

Funktionsweise von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

Die Kopplung von Massenspektrometrie mit der Flüssigchromatographie (LC-MS) ist eine relativ junge Entwicklung. In Verbindung mit der Gaschromatographie (GC-MS) hat diese Analytik eine wesentlich längere Tradition. Um eine Substanz analysieren zu können, muss diese sowohl für die Gaschromatographie als auch für die Massenspektrometrie zumindest so flüchtig sein, dass man sie in die Gasphase bringen kann, ohne sie dabei zu zerstören. In der Fettanalytik geht man hier einen Umweg, in dem man die Fette derivatisiert und dann die einzelnen Fettsäuren untersucht.

Will man noch größere Moleküle wie Arzneistoffe oder Proteine trennen und untersuchen, wird die Flüssigchromatographie unbedingt benötigt. Daher musste ein Weg gefunden werden, wie sich die Massenspektrometrie mit der Flüssigchromatographie am besten verbinden lässt.

Im folgenden wird der Aufbau einer neuen Technologie beschrieben. Um dabei den Überblick nicht gleich zu verlieren, werden die einzelnen Geräte für sich erklärt:

1. Allgemeines zur Flüssigkeitschromatographie (LC)
2. Trennleistung und Steigerung der Trennleistung der Flüssigkeitschromatographie
3. Besonderheiten der Nano-Flüssigkeitschromatographie (Nano-LC)
4. Techniken der LC-MS-Kopplung
5. Allgemeines zur Massenspektrometrie
6. Verwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung
7. Variationen und Variationsmöglichkeiten der Massenspektrometrie

1. Allgemeines zur Flüssigkeitschromatographie (LC)

Die Verwendung von zwei Begriffen, der Flüssigkeitschromatographie (LC) auf der einen bzw. der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf der anderen Seite, hängt mit der Entwicklung dieser Trennungsvorgänge zusammen. Da die Trennung heute fast ausschließlich unter Hochdruck betrieben werden, wird meist der kürzere Begriff gewählt. Man spricht daher nur von LC-MS oder Nano-LC statt von HPLC-MS oder Nano-HPLC.

Der große Vorteil der Flüssigkeitschromatographie gegenüber der Gaschromatographie ist, dass es für Analytik nur eine Bedingung gibt, nämlich die Löslichkeit des zu untersuchenden Stoffes in der flüssigen Phase. In der Flüssigkeitschromatographie werden Stoffe in dieser Phase aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität getrennt. Für alle Messungen wurde eine RP-18-Säule verwendet. In dieser Säule befindet sich ein festgepresstes Pulver, bestehend aus 3 µm kleinen Körnern. Durch

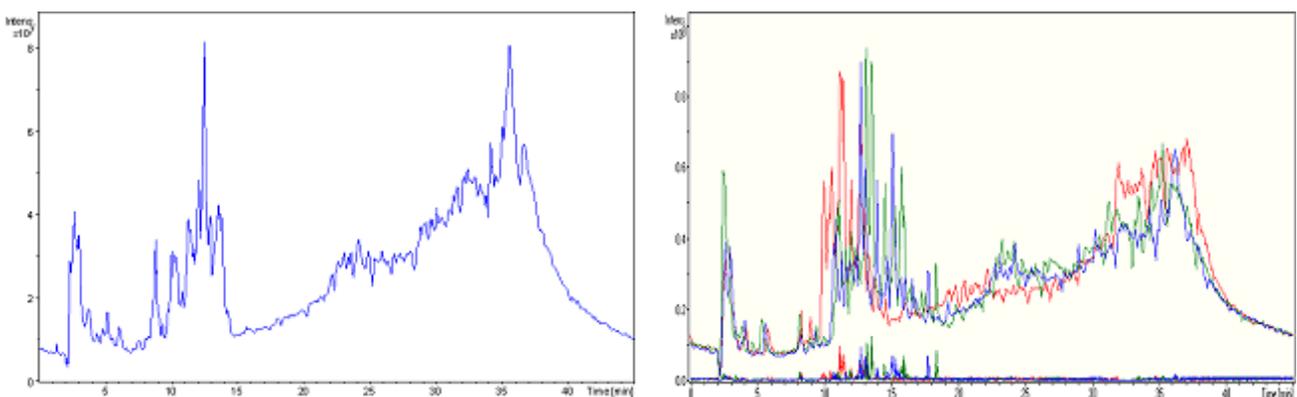
deren Lücken wird die Flüssigkeit gepumpt. Polare Moleküle werden in einer unpolaren Säule am wenigsten gebunden und verlassen die Säule zuerst, unpolare zuletzt. Dadurch findet die Trennung statt. Während der Trennung wird häufig, wie auch bei diesen Untersuchungen, ein Gradient gefahren, d.h. die Zusammensetzung der Fließmittel wird verändert. Dadurch kann die Laufzeit verkürzt und/oder die Trennleistung gesteigert werden.

2. Trennleistung und Steigerung der Trennleistung der Flüssigkeitschromatographie

Die bei der Flüssigkeitschromatographie detektierten Substanzen erscheinen in Form von Peaks im Chromatogramm. Sieht man die Peaks einzeln, war die Trennung gut, bei verschwommenen Peaks war die Trennung schlecht. Prinzipiell ist der Analytiker an einer guten Trennung interessiert – eine Übertreibung verlängert hingegen nur die Messung ohne dass sich die Ergebnisse verbessern.

Die Trennleistung hängt von verschiedenen Faktoren ab: Länge und Innendurchmesser der Säule; Probensubstanz und Probengröße; Mobile und stationäre Phase sowie von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase⁴. Durch die Veränderung einzelner Parameter kann die Trennleistung verbessert werden. Allerdings hatten diese bei den Chromatogrammen der Proteinverdauung deutlich geringere Auswirkungen als bei anderen Analysen mittels LC.

Vergleicht man die Chromatogramme von Proteinverdauung, wie in den folgenden Bildern, mit anderen Chromatogrammen, z.B. mit jenen von Pestiziden, so wirken letztere sauberer getrennt. Der Grund hierfür ist relativ einfach: die Proteinmatrices sind deutlich komplexer.

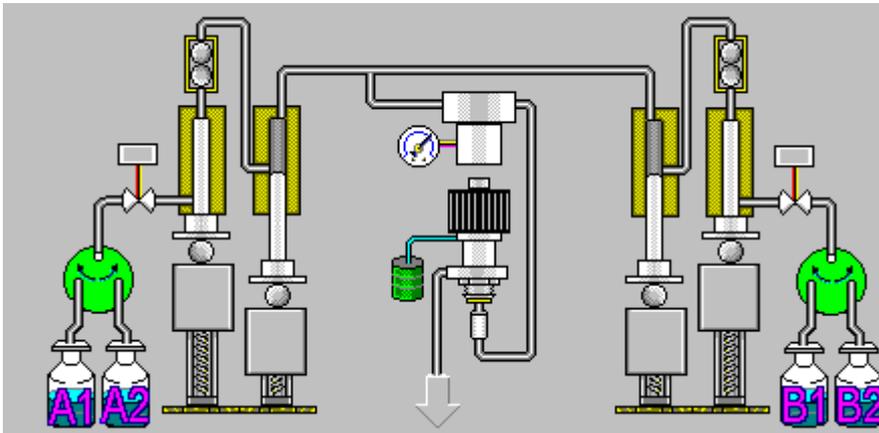


Links ein einfaches Chromatogramm. Zu erkennen sind vorhandene Substanzen (Peaks) und ein allgemeiner Anstieg sowie ein späterer Abfall der Kurve. Diese entsteht durch den Gradienten (Änderung Fließmittelzusammensetzung).

Rechts drei übereinandergelegte Chromatogramme, bei denen jeweils die Fließmittelzusammensetzung geändert wurde. Dabei ist das Chromatogramm mit dem bisherigen Gradienten blau, das dem steileren Gradienten rot und jenes mit dem flacheren Gradienten grün eingezeichnet. Ergebnis: die Gradientenänderung brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die verbesserte Trennung der Peaks konnte ebenso wenig erreicht werden wie die Verkürzung der Laufzeit.

3. Nano-Flüssigkeitschromatographie (Nano-LC)

Für die Nano-LC werden etwas geringere Flüssigkeitsmengen als für die LC benötigt. Das Prinzip der Trennung in flüssiger Phase ist das selbe wie das der LC. Die Nano-LC kann genau wie die LC



mit der MS oder mit anderen Messinstrumenten verbunden werden. Der einzige weitere Unterschied zwischen Nano-LC und LC besteht sonst nur im apparativen Aufbau. Für sie müssen spezielle Pumpen verwendet werden.

Aufbau der Pumpeinrichtung in der Flüssigkeitschromatographie. Dadurch können verschiedene Flüssigkeiten fast beliebig gemischt werden und die Zusammensetzung (der Gradient) kann während der Analyse verändert werden.

4. Techniken der LC-MS-Kopplung

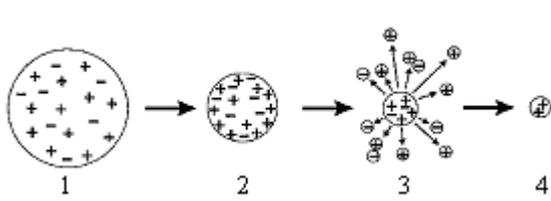
Die HPLC kann wie die GC mit zahlreichen anderen analytischen Methoden kombiniert werden. Chromatographie und Spektroskopie sind orthogonale Techniken, das heißt, man erhält mit ihnen sehr verschiedenartige Informationen. Chromatographie ist eine Trennmethode, Spektroskopie ist eine Technik, welche einen „Fingerabdruck“ von Molekülen liefert ⁴.

In der Bio-Massenspektrometrie lag das Hauptproblem darin, die biochemisch und biologisch wichtigen Makromoleküle – sie liegen im biologischen System typischerweise in wässrigen Salzlösungen vor – unzerstört ins Vakuum des Massenspektrometers zu überführen. Die MALDI- und ESI-Techniken sind die einzigen für Biomoleküle verträglichen Ionisierungsformen.

4.1 Elektrospray-Ionisation

Bei der so genannten Elektrospray-Ionisation (ESI) werden Lösungen der zu untersuchenden Substanzen durch elektrische Kräfte in ein extrem feines Aerosol aus hochgeladenen Tröpfchen überführt. Danach wird das Lösungsmittel auf dem Weg ins Vakuum des Massenspektrometers sukzessive verdampft, bis schließlich freie, elektrisch geladene Molekülonen entstehen. Diese können dann getrennt und nachgewiesen werden ³.

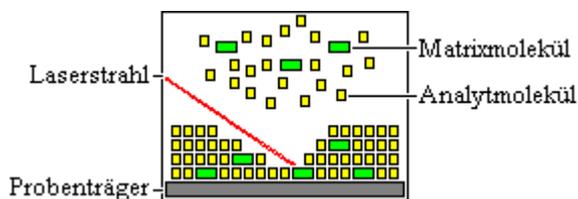
Skizzierung einer Elektrospray-Ionisation



1. Tropfen mit Protein und Ionen, eine Ionenart überwiegt.
2. Lösungsmittel verdampft im Vakuum, Ionen bewegen sich an die Oberfläche, die elektrische Feldstärke nimmt zu.
3. Ab einer kritischen Feldstärke zerplatzt der Tropfen, Ionen werden emittiert.
4. Geladenes Protein gelangt ohne Lösungsmittel ins Massenspektrometer.

4.2 Ionisation mittels MALDI-Technik

Einen ganz anderen Weg verfolgt die MALDI-Technik. Mit diesem sperrigen wissenschaftlichen Begriff wird eine Technik beschrieben, welche die massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen und anderen Biopolymeren zu einer Routineanwendung gemacht hat³. Bei der MALDI-Methode wird eine kleine Menge an Probe oder Analyten mit einer verhältnismäßig großen Menge



an Matrixmolekülen in saurer Lösung vermischt. Es wird ein 10^3 - 10^4 -facher Überschuss an Matrix empfohlen. Dieser Überschuss wird für den Schutz der Analytmoleküle benötigt. Sonst würde der Laser

direkt auf die Analyten wirken und sie zerstören. Als Matrix werden Verbindungen verwendet, die die Eigenschaft haben Lichtenergie zu absorbieren. Für Proteine und Messungen im Zentralen Institut wird α -Cyano-4-Hydroxizimtsäure verwendet. Für die Messung wird ein Teil der Lösung auf einen Metallträger pipettiert. Nach Verflüchtigung des Lösungsmittels kristallisiert die Matrix mit den Analytmolekülen aus. Wird solch ein Kristall mit einem gepulsten Laser bestrahlt, nehmen die Matrixmoleküle die Energie des Lasers auf. Diese Energie oder ein Teil davon wird an die Analyten weitergegeben. Dieser Energietransfer bewirkt die Desorption und gleichzeitig die Ionisation der Analytmoleküle. Es entstehen immer nur einfach protonierte Ionen².

5. Komponenten der Massenspektrometrie

Die Stärke der Massenspektrometrie liegt in der Direktheit und in der Einfachheit der gewonnenen Information. Daher ist sie als Analyseverfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung von chemischen Verbindungen von großer Bedeutung³. Alle Massenspektrometer bestehen aus den drei



Komponenten: Ionenerzeugung, Ionentrennung sowie Ionennachweis. Der Hinweis auf *Ion* ist wichtig: nur geladene Teilchen können untersucht werden. Geladene Teilchen werden im elektrischen Feld gleich beschleunigt.

6. Variationsmöglichkeiten der Massenspektrometrie

Massenspektrometer bestehen wie wir gerade gesehen haben aus drei Komponenten. Diese lassen sich prinzipiell beliebig variieren. Jedoch sind einige ältere, andere neuere Entwicklungen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden nur ESI, Ion Trap sowie SEV verwendet.



Ionenerzeugung

Ionenquelle

- Elektronenstoß-Ionisation (EI)
- Chemische Ionisation (CI)
- Fast-Atom-Bombardment (FAB)
- Elektrospray-Ionisation (ESI)
- Matrixunterstützte Laserdesorption/ Ionisation (MALDI)

Ionentrennung

Massenanalysator

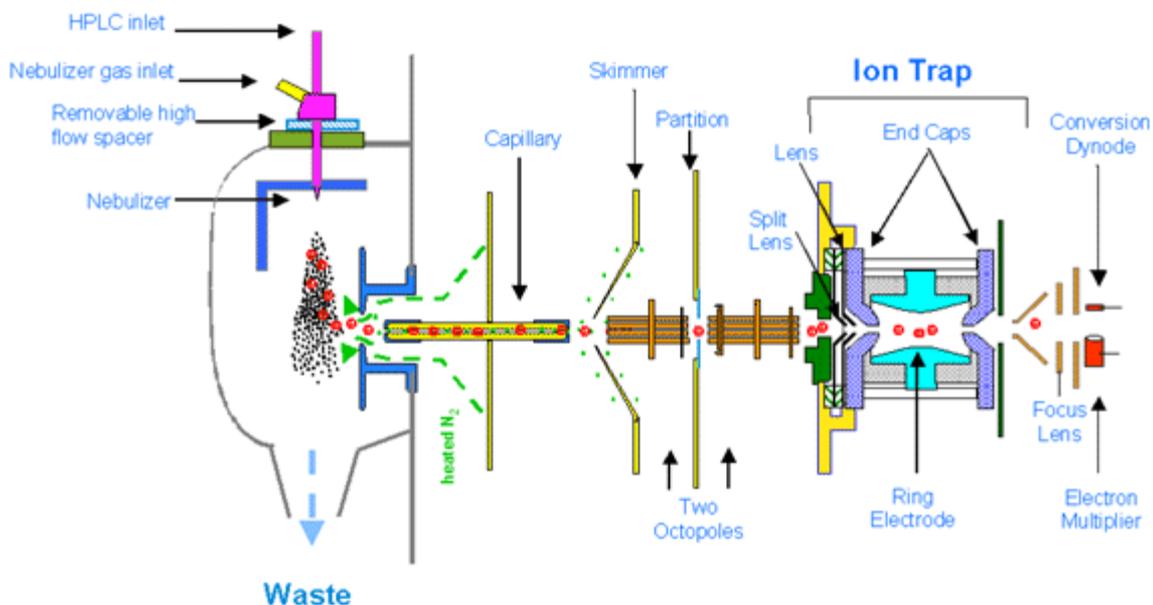
- Quadrupol
- Magnetisches Sektorfeld
- Elektrisches Sektorfeld
- Flugzeitanalysator (TOF)
- Elektrische Ionenfalle (Ion Trap)
- Elektromagnetische Ionenfalle (Ionencyclotron)

Ionennachweis

Detektor

- Konversionsdynode mit Sekundärionenvervielfacher (SEV)
- Szintillationszähler
- Vielkanalplatte (multichannel plate)
- Faraday-Cup

Die Ion-Trap soll hier noch besonders erwähnt werden: in dieser werden die Ionen „gefangen gehalten.“ Dank neuerer Entwicklungen können auch Massenspektren von Massenspektren gemacht werden oder nur nach bestimmten Massen gesucht werden. Dadurch können Messungen verbessert werden.



7. Verwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung

Zum Abschluss dieses Kapitels noch ein paar Worte zur Verwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung. Häufig werden Substanzen parallel zur Messung von Massenspektren mittels Kernresonanzspektrometrie (NMR) untersucht ⁵, vor allem mittels ¹³C-NMR.

Das Interesse richtet sich vor allem auf die Molekülmasse der untersuchten Substanz. Ist diese ungerade, so ist auch die Anzahl der Stickstoffatome im Molekül ungeradzahlig (Stickstoffregel). Hilfreich ist es, wenn man typische Bruchstücke findet: die Masse 77 stammt beispielsweise von einem Phenylrest. Häufig ergeben sich dann mehrere mögliche Isomere einer Substanz – mittels NMR-Messung kann die eindeutige Form bestimmt werden. Durch seine Arbeit zu Beginn der 1980er Jahre hat Kurt Wüthrich die Anwendung von NMR auf Proteine ermöglicht ⁶.

Anmerkungen, Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Dieser Text stellt das zweite Kapitel einer Diplomarbeit. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde bestimmte ein bestimmtes Protein untersucht. Dabei werden nicht nach Methyl- oder Phenylreste gesucht, sondern nach Aminosäuren bzw. Aminosäuresequenzen.

2. Alle Bilder und Tabellen stammen soweit nicht anders angegeben von den Handbüchern des LC/MS-Systems von Agilent. Dabei wurde vor allem folgendes Handbuch als Quelle genutzt:

Agilent 1100 Series LC/MSD-Trap-System Concepts Guide

Agilent 2004

3. Verwendete Literatur

2 **Aksu S.** Identifizierung und Charakterisierung von Brustdrüsengewebeproteinen der Maus und Etablierung einer neuen Kalibrierungsmethode für zweidimensionale Gele.

Doktorarbeit, Berlin 2003

http://edocs.tu-berlin.de/diss/2003/aksu_sevil.pdf

3 Brutschy B., Karas M. Der mikroskopische Blick auf die Moleküle des Lebens erschienen in „Forschung Frankfurt“ 1/2004

http://www.muk.uni-frankfurt.de/Publikationen/FFFM/dok/forschungffm0401_1.pdf

4 Meyer V.R. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographieur

Aktualisierte, 9. Auflage

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim 2004

5 Vollhardt, K.P.C., Schore N.E. Organische Chemie, Deutsche Übersetzung

Dritte Auflage

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim 2000

6 Pressemitteilung: Der Nobelpreis in Chemie 2002

<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2002/press-ge.html>