



massaspectrometrie als detectie-techniek in HPLC; een seminar

Rick Langen,
Laboratorium ziekenhuisapothek
Midden-Brabant
TweeSteden ziekenhuis, vestiging
Tilburg
Dr. Deelenlaan 5
5042 AD Tilburg.

Op 9 september 1997 organiseerde de firma Waters Chromatography B.V. een seminar met als onderwerp massaspectrometrie (MS) in HPLC. Doel van het seminar was een inleiding te geven in de verschillende technieken die gebruikt worden bij massadetectie in vloeistofchromatografie. De nadruk werd gelegd op de verschillende ionisatietechnieken, interfaces tussen LC en MS, de chromatografie en monstervoorbewerking.

De rol van massadetectoren in de vloeistofchromatografie

De rol van een detector is in de loop van de tijd veranderd. Waar een detector in eerste instantie niet meer hoefde te doen dan het 'zien' van een monstercomponent na de chromatografische scheiding worden nu in toenemende mate eisen gesteld aan gevoeligheid, specificiteit en confirmatie. Voorbeelden van de laatste soort detectoren zijn de Diode Array Detector (DAD), FT-IR en MS. Belangrijkste pluspunt van deze detectoren is de mogelijkheid tot positieve monster identificatie. Een MS detector geeft niet alleen aan dat een monstercomponent voorbij stroomt maar geeft ook aan welke component dit is. Een MS systeem is opgebouwd uit de volgende onderdelen: een monster introductie systeem, een interface, het massafilter en een multiplier. Het monster introductie systeem kan een LC, GC, CE, FIA of zelfs monsterprobe zijn. Met een monsterprobe wordt het monster direct in de MS gebracht.

Het interface heeft twee functies. Eerst moet het eluens verwijderd worden door middel van een hoog vacuüm. Ten tweede vindt in het interface de ionisatie van de monstercomponenten plaats. In het massafilter worden de verschillende brokstukken van een monstercomponent gescheiden op lading/massa ratio.

Ionisatie modes

Niet elke component zal een zelfde massaspectrum geven. Het massaspectrum is onder andere afhankelijk van de gebruikte ionisatie mode. Er wordt een onderscheid gemaakt in een 'harde' en 'zachte' ionisatie mode. Bij harde ionisatie worden de monstercomponenten gebombardeerd met elektronen. Men noemt dit Electron Impact ionisatie (EI). Bij zachte ionisatie worden de monstercomponenten blootgesteld aan primaire ionen. Deze ionisatie mode wordt Chemical Ionization mode genoemd (CI). Het belangrijkste verschil in massaspectrum is de hoeveelheid ion fragmenten die ontstaan. Bij EI zal de monstercomponent in een groot aantal brokstukken uiteenvallen. Het resulterend massaspectrum is karakteristiek voor deze component en bevat veel structuur informatie. Het complete molecule-ion (moederion) zal echter niet te zien zijn, zodat geen informatie wordt verkregen over de moleculemassa. Bij CI wordt een massaspectrum verkregen waarbij zeer weinig brokstukken te zien zijn. Deze ionisatietechniek geeft dus weinig structuur informatie maar wel is de moleculemassa eenvoudig te bepalen uit het massaspectrum.

Het interface

Er wordt een onderscheid gemaakt in de verschillende interfaces naar de manier waarop het monster

wordt geïntroduceerd in de MS en de ionisatie mode. Voordat het monster in de MS geïntroduceerd wordt, zal eerst een aerosol van het eluens gevormd moeten worden. Kleine uniforme eluensdruppels worden gevormd van waaruit de monstercomponenten gedesorbeerd of geïoniseerd kunnen worden. Hiertoe wordt de eluensstroom verstoord door een hoeveelheid energie die voldoende groot is om de oppervlaktespanning van het eluens te overwinnen. Deze energie wordt geleverd in de vorm van warmte, druk of een potentiaal verschil. Enkele interface technieken zijn: Particle Beam/Electron Impact (PB/EI), Electrospray (ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), Thermospray (TSP), Fast Atom Bombardment (FAB) en Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI). De belangrijkste technieken zijn PB/EI, APCI en ESI.

PB/EI

Het eluens (flow 0,6-2 mL/min, afhankelijk van de vluchtigheid) wordt bij atmosferische druk verstoord in een verwarmde desolvatie kamer. Na beschieting met elektronen ontstaan positief geladen ionbrokstukken. Deze worden door een eveneens positief geladen repeller de MS ingedrukt. Het resultaat zal een 'klassiek' massaspectrum zijn. Dit massaspectrum is geschikt voor structuuropheldering en, gekoppeld aan een commercieel verkrijgbare bibliotheek, geschikt voor positieve monsteridentificatie. Nadeel van deze techniek is de afwezigheid van het Mw ion voor de bepaling van het moleculegewicht en de wat mindere gevoeligheid.

APCI

APCI maakt gebruik van thermische,



pneumatische verstuiving om aerosols te vormen. Een elektrode ioniseert bij atmosferische druk de kleine eluensdruppels (flow tot 2 mL/min.), die op hun beurt weer de monstercomponenten ioniseren. Onder invloed van het vacuüm dat in de MS heerst worden deze ionen naar de MS getransporteerd. Deze techniek is geschikt voor moleculegewichtsbepalingen. Het moederion is in de vorm van moleculemassa $(Mw+H)^+$ ion aanwezig. Omdat dit een zachte ionisatietechniek is zal verdere structuurheldering niet mogelijk zijn. Andere nadelen zijn het gevaar voor thermische degradatie en de vereiste gevoeligheid van de monstercomponenten voor protonisatie.

ESI

De eluensstroom van maximaal 50 μ L/min wordt met behulp van een hoog voltage en pneumatische druk verstoven. Ionisatie vindt plaats bij atmosferische druk in de vloeistof-fase. Na desolvatatie worden ion-solvent molecule clusters verplaatst naar de MS door het daar heersend vacuüm. Tijdens deze verplaatsing vinden botsingen plaats waarbij de monstercomponenten geïoniseerd worden. Voordeel van deze techniek is de mogelijkheid van moleculegewichtsbepalingen door het ontstaan van het $(Mw+H)^+$ ion of $(Mw+H)^-$ ion. Ook is deze techniek geschikt voor vluchtige en niet vluchtige componenten. ESI wordt beschouwd als de gevoeligste LC/MS techniek. Nadelen zijn de lage flowsnelheid van het eluens en de beperkte structuurinformatie.

Up-Front Collision Induced Dissociation (CID)

Nadeel van APCI en ESI – zachte ionisatie technieken – is de beperkte structuurinformatie. Een molecule-massa alleen is onvoldoende voor positieve monsteridentificatie van onbekenden. Up-front CID – toegepast na een APCI of ESI interface – levert meer structuurinformatie (extra brokstukken) maar de piek van het moederion blijft zichtbaar in

het massaspectrum. Een potentiaal verschil tussen de inlaat en de skimmer – inlaat van het eigenlijke massafilter – zorgt ervoor dat de ionen versnellen. In het matige vacuüm – eventueel aangevuld met een make-up gas – dat in deze tussenruimte heerst zullen de $(Mw+H)^+$ ionen met de lucht of gas moleculen botsen waardoor de $(Mw+H)^+$ ionen verder zullen fragmenteren.

EI, APCI of ESI?

De vraag welke techniek het meest geschikt is, is afhankelijk van wat men met massadetectie wil bereiken. Bestaat het monster uit onbekende componenten en wil men deze identificeren of confirmeren met behulp van bibliotheek zoekfuncties dan is EI de aangewezen techniek. APCI en ESI zijn geschikte technieken voor analyse van bekende monstercomponenten met betrekking tot confirmatie, kwantificering en moleculegewichtsbepalingen.

Massa detectoren

De verkregen ionen ondergaan de massa-analyse in het massafilter. Meest gebruikt type filter is de quadrupole massa-analyser. Andere typen massa-analysers zijn; Ion-Trap (IT), Time Of Flight (TOF) en Sector (of High Resolution) analysers. De analysers kunnen een bepaald massabereik scannen (scan mode) of alleen geselecteerde massa's scannen (Selected Ion Mode SIM). In de selected ion mode kan een tot 10 maal zo hoge gevoeligheid bereikt worden in vergelijking met de scan mode.

In het geval van tandem massaspectrometrie (MS/MS) worden meerdere massa-analyses uitgevoerd door gekoppelde analysers (tandem in ruimte) of tandem in tijd in het geval van een IT analyser. Het resultaat zal een massaspectrum van een massaspectrum zijn. Bij tandem in ruimte analyses worden precursor ionen en produkt ionen in fysiek verschillende ruimtes geanalyseerd. De ionen worden van massa-analyser naar massa-analyser

getransporteerd. Hiertoe kunnen bijvoorbeeld drie quadrupoles gekoppeld worden. In de eerste quadrupole kan in SIM een verder te analyseren ion gekozen worden, in de tweede zal fragmentatie, door middel van bijvoorbeeld CID plaats vinden en in de laatste quadrupole kan weer een ionmassa gekozen worden voor analyse (SIM) of er kan een full scan worden opgenomen. Er zijn vier typen experimenten mogelijk:

- **Dochterion analyse:** Een ouderion wordt in het eerste massafilter geselecteerd; van CID fragmenten wordt een full spectrum scan opgenomen.
- **Ouderion analyse:** Een dochterion massa wordt ingesteld in het laatste massafilter. Het massafilter hiervoor is ingesteld in scanmode. Alleen ionen van fragmenten met de ingestelde massa zullen een signaal geven, anderen niet. Op deze manier kunnen ouderionen of fragmentatie patronen eenvoudig bepaald worden.
- **Constant neutral loss analyse:** Hierbij wordt een constant massaverschil tussen de massafilters ingesteld en gescand. Deze techniek kan gebruikt worden om specifieke drugfragmenten te analyseren.
- **Selected reaction monitoring analyse:** Deze techniek is het MS/MS equivalent van SIM. Alleen die ionen die volgens een specifieke manier fragmenteren worden gescand. Het precursor en production moeten allebei aan de ingestelde massa-eisen voldoen. Door deze manier van analyseren worden selectiviteit en gevoeligheid op dezelfde manier verbeterd zoals bij SIM in één enkel massafilter het geval is.

In het geval van IT analyse kan een geselecteerd ion gevangen worden in de iontrap om hierna nogmaals gefragmenteerd te worden. Het is mogelijk dit een aantal keer te herhalen (MS^n).

Samengevat voor de verschillende massadetectoren;

- Single Quadrupole EI:

- Reproduceerbaar, specifiek massaspectrum.
- Identificatie of classificatie mogelijk door beschikbare bibliotheken.
- Analyse van specifieke ionen mogelijk.
- Single Quadrupole ESI/APCI:
 - Moleculegewichtsbevestigingen.
 - Met CID toegenomen specificiteit en structuurinformatie.
- MS/MS:
 - Structuurinformatie van substructuren.
 - 'On-line' monster zuivering.

HPLC overwegen met betrekking tot eluens en kolommen voor een succesvolle LC/MS analyse

Een HPLC eluens kan niet zomaar een MS ingeleid worden. Door verstandige keuzen te maken voordat de chromatografische methode wordt opgezet kunnen een hoop problemen voorkomen worden.

Eluens

Bij de ontwikkeling van het eluens zijn de volgende parameters van belang: organische modifier, buffer type, buffer concentratie, pH en flow. Voor MS detectie worden – anders dan bij UV detectie – geen eisen gesteld aan de organische modifier. Bij MS detectie is het van belang dat gebruik wordt gemaakt van een vluchtige buffer. Fosfaatbuffers in het pH bereik van 1,1-3,1 kunnen vervangen worden door TFA, mierzuur, azijnzuur, ammoniumformaat (2,8-4,8) en ammoniumacetaat (3,8-5,8) buffers. Fosfaatbuffers in het pH bereik van 6,2-8,2 kunnen vervangen worden door ammoniumbicarbonaat (7-8). Voor ionpaarvorming van basische componenten kan gebruik worden gemaakt van TEA of methaansulfonzuur. Voor zure componenten kan gebruik worden gemaakt van TFA of mierzuur. De bufferconcentratie moet lager zijn dan 0,1 M waarbij 0,01 M optimaal is. Met betrekking tot een PB/EI interface wordt de eluens pH bepaald door de pH voorwaarden voor de kolom. Bij API is

de buffer pH een cruciale factor voor de ionisatie van het monster. Een zure pH van het eluens zal positieve ionen leveren (bij voorkeur pH 4-5). Een basische pH (bij voorkeur 8-9) zal negatieve ionen leveren. Eventueel kan post kolom additie van reagens worden toegepast om het eluens op de juiste pH te brengen.

Kolommen

De voordelen van miniaturisering van kolomdimensies zijn; een lagere flow en betere gevoeligheid door een lager dood volume. Van de eerste eigenschap wordt gebruik gemaakt als een HPLC systeem aan een MS gekoppeld wordt. Kolomdiameters voor PB/EI zijn 2 tot 3 mm. Met het ESI interface kan gebruik worden gemaakt van capillaire kolommen en kolommen met een diameter tot 2 mm. APCI is mogelijk met kolommen die een diameter hebben tot 4 mm.

OASIS™ monster-voorbereiding voor MS

Tevens maakte Waters van dit seminar gebruik om een nieuw monster-voorbereidingsproduct aan te prijzen. Het ging hierbij om een kolom voor vaste fase extractie (SPE). Deze Oasis™ kolommen zijn gepakt met een HLB (hydrophilic-lipophilic balance) co-polymer fase. Voordelen van deze fase zijn: de fase mag droogvallen, een extractie-procedure met hoge reproduceerbare opbrengsten voor zure, basische of neutrale componenten, zowel polair als apolair. Het universele extractieprotocol is zeer eenvoudig: conditioneren met achtereenvolgens 1 mL methanol en 1 mL water, 1 mL serummonster opbrengen, wassen met 1 mL 5% methanol en elueren met 1 mL methanol.

Beschouwing

Een leuk en vooral leerzaam seminar waarbij de MS detectie techniek duidelijk werd uitgelegd. De nadruk lag vooral in het ochtend programma op het educatief vlak. In het middag programma stonden de Waters pro-

dukten meer centraal. Doordat het de eerste keer was dat Waters een dergelijk seminar presenteerde werd er volop geïmproviseerd in het programma. Dit gaf een aardige informele sfeer waarin veel ruimte was voor discussie. Waters verwacht dat binnen 5 jaar LC/MS een standaard techniek in het laboratorium zal zijn. Of dit ook in de klinisch farmaceutische laboratoria zo zal zijn? Het zal duidelijk zijn dat vrijwel niemand een zak daalders op de plank heeft liggen om even een LC/MS te kopen. Waarom is het dan nu al belangrijk om over LC/MS na te denken? Wat zou een toepassingsgebied voor LC/MS in de klinische farmacie kunnen zijn? Sterkste punt van MS is de positieve monster identificatie. Monsterpieken worden niet alleen waargenomen, door een EI massaspectrum op te nemen en dit te vergelijken met massaspectra in een bibliotheek kunnen onbekenden geïdentificeerd worden. Het identificeren van onbekenden is met name in de toxicologie belangrijk. Op dit moment is de systematische toxicologische identificatie procedure (STIP), zoals deze ontwikkeld is door het laboratorium van de Stichting Centrale Ziekenhuis Apotheek in 's Hertogenbosch, voor veel laboratoria de standaard techniek bij toxicologische screenings. Maar STIP heeft ook zijn zwakke kanten. Een punt wat ik hier wil aanhalen is de chromatografie van STIP. Deze staat alweer ongeveer tien jaar. In deze tijd zijn de ontwikkelingen op het gebied van HPLC kolommen vooruitgegaan. Het 'ijken' van een HPLC kolom met een testmengsel door te variëren met de hoeveelheid fosforzuur en triethylamine is bij moderne kolommen niet meer nodig. Het pakingsmateriaal van moderne HPLC kolommen is van een dusdanige kwaliteit dat er geen verschil in retentietijd meer bestaat tussen dezelfde kolommen van een verschillende batch. De noodzaak voor het bijvoegen van triethylamine aan het eluens is door het gebruik van silica van een zuivere kwaliteit met reproduceerbare end-capping niet



Extract

meer nodig. Ook in de kolomdimensies is een trend naar miniaturisering zichtbaar. De voordelen van dit soort kolommen zijn een verbeterde selectiviteit, gevoeligheid en lager eluens verbruik. De toxicologie zelf is ook een dynamisch proces. Er zullen altijd nieuwe geneesmiddelen op de markt komen, een bibliotheek zal dus bijgehouden moeten worden wil deze volledig zijn. Mijns inziens zijn we nu op een tijdstip gekomen waarbij we moeten bepalen of we doorgaan met het bijhouden van de STIP bibliotheek en de STIP chromatografie of dat gekozen moet worden voor een nieuw toxicologisch systeem. De rol die een MS hierin

mogelijk kan spelen is duidelijk. Het is niet mogelijk een MS aan de STIP chromatografie te hangen door de gebruikte loopvloeistof van het STIP systeem. Het is echter ook niet voor iedereen weg gelegd een LC/MS systeem te kopen. De rol van de DAD in de toxicologie is zeker nog niet uitgespeeld. In LC/MS wordt de DAD gebruikt om bij problemen een diagnose te stellen of de chromatografie dan wel de MS onvoldoende functioneert. De informatie die met een DAD verkregen kan worden is echter te waardevol gebleken om deze informatie alleen te gebruiken als een stuk gereedschap voor de MS. Vandaar deze oproep om, via

Extract, met elkaar als klinisch farmaceutische analisten na te denken over een nieuw toxicologisch systeem dat zowel voor DAD als MS detectie geschikt is. Dat het zinvol is om hier over na te denken heeft het wijd verbreide, succesvolle gebruik van STIP door vele laboratoria al bewezen.

Literatuur

Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Pénicaut and Lachâtre G. Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Analytical Toxicology: A Review. *J.Anal.Tox.*(1997);21:116-126.
