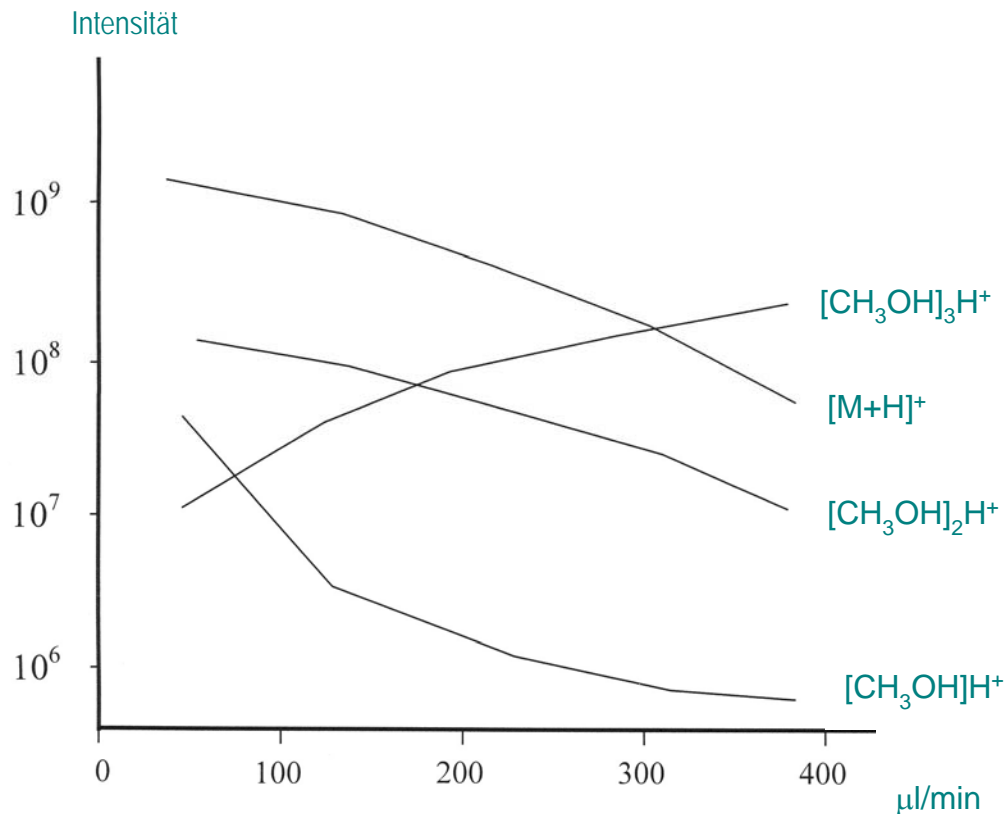
PA ca. 920 kJ/mol

100

PA: Protonenaffinität

IA: Ionisationsausbeute relativ zu Formiat

## Ionisationsunterdrückung durch Multimere hoher PA im Eluenten

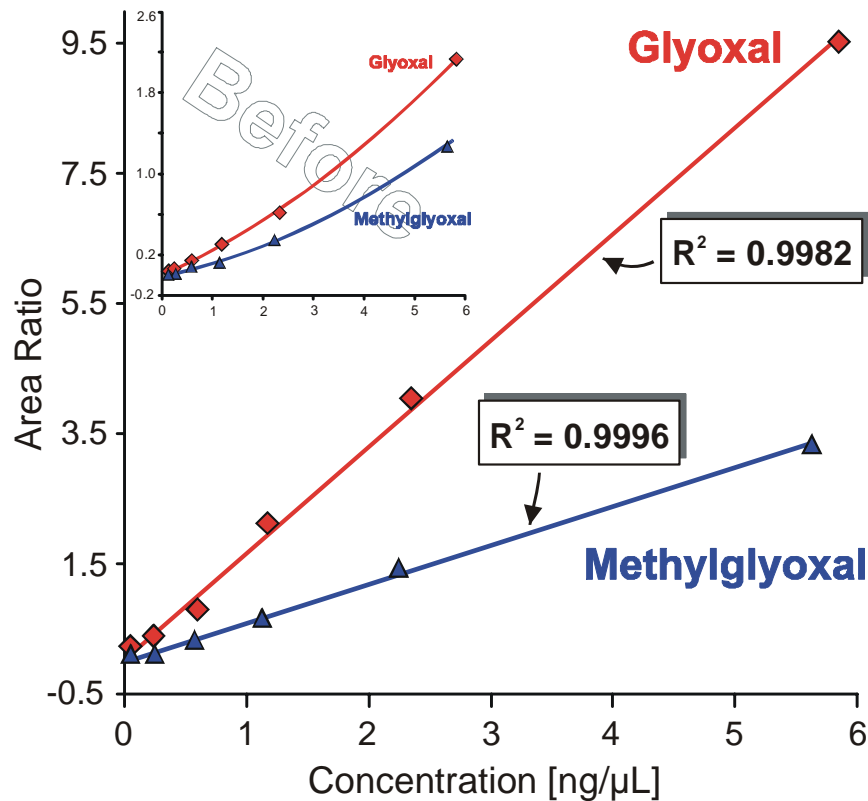


Methanol im Gradienten:

Flussabhängige Ausbeute des  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion einer Verbindung mit einer Protonenaffinität von 855 kJ/mol gegenüber  $[\text{CH}_3\text{OH}]\text{H}^+$  (755 kJ/mol),  $[\text{CH}_3\text{OH}]_2\text{H}^+$  (890 kJ/mol) und  $[\text{CH}_3\text{OH}]_3\text{H}^+$  (1025 kJ/mol).

# Ionisationsfallen APCI, Fortsetzung

Bei nicht optimaler Positionierung der Coronaentladung entsteht ein Störfeld, welches Nichtlinearitäten verursacht



Eine Verschiebung der Coronaentladungsnadel von ca. 1 mm aus dem Zentrum der Spraykapillare führt zu reproduzierbaren Nichtlinearitäten bei APCI(-) von 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Derivaten von Carbonylen.

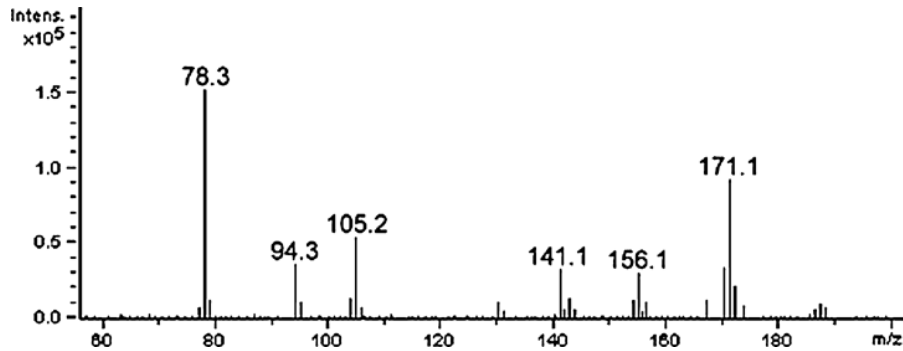
A: Verschobene Position  
B: korrekte Position.

## Ionisation durch Ladungsübertragung:

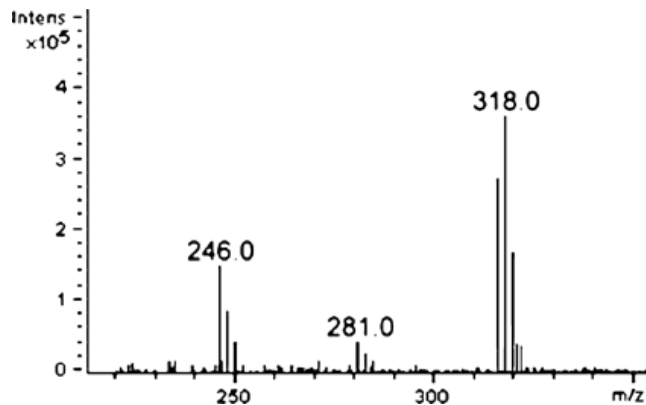
Benzol „post-column“ zum Eluenten zugeben (z.B. 0,1 ml/min bei Eluentfluss 0,3 ml/min).

- $C_6H_6^+$ . Radikalkation wird unter APCI-Bedingungen gebildet.
- Ist viel stabiler als  $C_6H_7^+$ , hat Ionisationsenergie von 9,2 eV
- Ladungsüberführung findet statt auf Moleküle mit höherer Ionisationsenergie: Beispiel Chlorpestizide

# Ladungsübertragungs-APCI von p,p'-DDE

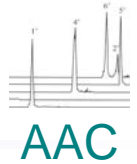


Oben:  
APCI(+)-Spektrum von  
Benzol



Unten:  
Ladungsübertragung-  
Spektrum von p,p'-DDE

# Nochmals eine Möglichkeit: Elektroneneinfang-APCI



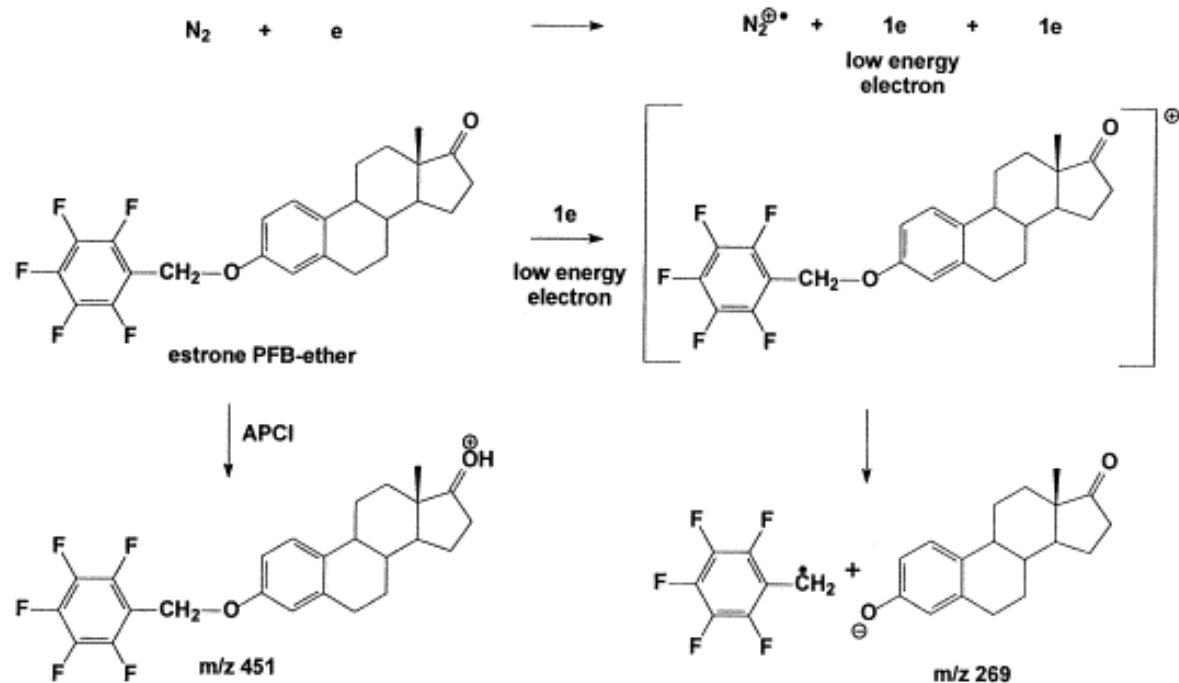
Bei der Coronaentladung werden neben  $N_2^{+\cdot}$ -Radikalkationen auch niedrig-energetische Elektronen gebildet, welche durch Elektroneneinfang aus Molekülen hoher Elektronegativität Radikalanionen bilden können.

Alternativ können durch dissoziativen Elektroneneinfang Fragmentanionen hoher Elektroneneaffinität entstehen.

- Erlaubt Isomeren zu unterscheiden
- Ermöglicht Selektivitätsgewinne und niedrigere Detektionsgrenzen durch geeignete Derivatisierung.

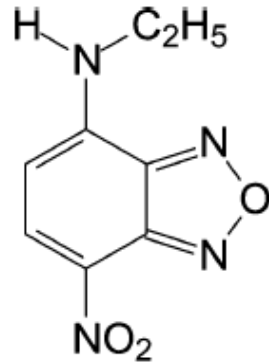
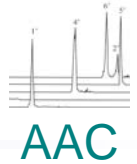
Übersichtsartikel: U. Karst, Anal. Bioanal. Chem. 382, 1744 (2005)

# Beispiel 1 Elektroneneinfang-APCI

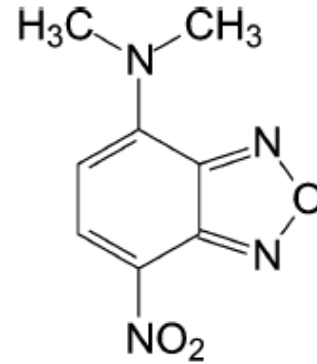


Durch Elektroneneinfang thermischer Elektronen gebildetes Anion nach Derivatisierung mit Perfluorbenzoylbromid. Die Empfindlichkeitssteigerung gegenüber APCI ist etwa 50-100-fach, Nachweisgrenze ist ca. 0,2 pg (G. Singh et al., Anal. Chem. 72, 3007 (2000)).

## Beispiel 2 Elektroneneinfang-APCI



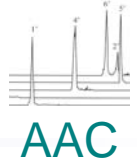
M = 208 g/mol  
m/z = 207 (APCI(-))



M = 208 g/mol  
m/z = 208 (APCI(-))

Unterscheidung zwischen N- und N,N-substituierten Aminen. Letzteres bildet das Radikalanion.

# Nochmals ein Exote: "No-discharge APCI



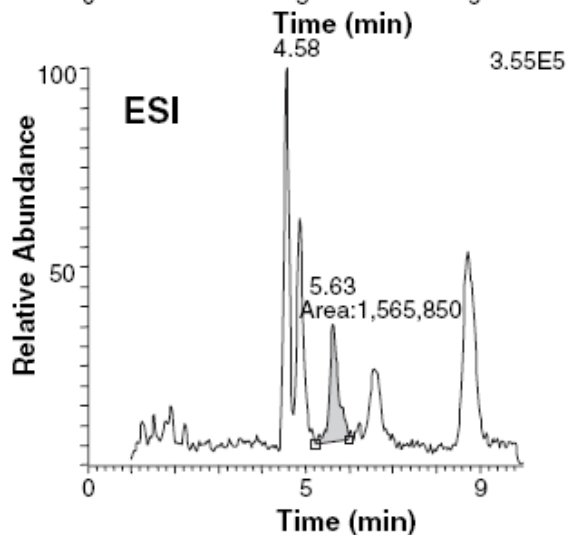
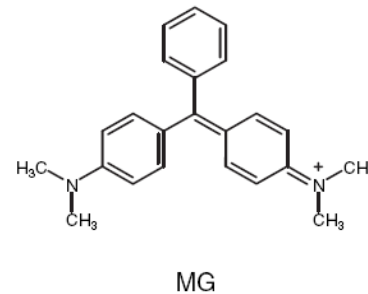
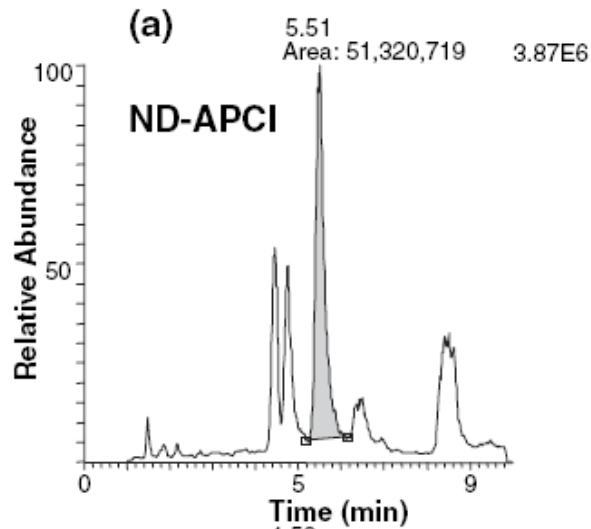
Zuerst in unserer Arbeitsgruppe 1997 bei der Charakterisierung von Cyclodextrinen entdeckt, aber nicht weiterverfolgt!

Coronaentladung bei der APCI-Quelle abgeschaltet ergibt bessere Empfindlichkeit für gewisse Strukturen wie Saccharide, Cyclodextrine, div. Ionophore etc..  
Normalerweise wird  $[M+H]^+$  oder  $M^+$  gebildet.

Bildungsmechanismus immer noch etwas unklar. Ähnliche Mechanismen wie bei ESI und/oder Dissoziation/Ionisation von Lösungsmittelmolekülen im Heizerbereich.  
Bessere Ionenbündelung durch fehlendes Störfeld der Coronaentladung.

Siehe auch S.B. Turnipseed et al., Rapid Commun Mass Spectrom. 20, 1231 (2005)

# Vergleich "No-discharge APCI mit ESI

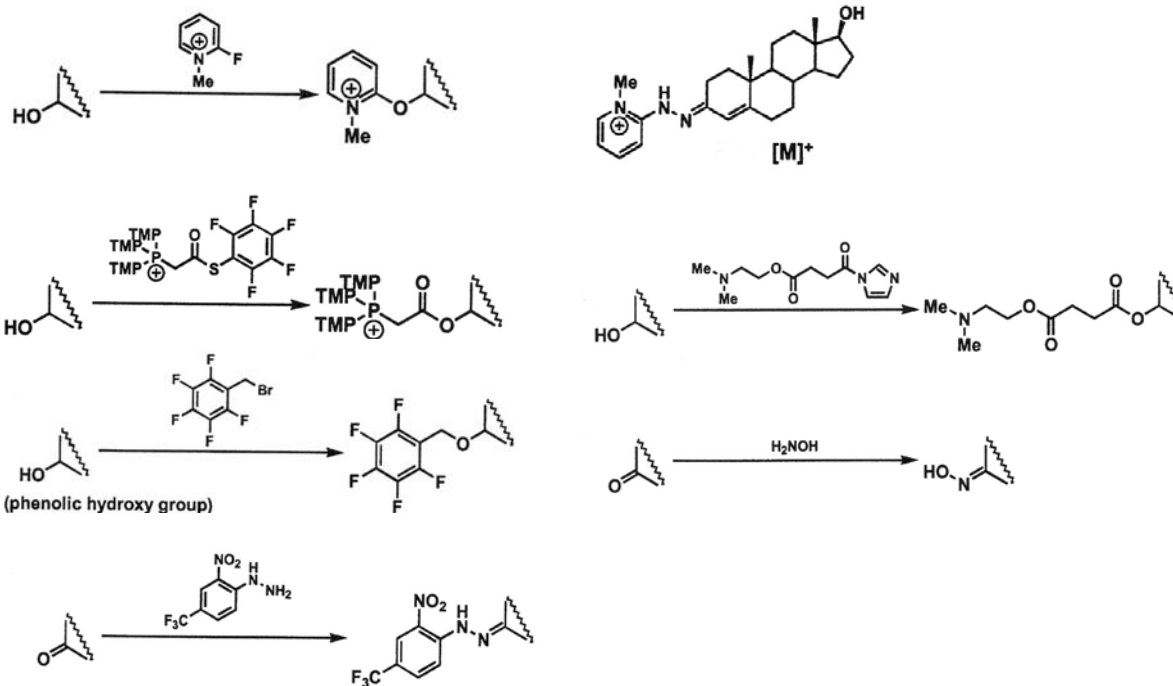


ND-APCI ergibt niedrigere Bestimmungsgrenzen für Leucomalachitgrün in Zuchtlachs, dass enzymatisch aus Malachitgrün (Fungizid etc.) gebildet wird.

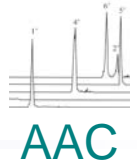
# Derivatisierung?

Wie beim Holzacker-Michel: Ja, sie lebt noch! Und hat ihre Berechtigung in der LC-MS

Beispiel: Erhöhung der Ionisationsausbeute von neutralen Steroiden durch Derivatisierung der OH- oder Ketogruppe zu ionischen oder leicht ionisierbaren Strukturen



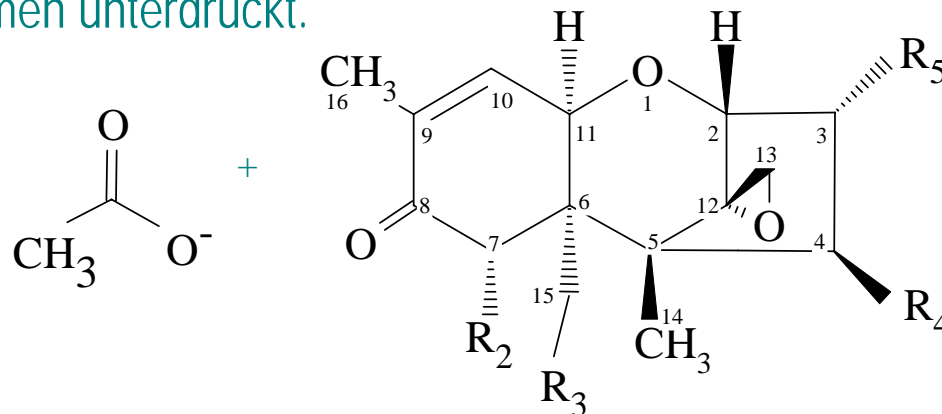
# Ion-Molekül-Addukte in der APCI, Teil 1



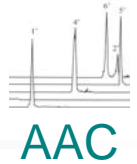
Unter APCI-Bedingungen können Moleküle mit gewissen Teilstrukturen Addukte mit Pufferionen bilden. Das kann zur Unterdrückung der Fragmentierung und zur erhöhten Selektivität für diese Teilstrukturen führen.

Beispiel APCI(-): Nur B-Trichothecene (Fusarientoxine in Getreide) bilden Acetataddukte, welche zudem die Nachweisgrenze absenken. Nur mit APCI(-) detektierbar. Alle anderen Toxine sind nicht sichtbar.

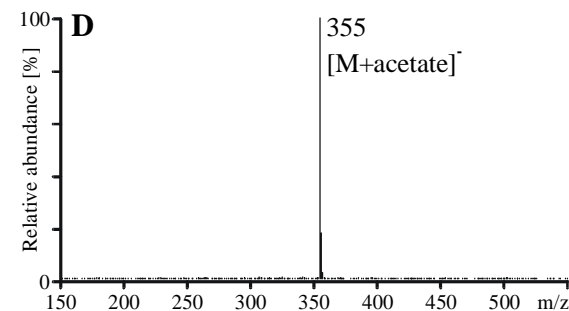
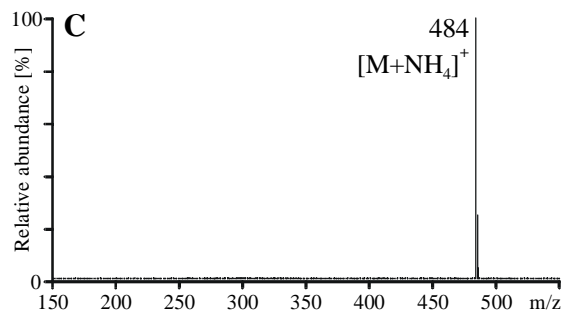
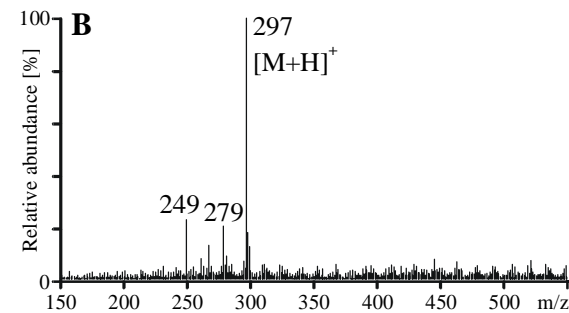
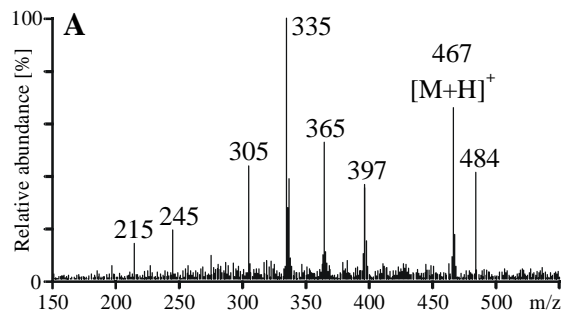
Beispiel APCI(+): Nur bei einer Acetylgruppe an C15 wird das Ammoniumaddukt als Basision nach Zusatz von Ammoniumacetat gebildet und die Fragmentierung im MS-Spektrum vollkommen unterdrückt.



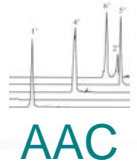
# Ion-Molekül-Addukte in der APCI, Teil 2



APCI-Massenspektren von 1 ng T2-Toxins (A) und 2 ng Deoxynivalenol (B) sowie nach Zusatz von Ammoniumacetat (C+D). Die Fragmentierung wird vollständig unterdrückt.



# Zusammenfassung APCI versus ESI



- Informationen zur Protonenaffinität von Analyten, Puffern, Elutionen sind sehr wichtig, um eine totale Ionisationsunterdrückung zu vermeiden.
- Die Bildung von Salzaddukten ist bei APCI wenig ausgeprägt. Veränderungen der Ionisationsausbeute und entsprechende Nichtlinearitäten sind nicht häufig.
- APCI(+) ist meist die robustere und linearere Messtechnik bei erhöhten Matrixgehalten.
- Gezielte Ionenaddukt-Bildungen können bei APCI das Spektrum der detektierbaren Verbindungen erweitern und Selektivitätsgewinne geben.
- APCI(-) reagiert wesentlich empfindlicher auf Variationen im chemischen Untergrund (z.B. Säulenbluten) als APCI(+).