

Optimierung der
Laserionisation bei Atmosphärendruck und
Aufbau einer SFC-APLI-Kopplung

Vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)
der Bergischen Universität Wuppertal
genehmigte Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

– Doktor der Naturwissenschaften –
(Dr. rer. nat.)



**BERGISCHE
UNIVERSITÄT
WUPPERTAL**

vorgelegt von

Dennis Klink
(Dipl.-Chem.)
aus Duisburg

Wuppertal im Dezember 2013

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20140331-143436-2

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:468-20140331-143436-2>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit
von August 2009 bis Dezember 2013
auf Anregung von
Herrn Prof. Dr. Oliver Johannes Schmitz
im Arbeitskreis Analytische Chemie sowie
im Arbeitskreis Physikalische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal
unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. Thorsten Benter

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und Zitate kenntlich gemacht habe.

Wuppertal, den

D e n n i s K l i n k

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn **PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ** gilt für wirklich alles, und das beinhaltet unter anderem die kontinuierliche Unterstützung durch jedwede Art von Diskussionen, Arbeitsanregungen, Hilfestellungen und mentorische Anweisungen, der Sicherstellung der Finanzierung, der Geräte, der Bereitstellung des Themas und der Möglichkeit zur Durchführung dieser Promotionsarbeit, der Präkorrektur der vorliegenden Arbeit, einer wunderbaren gemeinsamen Zeit in Wuppertal, dem Vertrauen in meine Person und Arbeit sowie der Einführung in die Welt der deutschen Weine mein allerherzlichster Dank!

Ein ebenso herzlicher Dank sei auch an Herrn **PROF. DR. THORSTEN BENTER** ausgesprochen: Danke für fachliche und außerfachliche Diskussionen, Hilfe bei literarischen Hochgenüssen in Anträgen, Bewerbungen, Lobhudeleien und Texten aller Art; ebenso fürs Arbeiten lassen im Laserlabor und die tolle Zeit in Denver und Minneapolis! Vielen Dank für die Motivation in vielerlei Hinsicht sowie die Zusammenarbeit in der Graduiertenkommission! „Hey, where do these stairs go?“¹

Herrn **PROF. DR. SIEGMAR GÄB**[†] gilt mein besonderer Dank. Er war über viele Jahre ein Mentor für mich und verbleibt im Herzen als wunderbarer Mensch. Unsere Gespräche über Fußball, Golf und so vieles weitere werde ich nie vergessen!

Mein weiterer Dank gilt ansonsten in objektiver, nicht wertender alphabetischer Reihenfolge

... Herrn **DR. KLAUS JOSEF BROCKMANN** für interessante Gespräche, viele feinsinnige Diskussionen und dafür, dass er das Café Brockmann betreibt (a wonderful place to be),

... Herrn **DIPL.-CHEM. EDUARD DEIBEL** für die Zusammenarbeit an der APLI, den derivatisierten Proben, beim Synthetisieren, beim Fußballgucken und der tollen Zeit im Labor, in der wir hart-forschen konnten,

... Frau **M. SC. VALERIE DERPMMANN** für die Messungen an der Iontrap, den *ab-initio*-Berechnungen, der Unterstützung in Lizenzfragen, den (Tag-)Träumen von Kuchen sowie einem Bällebad und dafür, dass sie ordentliche Musik ins Labor gebracht hat,

... der **DEUTSCHEN BAHN**, denn sie ließ mich fahren, und das ist ihr Wesen, zum Schreiben, Korrigieren und sehr langem Lesen,

... Herrn **RONALD GIESE** sowie Herrn **AXEL BRAKELMANN** und seinem Team der Werkstatt der BUW für alle angefertigten feinmechanischen Teile und Hilfestellungen,

¹Zitat aus dem Film *Ghostbusters* (1984, Regie & Produktion: I. Reitman, Buch: D. Aykroyd & H. Ramis)

... Frau **PROF. DR. ELISABETH HOLDER** und ihren Mitarbeitern Cüneyt, Eike, Ioannis, Nan und Simon für viele interessante und teils äußerst farbenreiche Proben,
... Frau **M. SC. SONJA KLEE** für die Hilfe beim Nachvollziehen der Clusterchemie, den kleinen Tanzeinlagen und der vorm Gerät verbrachten weinhaften Abende,
... Herrn **PROF. DR. HANS-WILLI KLING** für die Finanzierung meiner Restmonate und dem weiter nutzbaren Büroplatz,
... Herrn **DIPL.-CHEM. SEBASTIAN KLOPOTOWSKI** für das Aufnehmen und die Hilfestellung beim Auswerten der Schlierenbilder sowie der zahlreichen, teils unnützen Informationen zu (fast) jedem Thema,
... Frau **B. SC. LISA MARIE KRAUSKOPF** für die Zusammenarbeit an den Muschelextraktionen und den GCxGC-Messungen, die hier nun keine Verwendung fanden,
... der Fa. **SIM GmbH** mit Herrn **ROLF EICHELBERG** und Herrn **ANDREAS BELZER** für die Bereitstellung der SFC-Anlage, sowohl vor als auch nach dem Weihnachtsfest,
... Herrn **M. SC. WALTER WISSDORF** für Simulationen, Hilfestellung bei Problemen mit \LaTeX , Matlab und OS X, hilfreichen Diskussionen zu Interpretationen und vielem mehr,
... meinen **WG-MITBEWOHNERN** Janine, Kathrin, Jill, Sören, Ariane, Katja und Jan für eine traumhafte Zeit in Wuppertal,
... meinen **ZELLENGENOSSEN** aus L-11.08, besonders den langjährigen Gefährten Bernd, Lukas, Roman, Sonja und Volker für viele heitere Stunden, Gespräche über alles und jeden, und das, was die Atmosphäre im Büro angenehm machte,
... den **ZAUBERHAFTEN TEAMS** der einzig wahren Analytiker und der wahrhaftigen Physikochemiker sowie

... den Korrektoren, Lektoren und Ideengebern Frau **M. SC. YESSICA BRACHTHÄUSER**, Frau **B. A. JANA BÜRGERS**, Frau **M. SC. VALERIE DERPMANN**, Herrn **DR. HENDRIK KERSTEN**, Herrn **DIPL.-CHEM. BERND MELL**, Herrn **PH. D. WALTER V. TURNER** und Herrn **M. SC. NILS WIENAND**.

Ein Dank aus dem Herzen sei meinem besten Freund **JAN** zuteil. Vielen Dank für ergreifende, aufmunternde, öffnende und vertrauensvolle Gespräche über Wissenschaft, Leidenschaft und Freundschaft in Hochdahl, Bernkastel-Kues und vielen weiteren Orten, die mir mehr und mehr das Ausmaß unserer Freundschaft verdeutlichen.

Nicht zuletzt, sondern wirklich an vorderster Stelle gilt mein zu allertiefst herzlicher Dank meiner Familie. **MAMA**, **BERND** und **JANA**, ihr wart immer da für mich und habt oft auf mich verzichten müssen. Ihr habt mich unterstützt, wann immer es notwendig war, und mir Rückhalt, Kraft und den Mut gegeben, alles mit Eurer Hilfe durchzustehen. In tiefster Liebe verneige ich mich und danke Euch dafür!

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AMAA	(Anthracen-9-yl-)methoxyessigsäure
AP	Atmosphärendruck
APA-NHS	(Anthracen-9-yl-)propansäure- <i>N</i> -succinimidester
APCI	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl.: <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i>)
APLI	Atmosphärendruckklaserionisation (engl.: <i>atmospheric-pressure laser ionization</i>)
APPI	Atmosphärendruckphotoionisation (engl.: <i>atmospheric-pressure photo ionization</i>)
AQC	6-Aminochinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccimidylcarbamat
β	Massenkonzentration
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[e]P	Benzo[e]pyren
BOS	Hintergrundorientierte Schlierentechnik (engl.: <i>background-oriented Schlieren-technique</i>)
BPR	Rückdruckventil (engl.: <i>back pressure regulator</i>)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
<i>c</i>	Stoffmengenkonzentration
ca.	circa
CE	Kapillarelektrophorese (engl.: <i>capillary electrophoresis</i>)
CEC	Kapillarelektrochromatographie (engl.: <i>capillary electro chromatography</i>)
CH	Cyclohexan
CI	chemische Ionisation
CID	kollisions-induzierte Dissoziation (engl.: <i>collision-induced dissociation</i>)
d. h.	das heißt
DAD	Diodenarraydetektor
Da	Dalton
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIA	dynamische Ionenakzeptanz
DI	Direktinfusion (engl.: <i>direct infusion</i>)

DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
7,9-DMBA	7,9-Dimethylbenz[<i>c</i>]acridin
DPSS	diodengepumpter Festkörperlaser (engl.: <i>diode-pumped solid-state laser</i>)
d-SPE	dispersive Festphasenextraktion (engl.: <i>dispersive solid-phase extraction</i>)
ECD	Elektroneneinfangdetektor (engl.: <i>electron capture detector</i>)
EI	Elektronenstoßionisation
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm (engl.: <i>extracted ion chromatogram</i>)
ELSD	Lichtstreuungsdetektor (engl.: <i>evaporative light scattering detector</i>)
EPA	Umweltbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika (engl.: <i>environmental protection agency</i>)
ESI	Elektrosprayionisation
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektor
fs	fused-silica
FT-ICR	Fourier-Transform Ionencyclotronresonanz
FWHM	Peakbreite auf halber Höhe (engl.: <i>full width at half maximum</i>)
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
HETP	theoretische Bodenhöhe (engl.: <i>height equivalent to a theoretical plate</i>)
1-HP	1-Hydroxypyren
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HV	Hochvakuum
ID	Innendurchmesser
i. A.	im Allgemeinen
i. d. R.	in der Regel
LC	Flüssigkeitschromatographie
LFIS	Laminarflussionenquelle (engl.: <i>laminar-flow ion source</i>)
LiF	Lithiumfluorid
LIT	Lineare Quadrupolionenfalle
M	mol L ⁻¹
M ⁺	Radikalkation
[M+H] ⁺	protoniertes Molekülion
M _(<i>exakt</i>)	exakte Masse
MALDI	Matrix-assistierte Laserdesorption/-ionisation (engl.: <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MCP	Multikanalplatte (engl.: <i>multi-channel plate</i>)
MeOH	Methanol
MICEE	matrixinduzierter, chromatographischer Anreicherungseffekt (engl.:

	<i>matrix-induced chromatographic enhancement effect</i>)
MPIS	Multi-mode Ionenquelle (engl.: <i>multi-purpose ion source</i>)
MRM	engl.: <i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
Nd:YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
NIST	<i>National Institute of Standard and Technology</i>
Nr.	Nummer
NWG	Nachweisgrenze
oa-(TOF)MS	orthogonal beschleunigendes Flugzeitmassenspektrometer (engl.: <i>orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer</i>)
o. ä.	oder ähnlich(e)
o. g.	oben genannt(e)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PIV	Bildgebung für Teilchengeschwindigkeit (engl.: <i>particle image velocimetry</i>)
P _{krit.}	kritischer Punkt (Zusammenfassung von p _{krit.} & T _{krit.})
p _{krit.}	kritischer Druck
PLE	druckunterstützte Flüssigkeitsextraktion (engl.: <i>pressurized liquid extraction</i>)
QIT	Quadrupolionenfalle
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
REMPI	resonanzverstärkte Multiphotonenionisation (engl.: <i>resonance-enhanced multi-photon ionization</i>)
RSD	relative Standardabweichung (engl.: <i>relative standard deviation</i>)
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SFA	Raucharomazusatz (engl.: <i>smoke flavoured additives</i>)
SFC	superkritische Flüssigkeitschromatographie (engl.: <i>supercritical-fluid chromatography</i>)
SFE	superkritische Flüssigkeitsextraktion (engl.: <i>supercritical-fluid extraction</i>)
S/N	Signal-zu-Rauschverhältnis (engl.: <i>signal-to-noise ratio</i>)
SPE	Festphasenextraktion (engl.: <i>solid-phase extraction</i>)
SPME	Festphasenmikroextraktion (engl.: <i>solid-phase microextraction</i>)
S/SL	Split/Splitless
SSSA	Standard Sprayshield Anordnung
SST	Stahl(-Kapillaren) (engl.: <i>stainless steel</i>)
STP	Standardbedingungen (für engl.: <i>standard temperature and pressure</i>)
TC-MPIS	Temperaturkontrollierte Multi-mode Ionenquelle (engl.: <i>temperature-controlled multi-purpose ion source</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Gesamtionenchromatogramm (engl.: <i>total ion chromatogram</i>)
T _{krit.}	kritische Temperatur
(TOF)MS	Flugzeitmassenspektrometer (engl.: <i>time-of-flight mass spectrometer</i>)

t_r	Retentionszeit
u	atomare Masseneinheit (engl.: <i>unit</i>)
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
V/V	Volumenanteil
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

INHALTSVERZEICHNIS

1	Theoretische Grundlagen	1
1.1	Grundlagen zur Massenspektrometrie	1
1.1.1	Massenanalyserotypen	3
1.1.2	Ionisation	5
1.1.3	Atmosphärendruckionisationsmethoden	7
1.1.3.1	ESI	7
1.1.3.2	APCI	8
1.1.3.3	APPI	10
1.1.3.4	APLI	12
1.2	Superkritische Flüssigkeitschromatographie	14
1.2.1	Der superkritische Zustand	14
1.2.2	Chromatographie mit superkritischen mobilen Phasen	16
1.2.3	Entwicklung der SFC	19
1.3	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe - Bedeutung und Analyse . . .	21
1.3.1	Vorkommen und Entstehung	21
1.3.2	Transport und Abbau in der Umwelt	22
1.3.3	Toxizität und Metabolismus	23
1.3.4	Analyse und Aufbereitung von PAK	24
2	Problemstellung und Zielsetzung	27
3	Ergebnisse und Diskussion	29
3.1	Ionenquellenoptimierung	29
3.1.1	Entwicklung der temperaturkontrollierten MPIS (TC-MPIS)	30
3.1.2	Entwicklung eines aktiven <i>elevated floor</i>	35
3.1.3	Einschränkung der Verwendung von Drygas bei GC-APLI	41
3.1.3.1	Experimentelle Bestimmung der Drygasabhängigkeit	43
3.2	Charakterisierung der APLI als Ionisationsmethode	47
3.2.1	Untersuchung der Ionensuppression bei HPLC-APLI	47
3.2.2	Analytfragmentierung durch CID	50
3.2.2.1	CID von alkylierten PAK bei GC-APLI-(TOF)MS	53
3.2.2.2	Weiterführende Untersuchungen mit alkylierten PAK	57
3.2.2.3	Fragmentationen bei APLI-Ionisationslabeln	61

3.3	Vergleich zweier Lasersysteme	65
3.3.1	Vergleich der Signalintensitäten beider Lasersysteme mit HPLC-APLI	67
3.3.2	Ausrichtung des DPSS-Lasers bei HPLC-APLI	70
3.3.3	Ausrichtung des DPSS-Lasers bei GC-APLI	74
3.3.4	Einsatz beider Lasersysteme für die GC-APLI	75
3.3.4.1	Laservergleich anhand einer Muschelprobe	76
3.3.4.2	Quantifizierung von PAK in Muschelgewebe	79
3.3.5	Einsatz der Lasersysteme für die DI-APLI	82
3.3.5.1	Organische Iridiumkomplexe als Bausteine für polymere LED-Materialien	84
3.3.5.2	Bestimmung des Bromierungsgrades organischer Polymerbausteine	85
3.3.6	Beurteilung der Einsatzfähigkeit der Lasersysteme für die APLI	87
3.4	SFC-APLI-(TOF)MS	88
3.4.1	Vorteile der SFC bei der Trennung von PAK	88
3.4.2	Aufbau einer SFC-APLI-(TOF)MS-Kopplung	89
3.4.3	Das gewählte Restriktionssystem	90
3.4.4	Weitere Möglichkeiten der Sensitivitätsoptimierung	96
3.4.4.1	Einfluss der Erweiterung des Austrittsdurchmessers	96
3.4.4.2	Einfluss der Restriktionskapillarlänge	101
3.4.4.3	Einfluss der Ofen- und Transferlinetemperatur	102
3.4.4.4	Einfluss des Verdampfergases und des Sheathgasflusses	105
3.4.5	Vergleich der SFC-APLI mit HPLC-APLI	108
3.4.5.1	SFC-APLI für die Trennung komplexer PAK-Mischungen	108
3.4.5.2	Vergleich der Nachweisgrenzen verschiedener PAK mit SFC-, HPLC- und GC-APLI	110
3.4.5.3	Linearität und Empfindlichkeit der SFC- und HPLC-APLI	111
3.4.5.4	Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und Peakflächen	112
3.4.6	Quantifizierung von PAK in Muschelgewebe	113
3.4.7	Bestimmung von 1-HP mittels SFC-APLI	116
3.4.7.1	Bestimmung von 1-Hydroxypyren mit APLI-(TOF)MS	117
3.4.7.2	1-Hydroxypyren-Bestimmung mittels SFC- und HPLC-APLI	119
3.4.7.3	Linearität des 1-Hydroxypyren-Signals bei SFC-APLI	121
3.4.7.4	Quantitative Bestimmung von 1-Hydroxypyren in Urin mittels SFC-APLI	121
4	Zusammenfassung	123
5	Abstract	125

6	Experimenteller Teil	127
6.1	GC-Analysen - Chromatographische Bedingungen	127
6.1.1	GC-APLI-Analyse von Alkyl-PAK	127
6.1.2	Messungen zum Einfluss des Drygases bei verschiedenen MS-Einlass- geometrien	128
6.1.3	GC-APLI-Bedingungen für komplexe Proben (z. B. Muschelextrakte) .	128
6.2	HPLC-Analysen - Chromatographische Bedingungen	129
6.2.1	Vergleich der Peakintensitäten und S/N bei HPLC-APLI mit Excimer- und DPSS-Laser	129
6.2.2	HPLC-Analyse von (Anthracen-9-yl)-methoxyessigsäure-3-pyridin-3-yl- propylester	130
6.2.3	Analyse komplexer PAK-Mischungen mit HPLC-APLI	130
6.2.4	Vergleich der Ionensuppression bei HPLC-APLI	131
6.2.5	Peakbreitenoptimierung mit dem <i>elevated floor</i>	131
6.2.6	HPLC-APLI-Analysen von 1-Hydroxypyren	131
6.2.7	HPLC-APLI-Analysen von derivatisierten Aminosäuren	131
6.3	SFC-Analysen - Chromatographische Bedingungen	132
6.3.1	Erste Experimente zum Aufbau der SFC-APLI-Kopplung	132
6.3.2	Vergleich zwischen 25 & 50 μm ID-Kapillaren für die SFC-Kopplung .	132
6.3.3	Isokratische Analysen zur Optimierung der SFC-APLI-Kopplung . . .	133
6.3.4	SFC-APLI-Analyse von komplexen PAK-Mischungen	133
6.3.5	SFC-APLI-Analyse von SPE-Extrakten von Urin	135
6.4	Kontinuierliche Analytzufuhr zur Aufnahme der dynamischen Ionenakzeptanz	136
6.4.1	HPLC	136
6.4.2	GC	136
6.5	DI-APLI-Messungen verschiedener Verbindungen	137
6.6	Esquire-Messungen	137
6.7	Probenvorbereitung / Extraktionsmethoden	137
6.7.1	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (QuEChERS)	137
6.7.2	SPE zum Anreichern von 1-HP in Urin	138
6.7.3	Generierung einer Urinmatrix für Suppressionsmessungen	138
6.8	Derivatisierungsreaktionen	138
6.8.1	Aminosäurelabeling	138
6.8.2	Veresterung der Ionisationsmarker	139
6.9	<i>ab-initio</i> -Berechnungen	140
6.10	MALDI-Experimente	140
6.11	<i>Background-oriented Schlieren</i> -Aufnahmen	141
6.12	Numerische Simulationen	141
6.12.1	Simulationsbedingungen für die Simulation fluiddynamisch modellier- ter, zeitintegrierter Gasflüsse und -geschwindigkeiten	141

6.12.2	Simulationsbedingungen für die Simulation von Ionentrajektorien für verschiedene Einlassgeometrien bei GC-API	142
6.12.3	Simulationsbedingungen für die Simulation von Gasflüssen für verschiedene Einlassgeometrien bei GC-API	142
6.12.4	Simulationsbedingungen für die Simulation fluiddynamisch modellierter Gasflüsse und -geschwindigkeiten bei SFC-APLI	142
6.13	Lösungen, Verdünnungen und Mischungen	143
7	Anhang	145
7.1	Geräte	145
7.1.1	Massenspektrometer	145
7.1.2	Laser	145
7.1.3	Chromatographie	145
7.1.4	Chromatographische Säulen und Restriktionskapillaren	146
7.1.4.1	HPLC- und SFC-Trennsäulen	146
7.1.4.2	GC-Kapillarsäulen	146
7.1.4.3	Restriktionskapillaren für SFC	146
7.1.4.4	SPE-Kartuschen	147
7.1.5	Gasflussregler und -kontroller	147
7.1.6	EDV-Systeme und Software	147
7.1.7	Sonstige Materialien	147
7.2	Chemikalien	148
7.2.1	Synthetisierte Substanzen	148
7.2.2	Reinsubstanzen und Lösungsmittel	149
7.2.3	Mischungen	152
	Abbildungsverzeichnis	155
	Tabellenverzeichnis	159
	Literaturverzeichnis	161

1 Theoretische Grundlagen

Die naturwissenschaftliche Forschung hat die Aufgabe, bekanntes Wissen zu mehren und zu einem besseren Verständnis unbekannter Vorgänge des Lebens beizutragen. Aus dieser Forschung erhaltene Ergebnisse haben Auswirkungen auf viele Bereiche des Lebens. Die erhöhte Qualität der medizinischen Versorgung und die Erforschung biologischer Vorgänge trug unter anderem dazu bei, dass die Lebenserwartung des Menschen erhöht wurde. Die Verbesserungen der Zucht von Nutzpflanzen und -tieren sowie der Lebensmittelsicherheit ermöglichen die Ernährungsversorgung einer immer größer werdenden Anzahl von Menschen auf der Erde, die zudem einen höheren Lebensstandard genießen können.

Inhaltsstoffe der Lebensmittel und vieler Gegenstände des täglichen Bedarfs werden qualitativ und quantitativ durch die chemische Analytik bewertet. Deren spezielle Aufgabe umfasst jedoch nicht nur eine Aussage über Qualität und Inhaltsstoffe verschiedener Proben. Auch die Weiterentwicklung der für die Analytik wichtigen Techniken ist Gegenstand der chemisch-analytischen Forschung. Verbesserungen zielen auf genauere, schnellere und günstigere Analysen ab. Hierzu zählen auch die Weiterentwicklung der chromatographischen und massenspektrometrischen Techniken, die auf den folgenden Seiten beschrieben sind. Diese speziellen Arbeiten umfassen die Evaluierung eines bestehenden Systems zur selektiven Ionisation und sensitiven Detektion aromatischer Kohlenwasserstoffe, indem analytische Parameter bestimmt und bewertet werden. Zudem werden Möglichkeiten aufgezeigt, die bekannte Technik zu erweitern und diese Erweiterungen anzuwenden.

Im Folgenden wird dafür die an ein Flugzeitmassenspektrometer gekoppelte Laserionisation bei Atmosphärendruck (AP) verwendet. Weiterhin werden verschiedene chromatographische Trenntechniken wie die Gaschromatographie, die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und die superkritische Flüssigkeitschromatographie genutzt. Es werden Eigenschaften und Verbesserungen der Ionisationsquelle und der Einsatz eines günstigeren, diodengepumpten Festkörperlasers beschrieben und auftretende Probleme diskutiert. Den Einstieg in die Thematik geben die folgenden Seiten. Auf diesen werden die Grundlagen zum Verständnis der nachfolgenden Kapitel gegeben.

1.1 Grundlagen zur Massenspektrometrie

Massenspektrometrie ist ein physikalisches Verfahren, mit dem über unterschiedliche Prozesse gebildete Ionen abhängig vom Verhältnis ihrer Masse zur Ladung (m/z) voneinander getrennt und detektiert werden [1, 2]. Die Trennung erfolgt dabei durch unterschiedliche Wechselwirkung mit elektrischen und/oder magnetischen Feldern oder über Unterschiede in den Drift-

oder Flugzeiten der Ionen [3]. Als Massenspektrum wird ein Plot der am Detektor erzeugten Signalintensität durch die Ionen in Abhängigkeit des m/z bezeichnet [2]. Die Ionen können geladene Atome, Moleküle oder deren Bruchstücke sein [4].

Nicht nur für die instrumentelle Analytik ist die Massenspektrometrie zu einem mittlerweile unverzichtbaren Instrument geworden. Die Massenspektrometrie (MS) findet heutzutage in sehr vielen Disziplinen der Wissenschaft eine Anwendung. Neben der erwähnten chemischen Analytik (u. a. für organische, anorganische, physikochemische, petrochemische und lebensmittelchemische Fragestellungen) sind dies bspw. die Physik, die Biologie, Biochemie, Biomedizin, die Pharmazie, die Umweltanalytik, die Weltraumforschung, die Medizin und viele weitere [3, 4]. In dieser noch kleinen Auswahl an Disziplinen wird die Massenspektrometrie z. B. zur Sequenzierung von Biomolekülen im Bereich der Proteomforschung, zur Strukturaufklärung unbekannter Moleküle sowie in der Umwelt-, Lebensmittel- und Arzneimittelwirkstoffanalytik eingesetzt [3], um nur wenige der nahezu unzähligen Anwendungen zu nennen.

Die Anfänge der Massenspektrometrie lassen sich um genau 100 Jahre auf das Jahr 1913 zurückführen, in dem J. J. THOMSON eine massenspektrometrische Trennung der Neonisotope ^{20}Ne und ^{22}Ne durchführte [5–7]. F. W. ASTON gelang es 1919, massenspektrometrisch über Geschwindigkeitsfokussierung 212 natürliche Isotope verschiedener Elemente zu entdecken, wofür er im Jahr 1922 den Nobelpreis erhielt [2, 7]. Seit den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts hat sich die Massenspektrometrie beständig weiterentwickelt [4, 6, 8]. Ein wichtiges Ereignis war die Entwicklung des Quadrupol-Massenfilters und der Quadrupol-Ionenfalle durch PAUL im Jahr 1953 (Nobelpreis für Physik 1989) [2]. Heutzutage werden immer schneller neue Innovationen erarbeitet und vorgestellt, sodass die Massenspektrometrie noch immer einer rasanten Weiterentwicklung unterworfen ist [3].

Alle Massenspektrometer lassen sich allgemein in vier Funktionsabschnitte unterteilen, die je nach Anwendungsbereich unterschiedlicher Art sein können. Diese vier Bereiche sind das Einlasssystem zur Probenzufuhr, die Ionenquelle, der Massenanalysator zur Massentrennung und ein Detektionssystem zum Ionennachweis [6–8].

Oftmals werden Massenspektrometer in der Analytik gekoppelt mit chromatographischen Systemen wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder der Gaschromatographie (GC) betrieben, um auch isobare Verbindungen mit gleichem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) analysieren zu können [2]. Um Moleküle oder Atome massenspektrometrisch zu analysieren, ist es unablässig, dass die Analyten als ein- oder mehrfach geladene Ionen vorliegen [3, 9]. Hierfür stehen der Massenspektrometrie eine Vielzahl unterschiedlicher Ionisationsmethoden zur Verfügung, die je nach vorherrschendem Druckbereich bei der Ionenerzeugung in Vakuum-, Mitteldruck- und Atmosphärendruckionisationsmethoden oder aufgrund der Stabilität der erzeugten Ionen in harte und weiche Methoden unterteilt werden. Die Ionen werden mit einem Massenanalysator abhängig von ihrem m/z -Verhältnis getrennt und mit einem geeigneten Detektionssystem detektiert. Ein klassisches Detektionssystem ist der Faraday

Cup, eine becherförmige Elektrode, bei der auftreffende Ionen ihre Ladung abgeben und so einen detektierbaren Strom erzeugen. Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) setzten sich mit der Einführung scannender Massenspektrometer durch. Hier werden von den auf die Oberfläche auftreffenden Ionen nacheinander mehrere Kaskaden von Sekundärelektronen gebildet, die letztendlich einen gut detektierbaren Strom erzeugen. In vielen modernen Massenspektrometern werden zur Detektion Multikanalplatten (engl.: multi-channel plates, MCP) eingesetzt, die aus einer Vielzahl mikroskopisch kleiner SEV bestehen und einen höheren Verstärkungseffekt aufweisen. Die genannten Detektoren zählen zu den ionenzählenden Detektoren, denen die sogenannten Bildstromdetektoren, die bei Fourier-Transform (FT)-Massenspektrometern eingesetzt werden, gegenüberstehen [3].

1.1.1 Massenanalyserortypen

Im Laufe der Entwicklung der Massenspektrometrie wurden viele verschiedene Massenseparatoren vorgestellt. Die Gemeinsamkeit der Massenseparatoren liegt darin, dass die Ionenseparation unter Hochvakuum betrieben wird, damit die Ionen kollisionsfrei das Detektionssystem erreichen können [2, 3]. Um die in der Ionenquelle gebildeten Ionen im Massenspektrometer aufzutrennen, werden sie, meistens beschleunigt und durch Potentialfelder gelenkt, in den Analyserort des Massenspektrometers überführt [8]. Die Trennung der Ionen nach m/z erfolgt dann durch statische oder dynamische elektrische oder magnetische Felder oder feldfrei über die Flug- bzw. Driftzeit [3]. Abhängig von der analytischen Fragestellung und dem Anwendungsfeld kommen verschiedene Massenanalyserorten zum Einsatz. Gebräuchliche Typen sind Quadrupol-, Magnetsektorfeld-, Ionenfallen-, Flugzeit- (TOF) und Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz- (FT-ICR)-Geräte [3]. Eine Neuentwicklung aus dem Jahr 2005 ist die von MAKAROV entwickelte Orbitrap [10]. Auch Kombinationen der Massenanalyserorten werden benutzt. Hierzu zählen z. B. das Triple-Quadrupol- (QqQ) und das Quadrupol-TOF- (q-TOF)-Massenspektrometer. Eine ausführliche Beschreibung dieser Geräte übersteigt den Rahmen dieses Kapitels. Lediglich das Flugzeitmassenspektrometer wird im Folgenden näher erläutert. Zur Beschreibung anderer Massenanalyserortypen sei an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur verwiesen (z. B. [3]).

Flugzeitmassenspektrometer

Die erste Beschreibung eines Flugzeitmassenspektrometers geht zurück auf das Jahr 1946. Hier stellte STEPHENS seine Überlegungen für ein „gepulstes Massenspektrometer mit zeitlicher Dispersion“ vor [11]. Ab Mitte der 1950er Jahre waren Time-of-flight (TOF)-Geräte dann für die Kopplung mit der Gaschromatographie (GC) erhältlich, wurden aber kurze Zeit später durch die günstigere GC-Quadrupol(MS) ersetzt. Die Renaissance der (TOF)MS begann in den 1980er Jahren durch die Nutzung gepulster Ionenquellen wie z. B. der Matrix-assistierten Laserdesorption/-ionisation (MALDI) [3]. Für kontinuierlich arbeitende Ionenquellen wie die Elektrosprayionisation (ESI) werden heutzutage besonders die orthogonal beschleunigenden

Flugzeitmassenspektrometer (engl.: *orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer*, oa-(TOF)MS) als Massenanalysator eingesetzt [12].

Die Massenseparation eines Flugzeitmassenspektrometers arbeitet im Gegensatz zu vielen der anderen genannten Massenspektrometer in einem feldfreien Raum, der sogenannten Flugröhre. Das heißt, dass die Ionen keine Wechselwirkung mit elektrischen oder magnetischen Feldern eingehen, um nach ihrem m/z getrennt zu werden. Ionen mit gleicher kinetischer Energie E_{kin} werden vielmehr nach einem erfolgten Beschleunigungsimpuls (dem sogenannten Pusher-Impuls) durch einen Unterschied in ihrer Geschwindigkeit v bzw. dem daraus resultierenden Unterschied ihrer Flugzeit auf einer definierten Strecke getrennt [1, 3].

Die Geschwindigkeit der durch ein Potential U beschleunigten Ionen lässt sich unter Betrachtung ihrer kinetischen Energie E_{kin} nach Gleichung 1.1 berechnen und ist umgekehrt proportional abhängig von der Quadratwurzel ihrer Masse bzw. ihres m/z -Verhältnisses, wenn sich das Ion in einem Ruhezustand befand, wovon in erster Näherung ausgegangen wird [3].

$$E_{kin} = z \cdot e \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2} \quad \text{bzw.} \quad v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot e \cdot U}{m}} \quad [3] \quad (1.1)$$

mit: z = Ladungszahl des Ions, e = Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C), U = Beschleunigungspotential (in V), m = Ionenmasse (in kg) und v = Ionengeschwindigkeit (in m s^{-1})

Wird in Gleichung 1.1 die Geschwindigkeit v durch $v = s \cdot t^{-1}$ (mit: s = Flugstrecke und t = Flugzeit) substituiert, folgt daraus Gleichung 1.2, mit der die Flugzeit in einer definierten, feldfreien Strecke proportional von der Quadratwurzel des m/z -Verhältnisses abhängig ist. Ein gemeinsamer Startzeitpunkt der Ionen sowie eine möglichst kleine Verteilung ihrer kinetischen Anfangsenergie ist hierbei eine Voraussetzung. Ersteres wird erreicht, indem die Ionen aus einer gepulsten Ionenquelle stammen oder als diskontinuierliche Pakete gesammelt und zur Messung beschleunigt werden [3]. Eine Verringerung der Verteilung der kinetischen Energie und somit eine Verbesserung der Massenauflösung kann durch das Benutzen eines sogenannten Reflektrons erreicht werden [13]. Als Reflektron wird ein elektrostatischer Ionenpiegel bezeichnet, der meistens aus mit elektrischen Potentialen belegten Ringelektroden zusammengesetzt ist [2, 3].

$$t = \frac{s}{\sqrt{2 \cdot e \cdot U}} \cdot \sqrt{\frac{m}{z}} \quad [3] \quad (1.2)$$

mit: t = Flugzeit (in s) und s = Flugstrecke (in m)

Aus Gleichung 1.2 geht hervor, dass Ionen mit kleiner Masse eine kürzere Flugzeit haben als Ionen mit größerer Masse [1]. Durch Messen des Zeitintervalls zwischen dem Beschleunigungsimpuls und dem Auftreffen am Detektor wird mit den gerätespezifischen Parametern U

und s das m/z -Verhältnis bestimmt. Der Vorteil, der sich hieraus für das (TOF)MS ergibt, ist ein prinzipiell unbegrenzter Massenbereich [1, 3]. Limitiert wird dies allerdings durch die Anforderung an den Detektor, immer kürzere Zeitintervalle Δt für gegebene $\Delta m/z$ -Werte bei der Bestimmung immer größer werdender m/z zu messen [3].

Die Massenauflösung R kommerzieller Flugzeitmassenspektrometer liegt bei etwa 3000 [2]. Hierbei wird die Massendifferenz Δm bzw. $\Delta m/z$ zweier Signale, die bei einer definierten Masse m (oder m/z) aufgetrennt werden können, als Massenauflösung (gegeben durch Gleichung 1.3) bezeichnet [3].

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m/z}{\Delta m/z} \quad [2, 3] \quad (1.3)$$

Einfache Reflektrongeräte arbeiten mit der sogenannten v-Optik (einfache Reflexion der Ionen). Die Massenauflösung wird mit nacheinander geschalteten Reflektoren (z. B. w-Optik, doppelte Reflexion) nochmal deutlich erhöht, sodass moderne (TOF)MS-Systeme eine Massenauflösung zwischen 40 000 und 100 000 aufweisen [3, 14]. Verglichen mit den anderen o.g. Massenanalysatoren weist das (TOF)MS noch weitere Vorteile auf: Im Gegensatz zu scannenden Massenspektrometern wie dem Quadrupol-MS wird keines der beschleunigten Ionen diskriminiert [1]. Es eignet sich besonders durch hohe Repetitionsraten (bis zu 30 000 Hz) für schnelle Ionisationsprozesse und nimmt in einer gegebenen Zeit mehr Massenspektren auf als bspw. Magnetsektorfeldgeräte [3, 15]. Das Design und die Bauweise eines (TOF)MS sind vergleichsweise einfach und günstig [2, 3] und eine Kalibration der Massenskala kann über nur zwei Punkte erfolgen [1]. Time-of-flight-Massenspektrometer erlauben die Bestimmung exakter Massen (Massengenauigkeit < 1 ppm) und sie lassen sich für die Tandem-MS bspw. mit Quadrupol-Stoßzellen koppeln.

1.1.2 Ionisation

Für die massenspektrometrische Analyse ist die Bildung von Ionen unerlässlich. Wichtig ist hierbei u. a. die Ionenausbeute und Reproduzierbarkeit der Ionenbildung [2]. Die Ionen werden in der sogenannten Ionenquelle gebildet. Die Bildung eines positiven Ions erfolgt meist durch Entfernen eines Elektrons aus dem höchstbesetzten Molekülorbital (HOMO) des Moleküls [4]. Die hierfür aufzubringende Ionisierungsenergie liegt für die meisten Moleküle im Bereich von etwa 7 bis 15 eV [3]. Durch welchen Prozess diese Energie aufgebracht wird, hängt von der gewählten Ionisationsmethode ab, die aus einer großen Bandbreite verschiedener Ionisationsarten gewählt werden kann. Diese Vielfalt ermöglicht es, nahezu jede Verbindung massenspektrometrisch zu erfassen [3].

Ionisationsmethoden werden häufig in verschiedene Kategorien eingeteilt. Gebräuchlich ist die Einteilung in harte und weiche oder – in Abhängigkeit vom vorherrschenden Druck bei der Ionisation – in (Hoch-)Vakuum- (HV) und Atmosphärendruckionisationsmethoden (AP)

[2]. Unter AP-Bedingungen wird bei auftretenden chemischen Reaktionen hauptsächlich das thermodynamisch kontrollierte Produkt gebildet. Durch die geringe Teilchenzahldichte unter HV-Bedingungen ist dagegen die Bildung des kinetisch kontrollierten Produkts begünstigt [3, 16]. Bei der harten Ionisation wird einem Molekül ein Vielfaches der zur Ionisation benötigten Energie zugeführt. Je nach Molekülstruktur führt dies zum Teil zur Bildung von Fragmenten. Weiche Ionisationsmethoden hingegen bilden Molekül- (M^+) oder protonierten Molekülonen ($[M+H]^+$), die für weitere Strukturinformationen einer nachgeschalteten Stoßionierung (z. B. kollisions-induzierte Dissoziation, CID, engl.: *collision-induced dissociation*) unterworfen werden müssen [2, 17, 18].

Die klassische und bei weitem wichtigste (harte HV-)Methode, insbesondere für flüchtige Verbindungen, ist die sogenannte Elektronenstoßionisation (EI, engl.: *electron ionization* oder *electron impact ionization*), bei der die Analyten senkrecht zu ihrem Fluss mit einem Strahl thermischer Elektronen mit einer kinetischen Energie von (meistens) 70 eV beschossen werden [2–4, 7]. Der wichtigste dabei auftretende Ionisierungsprozess (die Bildung von Radikalkationen (M^+)) wird durch Gleichung R 1.1 beschrieben. Im Allgemeinen findet diese Reaktion bei einem Druck von etwa 10^{-4} Pa statt, um nachfolgende bimolekulare Reaktionen zu unterbinden [3]. Daneben kommt es auch zur Bildung mehrfach geladener Kationen oder auch Anionen [4]. Zudem führt die insbesondere zu Standardisierungszwecken, für z. B. den Vergleich mit Datenbanken, genutzte Elektronenenergie von 70 eV durch eine hohe Überschussenergie zu Fragmentierung der Analyten. Die erhaltenen Massenspektren können dadurch u. a. für die Strukturaufklärung herangezogen werden [2].



Neben der heute insbesondere für die gaschromatographische Analyse von organischen Molekülen eingesetzten EI wird auch die chemische Ionisation (chemische Ionisation (CI), engl.: *chemical ionization*) genutzt [2]. Diese gilt als weichere Ionisationsmethode als die EI und liefert dem Anwender häufig eine direkte Information über die Molekülmasse [3]. Die Ionisation erfolgt durch unterschiedliche, bimolekulare Ion-Molekül-Reaktionen (Protonentransfer¹, elektrophile Addition, Anionenabstraktion oder Ladungsaustausch) in der Gasphase (Gleichungen R 1.2 bis R 1.5 [3]). Für diese Reaktionen wird ein ionisiertes Reaktandgas (z. B. Methan, Butan, Ammoniak u. a.) benötigt, das den neutralen Analyten M ionisiert [3].



Neben der Ionisation durch Elektronen oder geladene Moleküle kann in der HV-Ionisation auch

¹bspw. von einem Reaktandgasion der Form $[BH]^+$

eine Wechselwirkung mit einem oder mehreren energiereichen Photonen zur Bildung von Ionen führen [4]. Bei ausreichend hoher bzw. überschüssiger Photonenenergie tritt gegebenenfalls eine Fragmentation des Analyten auf [19]. Bekannte Photoionisationsverfahren sind die *laser microprobe mass spectrometry* (LAMMA) oder die resonanzverstärkte Multiphotonionisation (engl.: *resonance-enhanced multi-photon ionization*, REMPI). Zur Photoionisation werden häufig Laser als Photonenquellen verwendet. Da diese oftmals gepulst betrieben werden, bietet sich eine Kopplung mit ebenfalls gepulsten Massenspektrometern wie dem (TOF)MS an [4, 20].

1.1.3 Atmosphärendruckionisationsmethoden

Der Arbeitsdruck eines Massenanalysators liegt allgemein in einem Bereich von etwa 10^{-4} bis 10^{-5} Pa [21]. Die Kopplung der Ionisationen bei Atmosphärendruck (ca. 10^5 Pa) an ein Massenspektrometer stellt aufgrund des großen Druckunterschiedes eine Herausforderung dar [22]. Zum Aufrechterhalten des Vakuums muss die Menge an eintretendem Gas in das MS begrenzt sein, zeitgleich aber einen ausreichenden Transfer der Ionen gewährleisten [21]. Besonders die Kopplung mit flüssigchromatographischen Trennungssystemen führt zu großen Mengen an gasförmigen Lösungsmitteln, die von den Ionen abgetrennt werden müssen. Beide Bedingungen werden zum einen durch sogenannte differentielle Pumpstufen und zum anderen durch das Design moderner Atmosphärendruckionisations- (API)-Quellen erreicht, bei denen die Ionen über elektrische Felder oder fluiddynamisch in das Massenspektrometer eingebracht werden. Eine Anforderung an die API ist, dass möglichst viele Molekülklassen (polare bis unpolare Analyten) ionisiert werden können. Hierfür wurden in der Forschung viele Ionisationsquellen entwickelt, von denen allerdings nur wenige eine breite Akzeptanz gefunden haben [21]. Die kommerziell erfolgreichsten AP-Ionisationsmethoden, insbesondere für die LC-MS, sind die Elektrosprayionisation (ESI) und die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (engl.: *atmospheric-pressure chemical ionization*, APCI) [21], die nachfolgend neben den neueren Entwicklungen APPI (Atmosphärendruckphotoionisation, engl.: *atmospheric-pressure photo ionization*) und APLI (Atmosphärendrucklaserionisation, engl.: *atmospheric-pressure laser ionization*) beschrieben werden.

1.1.3.1 ESI

Im Jahr 1984 wurden die ersten ESI-MS-Applikationen von FENN vorgestellt, für die er im Jahr 2002 den Chemie-Nobelpreis bekam [3, 21, 23, 24]. FENN nutzte für seine Arbeiten eine geerdete Stahlkapillare und eine zylindrische Gegenelektrode an einer Hochspannungsversorgung [21, 25]. Beim ESI-Prozess liegt zwischen der (Sprüh-)Kapillare und der Gegenelektrode ein Potential von ca. 3 bis 4 kV an, und oftmals wird zur Unterstützung des Sprühprozesses sowie zur Bildung eines feinen Nebels die Nadel mit einem Gasstrom umspült. Die hohe elektrische Feldstärke an der Kapillarspitze führt zu einer partiellen Trennung der positiv und negativ geladenen Ionen der Lösung und zur Ausbildung eines für den positiven ESI-Prozess

mit Kationen angereicherten Meniskus, dem sogenannten Taylorcone. Der Überschuss an positiven Ladungsträgern führt zu einer Instabilität des Meniskus, der dadurch Analyt enthaltene, geladene Tröpfchen freisetzt [26]. Das im entstehenden sogenannten Elektrospray enthaltene Lösungsmittel wird – oftmals unterstützt – von einem warmen, gegenfließenden Stickstoffstrom (Drygas genannt) verdampft [3]. Die geladenen Tröpfchen verlieren so stetig Lösungsmittel und die letztlich freiwerdenden, durch Ladungsübertragung ionisierten Analyten werden dem Massenspektrometer (durch attraktive elektrische Potentiale) zugeführt [3, 27].

Die ESI gilt als weiche Ionisationsmethode, mit der hauptsächlich einfach geladene protonierte Molekülonen ($[M+H]^+$), deren Analoga mit mehreren Ladungen oder deprotonierte Ionen erhalten werden [3, 21, 28]. Sie eignet sich zur effektiven Ionisation von kleinen Analyten wie quarternären Aminen, Phospholipiden, ionischen Metallkomplexen oder einfachen, leicht ladungsannehmenden anorganischen und organischen Verbindungen sowie hervorragend für die Ionisation von großen, bis zu mehreren hunderttausend Dalton (Da) schweren Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden und Nucleinsäuren [3, 18]. Allgemein lassen sich mit Hilfe der ESI nicht- oder schwerflüchtige, thermolabile und mittel- bis sehr polare Analyten als Ion zur massenspektrometrischen Analyse in die Gasphase überführen [21].

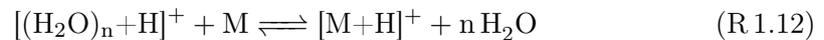
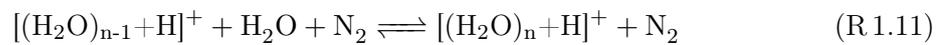
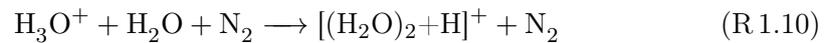
In Verbindung mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) als Trennmethode konnte die ESI mit allen Massenanalysatoren (z. B. Quadrupol-, Ionenfallen- und (TOF)MS gekoppelt werden [15, 29–32]. Durch den breiten Anwendungsbereich, die gute Sensitivität und Präzision ist die ESI das bekannteste und meistgenutzte Ionisationsverfahren für die AP-Massenspektrometrie [3, 33], deren Anwendbarkeit und analytische Leistungsfähigkeit sie entscheidend beeinflusst und vorangetrieben hat [28].

1.1.3.2 APCI

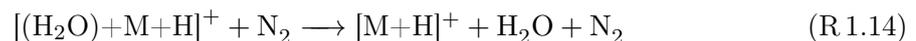
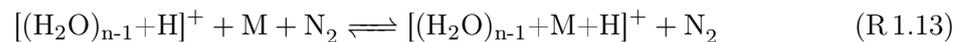
Neben der ESI existieren weitere AP-Ionisationsmethoden. Die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) – wie die ESI eine weiche Ionisationsmethode [18] – ermöglicht die Analyse kleiner bis mittlerer, semipolarer Analyten und bedient sich dabei der chemischen Ionisation in der Gasphase zur Bildung von protonierten Molekülonen ($[M+H]^+$) [18]. Chemische Ionisationen sind abhängig von der Anzahl stattfindender Stöße. Daher wird mit der APCI – im Unterschied zur klassischen CI unter Hochvakuumbedingungen – eine größere Anzahl Ionen pro Zeiteinheit gebildet und somit eine erhöhte Empfindlichkeit erreicht, da unter AP-Bedingungen mehr Stöße pro Zeit- und Volumeneinheit stattfinden können.

Entwickelt wurde die APCI im Jahr 1973 von HORNING für die LC-MS-Kopplung, bei der eine radioaktive ^{63}Ni -Quelle zur Erzeugung der benötigten Primärlonen genutzt wurde [3, 21, 34]. Heutzutage erfolgt die Ionenerzeugung durch eine Koronaentladung an einer Punktelektrode, die häufig eine Nadelform aufweist. Die Effizienz bzw. die Ionenausbeute konnte durch diese Weiterentwicklung signifikant (um ca. einen Faktor 100 [35]) erhöht werden [3]. An der in die AP-Ionenquelle ragende Nadel wird ein hohes elektrisches Potential angelegt, was zu starken Feldgradienten an der Nadelspitze und zur Ausbildung der Koronaentladung führt. Die im elektrischen Feld stark beschleunigten Elektronen führen u. a. zur Ionisation von

Stickstoff. Die entstehenden Radikalkationen des Stickstoffs ($N_2^{+\cdot}$) beginnen eine komplexe Ion-Molekülreaktionskaskade (siehe Gleichungen R 1.6 bis R 1.12), die über entstehende protonengebundene Wassercluster ($[(H_2O)_n+H]^+$) in der Bildung eines protonierten Molekülions ($[M+H]^+$) des – über ein Thermospray in die Quelle eingebrachten – Analyten mündet [3, 16, 34].



Dieser Reaktionsweg stellt die bislang in der Literatur anerkannten Vorgänge für diese Ionisation dar. Nach neuen Erkenntnissen findet Reaktion R 1.12 nur statt, wenn die Acidität des Clusters groß genug ist, um eine direkte Protonierung des Analyten M zu ermöglichen, was i. d. R. unter den gegebenen Bedingungen in AP-Ionenquellen nicht der Fall ist. Vielmehr kann der Mechanismus durch Gleichung R 1.13 erweitert werden. Hiernach wird das Analytmolekül zunächst in einen protonengebundenen Wassercluster eingelagert (z. B. durch Ligandenaustausch oder Ligandenanlagerung), um anschließend im Transmissionsbereich des Massenspektrometers nach erfolgten Clusterabbaureaktionen durch CID als protoniertes Molekülion zu verbleiben (Gleichung R 1.14) [36].



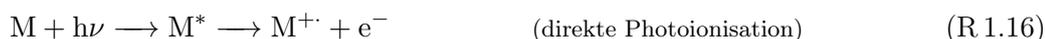
Wichtig für den Ionisationsprozess bei APCI ist das Vorhandensein des Analyten in der Gasphase, da nur dort die oben beschriebenen Reaktionen stattfinden [28]. Das erwähnte Thermospray wird dabei durch einen beheizbaren, pneumatisch assistierten Sprayer erzeugt und u. a. für die Kopplung der HPLC an die APCI genutzt [37–39]. Im Gegensatz zur ESI, die im Grunde nur für flüssigchromatographische Trennstufen Verwendung findet, kann die APCI zusätzlich in Kombination mit der Gaschromatographie [40] eingesetzt werden. Bekannte Anwendungen der GC-APCI sind Analysenverfahren für mittelpolare Verbindungen wie Pestizide [41, 42], Pharma- und Umweltproben [43]. Zudem kann die APCI in Kombination mit der superkritischen Flüssigkeitschromatographie (SFC) [44, 45] und der Kapillarelektrophorese (engl.: *capillary electrophoresis*, CE) [35, 46, 47] eingesetzt werden.

1.1.3.3 APPI

Sowohl die ESI als auch die APCI ionisieren unpolare Substanzen nur unzureichend gut [28]. Die APPI ergänzt diese Lücke im Anwendungsspektrum der AP-Methoden und ermöglicht eine Ionisation unpolarer Analyten [48]. Die APPI wurde im Jahr 2000 von SYAGE [49] und unabhängig davon im selben Jahr von ROBB [50] als Ionisationsmethode für die Massenspektrometrie vorgestellt [51]. Die erste Photoionisation wurde jedoch bereits im Jahr 1976 für die Kopplung mit einem GC [48, 52–54] entwickelt und 1982 um eine Kopplung mit der LC erweitert [48, 55, 56]. Neben der Massenspektrometrie wird die APPI auch für die Ionen-Mobilitäts-Spektrometrie (IMS) als Ionisationsmethode eingesetzt [48, 51]. Als Photonenquellen werden verschlossene Gasentladungslampen eingesetzt, deren emittierte Photonen Energien um etwa 10 eV besitzen (Vakuum-UV-Bereich), wie die häufig genutzte Krypton-Entladungslampe (Emission bei 10,0 und 10,6 eV) [28]. Weitere Lampentypen nutzen beispielsweise H₂ (10,2 eV), Ar (11,2 eV) oder Xe (8,4 eV) als Lampengase [3, 48, 50, 52].

Analog zu APCI und ESI ist die APPI eine weiche Ionisationsmethode, bei der die gebildeten Ionen selten fragmentieren [48]. Vielfach wurde die APPI bereits für die Analyse von Pestiziden, Carbamaten, Phenylharnstoffen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und weiteren Verbindungen sowohl in Kombination mit Flüssigkeitschromatographie (LC), GC, CE oder auch SFC eingesetzt [35, 48–50, 57–61].

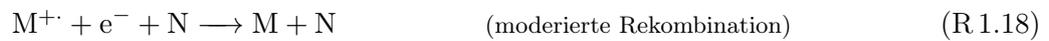
Der Aufbau einer APPI-Ionenquelle für die LC-Kopplung gleicht dem einer APCI-Quelle. Beide nutzen einen beheizbaren, pneumatisch assistierten Sprayer, um das Eluat in die Gasphase zu überführen. Lediglich die Koronaentladung wird durch die VUV-Lampe ersetzt [3]. Die Analyt-ionisation bei der APPI ist folglich differenziert zur APCI zu betrachten. Die AP-Photoionisation verläuft hauptsächlich indirekt über Reaktionen mit photoionisierten Lösungsmittelmolekülen oder anderen, zugesetzten Verbindungen (Dopanten) zu protonierten Molekülonen ($[M+H]^+$) und nur vereinzelt über eine direkte Photoionisation des Analyten zum Radikalkation (M^+) [48]. In vielen Fällen ist die Photonenenergie kleiner als die Ionisationsenergie der entsprechenden Verbindung, wodurch lediglich eine elektronische Anregung erfolgt (Gleichung R 1.15). Der seltenere Fall der direkten Photoionisation ist in Gleichung R 1.16 dargestellt [3]. Im Falle der direkten Photoionisation verläuft die Ionisationsreaktion bei der APPI als Einphotonenionisationsprozess.



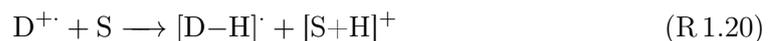
Hierbei kann M ein Analyt-, Lösungsmittel- oder Dopantmolekül sein. Die direkte Ionisation erfolgt, wenn die Photonenenergie größer als die Ionisierungsenergie von M ist und das angeregte Molekül M* nicht vor der Ionisation durch Photorelaxation, Photodissoziation oder Stoßlöschung² verloren geht. Zur Optimierung des Ionisationsprozesses wird bei der APPI oft-

²Diese Reaktionsgleichungen werden hier nicht weiter aufgeführt. Es wird dazu auf die einschlägige Literatur verwiesen [3, 48]

mals ein Dopant (teilweise in großem Überschuss) eingesetzt, da die direkte Ionisation eines Analyten durch Photonenabsorption der Matrixmoleküle nur eine geringe Effizienz aufweist. Der Dopant hat hierbei die Aufgabe, als Intermediat die Analyten über Protonenabgabe oder Ladungsaustausch zu ionisieren und so die Zahl der erzeugten Analytionen signifikant zu erhöhen [48]. Für zugesetzte Dopanten (D) müssen diese Bedingungen erfüllt sein, damit eine nachfolgende, indirekte Ionisation der Analyten erfolgen kann³. Zudem sollten die gebildeten Dopantionen eine hohe Rekombinationenergie und eine niedrige Protonenaffinität aufweisen, um weiterführenden Reaktionen zur Verfügung stehen zu können [48]. Der Verlust gebildeter Radikalkationen $M^{+\cdot}$ über die genannten Rekombinationsprozesse kann durch die Gleichungen R 1.17 und R 1.18 für die Autorekombination bzw. die moderierte Rekombination mit einem Stoßpartner N erfolgen [3].



In der Literatur werden die bereits angesprochenen, indirekten Reaktionen mit Lösungsmittelmolekülen oder zugesetzten Dopanten mithilfe der Gleichungen R 1.19 bis R 1.21 beschrieben [3, 48, 62]. Eine nach Gleichung R 1.16 erfolgte Ionisation eines Dopanten D zum Radikalkation $D^{+\cdot}$ kann demnach durch Ladungsübertragung zu einem erwünschten Radikalkation $M^{+\cdot}$ des Analyten M führen (Gleichung R 1.19). Ein ebenfalls erwünschter, möglicher zweiter Weg, um zu einem Analytion zu gelangen, ist die Bildung des protonierten Molekülions $[M+H]^+$ durch eine Reaktand-Ionen-Bildung mit einem Lösungsmittelmolekül S (Gleichung R 1.20), gefolgt von einem Protonentransfer auf den Analyten M (Gleichung R 1.21).



Diese einfachen, direkten Mechanismen zur Ionisierung des Analyten M bei APPI sind allerdings eher auf die Bauweise der Ionen-Transmissionsbereiche moderner Massenspektrometer zurückzuführen [36]. Isolierte Ionen bilden in der wasserhaltigen Gasphase einer AP-Ionenquelle sehr schnell Wassercluster, sodass – wie bereits beim APCI-Ionisationsprozess – Gleichung R 1.21 zunächst um die Bildung von protonengebundenen Analyt-Wasserclustern erweitert werden muss (vgl. Gleichung R 1.13), da die Gasphasenacidität des $[S+H]^+$ (genauer: $[S_n+H]^+$ mit $n \geq 4$) im Allgemeinen nicht ausreicht, um den Analyten M direkt zu protonieren. Die Bildung eines freien Analytions erfolgt dann wiederum im Transmissionsbereich des Massenspektrometers durch Clusterabbaureaktionen nach Gleichung R 1.14 [36].

Ob mit der APPI Radikalkationen oder protonierte Molekülionen detektiert werden, hängt stark von der Kombination aus verwendeter Lichtquelle, Lösungsmittel, zugesetztem Dopan-

³Oftmals eingesetzte Dopanten sind Toluol, Aceton oder Anisol [50, 51, 62].

ten und letztlich auch vom Analyten selbst ab. Basische Moleküle zeigen vermehrt Bildung von protonierten Molekülionen, während unpolare Analyten tendenziell eher Radikalkationen bilden. Vielfach können jedoch beide Ionenarten beobachtet werden [3, 28].

1.1.3.4 APLI

Eine weitere bei Atmosphärendruck operierende Photoionisationsmethode ist die im Jahr 2005 an der Bergischen Universität Wuppertal entwickelte APLI [28, 63]. Die APLI erweitert die bestehenden AP-Ionisationsmethoden um einen selektiven Ionisationsprozess für einfache, polymere oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) bzw. Hetero-PAK [28]. Für diese Substanzklassen gilt die APLI als ultra-sensitiv [28, 54, 64]. Mittlerweile ist der Einsatzbereich der APLI jedoch nicht nur auf mittel- bis unpolare aromatische Systeme beschränkt. Polare aliphatische Verbindungen wie z. B. Alkohole, Amine, Carbonsäuren oder Aminosäuren) sind durch Derivatisierungsreaktionen mit Anthracen-basierten Ionisationslabellen ebenfalls zugänglich [65–67].

Das Ionisationsprinzip der APLI zur Bildung von Primärionen basiert, im Gegensatz zur Einphotonenionisation in der APPI, auf einem resonanzverstärkten Zwei-Photonen Ionisationsprozess ((m+n)-REMPI mit $m = n = 1$) mit weniger energiereichen Photonen des nahen UV-Bereichs [28]. Der Ionisationsprozess führt nur zu einer geringen Überschussenergie der Analytmoleküle in der APLI. Zudem kann diese Energie stoßkontrolliert an Umgebungsgase in der Ionenquelle abgegeben werden [68]. Das Schema dieser Ionisation kann durch die Gleichungen R 1.22 und R 1.23 [28, 51, 54] beschrieben werden.



Im ersten Schritt erfolgt die resonante Anregung (Photon m) in einen relativ langlebigen Übergangszustand (M^*). Bei ausreichend hohen Photonendichten (größer 1 MW cm^{-2}), wie sie von Lasern bereitgestellt werden [69], erfolgt aus diesem Zustand innerhalb der Lebensdauer durch Absorption eines zweiten Photons n die Bildung eines Radikalkations ($M^{+\cdot}$) [28]. Dieses stellt das hauptsächlich detektierte Ion für einen Großteil der mit APLI ionisierbaren Analyten dar [28, 66]. Durch verschiedene, dem Ionisationsprozess nachgelagerte und davon unabhängige, Prozesse kann es zur Bildung anderer Spezies als dem Radikalkation kommen. Substanzen, die eine hohe Gasphasenbasizität aufweisen, wie z. B. Nicotin oder 7,9-Dimethylbenz[c]acridin (7,9-DMBA), neigen durch Reaktionen mit Protonendonatoren zur Bildung von protonierten Molekülionen ($[M+H]^+$). Fragmentierung wird bei APLI als Ionisationsprozess generell nicht beobachtet [70]. Dennoch können aus nachgelagerten Prozessen, bspw. im Einlassbereich des Massenspektrometers, durch CID Fragmente gebildet werden [68, 71].

Im Gegensatz zur klassischen REMPI findet bei der APLI die resonante Zwei-Photonenionisation jedoch nicht im Vakuum, sondern unter Atmosphärendruck statt. Bei der Expansion ins Vakuum (im sogenannten Jet) kühlen die Analyten adiabatisch ab. Die rovibronische Tem-

peratur liegt für gewöhnlich unter etwa 10 K [28]. Dies führt bei der Jet-REMPI zu scharfen UV-Übergängen zwischen Molekülzuständen [72]. Die rovibronische Abkühlung entfällt für die Laserionisation bei Atmosphärendruck, sodass die Moleküle durch überlappende, angeregte rotatorische und vibronische Zustände über sehr breite Absorptionsbanden verfügen [72], was den Einsatz festfrequenter Hochleistungslaser mit sehr großen Energiedichten ermöglicht [20, 28].

Besonders aromatische Kohlenwasserstoffe lassen sich so sehr selektiv und effizient über (1+1)-REMPI-Prozesse ionisieren [20, 28]. Sie besitzen große, lineare Absorptionsquerschnitte im nahen UV-Bereich sowie relativ langlebige Übergangszustände [28]. Besonders polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe haben hohe Zustandsdichten im Bereich von 4 bis 7 eV [68]. Ihre Ionisierungsenergien (IE) liegen nur knapp darüber (z. B. $IE_{(Naphthalin)}$ 8,1 eV, $IE_{(Anthracen)}$ 7,4 eV [3]) und unter 10 eV, wodurch die Kombination zweier Photonen eines KrF*-Excimerlasers ($\lambda = 248$ nm, entspricht 5 eV) zur schonenden Ionisation ausreicht. Die meisten gängigen Lösungsmittel, z. B. solche, die als mobile Phase in der HPLC genutzt werden, oder die in einer AP-Ionisationsquelle vorhandenen Gase besitzen keine erreichbaren Übergangszustände im nahen UV-Bereich, sodass diese transparent für die (meisten) bei der APLI eingesetzten Laserwellenlängen sind [63]. Neben dem KrF*-Excimerlaser können für die APLI auch ArF* ($\lambda = 193$ nm), XeCl* ($\lambda = 308$ nm) oder frequenzvervielfachte Nd:YAG-Laser (Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat, $\lambda = 266$ nm) eingesetzt werden [63, 73]. Eine schematische Übersicht über die Photonenanregung von einfachen Aromaten, polyzyklischen Aromaten und gängigen Lösungsmitteln ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

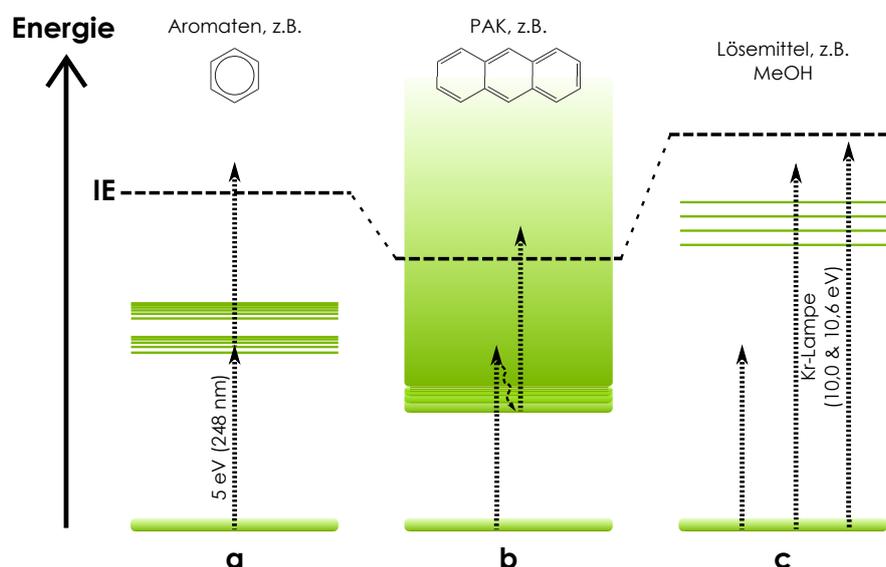


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Photonenanregung / -ionisation

Eine Kombination der APLI mit geeigneten Massenanalytoren erlaubt eine selektive und ultra-sensitive Analytik für PAK. Vorgeschaltete chromatographische Trennstufen erhöhen zudem die Leistungsfähigkeit der APLI-MS als Analysenmethode. HPLC [28, 74], GC [54,

74] und CEC [51] konnten als Trennmethode erfolgreich mit APLI-MS gekoppelt werden. APLI wurde zudem bereits als Ionisationsmethode an verschiedenen Massenspektrometern ((TOF)MS, Iontrap und FT-ICR) eingesetzt [74–76].

1.2 Superkritische Flüssigkeitschromatographie

Die Gaschromatographie und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zählen nicht zuletzt durch ihr weit gefasstes Einsatzfeld und ihren häufigen Gebrauch zu den ultimativen Standardmethoden in der chemischen Analytik. In nahezu jedem Bereich der analytischen Chemie sind diese beiden Methoden anzutreffen. Es existieren jedoch für einige spezielle Anwendungen noch weitere Trenntechniken. Für schnelle qualitative Aussagen über Synthesumsätze wird die Dünnschichtchromatographie verwendet. Viele Trennungen lassen sich auch mit der Kapillarelektrophorese und deren Varianten realisieren. Eine in den letzten Jahren wieder aufkeimende Nischentechnik ist die superkritische Flüssigkeitschromatographie (engl.: *supercritical-fluid chromatography*). Sie ist eine der neuesten chromatographischen Trenntechniken, die in der modernen Wissenschaft eingesetzt werden [77]. Das Interesse an der SFC und ihren Applikationsmöglichkeiten nimmt seit einigen Jahren vermehrt zu [78].

1.2.1 Der superkritische Zustand

Im Gegensatz zu den klassischen Chromatographiemethoden HPLC und GC wird in der superkritischen Flüssigkeitschromatographie (SFC) eine mobile Phase genutzt, deren thermodynamischer Zustand als über- bzw. superkritisch bezeichnet wird [79]. Das bedeutet, dass sowohl die kritische Temperatur T_{krit} als auch der kritische Druck p_{krit} überschritten sind. Einige Daten ausgewählter superkritischer Substanzen sind in Tabelle 1.1 gegenübergestellt.

Tabelle 1.1: Daten ausgesuchter superkritischer Substanzen — entnommen aus [80–83]

	T_{krit} [°C]	p_{krit} [MPa]	ρ_{krit} [g mL ⁻¹]
CO₂	31,0	7,38	0,47
N₂O	36,4	7,26	0,45
SF₆	45,5	3,77	0,74
NH₃	132,4	11,35	0,24
n-Butan	152,0	37,5	0,23
n-Pentan	196,6	3,37	0,23
H₂O	374,4	22,2	0,31

In einem Phasendiagramm bilden T_{krit} und p_{krit} den sogenannten kritischen Punkt. Wie in

Abbildung 1.2 im schematischen Phasendiagramm für Kohlenstoffdioxid zu erkennen, ist keine klare Phasengrenze zwischen der Gas- und der flüssigen Phase oberhalb des kritischen Punktes eingezeichnet. Dies entspricht auch dem realen Verhalten: Bei überkritischen Fluiden gleichen sich die Dichten der Flüssigkeit und des Gases an, wodurch eine Unterscheidung zwischen den beiden Phasen nicht mehr möglich ist [83].

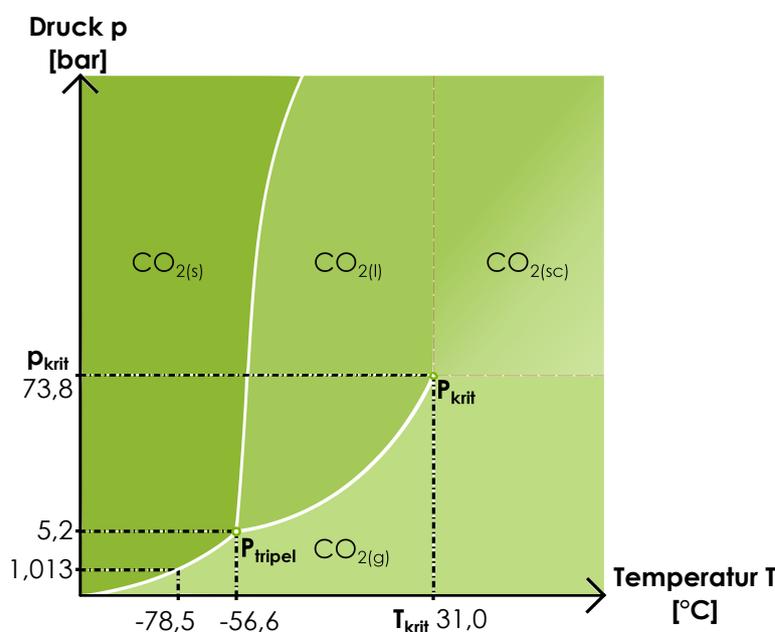


Abbildung 1.2: Phasendiagramm von CO₂

Die erste Entdeckung des überkritischen Zustands im Jahr 1822 geht auf den französischen Physiker DE LA TOUR zurück [79, 84]. ANDREWS war der erste, der eine vollständige Beschreibung der Druck-Volumen-Temperaturbeziehung von CO₂ lieferte [83, 85]. Gegenüber einer Flüssigkeit zeichnet sich der überkritische Zustand durch eine geringere Dichte, niedrigere Viskosität und erhöhte Diffusionskoeffizienten aus [86]. Ein Vergleich der Dichte, Viskosität und Diffusionskoeffizienten von Gasen, Flüssigkeiten und superkritischen Fluiden ist in Tabelle 1.2 gegeben.

Die Dichte eines superkritischen Fluids liegt zwischen der Dichte eines Gases und einer Flüssigkeit. Zudem ist sie über den Druck (wie bei einem Gas) einstellbar [7]. Das Lösungsvermögen, welches von der Dichte und der Temperatur abhängig ist [7, 79], ist verglichen mit dem eines Gases bei einem superkritischem Fluid außerordentlich stark erhöht (etwa drei Größenordnungen) [87, 88]. Es ist somit in etwa so stark wie das Lösungsvermögen einer Flüssigkeit. So löst beispielsweise superkritisches CO₂ ohne weiteres Alkane mit über 30 Kohlenstoffatomen, Di-*n*-alkylphthalate mit Alkylkettenlängen von bis zu 16 C-Atomen sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [82]. Viele industrielle und analytische Extraktionsprozesse werden seit längerer Zeit mit superkritischem CO₂ durchgeführt und sind unter dem Begriff superkritische Flüssigkeitsextraktion (engl.: *supercritical-fluid extraction*) (SFE) bekannt [89–

91]. Hierunter fallen bspw. die Koffeinextraktion aus Kaffeebohnen [79, 92, 93], die Extraktion von Hopfen [93] oder die Nicotinextraktion aus Tabak [94].

Tabelle 1.2: Vergleich der charakteristischen Stoffdaten von superkritischen Fluiden, Gasen und Flüssigkeiten — entnommen und geändert aus [82]

	Gas	superkritisches Fluid	Flüssigkeit
Dichte [g cm ⁻³]	$0,6 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-3}$	0,2 - 0,5	0,6 - 2
Viskosität [g cm ⁻¹ s ⁻¹]	$1 \cdot 10^{-4} - 3 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4} - 3 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-2} - 3 \cdot 10^{-2}$
Diffusionskoeffizient [cm ² s ⁻¹]	0,1 - 0,4	$10^{-4} - 10^{-3}$	$0,2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-5}$

1.2.2 Chromatographie mit superkritischen mobilen Phasen

Das gute Lösungsverhalten von superkritischen Fluiden kann auch für die Chromatographie genutzt werden. Allgemein gilt die SFC als eine *Hybridtechnik*⁴ zwischen Gas- und Flüssigkeitschromatographie, die die Vorteile beider Methoden vereint [95, 96] und Defizite beider Methoden ausgleicht [97]. Die SFC soll die Analyten annähernd mit der Gasgeschwindigkeit einer GC vorantreiben und dabei die Analyten solvatisieren wie die Flüssigkeit einer HPLC [98].

In der Gaschromatographie führen die sehr hohen Diffusionskoeffizienten und die geringe Viskosität der Gase zu einer sehr großen Trenneffizienz. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die Anwendbarkeit mit sensitiven, selektiven oder universellen Detektoren. Nicht-flüchtige und/oder thermisch instabile Analyten lassen sich jedoch nicht mit der GC analysieren⁵. In diesem Fall kann die HPLC oder die SFC als Trennmethode in Betracht gezogen werden [80]. Verglichen mit der HPLC sind chromatographische Trennungen mit der SFC effizienter und schneller [99, 100]. Die kurze Equilibrierungszeit zwischen zwei Analysen sowie ein höherer Probendurchsatz durch schnellere Analysenläufe führen zu kurzen Analysezyklen und somit zu geringeren Kosten [101]. Die HPLC produziert stündlich zwischen wenigen mL (bei der nano-HPLC) und etwa 250 mL (bei der LC×LC) Lösungsmittelabfall, der aufwändig und kostenintensiv entsorgt werden muss. Zudem müssen hierfür hochreine und somit teure Lösungsmittel angeschafft werden. Insbesondere beim Betrieb der SFC mit dem nur sehr gering toxischen und auch in hoher Reinheit relativ kostengünstigen CO₂ entfallen diese Entsorgungskosten für die teils giftigen Abfälle fast vollständig, da das CO₂ der mobilen Phase nach der Expansion in die Gasphase übergeht [102]. Lediglich der geringe Zusatz an organischem

⁴vgl. Stoffdaten superkritischer Fluide in Tabelle 1.2

⁵LEE und MARKIDES schätzten 1987, dass nur etwa 15% aller bekannten Substanzen mit GC analysierbar sind [80]

Modifier (unter 20 mL h^{-1})⁶ fällt zur Entsorgung an. Zu einem zusätzlichen Treibhauseffekt trägt das freiwerdende CO_2 nicht bei, da es zuvor bereits aus der Atmosphäre zurückgewonnen wurde [100] oder direkt recycled wird [88].

Die Trenneffizienz der SFC wird unter anderem durch die geringe Viskosität sowie die etwas größeren Diffusionskoeffizienten (vgl. Tabelle 1.2) gesteigert. Die niedrige Viskosität eines superkritischen Fluids ermöglicht eine viel höhere Flussrate (bei gleichzeitig geringem Gegen- druck) durch die chromatographische Säule als die mobile Phase in der HPLC [95]. Trotz der höheren linearen Fließgeschwindigkeit führen die erhöhten Diffusionskoeffizienten superkritischer Fluide dazu, dass sich das chromatographische Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase schneller einstellt als in der HPLC [79]. Die Trenneffizienz der SFC ist folglich besser. Ein Vergleich der Trennleistungen zwischen HPLC, SFC und GC liefert ein sogenannter VAN DEEMTER-Plot. Dieser beschreibt auf Grundlage der VAN DEEMTER-Gleichung (Gleichung 1.4) die Abhängigkeit der theoretischen Trennstufenhöhe (HETP, engl.: *height equivalent to a theoretical plate*) von der linearen Fließgeschwindigkeit einer mobilen Phase für chromatographische Verfahren.

$$\text{VAN DEEMTER-Gleichung:} \quad \text{HETP} = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u} \quad \text{nach [103]} \quad (1.4)$$

mit: HETP = theoretische Trennstufenhöhe, A = Koeffizient der Eddy-Diffusion, B = Längsdiffusionskoeffizient, C = Massenaustauschverzögerung und \bar{u} = durchschnittliche lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase

Hiervon abgeleitet wurde die GOLAY-Gleichung (Gleichung 1.5). Diese gilt für offene Kapillarsäulen, wodurch der Term für die Eddy-Diffusion entfällt. Sie stellt eine vereinfachte Form der VAN DEEMTER-Gleichung dar und ermöglicht die Berechnung einer theoretischen Trennstufenhöhe H_{Golay} für offene Kapillarsäulen.

$$H_{\text{Golay}} = \frac{B}{\bar{u}} + C_s \cdot \bar{u} + C_m \cdot \bar{u} \quad \text{nach [103, 104]} \quad (1.5)$$

mit: H_{Golay} = theoretische Trennstufenhöhe nach GOLAY (in mm), B = Längsdiffusionskoeffizient (in $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$), \bar{u} = durchschnittliche lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (in mm s^{-1}), C_s = Massenaustauschverzögerung mit der stationären Phase (in s) und C_m = Massenaustauschverzögerung mit der mobilen Phase (in s)

Bei Kapillarsäulen in der GC, die nur mit einem dünnen Film als stationärer Phase belegt sind, ist $C_s \ll C_m$. Der Einfluss des Massenaustauschs mit der stationären Phase ist sehr viel

⁶10 % Modifier bei einer Flussrate von $2,5 \text{ mL min}^{-1}$

kleiner als der mit der mobilen Phase und somit vernachlässigbar. Für die SFC gilt diese Vereinfachung ebenfalls, da hier die Diffusionskoeffizienten des superkritischen Fluids viel kleiner sind als die eines Gases [104]. Gleichung 1.5 kann dann zu Gleichung 1.6 reduziert werden.

$$H_{\text{Golay, vereinfacht}} = \frac{B}{\bar{u}} + C_m \cdot \bar{u} \quad \text{nach [104]} \quad (1.6)$$

Werden die Terme für B und C_m genauer aufgeschlüsselt, ergibt sich die vereinfachte, erweiterte GOLAY-Gleichung (Gleichung 1.7).

$$H_{\text{Golay, vereinfacht}} = \frac{2 \cdot D_m}{\bar{u}} + \frac{1 + 6k + 11k^2}{96(1 + k)^2} \cdot \frac{d_c^2}{D_m} \cdot \bar{u} \quad \text{nach [103]} \quad (1.7)$$

mit: $H_{\text{Golay, vereinfacht}}$ = vereinfachte, theoretische Trennstufenhöhe nach GOLAY (in mm), D_m = Diffusionskoeffizient der mobilen Phase (in $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$), \bar{u} = durchschnittliche lineare Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (in mm s^{-1}), k = Retentionsfaktor und d_c = Innendurchmesser der Kapillarsäule (in mm)

Auf Grundlage dieser Gleichung sind in Abbildung 1.3 die vereinfachten, theoretischen Trennstufenhöhen für HPLC, SFC und GC exemplarisch für die Kapillarchromatographie (angenommener Kapillar-ID = 0,05 mm) in Abhängigkeit der typischen, linearen Fließgeschwindigkeiten halblogarithmisch aufgetragen und dargestellt. Für die numerischen Lösungen der Gleichung 1.7 wurden ein Retentionsfaktor k von 0,75 sowie Diffusionskoeffizienten D_m von $2 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ (für die HPLC), $1 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ (für die SFC) und $10 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ (für die GC) gewählt.

Die optimale Fließgeschwindigkeit u_{opt} der Kapillarchromatographie, also die Lage der minimalen Trennstufenhöhen, hängt hier, bedingt durch die Wahl konstanter Werte für k und d_c , nur noch von den Diffusionskoeffizienten D_m der verschiedenen Trenntechniken ab. u_{opt} ist bei der Kapillar-GC um mehrere Größenordnungen gegenüber der (Kapillar-)HPLC und der (Kapillar-)SFC erhöht, da hier auch die Diffusionskoeffizienten der mobilen Phase am größten sind. Gleiches gilt für die SFC im Vergleich zur HPLC. Bei einer Chromatographie mit gepackten Säulen werden die Trennstufenhöhen in Anlehnung an die VAN DEEMTER-Gleichung größer, da hier die Eddy-Diffusion hinzukommt [103, 105, 106]. Aus Abbildung 1.3 ist ersichtlich, dass die SFC bei gleicher Trennleistung deutlich schnellere Trennungen ermöglicht als die HPLC. Ist eine Analyse mittels GC wegen zu geringer Flüchtigkeit der Analyten nicht möglich und eine Trennung mit der HPLC nicht ausreichend, kann die SFC eingesetzt werden [7].

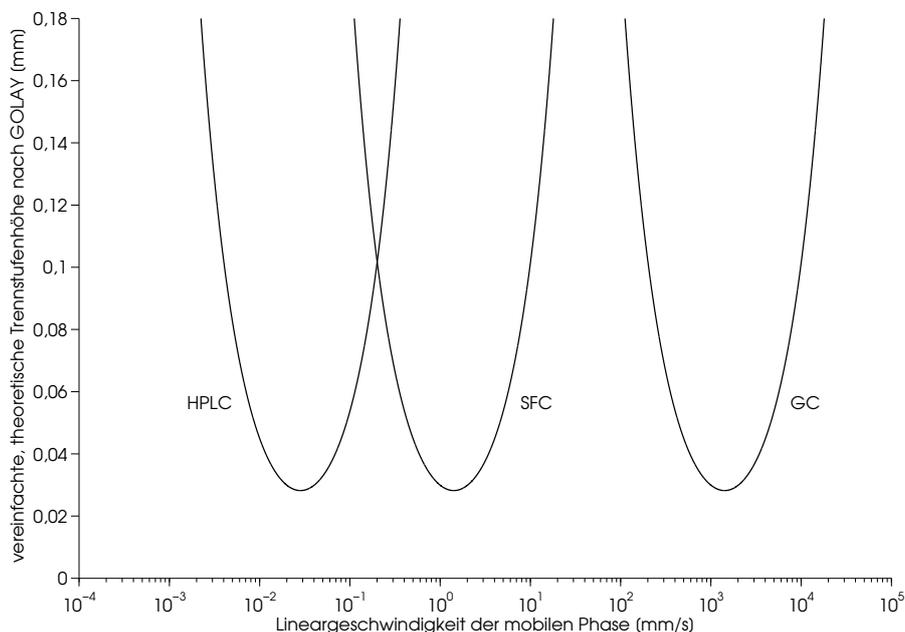


Abbildung 1.3: Vereinfachte, theoretische Trennstufenhöhen verschiedener chromatographischer Verfahren in Abhängigkeit der linearen Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase; berechnet für Kapillaren mit 0,05 mm ID, Diffusionskoeffizienten D_m von HPLC: $2 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, SFC: $1 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ und GC: $10 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$, Retentionsfaktor $k = 0,75$ [79, 82, 97]

1.2.3 Entwicklung der SFC

Die erste chromatographische Trennung mit superkritischen Fluiden als mobile Phase auf einer gepackten Säule wurde im Jahr 1962 von KLESNER, CORWIN und TURNER vorgestellt [107]. Erwähnenswerte Weiterentwicklungen gab es bis zu den frühen 1980er Jahren nicht [89]. In den Jahren 1981 und 1982 veröffentlichten NOVOTNY et.al. [108] und GERE et.al. [109] erste schnelle und effiziente Trennungen mit superkritischen mobilen Phasen auf Dünnschichtkapillarsäulen bzw. gepackten Säulen [89]. Erste kommerzielle Geräte waren ab Anfang bis Mitte der 1980er Jahre auf dem Markt [77, 98]. Der Betrieb dieser Geräte mit Dünnschichtkapillarsäulen und für die SFC optimierten, aber GC-typischen Detektoren [98, 101, 110] ließ das Interesse an der SFC-Technik zunächst steigen [99]. Dieses Interesse ging fast ausschließlich von GC-Anwendern aus, die in der SFC eine Erweiterung der GC-Technik, insbesondere für einen weiter gefassten Analytbereich⁷, sahen [98, 101]. Auch für einige HPLC-Anwender war diese Technik interessant, da die GC-typischen Detektoren (z. B. Flammenionisationsdetektor (FID), Elektroneneinfangdetektor (engl.: *electron capture detector*, ECD), usw. [79, 111–114]) auch ihren Analytbereich erweitern konnten⁸.

Probleme der Dünnschichtkapillar-SFC mit schlechter Reproduzierbarkeit, Sensitivität und ei-

⁷schlecht verdampfbare oder thermisch instabile Analyten [97]

⁸mögliche Detektion von nicht chromo- bzw. fluorophoren Verbindungen [97]

nem Mangel an Applikationsmöglichkeiten führten Anfang der 1990er Jahre dazu, dass diese Technik zunehmend an Interesse verlor [93, 98]. Die Wiederbelebung begann Ende der 1990er Jahre, als Forscher nach Methoden suchten, die einen hohen Probendurchsatz und geringeren Lösungsmittelverbrauch ermöglichen [93]. Durch die Arbeiten von BERGER wurde die zukünftige Ausrichtung der SFC auf eine Trennung mittelpolarer Analyten über eine gepackte Normalphase mit einem Gemisch aus CO₂ und organischem Modifier bei spektrometrischer Detektion fokussiert [98].

Die derzeit verfolgte Gerätetechnik basiert auf modifizierten HPLC-Modulen, die teilweise mit gekühlten Pumpenköpfen ausgerüstet sind, um die mobile Phase (evtl. zu verflüssigen) und das Gesamtsystem (Trennsäule, Detektor, usw.) mit einem Druck $\geq p_{krit}$ zu betreiben [101]. Durch diese relativ einfache Gerätetechnik ist die SFC heute eine moderne, akzeptierte und (mittlerweile) häufig angewandte analytische Methode. Die breite Akzeptanz als Trenntechnik erfährt die SFC durch ihre Ähnlichkeit zur HPLC. Hard- und Software beider Techniken sind nahezu identisch und die Technik robust [101]. Als superkritische mobile Phase wird häufig das sehr günstige CO₂ in Lebensmittelqualität verwendet, welches durch Modifizierung, i. A. durch Beimischen von Methanol, einen Zugang zu einem breiten Analytspektrum bietet [96] (vgl. Abbildung 1.4). Viele der für die HPLC bekannten Säulenmaterialien werden für die SFC eingesetzt [101]. Ebenso werden mittlerweile viele klassischerweise für die HPLC verwendeten Detektoren für die SFC genutzt. Hierzu zählen z. B. UV-Vis-Detektoren, der Diodenarraydetektor (DAD), der Fluoreszenzdetektor (FLD) und der Lichtstreuendetektor (engl.: *evaporative light scattering detector*, ELSD) [79, 115, 116]. Auch Kopplungen mit Massenspektrometern sind kommerziell erhältlich [110]. Anwendung findet die SFC im Bereich der Pharmazie durch einen hohen Probendurchsatz und das Lösen chiraler Trennprobleme [98] sowie in den Bereichen Umweltanalytik, Polymer- und Petrochemie [99]. Als besonders interessant ist die Tatsache anzusehen, dass die SFC zu den „grünen“ Trenntechniken zählt [100] und zudem bis zu 70 % der laufenden Kosten (verglichen mit HPLC) einsparen kann [93].

Der Analytbereich bei der SFC umfasst, je nach Art und Eigenschaft des Modifiers sowie der verwendeten Trennsäule, mittlerweile nahezu das gesamte Analytspektrum. Trennungen sehr unpolarer Substanzen wie aliphatische Kohlenwasserstoffe können mit reinem CO₂ durchgeführt werden. Für mittelpolare Substanzen wird häufig Methanol oder Acetonitril als organischer Modifier zugemischt. Sogar Trennungen von sehr polaren Verbindungen können durch Modifizieren des CO₂ mit Wasser oder auch Salzlösungen erreicht werden [117]. Eine Übersicht über die Einsatzmöglichkeiten der SFC mit verschiedenen Modifiern und ein Vergleich zu den klassischen Chromatographiemethoden ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

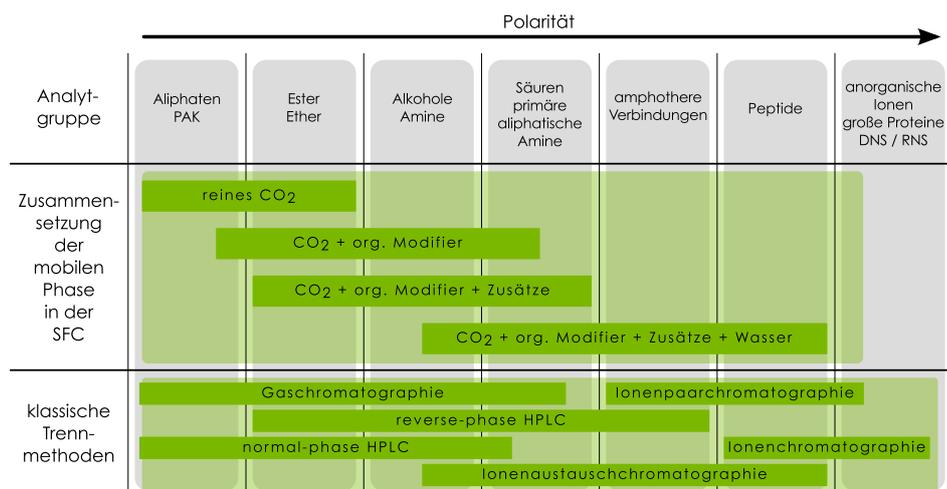


Abbildung 1.4: Übersicht über die Einsatzmöglichkeiten der SFC mit verschiedenen Zusammensetzungen der mobilen Phase und Vergleich mit herkömmlichen chromatographischen Methoden — modifiziert nach [117]

1.3 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe - Bedeutung und Analyse

Als PAK werden eine Vielzahl von Verbindungen bezeichnet, die je nach Definition aus mindestens zwei [118, 119] oder drei [120, 121] annelierten aromatischen Kohlenstoffringen bestehen und in verschiedenen Konfigurationen vorkommen [122].

1.3.1 Vorkommen und Entstehung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sind ubiquitär verteilte Umweltkontaminanten [61, 123, 124], die bei nahezu jeder unvollständigen Verbrennung organischer Materie unter pyrolytischen Bedingungen [123, 125] entstehen. Viele PAK wurden bereits (meist nach metabolischer Transformation) als teratogen, krebserregend und/oder mutagen oder auch als Promotoren eingestuft [118, 119, 121, 126, 127]. Erdöl, Torf, Braun- und Steinkohle gelten als natürliche Vorkommen von PAK [120]. Sie können aber auch auf natürlichem Wege durch Kondensationsreaktionen von Huminsäuren entstehen oder von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren produziert werden [122]. Durch z. B. den Genuss geräucherter oder gegrillter Nahrungsmittel, das Rauchen oder auch durch die Atemluft ist der Mensch einer PAK-Exposition ausgesetzt [122, 123]. Neben der festen Nahrung (PAK-Aufnahme zu ca. 95 %) nimmt der Mensch PAK zu ca. 1 % über das Trinkwasser auf [122].

Große Mengen an PAK wurden in den letzten Jahren u. a. durch den Einsturz des World Trade Centers (etwa 100 - 1000 t), durch Umweltkatastrophen wie die Ölpest im Golf von Mexiko (270 - 3300 t) oder durch großflächige Waldbrände freigesetzt [124, 128-130]. Schätzungen gehen von einem globalen Gesamteintrag an PAK in die Biosphäre von etwa $4,3 \cdot 10^6 \text{ t Jahr}^{-1}$ aus [122].

Im Allgemeinen entsteht bei der Verbrennung organischer Materie eine komplexe Mischung aus sehr vielen polyzyklischen aromatischen Substanzen (mehrere hundert [123, 124] isomere und homologe Verbindungen) in einem großen Massenbereich [44, 131, 132]. Je nach Entstehungsart und -temperatur variiert diese Mischung in ihrer Zusammensetzung [120]. FETZER [118] teilt die Verbindungen in eine kleine und eine große PAK-Klasse ein. Insbesondere die kleinen PAK ($\leq C_{24}$) wurden in den letzten Jahren hinsichtlich ihrer analytischen und chemischen Eigenschaften, aber auch bezüglich ihres Einflusses auf die Gesundheit eingehender untersucht [118, 133]. Die Umweltbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika (engl.: *environmental protection agency*, EPA) hat 16 der kleinen PAK im Jahre 1970 als Hauptschadstoffe identifiziert. Diese Zusammenstellung von 2- bis 5-Ring-Verbindungen ist seither als EPA-PAK-Mischung (siehe Tabelle 7.2.3 auf Seite 153) bekannt und wird zur Umwelt- und Expositionsüberwachung genutzt [124, 125, 132]. Acht Verbindungen aus der EPA-PAK-Mischung sowie weitere sieben als potentielle Schadstoffe für die Gesundheit geltende PAK bilden die EU-priority 15 PAK-Mischung [132] (siehe Tabelle 7.2.3 auf Seite 154). Während die EPA-PAK-Mischung auch sehr kleine (2- und 3-Ring-)Verbindungen enthält, beschränkt sich die EU-priority Mischung nur auf 4- und 5-Ring-PAK, die meist eine höhere Toxizität aufweisen als die kleineren Verbindungen [120].

1.3.2 Transport und Abbau in der Umwelt

Während die kleineren Verbindungen hauptsächlich als Gase transportiert werden können, verteilen sich die größeren PAK gebunden an Staubpartikel [120, 123]. Beide Transportwege führen über feuchte und trockene Deposition dazu, dass PAK in Böden und Gewässer gelangen [130, 133]. Ein natürlicher Abbau von PAK findet sowohl in der Luft durch Photolyse mit UV-Licht und durch Gasphasenreaktionen mit OH-Radikalen, NO_3 -Radikalen und Ozon (O_3) als auch in wässriger Phase statt [124, 133]. Die Mobilität von PAK kann durch Tenside oder organische Stoffe im Boden erhöht sein [122]. Ein langsamer, mikrobieller Abbau lässt sich in Böden und Sedimenten beobachten [120, 121, 134]. Dieser Abbauweg korreliert jedoch stark mit der Wasserlöslichkeit der PAK und ist umso geringer, je größer das Ringsystem wird. Kleine PAK wie Naphthalin, Anthracen usw. gelten als gut bakteriell abbaubar und können alleinige Kohlenstoff- und Energiequellen für Mikroorganismen (z. B. der Gattungen *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* u. a.) darstellen. Auch wenn keine Mikroorganismen bekannt sind, die sich einseitig von großen PAK, bspw. Benzo[a]pyren (B[a]P), ernähren, kann ein Metabolismus dennoch stattfinden [121, 134]. Nicht nur Bakterien, sondern auch Pilze können kleine und große PAK verstoffwechseln. Auf geeigneten Substraten können sie PAK durch das Cytochrom-P450-Monooxygenasesystem zu Epoxiden umsetzen. Die Epoxide sind dann einem weiteren Abbau zu *trans*-Dihydrodiolen zugänglich [134].

1.3.3 Toxizität und Metabolismus

Die im Allgemeinen dennoch geringen Abbauraten bzw. die hohe Persistenz von PAK führen dazu, dass diese Substanzen in der Umwelt und durch Anreicherung in der Nahrungskette im Körper vieler Lebewesen (u. a. aquatische Organismen [130]) akkumuliert werden [120, 124, 135]. Die dem Menschen durch Nahrung, Atemluft usw. zugeführten PAK werden meist nach intestinaler, resorptiver Aufnahme ins Blut, die Muskulatur und in erster Linie ins Fettgewebe umverteilt. Eine direkte Ausscheidung dieser unpolaren Stoffe ist vielen Organismen nicht möglich, sodass diese die PAK erst zu polarerer Verbindungen metabolisieren müssen [122]. Die polarerer Verbindungen können bspw. über den Urin oder Fezes ausgeschieden werden [135]. Der Darm und hauptsächlich die Leber, aber auch die terminalen Atemwege können als Metabolismusort fungieren [123]. Werden durch die Metabolisierung reaktive Zwischenstufen gebildet, können diese im Körper als indirekte Kanzerogene mit der DNA reagieren [124, 135]. Die metabolische Aktivierung erfolgt über Oxidations- und Hydrolysereaktionen u. a. mit Hilfe von Cytochrom-P450-abhängigen Enzymen [123]. Hierbei ist die Molekülstruktur der PAK und damit der molekular-topologische Ort der Metabolisierung ausschlaggebend für die biologische, evtl. schädigende Aktivität [124, 135]. Ein beispielhafter Unterschied in der Molekülstruktur, welcher sich im kanzerogenen Potential widerspiegelt, liefern B[a]P und Benzo[e]pyren (B[e]P). Ersteres wirkt als sehr starkes Kanzerogen, letzteres stellt vermutlich durch sterische Hinderungen und einen ineffektiven Metabolismus ein relativ schwaches Kanzerogen dar [119, 122, 136]. Das hohe kanzerogene Potential von B[a]P lässt sich aus der Molekülstruktur ableiten. Befindet sich nach dem zweiten metabolischen Oxidationsschritt (zum Diolepoxid) eine Epoxidgruppe in direkter Nachbarschaft zu einer sogenannten Bay-Region, liegt ein stark kanzerogener Metabolit vor, der sehr effektiv kovalent an DNA binden und sogenannte DNA-Addukte bilden kann. Eine Epoxidfunktion an einer K-Region ist hingegen weniger stark kanzerogen [137]. Die strukturelle Nachbarschaft ist somit wesentlich für die Bindung an DNA und das damit einhergehende mutagene Potential [122]. Um etwa den Faktor 100 stärker in ihrer kanzerogenen Wirkung sind PAK, die eine sogenannte Fjord-Region besitzen, wie z. B. das Dibenzo[a,l]pyren [138].

Abbildung 1.5 gibt einen Überblick über die verschiedenen Metabolismusregionen (K-, L-, M-, Bay- und Fjord-Region) am Beispiel der Moleküle Benz[a]anthracen und Dibenzo[a,l]pyren.

Die Ausbildung eines DNA-Addukts mit einem potentiellen Kanzerogen führt dazu, dass die Basensequenz bei der Proliferation unter Umständen nicht korrekt abgelesen und umgesetzt wird [122]. Greifen in diesen Fall die zelleigenen Reperaturmechanismen nicht, ist der Informationsfluss bei der Zellteilung gestört und es kann sich eine neoplastische Zelle bilden, aus welcher letztendlich durch eine erhöhte Vermehrungsrate ein Tumorgewebe hervorgehen kann [141].

Durch die nachgewiesene Kanzerogenität ist Benzo[a]pyren einer der bekanntesten und zugleich am intensivsten untersuchte PAK [122, 134]. In einer komplexen Mischung von PAK

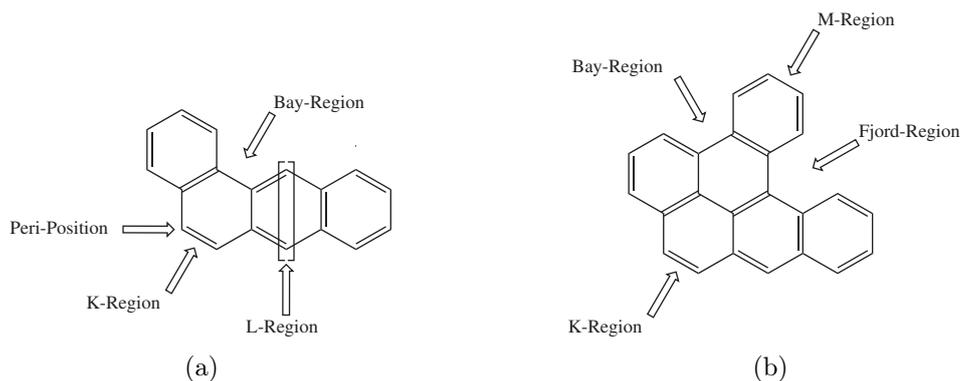


Abbildung 1.5: Verschiedene Metabolismusregionen bzw. Reaktionszentren an PAK: a) Benz[a]anthracen und b) Dibenzo[a,l]pyren — [124, 138–140]

ist das kanzerogene bzw. mutagene Potential von B[a]P jedoch nur im Bereich von 1 - 20 % anzusiedeln [132, 142]. Komplexe PAK-Mischungen bestehen nicht nur aus den unterschiedlichsten Grundstrukturen, sondern auch aus einer Vielzahl an isomeren, alkylierten PAK [143–146]. Während aus Verbrennungsprozessen hauptsächlich PAK-Grundstrukturen freigesetzt werden, enthält Erdöl alkylierte PAK als Hauptfraktion [130]. Methylierte oder allgemein alkylierte PAK sind in der Umwelt persistenter und bei einigen ist bereits Kanzerogenität bzw. Mutagenität nachgewiesen worden, andere gelten als Tumor-initiiierend [124, 143–148].

Befindet sich bspw. eine Methylgruppe an der Bay-Region, so ist das Tumor-initiiierende Potential dieser Verbindungen oftmals viel stärker als bei der PAK-Grundstruktur [147, 148]. Dies ist beispielsweise für Chrysen und 5-Methylchrysen der Fall [148, 149]. Auch Verbindungen mit Methylsubstituenten ausserhalb der Bay-Region zeigen der nativen Struktur gegenüber eine erhöhte tumorgene Aktivität. Wie schon bei den PAK gibt es auch bei den Alkyl-PAK eine Abhängigkeit zwischen der Molekülstruktur bzw. der Position der Alkylgruppen und der Kanzerogenität dieser Verbindungen [143, 149]. Aufgrund der großen Anzahl an möglichen Verbindungen ist der Einfluss hier sogar noch größer. So ist bspw. die Kanzerogenität von 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen durch eine weitere, zusätzliche Methylgruppe an der Peri-Position (in 5-Position) vermindert [149, 150].

1.3.4 Analyse und Aufbereitung von PAK

Durch die schädlichen Eigenschaften der PAK ist eine genaue und nachweisstarke Analyse notwendig. Hierzu ist eine möglichst leistungsstarke Trennung unablässig, da gerade in Umweltmatrices eine enorme Vielzahl an isomeren PAK auftritt und solche komplexen Matrices eine einfache Analyse erschweren. Häufig auf PAK untersuchte Matrices sind Böden [102, 151–154], Sedimente [151, 155, 156], Gewässer [124, 151, 157–160], Abwässer [157], Müllverbrennungsgase [161, 162], Luft [163], Lebensmittel [132, 164] und Bedarfsgegenstände [165] sowie aquatische Lebensformen [127, 166–169].

Um einer exakten PAK-Analyse gerecht zu werden, müssen solche Proben oftmals extrahiert

und aufbereitet werden. Gängige Probenaufbereitungsmethoden für diverse Matrices sind die SFE [102, 170], die Fest-Flüssig-Extraktion [163, 171], die Festphasenextraktionen (SPE, engl.: *solid-phase extraction*) und Festphasenmikroextraktion (SPME, engl.: *solid-phase microextraction*) [159, 160, 172, 173], die Ultraschallextraktion [152, 153] sowie die QuEChERS⁹-Extraktion [167].

Einfache PAK-Analysen werden hauptsächlich mit der HPLC [172, 174] oder der GC [160, 161] durchgeführt. Auch die SFC konnte erfolgreich für die Analyse von PAK eingesetzt werden [175]. Komprehensiv Trenntechniken wie die zweidimensional Gaschromatographie (GCxGC) erlauben eine sensitive und umfassende Analyse von PAK auch in komplexer Matrix [165, 176]. Als Detektoren eignen sich für die HPLC der UV-Vis- [151] oder besonders der Fluoreszenzdetektor [130, 174] und für die GC der FID und das MS. Häufig besser und sensitiver ist allerdings die Kopplung der Trenntechniken an die AP-Massenspektrometrie insbesondere mit APLI als Ionisationstechnik [68, 177].

⁹Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (QuEChERS)

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Laserionisation bei Atmosphärendruck (APLI) stellt für die massenspektrometrische Analyse polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) eine sehr selektive Ionisations- und äußerst sensitive Detektionsmethode dar. Entwickelt wurde die APLI im Jahr 2005 an der Bergischen Universität Wuppertal. Seitdem konnten erfolgreich Kopplungen zu chromatographischen Systemen aufgebaut und erste Anwendungen an diesen Kopplungen demonstriert werden. Die für diese Zwecke entwickelte Ionenquelle (MPIS) soll im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt werden. Zudem soll durch eine Untersuchung der Ionensuppression und der teilweise auftretenden Analytfragmentierung eine Standortbestimmung für die APLI durchgeführt werden, die einen Vergleich mit der Suppression bei anderen Ionisationsmethoden erlaubt und erklärt, aus welchen Gründen manche Substanzen Fragmente bilden.

Der Quellenkörper soll mit einem Heizelement ausgestattet werden, um somit HPLC-Analysen mit stark wässrigen Eluenten zu ermöglichen. Weiterhin soll auf Basis der Arbeit von LORENZ [178] die gegebene Fluidodynamik im Quellenkörper durch den Einsatz eines *elevated floor* derart optimiert werden, dass die Peakform von HPLC-Peaks nachhaltig verbessert wird. Hierfür sollen erste Experimente die grundsätzliche Eignung des *elevated floor* zeigen.

Eine Charakterisierung der Ionenquelle für die GC-APLI-MS soll den bisherigen Verzicht auf das sogenannte Drygas beschreiben und durch verbesserte MS-Einlassgeometrien einen möglichen Einsatz des Drygases ermöglichen.

Seit der Entwicklung der APLI wurden meistens festfrequente Excimerlaser zur Ionisation genutzt, die durch hohe Kosten und Einschränkungen in der Handhabbarkeit gewisse Nachteile mit sich bringen. An dieser Stelle soll der Einsatz eines kostengünstigeren und einfacher zu bedienenden diodengepumpten Festkörperlasers (DPSS) geprüft werden. Für eine umfassende Analyse der Einsatzmöglichkeiten sollen die HPLC-, die Direkt-Infusions- und die GC-APLI-MS eingesetzt werden.

Die Kopplungen mit APLI umfassen aktuell die Kombination mit der HPLC und der GC. In Verbindung mit einem Elektrospray konnte die Laserionisation zudem für die Kapillarelektrochromatographie (CEC) eingesetzt werden. Eine in den letzten Jahren wieder häufiger genutzte Trenntechnik ist die superkritische Flüssigkeitschromatographie (SFC), die mittlerweile aufgrund der heutigen Gerätetechnik als robust und zuverlässig angesehen wird. Sie stellt eine „grüne“ und somit umweltschonende Trenntechnik dar, deren Einsatz für die Trennung unpolarer Substanzen, z. B. PAK, als besonders effizient und schnell gilt. Die SFC soll das Portfolio der chromatographischen Kopplungen zur APLI-MS erweitern. Für eine Kombination der SFC mit der sensitiven Detektion durch APLI-MS wird ein neues Kopplungssystem

benötigt, das in dieser Arbeit entwickelt und hinsichtlich der analytischen Stärke mit der HPLC-APLI-MS verglichen werden soll. Mit dem neuen SFC-APLI-MS-System sollen Realproben untersucht und demonstriert werden, dass sowohl die Quantifizierung von PAK in Muschelgewebe als auch die Bestimmung des urinären Biomarkers 1-Hydroxypyren mittels SFC-APLI-MS möglich ist.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden einige Eigenschaften der für die Laserionisation bei Atmosphärendruck (APLI) benutzten Ionenquelle dargestellt, um erfolgte bauliche Veränderungen beschreiben und bewerten zu können. Es folgt eine Charakterisierung der Ionisationsmethode unter den Gesichtspunkten analytischer Fragestellungen hinsichtlich chromatographischer Kennzahlen und auftretender massenspektrometrischer Problematiken. Der anschließende Teil beschreibt den Vergleich zwischen zwei Lasersystemen, deren Anwendungspotential für die APLI und eine kritische Auseinandersetzung mit den sich hieraus ergebenden Limitierungen. Der letzte Teil behandelt die Kopplung der APLI mit der superkritischen Flüssigkeitschromatographie (SFC), deren analytische Leistungsfähigkeit sowie verschiedene Anwendungsmöglichkeiten.

3.1 Ionenquellenoptimierung

Für die massenspektrometrische Detektion werden die Ionen abhängig vom jeweiligen Ionisationsverfahren in einer Ionenquelle gebildet. Ein Vorteil von Atmosphärendruckionisationsquellen ist, dass ein relativ schneller Wechsel zwischen verschiedenen Ionisationsverfahren möglich ist. Im Gegensatz zu Hochvakuumionisationen muss weder das Massenspektrometer noch die Ionisationsquelle belüftet und nach dem Wechsel nicht wieder evakuiert werden. Statt dessen wird die außen liegende Ionisationsquelle bei Bedarf lediglich abgekühlt und ausgetauscht. Dasselbe gilt beim Wechsel zwischen vorgeschalteten chromatographischen Trennstufen wie der GC und der LC. Auch hier kann der Quellenkörper oftmals einfach gewechselt werden und so den Anwendungsbereich eines Massenspektrometers erweitern, da deren Design und Bauweise mittlerweile nicht nur auf eine Ionisationsart und chromatographische Kopplung beschränkt ist.

Eine echte Multi-mode Ionenquelle wurde 2008 von SCHIEWEK *et. al.* an der Bergischen Universität Wuppertal entwickelt und vorgestellt [68, 74]. Diese als *MPIS* (engl.: *multi-purpose ion source*) bezeichnete Ionenquelle ermöglicht sowohl die Kopplung einer HPLC- als auch einer GC-Trennstufe an dasselbe Massenspektrometer sowie den Betrieb verschiedener Ionisationsmethoden mit dieser Ionenquelle. Der Umbau von Chromatographiesystemen und Ionisationsmethoden lässt sich innerhalb weniger Minuten realisieren. Die MPIS ist für die Ionisation mit ESI (nur LC), APCI, APPI und APLI konstruiert und im Betrieb an verschiedenen Massenspektrometern (bspw. Ionenfalle [73, 75] und (TOF)MS [54, 66, 74]) sowie mit verschiedenen Gas- und Flüssigchromatographen erfolgreich getestet worden. Eine schematische Darstellung der temperaturkontrollierten MPIS (TC-MPIS) ist in Abbildung 3.1 als

CAD-Zeichnung dargestellt. Der Grundkörper der MPIS-Quelle ist aus Aluminium gefertigt. An die jeweiligen Kopplungsschnittstellen (b) sowie (d) bis (f) kann durch einen Austausch der Komponenten jeweils eine andere Trennstufen-Ionisations-Konfiguration genutzt werden. Zum Einkoppeln eines Laserstrahls für den Betrieb mit APLI als Ionisationsmethode werden Lithiumfluorid (LiF)-Fenster an den Schnittstellen (d) und (e) genutzt. Hierbei besteht die Wahlmöglichkeit, von welcher Seite der Laserstrahl eingebracht werden soll. Die gegenüberliegende Seite wird dann jeweils durch einen *Beamdump* verschlossen. Die LiF-Fenster können für die Ionisationsmethoden GC-APCI und GC-APPI gegen einen Flansch mit Halterung einer APCI-Coronanadel oder einer APPI-Lampe ausgetauscht werden. Für die Kopplung an eine flüssigchromatographische Trennstufe steht für APCI, APPI und APLI ein pneumatisch assistierter Verdampfer (a) sowie eine Halterung für eine Sprühnadel im ESI-Betrieb zur Verfügung, die anstelle des Verdampfers eingesetzt wird. Für die Anbindung an einen Gaschromatographen wird eine beheizbare Transferline (c) an Schnittstelle (b) positioniert. Im LC-Betrieb befindet sich an (b) ein Blindflansch (für APPI und APLI) oder die Halterung für eine APCI-Coronanadel.

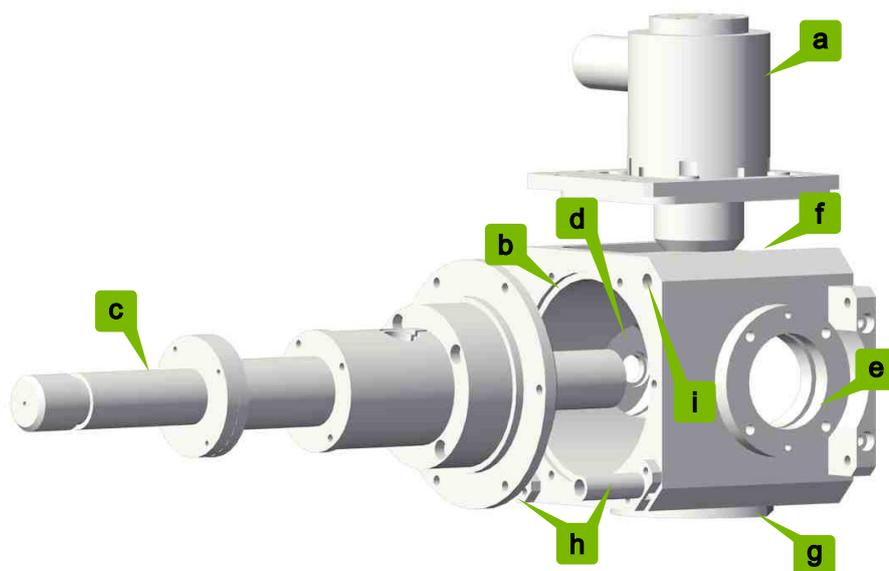


Abbildung 3.1: Explorative CAD-Zeichnung der TC-MPIS in GC-Konfiguration

a: pneumatisch assistierter Verdampfer für LC-Eluenten (austauschbar gegen ESI-Nadel), b: Schnittstelle für c: GC-Transferline (austauschbar gegen APCI-Nadel oder Blindflansch im LC-Betrieb), d und e: Halterungen für LiF-Fenster (austauschbar gegen z. B. GC-APCI-Nadel oder APPI-Lampe), f: Arretierschiene für a oder ESI-Nadelhalterung, g: Bodenplatte, h: Heizpatronen, i: Anschluss für Pt-100-Thermometer

3.1.1 Entwicklung der temperaturkontrollierten MPIS (TC-MPIS)

Die APLI gilt als ultra-sensitiv und selektive Ionisationsmethode für die Analyse polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe [54]. Durch erste Arbeiten von SCHIEWEK und de-

ren Weiterführung durch DEIBEL konnte demonstriert werden, dass außer Aromaten auch andere Verbindungsklassen für die Analyse mittels APLI-MS zugänglich sind [66–68]. Derivatisierungen mit geeigneten Ionisationslabeln erlauben zusätzlich zu den Aromaten die Analyse von z. B. aliphatischen Alkoholen, Aminen, Carbonsäuren und Aminosäuren. Im Allgemeinen stellen besonders die Aminosäuren aufgrund ihrer häufig sehr polaren Struktur eine Herausforderung an die chromatographische Trennung dar. Die Analyse von Aminosäuremischungen kann mittels HPLC-FLD durch Fluoreszenzderivatisierung mit 6-Aminochinolyl-*N*-hydroxysuccimidylcarbamate (AQC) durchgeführt werden [179–181]. Das von COHEN *et. al.* genutzte Derivatisierungsreagenz AQC dient dabei als Fluorophor und basiert auf der heterozyklischen Verbindung Chinolin. Die flüssigchromatographische Trennung dieser polaren Analyten erfolgt mit Gradientenelution auf einer 150 mm × 4,6 mm *reverse-phase*-Säule bei einem Fluss von 1,0 mL min⁻¹. Der durchgehend wasserhaltige Gradient beginnt mit einem ausschließlich wässrigen Puffer und endet bei maximal 60 % Acetonitril, um die derivatisierten Aminosäuren erfolgreich zu trennen [179–181]. Durch die strukturellen Gemeinsamkeiten ist ein ähnliches Verhalten für die Trennung derivatisierter Aminosäuren mit den Anthracenbasierten Ionisationslabeln für die APLI zu erwarten, sodass diese ebenfalls mit hohen Wasseranteilen bei der Gradientenelution getrennt werden müssen.

Durch hohe Wassergehalte im Eluenten kann es jedoch zu einer Verringerung der Ionisationseffizienz in der Ionenquelle kommen. Im normalen Betrieb¹ erreicht der aus Aluminium gefertigte Quellenkörper eine Temperatur von etwa 40 bis 50 °C. Die Temperatur des sogenannten Badgases² ist durch das heiße Drygas³ und das heiße Verdampfergas i. A. hoch genug, um eingebrachte Lösungsmittel mit niedrigen Siedepunkten in der Gasphase zu halten. Im Gegensatz dazu können in größeren Mengen eingebrachte, höher siedende Lösungsmittel wie z. B. Wasser, an den relativ kalten Oberflächen des Quellenkörpers kondensieren. Hierzu zählen auch die zum Einkoppeln des Laserlichts benötigten LiF-Fenster⁴. Bei der Kopplung einer HPLC mit der APLI-(TOF)MS wird das Eluat der Trennsäule vollständig der Ionenquelle zugeführt. Der Eluentenstrom (bis ca. 1,5 mL min⁻¹) wird dazu im Verdampfer (vgl. (a) in Abb. 3.1) pneumatisch assistiert versprüht und durch einen temperierten Keramikzylinder (300 bis 450 °C) in die Gasphase überführt. Das hierdurch aufgeheizte und für die Aminosäureanalytik wasserhaltige Gas gelangt dann in die Ionenquelle und schlägt sich auf den Fensterinnenflächen nieder. Abbildung 3.2a zeigt ein Foto des mit Kondenswasser beschlagenen LiF-Fensters bei einer Eluentenflussrate von 0,75 mL min⁻¹ und einem Wassergehalt von 90 %.

Die Wassertropfen auf den Fensterinnenseiten verhindern, dass das Laserlicht ungehindert und ohne Streuung in den Ionisationsraum gelangt. Als Konsequenz werden dort nahezu keine Ionen erzeugt und detektiert. Der Einfluss des kondensierten Wassers auf die Ionisationseffizienz ist aus Abbildung 3.3 ersichtlich, in der die Basislinien (als Gesamtionenchroma-

¹etwa 2 L min⁻¹ N₂-Drygas bei 200 °C sowie ca. 3 bis 4 L min⁻¹ Verdampfer-N₂ bei 300 bis 450 °C

²hiermit wird i. A. die Gasmischung innerhalb der Ionenquelle bezeichnet

³wird auch als Desolvatationsgas bezeichnet

⁴Lithiumfluorid ist für die verwendete Wellenlänge von 248 nm in hohem Maß transparent

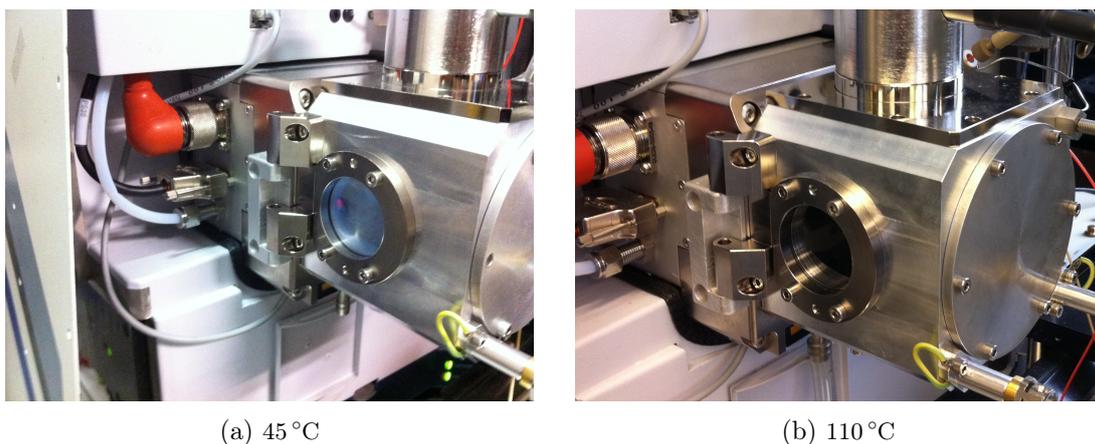


Abbildung 3.2: Fotos des LiF-Fensters in der HPLC-MPIS-Konfiguration beim Betrieb mit einer Eluentenflussrate von $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ und einem hohen Wassergehalt im Eluenten (90 % H_2O / 10 % MeOH) bei unterschiedlichen Temperaturen ((a): 45°C und (b): 110°C) der TC-MPIS

togramm (engl.: *total ion chromatogram*, TIC) der HPLC-APLI dargestellt sind. Abbildung 3.3 zeigt eine *reguläre* Basislinie mit Ionisierung der Hintergrundverunreinigungen des Badgases ohne Kondensat⁵ auf dem LiF-Fenster (Abbildung 3.2a), führt dies zu einem nahezu vollständigen Verlust der Ionisationseffizienz; die TIC-Basislinie erscheint dann als *Nullsignal*, da weder Analyt noch Hintergrundverunreinigungen ionisiert werden (Abbildung 3.3a).

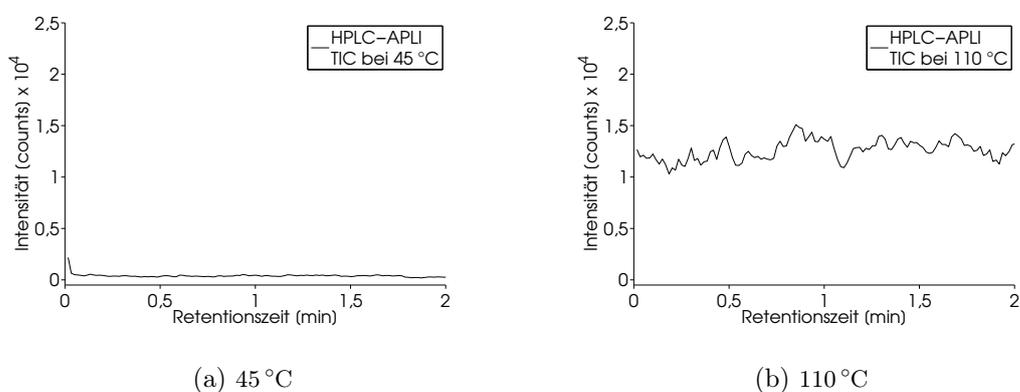


Abbildung 3.3: HPLC-APLI-Basislinien (TIC von m/z 50 bis 300) bei hohem Wassergehalt im Eluenten (90 %) und einer Eluentenflussrate von $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ in der temperaturkontrollierten MPIS.
 (a) Nahezu vollständiger Verlust der Ionisationseffizienz durch Beschlagen der LiF-Fenster
 (b) Reguläre Basislinie unter Erhalt der Ionisationseffizienz bei freiem LiF-Fenster

Um dieses Problem zu lösen, wurde der MPIS-Quellenkörper mit zwei konventionellen Heizpatronen (vgl. (h) in Abb. 3.1) sowie einem Pt-100 Temperatursensor (vgl. (g) Abb. 3.1) ausgestattet. Hierdurch kann dieser optimierte Quellenkörper kontrolliert bis ca. 150°C tem-

⁵unter ansonsten identischen Bedingungen, nur der Quellenkörper ist zum Verhindern der Kondensation auf 110°C geheizt

periert werden. Zur Regelung wird ein HT-MC1 Mikroprozessor-Temperaturregler der Fa. HORST GmbH genutzt.

Beim Betrieb der temperaturkontrollierten MPIS (TC-MPIS) bei einer Temperatur von etwa 110 °C beschlägt das LiF-Fenster unter ansonsten identischen Bedingungen nicht (siehe Abbildung 3.2b). Die vollständige Ionisationseffizienz bleibt erhalten und wird durch die in Abbildung 3.3 gezeigte Basislinie der geheizten Quelle veranschaulicht.

Um die Vorteile der TC-MPIS zu demonstrieren, wurden drei Aminosäuren derivatisiert, mittels HPLC getrennt und über APLI in der TC-MPIS ionisiert. Die Ionenquelle wurde dabei sowohl bei etwa 45 °C als auch temperiert bei 110 °C betrieben. Für die HPLC-Trennung wurde ein linearer H₂O/MeOH-Gradient mit einer hohen Flussrate (2,0 mL min⁻¹) verwendet (Analysebedingungen in Kapitel 6.2.7). Zur Derivatisierung wurden die Aminosäuren Glycin (**1**), L-Serin (**2**) und L-Leucin (**3**) (Abbildungen 3.4a bis 3.4c) eingesetzt und mit dem von DEIBEL [67] entwickelten Derivatisierungsreagenz (Anthracen-9-yl-)propansäure-*N*-succinimidester (**4**, APA-NHS, vgl. Abbildung 3.5) unter den in Kapitel 6.8.1 angegebenen Bedingungen zu den Amidinen⁶ umgesetzt. Ein Aliquot der Reaktionslösung wurde verdünnt und ohne weitere Aufarbeitung zur Analyse eingesetzt.

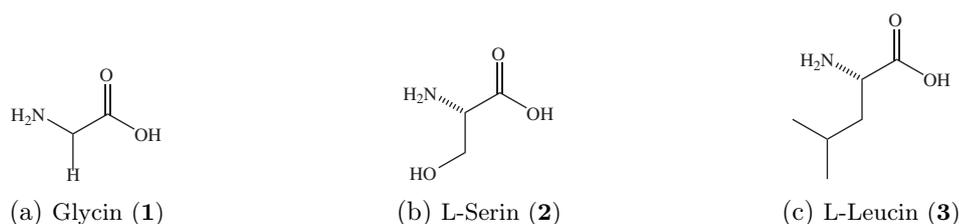


Abbildung 3.4: Zur Derivatisierung eingesetzte Aminosäuren

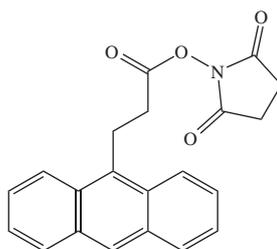


Abbildung 3.5: APA-NHS (**4**): Ionisationsmarker zur Derivatisierung von Aminosäuren

Die Analysebedingungen, d. h. der hohe Wassergehalt zu Beginn der Gradientenelution und die hohe Eluentenflussrate sind für diese Versuche sehr drastisch gewählt, um einen Extremfall zu demonstrieren. Hierdurch sind zum Anfang eines Analysenlaufs Eluentenbestandteile auf der „kalten“ Quelleninnenoberfläche und besonders auf den LiF-Fenstern als Kondensate sichtbar. Durch das relativ langsame Ansteigen des Methanolgehalts bei der Gradientenelution konnten noch bis zu 5 Minuten nach dem Start der Analyse Wassertropfen auf dem Fenster

⁶Die entsprechenden Derivate werden hier als APA-Gly (**5**, $M = 307,3 \text{ g mol}^{-1}$), APA-Ser (**6**, $M = 337,4 \text{ g mol}^{-1}$) und APA-Leu (**7**, $M = 363,5 \text{ g mol}^{-1}$) bezeichnet

beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt enthält der Eluent nur 10 % Wasser, sodass das Kondensat dann durch das warme Badgas aus der Quelle getragen wird und die LiF-Fenster nicht mehr beschlagen. Konstantes Temperieren des Quellenkörpers auf 110 °C konnte eine Kondensation der großen Wassermengen über den gesamten Gradientenlauf effektiv verhindern. Abbildung 3.6 zeigt die – unter den in Kapitel 6.2.7 angegebenen Bedingungen – erhaltenen HPLC-APLI-Chromatogramme als extrahiertes Ionenchromatogramm (engl.: *extracted ion chromatogram*, EIC) der m/z -Verhältnisse für Radikalkationen der derivatisierten Analyten. Während der gesamten Analyse ist die Ionisationseffizienz aller Aminosäurederivate im temperierten Quellenkörper (110 °C) größer als bei einer Quellentemperatur von 45 °C. Besonders der Peak des derivatisierten L-Leucins (APA-Leu, **7**) ist ohne kondensiertes Wasser etwa 10-fach größer als in der „kalten“ Quelle.

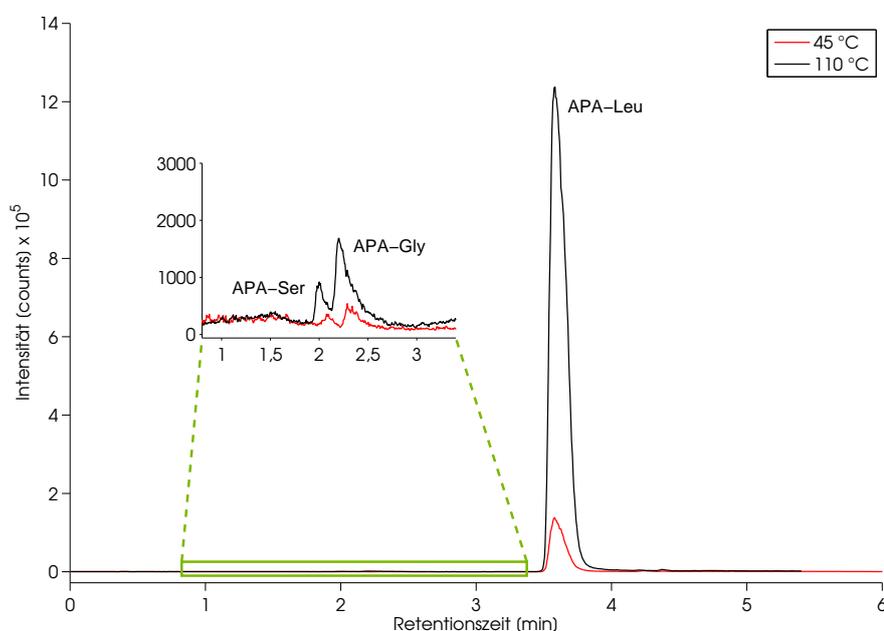


Abbildung 3.6: Summierte EIC der HPLC-APLI-Analysen ($\Sigma m/z$ 307,0 (**5**), 337,0 (**6**) und 363,0 (**7**) \pm 0,5) der Aminosäurederivate bei einer Quellentemperatur von 45 °C (rote Linie) und 110 °C (schwarze Linie) — Trennparameter in Kapitel 6.2.7

Verglichen mit dem APA-Leu-Peak sind die Signalintensitäten der Peaks von APA-Ser (**6**) und APA-Gly (**5**) sowohl bei 45 °C als auch bei 110 °C sehr klein. Diese geringen Signalintensitäten können darauf zurückzuführen sein, dass es – bedingt durch eine recht geringe Temperatur des Verdampfers (350 °C) und gleichzeitig hohem Wassergehalt im Gradienten – zu Diskriminierungseffekten bei der Überführung der Analyten in die Gaphase kommt. Wasser hat durch seine – verglichen mit organischen Lösungsmitteln – hohe Wärmekapazität und Verdampfungsenthalpie einen starken Kühleffekt auf die Verdampferinheit. Ebenfalls ist es

möglich, dass nachgelagerte Reaktionen zum Verlust der Ladung beitragen. Eine isokratische Elution mit geringerem Wassergehalt ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH V/V} = 25\%/75\%$) konnte demonstrieren, dass die Ionisationseffizienzen für **5** und **6** vergleichbar mit der von **7** ist. Unter diesen Bedingungen lässt sich allerdings keine ausreichende Trennung der Analyten erreichen.

Der Einsatz der temperierbaren Ionisationsquelle bietet zusätzlich zur Verminderung der Kondensation weitere Vorteile. Auf die dauerhaft geheizten Flächen schlagen sich Verunreinigungen oder nicht ionisierte Analyten weniger nieder als in einer ungeheizten Quelle. Die Reinigungszyklen des Quelleninnenraumes werden dadurch verlängert. Insbesondere für die sensitive APLI bedeutet dies zudem auf Dauer eine Reduzierung des Hintergrundsignals, da die Beläge in der Quelle mit dem Gasstrom des Dry- bzw. Verdampfergases oder allgemein mit dem Badgas kontinuierlich aus der Quelle herausgetragen werden.

3.1.2 Entwicklung eines aktiven *elevated floor*

Die Qualität und die analytische Leistungsfähigkeit einer HPLC-Analyse hängen von vielen Eigenschaften ab. Aus einem HPLC-Chromatogramm lassen sich einige dieser Eigenschaften in Form von Kennzahlen bestimmen. Um die Trennleistung eines chromatographischen Systems beschreiben zu können, wird u. a. die chromatographische Auflösung R_S bestimmt und bewertet [2, 7]. Diese Auflösung (Gleichung 3.1) ist ein Maß für die Vollständigkeit der Trennung zweier Komponenten [7]. Sie ist abhängig von der Retentionszeitdifferenz und der Peakbreite der betrachteten Substanzen. Ein erwünschtes Ziel der Chromatographie ist das Erreichen einer Basislinientrennung zweier Substanzen. Als basisliniengetrennt gelten dabei zwei Peaks, deren Auflösung $R_S = 1,5$ oder größer ist [2].

$$R_S = 2 \cdot \frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{w_{b_1} + w_{b_2}} \quad (3.1)$$

mit: R_S = Auflösung, $t_{r_{1,2}}$ = Retentionszeit der Substanzen 1 und 2 (in min) und $w_{b_{1,2}}$ = Peakbasisbreite der Substanzen 1 und 2 (in min)

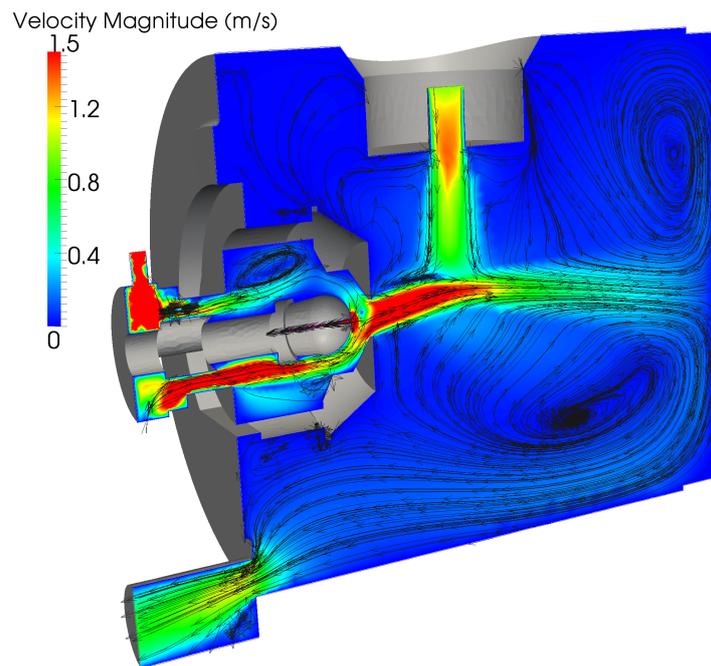
Eine hohe chromatographische Auflösung wird nicht nur durch eine große Differenz der Retentionszeiten zweier Substanzen sondern auch durch eine kleine Peakbreite erreicht. Im Idealfall haben chromatographische Peaks die Form einer schlanken Gaußfunktion [2]. Verschiedene Einflüsse auf die chromatographische Trennung können sich negativ auf die Basisbreite auswirken und zu asymmetrischen Peaks führen. Unter Umständen kann Tailing⁷ auftreten, wenn bspw. keine ausreichende Gleichgewichtsverteilung des Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase vorliegt. Durch Veränderungen aufgrund der chromatographischen Bedingungen, z. B. Anpassen der Eluentenflussrate, der stationären Phase, des Injektionsvolumens oder der Längen und Innendurchmesser der Verbindungskapillaren des Systems, lassen sich Peakverbreiterungen weitgehend reduzieren, insofern kein gravierender Defekt des Säulenmaterials

⁷beim Tailing ist die Steigung des chromatographischen Signals größer als der Abfall auf die Basislinie [2]

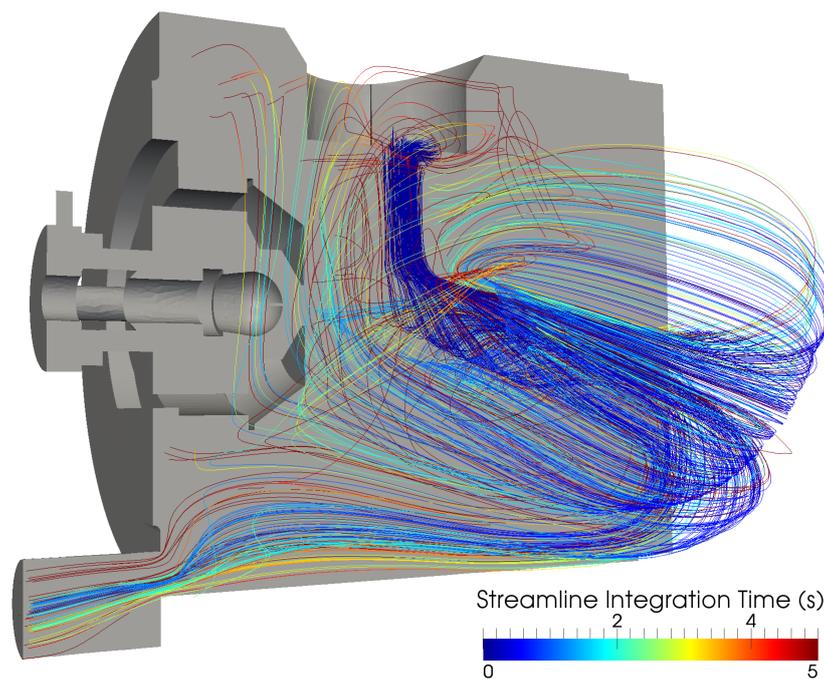
vorliegt.

Trotz optimierter chromatographischer Bedingungen können bei der HPLC-MS übermäßig breite Analytsignale auftreten. Unabhängig vom chromatographischen Trennprozess zeigen bspw. HPLC-APLI-Analysen in der MPIS häufig eine Peakverbreiterung oder ein Peaktailing [182]. Mit HPLC getrennte Substanzen gelangen über den pneumatisch assistierten Verdampfer in die Gasphase der Ionenquelle und werden von dort nach erfolgter Ionisation zum Teil in das MS geleitet. Nicht ionisierte Substanzen oder Ionen, die nicht direkt in das MS geleitet werden, stehen teilweise bedingt durch die Ionenquellengeometrie weiterhin im Quellenkörper zur Verfügung und treffen mit dem Verdampfergasstrom auf den Boden des Quellenkörpers auf [183–185]. Dort werden sie umgelenkt und bilden Verwirbelungen aus, wie in Abbildung 3.7a dargestellt ist [183]. Diese zeigt ein von PÖHLER numerisch simuliertes und von WISSDORF visualisiertes, fluiddynamisches Modell der statischen Gasflüsse mit relativer Verteilung eines Analyten in der LC-MPIS Quelle mit einem solchen Wirbel [183, 186]. Beachtenswert ist, dass der Analyt isotrop im Quellenkörper verteilt ist. Aus Abbildung 3.7b kann abgeleitet werden, dass der ausgebildete Wirbel bei kontinuierlicher Gaszufuhr stabil ist und das gesamte Quellengas eine Art „Analytpuffer“ bildet, der dafür sorgt, dass eine wiederholte und zeitlich verzögerte Abgabe des Neutralanalyten in die Ionisationszone bzw. in das Abluftsystem stattfinden kann. Die Simulation von WISSDORF (Simulationsbeschreibung in Kapitel 6.12.1) zeigt zeitlich integrierte Trajektorien von Fluidpaketen, d. h. die Aufenthaltsdauer einzelner Fluidpakete im Quellenkörper [184, 187]. Ionen, die keinen direkten Weg in das Massenspektrometer beschreiben, halten sich hiernach mehrere Sekunden (teilweise über 30 s) im Quellenkörper auf, bevor sie entweder zurück in die Ionisationszone und so mit einer zeitlichen Verzögerung doch ins Massenspektrometer gelenkt werden oder über das Abluftsystem verloren gehen. Den Trajektorien folgend können ionisierte Moleküle zudem durch Gasphasenreaktionen ihre Ladung verlieren. Diese aus der numerischen Simulation ersichtliche breite Verteilung der Transferzeiten neutraler Analyten sowie die anzunehmenden langen Aufenthaltszeiten einzelner Ionen bis zum Eintritt in das Massenspektrometer führen zur beobachteten Verbreiterung des HPLC-Signals in Form eines Peaktailings [182].

Um die Fluiddynamik der MPIS zu optimieren und dadurch ein Gasflusssystem zu schaffen, aus dem die Ionen direkt orthogonal in das Massenspektrometer gelangen, ist in Kooperation mit LORENZ [182] ein aktiver *elevated floor* (Abbildung 3.8a) entwickelt worden. Dieser soll die Gasströme im Quellenkörper gezielt und kontrolliert lenken, um so die Pufferwirkung des Quellengases zu minimieren und damit effektiv ein Tailing zu verhindern [182]. Der *elevated floor* stellt eine Erweiterung der MPIS dar und wird im Austausch gegen die Bodenplatte ((g) in Abbildung 3.1 auf Seite 30) in das System integriert. Der obere Teil des *elevated floor* ist ein im Quelleninneren abgeschrägtes Rohr zur Gasführung in Richtung eines gerichteten, gastreibenden Elements. Die erste und hier demonstrierte Entwicklung nutzt zur gerichteten Gasführung einen einfachen Axiallüfter (maximale Förderleistung: $50 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$), der im Allgemeinen zum Belüften und Kühlen in Computersystemen Verwendung findet. Die Intensität



(a) Fluiddynamisches Modell der Gasflüsse und -geschwindigkeiten



(b) Zeitintegriertes Modell der Strömungslinien

Abbildung 3.7: Numerische Simulationen der (a) Gasgeschwindigkeit (Farbskala) und Flusslinien sowie (b) der zeitintegrierten Trajektorien von Fluidpaketen in der MPIS — Simulationsbedingungen in Kapitel 6.12.1

der gerichteten Strömung kann durch die angelegte Gleichspannung ($U_{max} = 16\text{ V}$) und der damit verbundenen Lüfterdrehzahl variiert werden. Dem Axiallüfter folgt ein Anschluss an

die Abluft zur Entsorgung des überschüssigen Gases. Um die Gasbilanz im Quellenkörper auszugleichen, wird der ursprüngliche Anschluss an das Abluftsystem umfunktioniert, sodass hierdurch nun Umgebungsluft als Hilfgas zufließen kann.

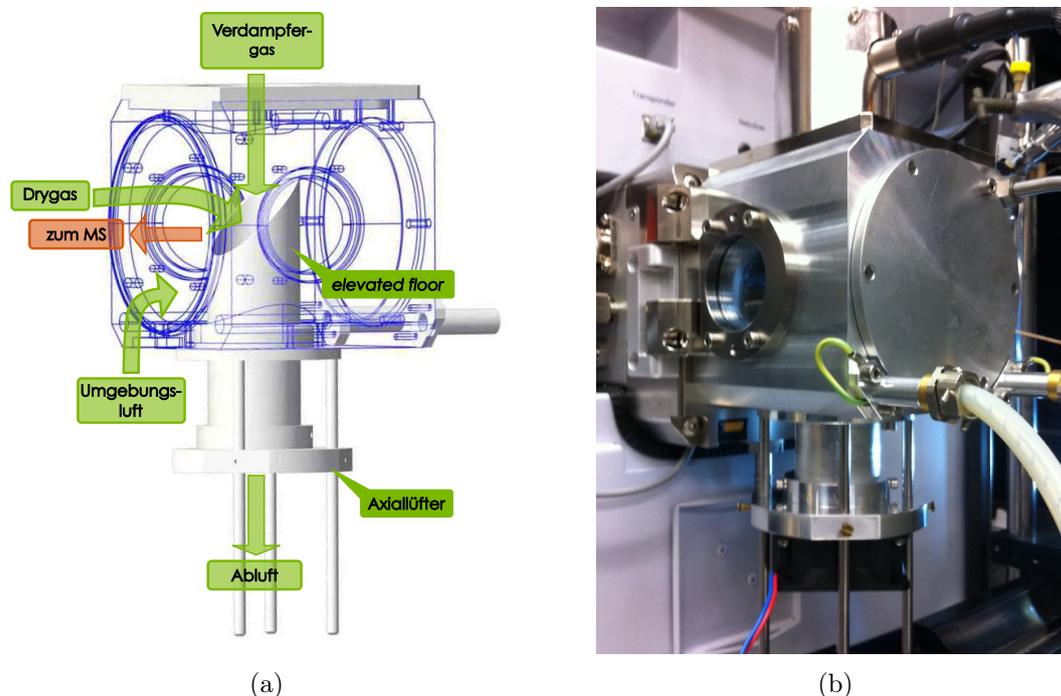


Abbildung 3.8: (a) CAD-Zeichnung mit schematischer Darstellung der Gasführung (grüne Pfeile) bei eingebautem *elevated floor* sowie (b) Foto des montierten *elevated floor* in der TC-MPIS

Um die Änderungen auf chromatographische Peaks durch den Einsatz des *elevated floor* quantitativ erfassen zu können, werden mit Hilfe der Auswertesoftware des Massenspektrometers (Bruker DataAnalysis) die Peakbasisbreite, die Peakbreite auf halber Höhe (engl.: *full width at half maximum*, FWHM) und das Signal-zu-Rauschverhältnis (engl.: *signal-to-noise ratio*, S/N) bestimmt und bewertet. Das ursprüngliche System dient hierbei als Ausgangspunkt für diese Betrachtung. Dafür wurde Anthracen als Referenzsubstanz gewählt, auf eine HPLC-Säule injiziert und mit HPLC-APLI-(TOF)MS analysiert. Während der Messreihe wurde die Intensität der gerichteten Strömung des *elevated floor* variiert, um deren Einfluss auf die Signalintensität zu demonstrieren. Dazu wurde die am Axiallüfter angelegte Gleichspannung in vier Stufen (0, 5, 10 und 15 V) verändert. Die erhaltenen Chromatogramme wurden zum Vergleich der Peakform auf maximale Intensität normiert und in Abbildung 3.9 dargestellt. Chromatogramm a) zeigt die Analyse von Anthracen im ursprünglichen System ohne *elevated floor*. Die Chromatogramme b) bis e) zeigen die Messungen mit dem in die Quelle eingebauten *elevated floor* bei unterschiedlichen Lüfterspannungen. Ohne Normierung werden die Intensitäten der Peaks zwischen a) $7,5 \cdot 10^5$ counts und e) $2,1 \cdot 10^5$ counts sukzessive kleiner.

Der qualitative Vergleich der Peakform zeigt, dass mit zunehmendem, geregeltm Gastrom

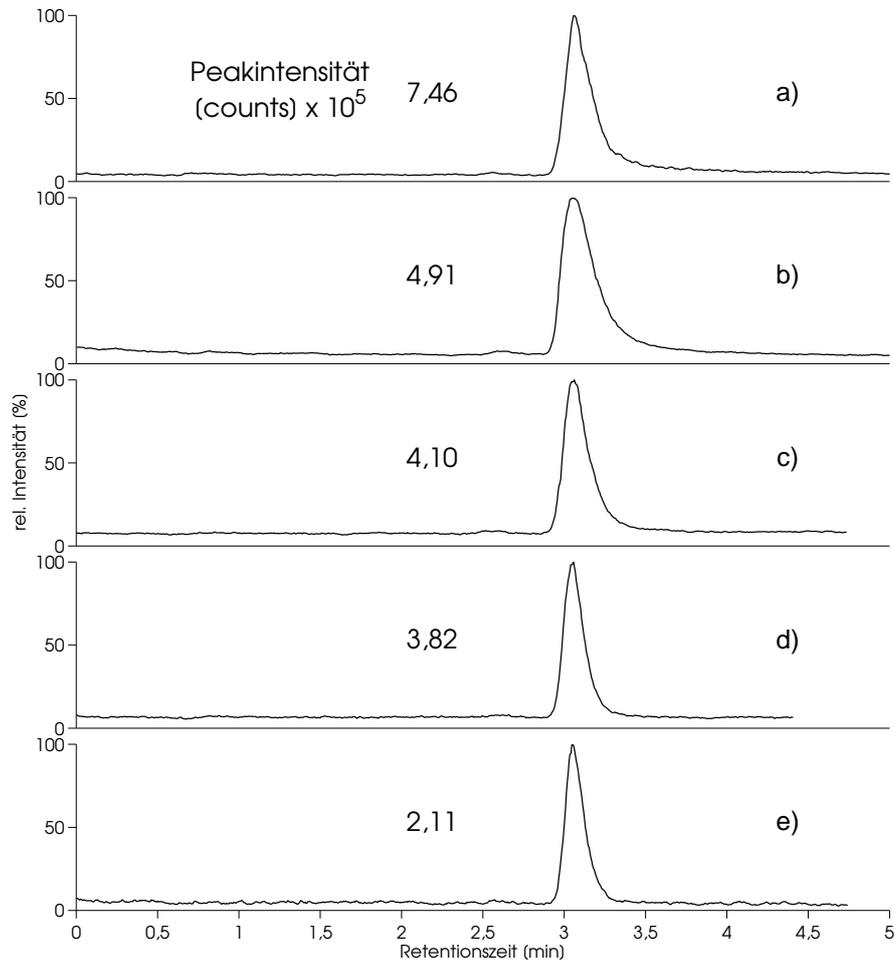


Abbildung 3.9: Normierte HPLC-APLI-(TOF)MS-Chromatogramme von Anthracen (EIC ($178,0 \pm 0,5$)) der Versuchsreihe zum *elevated floor* mit Angabe der ursprünglichen Signalintensität — a): ohne und b) bis e) mit Einbau des *elevated floor* in die TC-MPIS-Quelle. Die am Axiallüfter angelegte Spannung beträgt bei b): 0 V, c): 5 V, d): 10 V und e): 15 V — Trennparameter in Kapitel 6.2.5

in der Quelle das Peaktailing sowie die Peakbasis- und -halbhöhenbreite abnimmt. Dieser Vergleich spiegelt sich auch in der quantitativen Betrachtung der chromatographischen Kennzahlen wider. Diese Kennzahlen sind in Abbildung 3.10 als Balkendiagramme dargestellt und zeigen die Mittelwerte der Peakbasisbreiten w_b (1), der Peakbreiten auf halber Höhe (FWHM) (2) und der Signal-zu-Rauschverhältnisse S/N (3) der Doppelbestimmung.

In der ursprünglichen Konfiguration (a) der Ionenquelle ohne *elevated floor* liegt die Peakbasisbreite (1) des Anthracenpeaks bei etwa 35 s, die Peakbreite auf halber Höhe (2) beträgt etwa 10 s. Die Ionisationseffizienz und die Peakform sind den bekannten fluid- und elektrodynamischen

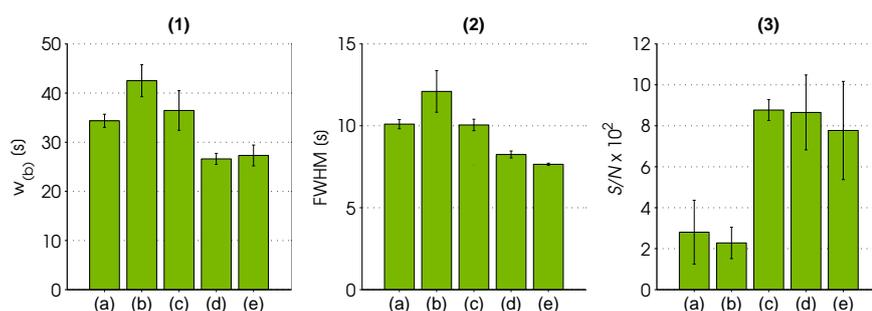


Abbildung 3.10: Balkendiagramme der Kennzahlen für Anthracen aus den HPLC-Messungen zur Peakbreitenoptimierung bei der APLI — ohne (a) und mit (b) bis (e) Einbau des *elevated floor* in die TC-MPIS-Quelle. Die am Axiallüfter angelegte Spannung beträgt bei (b) 0 V, (c) 5 V, (d) 10 V und (e) 15 V

schen Gegebenheiten unterworfen [178]. Nach dem Einbau des *elevated floor* (b) steigen die Peakbreiten vermutlich durch die drastische Störung der Fluid- und Elektrodynamik an. Ohne Ventilation kann das Gasführungsrohr primär als störendes Element für die Fluidodynamik angesehen werden, das durch den starren Rotator zudem wie ein tiefer liegender Verschluss wirkt und somit ein Abführen des Gasstroms verhindert. Mit zunehmender gerichteter Strömung durch eine Steigerung der Lüfterdrehzahl (Spannungssteigerung von $U = 5$ V bei (c) auf 15 V bei (e)) werden die Peakbreiten w_b und FWHM kleiner und erreichen w_b -Werte von etwa 26 s bei einer am Axiallüfter angelegten Spannung von $U = 10$ V. Die gerichtete Gasführung sorgt dafür, dass nicht ionisierte Moleküle aus der Ionisationsquelle geführt werden und dadurch nicht mehr mit Verzögerung in das Massenspektrometer gelangen können. Als Konsequenz kommt es zu einem Anstieg des S/N (3) von ca. 300 auf über 800. Die Hintergrundbelastung mit Analytmolekülen wird in diesem Fall geringer und sorgt für die Steigerung des S/N . Trotz der Verminderung der Signalintensität bzw. der Peakfläche bei steigender Ventilation ist kein Verlust der Nachweisempfindlichkeit zu erkennen, da die S/N entsprechend größer werden. Der Vorteil, der sich durch die Anwendung des *elevated floor* ergibt, ist somit die Steigerung der Peakkapazität für die chromatographische Trennung aufgrund der schmalere Peaks, während die Sensitivität durch Einsatz des *elevated floor* aufgrund des Analytverlustes und der Zunahme des S/N -Verhältnisses kaum verändert wird.

Die Einbautiefe des *elevated floor* wurde in drei Stufen⁸ ebenfalls variiert. Die zuvor dargestellten Daten repräsentieren hierbei die Ergebnisse, die mit der zweiten Stufe erzielt wurden. Stufe 1 liefert keine aussagekräftigen Ergebnisse. Dort ragt das Rohr zur Gasführung maximal, ohne dabei in direkten Kontakt zum Sprayshield⁹ des Massenspektrometers zu gelangen, in den Quellenkörper hinein. Aufgrund des dennoch sehr geringen Abstands (etwa 1 bis 3 mm)

⁸Einbautiefe als relativer Abstand von der Halterung des *elevated floor* bis zum Lüftergehäuse: Stufe 1: –28 mm (maximale Eindringtiefe), Stufe 2: –50 mm und Stufe 3: –75 mm

⁹Eine nähere Beschreibung des Sprayshields sowie weiterer Bauteile des Massenspektrometer-Einlasssystems folgt im nächsten Kapitel (3.1.3)

ist davon auszugehen, dass sich die vom Sprayshield ausgehenden Potentialfelder drastisch ändern und dadurch nur wenige Ionen in Richtung MS-Einlass gelenkt werden können. Der Betrieb des *elevated floor* in Stufe 3 liefert zu Stufe 2 vergleichbare Ergebnisse. Die Eindringtiefe des Gasführungsrohres ist bei Stufe 3 so gewählt, dass der abgeschrägte Teil gerade noch mit dem Quellenboden abschließt. Die Peakbreiten sind mit Stufe 2 vergleichbar und folgen dem gleichen Trend. Die Ergebnisse unterscheiden sich nur dahingehend, dass die Intensitäten der Peaks bei hohen Lüfterdrehzahlen kleiner sind als in Stufe 2, was durch eine unvorteilhafte Störung der Fluidynamik im Quellenkörper erklärt werden kann. Bauartbedingt ist die Eindringtiefe des Gasführungsrohres stufenlos verstellbar. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine optimale Position des *elevated floors* experimentell bestimmt werden muss. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass nicht nur die Position allein ausschlaggebend ist, sondern ebenfalls eine Wechselwirkung zwischen der Position des Rohrs und den Einlassparametern (Potentiale auf dem Sprayshield und der Transferkapillare) des Massenspektrometers besteht, die wiederum einen Einfluss auf die dynamische Ionenakzeptanz und somit auf den optimalen Ionisationsort ausübt.

3.1.3 Einschränkung der Verwendung von Drygas bei GC-APLI

Die Herausforderung bei einer Kopplung zwischen einem AP-Massenspektrometer und flüssigchromatographischen Trennstufen ist die Handhabung großer Lösungsmittelmengen, die in die Ionenquelle eingebracht werden, sowie deren Trennung vom Analyten bzw. den Analytionen. Um zu verhindern, dass Flüssigkeitstropfen in die erste Vakuumstufe des Massenspektrometers gelangen, wird ein temperierbares, sogenanntes Drygas (i. A. reiner Stickstoff) verwendet [64], das bspw. bei der ESI die Lösungsmittelverdampfung unterstützt [3, 188]. Einen Vorteil bietet das Drygas weiterhin dadurch, dass das Massenspektrometer nur sauberes Dry- und wenig dreckiges Umgebungsgas ansaugt. Zur Orientierung ist in Abbildung 3.11a eine schematische Zeichnung des Einlassbereichs vom verwendeten Bruker micrOTOF mit der sogenannten *Standard Sprayshield Anordnung* (SSSA) dargestellt. Die nebenstehende Abbildung 3.11b zeigt eine Fotografie verschiedener Bauteile der Einlassstufe. Das Drygas (a) umströmt die Transferkapillare (b) mit der montierten, fluidodynamisch optimierten Kapillarkappe (c) und tritt anschließend durch die Öffnung des Sprayshields (d) aus, um die Trocknung der hierdurch eintretenden Gase und Ionen zu unterstützen. Die Ionisationszone (e) ist bei der LC-APLI frei positionierbar und liefert je nach eingestellten Parametern wie Sprayshieldspannung, Gasvolumenflüssen usw. unterschiedliche Verteilungen der dynamischen Ionenakzeptanz (DIA) [70, 178]. Für die GC-APLI besteht ebenfalls eine Abhängigkeit der DIA von der Positionierung des Laserstrahls (siehe Kapitel 3.3.3). Die optimale Positionierung des Laserstrahls bei GC-APLI und somit die maximale, dynamische Ionenakzeptanz liegt wie erwartet zwischen der Transferline (f) und dem Sprayshield. Der Abstand zwischen diesen Bauteilen beträgt ca. 5 mm und wird i. A. vollständig vom Laserstrahl des verwendeten Excimerlasers ausgeleuchtet, um eine maximale Ionisierungseffizienz zu erhalten.

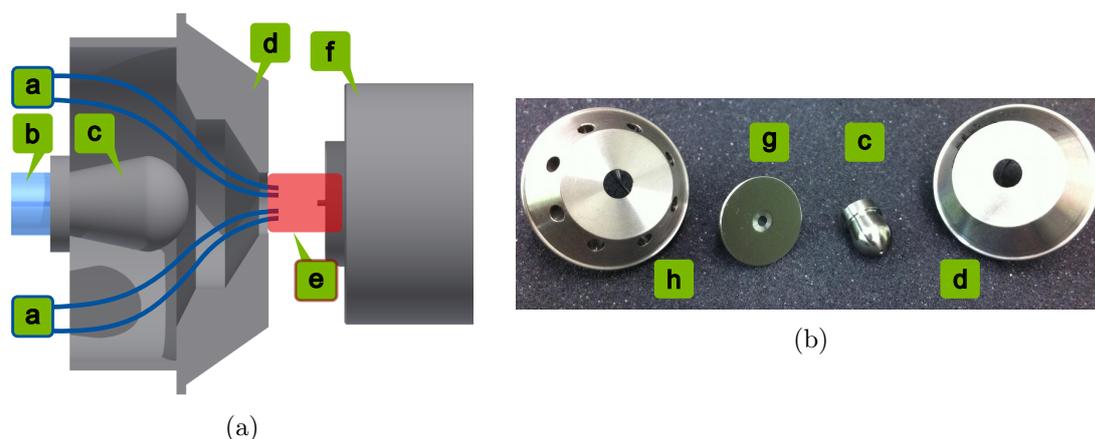


Abbildung 3.11: (a) Schematische Darstellung des Einlassbereichs und (b) Fotografie der unterschiedlichen Bauteile der Einlassstufe des Bruker micrOTOF
 a: Drygas, b: Transferkapillare, c: Kapillarkappe, d: Standard Sprayshield, e: Ionisationszone / Laserstrahl, f: GC-Transferline, g: *nano-GC-Cap*, h: weiterentwickeltes Sprayshield

Für GC-API-Anwendungen wie der GC-APLI, bei denen allgemein keine Trocknung der eintretenden Gase und Ionen erfolgen muss, wird von Bruker empfohlen (insbesondere für eine saubere Gasumgebung) einen Drygasfluss einzustellen [189]. Experimente hierzu belegen aber, dass auch der geringste am Bruker micrOFOF einstellbare Drygasfluss¹⁰ von $1,5 \text{ L min}^{-1}$ ein negativen Einfluss auf die Signalintensität der ionisierten Analyten bewirkt [64]. Das Drygas strömt dem Neutralanalyten und den gebildeten Ionen durch die Öffnung im Sprayshield diametral entgegen, wodurch diese weggespült werden. Für eine maximale Signalintensität ist somit das Abschalten des Drygases unablässig.

Im GC-APLI-Betrieb wird die Einlassstufe des Massenspektrometers mit der SSSA betrieben, die für die meisten Ionisationsmethoden Verwendung findet. Die Kombination aus Kapillarkappe und Sprayshield bietet einen großen Vorteil für die Ionenführung. Die Feldgradienten verlaufen unter optimal gewählten Potentialen trichterförmig und fokussieren so die Ionen auf die Öffnung der Transferkapillare. Eine numerische Simulation dieser Feldgradienten wurde von WISSDORF vorgenommen und ist in Abbildung 3.12a dargestellt. Hierbei stellen die roten Linien Ionentrajektorien dar, die von den ausgebildeten Feldgradienten abhängen. Die Simulation der Ionentrajektorien unterliegt zusätzlich einer Fluidynamik durch bspw. das Drygas. Im Gegensatz zur dargestellten Simulation in Abbildung 3.12b, bei der ein hoher Drygasfluss vorgegeben ist, wurde Abbildung 3.12a ohne Drygasfluss simuliert.

Für den Betrieb des micrOTOF mit GC-APCI wird die SSSA gegen eine flache, runde Kapillarkappe (die sogenannte *nano-GC-Cap*, Abbildung 3.11b (g)) ausgetauscht. Diese ermöglicht, dass die APCI-Nadel näher am Einlass des Massenspektrometers positioniert werden kann und so einen gerichteten Feldgradienten zur *nano-GC-Cap* und der Transferkapillare ausbildet. Hierdurch soll verhindert werden, dass der Gradient nachteilig in Richtung GC-Transferline

¹⁰ein Betrieb mit Drygas ist nur ab einem minimalen Volumenfluss von $1,5 \text{ L min}^{-1}$ möglich (Softwareseitig führt eine Vorgabe zwischen 0 und $1,5 \text{ L min}^{-1}$ zu einem konstanten Volumenfluss von $1,5 \text{ L min}^{-1}$)

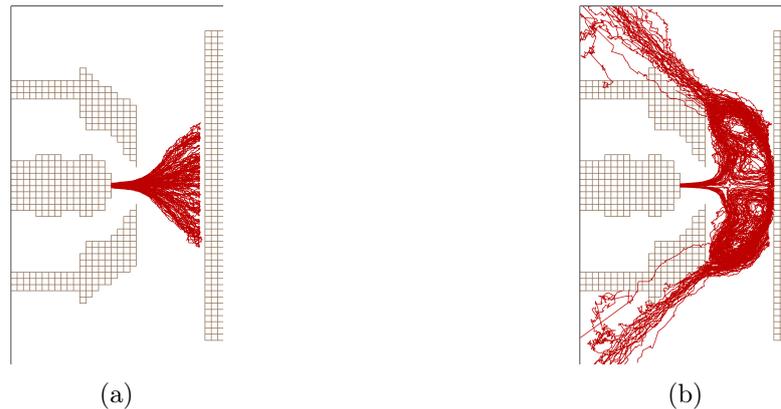


Abbildung 3.12: Numerische Simulationen von Ionentrajektorien zum Vergleich der Feldgradienten mit der *Standard Sprayshield Anordnung* beim micrOTOF unter dem Einfluss eines Drygasflusses von WISSDORF. Die vorgegebene Drygasgeschwindigkeit ist in (a) $0,0 \text{ m s}^{-1}$ und in (b) $0,1556 \text{ m s}^{-1}$. Die roten Linien stellen die simulierten Ionentrajektorien für Ionen mit einem m/z 202 dar und starten von der GC-Transferline — Simulationsbedingungen in Kapitel 6.12.2

ausgebildet wird. Ein Einsatz der *nano-GC-Cap* für die GC-APLI ist ebenfalls möglich und wird im Folgenden behandelt.

Die beiden genannten Einlassanordnungen unterscheiden sich einerseits durch eine unterschiedliche Drygasführung und andererseits durch veränderte Geometrien der Feldgradienten anliegender Potentialfelder. In der SSSA fließt das Drygas durch die etwa 6 mm große Öffnung des Sprayshields in den Ionisationbereich vor dem Massenspektrometer. Bei der *nano-GC-Cap* wird das Drygas geometriebedingt nach außen geführt, wobei ein kleiner Teil der Gasströmung an den Kanten der flachen Kapillarkappe verwirbelt wird und somit ein geringer Teil des *sauberen* Gases ins Massenspektrometer gesaugt werden kann. Fluidodynamischen Simulationen zufolge führt dies zu einem nur geringen Einfluss auf den Bereich vor der MS-Einlassöffnung. Abbildung 3.13a zeigt eine solche numerische Simulation für die *nano-GC-Cap* mit einem hohen Drygasfluss von WISSDORF. Die Farbcodierung des Hintergrunds entspricht hier der Gasgeschwindigkeit, das Vektorfeld stellt die Flussrichtung dar.

Der vorteilhaften Drygasführung der *nano-GC-Cap* für den Betrieb mit GC-APLI steht ein für die Ionenführung nachteiliges Potentialfeld gegenüber. Wie aus der Simulation von WISSDORF in Abbildung 3.13b ersichtlich ist, fokussieren die Ionentrajektorien nicht auf die Öffnung der *nano-GC-Cap* und der Transferkapillare. Vielmehr entsteht zwischen der *nano-GC-Cap* und der GC-Transferline ein Feldgradient, der nahezu dem eines Plattenkondensators entspricht. Für die gebildeten Ionen bedeutet dies, dass sie nur zu einem geringeren Anteil den Weg in das Massenspektrometer finden und folglich die Signalintensität geringer ist als bei der SSSA.

3.1.3.1 Experimentelle Bestimmung der Drygasabhängigkeit in der GC-APLI

Die nachfolgend beschriebenen Experimente sollen die Abhängigkeit der GC-APLI-Signalintensität vom Drygasfluss mit den unterschiedlichen Einlassgeometrien näher beschreiben

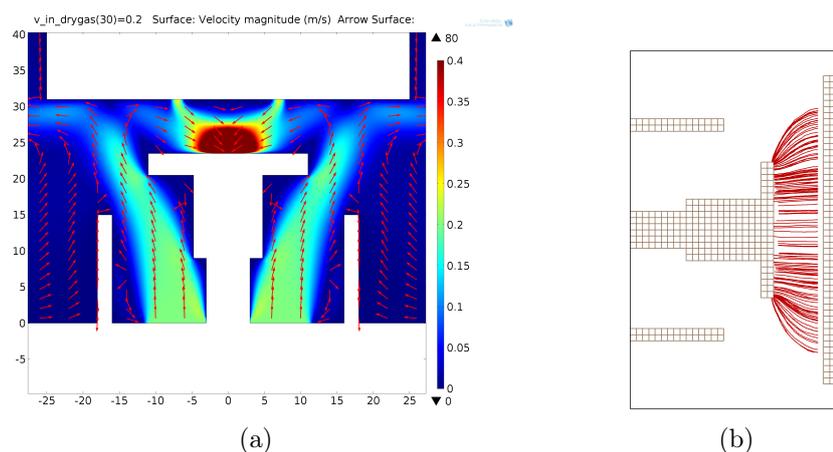


Abbildung 3.13: Numerische Simulationen der (a) Gasgeschwindigkeit (Farbskala) und der Flussfelder sowie der (b) Ionentrajektorien (rote Linien) für Ionen mit m/z 202 bei einer Drygasgeschwindigkeit von $0,2 \text{ m s}^{-1}$ für die *nano-GC-Cap* von WISSDORF — Simulationsbedingungen für (a) in Kapitel 6.12.3 und für (b) in Kapitel 6.12.2

und die aus den numerischen Simulationen erhaltenen Ergebnisse validieren. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Einlassgeometrien wird eine Weiterentwicklung der konventionellen SSSA eingesetzt und evaluiert. Diese nutzt ein von der Fa. BRUKER DALTONIK weiterentwickeltes Sprayshield, das für die Verwendung mit Drygas in der GC-APLI geeignet sein soll (vgl. Abb. 3.11b (h) auf Seite 42). Das neu entwickelte Sprayshield wurde auf den angewinkelten Seitenflächen um acht konzentrisch gleichverteilte Öffnungen (Innendurchmesser etwa 3 mm) erweitert. Durch diese zusätzlichen Öffnungen soll ein Großteil des Drygases geführt werden, um die Drygasmenge durch die zentrale Öffnung des Sprayshields zu minimieren. Zusätzlich soll dadurch eine saubere Gasumgebung vor der Kapillarkappe beibehalten und die Signalintensität im Vergleich zur SSSA bei gleicher Drygasmenge erhöht werden. Eine Darstellung der numerisch simulierten Gasgeschwindigkeiten (mit farbcodiertem Hintergrund) und Flussrichtungen (Vektorfeld) ist in der von WISSDORF erstellten Abbildung 3.14 gegeben. Der Drygasfluss wird in der Simulation zum größten Teil durch die konzentrisch verteilten Öffnungen geleitet. Ein Teil des Gasflusses umströmt wie bei der konventionellen SSSA die Kapillarkappe und wird von der Einlasskapillare eingesaugt. Anzunehmen ist, dass weiterhin ein Teil des Drygases durch die zentrale Öffnung des Sprayshields austritt. Der Einfluss auf die Signalintensität durch das Drygas sollte aber geringer sein als bei der konventionellen SSSA, weil hier nur ein geringerer Teil des Drygases dem Analyten entgegenströmt.

Um den Drygaseinfluss in der GC-APLI experimentell zu bestimmen, wurden Analysen einer deuterierten PAK-Mischung (PAK-Mix 31, siehe Tabelle 7.2.3) unter Variation des Drygasflusses in drei Stufen ($0,0 \text{ L min}^{-1}$, $1,5 \text{ L min}^{-1}$ und $3,0 \text{ L min}^{-1}$) mit den drei Einlassgeometrien durchgeführt. Die dabei erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 3.15 in Abhängigkeit der Einlassgeometrie und des Drygasflusses dargestellt.

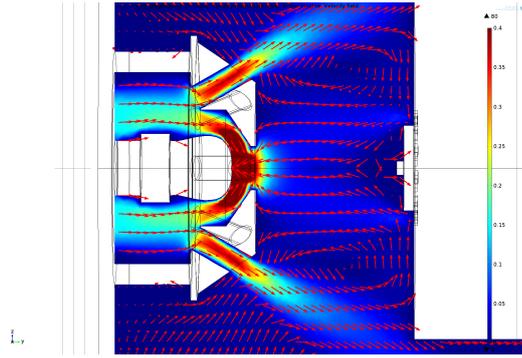


Abbildung 3.14: Numerische Simulation der Gasgeschwindigkeit und der Flussfelder für die weiterentwickelte SSSA (simuliert von WISSDORF) — Simulationsbedingungen in Kapitel 6.12.3

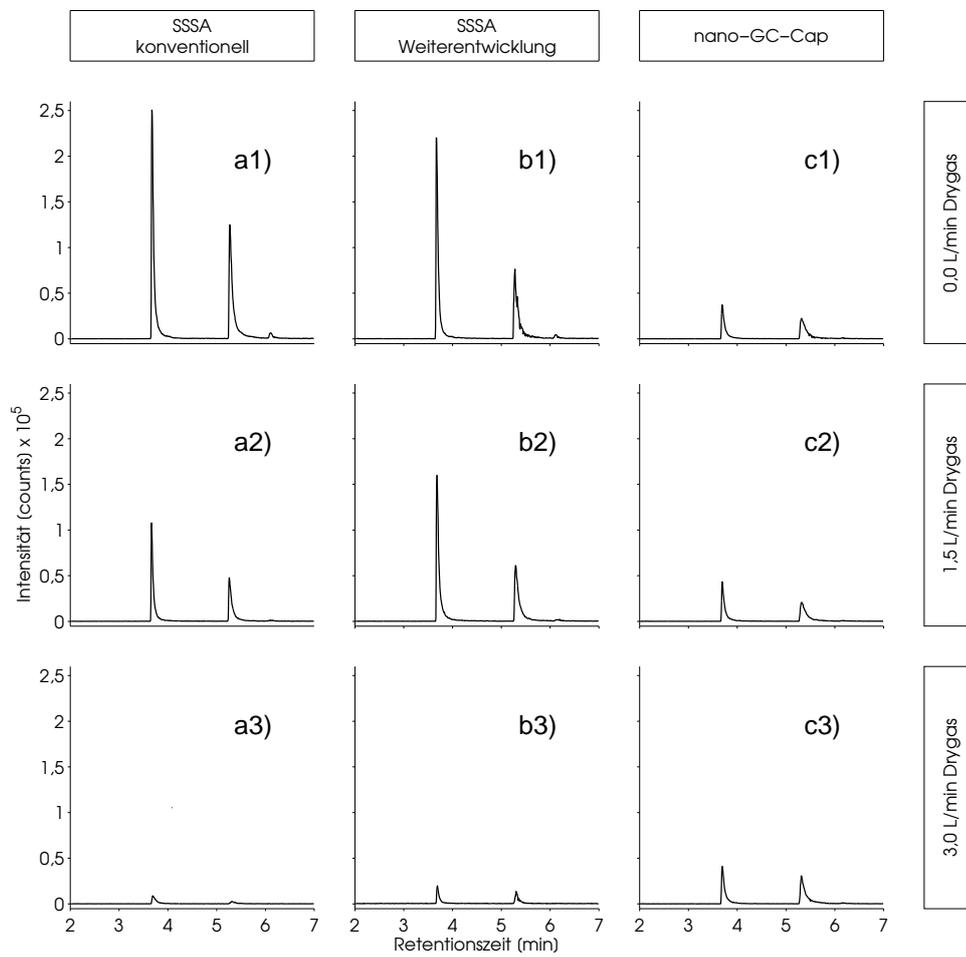


Abbildung 3.15: GC-APLI-Chromatogramme (summiertes EIC für Phenanthren-d10 m/z 188,0 (Retentionszeit $t_r \approx 3,7$ min)), Chrysen-d12 m/z 240,0 ($t_r \approx 5,3$ min) und Perylen-d12 m/z 264,0 ($t_r \approx 6,1$ min), jeweils $\pm 0,5$) in Abhängigkeit von verschiedenen Einlassgeometrien (Spalten) und Drygasflüssen (Zeilen) — Trennparameter in Kapitel 6.1.2

Die erste Spalte zeigt die Chromatogramme mit der konventionellen SSSA. Für die betrachteten Substanzen kann hier jeweils die höchste Signalintensität für die gesamte Versuchsreihe gemessen werden. Zum quantitativen Vergleich sind in Abbildung 3.16 die ermittelten Peakflächen für Phenanthren-d10 in Abhängigkeit des Drygasflusses aufgetragen. Die Peakfläche für Phenanthren-d10 wird bspw. bei einer Erhöhung des Drygasflusses von $0,0$ auf $1,5 \text{ L min}^{-1}$ bei der konventionellen SSSA auf etwa 40% verringert. Die Signalintensität bei $3,0 \text{ L min}^{-1}$ entspricht nur noch ca. 5% des Signals bei $0,0 \text{ L min}^{-1}$. Dieser abnehmende Trend kann ebenfalls für die weiterentwickelte SSSA beobachtet werden. Durch die geänderte Drygasführung ist allerdings der Verlust der Ionisationsausbeute bzw. an Ionen, die das Massenspektrometer erreichen, geringer als in der konventionellen SSSA. Die Flächen erreichen hier etwa 61% bei $1,5 \text{ L min}^{-1}$ Drygas und 10% bei $3,0 \text{ L min}^{-1}$. Für die *nano-GC-Cap* können aufgrund der Drygasführung und der Feldgradienten geringere aber konstante Peakintensitäten und -flächen beobachtet werden. Ohne eine Fokussierung der Ionen auf die Öffnung der Einlasskapillare sind die Peakflächen entsprechend kleiner als bei den beiden SSSA-Varianten. Verglichen mit der SSSA bei $0,0 \text{ L min}^{-1}$ Drygas liegen die Peakflächen mit der *nano-GC-Cap* - unabhängig vom Drygas - konstant bei etwa 20% .

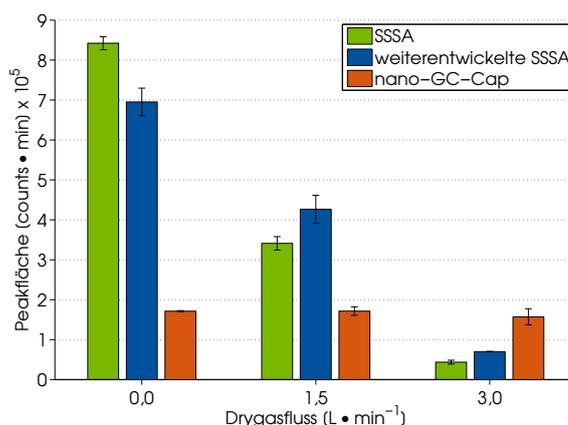


Abbildung 3.16: Mittlere Peakflächen ($n=2$) von Phenanthren-d10 aus den GC-APLI-Chromatogrammen in Abbildung 3.15 in Abhängigkeit des Drygasflusses und der verschiedenen Einlassgeometrien

Die Ergebnisse dieser Messreihen und die zugehörigen numerischen Simulationen sind zueinander konsistent. Eine Zugabe von Drygas führt in der GC-APLI in jedem Fall zu einem Verlust an Signalintensität und somit zu einem geringeren Nachweisvermögen. Als vom Drygas unabhängig kann nur die *nano-GC-Cap* als Option für die Einlassgeometrie des Massenspektrometers gelten. Durch die Höhe des Verlust an Ionen aufgrund der unvorteilhaften Feldgradienten stellt auch diese Geometrie keine sinnvolle Alternative für die GC-APLI dar. Die *nano-GC-Cap* bietet nur den bereits beschriebenen Vorteil für die GC-APCI, für deren Anwendung diese Geometrie entwickelt wurde. Die Anwendung der weiterentwickelten SSSA bietet einen signifikanten Vorteil gegenüber der konventionellen SSSA bei Verwendung von

Drygas. Sie lässt sich aber nicht mit einer maximierten Intensität vereinbaren. Inwieweit die Verwendung von Drygas in der GC-API-MS als sinnvoll betrachtet werden kann, müssen Langzeitstudien bezüglich einer Kontamination des Einlassbereichs zeigen.

3.2 Charakterisierung der APLI als Ionisationsmethode

Für einige der bekannten AP-Ionisationsmethoden sind verschiedene Probleme beim jeweiligen Ionisationsprozess hinreichend bekannt und untersucht. Unter anderem tritt z. B. bei der Elektrosprayionisation unter bestimmten Umständen eine Ionensuppression auf, für deren Erklärung unterschiedliche Modelle zur Verfügung stehen [26, 31, 190–192]. Eine solche Untersuchung fehlt für die APLI bislang.

Im folgenden Kapitel wird untersucht, ob es bei der APLI im Vergleich zu den bekannten Ionisationsmethoden zu einer Ionensuppression kommt. Ebenso sollen Experimente und theoretische Berechnungen das Modell des Ionisationsmechanismus der APLI bestätigen und beschreiben, unter welchen Umständen Fragmentensignale zu erwarten sind.

3.2.1 Untersuchung der Ionensuppression bei HPLC-APLI

Bei der Analyse komplexer Proben mittels LC-MS treten verschiedene Formen von Matrixeffekten auf. Einer dieser Effekte, der zumeist einen negativen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit und Genauigkeit einer quantitativen massenspektrometrischen Detektion ausübt, ist die sogenannte Ionensuppression [190, 191]. Diese bewirkt häufig eine Verminderung des Analytensignals und entsteht u. a. durch Koelution von Matrixbestandteilen, schlecht verdampfbaren Substanzen oder Substanzen mit hoher Gasphasenbasizität.

Für die ESI werden verschiedene Ursachen der Ionensuppression diskutiert. Bei zu hohen Konzentrationen an ionisierbaren Substanzen werden mit der ESI Verluste der Signalintensität detektiert, abweichend vom ansonsten linearen Verhalten. Die Gründe hierfür lassen sich auf eine limitierte Anzahl der zur Verfügung stehenden Ladungen in oder einer Sättigung der Analyten auf einem Spraytropfen zurückführen. Weiterhin ist die Viskosität hochkonzentrierter Lösungen erhöht und führt dadurch zu einer Verminderung der Lösungsmittelverdampfung aus dem Tropfen und somit zu einer geringeren Anzahl von Analytionen in der Gasphase [191, 193, 194]. Aus demselben Grund werden durch schlecht verdampfbare Substanzen im Elektrospray ebenfalls weniger Analytionen gebildet [190]. Zusätzlich zu diesen auf die Flüssigphase beschränkten Effekten können bereits ionisierte Verbindungen mit koelutierenden Substanzen, die eine hohe Gasphasenbasizität aufweisen, um ihre Ladung konkurrieren. Dieser Effekt tritt nicht nur bei der ESI, sondern auch bei der APCI auf [194, 195]. Allgemein ist die Ionensuppression bei APCI weitaus geringer als bei der ESI, was mit dem Ionisationsmechanismus zusammen hängt [191].

Bei der APLI findet die Ionisation wie in der APCI nach dem nahezu vollständigen Verdampfen und Überführen der Analyten in die Gasphase statt. Eine Untersuchung der Ionensuppression für die APLI hat bislang nicht stattgefunden. Dadurch, dass die Ionisation bei

APLI ebenfalls in der Gasphase stattfindet, ist eine der APCI ähnliche Ionensuppression zu erwarten. Um den Einfluss einer solchen Ionensuppression auf diese Ionisationsmethode zu untersuchen und damit einen Vergleich zu den bekannten Methoden zu ermöglichen, wurden die nachfolgend beschriebenen Experimente durchgeführt. Allgemein stehen für die experimentelle Bestimmung der Ionensuppression mehrere Verfahren zur Verfügung, von denen einige mit dem sogenannten *multiple reaction monitoring* (MRM) durchgeführt werden [191]. Hierfür ist die Anwendung einer MS/MS-Methode notwendig, die für die durchgeführten Experimente nicht zur Verfügung stand. Stattdessen wurde eine Methode, die zusätzlich eine Bestimmung der zeitlichen Ionensuppression während einer chromatographischen Trennung erlaubt, genutzt [193].

Für die Bestimmung der Ionensuppression wurde eine stark matrixbelastete Probe per HPLC chromatographiert und mit einem kontinuierlich zugegebenen – für die Ionisation zugänglichen – Analyten gemeinsam in die Ionenquelle gegeben und zur Ionisation gebracht (Abbildung 3.17). Die folgenden Ergebnisse wurden mit einer Urinmatrix als matrixbelasteter Probe für APLI, APCI und ESI durchgeführt. Die erfolgte Aufarbeitung des Urins ist in Kapitel 6.7.3 beschrieben. Für die in Abbildung 3.18 dargestellten EIC (m/z 191,0 und $209,0 \pm 0,5$) erfolgte die chromatographische Trennung des Urinextrakts isokratisch mit einem Eluenten aus Methanol und Wasser ($V/V = 70\%/30\%$) (weitere Bedingungen sind in Kapitel 6.2.4 angegeben). Über ein T-Stück und eine Spritzenpumpe wurde dem Eluat eine Lösung von Anthracen-9-methanol ($M = 208,3 \text{ g mol}^{-1}$) hinzugegeben.

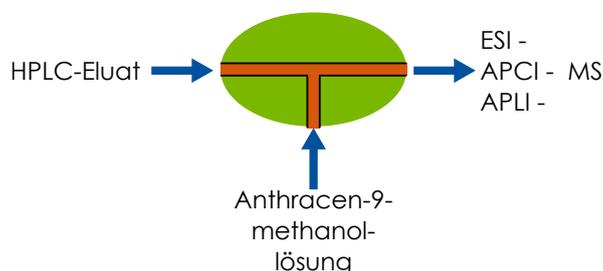


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Ionensuppression

Anthracen-9-methanol (**8**) wurde aus einer Reihe von Vorversuchen, bei der die Ionisierbarkeit verschiedener Substanzen mit ESI, APCI und APLI untersucht wurde, als Analyt ausgewählt. Hier konnte gezeigt werden, dass Anthracen-9-methanol mit allen Ionisationsmethoden zugänglich ist¹¹. Für APLI und APCI zeigten die Massenspektren aus diesen Versuchen zwei relevante m/z -Verhältnisse. Zum einen wird – bedingt durch CID – ein Fragment mit dem m/z 191 und zum anderen das protonierte Molekülion mit m/z 209 gebildet. Beide Massenspektren werden nachfolgend als summiertes EIC betrachtet.

Leider zeigten die Messungen der Ionensuppression bei ESI mit der Urinprobe unter den verwendeten Bedingungen eine große Anzahl chromatographischer Peaks mit relevanten m/z -

¹¹für ESI erfolgte zum Erhöhen der Ionisationseffizienz die Zugabe von NH_4^+ -Ionen zum Eluenten

Verhältnissen von **8** in einem Zeitfenster, in dem die Elution von supprimierenden Substanzen erwartet wird. Ein Vergleich zu den bekannten Suppressioneffekten bei ESI kann deshalb nicht erfolgen. Für diese Untersuchungen wäre ein hochauflösendes Massenspektrometer notwendig gewesen. Es werden daher nur Ergebnisse aus APCI- und APLI-Messungen zur Diskussion der Ionensuppression betrachtet.

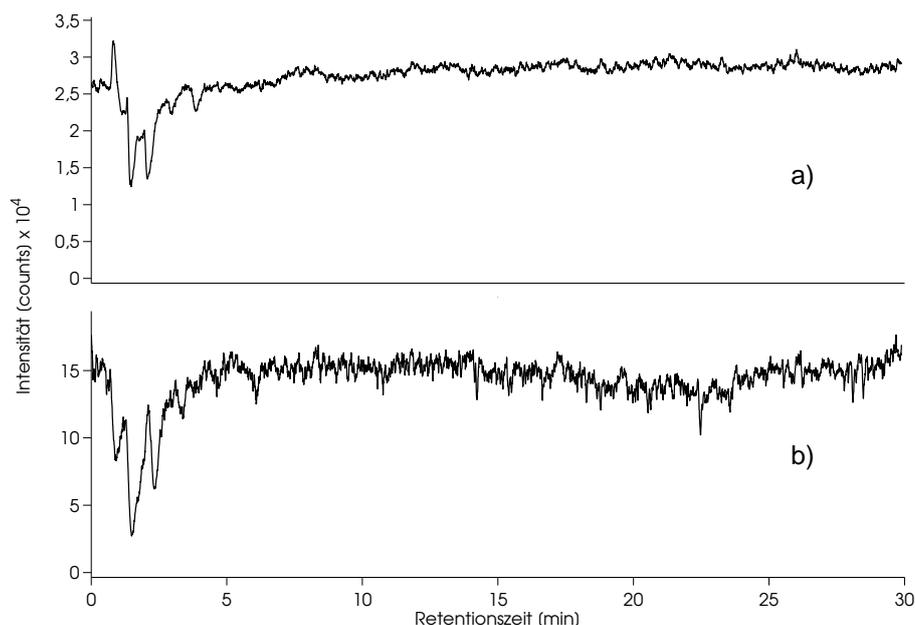


Abbildung 3.18: HPLC-Chromtogramme der summierten EIC ($\Sigma m/z$ 191,0 und $209,0 \pm 0,5$) für Anthracen-9-methanol (**8**) zum Vergleich der Suppression durch eine Urinmatrix bei a): HPLC-APCI und b): HPLC-APLI — Trennparameter in Kapitel 6.2.4

Obwohl die Ionisierungseffizienz der APCI deutlich weniger als die der ESI von einer Ionensuppression beeinflusst wird, können besonders basische Matrixbestandteile bzw. solche mit einer hohen Gasphasenbasizität einen solchen Effekt auslösen [191, 196]. Harnstoff ist ein stickstoffhaltiges Hauptprodukt des Proteinkatabolismus im Körper des Menschen und wird in großen Mengen (im Bereich von ca. 25 g d^{-1}) über den Urin ausgeschieden [197, 198]. Die Gasphasenbasizität von Harnstoff ist nur geringfügig niedriger als die von aliphatischen Aminen oder Ammoniak [199, 200] und erreicht somit eine beachtenswerte Protonenaffinität. Als Folge hieraus ist eine leichte Ionensuppression für die Analyse eines Urinextrakts zu erwarten, zumal im Urin weitere Substanzen mit hoher Gasphasenbasizität vorhanden sind. Chromatogramm (a) in Abbildung 3.18 zeigt das EIC der oben genannten m/z -Verhältnisse für **8** bei der Analyse eines Urinextrakts mit HPLC-APCI. Im vorderen Bereich (bis ca. 5 Minuten) ist eine leichte Ionensuppression zu erkennen. Chromatogramm (b) derselben Analyse mit HPLC-APLI zeigt ein identisches Verhalten der Ionensuppression. Aufgrund der identischen Matrix

ist hier ebenfalls eine leichte Ionensuppression zu erwarten, die durch die oben genannten Gründe bezüglich der Gasphasenbasizität entsteht.

Anhand dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Ionensuppression bei HPLC-APLI auch in weiteren Fällen mit der der HPLC-APCI vergleichbar ist und nicht in einer Stärke beeinflusst wird, wie es für die ESI erwartet wird. Um jedoch eine umfassende und fundiertere Aussage über Suppressionseffekte sowie deren Vergleich bei den unterschiedlichen Ionisationsmethoden machen zu können, sind weitere Experimente mit unterschiedlichen Matrizes und ionisierbaren Zusätzen erforderlich.

3.2.2 Analytfragmentierung durch CID

Bei der Atmosphärendruck-Massenspektrometrie (AP-MS) werden die Analyten in einer Ionenquelle unter Atmosphärendruck ionisiert. Die Isolation der Ionen vom Neutralgas, die Massenauftrennung und die Detektion erfolgen hingegen in Bereichen mit deutlich niedrigerem Druck. Um in den Hochvakuumbereich eines Massenspektrometers zu gelangen, müssen die Ionen dabei – meist durch elektrische Felder beschleunigt und fokussiert – mehrere sogenannte differentielle Druckreduktionsstufen passieren. Die Einstellungsparameter (i. A. elektrische Potentiale) der hierfür benötigten Bauelemente (Skimmer, RF-Multipole, Ionenlinsen usw.) werden zusammengefasst allgemein als Ionentransmissionsparameter bezeichnet.

Abbildung 3.19 zeigt den schematischen Aufbau eines orthogonal beschleunigenden Flugzeitmassenspektrometers (oa-(TOF)MS) wie dem micrOTOF der Fa. BRUKER DALTONIK.

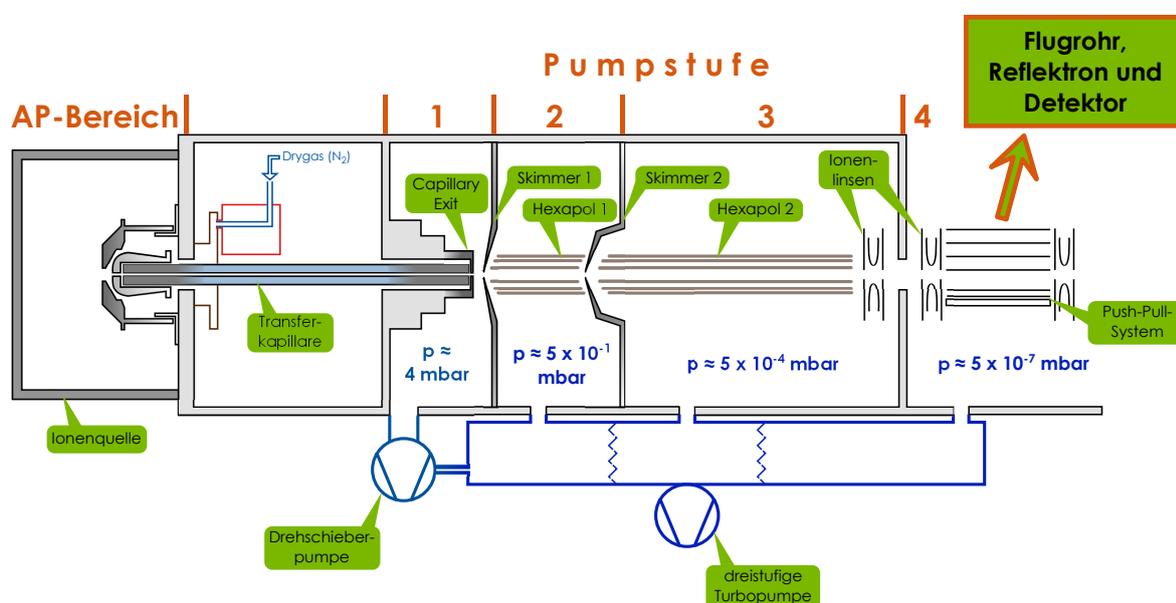


Abbildung 3.19: Schema eines orthogonal beschleunigenden Flugzeitmassenspektrometers nach [201]

Die in der Ionenquelle gebildeten Ionen werden durch Potentialfelder beschleunigt und passieren zunächst eine etwa 18 cm lange Glaskapillare (Innendurchmesser (ID) 0,5 mm), deren

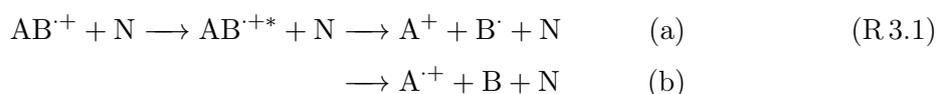
Ausgang in der ersten differentiellen Pumpstufe des Massenspektrometers endet. Viele der aktuell kommerziell erhältlichen Massenspektrometer arbeiten mit solchen Glaskapillaren zur ersten Druckreduktion. Der Druck in der ersten Vakuumstufe liegt im Bereich von wenigen mbar und wird als Grobvakuum bezeichnet. Zum Erreichen des Grobvakuums wird beim Bruker micrOTOF eine Drehschieberpumpe verwendet, die auch als Vorstufe für die dreistufige Turbomolekularpumpe des Feinvakuums dient. Die beiden Enden der Glaskapillare sind metallbeschichtet, wodurch sowohl auf Atmosphärendruckseite in der Ionenquelle als auch in der ersten differentiellen Vakuumstufe jeweils ein elektrisches Potential auf die Kapillarenden gelegt werden kann. Im Atmosphärendruckbereich dienen diese Potentiale dazu, die in der Ionenquelle gebildeten Ionen auf den *Einsaugbereich* der Kapillare zu fokussieren, um sie mit einem Gasstrom (bedingt durch den Unterdruck im Massenspektrometer) durch die Kapillare transportieren zu können.

Im Grobvakuumbereich werden die Ionen aus der unterexpandierten Gasströmung des Kapillarausgangs durch ein anliegendes elektrisches Potential von $\Delta U \approx 50$ bis 250 V (CapillaryExit-Spannung) auf die erste kegelförmige Skimmerelektrode (als Skimmer 1 bezeichnet) – oder bei neueren Geräten durch einen Ionentrichter (sogenannter *Ion-funnel*) – in die nächste Vakuumstufe fokussiert. Über eine weitere Skimmer/RF-Hexapol-Kombination – bei einem wiederum niedrigeren Druck – gelangen die Ionen dann durch die Ionenlinsen in das Push-Pull-System des Massenanalysators. Die kleine Öffnung im Skimmer 1 und Skimmer 2 stellt dabei eine Restriktionsstelle für die weitere Druckreduktion dar. Die eingesetzten Multipole lenken durch Gleich- und RF-Wechselfelder die Ionen auf stabile Flugbahnen und ermöglichen eine Trennung von Ionen und ungeladenen Teilchen.

Durch die anliegenden Potentiale erfahren die Ionen jeweils eine Beschleunigung und somit eine Erhöhung ihrer kinetischen Energie (E_{kin}). Bei dem vor Skimmer 1 herrschenden Druck beträgt die Teilchenzahldichte etwa 10^{17} Teilchen cm^{-3} , im ersten Multipol (Hexapol) und vor Skimmer 2 etwa 10^{16} Teilchen cm^{-3} . Diese relativ hohen Teilchendichten führen zwangsläufig im Bereich vor Skimmer 1 und ebenso vor Skimmer 2 zu teils sehr energiereichen Stößen zwischen den beschleunigten Ionen und vorhandenen Neutralteilchen (meistens N_2).

Die Region vor Skimmer 2 ist dabei als besonders kritisch zu betrachten, da hier die Ionen durch die elektrischen Felder eine hohe E_{kin} erreichen können und zudem die Teilchenzahldichte noch relativ hoch ist. Energiereiche Stöße mit Neutralteilchen treten hier vermehrt auf, sodass die Ionen einer kollisions-induzierten Dissoziation (CID) unterliegen können [17]. Bei CID erfolgt aufgrund der Stöße eine Aktivierung der Ionen mit anschließender statistischer Umverteilung eines Teils der kinetischen Energie E_{kin} in innere Energie U [3]. Je nach Beschaffenheit und Stabilität des Moleküls bzw. dessen Bindungen sowie der Menge an zugeführter innerer Energie kann es nach den CID-Stößen zu Bindungsbrüchen und Fragmentation kommen (Reaktionsgleichung R.3.1 [3]). Ein durch einen Stoß mit einem Neutralteilchen N aktiviertes Radikalkation AB^{+*} , dessen innere Energie statistisch verteilt ist, kann durch einen weiteren Stoß mit einem Stoßpartner N dissoziativ auf verschiedenen Fragmentationswegen abhängig von der inneren Energie U zerfallen: Reaktionsweg R.3.1(a) führt zur Bildung eines

einfachen Ion A^+ und einem neutralen Radikal $B\cdot$, Reaktionsweg R.3.1(b) zu einem Radikalkation $A^{\cdot+}$ sowie einem Neutralteilchen B .



Diese Vorgänge können in analytischer Anwendung als Methode zur Strukturaufklärung von Verbindungen genutzt werden. Vielfach finden sie in Laboratorien als sogenanntes MS/MS (oder auch in spezieller Form als MS^n) Anwendung¹² [17].

Analytische Anwendung der CID

Bei MS/MS- oder MS^n -Experimenten wird in einem Massenseparator ein Ionenpaket bestimmter m/z -Verhältnisse selektiert und in einer Stoßzelle (z. B. eine Ionenfalle oder ein Quadrupol) einem Stoßgas unter leicht erhöhtem Druck ausgesetzt. Die Stöße führen zur Bildung von Fragmenten durch CID, die anschließend wiederum nach ihrem m/z -Verhältnis getrennt und detektiert werden [3]. Dieses Verfahren bietet für die Analytik zwei Vorteile: Einerseits lassen sich aus den hierbei gewonnenen Informationen Rückschlüsse auf die Molekülstruktur ziehen. Andererseits kann dieses Verfahren einer selektiven Detektion dienen und somit die Sensitivität (verbessertes S/N -Verhältnis) auf einzelne Analyten bzw. deren Fragmente erhöhen, was zu empfindlicheren Nachweisen führt. Als geeignet erweisen sich solche Verfahren speziell bei weichen Ionisationsverfahren, die ansonsten stabile Ionen mit geringen inneren Energien hervorbringen [3].

Unerwünschte CID-Prozesse in der Analytik

Bei einem Probenscreening bzw. bei der Targetanalytik auf bestimmte Substanzen in Realproben führen besonders unerwartete CID zu Problemen. Während bei einer umfassenden Messung durch Aufzeichnen eines Gesamtionenchromatogramms (TIC) alle vom Detektor registrierten Ionen summiert und als Chromatogramm ausgegeben werden, wird bei der Targetanalytik meistens ein sogenanntes EIC aufgezeichnet. Das EIC wird vom Benutzer gewählt und zeichnet ein definiertes, erwartetes m/z -Verhältnis (in bestimmten Grenzen) einer bestimmten Zielverbindung auf [3]. Stimmt das gewählte m/z -Verhältnis für das EIC nicht mit dem m/z -Verhältnis des Analytens überein, weil dieses bspw. durch CID als Fragment auftritt, wird auf der gewählten EIC-Spur kein chromatographischer Peak registriert und das Ergebnis evtl. fehlinterpretiert.

¹²als Stoßgase werden hierbei u. a. Helium, Argon und N_2 eingesetzt [3]

3.2.2.1 CID von alkylierten PAK bei GC-APLI-(TOF)MS

Für den Ionisierungsprozess der APLI ist bekannt, dass die Wechselwirkung des Analyten mit den Laserphotonen zur Bildung eines Radikalkations ($M^{\cdot+}$) führt [28, 66, 70]. Werden die Ionen ohne eine signifikante Beschleunigung durch Feldgradienten in der Ionentransmissionsoptik, also ohne starke Erhöhung der Iontemperatur in den Massenanalysator geleitet, wird nahezu ausschließlich das Massensignal des Radikalkations erhalten. Durch Transmission der Ionen durch die Ionenoptik unter Anwendung starker Potentialfelder wird die Iontemperatur erhöht. Dies ist bspw. beim verwendeten Bruker micrOTOF der Fall. Hierdurch kommt es ggf. zu nachgelagerten Prozessen wie Clusterbildung, CID bzw. Fragmentation o. ä. auf dem Weg in Richtung Massenanalysator und somit u. U. zu einer Änderung des m/z -Verhältnisses des betreffenden Analyten.

Ein mit der GC-APLI-(TOF)MS an einem Bruker micrOTOF aufgenommenes Chromatogramm eines QuEChERS-Probenextrakts einer unbekanntes Jakobsmuschel zeigte im TIC einige chromatographische Signale (u. a. einige mit dem m/z -Verhältnis 141,1) zwischen den durch Standards zuvor bekannten Substanzen Naphthalin und Phenanthren. Durch eine unter gleichen Bedingungen durchgeführte gaschromatographische Analyse der PAK-Mischung PAK-Mix 14 (enthält 1- und 2-Methylnaphthalin – siehe Tabelle 7.2.3) konnten zwei dieser Peaks als Monomethylnaphthalinisomere sowie weitere als kleinere Dreiring-PAK identifiziert werden.

Die Monomethylnaphthalinisomere ($M_{(exakt)} = 142,1 \text{ g mol}^{-1}$) aus PAK-Mix 14 zeigten allerdings nicht das durch den APLI-Prozess zu erwartende m/z -Verhältnis von jeweils 142,1, sondern ein m/z -Verhältnis von 141,1 (als *most abundant m/z*). Für die kleineren Dreiring-PAK (z. B. Acenaphthen, Fluoren) konnten ebenfalls nicht die erwarteten m/z -Verhältnisse des Radikalkations detektiert werden. Zur weiteren Identifizierung wurde deshalb eine synthetische Mischung verschiedener Alkylnaphthaline (und Alkylanthracene - siehe Tabelle 3.1) hergestellt und mittels GC-APLI analysiert. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 3.20 mit den summierten EIC für m/z -Verhältnisse von 141, 155, 191, 192 und 206 (jeweils $\pm 0,5$) dargestellt.

Alkylnaphthaline

Die Massenspektren der Peaks **9** - **12** sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Bei keiner der Verbindungen ist eine Detektion des erwarteten Radikalkation- m/z zu beobachten. Durch die gewählten Ionentransmissionseinstellungen am Bruker micrOTOF (z. B. durch das Potentialgefälle zwischen CapillaryExit und Skimmer 1 sowie das Potential auf Skimmer 2) wird das 1-Methylnaphthalin ($M = 142,1 \text{ Da}$) einer Fragmentation durch Stöße mit dem umgebenden Stickstoff ausgesetzt, bei der es formal ein Wasserstoffatom verliert und ein Ion

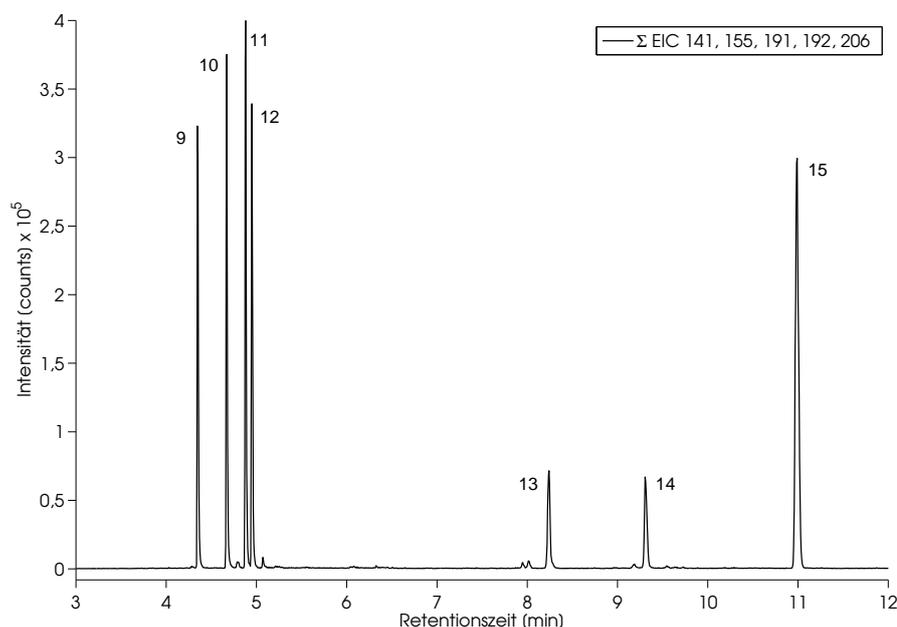


Abbildung 3.20: GC-Analyse von 7 Alkyl-PAK — **9**: 1-Methylnaphthalin, **10**: 2-Ethylnaphthalin, **11**: 1,4-Dimethylnaphthalin, **12**: 1,2-Dimethylnaphthalin, **13**: 1-Methylanthracen, **14**: 2-Ethylanthracen, **15**: 9,10-Dimethylanthracen — Trennparameter in Kapitel 6.1.1

Tabelle 3.1: Synthetische Mischung verschiedener Alkyl-PAK

Peak / Nr.	Substanz	Masse M [Da]	detektierte m/z	β [$\mu\text{g L}^{-1}$]
9	1-Methylnaphthalin	142,1	141,1*	25
10	2-Ethylnaphthalin	156,1	128,1 141,1*	25
11	1,4-Dimethylnaphthalin	156,1	128,1; 141,1*; 155,1	25
12	1,2-Dimethylnaphthalin	156,1	128,1; 141,1*; 155,1	25
13	1-Methylanthracen	192,1	192,1*	10
14	2-Ethylanthracen	206,1	191,1; 206,1*	10
15	9,10-Dimethylanthracen	206,1	191,1; 206,1*	25

*: *intensivstes Signal*

$[\text{M-H}]^+$ mit dem m/z -Verhältnis 141,1 bildet¹³ (vgl. Massenspektrum in Abbildung 3.21a). Bei der Radikalkation des 2-Ethylnaphthalins ($M = 156,1$ Da) führt dieser Prozess vermutlich sogar zu einem Bruch der aliphatischen C–C-Bindung, wodurch hauptsächlich formal eine Methylgruppe abgespalten und ebenfalls ein Ion mit dem m/z -Verhältnis 141,1 gebildet wird

¹³ das isomere 2-Methylnaphthalin verhält sich identisch, was durch die gleiche GC-APLI-Analyse des PAK-Mix 14 bestätigt werden konnte

(Massenspektrum in Abbildung 3.21b). Dagegen verlieren – wie aus den Abbildungen 3.21c und 3.21d ersichtlich ist – die Ionen von **11** und **12** entweder formal ein Wasserstoffatom (Bildung eines $[M-H]^+$ - m/z 155,1) oder eine Methylgruppe (Bildung von $[M-CH_3]^+$ - m/z 141,1).

Die Ergebnisse aus den Massenspektren legen den Schluss nahe, dass von den analysierten Alkyl-naphthalinen keines ein ausreichend stabiles Radikalkation M^+ besitzt, welches ohne Fragmentierungsreaktion den Massenanalysator erreicht. Die nachfolgende Betrachtung der Alkylanthracene spiegeln ein leicht anderes Verhalten wider. Zur weiterführenden Betrachtung und Erklärung wird später auf ergänzende Messungen an einem anderen MS-System sowie Berechnungen eingegangen (Kapitel 3.2.2.2).

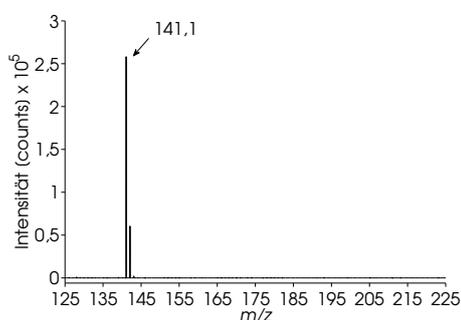
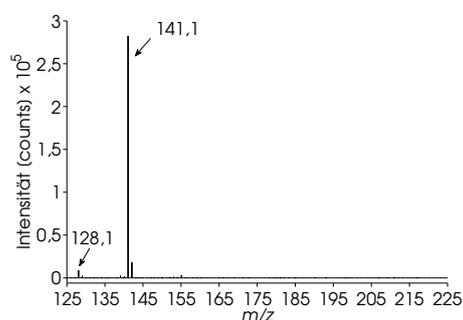
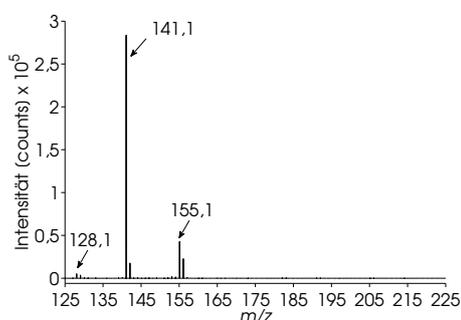
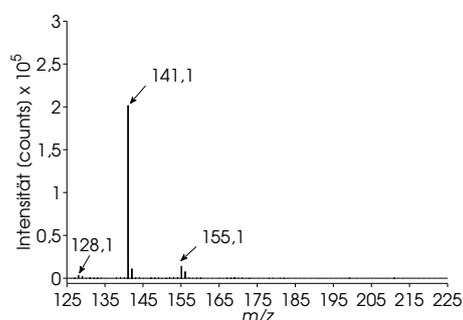
(a) 1-Methylnaphthalin (**9**)(b) 2-Ethyl-naphthalin (**10**)(c) 1,4-Dimethylnaphthalin (**11**)(d) 1,2-Dimethylnaphthalin (**12**)

Abbildung 3.21: Massenspektren der Alkyl-Naphthaline aus einer GC-APLI-Analyse (vgl. Abbildung 3.20)

Alkylanthracene

Die aus der GC-APLI-Analyse in Abbildung 3.20 erhaltenen Massenspektren der Alkylanthracene unterscheiden sich von denen der Alkyl-naphthaline. Abbildung 3.22 zeigt die mit GC-APLI erhaltenen Massenspektren von **13** bis **15**. Als intensivstes Signal werden bei den Alkylanthracenen die jeweiligen m/z -Verhältnisse der Radikalkationen detektiert. 1-Methylanthracen ($M = 192,1$ Da) zeigt im Gegensatz zu 1-Methylnaphthalin nahezu ausschließlich

das M^+ mit m/z 192,1. Zudem verliert die Ethylverbindung des Anthracens in weitaus geringerem Maße als das Ethylnaphthalin formal eine Methylgruppe und bildet ein Signal mit m/z 191,1. Für das 9,10-Dimethylantracen ist – ebenfalls in geringerem Maße – ein Signal bei m/z 191,1 zu beobachten, das durch Abspaltung einer Methylgruppe erklärt werden kann.

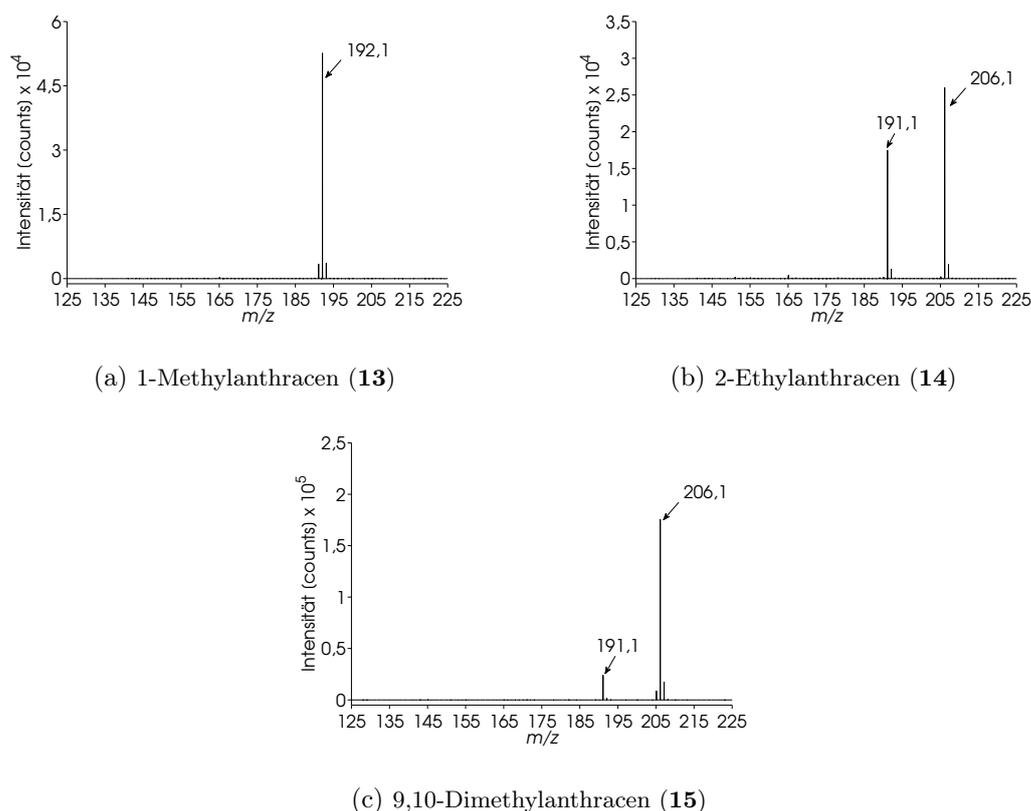


Abbildung 3.22: Massenspektren der Alkyl-Anthracene aus einer GC-APLI-Analyse (vgl. Abbildung 3.20)

Die im Gegensatz zu dem Alkylnaphthalinen erhöhte Stabilität der Alkylanthracene kann mit einer Erhöhung der Freiheitsgrade des Moleküls erklärt werden. Die Beschleunigungsspannungen des Massenspektrometers erhöhen die kinetische Energie des Moleküls. Nach einem erfolgten Stoß mit einem Neutralteilchen wird die Energie in Form von innerer Energie im Molekül verteilt. Insofern einer Bindung ein genügend hoher Energiebetrag der inneren Energie zur Verfügung steht, besteht die Möglichkeit, dass diese dissoziativ zerfällt. Die Verteilung der inneren Energie erfolgt auf alle im Molekül vorhandenen Atome und Bindungen. Alkylanthracene besitzen für diesen Fall eine den Alkylnaphthalinen gegenüber erhöhte Vielzahl von Freiheitsgraden zur Energieverteilung. Folglich ist zu erwarten, dass den Alkylnaphthalinen in jedweder Form erhöhte Energiebeträge in den Alkylseitenketten zur Verfügung stehen und sie mit entsprechend höheren Wahrscheinlichkeiten dort dissoziativ zerfallen.

3.2.2.2 Weiterführende Untersuchungen mit alkylierten PAK

Die bisher mittels APLI-(TOF)MS analysierten Alkylanthracenverbindungen liefern die aus dem Ionisationsprozess zu erwartenden Signale auf der Massenspur der jeweiligen Radikalkationen- m/z . Weitere Untersuchungen sollen nun zeigen, dass a) mit APLI aus den Alkyl-naphthalin- und den Alkylanthracenverbindungen Radikalkationen gebildet werden, die keinem unimolekularen Zerfall unterliegen und b) die Bildung anderer beobachteter Spezies ($[M-H]^+$ und $[M-CH_3]^+$) durch CID-Reaktionen erfolgen kann. Zur Unterstützung dieser Annahmen wurden in Zusammenarbeit mit DERPMANN (Arbeitskreis Physikalische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal) zum einen *ab-initio*-Berechnungen¹⁴ durchgeführt und zum anderen die entsprechenden Alkylverbindungen mittels Direkteinlass in einer Laminarfluss-Ionenquelle mit APLI ionisiert und an einem Ionenfallen-MS analysiert. Dieses bietet die Möglichkeit, die aus der Ionenquelle eingebrachten Ionen fragmentierungsarm in den Massenanalysator zu überführen oder vor der Massenanalyse einer CID auszusetzen.

ab-initio-Berechnungen

Bei einer *ab-initio*-Berechnung werden zunächst die Bildungsenthalpien der an einer Reaktion beteiligten Moleküle oder Ionen bestimmt. Die Berechnung erfolgt dabei mithilfe quantenmechanischer Grundsätze und liefert i. A. die günstigste Gesamtenergie zur Bildung einer vorgegebenen Molekülstruktur. Mithilfe der erhaltenen Ergebnisse lassen sich unter Anwendung des Hess'schen Satzes Gibbs-Energien errechnen, die eine Aussage über das mögliche Ablaufen einer Reaktion (exergonisch oder endergonisch) zulassen. Dabei ist zu beachten, dass hierdurch keine Informationen über die Aktivierungsenergie oder die Zustandsfunktionen der elektronischen und vibronischen Energieverteilung im Molekül erhalten werden.

Ausgehend von einer vorgegebenen Molekülstruktur für bspw. 1-Methylnaphthalin (**9**) kann mit *ab-initio*-Berechnungen für die Bildung dieses Moleküls aus den Elementen eine Energie $\Delta H_{(M)}$ von $-11\,567,58$ eV berechnet werden. Die Bildungsenergie $\Delta H_{(M^{\cdot+})}$ des entsprechenden Radikalkations beträgt mit dem gleichen Verfahren $-11\,560,01$ eV. Nach Anwendung des Hess'schen Satzes erfordert die Bildung des Radikalkations aus dem Neutalmolekül somit eine Energie $\Delta_R G_{(M \rightarrow M^{\cdot+})}$ von $7,57$ eV (Literaturwert: $7,96$ eV [202]). Diese Reaktion ist folglich endergonisch und kann bei Zufuhr der entsprechenden Energie (bspw. durch Photonen) ablaufen. Diese Aussage ist jedoch zunächst nur als richtungweisend anzusehen. Fehlen – wie bereits erwähnt – Informationen über die Aktivierungsenergie bzw. die Übergangszustände (und deren Funktionen), ist eine abschließende gesicherte Aussage über den Reaktionsverlauf aus den Ergebnissen der *ab-initio*-Berechnungen nicht möglich.

Nach diesem Verfahren wurden für die in Abbildung 3.20 mit GC-APLI-(TOF)MS gemessenen Substanzen Gibbs-Energien für verschiedene Reaktionen berechnet, auf deren Werte im Folgenden eingegangen wird.

¹⁴Die *ab-initio*-Berechnung ist eine auf Quantenchemie basierende, computergestützte Methode der theoretischen Chemie, die theoretisch bestimmte Werte für die Gibbs-Energie $\Delta_R G$ einer definierten Reaktion liefert.

APLI-QIT(MS)-Experimente

Um experimentell zu bestätigen, dass durch den APLI-Ionisationsprozess ausschließlich Radikalkationen gebildet werden und entstehende Fragmentierungsprodukte auf nachfolgende Reaktionen zurückzuführen sind, wurden – ebenfalls in Zusammenarbeit mit DERPAMANN – einige der bisher untersuchten Alkyl-PAK weitergehend untersucht. Die Substanzen wurden dazu per Direktinlass an einem Ionenfallenmassenspektrometer der Fa. BRUKER DALTONIK (Bruker esquire6000) mit einem frequenzvervierfachen, diodengepumpten Nd:YAG-Laser (DPSS-Laser) bei $\lambda = 266$ nm ionisiert und massenspektrometrisch sowohl unter fragmentativen Bedingungen als auch fragmentationsarm analysiert. Das verwendete Massenspektrometer bietet hier die Möglichkeit, trotz geringer Potentialgefälle in der Ionenoptik ausreichend hohe Signalintensitäten zu liefern und somit ein CID-armes Massenspektrum zu erhalten.

Abbildung 3.23 zeigt die APLI-QIT-Massenspektren von 1-Methylnaphthalin (**9**), die fragmentationsarm (3.23a) und unter fragmentativen Bedingungen (3.23b) erhalten wurden. Bei fragmentationsarmen Bedingungen wird quantitativ das Radikalkation detektiert. Durch Erhöhen des zwischen dem Kapillarausgang und dem Skimmer anliegenden Potentials erhalten die Radikalkationen hier zusätzliche kinetische Energie zur Beschleunigung auf den Skimmer. Diese Energie reicht bei dem gegebenen Druck von etwa 5 mbar in dieser Region aus, um durch nun energiereiche Stöße mit Neutralteilchen fragmentative Bedingungen zu schaffen. Dies kann durch die Bildung eines $[M-H]^+$ -Signals mit dem m/z 141 bestätigt werden.

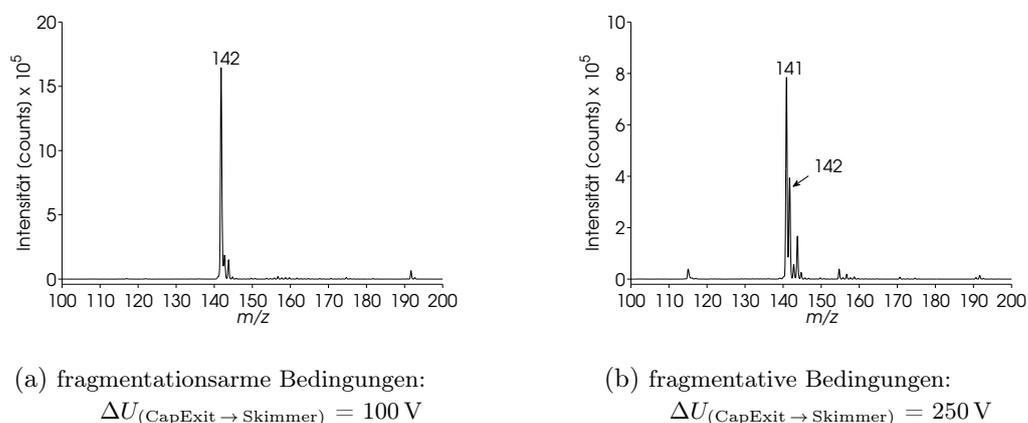


Abbildung 3.23: APLI-QIT-Massenspektren von **9** (1-Methylnaphthalin)

Unter gleichen Bedingungen wurde die Analyse für 1-Methylantracen (**13**) wiederholt. Die erhaltenen Massenspektren sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Auch hier wurden die Bedingungen so gewählt, dass die ionisierten Analyten fragmentationsarm (3.24a) und unter fragmentativen Bedingungen (3.24b) den Massenanalysator erreichen. Selbst mit einer gegenüber dem vorigen Experiment um weitere 90 V höheren Potentialdifferenz (also 240 V) zwischen dem Kapillarausgang und dem Skimmer wird ausschließlich ein Massensignal mit dem m/z

des Radikalkations bei 192 erhalten.

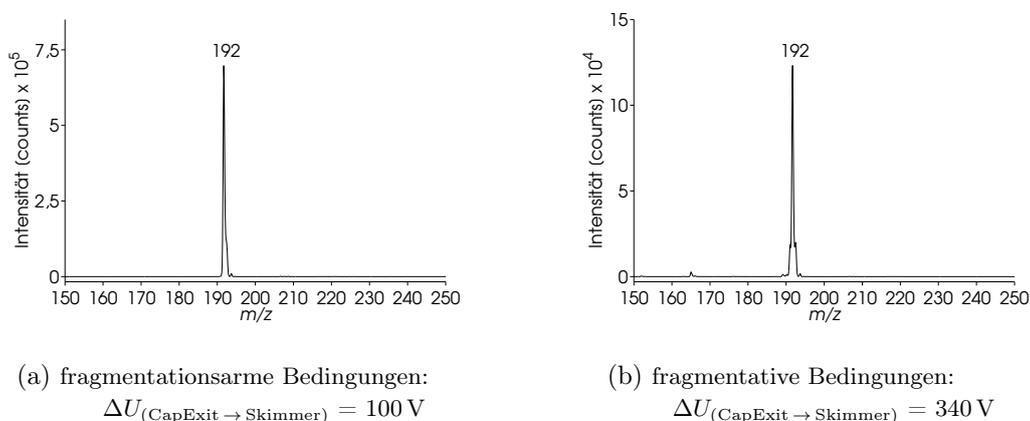


Abbildung 3.24: APLI-QIT-Massenspektren von **13** (1-Methylantracen)

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der GC-APLI-(TOF)MS-Analyse in Abbildung 3.20 und bestätigen die Annahme, dass es durch die Einstellungen der Ionenoptik des Bruker micrOTOF in den Bereichen vor Skimmer 1 und Skimmer 2 zu CID kommt. Aus den Ergebnissen kann ebenfalls abgeleitet werden, dass die hauptsächliche Region für Stöße dieser Art der Bereich vor Skimmer 2 ist. Die Potentialdifferenzen zwischen dem Kapillarausgang und dem ersten Skimmer sind beim esquire6000 und dem micrOTOF etwa gleich groß. Im Ionenfallen-MS folgt auf den ersten Skimmer ein System aus zwei Oktapolen mit einer Vakuumblende und die Ionenlinsen, die die Ionen in den QIT-Massenanalysator leiten. Nach dem ersten Skimmer des micrOTOF folgt, wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, ein System aus zwei Hexapolen, die durch Skimmer 2 voneinander getrennt sind, und den Ionenlinsen vor dem Push-Pull-System des Analysators. Im micrOTOF erhalten die Ionen hier – im Gegensatz zum esquire6000 – eine zusätzliche Beschleunigungsspannung, die wahrscheinlich ausschlaggebend für die Fragmentation der Radikalkationen ist.

Sowohl für 1-Methylnaphthalin (**9**) als auch für 1-Methylantracen (**13**) wurden ergänzend zu diesen Messungen *ab-initio*-Berechnungen durchgeführt, um zu erklären, weshalb **9** im Gegensatz zu **13** unter Fragmentationsbedingungen nicht das Radikalkation (M^+), sondern das $[M-H]^+$ bildet. Die Gibbs-Energien $\Delta_R G$ zur Bildung eines $[M-H]^+$ aus dem entsprechenden Radikalkation sowie zur Bildung des Radikalkations aus dem Neutrale Molekül sind in Tabelle 3.2 angegeben.

Die berechneten Gibbs-Energien beider Reaktionen sind relativ ähnlich und liegen um einen Absolutwert von 0,32 eV auseinander. Hieraus lässt sich nicht eindeutig nachvollziehen, dass **9** ein $[M-H]^+$ bildet und **13** nicht. Eine Aussage aus diesen Werten besitzt jedoch nur für die reine Betrachtung der Gibbs-Energie Gültigkeit. Für beide Systeme kann keine Aussage über die zur Aktivierung dieser Reaktion nötige Energie getroffen werden. Die errechneten Werte lassen

Tabelle 3.2: Ergebnisse der *ab-initio*-Berechnungen für **9** und **13**

Substanz	$\Delta_R G$ in [eV] für die Bildung von	
	M^+	$[M-H]^+$
1-Methylnaphthalin (9)	7,57	2,53
1-Methylantracen (13)	6,91	2,85

an dieser Stelle aber eine Aussage zur Tendenz der Bildungsmöglichkeit zu. Hinzu kommt ein weiterer Aspekt: Um eine Bindung kollisionsinduziert zu spalten, muss ein entsprechend hoher Betrag an innerer Energie in dieser Bindung vorliegen. Die innere Energie aus einer Kollision wird in einem gegebenen Molekül auf sämtliche (Bindungs-)Freiheitsgrade verteilt. Bedingt durch eine erhöhte Anzahl an möglichen Freiheitsgraden (also mehr Bindungen) entfällt im Fall des 1-Methylantracens jeweils weniger innere Energie auf eine Bindung als beim 1-Methylnaphthalin. Um weitere detailliertere Aussagen zu dieser Thematik treffen zu können, sind exakte Angaben zur Zustandsdichte der jeweiligen Moleküle bzw. Berechnungen nach der sogenannten RRKM-Theorie¹⁵ notwendig, deren ausführliche Betrachtung den Rahmen und das Thema dieser Arbeit übersteigt und daher nicht weiter erläutert wird.

Durch die vorgestellten Ergebnisse wurde die Annahme, dass die mit APLI gebildeten Radikalkationen durch CID in der Ionenstrahltransmissionsoptik des Massenspektrometers fragmentiert werden können, bestätigt. Diese Ergebnisse sind im Allgemeinen auch auf andere Alkyl-PAK übertragbar. Um die Massenspektren der restlichen Alkyl-PAK aus der GC-APLI-(TOF)MS-Analyse (Abbildung 3.20) ebenfalls erklären zu können, wurden auch für diese Strukturen *ab-initio*-Berechnungen durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 3.3 dargestellt sind. Beim Betrachten der Massenspektren der Alkylantracene 2-Ethylantracen (**14**) und 9,10-Dimethylantracen (**15**) fällt auf, dass neben den Signalen des Radikalkations auch Fragmentensignale (m/z 191, mögliches $[M-CH_3]^+$) in geringem Maße gebildet werden. Keine Alkylantracenverbindung liefert ein Signal für ein mögliches $[M-H]^+$ (m/z 205 bei **14** und **15**). Diese Fragmentensignale können ansatzweise über die errechneten Gibbs-Energien der Bindungsspaltungen erklärt werden. Für **14** wurden diese Energien zu $\Delta_R G_{([M-H]^+)}$ 2,58 und 3,25 eV für jeweils ein H-Atom der Methyl- bzw. Methylengruppe berechnet. Beide Werte liegen über dem Wert für $\Delta_R G_{([M-CH_3]^+)}$ von 2,05 eV, sodass anhand dieser Werte anzunehmen ist, dass das Radikalkation bevorzugt eine Methylgruppe verliert. Die gleiche Tendenz sowohl im Massenspektrum als auch bei den berechneten Werten zeigen die $\Delta_R G$ -Werte für 2-Ethyl-naphthalin (**10**). Allerdings ist hier der Verlust der Methylgruppe stärker ausgeprägt.

Umgekehrt verhalten sich die berechneten Werte für 1,4-Dimethylnaphthalin (**11**) und 1,2-

¹⁵Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus-Theorie — eine auf der Eyring-Theorie basierende Theorie zur mikroskopischen Betrachtung der chemischen Reaktivität aktivierter Übergangskomplexe, die eine Berechnung unimolekularer Gasphasenreaktionen ermöglicht [203]

Tabelle 3.3: Ergebnisse der *ab-initio*-Berechnungen für weitere Alkyl-PAK

Substanz	$\Delta_R G$ in [eV] für die Bildung von		
	$M^{+\cdot}$	$[M-H]^+$	$[M-CH_3]^+$
2-Ethyl-naphthalin (10)	7,56	2,10 [†] & 2,78 [†]	1,70
1,4-Dimethyl-naphthalin (11)	7,37	2,50	4,02
1,2-Dimethyl-naphthalin (12)	7,38	2,50 [‡] & 2,63 [‡]	3,76 [‡] & 3,88 [‡]
2-Ethyl-anthracen (14)	6,87	2,58 [†] & 3,25 [†]	2,05
9,10-Dimethyl-anthracen (15)	6,71	2,54	4,19

[†]: Werte für das H-Atom der Methyl- bzw. der Methylengruppe

[‡]: Werte für jeweils eine der nicht identischen Methylgruppen

Dimethylnaphthalin (**12**). Hier sollte bevorzugt ein $[M-H]^+$ gebildet werden. Aus den Massenspektren (Abbildungen 3.21c und 3.21d) geht hervor, dass zwar das erwartete Fragment bei m/z 155 gebildet wird, jedoch mit geringerer Intensität als das Fragment mit m/z 141 ($[M-CH_3]^+$). An dieser Stelle fehlen analog zum Vergleich der Massenspektren und *ab-initio*-Berechnungen des 9,10-Dimethylantracens (**15**) weitere Angaben zur nachfolgenden Chemie und den damit verbundenen Energien/Zustandsdichten der Übergangszustände. Weiterführende Betrachtungen werden aufgrund der damit verbundenen Komplexität hier nicht vorgenommen. Allgemein zeigen die Ergebnisse – neben ihrer Komplexität – dass Alkylanthracenverbindungen stabiler gegenüber CID sind als Alkyl-naphthalinverbindungen.

3.2.2.3 Fragmentationen bei APLI-Ionisationslabeln

Bereits durch erste Arbeiten von SCHIEWEK ist bekannt, dass bei der APLI-(TOF)MS-Analyse von derivatisierten Analyten wie Ethanol, Dodecylamin oder Cholesterin mit dem auf 9-Anthracenmethanol basierenden Ionisationslabel (Anthracen-9-yl-)methoxyessigsäure (AMAA, **16**, Abbildung 3.26a) Fragmente mit einem m/z von 191 gebildet werden [66]. Dieses Massensignal tritt mit identischer Retentionszeit zusätzlich zum Signal des erwarteten m/z des derivatisierten Analyten auf. Durch Arbeiten von DEIBEL (Arbeitskreis Analytische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal und Angewandte Analytische Chemie der Universität Duisburg-Essen) mit verschiedenen anderen Analyten konnte dies bestätigt werden [67]. Abbildung 3.25a (von DEIBEL) zeigt mehrere Massenspuren eines HPLC-Chromatogramms der mit **16** derivatisierten Verbindung 3-Pyridin-3-yl-propan-1-ol (**17**). Der chromatographische Peak des Fragments (EIC ($191,0 \pm 0,5$)) hat dieselbe Retentionszeit wie der derivatisierte Analyt (Anthracen-9-yl-)methoxyessigsäure-3-pyridin-3-yl-propylester (**18**) (EIC ($384,0, 385,0$ und $386,0 \pm 0,5$)). Die Peakfläche des Fragments ist etwa 24-fach größer als die Peakfläche der summierten Analytmassenspur. Dass nur etwa 4% des Derivats **18** den Massenanalysator erreicht, ist ein signifikanter Empfindlichkeitsverlust für den Analyten.

Eine Analyse der Molekülstruktur legt einen Bindungsbruch an der in Abbildung 3.25b dar-

gestellten Etherbrücke nahe (rot gekennzeichnet), die zu einem Fragment mit dem m/z 191 führt. Es ist zu erwarten, dass dieser Bindungsbruch entweder durch thermische Belastung beim Verdampfen oder durch CID im Ionenstrahlbereich des Massenspektrometers entstehen.

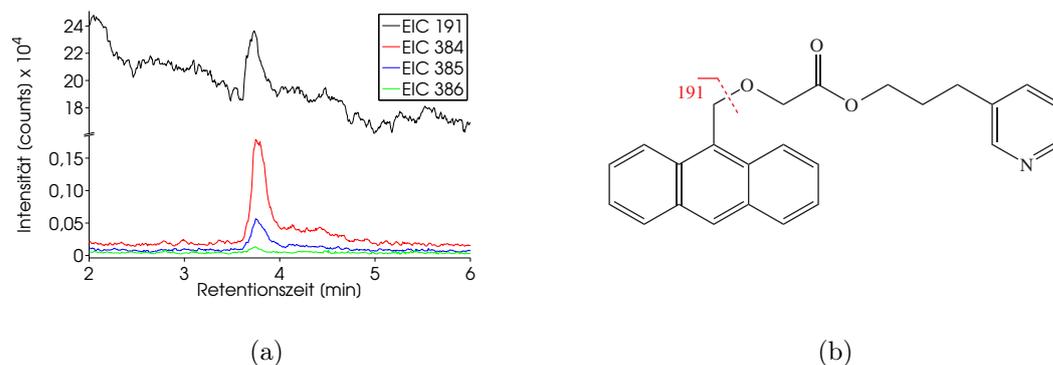


Abbildung 3.25: (a): HPLC-APLI-(TOF)MS-Analyse von **18**. Deutlich zu erkennen ist die Bildung eines Fragments mit m/z 191 in großen Mengen (vgl. y-Achse) — Trennparameter in Kapitel 6.2.2
(b): Struktur des Derivats von **17**: (Anthracen-9-yl)methoxyessigsäure-3-pyridin-3-yl-propylester **18** – in rot eingezeichnet ist die potentielle Bruchstelle zur Bildung eines Fragments mit dem m/z 191

Solche Bindungsbrüche vermindern die Nachweisempfindlichkeit eines Analyten über den EIC. Insbesondere, wenn das Fragment vermehrt gegenüber dem erwarteten derivatisierten Analyten auftritt, wie es hier der Fall ist.

Die Etherbrücke erscheint als instabile und somit mögliche Bruch-/Fragmentationsstelle und ist deshalb ungeeignet für ein solches Ionisationslabel. Aus diesem Grund wurden in den Arbeiten von DEIBEL andere Ionisationslabel (u. a. (Anthracen-9-yl)propansäure (**19**), Abbildung 3.26b) entwickelt, die keine Etherbrücke an 9-Methylantracen-Position tragen.

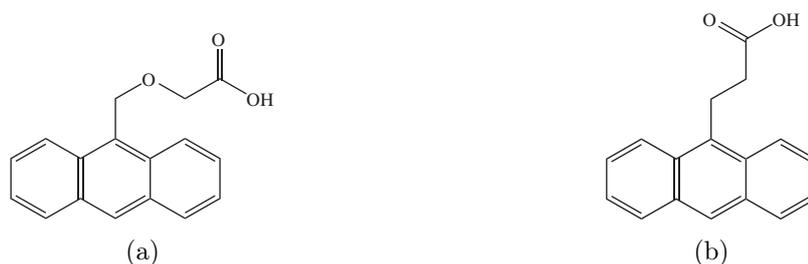


Abbildung 3.26: Zwei der genutzten Ionisationsmarker für die APLI-MS:
(a): (Anthracen-9-yl)methoxyessigsäure **16** – Ionisationsmarker mit Etherbrücke
(b): (Anthracen-9-yl)propansäure **19** – Ionisationsmarker ohne Etherbrücke

Zum Vergleich der Stabilität dieser Ionisationslabel gegenüber CID wurden von DEIBEL nach den in Kapitel 6.8.2 beschriebenen Reaktionen (R 6.2 und R 6.3) Methylester (**20** und **21**) der Verbindungen **16** und **19** hergestellt und ebenfalls zusammen mit DERPMANN APLI-Analysen

am QIT(MS) durchgeführt. Zudem wurden von DERPMANN die Gibbs-Energien an möglichen Bruchstellen beider Methylester berechnet.

Die berechneten möglichen Fragenmationsstellen sind für **20** in Abbildung 3.27 und für **21** in Abbildung 3.28 rot gekennzeichnet. Die nebenstehenden Tabellen (3.4 und 3.5) listen die über *ab-initio*-Rechnungen erhaltenen Werte der Gibbs-Energien $\Delta_R G$ zur Bildung des entsprechenden Fragments **q** aus dem jeweiligen Radikalkation auf.

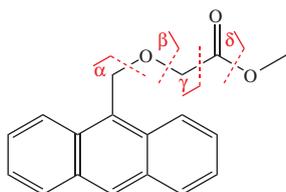


Abbildung 3.27: Mit *ab-initio* berechnete mögliche Bindungsbrüche in **20** ($M = 280,3 \text{ g mol}^{-1}$)

Tabelle 3.4: Ergebnisse der *ab-initio*-Berechnungen für die angegebenen Bruchstellen in **20**

q	$\Delta_R G_{(M^+ \rightarrow M_q^+)}$ [eV]	Fragment- m/z
α	1,16	191
β	1,48	207
γ	1,20	221
δ	2,57	249

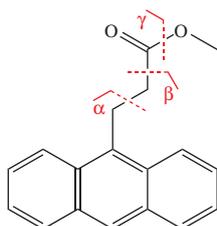


Abbildung 3.28: Mit *ab-initio* berechnete mögliche Bindungsbrüche in **21** ($M = 264,3 \text{ g mol}^{-1}$)

Tabelle 3.5: Ergebnisse der *ab-initio*-Berechnungen für die angegebenen Bruchstellen in **21**

q	$\Delta_R G_{(M^+ \rightarrow M_q^+)}$ [eV]	Fragment- m/z
α	1,35	191
β	1,95	205
γ	2,95	233

Aus den Ergebnissen von DEIBEL geht hervor, dass die Elimination der Etherbrücke im Ionisationsmarker eine Fragmentierung zu m/z 191 unter den gegebenen Bedingungen effektiv vermindert. Die *ab-initio*-Berechnungen bestätigen dies. Die Gibbs-Energie für den Bindungsbruch an α ist bei **20** um 0,19 eV niedriger als bei **21**. Aus den Massenspektren (Abbildungen 3.29b und 3.30b) ist ersichtlich, dass die anderen möglichen Fragmente eine untergeordnete Rolle spielen. Dies ist insbesondere für **21** der Fall. Beide Ionisationsmarker liefern zudem unter fragmentationsarmen Bedingungen ausschließlich das Radikalkation, wodurch – analog zu den Alkyl-PAK – die Bildung einzelner Fragmente ausschließlich auf CID zurückzuführen ist. Eine Erhöhung der Potentialdifferenz zwischen dem Kapillarausgang und dem Skimmer fördert auch hier eine kollisionsinduzierte Dissoziation, sodass die mit APLI gebildeten Radikalkationen fragmentieren. Ohne Etherbrücke wird als intensivstes Signal die Radikalkationenmasse (m/z 264) detektiert (Abb. 3.30). Mit etwa einem Fünftel an Intensität wird das Fragment α erhalten. Die Intensitätsverhältnisse der QIT(MS) sind aber aufgrund der unterschiedlichen Bauart und Ionenzuführung nicht vergleichbar mit Messungen an einem

(TOF)MS, da dort andere Bedingungen, insbesondere in Bereichen mit hochenergetischen Stößen (CID-Bereiche) vorherrschen.

Auffällig bei den *ab-initio*-Werten für **20** ist der Wert für die Bindung zum Fragment γ . Obwohl dieses eine ähnliche Gibbs-Energie aufweist wie die Bindung zum Fragment α , ist die Intensität des zugehörigen m/z -Signals gering. Auch hier ist eine genaue Erklärung aufgrund fehlender weiterer Informationen nicht möglich.

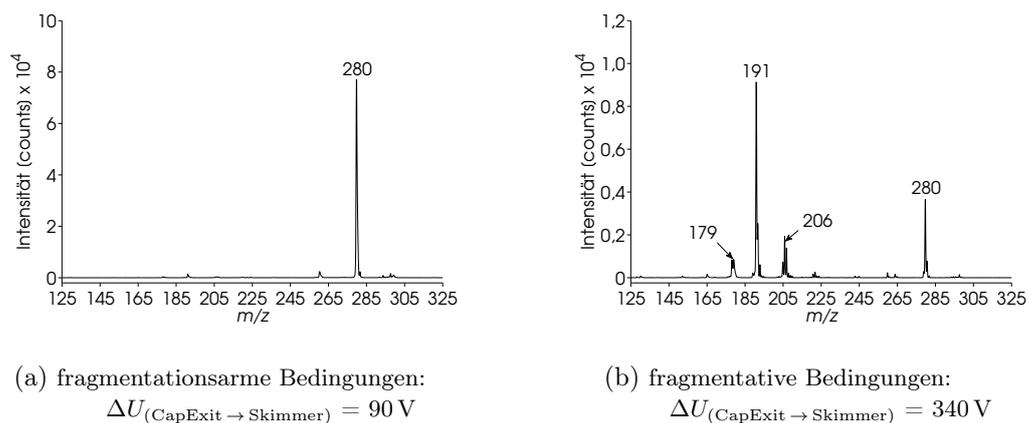


Abbildung 3.29: APLI-QIT-Massenspektren von **20** ((Anthracen-9-yl)-methoxyessigsäuremethylester)

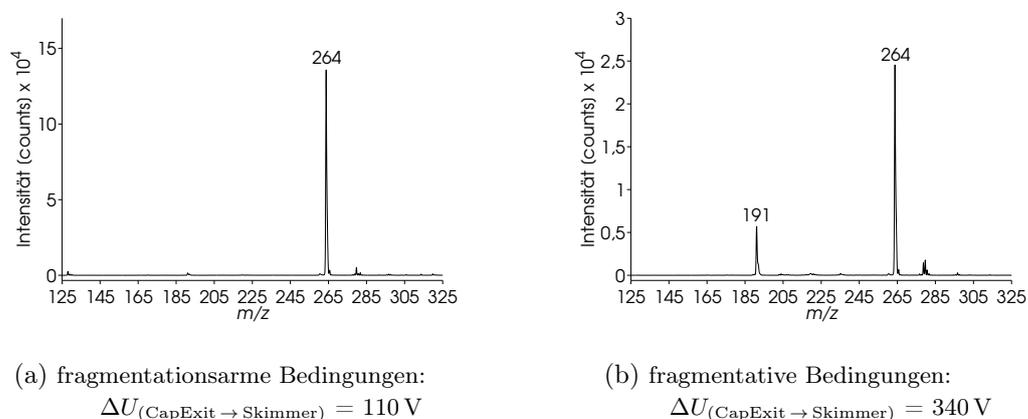


Abbildung 3.30: APLI-QIT-Massenspektren von **21** ((Anthracen-9-yl)-propansäuremethylester)

3.3 Vergleich zweier Lasersysteme

Zur Laserionisation bei Atmosphärendruck werden leistungsstarke Laser als Photonenquellen für UV-Licht verwendet. Ein solches Lasersystem stellt beispielsweise ein Edelgashalogenid-Excimerlaser dar. Bisherige Untersuchungen mit APLI wurden größtenteils mit herkömmlichen KrF*-Excimerlasern bei einer Wellenlänge von $\lambda = 248 \text{ nm}$ (entspricht einer Ionisierungsenergie von etwa $10,0 \text{ eV}$ bei einem 1+1-REMPI-Prozess) durchgeführt. Ein solcher Laser gilt aufgrund seiner Ausmaße von ca. $54 \text{ cm} \times 47 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$ ($l \times b \times h$) als sogenannter *bench-top* Laser. Ohne eine Fokussierung des Laserstrahls liegen die Leistungsdichten solcher Systeme im Bereich von wenigen Megawatt pro cm^2 [73]. Zum Betrieb wird eine charakteristische Gasmischung aus Krypton und Fluor in Neon bei etwa $6,5 \text{ bar}$ genutzt, um nach der Präionisation durch eine gepulste Hochspannungsentladung den angeregten Komplex aus Kr und F zu bilden¹⁶. Die Haltbarkeit des sogenannten Premixgases ist durch Reaktionen des Gases begrenzt, sodass nach einer bestimmten Anzahl an Laserpulsen ein Austausch erfolgen muss. Hierdurch fallen für den Betrieb eines solchen Lasers stetige Fixkosten an. Die hohe Aggressivität des Premixgases führt zudem zu einem kontinuierlichen Abbrand der Elektroden, weshalb die Lasercavity nach etwa 400 Millionen Laserpulsen gewartet werden muss. Dadurch werden ebenfalls hohe Kosten verursacht [73]. SHORT argumentiert, dass aufgrund der Größe sowie der hohen Kosten für die Anschaffung und Wartungsarbeiten eines solchen Lasers eine weitreichende Nutzung der APLI nicht stattfindet [73, 206].

Eine vielversprechende Alternative zu den Excimerlasern stellen diodengepumpte Festkörperlaser (engl.: *diode-pumped solid-state laser*, DPSS) dar. Als Lasermedium dient ein mit Neodym dotierter Kristall aus Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG), der Licht von $\lambda = 1064 \text{ nm}$ emittiert. Durch zweifache Frequenzverdopplung beträgt die Wellenlänge des emittierten UV-Lichts $\lambda = 266 \text{ nm}$ (entspricht etwa $9,3 \text{ eV}$ an Ionisierungsenergie für einen 1+1-REMPI-Prozess). Für viele Verbindungen ist diese Energie ausreichend, um mit der gegebenen Energiedichte eine Ionisation über einen 1+1-REMPI-Prozess zu ermöglichen. Die Leistungsdichte eines solchen kompakten Lasersystems (Ausmaße des Laserkopfes: $22 \text{ cm} \times 9 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$) ist etwa 10-fach höher als beim KrF*-Excimerlaser. Weitere Unterschiede ergeben sich durch die Strahlgeometrie sowie die vom Laserlicht effektiv beleuchtete Fläche. Durch die geringe mechanische und vor allem chemische Belastung kann der DPSS-Laser als wartungsarm angesehen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit und Kompatibilität der beiden Lasertypen Excimer- und DPSS-Laser für die Laserionisation bei Atmosphärendruck aus analytischer Sichtweise untersucht. Als Lasersysteme standen ein ATLEX 300 SI KrF*-Excimerlaser der Fa. ATL LASERTECHNIK sowie ein FQSS-266-50 DPSS-Nd:YAG-Laser der Fa. CRYLAS zur Verfügung. Eine Übersicht über die bereits genannten sowie weitere Parameter beider Lasersysteme ist in Tabelle 3.6 gegeben.

¹⁶hiernach wäre das System als Exciplexlaser (von *excited complex*) zu bezeichnen; in der Praxis hat sich jedoch der Begriff Excimerlaser (von *excited dimer*) durchgesetzt [204, 205]

Tabelle 3.6: Vergleich der Parameter der verwendeten Lasersysteme — verändert nach [73]

	ATLEX 300SI	FQSS-266-50
Typ	KrF*-Excimer	DPSS-Nd:YAG
Wellenlänge	248 nm	266 nm
Pulsenergie	bis 15 mJ	bis 70 μ J
Repetitionsrate	bis 300 Hz	bis 100 Hz
Pulsbreite (FWHM)	5 ns	1 ns
Strahlprofil	rechteckig	rund
Beleuchtungsfläche	50 mm ²	0,2 mm ²
theoretische Laserleistungsdichte	$3 \cdot 10^6$ W cm ⁻²	$3 \cdot 10^7$ W cm ⁻²
Geräuschpegel [73, 207]	70 dB	0 dB
Anschaffungskosten	40 000 EUR	10 000 EUR

Die Suche nach einem geeigneten Lasersystem zum Ersatz des Excimerlasers ist einerseits auf die Anschaffungs- und Wartungskosten zurückzuführen. Andererseits soll die Handhabung des neuen Systems erleichtert sein und der Umgang mit giftigen Gasen entfallen. Für den Excimerlaser wird zum Betrieb das Premixgas und für Wartungsarbeiten ein reines Inertgas (Helium) benötigt. Hierdurch müssen dauerhaft zwei Gasflaschen an das System angeschlossen sein. Um die giftige Gasfüllung der Lasercavity auszutauschen, ist das System an eine Membranpumpe mit Halogenfilter angeschlossen, wodurch der Platzbedarf eines Excimerlasers zusätzlich erhöht ist. Das DPSS-System hingegen besteht nur aus einer Steuereinheit mit Netzteil und dem Laserkopf, der die Laserpulse erzeugt. Beide Lasersysteme sind in Abbildung 3.31 als Fotografie dargestellt.

Die Eignung eines Excimerlasers für die HPLC-APLI wurde bereits durch SCHIEWEK demonstriert [68, 74]. LORENZ konnte die Abhängigkeit der Signalintensität der HPLC-APLI vom Ionisationsort bestimmen [178, 208]. Diese Arbeiten beschreiben, welche Herausforderungen an das DPSS-System gestellt werden. Die Erzeugung von Ionen in dem gegebenen System aus Analytzufuhr, Ionenquelle und Massenspektrometereinlass erfolgt in einem Volumen mit einer Fläche von näherungsweise 5 mm \times 8 mm Kantenlänge. Zwei Bedingungen zur Erzeugung eines Ionensignals sind bei einem solchen Aufbau zu erfüllen: 1) die Ionen müssen in einem Bereich gebildet werden, der durch Potentialfelder und Gasdynamik einen Transport der Ionen zum Massenspektrometereinlass erlaubt und 2) der orthogonal zum Massenspektrometereinlass auf den Neutralanalyten gerichtete Laserstrahl muss innerhalb dieses Bereiches die Ionen erzeugen [73]. Das Strahlprofil des Excimerlasers leuchtet mit seinen Ausmaßen (8 mm \times 6 mm) relativ genau diese Fläche aus. Im Gegensatz dazu ist die Fläche, die der DPSS-Laser ausleuchtet, etwa 250-mal kleiner. Zu erwarten ist in diesem Fall eine Vermin-

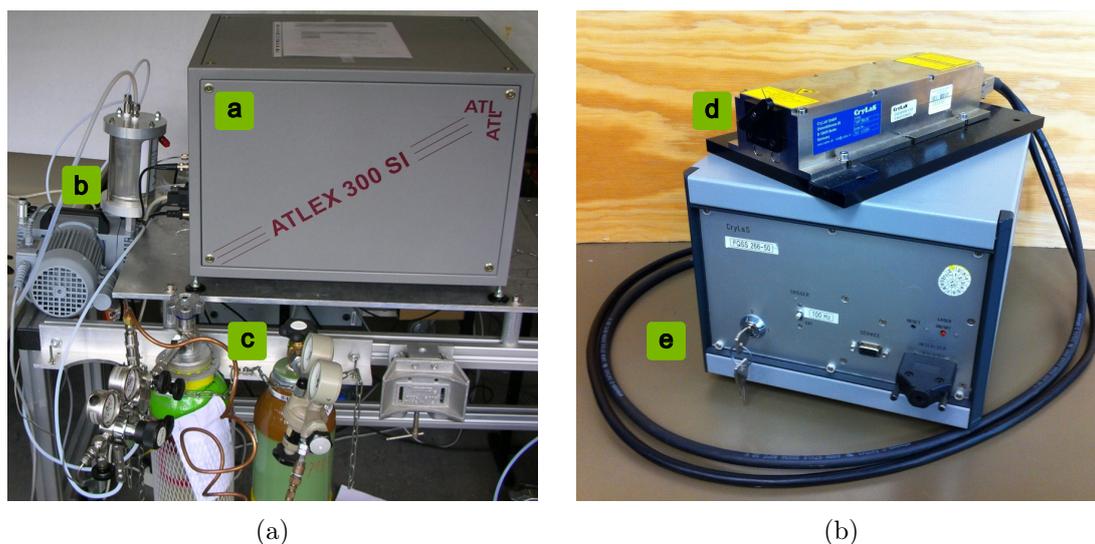


Abbildung 3.31: Fotografien der verwendeten Lasersysteme

(a): ATLEX 300 SI KrF*-Excimerlaser (Fa. ATL LASERTECHNIK) mit a: bench-top KrF*-Excimerlaser ATLEX 300 SI, b: Membranpumpe, c: Gasflaschen für Premix und Inertgas
 (b): FQSS-266-50 Nd:YAG-DPSS-Laser (Fa. CRYLAS) mit d: Nd:YAG-DPSS-Laserkopf, e: Steuereinheit mit Netzteil

derung des Ionensignals, da trotz der größeren Laserleistungsdichte nur noch ein geringer Teil des Neutralanalyten ionisiert und detektiert wird. Die relativ große Beleuchtungsfläche des Excimerlasers birgt allerdings den Nachteil, dass nicht nur der Großteil des Neutralanalyten, sondern zusätzlich eine beträchtliche Menge an Verunreinigungen und / oder zeitlich dispergierte Neutralanalyten aus dem Quellenkörper (vgl. Kapitel 3.1.2) ionisiert und massenspektrometrisch erfasst werden. Die Effizienz der Ionenerzeugung beschränkt sich dann nicht nur auf den Analyten selbst, sondern führt zudem zu einem erhöhten Signalrauschen im Massenspektrometer und folglich zu kleineren Signal-zu-Rauschverhältnissen. Diese wiederum tragen proportional zur Nachweisgrenze des analytischen Gesamtsystems bei. Der Laserstrahl des DPSS-Lasers lässt sich auf das Maximum der Ionenakzeptanz und der Neutralanalytverteilung fokussieren bzw. ausrichten, wodurch eine Belastung des MS-Systems durch vermehrte Bildung unerwünschter Signale minimiert werden kann.

3.3.1 Vergleich der Signalintensitäten beider Lasersysteme mit HPLC-APLI

Wichtig für eine leistungsfähige quantitative Analyse ist neben einem empfindlichen Ansprechverhalten des Detektors auf einen Analyten das Rauschen des Detektorsignals¹⁷. Dieses bestimmt zusammen mit dem eigentlichen Analytsignal die Nachweisgrenze (NWG). Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wird häufig das Verhältnis zwischen dem Analytsignal und dem Signalrauschen des Detektors genutzt. Ein angenäherter Zusammenhang des S/N und der NWG ist gegeben durch Gleichung 3.2. Die NWG liefert für ein umfassendes analyti-

¹⁷Hiermit ist im Folgenden nicht das elektronische Rauschen des Detektors selbst, sondern das vom analytischen System erzeugte chemische Rauschen gemeint.

sches Verfahren eine Aussage über den Wert, ab dem der Analyt – mit geringem statistischen Risiko – als nachgewiesen gilt [209–211]. Dabei ist σ die Standardabweichung des Basislinienrauschens.

$$\text{NWG} = 3 \cdot \sigma \quad (3.2)$$

Bei der APLI-MS ist nicht nur das elektronische Rauschen des eigentlichen Detektors, sondern ebenfalls das durch Ionisation von Verunreinigungen erzeugte Signalrauschen im TIC (oder besonders auf einer einzelnen Massenspur) von Interesse. Speziell beim Vergleich der beiden Lasersysteme sind große Unterschiede im Signalrauschen des Untergrunds und damit im S/N bzw. der NWG zu erwarten. Zusätzlich ist ein Unterschied im Nachweisvermögen zu erwarten, der sich aus den unterschiedlichen Signalintensitäten der jeweiligen Analyten ergibt. Für einen quantitativen Vergleich der Leistungsfähigkeit beider Lasersysteme für die HPLC-APLI kann daher das S/N herangezogen werden. Für diesen Vergleich wurden HPLC-APLI-Analysen mit verschiedenen Analyten durchgeführt. Ausgewählt wurden Anthracen, 7,9-Dimethylbenz[*c*]acridin, (7,9-DMBA) und Nicotin. Diese Analyten sind einerseits in ausreichendem Maße APLI-gängig und unterscheiden sich andererseits in ihrer Polarität bzw. Gasphasenbasizität, sodass auftretende Gasphasenreaktionen ebenfalls berücksichtigt werden können. Für eine quantitative Aussage über das S/N wurde jeder Analyt jeweils fünfmal mit zeitlicher Differenz in das HPLC-APLI-System injiziert und sowohl mit dem Excimerlaser als auch mit dem DPSS-Laser ionisiert. Hierbei wurden die Einlassparameter des Massenspektrometers sowie die fluid- und elektrodynamischen Bedingungen der Ionenquelle konstant gehalten. Aus den erhaltenen Chromatogrammen (Abbildung 3.32) wurde mithilfe der MS-Auswertesoftware DataAnalysis (Version 4.0) das S/N bestimmt und arithmetisch gemittelt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

Für die Analysen mit dem DPSS-Laser wurde jeweils das Maximum der Signalintensität der entsprechenden Massenspuren (m/z 178,0 \pm 0,5 für Anthracen, m/z 257,0 & 258,0 \pm 0,5 für DMBA und m/z 161,0 & 163,0 \pm 0,5 für Nicotin) gesucht. Hierfür wurden die einzelnen Probelösungen zuvor mithilfe einer Spritzenpumpe kontinuierlich zur Ionisation bereitgestellt und die Position des DPSS-Lasers variiert, bis ein Maximum des Analytsignals erreicht wurde. Die Notwendigkeit dazu wird in Kapitel 3.3.2 näher beschrieben.

Die Analysen zeigen einen deutlichen Verlust der Signalintensitäten bzw. Peakhöhen für alle Analyten. Diese betragen für Anthracen (1 117 219 \pm 52 500) counts mit dem Excimerlaser und (7029 \pm 299) counts mit dem DPSS-Laser. Für Anthracen bedeutet dies, dass die mit dem DPSS-Laser erhaltene Peakhöhe nur etwa 0,6 % von der mit dem Excimerlaser erhaltenen Peakhöhe entspricht. Der Signalverlust für 7,9-DMBA¹⁸ und Nicotin¹⁹ ist nicht so stark aus-

¹⁸Peakhöhe mit Excimerlaser: (45 245 \pm 2343) counts; mit DPSS-Laser: (12 829 \pm 666) counts

¹⁹Peakhöhe mit Excimerlaser: (160 529 \pm 10 613) counts; mit DPSS-Laser: (52 781 \pm 4954) counts

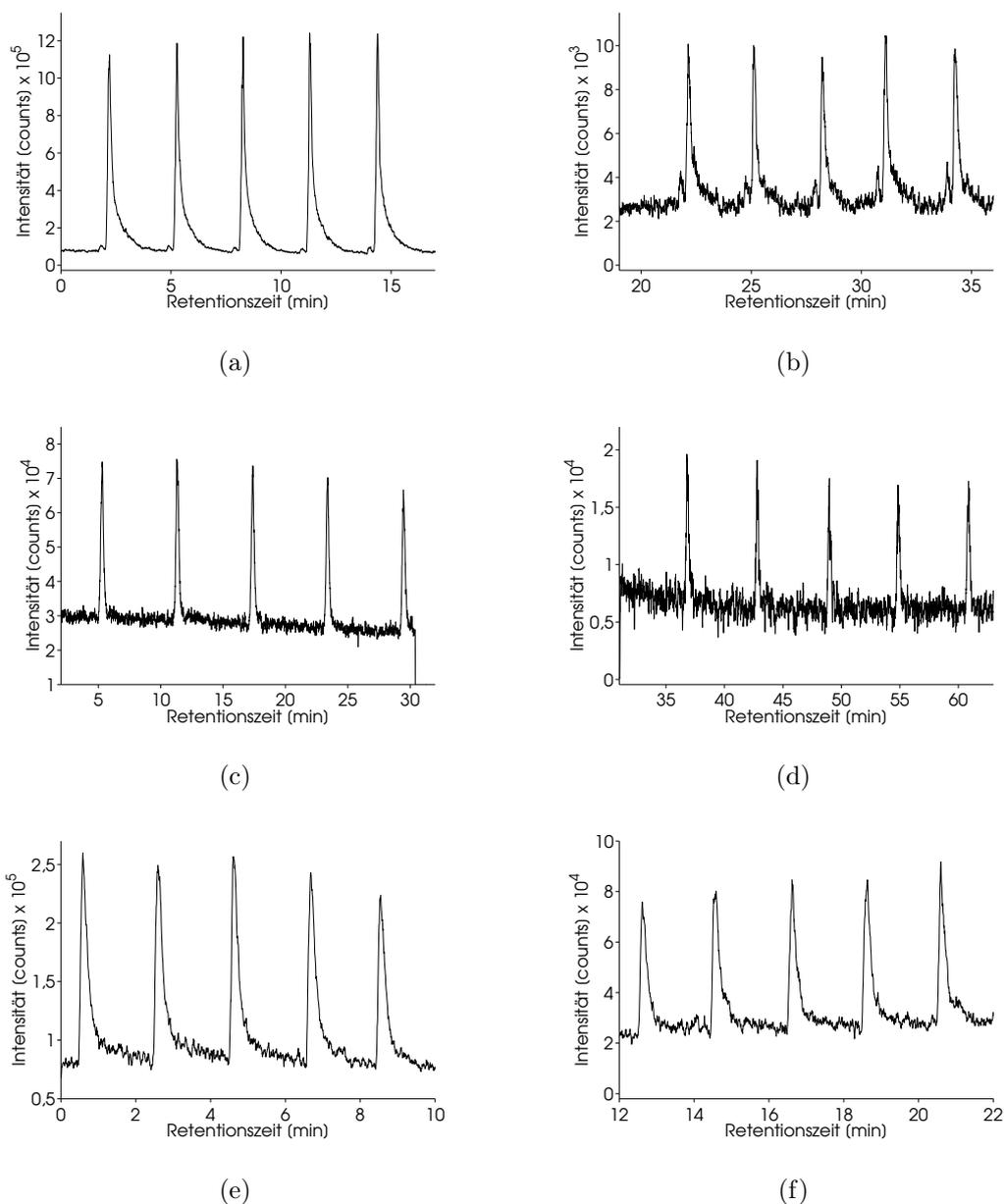


Abbildung 3.32: HPLC-APLI-Chromatogramme für jeweils fünf Injektionen von: (a) und (b) 50 nM Anthracenlösung (m/z $178,0 \pm 0,5$), (c) und (d) 50 nM 7,9-DMBA-Lösung ($\Sigma m/z$ $257,0, 258,0 \pm 0,5$) sowie (e) und (f) 50 nM Nicotinlösung ($\Sigma m/z$ $161,0, 163,0 \pm 0,5$) mit (a), (c) und (e) Excimer- und (b), (d) und (f) DPSS-Laser — Trennparameter in Kapitel 6.2.1

geprägt. Für die relevanten Massenspuren dieser beiden Analyten beträgt der Verlust 71,6 % (für 7,9-DMBA) und 67,1 % (für Nicotin).

Neben den Signalintensitäten werden auch die S/N -Verhältnisse verringert. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 3.7 angegeben. Das S/N für Anthracen mit dem DPSS-Laser beträgt hiernach nur noch etwa 0,6 % des S/N , das mit dem Excimerlaser erhalten wurde. Auch hier ist der Verlust für die beiden anderen Analyten geringer: Das S/N wird bei 7,9-DMBA um 71,6 %, bei Nicotin um 63,4 % kleiner. Die Verluste bei den Signalintensitäten sind somit

ähnlich hoch wie die Verluste bei den S/N . Das Signalrauschen nimmt demnach nicht im erwarteten Maße ab, sondern bleibt im Verhältnis zum Analytsignal konstant.

Tabelle 3.7: Vergleich der arithmetischen Mittelwerte ($n = 5$) des S/N verschiedener Analyten der HPLC-APLI mit Excimer- und DPSS-Laser

	Signal-zu-Rauschverhältnis	
	Excimerlaser	DPSS-Laser
Anthracen	$3025,0 \pm 142,2$	$19,1 \pm 0,8$
7,9-DMBA	$68,2 \pm 3,5$	$19,3 \pm 1,0$
Nicotin	$197,0 \pm 48,1$	$72,0 \pm 6,8$

Der Vergleich der Signal-zu-Rauschverhältnisse der Analyten zeigt, dass Anthracen im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen mit dem DPSS-Laser deutlich schlechter ionisierbar ist. Ein von MÖNNIKES experimentell bestimmtes und zum Vergleich herangezogenes MPLI²⁰-1+1-REMPI-Spektrum von Anthracen [69] legt den Schluss nahe, dass der Absorptionsquerschnitt für Photonen mit der Wellenlänge $\lambda = 266$ nm des DPSS-Lasers deutlich geringer ist als bei der Wellenlänge des Excimerlasers ($\lambda = 248$ nm). Anthracen zeigt bei einer 1+1-REMPI eine hohe Ionenausbeute bei kleinen Wellenlängen [69]. Gasphasen-UV-Absorptionsspektren spiegeln dieses Verhalten ebenfalls wider. Die von THÖNY *et. al.* vorgestellten Spektren zeigen eine starke Absorption²¹ (etwa 110000 bis 140000 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) bei 248 nm und weniger als 2000 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei einer Wellenlänge von 266 nm [212].

Ein wirklich aussagekräftiger quantitativer Vergleich der beiden Lasersysteme für die HPLC-APLI ist letztlich nur mit Einschränkungen möglich. Für das System bestehen neben einer Abhängigkeit von den Lasersystemen zusätzliche Abhängigkeiten durch die verwendeten Laserwellenlängen und vor allem deren Wechselwirkung mit den verschiedenen Analyten. Im Rahmen der durchgeführten Experimente kann ansatzweise gezeigt werden, dass der Einsatz des DPSS-Lasers für die HPLC-APLI mit großen Nachteilen für die Nachweisempfindlichkeit und die Möglichkeit umfassende Analysen durchzuführen behaftet ist.

3.3.2 Ausrichtung des DPSS-Lasers bei HPLC-APLI

Aus den Vorarbeiten zum Intensitätsvergleich wurde deutlich, dass ein maximales Analytsignal nur erreicht wird, wenn der DPSS-Laser eine bestimmte Position ausleuchtet. Diese optimale Position ist für die verwendeten Analyten unterschiedlich. Zudem zeigen sich, abhängig von der Laserposition, Intensitätsunterschiede bei den verschiedenen Massenspuren von Nicotin und 7,9-DMBA, da diese nicht nur als Radikalkation, sondern ebenfalls als pro-

²⁰Laserionisation bei mittlerem Druck (engl.: *medium pressure laser ionization, MPLI*)

²¹das Absorptionsmaximum von Anthracen liegt bei etwa 235 nm

toniertes Molekülion ($[M+H]^+$) oder $[M-H]^+$ (nur Nicotin) detektiert werden. Die Ionisation mit dem DPSS-Laser bei HPLC-APLI wird somit von vielen Faktoren beeinflusst. Um den Zusammenhang der verschiedenen Faktoren experimentell abzubilden und eventuell eine Position zu finden, bei der alle Analyten gut detektiert werden können, wurde die Signalintensität in Abhängigkeit der Laserposition bestimmt. Für diese Experimente wurde die Laserposition nach dem Vorbild der DIA-Messungen in der APLI von LORENZ [70, 178, 208] bei kontinuierlicher Analytzugabe in zwei Richtungen manuell schrittweise verändert und die Intensität der verschiedenen Massensignale aufgezeichnet worden.

Um eine exakte Positionierung des Laserstrahls zu ermöglichen, wurde hierzu am Tisch des Massenspektrometers eine Halterung für den Laserkopf installiert, die mit einer Mikrometerschraube die Positionierung des Lasers in x -Richtung (in Richtung des Massenspektrometer-einlasses) ermöglicht. Zusätzlich kann die Halterung stufenlos in y -Richtung (Höheneinstellung) verstellt werden. Beide Positionsänderungen können nur manuell durchgeführt werden und sind, insbesondere dadurch, dass das System nicht völlig starr ist, nur bedingt reproduzierbar. Abbildung 3.33 zeigt eine Fotografie des verwendeten Aufbaus.



Abbildung 3.33: Auf optischer Schiene montierter DPSS-Laser mit Mikrometerschraube zur Positionierung in x -Richtung und stufenloser Positionierung in y -Richtung

Die in Abbildung 3.34 dargestellten Fehlfarbplots zeigen die normierten Intensitäten des TIC bei einer Flussrate von $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ für Anthracen (a1), Nicotin (b1) und 7,9-DMBA (c1) in Abhängigkeit von der Position des DPSS-Lasers. Die exakte Position wurde mithilfe der Mikrometerschraube eingestellt und durch einen Abgleich der Position der Laserfluoreszenz auf Millimeterpapier (hinter der Ionenquelle angebracht) bestimmt. Als Referenzpunkt wurde der Einlass zum Massenspektrometer gewählt und auf die Position $x = 0 \text{ mm}$ und $y = 0 \text{ mm}$ festgelegt. Aus den Messungen von LORENZ ist bekannt, dass eine Änderung der elektrischen Potentiale sowie weiterer Parameter der Ionenquelle zu einer Änderung der DIA führen [70, 178, 208]. Aus diesen Gründen wurden die entsprechenden Parameter konstant gehalten, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Geändert wurden nur die Einstellungen der Ionenstrahltransmissionsoptik, sodass das gewünschte m/z -Verhältnis mit möglichst großer Intensität verfolgt werden konnte.

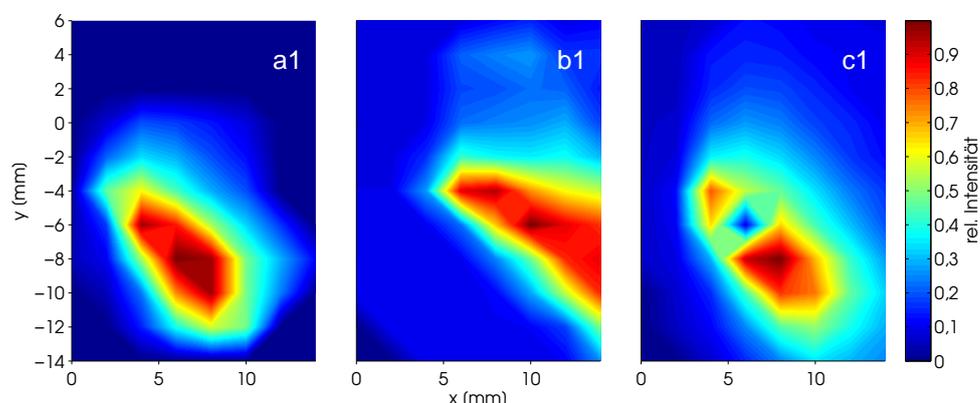


Abbildung 3.34: Dynamische Ionenakzeptanz bei HPLC-APLI mit einer Flussrate von $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ unter gegebenen Parametersätzen für verschiedene Substanzen. Die Ionisation erfolgte mit dem DPSS-Laser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsenergie von $62 \mu\text{J}$. Die Abbildungen zeigen die TIC-Signalintensität mit den Analyten a1: Anthracen (10 nM), b1: Nicotin (50 nM) und c1: 7,9-Dimethylbenz[c]acridin (50 nM) — Experimentelle Bedingungen in Kapitel 6.4.1

Besonders beim 7,9-DMBA (c1) sind zwei klar abgegrenzte lokale Maxima zu erkennen, bei denen die Intensitätsverteilung zwischen dem Radikalkation ($\text{M}^{\cdot+}$) und dem $[\text{M}+\text{H}]^+$ unterschiedlich ist. Rund um die Position $x = 4 \text{ mm} / y = -4 \text{ mm}$ wird ein größeres Signal für das Radikalkation mit dem m/z 257 detektiert. Bei $x = 8 \text{ mm} / y = -8 \text{ mm}$ verschiebt sich die Intensitätsverteilung zugunsten des $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 258). Ähnlich verhalten sich die Signale für Nicotin (b1). Die Verschiebung des Intensitätsverhältnisses zwischen den Massensignalen des $[\text{M}-\text{H}]^+$ (m/z 161), $\text{M}^{\cdot+}$ (m/z 162) und $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 163) erzeugt jedoch keine klar definierten lokalen Maxima wie beim 7,9-DMBA. Das Anthracen (a1) wird nur als Radikalkation detektiert und zeigt somit keine Intensitätsverschiebung.

Die lokalen Maxima der drei Analyten liegen zwar relativ nah beieinander (im Bereich weniger Millimeter), können aber aufgrund der geringen Beleuchtungsfläche des DPSS-Lasers nicht zusammen erreicht werden. Als Konsequenz können die Substanzen in einem Analysenlauf nicht mit der maximalen Empfindlichkeit detektiert werden. Im Gegensatz dazu können durch die große Beleuchtungsfläche des Excimerlasers alle Spezies eines Analyten sowie alle Analyten in einem Analysenlauf ionisiert und detektiert werden.

LORENZ konnte im Rahmen seiner Arbeit zeigen, dass die Form und Position der DIA – zusätzlich zu den Potentialen des Einlasssystems – vom Gasfluss aus dem Verdampfer der Ionenquelle abhängt [70, 178, 208]. Diese Gasmenge wird nicht nur durch den Verdampfergasstrom, sondern auch durch die hinzugegebene Menge an Eluat bestimmt. Hierdurch ist eine signifikante Änderung der Signalintensität bei einer festgelegten Position des DPSS-Lasers zu erwarten. Die in Abbildung 3.34 dargestellten DIA wurden aus diesem Grund zusätzlich bei einer anderen Flussrate ($0,75 \text{ mL min}^{-1}$) bestimmt. Für diese Experimente wurden identische

Messbedingungen (Ionenquellenparameter, Einlassparameter des MS, Konzentrationen usw.) gewählt. Die erhaltenen Daten für diese DIA bei $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ sind in Abbildung 3.35 dargestellt.

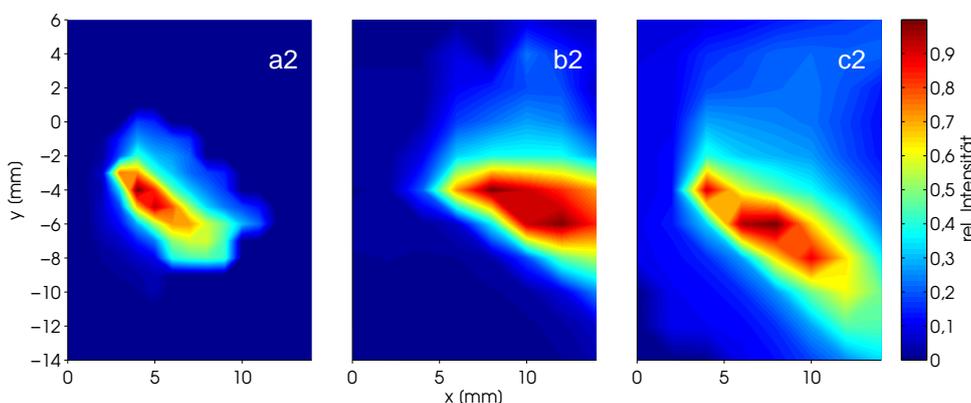


Abbildung 3.35: Dynamische Ionenakzeptanz bei HPLC-APLI mit einer Flussrate von $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ unter gegebenen Parametersätzen für verschiedene Substanzen. Die Ionisation erfolgte mit dem DPSS-Laser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsenergie von $62 \mu\text{J}$. Die Abbildungen zeigen die TIC-Signalintensität mit den Analyten a2: Anthracen (10 nM), b2: Nicotin (50 nM) und c2: 7,9-Dimethylbenz[*c*]acridin (50 nM) — Experimentelle Bedingungen in Kapitel 6.4.1

Auch bei einer anderen Eluentenflussrate lassen sich Unterschiede in den Verhältnissen der Signalintensitäten für Nicotin (b2) und 7,9-DMBA (c2) in Abbildung 3.35 feststellen. Die dreifach höhere Flussrate führt dazu, dass die Bereiche, aus denen ein Großteil der Ionen das Massenspektrometer erreicht, eine etwas geringere Ausdehnung zeigen und die lokalen Intensitätsmaxima der beiden 7,9-DMBA-Spezies sowie der drei Nicotinspezies geringfügig näher beieinander liegen. Das Maximum für das Radikalkation des 7,9-DMBAs liegt nach wie vor bei etwa $x = 4 \text{ mm} / y = -4 \text{ mm}$, das des $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei $x = 6 \text{ mm} / y = -6 \text{ mm}$. Der Akzeptanzbereich des Anthracens (a2) zeigt bei $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ eine kleinere Fläche als bei $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ (vgl. Abbildung 3.34 a1). Das Intensitätsmaximum für das M^+ von Anthracen wandert durch die unterschiedliche Eluentenflussrate von $x = 6 \text{ mm} / y = -8 \text{ mm}$ bei $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ zu $x = 4 \text{ mm} / y = -4 \text{ mm}$ bei $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ und kann mit einem fest positionierten DPSS-Laser nach der Flussänderung nur noch mit geringer Intensität detektiert werden. Aus diesem Grund ist der DPSS-Laser für die HPLC-APLI nur bedingt nützlich. Neben der Tatsache, dass nicht alle Analyten in einem Analysenlauf mit möglichst großer Intensität detektiert werden können, muss die Laserposition abhängig von der Flussrate des chromatographischen Systems neu justiert werden. Mit dem Excimerlaser ist der ausgeleuchtete Bereich so groß, dass die im Bereich weniger Millimeter auftretenden Positionsänderungen des Maximums der DIA nur einen geringen Einfluss auf die Signalintensität haben.

3.3.3 Ausrichtung des DPSS-Lasers bei GC-APLI

Auch bei der Analyse mittels GC-APLI ist die Ausrichtung des Laserstrahls auf eine bestimmte Position sowie dessen Beleuchtungsfläche sehr wichtig. Abhängig von verschiedenen Parametern der Ionenquelle und des Massenspektrometers (Gasflüsse wie Sheath- und Drygas, Potentiale auf Sprayshield und Kapillarkappe) variiert die Intensität des Analytsignals im Massenspektrometer vor allem durch eine Positionsänderung des idealen Ionisationsortes. Dieser zeigt bei GC-APLI zusätzlich zu den genannten Parametern auch eine Abhängigkeit von der Austrittstiefe der GC-Säule aus der Transferline. Abbildung 3.36 zeigt die orts aufgelöste Abhängigkeit der Signalintensität von Anthracen in der GC-APLI-Konfiguration für einen festen Parametersatz (konstante Potentiale und Gasflüsse). Bei einer GC-Analyse mit Temperaturgradienten ändert sich – durch Ausdehnung des im GC-Ofen befindlichen Teils der Transferline – die Position der Kapillare in der Ionenquelle bzw. deren Eindringtiefe in die Ionenquelle, da die GC-Säule an dem im GC-Ofen befindlichen Teil der Transferline befestigt ist. Weiterhin kann sich die Position der GC-Säule in der Quelle durch Ausdehnungs- und Krümmungsänderungen innerhalb der Transferleitung verschieben. Durch die Änderung der Eintrittstiefe des Kapillarendes treten die getrennten Analyten an einer anderen Position in die Ionisationszone, wodurch die Position und Form der dynamischen Ionenakzeptanz geändert wird. Diese Änderungen werden mit dem Excimerlaser nicht erfasst, da dieser stets den gesamten Bereich der Ionenakzeptanz ausleuchtet. Eine Abhängigkeit der mit dem Excimerlaser erhaltenen Signalintensität von der GC-Ofentemperatur besteht somit nicht. Die kleine Beleuchtungsfläche des DPSS-Lasers ($0,2 \text{ mm}^2$) führt dazu, dass eine Verschiebung der Ionenakzeptanz einen großen Einfluss auf die Ionisationsausbeute zeigt. Die von beiden Lasern ausgeleuchteten Flächen sind schematisch in Abbildung 3.36 eingezeichnet und visualisieren die starke Abhängigkeit durch die sehr kleine Beleuchtungsfläche des DPSS-Lasers.

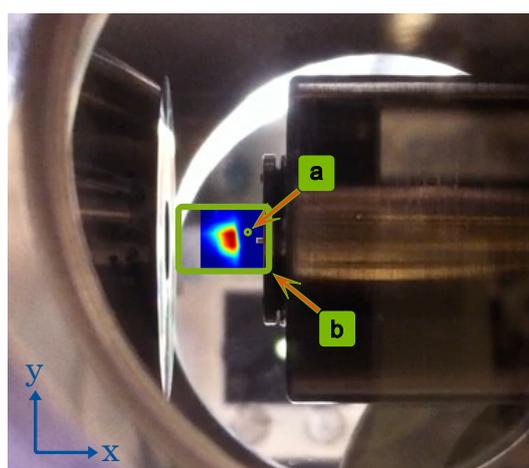


Abbildung 3.36: Ortsaufgelöste dynamische Ionenakzeptanz als Fehlfarbenplot innerhalb des grünen Rahmens b für Anthracen bei einem festgelegten Parametersatz mit schematischer Darstellung der vom a: DPSS-Laser und b: Excimerlaser ausgeleuchteten Fläche in Relation zur Ionenquellengeometrie bei GC-APLI — Experimentelle Bedingungen in Kapitel 6.4.2

Um die thermische Abhängigkeit der Kapillarsäulenposition von der GC-Ofentemperatur abzubilden, wurde von der Ionenquellengeometrie eine Videosequenz über den Verlauf eines GC-Temperaturgradienten (Start bei 75 °C, Heizrate 10 °C min⁻¹ auf 340 °C) aufgenommen. Die in Abbildung 3.37 dargestellten Momentaufnahmen zeigen eine unterschiedliche Position der GC-Kapillarsäule bei 75 °C (Abb. 3.37a) und 340 °C (Abb. 3.37b). Die thermische Ausdehnung verändert die Position des Kapillarendes um ca. 0,5 mm und führt so zu erheblichen Änderungen der Signalintensität mit dem DPSS-Laser.

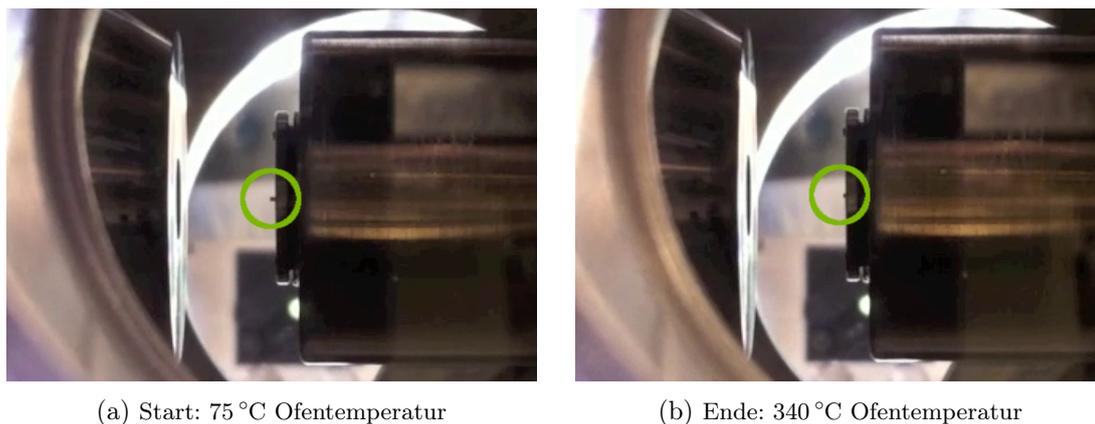


Abbildung 3.37: Momentaufnahmen der Ionenquellengeometrie zur Darstellung der Positionierung der GC-Säule aus der Transferline (grüner Kreis) während eines GC-Temperaturgradienten (Start (a) 75 °C, Ende (b) 340 °C)

Die Positionierung des DPSS-Lasers beim Einsatz in der GC-APLI ist ein kritischer Parameter. Für eine maximale Ionisationseffizienz ist eine exakte Positionierung des Laserstrahls notwendig. Eine Korrektur der Positionierung des Laserstrahls ist nach jedem Säulenwechsel notwendig. Zudem stellen die geringen Ausmaße der Strahlgeometrie zusätzlich eine Herausforderung dar. Um eine Laserposition exakt reproduzieren zu können, muss der Laserstrahl sehr fein (im Mikrometerbereich) justierbar sein. Dies ist mit dem in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Aufbau möglich. Eine Möglichkeit, die Positionierung zu vereinfachen, ist eine Neukonstruktion der Transferline, bei der die GC-Säule im Ionenquellenbereich fest positioniert werden kann.

3.3.4 Einsatz beider Lasersysteme für die GC-APLI

Trotz der beschriebenen Einschränkung durch die Positionierung des DPSS-Lasers ist es generell möglich, dieses Lasersystem für die GC-APLI zu nutzen. Grundsätzlich sind für die Sensitivität des GC-APLI-Systems in Kombination mit dem DPSS-Laser weniger große Nachteile zu erwarten als für die HPLC-APLI. Dies wird besonders durch einen Vergleich der DIA-Ausmaße beider Systeme deutlich. Die Hauptverteilung der DIA erstreckt sich bei HPLC-APLI über eine Fläche von etwa 35 mm² [73]. Bei GC-APLI erfolgt die Elution des chromatographischen Systems sehr fokussiert in den Bereich zwischen GC-Transferline und MS-Einlasskapillare

(Abstand ca. 5 mm). Das Sheathgas aus der Transferline stabilisiert die räumliche Verteilung der Neutralanalyten [68] und führt dazu, dass die Fläche der DIA etwa zehnmals kleiner ist als bei der HPLC. Demnach ist anzunehmen, dass der Anteil der vom DPSS-Laser erfassten Neutralanalytmenge signifikant größer ist.

3.3.4.1 Laservergleich anhand einer Muschelprobe

Die ubiquitäre Verteilung von PAK in der Umwelt erstreckt sich auch auf aquatische Systeme. Aufgrund der geringen Löslichkeit dieser unpolaren Verbindungen ist ihre Konzentration im Wasser allerdings eher gering. Vielmehr werden sie besonders an Sedimenten adsorbiert bzw. von diesen absorbiert. Marine Lebensformen, die einen hohen Lipidanteil haben, sind in der Lage, PAK über die Nahrungskette anzureichern [155, 166, 169]. Organismen, die vermehrt in Sedimenten leben, werden intensiv zur Untersuchung der Gewässerbelastung mit lipophilen Stoffen und deren Bioverfügbarkeit herangezogen [155, 168, 169]. Muscheln stellen solche Indikatororganismen dar, da sie unpolare Kohlenwasserstoffe wie PAK scheinbar ohne nachteilige Effekte für den eigenen Organismus anreichern können [169]. Ein Abbau der organischen Substanzen, besonders der PAK, erfolgt bei den wirbellosen Muscheln aufgrund fehlender oder ineffizient arbeitender Enzymsysteme im Gegensatz zu den Wirbeltieren nur langsam oder gar nicht [155, 166, 171, 213]. Die Anreicherung der Verunreinigungen erfolgt bei den Muscheln durch ihre Ernährungsweise. Austern (*Ostreidae*) sind in der Lage, täglich bis zu 600 L, Miesmuscheln (*Mytilus*) etwa 120 L Wasser zu filtern und die darin enthaltenen Schwebstoffe mit ihren Kiemen aufzufangen [214]. In verschiedenen Muschelspezies wurden vor allem nach Ölkatastrophen PAK-Konzentrationen von über $1 \mu\text{g g}^{-1}$ nachgewiesen [169, 171]. Die Belastung von verzehrfähigen Muscheln mit PAK, insbesondere dem B[a]P, ist durch die Europäische Union (EU) reglementiert und liegt bei einem festgelegten Wert von maximal $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ Feuchtmasse [166, 215].

Die Extraktion von PAK aus tierischem Gewebe wie Muscheln erfolgt häufig über eine klassische Soxhlet-Extraktion mithilfe einer großen Menge eines unpolaren Lösungsmittels (z. B. Hexan). Als weitere Extraktionsmethoden werden die druckunterstützte Flüssigkeitsextraktion (engl.: *pressurized liquid extraction*, PLE) oder die superkritische Flüssigkeitsextraktion (engl.: *supercritical-fluid extraction*, SFE) verwendet. Solche Methoden erfordern jedoch einen beachtenswerten Reinigungsaufwand für die verwendeten Geräte [167]. Ein sinnvoller Trend, nicht nur im Bereich der analytischen Chemie, ist die Anwendung sogenannter „grüner“ Methoden. Hierbei steht vor allem im Blickpunkt, die Umwelt z. B. durch den Einsatz nur geringer Lösungsmittelmengen oder sogar den Verzicht darauf zu schützen [100, 216]. Einen solchen Ansatz verfolgt eine im Jahr 2003 von ANASTASSIADES *et. al.* vorgestellte Extraktionsmethode namens QuEChERS [217]. QuEChERS ist ein Akronym für Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe und wurde ursprünglich für die Extraktion von Pestiziden aus pflanzlichen Lebensmitteln entwickelt und verwendet [218–221]. Mittlerweile wird diese Methode auch für andere Kontaminanten wie z. B. PAK oder (Tier-)Arzneiprodukte sowie für weitere Proben-

arten eingesetzt [167, 222]. Die QuEChERS-Methode basiert auf einer wässrigen Extraktion des Probenmaterials mit Acetonitril, welches nach der Extraktion mit MgSO_4 und NaCl aus der wässrigen Phase ausgesalzt wird [167, 217, 219]. Vielfach werden die Extrakte anschließend mit dispersiver Festphasenextraktion (d-SPE) aufgereinigt, bevor sie mittels GC oder HPLC analysiert werden [167, 219–222]. Diese Extraktionsmethode benötigt nur eine geringe Menge Acetonitril, das ohne große Umweltbelastung entsorgt werden kann.

Da die Effizienz der Ionisation mit APLI auch bei hohen Belastungen der Probe mit Matrixbestandteilen gegeben ist, sollte die QuEChERS-Probenvorbereitung besonders für eine Analyse mittels APLI-MS und einer chromatographischen Vortrennung geeignet sein. Als Einschränkungen können hier nur individuelle chromatographische Probleme auftreten. Um PAK aus einer Muschelprobe (z. B. Jakobsmuscheln (*Pecten spp.*) oder der blauen Miesmuschel (*mytilus edulis*)) mittels QuEChERS zu extrahieren, wird homogenisiertes Muschelgewebe eingewogen, mit Wasser und einem internen Standard versetzt und geschüttelt. Das Acetonitril wird anschließend mit MgSO_4 und NaCl ausgesalzt und analysiert. Die Extraktionsschritte sind schematisch in Abbildung 3.38 dargestellt und in Kapitel 6.7.1 näher beschrieben. Diese Methode kann als Variation der QuEChERS-Methode angesehen werden, da hier eine zusätzliche Aufreinigung des erhaltenen Extrakts durch d-SPE entfällt.

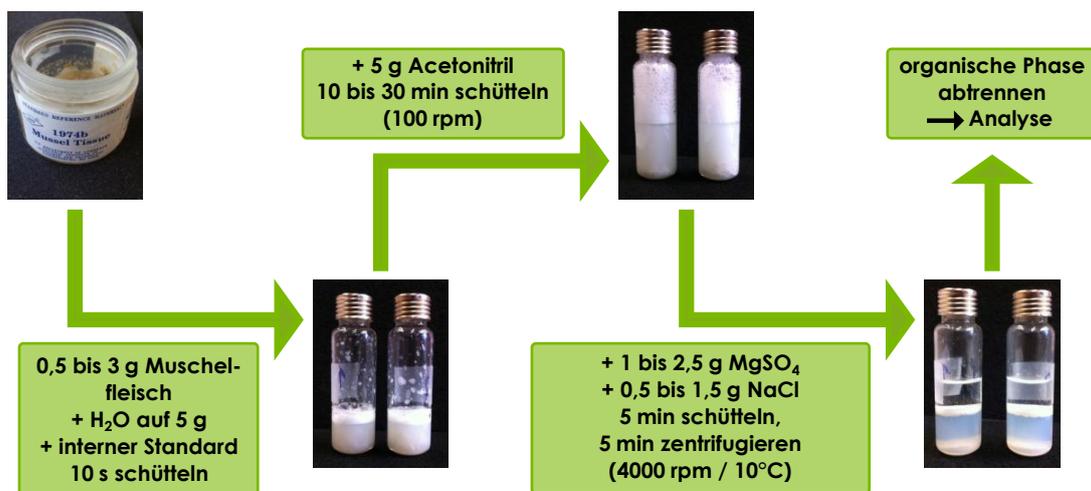


Abbildung 3.38: Schema der verwendeten QuEChERS-Extraktionsmethode

Ein solcher QuEChERS-Extrakt wurde als Probe gewählt, um den Excimer- und den DPSS-Laser bei einer Analyse mit GC-APLI zu vergleichen. Abbildung 3.39 zeigt die summierten EIC für typische PAK-Massen ($\Sigma m/z$ 128,0, 141,0, 151,0, 165,0, 178,0, 202,0, 228,0, 252,0, 276,0, 278,0 und $302,0 \pm 0,5$) von GC-APLI-Analysen, die mit beiden Lasern durchgeführt wurden. Zu beachten ist, dass das mit dem Excimerlaser erhaltene Chromatogramm (b) zur besseren Vergleichbarkeit mit derselben Skalierung für die Intensität dargestellt ist wie das Chromatogramm mit dem DPSS-Laser (a). Hierbei wird lediglich das Peakpaar Phenan-

thren/Anthracen ($t_R \approx 10$ min, Intensität: $3 \cdot 10^6$ counts) nicht vollständig dargestellt. Das zur Extraktion eingesetzte zertifizierte Muschelgewebe SRM 1974b wurde vom *National Institute of Standard and Technology* (NIST) bezogen und nach der in Kapitel 6.7.1 beschriebenen Methode extrahiert.

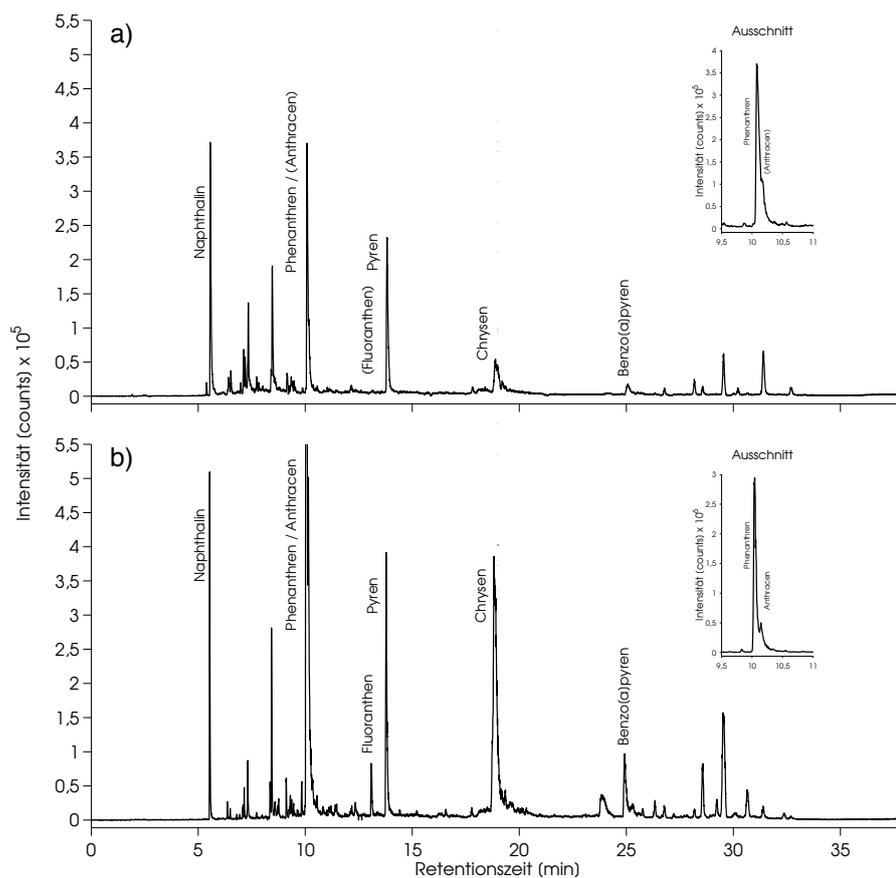


Abbildung 3.39: GC-APLI-Chromatogramme (summierte EIC) eines QuEChERS-Muschelextrakts (NIST SRM 1974b) für typische PAK-Massen mit a): DPSS-Laser und b): Excimer-Laser (gleiche Skalierung wie (a)); das Maximum des Signals bei $t_R \approx 10$ min liegt bei etwa $3 \cdot 10^6$ counts). Die Ausschnitte zeigen jeweils das Peakpaar Phenanthren / Anthracen — Trennparameter in Kapitel 6.1.3

Einige der betrachteten Signale können mit annähernd gleicher Intensität detektiert werden. Große Verluste in der Signalintensität mit dem DPSS-Laser werden bspw. bei Phenanthren/Anthracen ($t_R \approx 10$ min), Fluoranthren ($t_R \approx 13$ min) oder Chrysen ($t_R \approx 19$ min) sowie bei den größeren PAK (ab etwa fünf annelierten Ringsystemen, $t_R > 20$ min) festgestellt. Für diese Substanzen ist die Signalintensität mit dem Excimerlaser größer. Die Intensitätsverhältnisse verschiedener Substanzen mit beiden Lasern sind in vielen Fällen nicht konstant, da

die Absorptionsquerschnitte bei den unterschiedlichen Wellenlängen deutlich differieren. Während mit dem Excimerlaser zwei deutliche Signale für das Peakpaar Phenanthren / Anthracen detektiert werden können (siehe Ausschnittvergrößerung), zeigt die extrahierte Massenspur beim DPSS-Laser nur das Signal für Phenanthren mit einer kleinen Schulter. Die Intensitätsunterschiede bei den größeren PAK lassen sich zudem auf die angesprochene Änderung der Kapillarsäulenposition in der Ionenquelle bei erhöhter Ofentemperatur erklären (vgl. Kapitel 3.3.3).

3.3.4.2 Quantifizierung von PAK in Muschelgewebe

Für eine aussagekräftige Beschreibung der Leistungsfähigkeit der GC-APLI mit den beiden Lasersystemen wurde versucht, die Analyten in komplexer Matrix zu quantifizieren. Hierbei traten verschiedene Probleme auf, die eine analytisch verwertbare Aussage nicht zulassen. So sollte zunächst mithilfe einer externen Kalibrierung die Menge der in der Muschelmatrix enthaltenen PAK bestimmt werden. Aus den Analysen der Kalibrationslösungen ohne Matrixbelastung wurden dabei, wie ein Vergleich mit PAK-Standards deutlich zeigen konnte, sehr breite und um bis zu einer Größenordnung kleinere Analytpeaks mit starkem Tailing erhalten. Matrixbelastete Proben, denen ebenfalls die Standardsubstanzen zugesetzt wurden, zeigten hingegen große und schlanke Peaks mit geringem Tailing.

Die Gründe für eine Verringerung der Signalintensität bei gleichzeitig breiteren Peaks lassen sich auf den sogenannten matrixinduzierten chromatographischen Anreicherungseffekt (engl.: *matrix-induced chromatographic enhancement-effect*, MICEE) zurückführen. Beim MICEE zeigen die Peaks ohne Probenmatrix eine schlechte Peakform und eine geringe Signalintensität [223]. Verantwortlich für diesen Effekt sind aktivierte Stellen im Injektionssystem oder der chromatographischen Säule. Die Matrix der Probe belegt diese aktiven Stellen und sorgt für einen nahezu verlustfreien Transport der Analyten auf die Trennsäule [223]. Im Rahmen dieser Problematik durchgeführte Experimente konnten zeigen, dass der MICEE unabhängig von der Zusammenstellung des GC-Injektors (d. h. verschiedene Kombinationen aus Liner, Septen, Dichtungen sowie Injektortemperatur), der Trennsäule, der Analytlösungsmittel, des verwendeten Lasers sowie des GC-Ofentemperaturprogramms und -Trägergasflusses auftritt. Abbildung 3.40 verdeutlicht den Effekt der matrixinduzierten Anreicherung mithilfe von Chromatogrammen einer GC-APLI-Analyse von ausgewählten Analytmassenspuren ($\Sigma m/z$ 228,0, 242,0, 252,0 und $276,0 \pm 0,5$). Das Chromatogramm 3 (blaue Linie) zeigt die Analyse eines Muschelextrakts (*pecten spp.* in Cyclohexan) mit zugesetzter PAK-Standardlösung (PAK-Mix 183/14, $\beta = 1 \mu\text{g L}^{-1}$) mit schlanken Peaks. Die Peaks der PAK-Standardlösung mit identischer Konzentration in reinem Cyclohexan (Chromatogramm 2, rote Linie) sind weniger intensiv, weisen eine größere Peakbasisbreite auf und eluieren mit verzögerter Retentionszeit. Zum Vergleich ist zusätzlich das Chromatogramm des Muschelextrakts ohne Zusatz der PAK-Standardlösung dargestellt (1, schwarze Linie).

Der MICEE wurde bereits vielfach für die gaschromatographische Analyse von Pestiziden

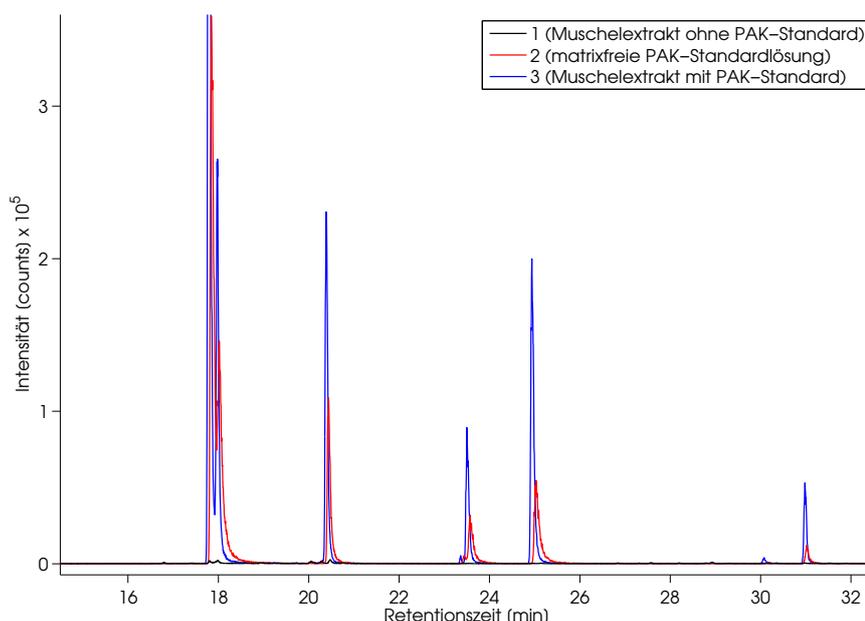


Abbildung 3.40: GC-APLI-Chromatogramme der summierten EIC für ausgewählte PAK-Massenspuren ($\Sigma m/z$ 228,0, 242,0, 252,0 und $276,0 \pm 0,5$) zur Demonstration des MICEE anhand eines Muschelextrakts (0,25 mg lyophilisierte *pecten spp.* in 5 mL Cyclohexan): (1) ohne und (3) mit zugesetzter PAK-Standardlösung ($\beta = 1 \mu\text{g L}^{-1}$) und (2) einer matrixfreien PAK-Standardlösung ($\beta = 1 \mu\text{g L}^{-1}$). — Zur deutlicheren Darstellung des Bereichs zwischen 20 und 32 min wurden die Chromatogramme auf das intensivste Signal von (2) normiert — Trennparameter in Kapitel 6.1.3

beschrieben [224–229] und ist ebenfalls für die Bestimmung von PAK bekannt [154, 230]. Eine induzierte Matrixbelastung durch Zusatz von verschiedenen, meist polaren Substanzen (diverse Zucker, Zuckerlactone, Polyole) zu einer ansonsten matrixfreien Analytlösung lässt sich generieren und liefert eine verbesserte Analyse [223, 231–233].

Ein Zusatz solcher Substanzen zu einer PAK-Kalibrationslösung für die GC-APLI zeigt ebenfalls eine Verbesserung der Peakform und -intensität. Ein quantitativer Ersatz für die Realmatrix konnte hiermit jedoch nicht erreicht werden. Als zugesetzte Matrixsubstanzen wurden verschiedene Zucker (u. a. D-Ribose) sowie ein aufgereinigtes Zwischenprodukt (**22**, siehe Abbildung 3.41) aus einer von DEIBEL durchgeführten Synthese von APLI-Derivatisierungslabeln verwendet.

Abbildung 3.42 zeigt GC-APLI-Chromatogramme einer PAK-Standardlösung ($\beta = 1 \mu\text{g L}^{-1}$) ohne (1, schwarze Linie) und mit (2, rote Linie) Zusatz von **22** ($\beta = 2 \text{g L}^{-1}$). Mit dem Zusatz von **22** kann die Peakform und -intensität einer matrixfreien PAK-Standardlösung in reinem Acetonitril deutlich verbessert werden. Ein vollständiger Ersatz der ursprünglichen Muschelmatrix wird jedoch nicht erreicht.

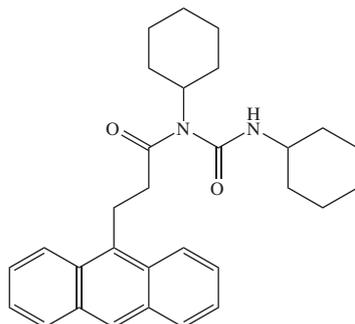


Abbildung 3.41: Molekülstruktur der Verbindung 1-(3-Anthracen-9-yl-propionyl)-1,3-dicyclohexylharnstoff (**22**, $M = 456,6 \text{ g mol}^{-1}$)

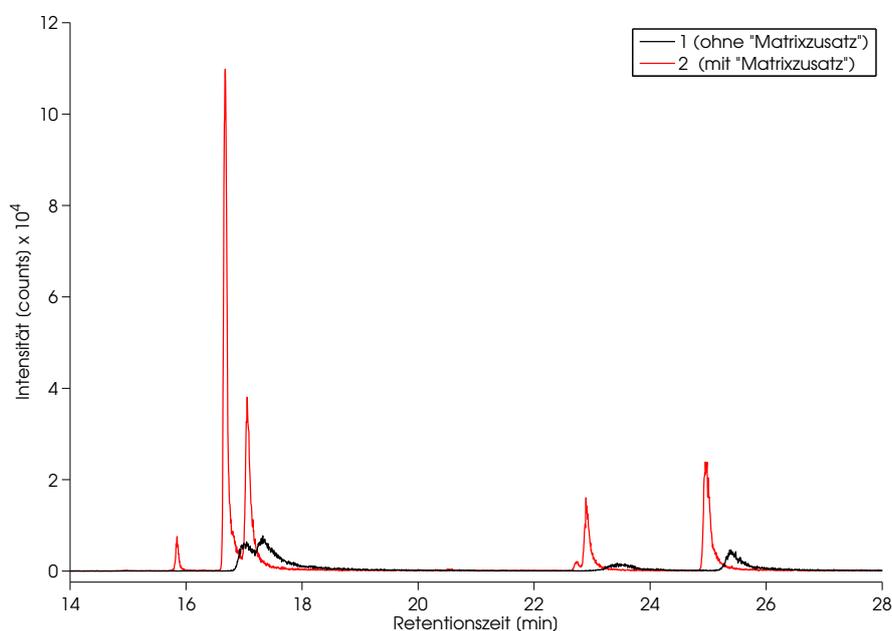


Abbildung 3.42: GC-APLI-Chromatogramme der summierten EIC für ausgewählte Massenspektren ($\Sigma m/z$ 240,0 und $264,0 \pm 0,5$) einer komplexen deuterierten PAK-Mischung (PAK-Mix 9, $\beta = 1 \mu\text{g L}^{-1}$ in Acetonitril) (1) ohne und (2) mit dem Zusatz von **22** ($\beta = 2 \text{ g L}^{-1}$). — Trennparameter in Kapitel 6.1.3

Eine Quantifizierung über eine externe Kalibrierung konnte sonst aufgrund des MICEE nicht durchgeführt werden. Die Quantifizierung über interne deuterierte Standards konnte ebenfalls aufgrund der Komplexität der Probe sowie des MICEE nicht realisiert werden. Für eine exakte quantitative Analyse ist eine Kenntnis über Responsefaktoren zwischen den PAK-Verbindungen und deren deuterierten Analoga notwendig, um verlässliche Aussagen zuzulassen. Responsefaktoren sollten in einer analytfreien Matrix bestimmt werden, die aber nicht zur Verfügung stand. Die stark variierenden Gehalte²² verschiedener PAK-Verbindungen in

²²zwischen $0,3$ und $18 \mu\text{g kg}^{-1}$ Feuchtmasse [234]

der Muschelprobe erwiesen sich zudem als ungeeignet für ein einfaches Standardadditionsverfahren mit einer kommerziellen PAK-Mischung. Hierfür würde eine angepasste Multi-PAK-Standardlösung benötigt. Eine abschließende Beurteilung über die Leistungsfähigkeit der Lasersysteme für die GC-APLI kann in dieser Arbeit daher nur qualitativ erfolgen.

3.3.5 Einsatz der Lasersysteme für die DI-APLI

Die APLI-(TOF)MS bietet sich zur Identifizierung und Charakterisierung von geeigneten Reaktionszwischen- und -endprodukten in der organischen Synthese an [28, 68, 235]. Mithilfe der Direktinfusions (engl.: *direct infusion*, DI)-APLI können so effizient Molekülmassen von Verbindungen bestimmt werden, die mit anderen Ionisationsmethoden nur schwer oder gar nicht zugänglich sind. Vor allem unpolare Verbindungen mit großen Molekülmassen können mit den gängigen Ionisationsmethoden – häufig wird für die Reaktionskontrolle die ESI eingesetzt – nicht ionisiert und somit nicht analysiert werden.

Eine weitere Methode, die u. U. eine Bestimmung der Molekülmasse (z.B. indirekt über Adduktbildung) zulässt, ist die matrix-assistierte Laserdesorption/-ionisation (engl.: *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI). In Abbildung 3.43 ist die Molekülstruktur der zu untersuchenden Verbindung **23** ($C_{90}H_{96}N_6S_9$, $M = 1550,5 \text{ g mol}^{-1}$) dargestellt. Diese Struktur ist ein organisches Dendrimer, das mit seiner sternenförmigen Struktur als Donor-Akzeptor-Donor-Struktur in organischen Solarzellen Anwendung finden soll, um die elektronischen Eigenschaften der Solarzelle durch breitere Absorptionsbanden und folglich effizientere Leistungswandlungen zu verbessern [236]. Abbildung 3.44 zeigt einen Vergleich der Massenspektren einer von der Arbeitsgruppe Funktionelle Polymere der Bergischen Universität Wuppertal synthetisierten Verbindung, die mit APLI- (Abb. 3.44a) und MALDI-(TOF)MS (Abb. 3.44b) erhalten wurden. Für die APLI wurde in diesem Fall der KrF*-Excimerlaser genutzt.

Die experimentellen Bedingungen für die von WULF (Arbeitskreis Analytische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal) durchgeführte MALDI-(TOF)MS-Messung sind in Kapitel 6.10 und für die APLI-(TOF)MS-Messung in Kapitel 6.5 angegeben. Für beide Ionisationsmethoden sind als Referenz zusätzlich simulierte Massenspektren der entsprechenden Summenformeln abgebildet .

Für die MALDI-(TOF)MS-Messungen wurden der Probe Dithranol (1,8,9-Trihydroxyanthracen) als Matrix sowie Silbertrifluoracetat als kationisierendes Salz hinzugegeben [236]. Die mehrere Schritte umfassende Probenvorbereitung erfolgte nach der sogenannten *dried-droplet*-Methode. Das Silbersalz führt bei der Desorption zu einer Adduktbildung mit der Zielsubstanz, sodass das erhaltene Massenspektrum um die Verteilung der Silberisotopen erweitert ist. Zur Bestimmung der Molekülmasse muss hier eine Differenzbildung oder ein Vergleich mit einem simulierten Massenspektrum für das Addukt durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu ist mit APLI-(TOF)MS die Bestimmung der Molekülmasse über das gebildete Radi-

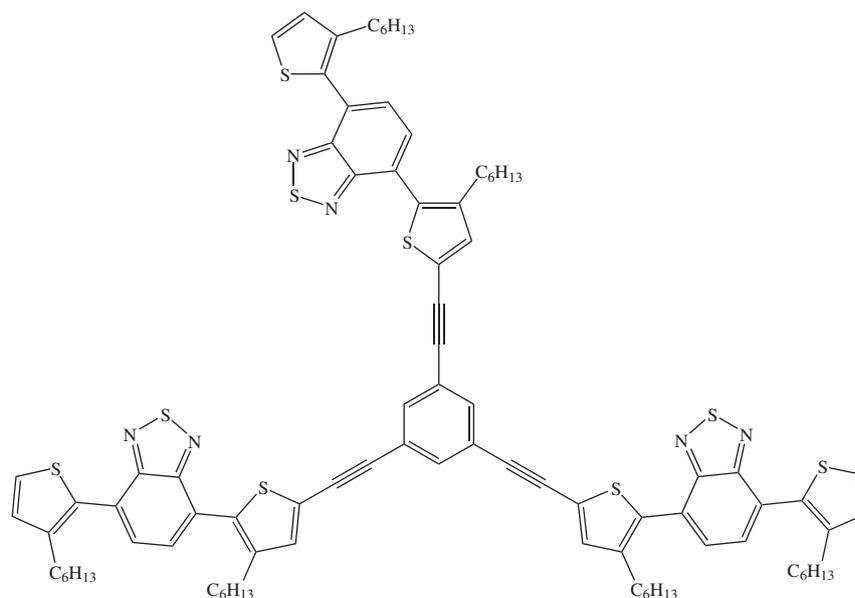


Abbildung 3.43: Molekülstruktur der Verbindung 1,3,5-Tris((4-hexyl-5-(7-(3-hexylthiophen-2-yl)benzo[c][1,2,5]thiadiazol-4-yl)thiophen-2-yl)ethinyl)benzol (**23**, $M = 1550,4 \text{ g mol}^{-1}$)

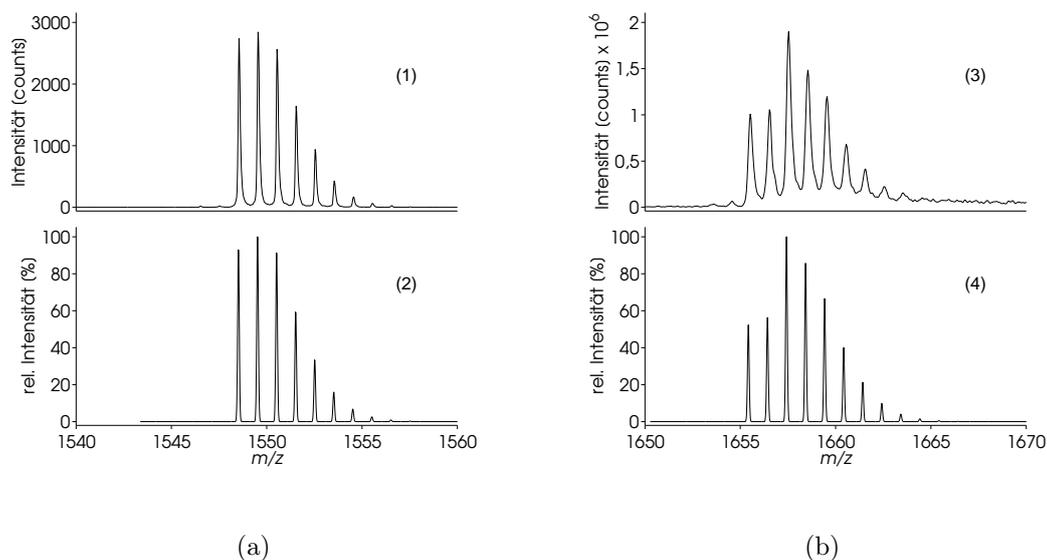


Abbildung 3.44: Vergleich der (a) APLI- und (b) MALDI-Massenspektren (**1** und **3**) der Verbindung **23** mit simulierten Massenspektren (**2**, $\text{C}_{90}\text{H}_{96}\text{N}_6\text{S}_9$ und **4**, $\text{C}_{90}\text{H}_{96}\text{N}_6\text{S}_9\text{Ag}$) für die zu erwartende Molekülzusammensetzung

kalkulation der Zielverbindung möglich, was einen Vorteil für die direkte Massenbestimmung bedeutet. Weiterhin vorteilhaft ist die einfache Probenvorbereitung: Für die APLI-Messungen wurde die Probe eingewogen, in Dichlormethan gelöst und verdünnt. Zur Ionisation wurde die Verdünnung ohne weitere Schritte mithilfe einer Spritzenpumpe in den Verdampfer der Ionisationsquelle eingetragen [236].

Der Vergleich zwischen APLI und MALDI zeigt, dass die APLI grundsätzlich als Informationsquelle für die begleitende Analytik einer organischen Synthese geeignet ist. Die bisher erfolgten Molekülmassebestimmungen erfolgten mit einem Excimerlaser bei 248 nm. Um die Eignung des DPSS-Lasers bei 266 nm für identische Fragestellungen zu evaluieren, sind nachfolgend die Ergebnisse der Identifizierung weiterer Verbindungen sowohl mit dem Excimer- als auch mit dem DPSS-Laser dargestellt.

3.3.5.1 Organische Iridiumkomplexe als Bausteine für polymere LED-Materialien

In der Vergangenheit wurde für die Identifikation neutraler heteroleptischer Iridium(III)-Komplexe bereits die APLI-(TOF)MS mit einem KrF*-Excimerlaser genutzt [237]. Diese Verbindungen bieten sich durch ihre optisch-aktiven Eigenschaften als Bausteine für Polymere an, die in organischen Leuchtdioden Verwendung finden. Eine Vorstufe der für diese Zwecke nutzbaren heteroleptischen Ir(III)-Komplexe ist Verbindung **24** ($C_{54}H_{44}IrN_3O_4$, $M = 991,2 \text{ g mol}^{-1}$), deren Molekülstruktur in Abbildung 3.45 dargestellt ist. Ausgehend von dieser Verbindung kann über verschiedene weitere Reaktionen eine Vielzahl an nutzbaren Strukturen für organische Leuchtdioden erhalten werden.

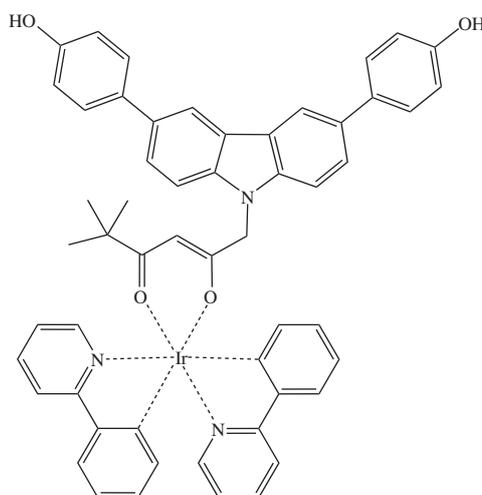


Abbildung 3.45: Molekülstruktur der Verbindung Bis(2-phenylpyridino)-(6-[3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-carbazol-9-yl]-5-hydroxo-2,2-dimethylhex-4-en-3-on)-iridium(III) (**24**, $M = 991,2 \text{ g mol}^{-1}$)

Zur Identifizierung der Vorstufe wurden massenspektrometrische Untersuchungen mit APLI-(TOF)MS durchgeführt. Die Massenspektren in Abbildung 3.46 wurden sowohl mit dem Excimerlaser (a) als auch mit dem DPSS-Laser (b) erhalten. Zum Vergleich ist ein simuliertes Massenspektrum (c) für die angegebene Summenformel dargestellt. Für dieses Experiment wurde die Probe wie in Kapitel 6.5 beschrieben verdünnt und bei einer Konzentration von $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ in Dichlormethan ohne weitere Aufarbeitung gemessen.

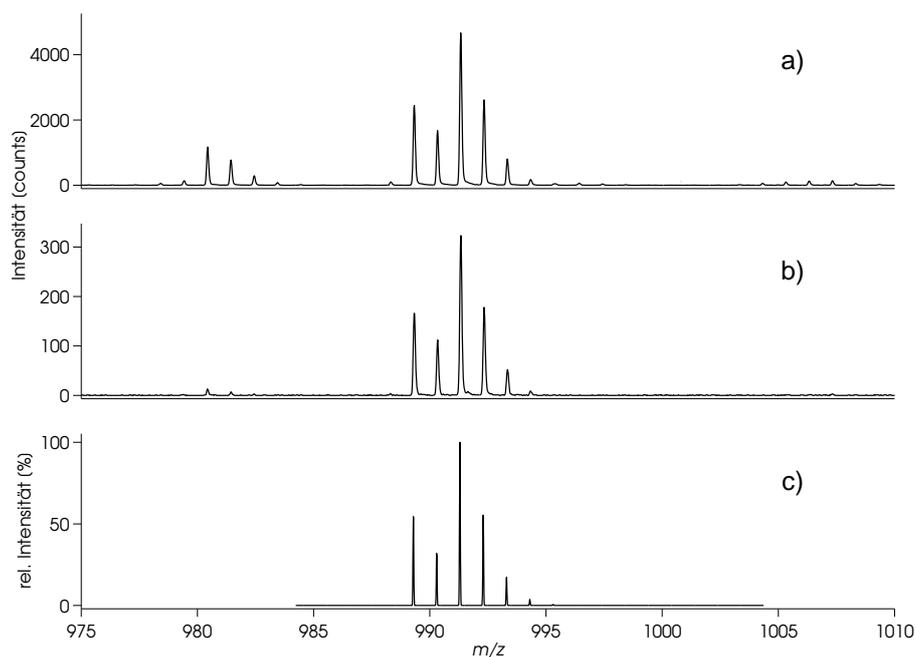


Abbildung 3.46: DI-APLI-Massenspektren des organischen Iridiumkomplexes **24** mit a): KrF*-Excimerlaser und b): DPSS-Laser. Zum Vergleich der Massenspektren dient c): ein simuliertes Massenspektrum für $C_{54}H_{44}IrN_3O_4$

Die erhaltenen Massenspektren zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit dem aus der Simulation zu erwartenden Spektrum. Dies gilt für den Excimerlaser und den DPSS-Laser. Der Unterschied in der Signalintensität bei beiden Lasern ist unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Beleuchtungsflächen der Laserstrahlen nachvollziehbar. Ebenso besteht aufgrund der unterschiedlichen Photonenenergie der Laser und den damit zusammenhängenden Absorptionsquerschnitten des Analyten bei diesen Energien eine Abhängigkeit der Signalintensität. Um hier eine abschließende Beurteilung geben zu können, sind weitere Informationen zu den Absorptionsquerschnitten bei 248 nm und 266 nm notwendig.

3.3.5.2 Bestimmung des Bromierungsgrades organischer Polymerbausteine

Eine weitere Verbindungsklasse, deren Identifikation mit DI-APLI-(TOF)MS (sowohl mit dem Excimer- als auch mit dem DPSS-Laser) möglich ist, basiert auf der in Abbildung 3.47 dargestellten Grundstruktur der Verbindung **25**. Aus dieser können durch eine Bromierungsreaktion die Verbindungen **26** ($C_{87}H_{121}Br$, $M = 1246,8 \text{ g mol}^{-1}$), **27** ($C_{87}H_{120}Br_2$, $M = 1325,7 \text{ g mol}^{-1}$) und **28** ($C_{87}H_{119}Br_3$, $M = 1404,6 \text{ g mol}^{-1}$) erhalten werden. Das Ziel der APLI-Untersuchung ist in diesem Fall die Bestimmung des Bromierungsgrades verschiedener Fraktionen nach einer säulenchromatographischen Aufbereitung des Syntheseprodukts der Bromierung. Es wurden zwei Fraktionen analysiert, die nach dem in Kapitel 6.5 angegebenen Verfahren aufbereitet wurden.

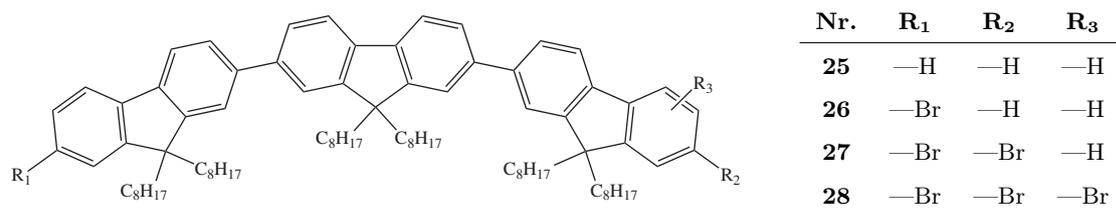


Abbildung 3.47: Molekülstruktur der Verbindung
9,9,9',9',9'',9''-Hexaocetyl-9H,9'H,9''H-[2,2',7',2'']terfluorene

Die mit dem Excimerlaser erhaltenen Massenspektren für beide Fraktionen sind zusammen mit entsprechenden simulierten Spektren in Abbildung 3.48 dargestellt. Die Analyse der Fraktion A zeigte nur eine sehr geringe Intensität bei den Massensignalen für das Edukt **25** und die Monobromverbindung **26**. Beide sind in Fraktion B nicht nachzuweisen. Durch den Vergleich mit den simulierten Spektren kann Fraktion A der dibromierten Verbindung und Fraktion B der tribromierten Verbindung zugeordnet werden.

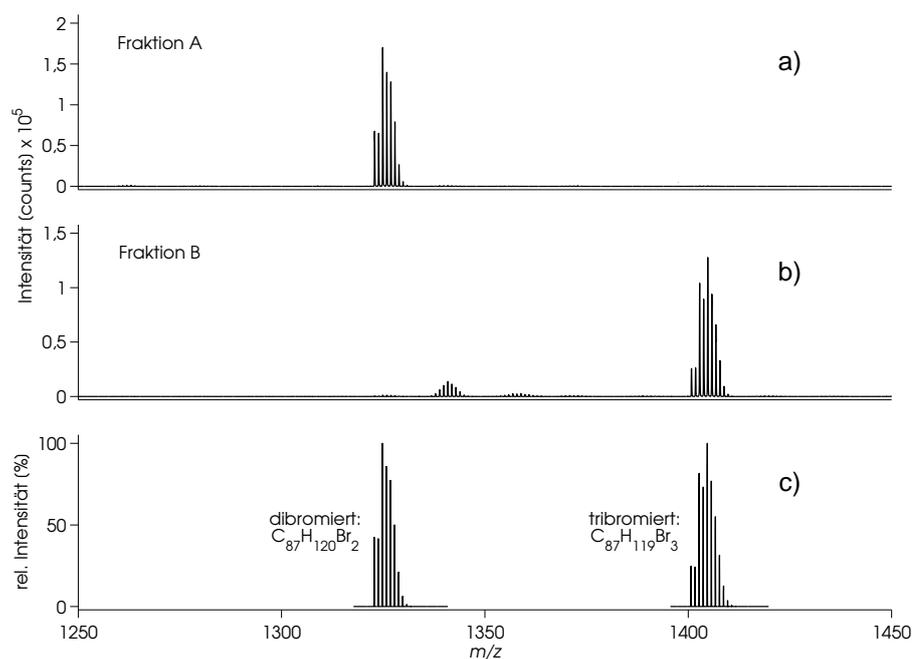


Abbildung 3.48: Vergleich der Massenspektren verschiedener Fraktionen a) & b) einer säulenchromatographischen Aufbereitung nach Bromierung der Grundstruktur **25** zum Aufbau eines organischen Polymerbausteins. Die Messungen wurden mit einem Excimerlaser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsenergie von 5 mJ durchgeführt. Zur Bestimmung des Bromierungsgrades sind die simulierten Massenspektren c) für das dibromierte (**27**) und das tribromierte Produkt (**28**) ebenfalls abgebildet.

Für einen Vergleich der beiden Lasersysteme wurde Fraktion A zusätzlich mit dem DPSS-

Laser ionisiert. Abbildung 3.49 zeigt die mit dem Excimerlaser (a) (100 Hz, 5 mJ) und dem DPSS-Laser (b) (100 Hz, 70 μ J) erhaltenen Massenspektren einer aufbereiteten Fraktion des Dibromids **27**, das in einer Konzentration von 20 μ mol L⁻¹ zur Analyse eingesetzt wurde. Zum Vergleich des Isotopenmusters, das insbesondere durch die Verteilung der Bromisotopen sehr charakteristisch ist, wurde zusätzlich ein simuliertes Massenspektrum (c) abgebildet.

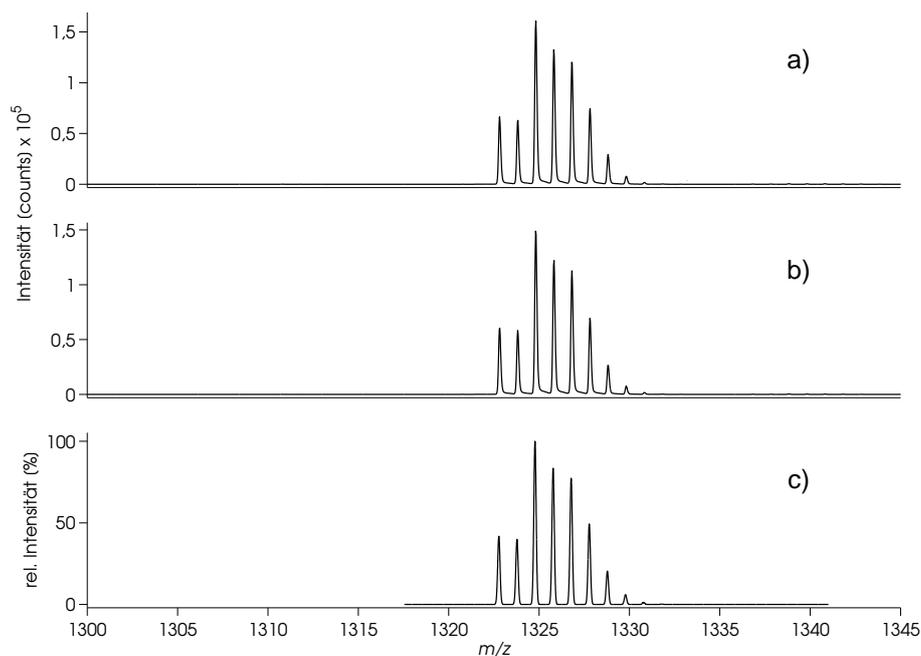


Abbildung 3.49: Vergleich der Massenspektren des organischen Polymerbausteins **25** aus der 2. Fraktion einer säulenchromatographischen Aufbereitung der Syntheselösung. Die Massenspektren belegen, dass in dieser Fraktion das dibromierte Produkt erhalten wurde. Die Analysen erfolgten mit einem Excimerlaser a) und mit einem DPSS-Laser b). Zum Vergleich des Isotopenmusters ist ein simuliertes Massenspektrum c) für C₈₇H₁₂₀Br₂ abgebildet.

Auch hier lässt sich eine deutliche Übereinstimmung der mit beiden Lasern erhaltenen Massenspektren zu dem simulierten Spektrum feststellen. Die Signalintensitäten sind dabei für identische Konzentrationen und Förderraten der Spritzenpumpe bei beiden Lasern nahezu gleich. Vergleichbare Ergebnisse mit dem DPSS-Laser sind für solche Verbindungen auch mit anderen Bromierungsgraden zu erwarten. Die dargestellten Ergebnisse belegen deutlich, dass auch mit dem kompakteren DPSS-Laser eine eindeutige Identifizierung verschiedener Verbindungen möglich ist.

3.3.6 Beurteilung der Einsatzfähigkeit der Lasersysteme für die APLI

Mit beiden Lasersystemen sind APLI-Analysen verschiedener Analyten grundsätzlich möglich. Allgemein bietet der Excimerlaser jedoch diverse Vorteile gegenüber dem DPSS-Laser. Eine festgelegte Strahlposition im Quellenkörper führt beim DPSS-Laser zu Unterschieden in

der DIA während einer GC-Analyse. Ein Vergleich von Analysen, besonders bei verschiedenen Ofentemperaturprogrammen, kann hier zu Fehlern bei der Auswertung führen, die mit dem Excimerlaser nicht auftreten. Diese Einschränkungen gelten ebenfalls für die HPLC-APLI. Bei dieser ist die Ausrichtung des Laserstrahls besonders relevant, was zu vielen Kompromissen bei der Anwendung des DPSS-Lasers für die HPLC-APLI führt. Die mit beiden Lasersystemen erhaltenen Ergebnisse zeigen teilweise deutliche Unterschiede in der Signalintensität der Analyten durch unterschiedliche Absorptionsquerschnitte. Hierdurch können Analysen mit beiden Systemen nicht direkt miteinander verglichen werden. Ein qualitativer Vergleich der Systeme ist möglich und demonstriert, dass beide Lasersysteme zur Identifikation organischer Verbindungen eingesetzt werden können.

3.4 SFC-APLI-(TOF)MS

Die APLI-MS als leistungsstarke Ionisations- und Detektionsmethode, insbesondere für PAK, wurde bereits mit gängigen Trennverfahren wie GC und HPLC sowie mit spezielleren Verfahren wie der Kapillarelektrochromatographie (CEC; in Kombination mit einem Elektrospray als ESILI) gekoppelt oder für desorptive Anwendungen genutzt [28, 51, 54, 68, 74]. Um das Portfolio der analytischen Trennmethode zu erweitern, wird nachfolgend die erste Kopplung der APLI-MS mit der superkritischen Flüssigkeitschromatographie (SFC) beschrieben, ihre Anwendbarkeit gezeigt und dabei auftretende Probleme diskutiert.

3.4.1 Vorteile der SFC bei der Trennung von PAK

Zur Trennung von PAK werden häufig die GC [152, 160, 164, 168], die HPLC [151, 157, 172, 174] und die SFC eingesetzt [44, 125, 129, 131, 173]. Vorteile der GC sind die hohe chromatographische Trennleistung z. B. bei komplexen Analytmischungen und die Einsatzmöglichkeit universeller Detektoren. Die HPLC ermöglicht hingegen die Analyse nicht oder nur schwer verdampfbarer sowie thermisch instabiler Analyten und zeigt oftmals eine höhere Selektivität für die Trennung isomerer Verbindungen [119].

Die Vorteile beider Methoden vereint die SFC [96, 131]. Das in der SFC am häufigsten eingesetzte Elutionsmittel ist über- bzw. superkritisches Kohlenstoffdioxid (CO_2) [77]. Der kritische Punkt $P_{\text{krit.}}$ von CO_2 liegt bei einer Temperatur von $T_{\text{krit.}} = 304,18 \text{ K}$ und einem Druck von $p_{\text{krit.}} = 73,8 \text{ bar}$ [238]. Oberhalb dieses Punktes liegt CO_2 superkritisch vor.

Superkritische Elutionsmittel zeichnen sich im Vergleich zu den gängigen HPLC-Eluenten durch höhere Diffusionskoeffizienten und niedrigere Viskositäten aus, was zu einer erhöhten Trenneffizienz und verkürzten Analysenzeiten führt [77, 95, 109, 131]. Verglichen mit den mobilen Phasen der GC ist die Dichte eines superkritischen Fluids um bis zu drei Größenordnungen höher [77]. Hiermit geht eine Erhöhung des Lösungsvermögens in der gleichen Größenordnung für viele Analyten einher, wodurch der Massentransfer drastisch erhöht wird [87, 131]. Die Dichte des superkritischen Fluids ist dabei eine Funktion des Drucks sowie der

Temperatur und über diese Parameter sehr einfach zu variieren. Die Dichte gilt in der SFC als Schlüsselparameter für eine erfolgreiche Trennung [7, 125, 239]. Superkritisches CO₂ bietet sich als mobile Phase in der SFC besonders durch die relativ niedrige kritische Temperatur für die Trennung thermisch labiler Substanzen an. Zudem erleichtert der – verglichen mit einigen anderen superkritischen Fluiden – niedrige kritische Druck die technische Handhabbarkeit der einzusetzenden Geräte. Die Bauteile des Chromatographiesystems können somit für die verwendeten Drücke in einfacher Weise konstruiert werden, ohne dass spezielle hochdruckbeständige Verbindungen und Dichtungen nötig sind.

Der Arbeitsbereich für den SFC-Systemdruck mit CO₂ als mobile Phase liegt i. A. bei Drücken bis ca. 400 bar und somit weit über dem kritischen Druck. Hierdurch wird das Elutionsvermögen aufgrund der erhöhten Dichte zusätzlich verbessert. Die Elutionskraft des CO₂ kann durch Beimischen eines organischen Modifiers (i. d. R. MeOH oder ACN) weiter erhöht werden, wodurch Analysenzeiten von ca. 6 Minuten für eine vollständige Trennung (mit Druck-, Temperatur- und Elutionsgradienten) der EPA-PAK-Mischung realisierbar sind [125, 129].

Die Kopplung der schnellen chromatographischen Trennung von PAK mittels SFC mit der hohen Nachweisempfindlichkeit der APLI-MS eröffnet neue Möglichkeiten für schnelle, kostengünstige, umwelt- und analytschonende Analysen von PAK und deren zugänglichen Derivate.

3.4.2 Aufbau einer SFC-APLI-(TOF)MS-Kopplung

Die Herausforderung beim Aufbau einer Kopplung der SFC mit der MS besteht darin, die unter erhöhtem Druck betriebene SFC an eine Ionenquelle zu koppeln, die unter Atmosphärendruck arbeitet. Für den Übergang vom Hochdruck- in den Atmosphärendruckbereich wird ein sogenannter Restriktor benötigt. Dieser erlaubt einerseits eine Druckregulierung des Chromatographiesystems und dient andererseits – nach erfolgter Expansion der mobilen Phase – als Schnittstelle für nachfolgende, drucklose Systeme.

Zum Aufbau der SFC-APLI-(TOF)MS-Kopplung stand ein kommerziell erhältliches SFC-Gerät der Fa. AGILENT TECHNOLOGIES, das sogenannte *Agilent 1260 Infinity SFC-System*, zur Verfügung. Dieses nutzt neben einer speziell für den SFC-Betrieb modifizierten, gewöhnlichen HPLC-Anlage²³ ein zusätzliches Gerät: das *Aurora Fusion A5 SFC-Modul*. Dieses hat ein heiz- und regelbares sogenanntes BPR-Ventil (Rückdruckregulatorventil; engl.: *back pressure regulator*), das als Restriktor dient, sowie mehrere Drucksensoren zur Kontrolle des Systemdrucks an verschiedenen Positionen. Zusätzlich liefert das Aurora-Modul das für den SFC-Betrieb benötigte flüssige CO₂, welches gasförmig aus einer Druckgasflasche entnommen und von der Aurora Fusion A5 in einem Peltier-Element verflüssigt wird.

Nach der chromatographischen Trennung durchläuft das Eluat – in der kommerziell verfügbaren Konfiguration – einen Detektor im Hochdruckbereich²⁴. Anschließend expandiert das CO₂ bzw. das Eluentengemisch am BPR gegen den Atmosphärendruck, wobei es aufgrund

²³modifiziert sind z. T. Dichtungen, Flusswege und das Injektionsventil

²⁴mit einen UV-Vis-Diodenarraydetektor (DAD) mit (wand-)verstärkter Detektionszelle

des Joule-Thomson-Effekts zu einer starken Abkühlung der mobilen Phase im AP-Bereich kommt [204]. In Folge dieser starken Abkühlung können schwerflüchtige Analyten zunächst auskondensieren, wodurch sie für den Weitertransport auf der Niederdruckseite, abhängig vom Dampfdruck des jeweiligen Analyten, nicht mehr bzw. nur schwer zugänglich sind.

Bei der kommerziell verfügbaren SFC-MS-Kopplung wird das Auskondensieren umgangen, indem vor dem BPR mit Hilfe einer zusätzlichen HPLC-Pumpe über ein T-Stück ein organisches Lösungsmittel (z. B. Methanol; ca. $0,2 \text{ mL min}^{-1}$) hinzugepumpt wird, das für einen Weitertransport der Analyten sorgt [240]. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass eine zusätzliche HPLC-Pumpe benötigt wird, um die Analyten in die Ionenquelle des Massenspektrometers zu überführen und dass das nun erhaltene Eluat in einer Verdampfeinheit vom Lösungsmittel befreit werden muss.

Die am Bruker micrOTOF verwendete TC-MPIS bietet zwar die Möglichkeit zum Verdampfen der Lösungsmittel, jedoch ist dieser Versuchsaufbau identisch mit dem Aufbau der Ionenquellengeometrie der HPLC-APLI. Diese Konfiguration ist u. a. aufgrund der fluid- und elektrodynamischen Eigenschaften um etwa zwei Größenordnungen weniger nachweisempfindlich als bspw. die GC-APLI-Kopplung (vgl. Kap. 3.4.5.2). Eine Anforderung an die SFC-APLI-Kopplung ist eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit gegenüber der HPLC-APLI, die mithilfe der GC-Konfiguration erreicht werden soll.

3.4.3 Das gewählte Restriktionssystem

Viele bereits realisierte Kopplungen der SFC zu drucklos betriebenen Detektoren wie z. B. dem ELSD nutzen feste Restriktoren. Zu diesem Zweck werden Metall-, Quarz- oder Glaskapillaren verwendet, deren Innendurchmesser wenige Mikrometer betragen. Solche Restriktoren haben einen unveränderlichen Flusswiderstand. Dadurch ist die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase vom anliegenden Druck sowie der Eluentenzusammensetzung und der Temperatur abhängig [7]. Bei solchen Systemen kommt es auf der gesamten Kapillarlänge zu einem kontinuierlichen Druckabfall. Durch die Expansion gegen den Atmosphärendruck und der damit einhergehenden Abkühlung aufgrund des Joule-Thomson-Effekts müssen solche Kapillaren am Ende geheizt werden.

Die in den folgenden Abschnitten entwickelte Kopplung verwendet eine fused-silica (fs)-Kapillare, die über ein T-Stück auf der Hochdruckseite des Systems eingebaut ist und zum Überführen der mobilen Phase in die Ionenquelle des Massenspektrometers dient, als festen Restriktor. Das System besitzt somit zwei Restriktoren, da ein Betrieb der SFC-Anlage ohne das Aurora Fusion A5 technisch nicht ohne weiteres realisierbar ist²⁵. Um die Restriktionskapillare zu heizen, wurde der Säulenofen des bestehenden GC-APLI-(TOF)MS-Versuchsaufbaus eingesetzt. Die GC-Transferline als Übergang zur MPIS bietet außerdem die Möglichkeit, die Kapillare bis kurz vor dem Eintritt in die Ionenquelle zu heizen.

²⁵Das Agilent 1260 Infinity SFC-System benötigt zum Betrieb zwingend das Aurora Fusion A5 SFC-Modul. Zum einen, um flüssiges CO_2 bereitzustellen, zum anderen, um die Systemdrücke kontinuierlich zu überprüfen. Diese Funktionen sind softwareseitig nicht ohne genaue Kenntnisse der firmeninternen Firmware zu umgehen.

Der Versuchsaufbau ist als Fotografie in Abbildung 3.50 und als schematische Zeichnung in Abbildung 3.51 dargestellt. In diesem Aufbau gelangt das Eluat direkt nach der chromatographischen Trennsäule über eine SST²⁶-Kapillare in ein T-Stück. Eine Seite des T-Stücks ist zum Einstellen und Aufrechterhalten des überkritischen Drucks mit dem BPR verbunden. Hierdurch fließt ein Teil des Eluats in die Entsorgung. Der zweite Teil des Eluats gelangt am dritten Anschluss des T-Stücks über eine 90 mm × 0,12 mm SST-Kapillare und einen totvolumenfreien Linearverbinder in die fs-Restriktionskapillare. Wie in Kapitel 3.4.4.3 beschrieben wird, ist es notwendig, die Restriktionskapillare vor der geheizten Transferline auf eine erhöhte Temperatur zu bringen, um so das Auskondensieren hochsiedender Analyten zu vermeiden. Zu diesem Zweck wird die Restriktionskapillare durch den an die Transferline gekoppelten Ofen geführt. Im Ofen kann diese Kapillare über einen GC-Säulenverbinder auf andere Innendurchmesser erweitert werden, was im Folgenden näher erläutert wird.

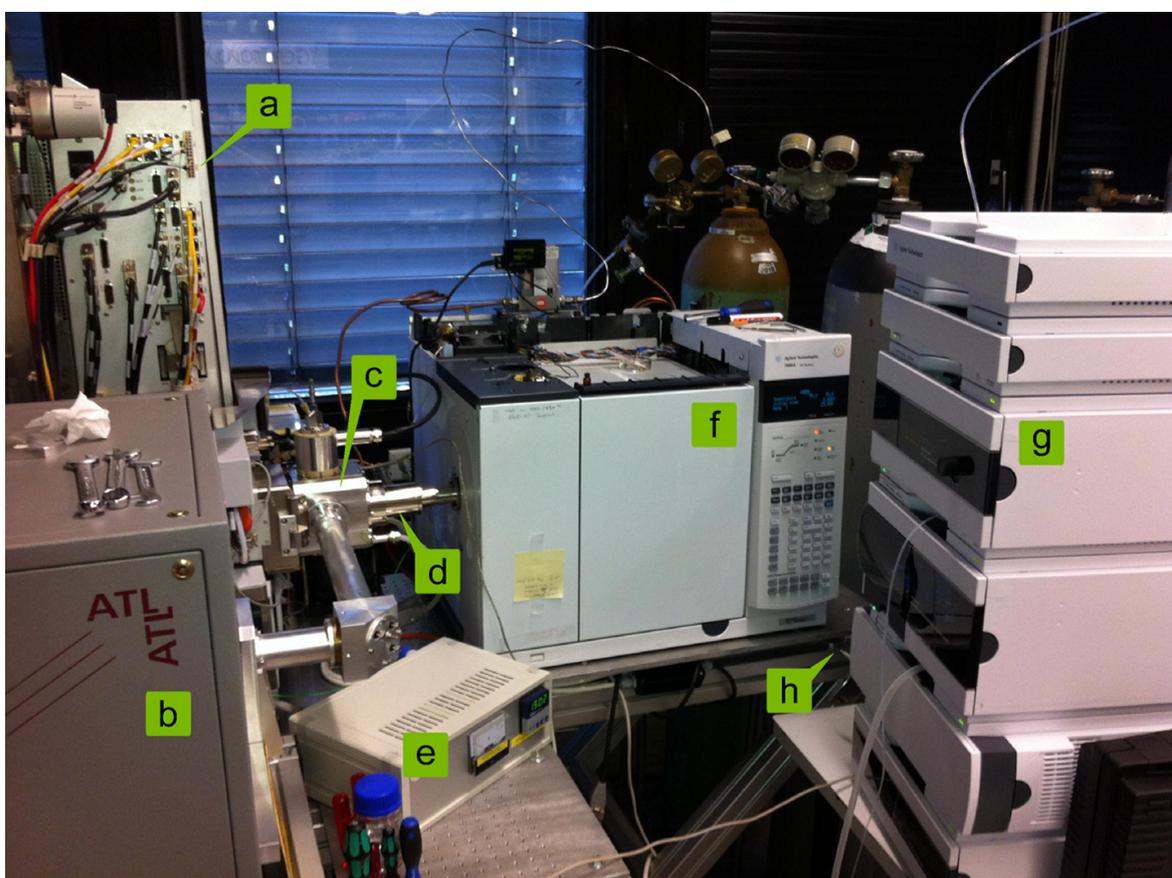


Abbildung 3.50: Fotografie des SFC-APLI-Aufbaus — a: Bruker micrOTOF Massenspektrometer, b: ATL ATLEX 300SI KrF* Excimer-Laser, c: TC-MPIS, d: Transferline, e: Transferlinesteuerung, f: Agilent GC 7890A Gaschromatograph, g: Agilent 1260 Infinity SFC-System, h: Kopplung der Restriktionskapillare, verdeckt durch g: Aurora Fusion A5 SFC-Modul

²⁶Stahl(-kapillare) (engl.: *stainless steel (capillary)*)

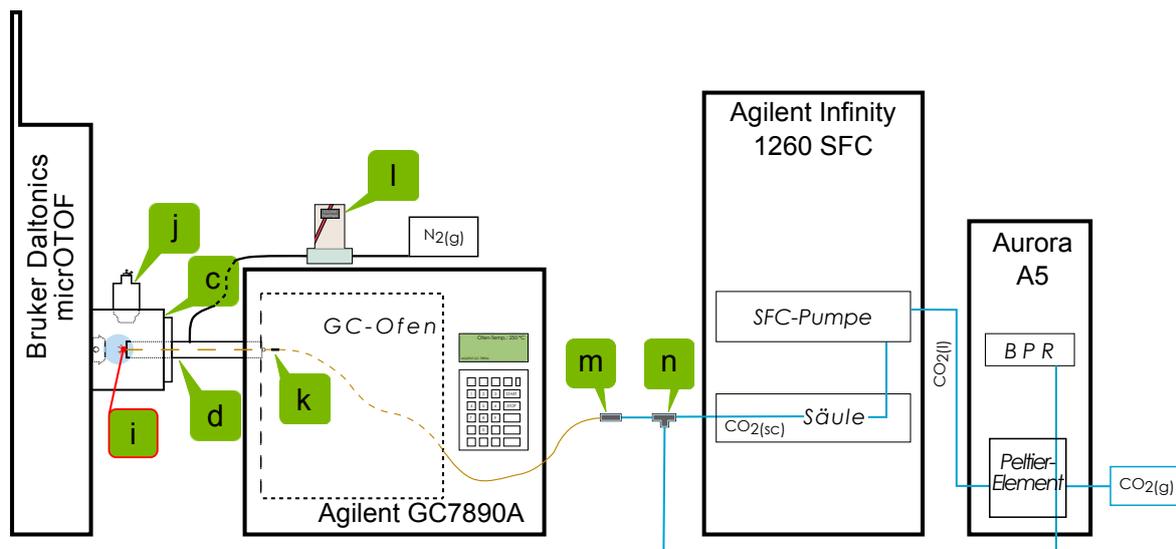


Abbildung 3.51: Schematischer Aufbau der SFC-APLI — c: TC-MPIS, d: Transferline, i: Laserstrahl, j: Verdampfereinheit, k: Kapillarsäulenverbinder, l: Gasflusskontroller, m: Linearverbinder (totvolumenfrei), n: T-Stück (totvolumenfrei)

Der Einsatz einer fs-Kapillare, die mit einem T-Stück an das System gekoppelt ist, wurde zuvor konzeptionell erfolgreich an einer SFC-FID-Kopplung untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine 1,25 m lange fs-Kapillare mit 25 μm -ID grundsätzlich als Restriktionskapillare geeignet ist. Aus einer Kapillare dieser Dimension fließt im Atmosphärendruckbereich bei Raumtemperatur etwa 80 mL gasförmiges CO_2 ²⁷. Der Gesamtgasfluss aus dem chromatographischen System (gemessen am BPR-Ausgang) beträgt unter diesen Bedingungen ca. $1 \text{ L min}^{-1} \text{ CO}_2$. Der Fluss durch die Restriktionskapillare ist umgekehrt proportional von der gewählten Ofentemperatur und variiert zwischen 40 und 100 mL min^{-1} bei Temperaturen bis 300°C .

Unter optimierten Bedingungen durchgeführte Analysen mit insbesondere für die APLI sehr hohen Analytkonzentrationen (z. B. 1 mg L^{-1} Naphthalin oder $250 \mu\text{g L}^{-1}$ PAK-Mix 31)²⁸, liefern vergleichsweise geringe Signalintensitäten und somit schlechte Nachweisgrenzen. Abbildung 3.52 zeigt beispielsweise die extrahierte Massenspur ($m/z = 240,0 \pm 0,5$) für Chrysen-d12 aus einer Analyse des PAK-Mix 31. Injiziert wurden hier $5 \mu\text{L}$ der mit ACN verdünnten PAK-Lösung ($\beta = 250 \mu\text{g L}^{-1}$). Das S/N beträgt 132 und liefert eine geschätzte Nachweisgrenze²⁹ von ca. $6 \mu\text{g L}^{-1}$.

Im T-Stück wird das Eluat auf die Restriktionskapillare und das BPR-Ventil (als Systemausgang) aufgeteilt. Das Splitverhältnis liegt unter den oben angegebenen Bedingungen bei etwa 1:10 bis 1:25 (unter ungünstigen Bedingungen bei 1:100), abhängig von der Ofentemperatur, dem Eluentenfluss und dem BPR-Druck und führt so zu massiven Verlusten des für die Io-

²⁷ bei einem Eluentenfluss von 2 mL min^{-1} reinem CO_2 sowie einem Systemdruck von 200 bar am BPR

²⁸ Zusammensetzung von PAK-Mix 31 in Tabelle 7.2.3

²⁹ nach dem 3s-Konzept von KAISER und SPECKER [210, 211]

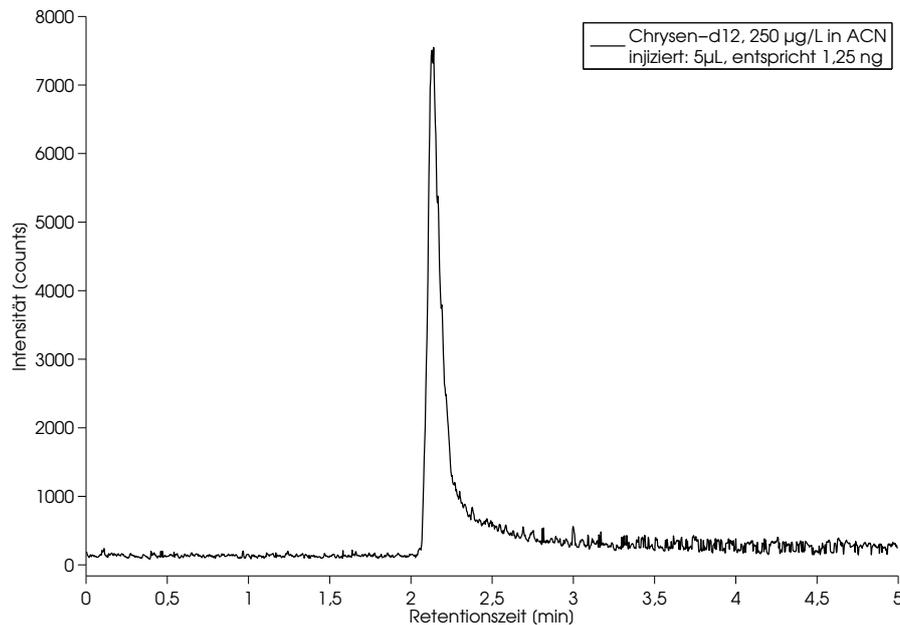


Abbildung 3.52: SFC-APLI-Analyse von PAK-Mix 31 ($\beta = 250 \mu\text{g L}^{-1}$ in ACN). Dargestellt ist das EIC für Chrysen-d12 ($m/z = 240,0 \pm 0,5$, entspricht 1,25 ng). $S/N \simeq 132$ — Trennparameter in Kapitel 6.3.1

nisation verfügbaren Analyten. Um das Splitverhältnis zu optimieren, können verschiedene Parameter verändert werden. Eine Möglichkeit ist das Erweitern des Innendurchmessers der Kapillare.

Nach dem Gesetz von HAGEN und POISEUILLE (Gleichung 3.3) geht der Innenradius einer Kapillare mit der vierten Potenz in die Berechnung des Volumenstromes ein. Dieses Gesetz gilt strenggenommen nur für laminar fließende Newton'sche Fluide, deren Fließgeschwindigkeit selber zeitlich konstant ist und bei denen sich die Flüssigkeitsschicht an der Rohrwand nicht bewegt [241]. Insbesondere ein laminarer Fluss ist für das verwendete System tendentiell nicht anzunehmen.

$$\text{Gesetz von Hagen-Poiseuille: } \dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l} \quad [241] \quad (3.3)$$

mit: \dot{V} = Volumenfluss (in $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), r = Kapillarradius (in m), Δp = Druckdifferenz im Kapillarrohr (in Pa), η = dynamische Viskosität des Fluids (in $\text{Pa} \cdot \text{s}$) und l = Länge der Kapillare (in m)

Vielmehr ist anzunehmen, dass es sich hier um einen turbulenten Fluss handelt. Die Abschätzung über turbulente oder laminare Flüsse erfolgt mithilfe der sogenannten Reynoldszahl Re .

Nach Gleichung 3.4 zur Berechnung der Reynoldszahl beträgt der Wert für Re im gegebenen System³⁰ etwa 51 300.

$$\text{Berechnung der Reynoldszahl: } Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\eta} = \frac{\bar{v} \cdot d}{\nu} \quad [241] \quad (3.4)$$

mit: Re = Reynoldszahl, ρ = Dichte des Fluids (in kg m^{-3}), v = charakteristische Strömungsgeschwindigkeit des Fluids (in m s^{-1}), d = Kapillardurchmesser (in m), η = dynamische Viskosität des Fluids (in $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1}$), \bar{v} = mittlere Geschwindigkeit des strömenden Fluids (in m s^{-1}) und ν = kinematische Viskosität des Fluids (in $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)

Übersteigt die Reynoldszahl Re eine festgelegte sogenannte kritische Reynoldszahl Re_{krit} , erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass eine bis dahin laminare Strömung in eine turbulente Strömung umschlägt. Dies geschieht durch kleine Schwankungen oder Störungen des Flusses (z. B. Einlaufstörungen), durch welche sich Turbulenzen bilden können. Bei Reynoldszahlen weit unter Re_{krit} zerfallen diese Turbulenzen wieder [244]. Die kritische Reynoldszahl ist keine strikte bzw. exakte Grenze und variiert je nach Anwendungsfall. Für Rohrströmungen (glatte, runde Rohre) liegt Re_{krit} im Bereich zwischen 2000 und 20 000 [241, 245].

Trotz der anzunehmenden turbulenten Strömung und der damit verbundenen Ungenauigkeit des Hagen-Poiseuille'schen Gesetzes kann für eine qualitative Abschätzung angenommen werden, dass der Innenradius in irgendeiner Art proportional in den Volumenstrom eingeht. Aus dieser Annahme folgt, dass ein Aufweiten des Innendurchmessers der fs-Kapillare das Splitverhältnis deutlich erhöht, da der Gesamtfluss durch das chromatographische System konstant gehalten wird³¹.

Nicht jeder beliebige Innendurchmesser einer fs-Kapillare eignet sich für die Restriktionsleitung. Das Aurora Fusion A5 gleicht zum Aufrechterhalten eines konstanten Systemdrucks mit einem Sensor vor dem BPR den Druck ab und regelt das BPR-Ventil gegebenenfalls nach. Das Nachregeln ist bauartbedingt nur bis zu einem bestimmten Druck möglich. Ist der Druckabfall am T-Stück, also vor dem Sensor, durch einen zu großen Kapillar-ID zu groß, kann der BPR nicht ausreichend nachregeln. Dadurch erreicht der Systemdruck nicht den Sollwert und das Aurora Fusion A5 gibt infolgedessen eine Fehlermeldung aus (Fehler: *leak detected*) und beginnt mit einer Sicherheitsabschaltung des Gesamtsystems.

Um das Auftreten dieser Fehlermeldung möglichst zu vermeiden, sollte eine Restriktionskapillare mit dem größtmöglichen Innendurchmesser gewählt werden, die dennoch einen für den BPR regelbaren Druckabfall sicherstellt. Hierfür wurde geprüft, welcher Innendurchmesser bei

³⁰berechnet für einen gasförmigen Volumenstrom von 50 mL CO_2 in einer Kapillare mit 25 μm Innendurchmesser bei einer Temperatur von 480 K und einem Druck von 250 bar ($\eta = 23,35 \mu\text{Pa} \cdot \text{s}$ [242] sowie $\rho = 28,22 \text{ kg m}^{-3}$ (berechnet mit Daten aus [243]))

³¹Eine Abhängigkeit besteht beim Gesamtfluss durch die geförderte Menge an mobiler Phase und den Rückdruck durch das BPR-Ventil.

einer gegebenen Kapillarlänge von 1,25 m am besten geeignet ist. Zur Verfügung standen fs-Kapillaren mit Innendurchmessern von 50, 75, 100 und 150 μm . Schon ab einem ID von 75 μm ist der durch den BPR-Sensor registrierte Systemdruck sehr instabil und das Gerät gibt nach kurzer Zeit die oben genannte Fehlermeldung aus. Mit einer 50 μm -ID fs-Kapillare bleibt der Systemdruck hingegen über lange Zeit stabil und das System gibt keine Fehlermeldung aus. Nachfolgend wird daher diese Restriktionskapillare verwendet.

Der Ausfluss von gasförmigem CO_2 aus einer solchen Kapillare liegt bei den genutzten Parametern in etwa in einem Bereich von ca. 150 bis 350 mL min^{-1} . Da das BPR-Ventil nicht volumen-, sondern druckreguliert arbeitet, ist trotz einer Veränderung des Eluentenflusses in der Restriktionskapillare der CO_2 -Fluss im chromatographischen System konstant. Dieses Verhalten sorgt dafür, dass das Splitverhältnis am T-Stück zugunsten der Restriktionsleitung verschoben wird.

Ein qualitativer Vergleich von Analysen mit den eingesetzten fs-Kapillaren (25 und 50 μm -ID) unter ähnlichen chromatographischen Bedingungen ist in Abbildung 3.53 dargestellt. Die Chromatogramme 1 und 2 zeigen jeweils die extrahierte Massenspur m/z $240,0 \pm 0,5$ für Chrysen-d12 aus einer Analyse des PAK-Mix 31. Zu beachten ist, dass die eingesetzte Konzentration bei 1 mit $\beta = 250 \mu\text{g L}^{-1}$ fünfmal höher ist als bei 2 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$).

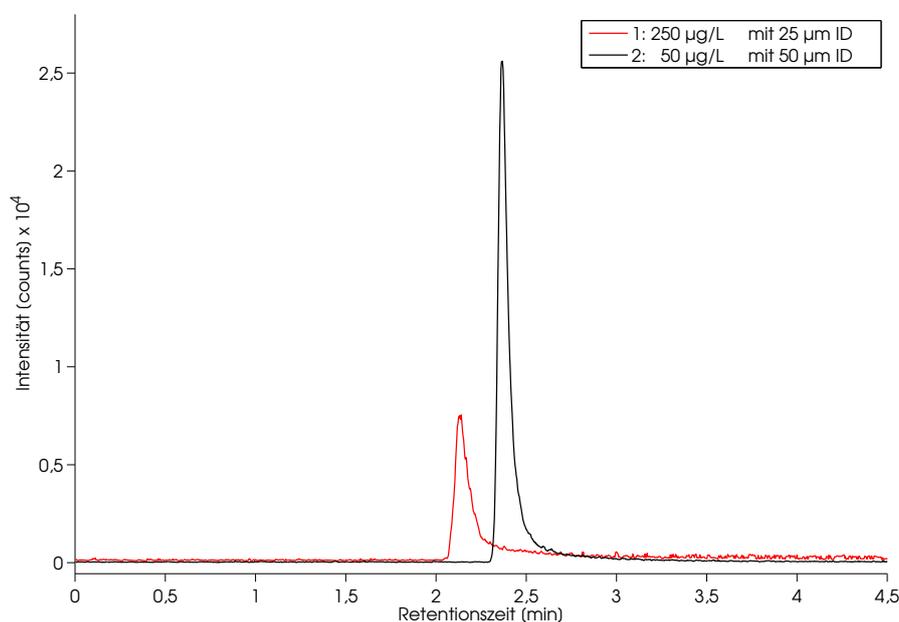


Abbildung 3.53: Qualitativer Vergleich der SFC-APLI-Analysen von PAK-Mix 31 in verschiedenen Massenkonzentrationen (1: $250 \mu\text{g L}^{-1}$ und 2: $50 \mu\text{g L}^{-1}$) mit unterschiedlichen Restriktionskapillar-ID. Dargestellt sind die EIC für m/z $240,0 \pm 0,5$ für Chrysen-d12.

1: 1,25 ng Chrysen-d12 mit 25 μm -ID Kapillare; das S/N beträgt ≈ 132

2: 0,25 ng Chrysen-d12 mit 50 μm -ID Kapillare; das S/N beträgt ≈ 1306

— Trennparameter in Kapitel 6.3.1 (für 1) und Kapitel 6.3.2 (für 2)

Die dargestellten Ergebnisse geben einen Trend wieder, der qualitativ den beschriebenen Erwartungen entspricht, jedoch vergleichsweise höher liegt, als es die berechneten Splitverhältnisse vermuten lassen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden weitere Optimierungsschritte für die Empfindlichkeit des Systems vorgenommen. Eine Möglichkeit, das System zu verbessern, besteht darin, die Analytmenge in der Ionisationszone weiter zu erhöhen. Hierzu bietet das Gesetz von Hagen-Poiseuille als Option eine Variation der Restriktionsstrecke an, auf die in Kapitel 3.4.4.2 näher eingegangen wird.

3.4.4 Weitere Möglichkeiten der Sensitivitätsoptimierung

Das gewählte Kopplungssystem über eine feste Restriktionskapillare ermöglicht mehrere Optionen, um das System auf maximalen Analyttransport zur Ionisationsquelle bzw. maximale Empfindlichkeit zu optimieren. So bietet das chromatographische System durch Variation des Systemdrucks, der Eluentenflussrate und -zusammensetzung die Möglichkeit, das Splitverhältnis am T-Stück in die gewünschte Richtung zu verschieben. Ebenso ist die verwendete Restriktionskapillare von großer Bedeutung. Weiteren Einfluss auf das Splitverhältnis übt auch die Ofen- bzw. Transferlinientemperatur aus, da hier in großem Maße die Gasviskosität in der Restriktionskapillare beeinflusst wird. Zuletzt können auch Parameter der Ionenquelle selbst die Empfindlichkeit der Kopplung beeinflussen.

3.4.4.1 Einfluss der Erweiterung des Austrittsdurchmessers

Mit der Erweiterung des Innendurchmessers auf 50 μm konnte die Empfindlichkeit der SFC-APLI-(TOF)MS-Kopplung bereits deutlich erhöht werden. Die Empfindlichkeit ist jedoch noch nicht in einem Bereich angelangt, der für die APLI insbesondere mit der GC-Ionenquellengeometrie erwartet wird. Der Unterschied zwischen den beiden Chromatographiesystemen ist die Eluatmenge bzw. der Volumenfluss, der aus der Restriktionskapillare der SFC bzw. der Trennsäule der GC in die Ionenquelle gelangt. Der Volumenfluss beeinflusst das fluiddynamische Verhalten dieses Gasstroms beim Eintritt in die Ionenquelle. Während aus einer GC-Kapillare ein Trägergasstrom Q von etwa 1 bis 2 mL min^{-1} fließt, gelangen die Analyten mit einer 50 μm -ID fs-Kapillare bei der SFC-Kopplung mit einem Gasstrom von etwa 150 bis 350 mL min^{-1} in die Ionisationszone. Zudem ist die Kapillaraustrittsfläche A der SFC-Restriktionskapillare etwa 25 mal kleiner als bei einer GC-Säule³². Hieraus ergeben sich deutliche Unterschiede in der Geometrie des austretenden Gasstrahls und in der Gasaustrittsgeschwindigkeit v der beiden Systeme.

Nach dem Austritt aus der Kapillare erfahren die Gasteilchen i. A. eine Reduzierung ihrer Fließgeschwindigkeit gegenüber der Strömung in der Kapillare selbst. Das Austrittsverhalten einer Strömung aus einem Rohr hängt von verschiedenen Faktoren ab, zu denen die Fließgeschwindigkeit, stoffspezifische Eigenschaften wie die Dichte oder die Viskosität, die Geometrie der Austrittsöffnung und die Druckdifferenz zählen.

³²Häufig werden GC-Säulen mit einem Innendurchmesser von 250 μm verwendet.

Um den Einfluss der Fließgeschwindigkeit bzw. des Volumenflusses bei gegebenem ID auf das Austrittsverhalten des Eluats bei der SFC-Kopplung näher beschreiben zu können, wurde in Zusammenarbeit mit KŁOPOTOWSKI (Arbeitskreis Physikalische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal) mit dem sogenannten *background-oriented Schlieren*-Verfahren (BOS) ein Abbild der Gasflüsse beim Austritt aus der Restriktionskapillare in die Ionenquelle erstellt. Das BOS-Verfahren wurde 1999 von MEIER und RICHARD *et. al.* entwickelt und bietet die Möglichkeit, Brechungsindexgradienten transparenter Medien durch Fotografie und computergestützter Auswertung sichtbar zu machen und daraus Größen wie Dichte- oder Konzentrationsverteilungen abzuleiten [246, 247]. Ein einfacher BOS-Versuchsaufbau benötigt dazu eine (Digital-)Kamera, eine intensive Lichtquelle und ein strukturiertes zufälliges Punktemuster als Hintergrund des zu untersuchenden Versuchsaufbaus [248]. Die intensive Lichtquelle beleuchtet i. A. nur das Hintergrundmuster. Zwischen Kamera und Hintergrundmuster befindet sich der Versuchsaufbau. Mit der Kamera werden dann zwei Bilder des Hintergrundmusters aufgenommen, wobei das Kameraobjektiv das Hintergrundmuster fokussiert. Eines der Bilder wird als Referenzbild ohne Gasflüsse, das zweite Bild mit den abzubildenden Gasflüssen aufgenommen. Aufgrund der unterschiedlichen Dichtegradienten der Gasflüsse lassen sich die sogenannten Störungen (Verschiebungen der Bildpunkte des Hintergrundmusters) zwischen beiden Bildern erkennen. Diese Verschiebungen werden mithilfe eines Auswertalgorithmus, der ursprünglich z. B. für die Bildgebung bei der Messung der Teilchengeschwindigkeit, dem sogenannten PIV-Verfahren (engl.: *particle image velocimetry*) entwickelt wurde, bestimmt und in Vektoren transformiert. Aus diesen Daten kann dann eine Visualisierung erfolgen [246–248].

Abbildung 3.54a bildet eine Kombination aus dem BOS und einem überlagerten Realbild ab. In dieser Abbildung wurde das BOS nur mit dem Eluat ($\text{CO}_2/\text{MeOH V/V} = 80\%/20\%$ mit 2 mL min^{-1}) aus der Restriktionskapillare ohne zusätzliche Gasflüsse wie Sheathgas aus der Transferline, Drygas aus dem Massenspektrometer und Vaporizergas aus dem Verdampfer aufgenommen. Für diese Aufnahmen wurde der Austrittsdurchmesser der $50\ \mu\text{m}$ ID-Restriktionskapillare durch Kopplung einer $530\ \mu\text{m}$ ID-Kapillare vergrößert (siehe Seite 99). Abbildung 3.54b zeigt zum Vergleich eine fluiddynamische Simulation³³ dieses Systems.

Zwischen der Transferline (rechts im Bild) und dem Sprayshield des Massenspektrometers (links) ist die Geometrie des austretenden Eluats deutlich zu erkennen (grüne Ellipse). Entgegen der Extrapolation aus den bekannten Verteilungen der dynamischen Ionenakzeptanz für die GC-APLI-Kopplung [68] entsteht durch das hohe Ausflussvolumen der SFC-APLI-Kopplung keine Gas- bzw. Analytblase, sondern ein gerichteter, kaum aufweitender Gasstrahl, der direkt auf den Eingang des Massenspektrometers gerichtet ist.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gas- und Analytteilchen ohne nennenswerten Geschwindigkeitsverlust aus der Restriktionskapillare austreten und in den Einsaugbereich

³³ von WISSDORF (Arbeitskreis Physikalische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal)

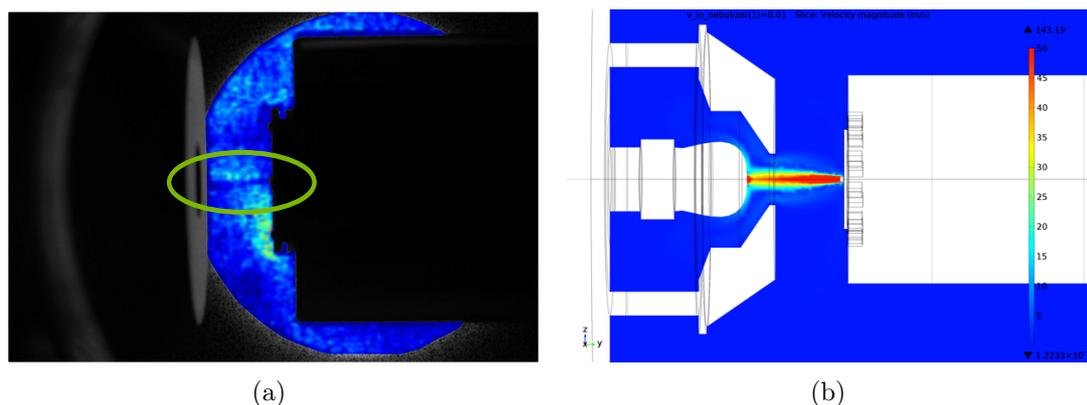


Abbildung 3.54: (a): BOS-Aufnahme (Rauschfilter 1,2) kombiniert mit Realbild und (b) fluiddynamische Simulation der SFC-APLI-Kopplung — Aufnahmebedingungen für die BOS-Technik in Kapitel 6.11, Parameter der fluiddynamischen Simulation in Kapitel 6.12.4

des Massenspektrometers gelangen. Im Gegensatz zur GC-APLI-Kopplung behalten sie ihre Austrittsgeschwindigkeit bei und weisen sehr große Unterschiede in ihrer Aufenthaltszeit in der vom Laser ausgeleuchteten Fläche auf. Die Laserimpulse (etwa 4 bis 6 ns) leuchten mit einer Repetitionsrate von 50 bis 200 Hz, meistens mit 100 Hz, in die (Ionisations-)Zone zwischen Transferline und Sprayshield (Abstand: 5 mm). Durchquert ein Analytmolekül die Ionisationszone zwischen zwei Laserimpulsen, kann es nicht ionisiert und analysiert werden. Da die Aufenthaltszeiten bei der SFC sehr kurz sind, wird (nach obiger Annahme) nur jedes zwei- bis viertausendste Analytteilchen von einem Laserpuls beleuchtet und ionisiert. Bei den geringen Fließgeschwindigkeiten der GC wird hingegen nahezu jedes Teilchen beleuchtet. Tabelle 3.8 gibt hierzu einen Überblick über die relevanten Parameter der GC- und SFC-Kopplung. Zu beachten sind hier die großen Unterschiede in den Austrittsgeschwindigkeiten und den hieraus resultierenden Aufenthaltszeiten in der Ionisationszone. Trotz einer gleichen Analytmenge wird mit diesen Angaben deutlich, dass die SFC-Kopplung weniger empfindlich sein wird als die GC-Kopplung.

Tabelle 3.8: Vergleich der Gasaustrittsparameter bei GC und SFC

	Volumenstrom Q [mL min ⁻¹]	Austrittsfläche A [m ²]	Austrittsgeschwindigkeit v [m s ⁻¹]	Aufenthaltszeit t [s]
GC	1 - 2	$5 \cdot 10^{-8}$	0,34 - 0,68	$1,5 \cdot 10^{-2}$ - $7,4 \cdot 10^{-3}$
SFC	100 - 200	$2 \cdot 10^{-9}$	849 - 1698	$5,9 \cdot 10^{-6}$ - $2,9 \cdot 10^{-6}$

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Analytteilchen in der SFC-Anordnung zur Maximierung der Ionisationsausbeute stark verlangsamt werden müssen, um durch eine genügend lange

Aufenthaltszeit in der Ionisationszone mit dem Laserlicht in Wechselwirkung treten zu können. Die Änderung der Gasgeschwindigkeit in einem Rohr kann wiederum aus Parametern des Hagen-Poiseuille'schen Gesetzes erfolgen. Den größten Einfluss hat hierbei der Innendurchmesser der Kapillare. Allerdings ist eine Verwendung größerer Innendurchmesser durch das Aurora Fusion A5 SFC-Modul nur eingeschränkt möglich. Der hohe Gasstrom muss somit nach der Restriktionskapillare und vor dem Eintritt in die Ionisationszone gebremst werden. Die Geschwindigkeitsreduktion sollte hierbei erfolgen, ohne dass durch gasdynamische Effekte (z. B. Diffusion in der Expansionszone) Analytverluste auftreten.

Hierfür bietet sich das Erweitern der Austrittskapillare durch eine Kapillarkopplung mit größeren Innendurchmessern an. Dies lässt sich in einfacher Weise über einen Kapillarsäulenverbinder im GC-Ofen (vgl. **k** in Abbildung 3.51), also vor dem Durchführen der Kapillare durch die Transferline, realisieren. Durch die zusätzliche Kapillare wird die Restriktionsstrecke um etwa 330 mm (benötigte Kapillarlänge zum Durchführen durch die GC-Transferline) verlängert und somit der Volumenfluss verringert. Die Änderung des Volumenstroms ist jedoch sehr gering und vernachlässigbar klein.

Zur Optimierung der Austrittserweiterung wurden fs-Kapillaren mit Innendurchmessern von 180, 250 und 530 μm verwendet. Für die Kopplung zweier Kapillarsäulen gibt es kommerziell erhältliche Verbindungsstücke. Zur Kopplung der 50 μm -ID fs-Restriktionskapillare mit Kapillaren, deren ID $\leq 250 \mu\text{m}$ ist, wurde ein totvolumenfreier Metallverbinder der Fa. SGE (MVSU Mini-Union) und für Kopplungen mit 530 μm ID-Kapillaren ein deaktivierter Universalverbinder (Universal Prestight Connector) aus Glas der Fa. CS-Chromatographie, bei dem die Kapillaren mit Polyimid-Kleber verfestigt wurden, genutzt. Beide Verbindertypen sind in Abbildung 3.55 gezeigt.



Abbildung 3.55: Desaktivierte Verbindertypen für fs-Kapillaren
a: Metallverbinder der Fa. SGE (nicht im Bild: Dichtungsferrules)
b: Kapillarverbinder aus Glas der Fa. CS-Chromatographie

In Abbildung 3.56 sind Chromatogramme dargestellt, die mit unterschiedlichen Austrittsdurchmessern der Restriktionskapillare erhalten wurden. Alle Analysen wurden mit der selben Lösung des PAK-Mix 31 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$) in das SFC-System injiziert und unter identischen Bedingungen chromatographiert. Geändert wurde jeweils die Kopplung der Restriktionskapillare und der Austrittskapillare im GC-Ofen.

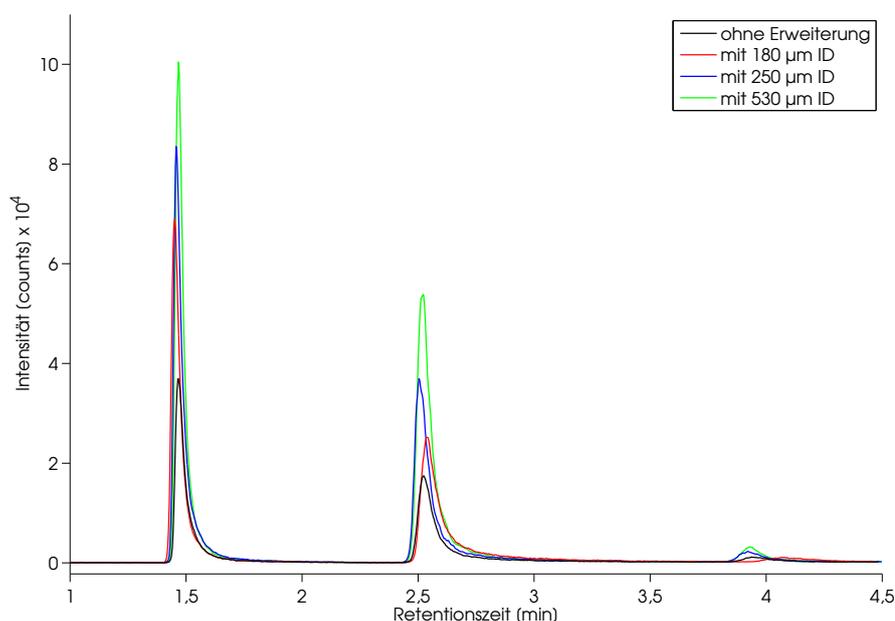


Abbildung 3.56: SFC-APLI-Analysen von PAK-Mix 31 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$ in ACN/H₂O 80%/20%). Dargestellt sind die summierten EIC der d-PAK-*m/z*-Verhältnisse für Phenanthren-d10 (ca. 1,5 min), Chrysen-d12 (ca. 2,5 min) und Perylen-d12 (ca. 3,9 min). Für die Analysen wurde der ID der Restriktionskapillare auf einer Länge von 33 cm auf dem Weg zum MS variiert. — Trennparameter in Kapitel 6.3.3

Das erhaltene Chromatogramm ohne eine zusätzliche Erweiterung der Restriktionskapillare (schwarze Linie) kann als Ausgangspunkt angesehen werden. Durch die Erweiterung mit 180 μm (rote Linie), 250 μm (blaue Linie) bzw. 530 μm (grüne Linie) ID-Kapillaren wird die Signalintensität und die erhaltene Peakfläche um etwa einen Faktor 2 bis 3 erhöht. In der gleichen Größenordnung steigt auch das S/N , da die Analytsignale größer werden, das Signalrauschen dabei aber konstant bleibt. Eine Peakverbreiterung wird hier nicht beobachtet. Aufgrund der Turbulenz und der schnellen Strömung in den Kapillarrohren, insbesondere in der Austrittskapillare, kann eine Peakverbreiterung auch nicht erwartet werden.

Somit kann durch die Erweiterungskapillare ein Gewinn an Empfindlichkeit erzielt werden. Dieser Gewinn verläuft jedoch nicht linear mit der berechneten reduzierten Geschwindigkeit des austretenden Gasstroms. Dies lässt sich einerseits dadurch begründen, dass diese Berechnungen auf mehreren Annahmen bezüglich des Hagen-Poiseuille'schen Gesetzes beruhen, die im Vorfeld bereits als Näherung angenommen wurden. Andererseits deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass hier ein sehr komplexes System vorliegt, für dessen Beschreibung eine einfache Berechnung der Austrittsgeschwindigkeit über den Kapillarquerschnitt und den Volumenfluss nicht ausreichend ist. Für die meisten der nachfolgenden Ergebnisse wurde das SFC-System jeweils mit einer solchen Kapillarerweiterung betrieben.

3.4.4.2 Einfluss der Restriktionskapillarlänge

Um die Analytmenge zu erhöhen, die die Ionisationszone erreicht, wurde neben der Erweiterung des Innendurchmessers der Restriktionskapillare und der zusätzlichen Austrittskapillare auch die Länge der Restriktionskapillare optimiert. Hierbei muss unter anderem berücksichtigt werden, dass – in Analogie zum maximalen ID der Restriktionskapillare – die Länge der Restriktionsstrecke einen Einfluss auf die Stabilität und Arbeitsweise des BPR-Ventils besitzt. Die Länge der Restriktionsstrecke muss so gewählt werden, dass der vom BPR aufrecht zu haltene Druck konstant ist und nicht dazu führt, dass das Gerät eine Sicherheitsabschaltung durchführt. Der Einfluss der Kapillarlänge auf den Volumenfluss geht nach Gleichung 3.3 nur reziprok ein, sodass hier ein genügend großes Potential zur Verbesserung gegeben ist. Weiterhin führt eine Verschiebung des Splitverhältnisses durch eine kürzere Kapillare dazu, dass eine zusätzliche Menge des Eluats in die Ionisationsquelle ausströmt und die bereits beschriebenen Vorteile durch das Aufweiten der Restriktionskapillare etwas reduziert werden, da der Volumenfluss und dadurch die Strömungsgeschwindigkeit des Eluats steigt.

Um die minimale Länge der Restriktionskapillare zu bestimmen, die gleichzeitig eine Stabilität des Aurora-Moduls gewährleistet, wurde die 50 μm ID fs-Kapillare ausgehend von einer Länge von 1250 mm in Vorversuchen sukzessive gekürzt. Bei diesen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine minimale Länge von 600 mm benötigt wird, um eine sofortige Fehlermeldung auszuschließen. Unter diesen Bedingungen zeigt das System allerdings ein stark schwankendes Signal des Systemdrucks, sodass für weitere Versuche eine minimale Länge von 750 mm gewählt wurde. Der Einfluss verschiedener Kapillarlängen (1250 mm, 1000 mm und 750 mm) auf die Signalintensität der Analyten in PAK-Mix 31 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$) ist in Abbildung 3.57 dargestellt. Für die chromatographischen Analysen wurde jeweils dieselbe Analytlösung injiziert und die Restriktionskapillare nach einem Analysenlauf um jeweils 250 mm gekürzt.

In guter Übereinstimmung mit den Annahmen werden die Signalintensitäten und Peakflächen mit abnehmender Kapillarlänge um etwa 50 bis 70 % erhöht. Diese Zunahme ist – durch das Vergrößern der Peaks bei gleichzeitig konstantem Rauschen – auch für das S/N zu beobachten. Für eine Abschätzung der Korrelation zwischen den erhaltenen Werten und den Gasflussmengen werden in Tabelle 3.9 die relativen Peakflächen des Analyten Phenanthren-d10 mit einem normierten Splitverhältnis der Gasflüsse durch die Restriktionskapillare und dem BPR-Ventil verglichen. Die zugrunde liegenden Gasflüsse wurden aufgrund einer besseren Zugänglichkeit am SFC-FID-System gemessen.

Obwohl die zugrunde liegenden Werte für die Gasflüsse – bedingt durch das verwendete Messgerät³⁴ – nicht mit hoher Genauigkeit bestimmt werden konnten³⁵ und die Strömungs-

³⁴ Agilent ADM 1000 Flow Meter

³⁵ Die Schwankungsbreite des angezeigten Messwerts betrug bei hohen Flussraten ± 10 bis 20 %. Der Volumenfluss wurde deshalb approximiert und gerundet verwendet, da hier vielmehr das Verhältnis der Gasflüsse zueinander ausschlaggebend ist und nicht der exakte Volumenfluss.

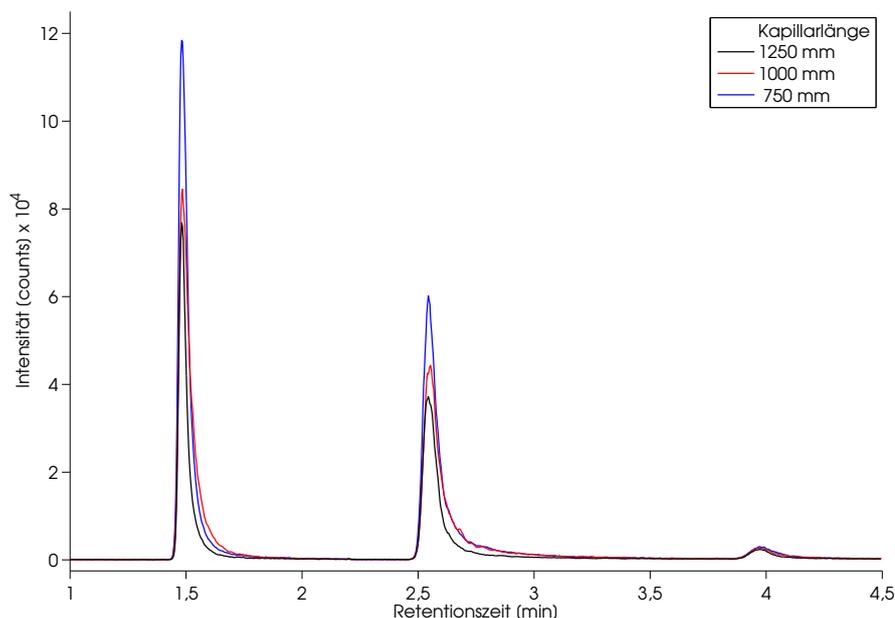


Abbildung 3.57: SFC-APLI-Analysen von PAK-Mix 31 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$ in ACN/H₂O 80%/20%). Dargestellt sind die summierten EIC der d-PAK-*m/z*-Verhältnisse für Phenanthren-d10 (ca. 1,5 min), Chrysen-d12 (ca. 2,5 min) und Perylen-d12 (ca. 3,9 min).

Für die Analysen wurde die Länge der Restriktionsstrecke um jeweils 250 mm auf dem Weg zum MS gekürzt. — Trennparameter in Kapitel 6.3.3

Tabelle 3.9: Berechnetes Splitverhältnis und relative Peakflächen in Abhängigkeit der Restriktionskapillarlänge

	Kapillarlänge [mm]		
	1250	1000	750
rel. Peakfläche Phenanthren-d10	1	1,3	1,7
normiertes Splitverhältnis	1	1,2	1,7

geschwindigkeit leicht erhöht ist, kann anhand der Zahlen belegt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den Gasflüssen bzw. dem daraus resultierenden Splitverhältnis und der Signalintensität besteht und die Restriktionskapillarlänge einen direkten Einfluss auf das Splitverhältnis und somit die Analytmenge hat, die die Ionenquelle erreicht.

3.4.4.3 Einfluss der Ofen- und Transferlinietemperatur

Aus den erwähnten Vorversuchen mit einer gleichartigen SFC-FID-Kopplung ist eine Abhängigkeit der Peakform und der im Detektor registrierten Analytmenge von der Temperatur

der Restriktionskapillare bzw. der Ofentemperatur bekannt. Für diese Vorversuche wurden unverdünnte, flüssige Alkane von C_6 bis C_{16} mit der SFC über eine Normalphase getrennt und analog zur beschriebenen Kopplung über eine fs-Restriktionskapillare aus einem T-Stück vor dem BPR in einen GC-Ofen geführt. Die fs-Kapillare wurde dort direkt mit dem FID verbunden und das Detektorsignal aufgezeichnet.

Unter identischen chromatographischen Bedingungen konnte so bei einer konstanten Ofentemperatur von $50\text{ }^\circ\text{C}$ ein von der C-Kettenlänge bzw. dem Dampfdruck der Analyten abhängiges Verhalten registriert werden. Hexan erreicht den Detektor als schmaler, intensiver Peak. Die Symmetrie der Peaks nimmt ab Octan bereits ab; die länger-kettigen Alkane bilden entweder breite Doppelpeaks oder sehr breite und flache Peaks. Durch Erhöhen der GC-Ofentemperatur von $50\text{ }^\circ\text{C}$ auf $300\text{ }^\circ\text{C}$ in Schritten von $50\text{ }^\circ\text{C}$ ändert sich die Peakform und die Intensität der Signale. Das Intensitätsmaximum konnte hier bei einer Temperatur von $200\text{ }^\circ\text{C}$ erreicht werden. Bei höherer Temperatur wurden die Signalintensität und die Peakfläche des Hexadecans zunehmend kleiner.

Dieses Verhalten ist durch eine Wechselwirkung zwischen dem Dampfdruck des jeweiligen Analyten und dem vorherrschenden Druck in der Restriktionskapillare zu erklären. Das CO_2 als Eluent erreicht die Restriktionskapillare – abhängig von der Temperatur – entweder in superkritischem oder flüssigem Zustand. Durch den auf der Restriktionsstrecke konstant abfallenden Druck ändert sich der Aggregatzustand des Eluenten bis hin zum Gas. Die Analyten liegen mehr oder weniger ebenfalls gasförmig vor (abhängig vom Analytdampfdruck). Bei hochsiedenden Analyten reicht eine Temperatur von $50\text{ }^\circ\text{C}$ nicht aus, um sie als definierten, chromatographischen Peak zum Detektor zu überführen. Diese Analyten unterliegen entweder einer Peakverbreiterung oder sie kondensieren in der Restriktionsstrecke aus und erreichen den Detektor nicht mehr. Durch Erhöhen der GC-Ofentemperatur nach einem Analysenlauf und dem dadurch erfolgten Remobilisieren der kondensierten Analyten konnte dies bestätigt werden.

Die Verringerung der Signalintensität bei sehr hoher Ofentemperatur ist eine Folge der Temperaturabhängigkeit der Gasviskosität. Diese nimmt – im Gegensatz zur Viskosität von Flüssigkeiten – mit steigender Temperatur zu [83, 249, 250]. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (Gleichung 3.3) bedeutet ein Anstieg der Gasviskosität, dass der Volumenfluss durch die Restriktionskapillare geringer wird. Hierdurch wird das Splitverhältnis am T-Stück ungünstig verändert. Als Folge dessen werden die Peakflächen und Signalintensitäten nach Überschreiten einer optimalen Temperatur wieder kleiner.

Übertragen auf die SFC-APLI ist dieses Verhalten besonders auch von den PAK zu erwarten. Im Gegensatz zu den Alkanen aus den Vorversuchen liegen die PAK bei Raumtemperatur als Feststoffe vor und haben einen vergleichsweise kleinen Dampfdruck. Um den Einfluss der GC-Ofentemperatur qualitativ bewerten zu können, wurden bei verschiedenen Ofen- und Transferlinetemperaturen³⁶ ($100, 150, 200$ und $250\text{ }^\circ\text{C}$) SFC-Analysen des PAK-Mix 31 ($\beta = 50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) unter den in Kapitel 6.3.3 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Chromato-

³⁶die GC-Transferline wurde mit einem Offset von $+ 5\text{ }^\circ\text{C}$ betrieben

gramme (EIC) für a) Phenanthren-d10 (m/z 188,0 \pm 0,5), b) Chrysen-d12 (m/z 240,0 \pm 0,5) und c) Perylen-d12 (m/z 264,0 \pm 0,5) sind in Abhängigkeit von der gewählten Ofen- und Transferlinietemperatur in Abbildung 3.58 dargestellt.

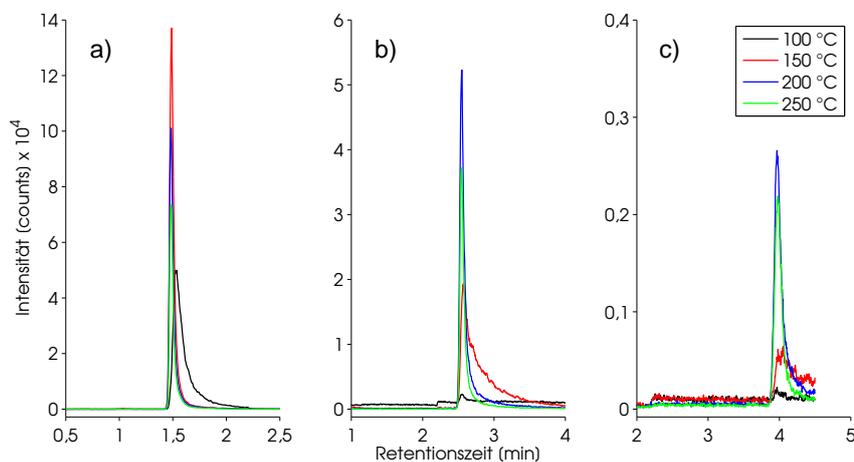


Abbildung 3.58: SFC-APLI-Analysen von PAK-Mix 31 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$ in ACN/H₂O (80%/20%)) unter dem Einfluss verschiedener Ofen-/Transferlinietemperaturen auf die einzelnen Analyten. Dargestellt sind die EIC für a) Phenanthren-d10 (m/z 188,0 \pm 0,5), b) Chrysen-d12 (m/z 240,0 \pm 0,5) und c) Perylen-d12 (m/z 264,0 \pm 0,5) — Trennparameter in Kapitel 6.3.3

Bei einer Ofentemperatur von 100 °C kann nur Phenanthren-d10 als Peak identifiziert werden. Diese Verbindung hat von den drei Analyten den niedrigsten Siedepunkt bzw. den höchsten Dampfdruck. Die relativ niedrige Temperatur ist allerdings noch nicht ausreichend, um die Substanz in genügendem Maße in die Gasphase zu überführen, was zu einem starken Peak-tailing führt. Besonders der Übergang zwischen den beiden Teilen der Restriktionskapillare (Verbindung von 50 μm ID zur Erweiterungskapillare mit 530 μm) wird als Folge der dort stattfindenden Expansion relativ kalt, was nur mit einer entsprechend hohen Ofentemperatur korrigiert werden kann.

Chrysen-d12 und Perylen-d12 erreichen die Ionenquelle als schlanker Peak erst nach dem Erhöhen der Ofentemperatur auf mindestens 200 °C. Unterhalb dieser Temperatur kondensieren beide Substanzen nahezu vollständig aus. Für beide kann die Dampfdruckabhängigkeit besonders – bei einer Ofentemperatur von 150 °C – demonstriert werden. Chrysen-d12 weist bei dieser Temperatur, wie Phenanthren-d10 bei 100 °C, ein Tailing auf. Perylen-d12 kann bei 150 °C nur annähernd als Peak erkannt werden.

Wie bei den beschriebenen Vorversuchen werden die Signalintensitäten und Peakflächen nach dem Überschreiten einer analytabhängigen, optimalen Ofentemperatur wieder kleiner. Das Maximum für das Phenanthren-d10-Signal liegt bei einer Ofentemperatur von ca. 150 °C. Chrysen-d12 und Perylen-d12 liefern erst bei 200 °C die jeweils intensivsten Signale. Für die SFC-APLI-Analysen muss demnach in Abhängigkeit der Analytdampfdrücke eine optimale

GC-Ofentemperatur gefunden werden, um maximale Signalintensitäten zu erreichen. Sinnvoller als die Bestimmung einer gemeinsamen optimalen Temperatur ist ein Temperaturgradient im GC-Ofen. Dies wurde aus Zeitgründen in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.4.4.4 Einfluss des Verdampfergases und des Sheathgasflusses

Neben den bisher beschriebenen Optimierungen, die alle das Restriktionssystem betreffen, haben auch Parameter der Ionenquelle einen Einfluss auf die Sensitivität der SFC-APLI-Kopplung. Die auf dem Sprayshield und der Kapillarkappe des Massenspektrometers anliegenden Potentiale wurden aus den Messungen mit der GC-APLI-Kopplung übernommen. Wie bei der GC-APLI wurde auch für die SFC-Kopplung kein Drygas verwendet. Als einflussreiche Variablen für die Sensitivität gelten der Sheathgasfluss aus der Transferline und das Verdampfergas. Aus der GC-APLI ist bekannt, dass dem Sheathgas eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung des GC-Trägergases zukommt. Da aber die Gasmenge, die aus der Restriktionskapillare in die Ionenquelle strömt, etwa 100-fach größer als in der GC ist, ist das Ausströmverhalten fundamental verschieden von dem der GC-Kopplung. Die Geometrie dieser Strömung wurde bereits in Kapitel 3.4.4.1 erläutert. Das austretende Eluat der SFC ist ein klar definierter, strikter Gasstrahl, der nicht nennenswert aufgeweitet wird (vgl. Abbildung 3.54 auf Seite 98). Die Gasflussgeschwindigkeiten sind extrem hoch, sodass der Strahl sehr stabil gegenüber äußeren Einflüssen ist. Ein stabilisierender Effekt des Sheathgases ist für die SFC-Kopplung weder anzunehmen noch nötig. Um die Abhängigkeit des Sheathgasflusses abzubilden, wurde bei identischen Analysen der Sheathgasvolumenstrom zwischen $0,25$ und $1,50 \text{ L min}^{-1}$ in Schritten von $0,25 \text{ L min}^{-1}$ variiert. Das Diagramm in Abbildung 3.59 zeigt die ermittelten Peakflächen für Phenanthren-d10 aus der Analyse des PAK-Mix 31 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$) in Abhängigkeit des Sheathgasflusses.

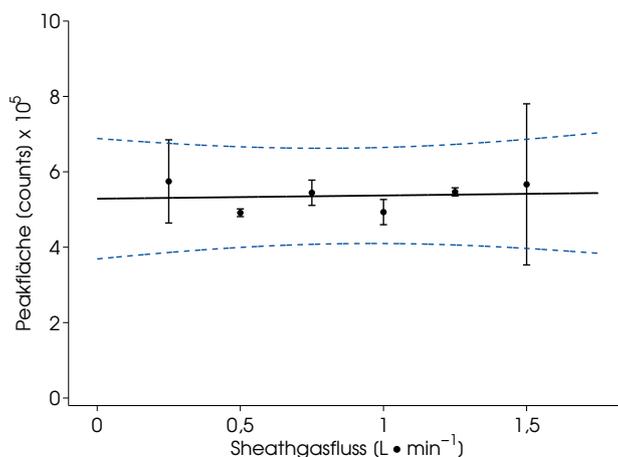


Abbildung 3.59: Peakfläche des Phenanthren-d10-Peaks in Abhängigkeit des Sheathgasflusses bei SFC-APLI

Die Peakflächen zeigen keine signifikante Abhängigkeit vom Sheathgasfluss zwischen 0,25 und 1,50 L min⁻¹. Im Rahmen ihrer Fehlergrenzen können die Peakflächen als konstant angesehen werden, da die Steigung der Ausgleichsfunktion (einem Polynom erster Ordnung) kleiner als 2% ist. Alle weiteren den Chromatogrammen zu entnehmenden analytischen Parameter wie S/N, Peakform usw. sind ebenfalls im betrachteten Bereich konstant.

Die in eine AP-Ionisationsquelle eingeleiteten Gase wie Drygas, Verdampfergas oder Sheathgas haben einerseits die bereits beschriebenen Funktionen. Andererseits ermöglichen diese Gasflüsse einen Ausgleich der Gasbilanz in der Ionenquelle (zum Aufrechterhalten des Atmosphärendrucks) und sorgen bei einem Überangebot dafür, dass das Badgas der Ionenquelle durch kontinuierlichen Austausch *sauber* gehalten wird. Eine Kontamination mit eingesaugter Labor- oder Abluft wird dadurch vermieden. Die Menge des zugeführten Gases ist jedoch ein kritischer Parameter beim Betrieb einer AP-Ionisationsquelle. Zu starke Gasflüsse können im Falle einer ungünstigen Gasdynamik dazu führen, dass bspw. ein Neutralanalytstrom verdünnt oder so stark verwirbelt wird, dass die Ionisationsausbeute geringer ist und dadurch der Analyt mit einer schlechteren Empfindlichkeit detektiert wird. In der GC-APLI wird zum Ausgleich der Gasmengen in der Ionenquelle über den Verdampfer ein Gasstrom zugeführt, dessen Einfluss auf das Analyseergebnis bisher nicht näher untersucht ist. Die ersten Experimente mit SFC-APLI wurden aus den genannten Gründen ebenfalls mit einem Verdampfergasstrom durchgeführt. Für die SFC-APLI wurde im Verlauf der Versuchsreihen zur Maximierung der Analytsignalintensitäten eine Abhängigkeit vom Verdampfergasstrom untersucht.

Das Verdampfergas wird dabei über die Steuerungssoftware des Massenspektrometers eingestellt³⁷ und geregelt. Soft- und hardwareseitig lässt sich das Verdampfergas nicht über das Volumen, sondern über den an der Verdampfernadel anliegenden Druck regeln. In der Verdampfernadel bzw. an deren Spitze umströmt das Verdampfergas die ansonsten flüssigkeitsführende Stahlkapillare und tritt zusammen mit ihr aus der Spitze dieses Bauteils aus. Die Positionierung der Kapillare ist infolgedessen ausschlaggebend für den anliegenden Druck bzw. für ein bei gegebenem Druck resultierendes, austretendes Gasvolumen. Die exakte Position der Kapillare kann nur nach Augenmaß bestimmt werden, wodurch eine reproduzierbare und genaue Kenntnis der Gasmenge nicht vorliegt. Die Position der Kapillare unterliegt zudem einer Variation über die Temperatur der Verdampfereinheit. Desweiteren ergibt sich eine Abhängigkeit der Positionierung der Kapillare durch den Anwender, der die Installation durchführt.

Die Abhängigkeit der Signalintensität mehrerer Analyten aus PAK-Mix 31 vom Verdampfungssystem bei SFC-APLI ist in Abbildung 3.60a dargestellt. Für die Analysen wurde der an der Verdampfernadel anliegende N₂-Druck zwischen 0 und 3,6 bar in 1,2 bar-Schritten variiert. Die eingesetzte Analytlösung ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$) wurde dabei konstant gehalten. Abgebildet sind die summierten EIC für Phenanthren-d10 ($m/z 188,0 \pm 0,5$), Chrysen-d12 ($m/z 240,0 \pm 0,5$) und Perylen-d12 ($m/z 264,0 \pm 0,5$).

³⁷der Parametername hierfür ist *Vap.Gas*

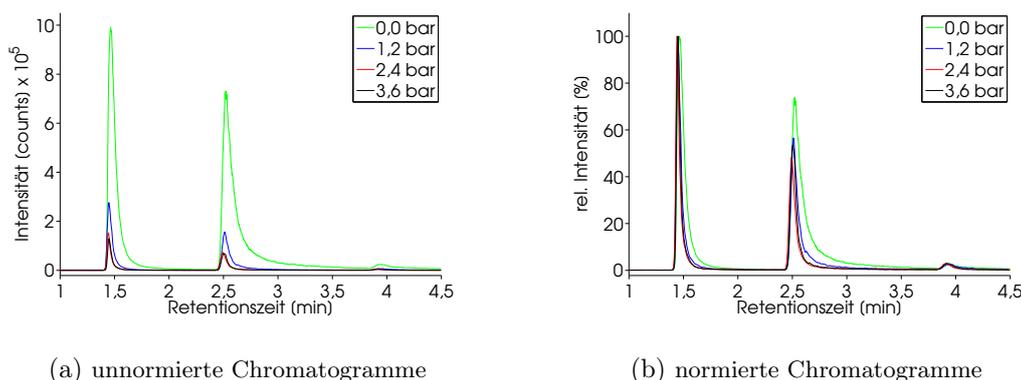


Abbildung 3.60: SFC-APLI-Chromatogramme von PAK-Mix 31 ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$ in ACN/H₂O (80%/20%)) bei Variation der anliegenden Gasdrücke an der Verdampfernadel.

Die Chromatogramme in (a) und (b) unterscheiden sich durch ihre Skalierung: Bei (b) wurden die Signalintensitäten normiert.

(a) dient einem Vergleich der absoluten Signalintensitäten und (b) einem Vergleich der Peakformen. Dargestellt sind die summierten EIC der d-PAK-*m/z*-Verhältnisse für Phenanthren-d10, Chrysen-d12 und Perylen-d12. — Trennparameter in Kapitel 6.3.3

Die erhaltenen Chromatogramme zeigen eine signifikante Abhängigkeit der Signalintensität vom Gasdruck am Verdampfer bzw. der durch den Verdampfer bereitgestellten Gasmenge. Der Volumenfluss des Verdampfergases beträgt mit der gegebenen Positionierung der Stahlkapillare bei 3,6 bar etwa 8 L min^{-1} mit Temperierung des Gasstroms³⁸. Eine weitere Abhängigkeit vom Verdampfergasstrom zeigt die Peakform. Abbildung 3.60b (Chromatogramme mit normierten Signalintensitäten) verdeutlicht, dass mit gesteigerten Verdampfergasströmen das Tailing der Analytsignale verringert wird.

Bei kleineren Gasströmen durch den Verdampfer tritt eine Verbreiterung der Peaks in Folge des schlechteren Austausches des Badgases auf. Hierdurch wird die Umgebung der Ionisationszone nicht genügend vom Neutralanalyten gereinigt, sodass dieser mit einer zeitlichen Verzögerung wieder zurück in die Ionisationszone und von dort ins Massenspektrometer gelangt. Mit steigendem Gasfluss und Gasaustausch lässt sich zwar die Peakform verbessern, jedoch sinkt dadurch die Signalintensität (bei konstantem Signal-zu-Rauschverhältnis).

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der Verdampfergasstrom einen großen Einfluss sowohl auf die Peakform als auch auf die Signalintensität hat und ermöglicht dadurch zwei Optionen zur Analyse mittels SFC-APLI: Für eine nachweisempfindlichere Analyse einzelner Analyten sollte der Gasstrom aus dem Verdampfer verringert werden, um ein maximales Analytsignal zu erhalten. Für chromatographisch anspruchsvolle Fragestellungen, bei denen eine möglichst effiziente Trennung der einzelnen Substanzen notwendig ist, sollte ein leichter bis mittlerer Verdampfergasstrom gewählt werden. Hierdurch wird die Peakkapazität und Auflösung der chromatographischen Trennung erhöht.

³⁸die Bestimmung des Volumens erfolgte durch Bilanzierung aller Gasflüsse der Ionenquelle

3.4.5 Vergleich der SFC-APLI mit HPLC-APLI

Zur Einordnung der analytischen Leistungsfähigkeit der optimierten SFC-APLI-Kopplung bietet sich ein Vergleich zu den bereits bestehenden Kopplungen der APLI-(TOF)MS an chromatographische Systeme an. Hierbei ist ein Vergleich der Nachweisgrenzen und chromatographischer Parameter wie der Peakbreite nützlich. Einhergehend mit der Untersuchung der Nachweisgrenzen lassen sich Aussagen über die Linearität und die Reproduzierbarkeit sowohl der erhaltenen Peakflächen als auch der Retentionszeiten treffen. Ein Vergleich der Analysenzeiten für identische analytische Fragestellungen ist besonders hinsichtlich der Verfahrenseffizienz ebenfalls sinnvoll.

3.4.5.1 SFC-APLI für die Trennung komplexer PAK-Mischungen

Eine besondere Stärke der SFC besteht in der effizienten Trennung komplexer PAK-Mischungen bei gleichzeitig kurzen Analysenzeiten. HEATON *et. al.* beschreiben beispielsweise eine PAK-Trennung mit optimierten Elutions-, Säulentemperatur- und den Systemdruckgradienten in etwa 6 min [129]. Eine solche Trennung stellt einen Spezialfall hinsichtlich der Analysenzeit dar und kann mit dem Agilent 1260 Infinity SFC-System nicht realisiert werden, da ein Gradient des Systemdrucks am BPR nicht programmierbar ist. Das in Abbildung 3.61 dargestellte Chromatogramm zeigt eine typische SFC-Analyse einer komplexen PAK-Mischung (deuterierte EPA-Mischung, PAK-Mix 9)³⁹ mit einem Elutionsgradienten bei einer konstanten Säulentemperatur von 60 °C. Lediglich zwei Peakpaare (Phenanthren / Anthracen bei etwa 2,9 min und Benzo[*b*]fluoranthren / Benzo[*k*]fluoranthren bei etwa 7,3 min) weisen unter diesen Bedingungen keine ausreichende Basislinientrennung auf.

Diese nahezu vollständige Trennung der EPA-PAK-Mischung mittels SFC-APLI kann in einer Analysenzeit von etwa 11 Minuten erreicht werden. Zusätzlich werden ca. 2 Minuten für die Reequilibrierung der Trennsäule benötigt. Nach insgesamt 13 Minuten kann die nächste Injektion erfolgen. Unter optimierten Bedingungen kann mit derselben Säule eine umfangreiche Trennung der EPA-PAK-Mischung in ca. 26 Minuten (mit Reequilibrierung 33 Minuten) mittels HPLC realisiert werden⁴⁰.

Allerdings konnte für alle Peaks der optimierten HPLC-APLI-Analyse eine Basislinientrennung erreicht werden. Bei der SFC-APLI sind die angesprochenen geringen Defizite der Trennung auf die chromatographischen Bedingungen zurückzuführen und somit nur von der Trennsäule, der mobilen Phase usw. abhängig. Diese Parameter haben keinen Einfluss auf die Detektion mittels APLI-MS. Sie können bei weiteren Optimierungsarbeiten für die SFC verändert werden und dadurch die Trennleistung für kritische Substanzen verbessern. Für viele Trennprobleme der HPLC sind bereits gleiche oder bessere Trennergebnisse mit der SFC erzielt

³⁹siehe Tab. 7.2.3 in Kap. 7.2.3

⁴⁰Die Gesamtanalysenzeit ist somit bei der SFC-APLI um etwa 60 % geringer als bei der HPLC. Die chromatographischen Bedingungen der HPLC-Analyse wurden hierfür in Anlehnung an die Vorgaben des Säulenherstellers gewählt

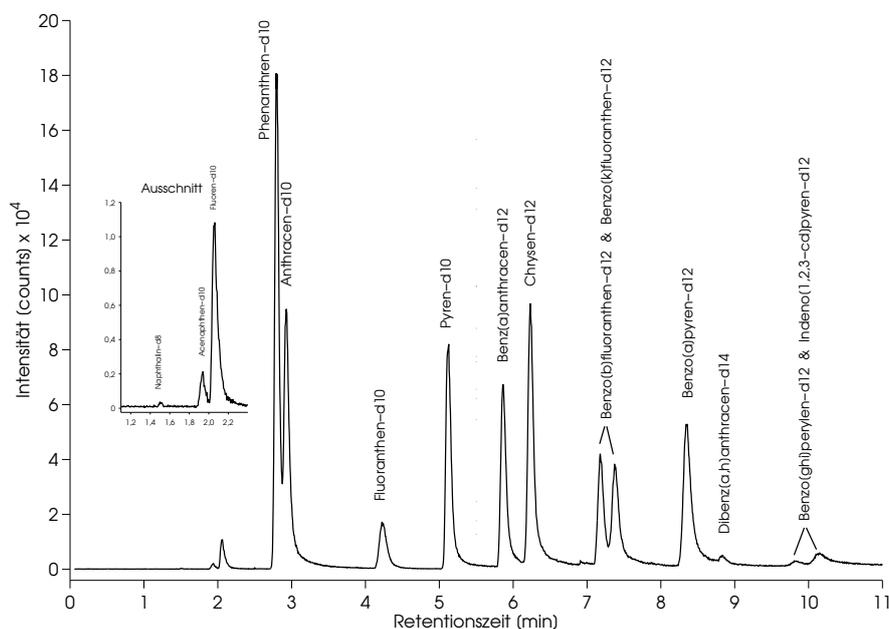


Abbildung 3.61: Typisches Chromatogramm einer SFC-APLI-Analyse einer komplexen, deuterierten PAK-Mischung mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g L}^{-1}$ in Acetonitril. Die Trennung erfolgte mit einem Elutionsgradienten bei einer Säulentemperatur von 60°C — Trennparameter in Kapitel 6.3.4

worden [251]. Tabelle 3.10 gibt einen ersten Überblick über die Peakhalbwertsbreite (FWHM) ausgewählter Substanzen aus der Trennung einer PAK-Mischung für die SFC- und HPLC-APLI.

Tabelle 3.10: Vergleich der Peakhalbwertsbreiten bei SFC- und HPLC-APLI.

Für die Analysen wurden jeweils optimierte Bedingungen gewählt. Die Bestimmung der FWHM erfolgte bei der SFC-APLI aus den Daten einer Analyse einer d-PAK-Mischung mit einer Konzentration von $\beta = 10 \mu\text{g L}^{-1}$. Bei HPLC-APLI stammen die Daten aus der Analyse einer nicht-deuterierten PAK-Mischung ($\beta = 4 \mu\text{g L}^{-1}$) — Trennparameter in Kapitel 6.3.4 (SFC-APLI) und Kapitel 6.2.3 (HPLC-APLI)

Substanz	Peakhalbwertsbreite [s]	
	SFC	HPLC
Pyren	4,7	9,1
Chrysen	4,8	8,5
Benzo[a]pyren	6,7	12,1

In allen Fällen sind die Peaks der SFC deutlich schmaler als bei der HPLC. Bei beiden Verfahren können weitere Optimierungen erfolgen. Aus den erhaltenen Daten kann aber bereits

abgeleitet werden, dass die SFC deutlich schmalere Peaks und somit höhere Trennstufenzahlen – auch in der Kombination mit APLI-MS – liefert.

3.4.5.2 Vergleich der Nachweisgrenzen verschiedener PAK mit SFC-, HPLC- und GC-APLI

Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung eines analytischen Verfahrens ist die Nachweisgrenze (vgl. Kapitel 3.3.1). Mithilfe der Nachweisgrenze für einen Analyten lässt sich im Vorfeld beurteilen, ob ein definiertes Verfahren zur Analyse genutzt werden kann oder nicht. Dies ist bspw. interessant für Analysen, bei denen gesetzlich festgelegte Höchstgehalte für spezielle Analyten (z. B. Benzo[a]pyren in Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen [252]) bestimmt werden müssen und keine festgeschriebene Analysenmethode benutzt werden muss. Ebenso können Nachweisgrenzen dazu dienen, unterschiedliche Verfahren für die Bestimmung eines oder mehrerer Analyten miteinander zu vergleichen. In Tabelle 3.11 sind die ermittelten Nachweisgrenzen für eine Reihe von PAK mit den verschiedenen APLI-Kopplungen gegenübergestellt. Die Berechnung der Nachweisgrenzen erfolgte in Anlehnung an das 3s-Konzept nach KAISER und SPECKER [210, 211]. Die dazu benötigten Signal-zu-Rauschverhältnisse wurden mithilfe der MS-Auswertesoftware DataAnalysis bestimmt und gemittelt ($n = 3$). Für die Daten wurden jeweils unterschiedlich konzentrierte komplexe PAK-Mischungen chromatographisch getrennt. Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte dann für Peaks mit S/N -Werten ≤ 25 .

Die Daten für die Nachweisgrenzen insbesondere für SFC- und HPLC-APLI liegen jeweils in der gleichen Größenordnung. Die GC-Daten sind um eine bis zwei Größenordnungen niedriger. Die Gründe hierfür sind ein effizientes Zusammenspiel von Fluid- und Elektrodynamik beim Transport der Ionen ins Massenspektrometer. Zudem erfolgt die Elution der Analyten in der GC mit einer sehr viel kleineren Peakbreite, wodurch die Analyten lokal sehr viel konzentrierter vorliegen und dadurch empfindlicher analysiert werden können.

Für die SFC sind nahezu alle PAK mit identischen Nachweisgrenzen detektierbar. Nur bei den größeren PAK werden erhöhte Nachweisgrenzen erhalten. Hier ist ein Einfluss der GC-Ofen- und Transferlinientemperatur bemerkbar. Wie in Kapitel 3.4.4.3 beschrieben, besteht eine signifikante Abhängigkeit zwischen der Ofentemperatur und der Signalintensität besonders für die hochsiedenden PAK bei konstanter Temperatur. Im Vergleich zur HPLC-APLI können besonders die kleineren PAK sensitiver analysiert werden. Für beide Methoden wurden identische MS-Parameter gewählt. Der Unterschied der Nachweisgrenzen verschiedener PAK bei der HPLC-APLI ist dadurch auf die Variation der Einlassgeometrie zurückzuführen. Das Signalrauschen auf den einzelnen Massenspuren ist bei der SFC-APLI generell relativ gering. Bei der HPLC-APLI werden oftmals aufgrund der vorhandenen ionisierbaren Verunreinigungen im Badgas der Ionenquelle erhöhte und stark rauschende Basislinien erhalten, was zu einer Verringerung des S/N führt. Substanzen, die zudem einen geringeren Absorptionsquerschnitt aufweisen (z. B. Fluoranthen gegenüber dem Pyren), können dann trotz gleicher Ringanzahl und Molekülmasse weniger empfindlich analysiert werden.

Tabelle 3.11: Vergleich der Nachweisgrenzen für verschiedene PAK bei HPLC-, GC- und SFC-APLI

	SFC [$\mu\text{g L}^{-1}$]	HPLC [$\mu\text{g L}^{-1}$]	GC [$\mu\text{g L}^{-1}$]
Naphthalin	1,00	n.b.	0,010*
Acenaphthen	n.b.	n.b.	0,025*
Fluoren	0,09	0,86	0,025*
Phenanthren	0,02	0,27	n.b.
Anthracen	0,06	0,38	0,0025*
Fluoranthren	0,12	1,70	0,005*
Pyren	0,03	0,22	0,002*
Benzo[c]fluoren	n.b.	n.b.	0,010
Benz[a]anthracen	0,02	0,10	0,100
Chrysen	0,02	0,08	0,0005*
5-Methylchrysen	n.b.	n.b.	0,010
Benzo[b]fluoranthren	0,06	0,06	n.b.
Benzo[k]fluoranthren	0,07	0,10	n.b.
Benzo[a]pyren	0,08	0,15	0,015*
Dibenzo[a,h]anthracen	0,68	0,09	0,050
Benzo[ghi]perylen	4,05	0,18	0,030
Indeno[1,2,3-cd]pyren	1,99	0,26	0,200
Dibenzo[a,l]pyren	n.b.	n.b.	0,020

* : Angabe für die perdeuterierte Verbindung

Die Nachweisgrenzen der SFC-APLI liegen bereits in großen Teilen unterhalb derer der HPLC und können durch weitere Optimierungsarbeiten, bspw. durch vollständiges Überführen (ohne ein Splitting am T-Stück) des Eluats in die Ionenquelle, nochmals verringert werden. Für die HPLC ist eine Optimierung mit der gegebenen Ionenquellengeometrie nur noch bedingt realisierbar. Hier wird die Signalintensität hauptsächlich durch die Fluid- und Elektrodynamik bestimmt, die für einzelne Analyten aber nicht pauschal verbessert werden können.

3.4.5.3 Linearität und Empfindlichkeit der SFC- und HPLC-APLI

Neben dem Nachweisvermögen, das die untere Grenze der mit einem analytischen Verfahren bestimmbaren Konzentration eines Analyten darstellt, ist eine Kenntnis über das Verhalten bei höheren Konzentrationen nötig, um ein solches Verfahren umfassender beschreiben zu können. Für ein genaues Verfahren ist ein linearer oder in irgendeiner Art proportionaler Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem Messsignal wünschenswert. In einem solchen idealen Fall kann eine quantitative Bestimmung durch eine externe Kalibration erfolgen. Dabei ist ein großer Bereich mit linearem Verhalten des Detektors notwendig, um auch große Konzentrationen eines Analyten bestimmen zu können. Im Allgemeinen stößt das Mess-

signal jedoch aufgrund einer Übersättigung des Detektors ab einer bestimmten Konzentration an einen Grenzwert, an dem eine Proportionalität nicht mehr gegeben ist.

Abbildung 3.62 zeigt zwei Diagramme für den linearen Bereich der (a) SFC- und (b) HPLC-APLI über einen Konzentrationsbereich von jeweils drei bis vier Größenordnungen ab dem Bereich der Nachweisgrenze am Beispiel von Chrysen ohne Berücksichtigung der Probenvorbereitung. Für die dargestellten Werte wurden fünf unterschiedlich konzentrierte PAK-Standardlösungen ($0,05$ bis $50 \mu\text{g L}^{-1}$ bei SFC und $0,16$ bis $100 \mu\text{g L}^{-1}$ bei HPLC) analysiert und die arithmetischen Mittel der Peakflächen von Chrysen ($n = 3$) gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen.

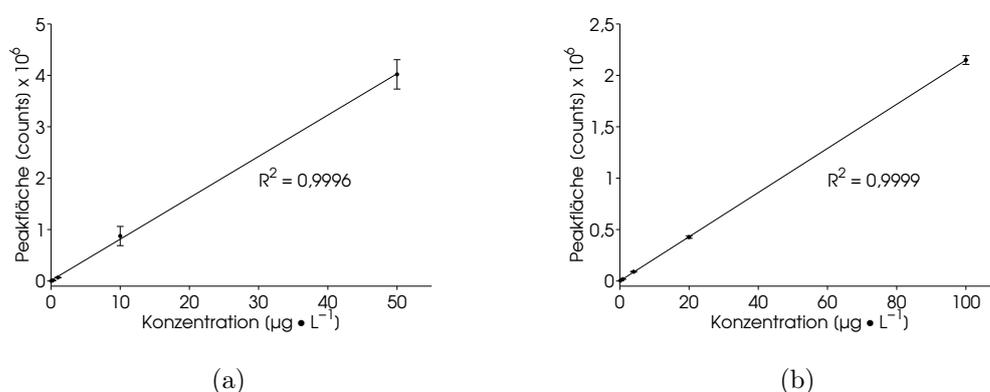


Abbildung 3.62: Vergleich der Linearität bei (a) SFC-APLI und (b) HPLC-APLI am Beispiel von Chrysen aus PAK-Mix 14. Für beide Datensätze gilt $m = 5$ und $n = 3$

Die Koeffizienten der erhaltenen Regressionsgeraden ($y=m \cdot x+b$) wurden im Falle der SFC mit $m = 80\,452 \text{ counts} \cdot \text{L} \mu\text{g}^{-1}$ und $b = 8665 \text{ counts}$ und für die HPLC mit $m = 21\,476 \text{ counts} \cdot \text{L} \mu\text{g}^{-1}$ und $b = 959 \text{ counts}$ bestimmt. Aus diesen Daten kann abgeleitet werden, dass die SFC-APLI etwa vierfach empfindlicher ist als die HPLC-APLI. Die Steigerung der Empfindlichkeit ist besonders auf die gewählte Versuchsanordnung zurückzuführen. Der direkte Weg der Ionen bei der Anordnung der SFC ist, wie bereits die Erfahrungen mit der GC-APLI zeigen, viel effizienter als die Ionisation aus dem großen Verteilungsvolumen der Neutralanalyten bei der HPLC.

3.4.5.4 Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und Peakflächen

Neben der idealer Weise wiederholbaren Bestimmung der Peakfläche ist im Routinebetrieb eine reproduzierbare Bestimmung der Retentionszeiten vor allem im Hinblick auf automatisierte Auswertungen sehr wichtig. Während Abweichungen der Retentionszeit hauptsächlich auf das chromatographische System zurückzuführen sind, hängt die Größe der Peakflächen zum Teil vom Detektionssystem und zum Teil vom Injektionssystem des Trennsystems ab. Bei einem Massenspektrometer beeinflusst einerseits die Detektionseinheit selbst (SEV, MCP usw.), andererseits die vorhergehenden Teile des Systems wie die Ionenerzeugung, der Ionen-

transport und die Massenseparation unter Umständen die Anzahl detektierter Ionen. Die zur Analyse auf die Trennsäule aufgegebene Menge an Analyt variiert z. B. bei einer manuellen Injektion mit einem 6-Wege-Ventil stärker als in einem automatisierten System. Besonders betroffen von einer manuellen Bedienung des Injektionsventils ist die Retentionszeit, da die Uhr des Detektionssystems ebenfalls nur manuell mit dem Injektionszeitpunkt synchronisiert werden kann.

Die genannten Parameter können als Kennzahlen für den Vergleich zweier chromatographischer Systeme dienen. Für einen solchen Vergleich wurden die relativen Standardabweichungen der Peakflächen und der Retentionszeiten des Chrysen signals aus den SFC- und HPLC-APLI-Analysen einer komplexen PAK-Mischung ausgewertet. Die Ergebnisse der Fünffachbestimmung sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst.

Tabelle 3.12: Vergleich der relativen Standardabweichungen ($n = 5$) für die Peakfläche und die Retentionszeit von Chrysen mittels SFC- und HPLC-APLI

	relative Standardabweichung	
	Retentionszeit	Peakfläche
SFC	0,13 %	3,55 %
HPLC	0,71 %	7,98 %

Das Infinity 1260 SFC-System arbeitet im Gegensatz zur benutzten HPLC-Anlage mit einem automatisierten Injektionssystem. Hier wird sowohl das Befüllen der festen Probenschleife als auch der Injektionsvorgang computergestützt durchgeführt und der Startzeitpunkt mit dem Massenspektrometer synchronisiert. Die Injektion bei der HPLC erfolgt hingegen in klassischer Arbeitsweise durch das Befüllen der Probenschleife mithilfe einer Spritze, Schalten des 6-Wege-Ventils und möglichst gleichzeitigem Starten des Gradientenprogramms und der Datenaufzeichnung des Massenspektrometers. Die erhaltenen Werte der relativen Standardabweichung für die Retentionszeit machen den Unterschied zwischen den beiden Systemen deutlich. Die automatisierte Injektion der SFC liefert etwa fünfmal kleinere Abweichungen der Retentionszeit. Die erhaltenen Peakflächen variieren bei der manuellen Injektion der HPLC etwa doppelt so stark wie bei der SFC. Insgesamt liefert das an die APLI-(TOF)MS angeschlossene SFC-System deutlich reproduzierbarere Ergebnisse als die HPLC-Anlage. Eine generelle Aussage zur Reproduzierbarkeit der jeweiligen chromatographischen Methode ist aufgrund dieser Unterschiede schwierig.

3.4.6 Quantifizierung von PAK in Muschelgewebe

Mit der Kopplung von SFC und APLI sollen nun repräsentative Applikationen erarbeitet werden, um das Anwendungspotential der Methode zu demonstrieren. Hierfür wurden zwei Beispiele aus dem *LifeScience*-Bereich gewählt. Dieses und das folgende Kapitel beschreiben

die Quantifizierung ausgewählter PAK in einer Muschelmatrix sowie die Bestimmung des Biomarkers 1-Hydroxypyren (1-HP) in humanem Urin. Bei der Bestimmung des 1-Hydroxypyrens wird hierbei zusätzlich ein Fokus auf den Vergleich zur HPLC und zuvor erfolgten Bestimmungen mittels GC-APLI gelegt.

Für die Quantifizierung von PAK in Muscheln wurde die in Abbildung 3.38 vorgestellte Extraktionsmethode QuEChERS genutzt. Das zu extrahierende Muschelfleisch wurde hierfür mit einem internen deuterierten PAK-Standard versetzt, nach der in Kapitel 6.7.1 angegebenen Methode extrahiert und zur Analyse mittels SFC-APLI eingesetzt. Abbildung 3.63 zeigt ausgewählte PAK-Massenspuren aus einem typischen SFC-Chromatogramm des zertifizierten Muscheltgewebes NIST SRM1974b⁴¹ [234]. Die dargestellten Chromatogramme zeigen a) das Gesamtionenchromatogramm sowie die extrahierten Ionenchromatogramme für b) m/z 178 (bspw. für Phenanthren usw.), c) m/z 228 (z. B. für Chrysen), d) m/z 252 (u. a. B[a]P oder Perylen) und e) die Summe der m/z -Verhältnisse der zur Quantifizierung genutzten deuterierten Verbindungen Phenanthren-d10 (m/z 188), Chrysen-d12 (m/z 240) und Perylen-d12 (m/z 264), jeweils mit $m/z \pm 0,5$.

Das verwendete Muscheltgewebe wurde aus der Gattung der Miesmuscheln⁴² gewonnen. Über Ringversuche wurden von NIST unter anderem die Massengehalte verschiedener PAK ermittelt und zertifiziert. Zusätzlich zu den zertifizierten Gehalten sind Referenzgehalte diverser weiterer PAK angegeben. Mithilfe der zertifizierten Gehalte ist eine direkte Aussage über die Genauigkeit der SFC-Analyse möglich.

Für die Auswertung und die Bestimmung der PAK-Gehalte wurden die erhaltenen Peakflächen von Phenanthren + Anthracen⁴³, Chrysen und Perylen in Relation zu den Peakflächen der deuterierten Analoga aus PAK-Mix 31 gesetzt. In Tabelle 3.13 sind die Ergebnisse dieser Dreifachbestimmung zusammen mit den zertifizierten Massengehalten dieser Verbindungen angegeben.

Die Identifikation der zur Quantifizierung gewählten Substanzen erfolgte über den internen Standard (PAK-Mix 31). Die Quantifizierung kann hier nur für Substanzen erfolgen, die im internen Standard enthalten sind, da die Absorptionseigenschaften der PAK voneinander deutlich verschieden sind und keine Responsefaktoren für die verbleibenden Substanzen bestimmt wurden. Der Einsatz eines komplexeren, internen deuterierten Standards (bspw. eines deuterierten EPA-PAK-Mixes) wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Das Chromatogramm zeigt, dass von den Verbindungen mit kleiner Molekülmasse (u. a. Naphthalin oder Anthracen) sehr viele isomere, teilweise alkylierte Verbindungen detektiert werden können (vgl. a) in Abbildung 3.63). Besonders in diesen Bereichen reicht die Trennleistung des Systems nicht aus, um basisliniengrenzte Peaks zu erhalten, die eine Bestimmung der

⁴¹zertifiziertes Referenzmaterial vom NIST, Gaithersburg, MA, USA

⁴²speziell der Art *mytilus edulis* (blaue Miesmuschel)

⁴³Bestimmung in Summe aufgrund des nicht ausreichenden Auflösungsvermögens (vgl. Abb. 3.63 b))

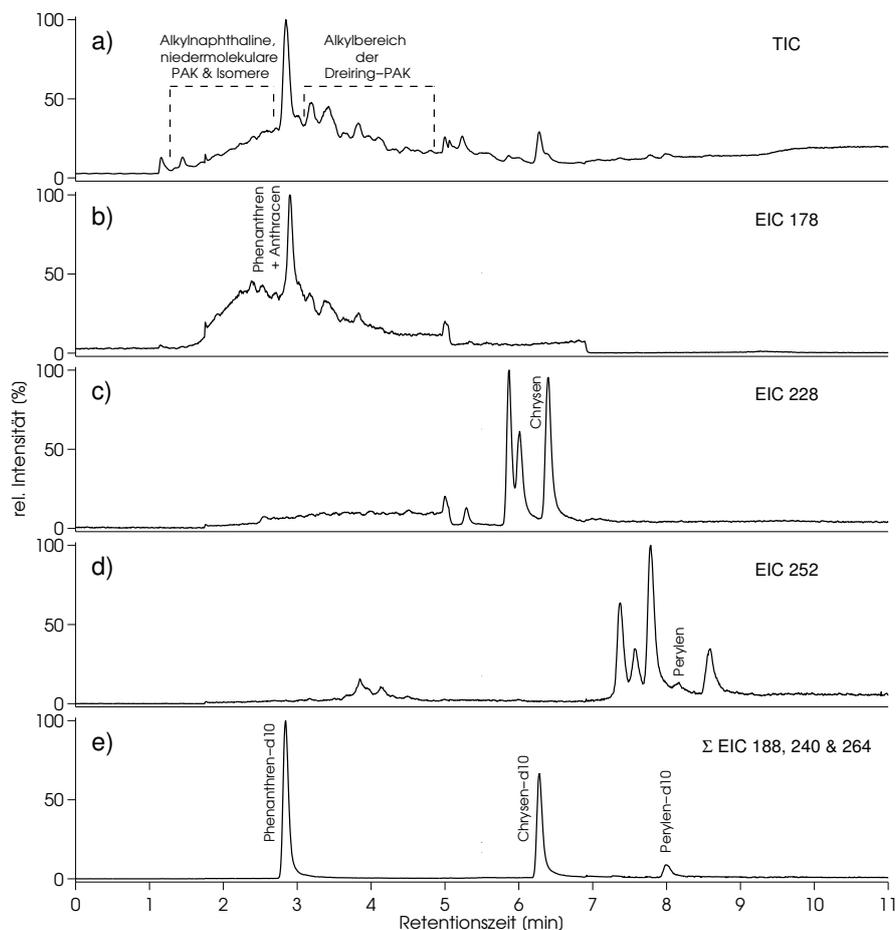


Abbildung 3.63: Typisches SFC-APLI-Chromatogramm des mittels QuEChERS extrahierten NIST Referenzmaterials SRM1974b (*mytilus edulis*). Abgebildet sind a) das TIC sowie ausgewählte EIC (jeweils $m/z \pm 0,5$) relevanter PAK-Massenspuren: b) m/z 178 für z. B. Phenanthren, Anthracen usw., c) m/z 228 (u. a. Chrysen), d) m/z 252 (bspw. Perylen, B[a]P usw.). e) zeigt die summierten EIC der zu Quantifizierung eingesetzten deuterierten Standards Phenanthren-d10 (m/z 188), Chrysen-d12 (m/z 240) und Perylen-d12 (m/z 264). — Trennparameter in Kapitel 6.3.4

Peakfläche einer einzelnen Verbindung ermöglicht. Aus diesem Grund erfolgt die Quantifizierung nur für die o. g. Verbindungen und nicht zusätzlich für Naphthalin und Acenaphthen, die ebenfalls Bestandteil des internen Standards sind. Die ermittelten Gehalte liegen alle im Bereich der Zertifizierung und zeigen, dass die SFC-APLI grundsätzlich zur Quantifizierung von PAK geeignet ist.

Tabelle 3.13: Vergleich der mit SFC-APLI ermittelten Konzentrationen ausgewählter PAK im *mytilus edulis*-Referenzmaterial (NIST 1974 b) mit zertifizierten Konzentrationsangaben [234]
 Die Daten wurden mithilfe eingesetzter interner deuterierter PAK-Standards ermittelt. Das Referenzmaterial wurde mit der QuEChERS-Extraktionsmethode extrahiert. — Extraktionsbedingungen und Trennparameter in Kapitel 6.7.1 und 6.3.4

Substanz	ermittelter Massengehalt $\mu\text{g kg}^{-1}$	zertifizierter Gehalt [234] $\mu\text{g kg}^{-1}$
Phenanthren + Anthracen	$3,23 \pm 0,43$	$3,11 \pm 0,18$
Chrysen	$6,27 \pm 0,31$	$6,3 \pm 1,0$
Perylen	$0,95 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,14$

3.4.7 Bestimmung von 1-Hydroxypyren mittels SFC-APLI

Als wichtiges Maß für die PAK-Exposition eines Menschen wurden bereits verschiedene PAK-Metaboliten untersucht [253, 254]. Die Anzahl möglicher Metabolite ist sehr groß, weil bspw. die bei Verbrennungen organischer Materie auftretenden PAK-Mischungen häufig aus über 100 verschiedenen PAK-Verbindungen und deren Isomeren bestehen [255, 256]. Als analytisch relevante Metaboliten gelten u. a. Mono- oder Polyhydroxyverbindungen der PAK. Für diverse Hydroxyphenanthren-, Hydroxybenzo[a]pyren- oder Hydroxychrysenisomere sowie 1-Hydroxypyren liegen bereits verschiedene Studien vor [253, 257, 258]. Bei B[a]P und Pyren ist eine gute Korrelation zwischen der Aufnahme und den über den Urin ausgeschiedenen Metaboliten bekannt [254, 259]. 1-HP, der Hauptmetabolit des Pyrens, gilt als exzellenter Biomarker und wird seit über 20 Jahren zu Untersuchungen von PAK-Expositionen herangezogen [253–255, 260]. Im Gegensatz zu B[a]P ist Pyren nicht kanzerogen [256, 257, 261] und somit seltener im Fokus der Diskussionen über PAK-Belastung und -Analytik. Die Wahl von 1-HP als Biomarker ist daher überraschend [260], aber dennoch verständlich. Der Körper bildet z. B. aus B[a]P über 20 Metabolite [256]. Zudem lieferten in den 1980er Jahren erfolgte Untersuchungen über B[a]P-Metabolite nur unzureichende Ergebnisse aufgrund von Limitierungen in den analytischen Verfahren. Die gebildeten (Poly-)Hydroxymetabolite der PAK werden i. A. hauptsächlich als Konjugate (z. B. Glucuronide) über den Faeces ausgeschieden. Eine Exkretion über den Urin erfolgt nur für wenige Metabolite [255]. 1-HP jedoch wird nahezu ausschließlich (zu etwa 90 %) in Form des Glucuronidaddukts über den Urin ausgeschieden, was eine Probennahme stark vereinfacht [254–256]. Die Ausscheidung von 1-HP als Glucuronidaddukt ist bereits seit den 1950er Jahren bekannt [262]. Pyren ist bedingt durch seine ausgeprägte Symmetrie einerseits ein thermodynamisch äußerst stabiles Molekül, was dazu führt, dass es allgemein zu großen Anteilen in nahezu jeder PAK-Mischung vorkommt. Darüber hinaus lässt die Rotationssymmetrie nur die Bildung eines einzigen Monohydroxyderivats zu, wodurch dessen Bildung unabhängig von individuellen genetisch bedingten Metabolismuszyklen ist. Bei anderen Verbindungen führt dies bspw. dazu, dass die diversen Metabolite von unterschiedlichen

Genotypen in abweichenden Verhältnissen gebildet werden. 1-HP kann somit als universeller Biomarker für eine PAK-Exposition herangezogen werden [260].

Zur Bestimmung der PAK-Metabolite werden in vielen Fällen die HPLC oder die GC in Kombination mit massenspektrometrischer Detektion eingesetzt. Neben der MS-Detektion wurden hierfür u. a. die elektrochemische Detektion sowie Fluoreszenz- und UV-Vis-Detektoren eingesetzt [253, 254, 259, 263, 264]. Die beiden bisher genutzten chromatographischen Trennverfahren zeigen dabei verschiedene Nachteile, insbesondere bei der Trennung der komplexen Metabolitmischungen. Gerade hochmolekulare Hydroxyverbindungen können aufgrund ihrer schlechten Verdampfbarkeit mithilfe der GC bspw. nur als Trimethylsilylderivate analysiert werden. Eine solche Derivatisierung ist für eine HPLC-Trennung nicht notwendig, jedoch ist hier die Trenneffizienz verglichen mit der GC eher gering [253]. In allen Fällen erfolgt die Bestimmung von 1-HP im Urin mit vorhergehender enzymatischer oder saurer Hydrolyse der Glucuronidaddukte. Nach der Spaltung liegen die Hydroxyverbindungen frei vor und können analysiert werden [265]. In dieser Arbeit wird 1-HP zu Urin dotiert, weshalb eine glucuronidische Spaltung nicht notwendig war.

3.4.7.1 Bestimmung von 1-Hydroxypyren mit APLI-(TOF)MS

Die gaschromatographische Bestimmung von 1-HP mit APLI-(TOF)MS unterliegt ebenfalls einer Limitierung. Zwar ist es SCHIEWEK gelungen, 1-Hydroxypyren in Urin zu bestimmen, jedoch musste dazu die Hydroxyfunktion zunächst zu einen Trimethylsilyl- oder Methylether umgesetzt werden, um die Empfindlichkeit in einen für die Urinanalytik interessanten Bereich zu steigern. Eine Detektion von underivatisiertem 1-HP war nicht möglich [68]. Vermutet wird, dass Gasphasenreaktionen mit Wasser zu einer Abstraktion des aciden Protons der Hydroxyfunktion führen und das gebildete Radikalkation dadurch die Ladung verliert und es einer Detektion nicht länger zugänglich ist [68].

Dem gegenüber steht die grundsätzliche Möglichkeit, 1-HP in größeren Konzentrationen mittels HPLC-APLI unter Anwesenheit von Wasser im Eluenten als Radikalkation nachzuweisen. Allerdings erfolgt auch hier eine Reduzierung des Analytsignals durch eine Gasphasenreaktion. Sowohl per Direktinjektion als auch mit vorgeschalteter HPLC-Trennung tritt eine Fragmentbildung bei 1-HP auf. Das erhaltene APLI-Massenspektrum während der Elution von 1-HP nach erfolgter Trennung mittels HPLC ist in Abbildung 3.64 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die vermehrte Bildung des Fragmentsignals bei m/z 189,1, dessen Bildung durch Silylierung des 1-Hydroxypyrens unterdrückt werden kann. Durch die Bildung des Fragments wird das Gesamtsignal auf der Massenspur des Hydroxypyrens (m/z 218,1) um etwa 65% vermindert. Hierdurch sinkt das Nachweisvermögen. Diese Fragmentierungsreaktion kann unter Umständen auf eine Gasphasenreaktion zurückgeführt werden.

Das erhaltene Fragment ist für die massenspektrometrische Analyse von 1-HP mit EI bereits bekannt⁴⁴. Der in der EI-MS zur Fragmentbildung führende Mechanismus kann von der Gas-

⁴⁴Zum Vergleich kann hier ein Referenzmassenspektrum der NIST EI-MS-Datenbank (z. B. [266]) herangezogen

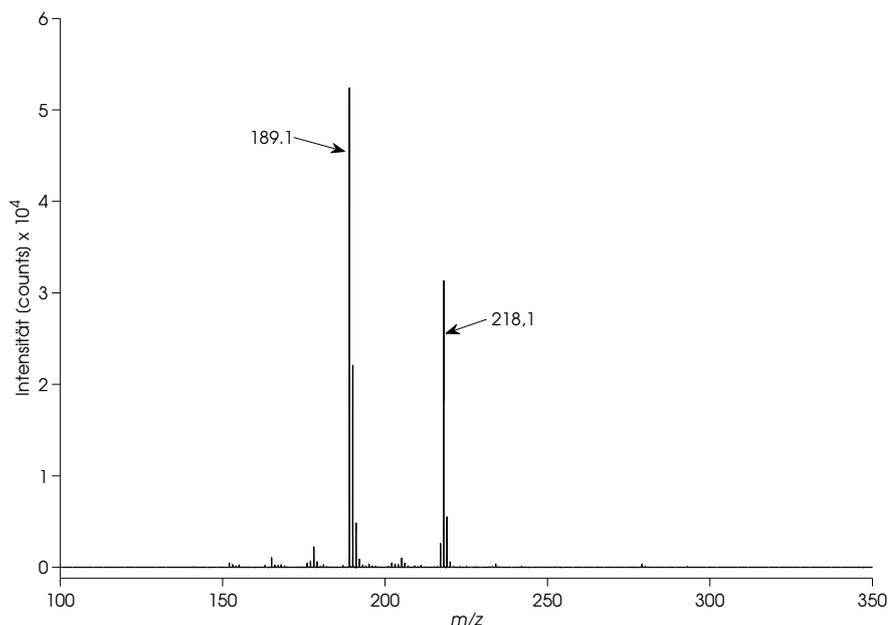


Abbildung 3.64: HPLC-APLI-Massenspektrum des 1-HP-Peaks ($\beta = 1 \text{ mg L}^{-1}$, Injektionsvolumen $5 \mu\text{L}$)

phaseneliminierung der CO-Gruppe des Phenols mit nachfolgender Abspaltung eines Wasserstoffatoms unter Bildung eines thermodynamisch stabilen Cyclopentadienylkations abgeleitet werden [267–270]. Einen analogen, auf 1-HP übertragenen Mechanismus zeigt Abbildung 3.65.

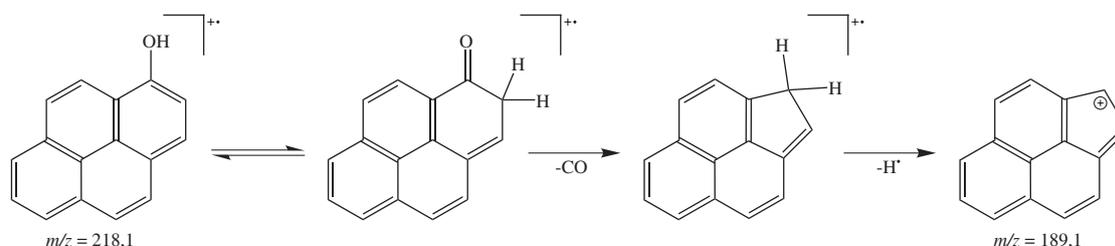


Abbildung 3.65: Von der CO-Abspaltung des Phenols bei der EI-MS abgeleiteter [267–270], möglicher Fragmentationsweg für 1-HP zur Bildung des Fragments mit dem m/z 189,1.

Die sogenannte *appearance energy*, also die Energie, die nötig ist, damit sich über einen genannten Reaktionsweg das Produkt (im Falle von Phenol das Cyclopentadienylkation) bildet, liegt für Phenol bei etwa $14,2 \text{ eV}$ [271]. Unter EI-Bedingungen steht dem Phenol für die Bildung des Cyclopentadienylkations genügend Energie zur Verfügung, sodass die Reaktion entsprechend ablaufen kann. Für 1-HP ist die *appearance energy* nicht bekannt. Es ist anzunehmen, dass sie in der gleichen Größenordnung liegt wie im Falle des Phenols. Hierbei würde sowohl die zugeführte Photonenenergie als auch die thermische Energie des Verdampfers nicht werden.

ausreichen, um den Reaktionsweg in Abbildung 3.65 unter AP-Bedingungen zu ermöglichen. Zur Bildung des Fragments m/z 189,1 müssen folglich weitere Faktoren wie Gasphasenreaktionen mit Wasser oder CID in der MS-Einlasstufe von 1-HP-Wasserclustern einen Einfluss auf die Fragmentbildung ausüben.

3.4.7.2 1-Hydroxypyren-Bestimmung mittels SFC- und HPLC-APLI

Das genannte Fragment tritt bei einer Trennung und Analyse mittels SFC-APLI-(TOF)MS nicht auf, wie das in Abbildung 3.66 dargestellte Massenspektrum eines 1-HP-Peaks der SFC-APLI zeigt. Im Gegensatz zur HPLC wird der Analyt hier ohne Wasser thermisch verdampft und liegt in einer nahezu reinen CO_2 -Umgebung vor. Bei beiden chromatographischen Verfahren enthält der Eluent Methanol. Zudem wird in beiden Fällen das Eluat vor der Ionisation thermisch belastet, sodass für die SFC-Analyse verglichen mit der HPLC anzunehmen ist, dass die Fragmentierung mit der Anwesenheit von Wasser zusammenhängt und unabhängig von anderen Einflüssen wie Methanolgehalt oder Temperatur ist. Dies ist neben der Geometrie der Ionenquelle der hauptsächliche Unterschied der beiden Verfahren.

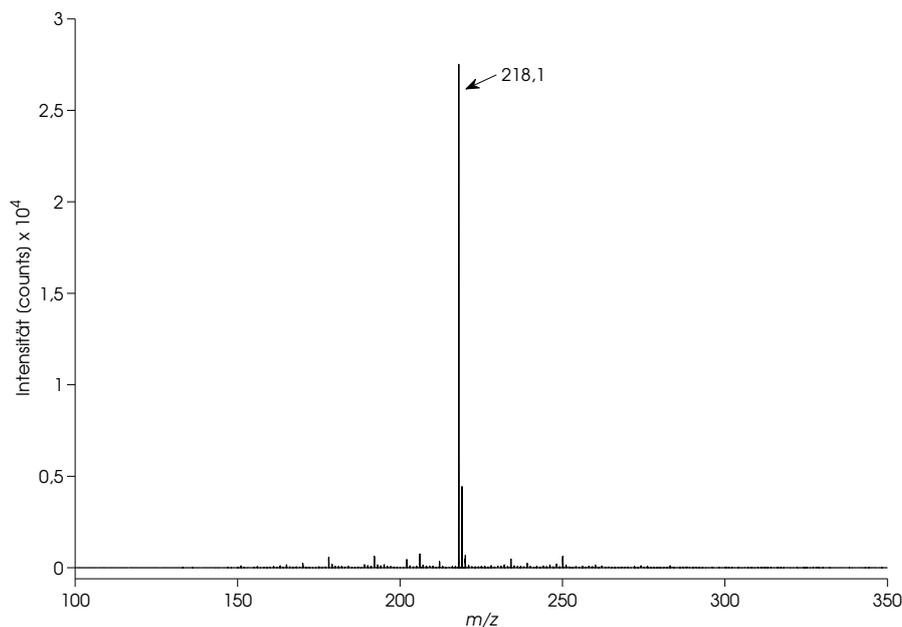


Abbildung 3.66: SFC-APLI-Massenspektrum des 1-HP-Peaks ($\beta = 0,2 \text{ mg L}^{-1}$, Injektionsvolumen $5 \mu\text{L}$)

Für die Analyse von 1-HP mit SFC-APLI zeigt sich dadurch ein Vorteil für das Nachweisvermögen, weil das Radikalkation der Zielsubstanz nicht durch Fragmentation verloren geht. Weiterhin wird das Nachweisvermögen dadurch gesteigert, dass mit der Kopplungsoption über die GC-Transferline eine optimale fluid- und elektrodynamische Umgebung geschaffen wurde.

Das gesteigerte Nachweisvermögen der SFC-APLI gegenüber der HPLC-APLI für 1-HP ist aus Abbildung 3.67 ersichtlich. Diese zeigt Chromatogramme (EIC: m/z 218,0 \pm 0,5) derselben 1-HP-Lösung ($\beta = 50 \mu\text{g L}^{-1}$ in Acetonitril) bei identischem Injektionsvolumen für die SFC-APLI (schwarze Linie) und die HPLC-APLI (rote Linie). Mit der SFC ist die Peakintensität etwa 25-fach und die Peakfläche knapp 50-fach größer als bei der HPLC. Über das 3s-Konzept⁴⁵ wurden mithilfe der Signal-zu-Rauschverhältnisse die Nachweisgrenzen beider Verfahren ermittelt und verglichen. Für die HPLC-Analyse konnte dabei eine Nachweisgrenze von $26,2 \mu\text{g L}^{-1}$ und für die SFC-Analyse von $0,44 \mu\text{g L}^{-1}$ erhalten werden.

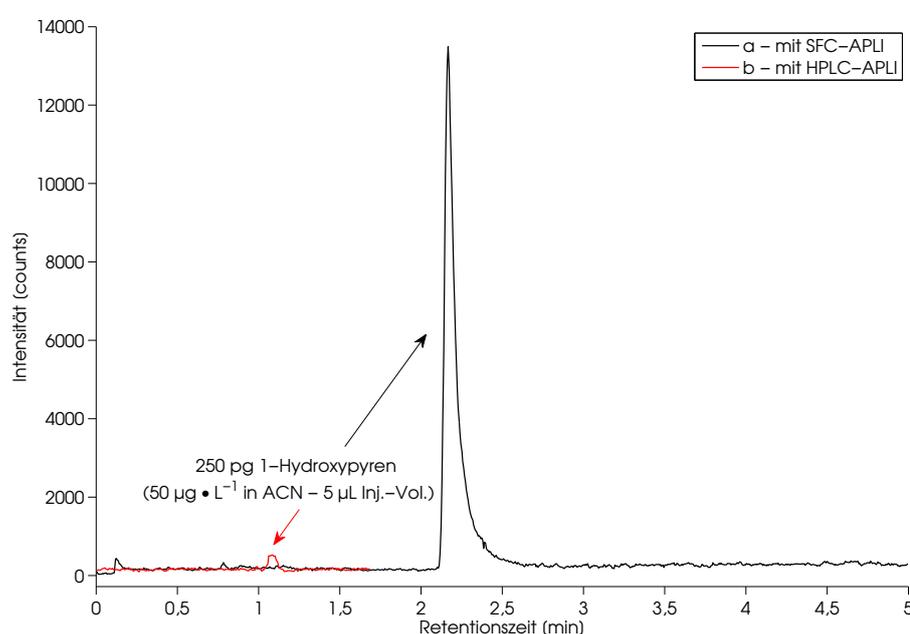


Abbildung 3.67: EIC (m/z 218,0 \pm 0,5) einer Analyse von 1-HP in ACN mit HPLC- (rote Linie) und SFC-APLI (schwarze Linie) — Trennparameter in Kapitel 6.2.6 (für HPLC-APLI) und in Kapitel 6.3.5 (für SFC-APLI)

Die mit SFC-APLI erhaltene Nachweisgrenze ermöglicht somit eine Analyse von 1-HP in einem Bereich, der zur Bestimmung einer PAK-Exposition geeignet ist. Unbelastete Probanden weisen 1-HP-Konzentrationen im Urin von $0,10$ bis $3,1 \mu\text{g L}^{-1}$ auf [254], die mit einer vorhergehenden Anreicherung über eine Festphasenextraktion sicher analysiert werden können. Ebenso sollte damit die Analyse von höheren urinären Konzentrationen – unter Umständen sogar ohne eine Anreicherung – gelingen. Zum Vergleich: Die urinäre 1-HP-Konzentration bei exponierten Mitarbeitern einer Firma für die Aluminiumproduktion liegt im Bereich von 2 bis $100 \mu\text{g L}^{-1}$ [254].

⁴⁵nach KAISER und SPECKER [210, 211]

3.4.7.3 Linearität des 1-Hydroxypyren-Signals bei SFC-APLI

Um eine aussagekräftige Analytik auf einen Biomarker durchführen zu können, ist besonders aufgrund der unterschiedlichen PAK-Belastung der Probanden sowie der damit einhergehenden natürlich schwankenden Konzentrationen eine Linearität über einen möglichst großen Konzentrationsbereich wichtig. Um einen solchen Bereich angeben zu können, wurden SFC-APLI-Analysen mit vier verschiedenen Konzentrationen einer 1-HP-Lösung in einem Bereich von 1 bis 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ durchgeführt und ausgewertet. Die erhaltenen arithmetischen Mittelwerte ($n = 3$) der ermittelten Peakflächen sind in Abbildung 3.68 in Abhängigkeit der Konzentration abgebildet.

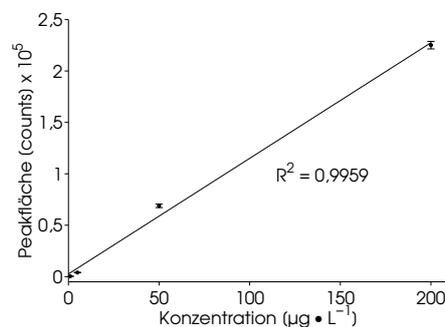


Abbildung 3.68: Linearität des 1-Hydroxypyrensignals bei SFC-APLI in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($m = 4$, $n = 3$).

3.4.7.4 Quantitative Bestimmung von 1-Hydroxypyren in Urin mittels SFC-APLI

Das Potential dieser Methode kann beispielhaft an einer mit 1-HP dotierten Urinprobe demonstriert werden. Hierzu wird dem gesammelten Urin ohne weitere Aufbereitung (d. h. keine Hydrolyse, Filtration o. ä.) eine Lösung von 1-Hydroxypyren in Acetonitril ($\beta = 1 \text{ mg L}^{-1}$) zudosiert, um eine Endkonzentration von 500 ng L^{-1} im Urin zu erhalten. Diese Konzentration liegt im unteren Bereich der 1-HP-Konzentrationen, die in [254] für nicht-exponierte Personen angegeben sind (0,10 bis 3,1 $\mu\text{g L}^{-1}$). Die dotierte und eine nicht-dotierte Urinprobe werden nach der in Kapitel 6.7.2 angegebenen Methode auf einer Festphase angereichert und in Acetonitril resuspendiert (Anreicherungsfaktor: $25/1,5 = 16,67$). Der Anreicherungsschritt wurde gewählt, um im gegebenen Kalibrationsbereich von 1,0 bis 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ arbeiten und quantifizieren zu können. Die erhaltenen Chromatogramme (EIC-Spuren für 1-HP, m/z 218,0 \pm 0,5) der dotierten (schwarze Linie) und der nicht-dotierten Urinprobe (rote Linie) sind in Abbildung 3.69 dargestellt. Die Retentionszeit für das 1-HP liegt unter den gewählten Bedingungen (siehe Kapitel 6.3.5) bei ca. 2,2 min. Abbildung 3.69 zeigt, dass selbst kleinere Konzentrationen mit diesem Verfahren bestimmt werden können.

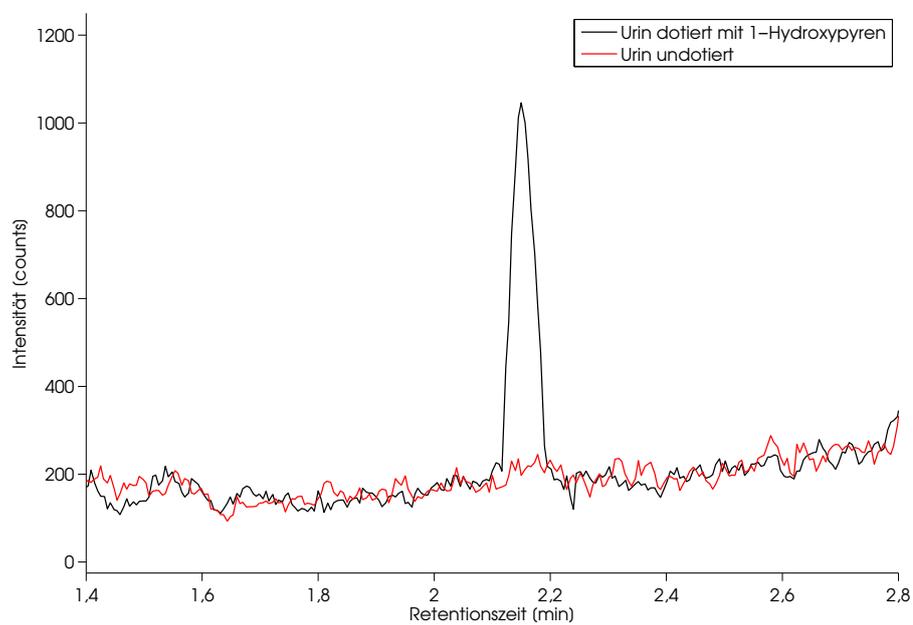


Abbildung 3.69: Vergleich der EIC m/z $218,0 \pm 0,5$ von dotiertem (schwarze Linie) und undotiertem (rote Linie) Urin zur Bestimmung von 1-Hydroxypyren — Trennparameter in Kapitel 6.3.5

4 Zusammenfassung

Als leistungsstarke Ionisationsmethode für die massenspektrometrische Analyse polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) kann die Laserionisation bei Atmosphärendruck (APLI) eingesetzt werden. Die Ionisation erfolgt dabei über eine resonanzverstärkte Multiphotonenionisation, einem sogenannten 1+1-REMPI-Prozess, der eine selektive Ionisation und dadurch eine sensitive Analyse ermöglicht. Seit der Einführung der APLI im Jahr 2005 wurden Kopplungen mit chromatographischen Systemen wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder der Gaschromatographie (GC) realisiert und erste Anwendungen demonstriert. Zur Erweiterung des Portfolios chromatographischer APLI-Kopplungen konnte mit der superkritischen Flüssigkeitschromatographie (SFC) ein neues System, die SFC-APLI-(TOF)MS, aufgebaut werden. Mit der neu entwickelten Kopplung wurden PAK im Gewebe der blauen Miesmuschel (*mytilus edulis*) über interne deuterierte Standards quantifiziert. Hierfür wurde das Muschelgewebe nach einem modifizierten QuEChERS-Protokoll extrahiert und ohne weitere Aufarbeitung oder Reinigung mittels SFC-APLI analysiert. Desweiteren ermöglicht die SFC-APLI-(TOF)MS eine einfache quantitative Bestimmung von 1-Hydroxypyren (1-HP) in Urin. 1-HP gilt als exzellenter urinärer Biomarker für PAK-Expositionen und kann mit der neuen Kopplung in relevanten Konzentrationen bestimmt werden. Die ermittelte Nachweisgrenze für 1-HP bei der Bestimmung mittels SFC-APLI-(TOF)MS beträgt $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ und liegt damit unterhalb der 1-HP-Konzentration, die im Urin exponierter Probanden gefunden wurde [254]. Zur Anreicherung von 1-HP und Abtrennung sehr polarer Urinbestandteile erfolgt eine einfache Extraktion mit einem C_{18} -Festphasenmaterial.

Zur Ionisation wird bei APLI ein festfrequenter KrF*-Excimerlaser mit einer Laserwellenlänge von $\lambda = 248 \text{ nm}$ genutzt. Solche Laser erzeugen hohe Kosten bei der Anschaffung und im Betrieb durch den oftmaligen Wechsel der sogenannten Premix-Gasmischung und durchzuführender Wartungsarbeiten. Als wartungsarme und kostengünstigere Alternative zum Excimerlaser kann ein frequenzvervierfacher diodengepumpter Festkörperlaser (DPSS-Laser) mit einem neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Kristall (Nd:YAG) als Lasermedium ($\lambda = 266 \text{ nm}$) eingesetzt werden, der zudem höhere Laserleistungsdichten erreicht. Der Einsatz des DPSS-Lasers kann für die Direktinfusions-, HPLC- und GC-APLI erfolgen. Das Laserstrahlprofil des DPSS-Lasers ist im Vergleich mit dem Profil des Excimerlasers deutlich kleiner. Hierdurch ergeben sich Kompromisse beim Nachweisvermögen, insbesondere bei HPLC-APLI. Aus der kleinen Beleuchtungsfläche resultiert eine signifikante Abhängigkeit von der Strahlposition im Quellenkörper, deren Ausrichtung auf ein gegebenes Analysenproblem optimiert werden muss. Die exakte Positionierung ist ebenfalls für eine optimale Nutzung der

GC-APLI notwendig. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsquerschnitte der Analyten für die verwendeten Laserwellenlängen ist ein direkter Vergleich von mit beiden Lasersystemen durchgeführten Analysen nicht möglich. Auch bei der Charakterisierung organischer Verbindungen zur Synthesekontrolle kann der DPSS-Laser eingesetzt werden und dabei mit dem Excimerlaser vergleichbare Ergebnisse erzielen.

Die zur Kopplung von APLI und weiteren Ionisationmethoden wie der Elektrosprayionisation (ESI) oder der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) mit chromatographischen Systemen und dem Massenspektrometer (MS) genutzte Multi-mode Ionisationsquelle (MPIS) kann durch die zusätzliche Verwendung von Heizelementen zur temperaturkontrollierten (TC)-MPIS erweitert werden. Das Temperieren der Ionenquelle erlaubt HPLC-Trennungen mit hohen Wasseranteilen im Eluenten ohne Defizite bei der Ionenausbeute durch Kondensation des Wassers. Weiterhin ermöglicht der Einsatz einer gerichteten Gasführung im Quellenkörper mit dem sogenannten *elevated floor* die Optimierung der Peakform und Peakbreite bei HPLC-APLI-(TOF)MS-Analysen.

Das bei Massenspektrometern zur Verringerung von Kontaminationen des Einlassbereichs durch Neutralanalyten genutzte Drygas führt bei GC-APLI-(TOF)MS zu einer signifikanten Reduktion der Analytsignalintensität. Das Drygas strömt dem GC-Eluat diametral entgegen und verdrängt den Neutralanalyten noch vor der Ionisation. Eine Änderung der Gasführung durch modifizierte und neu gestaltete Bauteile des MS-Einlasssystems führte zu geringfügigen Verbesserungen der Signalintensität bei Nutzung des Drygases. Mit den evaluierten Einlassgeometrien ist der Einsatz von Drygas mit Kompromissen möglich, ein vollwertiger Ersatz zum Verzicht auf dieses Gas kann jedoch nicht geleistet werden.

Nach der Theorie werden durch den Ionisationsmechanismus bei APLI ausschließlich Radikalkationen (M^+) gebildet. Die Ionisation erfolgt dabei sehr analytschonend und fragmentierungsarm. Kleine PAK bzw. besonders deren Alkylderivate erreichen den (TOF)MS-Detektor häufig als $[M-H]^+$. Komplexere Verbindungen wie z. B. durch APLI-Ionisationslabel zugängliche Verbindungen zeigen im Massenspektrum die Bildung signifikanter Anteile an Fragmenten. Durch *ab-initio*-Berechnungen und Experimente mit einem Ionenfallen-MS konnte gezeigt werden, dass sowohl die Bildung des $[M-H]^+$ als auch die Fragmentierung der derivatisierten Verbindungen auf kollisions-induzierter Dissoziation (CID) in der Ionenoptik des Flugzeit-MS zurückzuführen ist. Durch schonende Bedingungen bei der Ionenführung, wie sie beim verwendeten Ionenfallen-MS genutzt werden, kann die CID stark reduziert und die erwarteten Radikalkationen detektiert werden.

5 Abstract

Atmospheric-pressure laser ionization (APLI) is a powerful method for the mass-spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). The selective ionization is realized via a resonance-enhanced multi-photon ionization process and therefore makes possible a very sensitive analysis. APLI was presented in 2005 and has been hyphenated successfully to chromatographic separation techniques like high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). A number of applications have been demonstrated with these techniques. In order to expand the portfolio of chromatographic couplings to APLI, a new hyphenation setup of APLI and supercritical-fluid chromatography (SFC) was devised. With the new setup, PAH have been quantified in blue-mussel tissue (*mytilus edulis*) by means of internal deuterated standards. A modified QuEChERS protocol was used for extraction. The extract was analyzed by SFC-APLI without further purification or clean-up steps. SFC-APLI-(TOF)MS could also be used for a simple quantification of 1-hydroxypyrene (1-HP) in urine. 1-HP is an excellent and accepted urinary biomarker for PAH exposures and can be determined in relevant concentrations. The limit of detection for 1-HP by SFC-APLI-(TOF)MS was found to be $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, which is lower than the 1-HP concentrations found in exposed persons [254]. A simple extraction with a C_{18} -solid phase was used to concentrate 1-HP and separate it from the highly polar matrix.

In APLI, a fixed-frequency KrF*-excimer laser with a wavelength of $\lambda = 248 \text{ nm}$ is used for ionization. Purchasing and operating such lasers is cost-intensive, especially because the pre-mix gas needs to be replenished often and the laser system requires considerable maintenance. A cheaper and more readily maintained alternative to these laser systems is a quadrupled-frequency diode-pumped solid-state laser (DPSS laser) with a neodymium-doped yttrium-aluminum-garnet crystal as active laser medium ($\lambda = 266 \text{ nm}$); this provides a higher power density than the excimer-laser systems. Operating the DPSS laser allows analyses with either direct-infusion-, HPLC- or GC-APLI. The DPSS laser-beam is much narrower than the excimer beam and results in a loss of detection power, especially for HPLC-APLI. There is a significant dependency of the laser-beam position inside the source enclosure and the narrow laser beam, which therefore has to be well aligned for a given analysis. An exact position is needed for GC-APLI as well. Because absorption cross-sections are different for each analyte at a given laser wavelength, a direct comparison of analyses with the two laser systems is not possible. Excimer and DPSS lasers gave comparable results when used to characterize organic compounds for synthesis-control purposes.

For hyphenation of APLI and other ionization methods, e.g. electrospray ionization (ESI) or atmospheric-pressure chemical ionization (APCI), to chromatographic systems and a mass spectrometer (MS), a multi-purpose ion source (MPIS) is used; this was further upgraded to a temperature-controlled (TC)-MPIS by the addition of heating elements. Controlling the temperature of the source enclosure makes possible HPLC separations with an eluent containing a high percentage of water without a loss in ionization efficiency through condensation of water. Furthermore, when an *elevated floor* is used for a directed gas flow in the source enclosure, the peak shape and peak width are optimized in HPLC-APLI-(TOF)MS analyses. In a mass spectrometer dry gas is used to reduce the contamination of the sample-inlet stage with neutral analyte. Applying dry gas in GC-APLI-(TOF)MS analyses results in a significant loss of analyte signal. The dry gas flow is directed diametrically against the GC effluent and forces out the neutral analyte before the ionization. Changing the gas direction by modified or newly constructed components of the MS inlet stage results in a slight improvement of signal intensity when dry gas is used. The inlet components evaluated allow the use of dry gas with compromises, but do not make complete relinquishment of the dry gas possible.

As predicted in theory, the ionization by APLI results exclusively in radical cations (M^+). The ionization mechanism is furthermore very soft to the analyte molecule and does not lead to fragmentation. Small PAH molecules or especially their alkylated derivatives often arrive at the (TOF)MS detector as $[M-H]^+$. Complex molecules, such as labeled compounds which have been made accessible to APLI analysis by derivatization with an APLI ionization label, undergo significant fragmentation. For both scenarios, *ab-initio*-calculations and experiments done with an ion-trap MS clarify the $[M-H]^+$ formation and fragmentation as a result of collision-induced dissociation (CID) processes within the ion optical transfer stage of the time-of-flight MS. Under soft conditions for ion guiding, as used with the ion-trap MS, the CID rate is reduced, and the expected radical cations are detected.

6 Experimenteller Teil

6.1 GC-Analysen - Chromatographische Bedingungen

Für die gaschromatographische Analyse einer flüssigen Probenlösung wurden, sofern nicht anders angegeben, jeweils 1 μL splitlos in einen Split/Splitless-Injektor (S/SL) injiziert, der mit einem Spülfluss von 60 mL min^{-1} des Trägergases (Helium 5.0) 30 s nach jeder erfolgter Injektion gespült wurde.

6.1.1 GC-APLI-Analyse von Alkyl-PAK

Für die GC-APLI-Analyse des in Abbildung 3.20 dargestellten Chromatogramms wurden 10 bzw. $25 \mu\text{g L}^{-1}$ der in Tabelle 3.1 angegebenen Alkyl-PAK in einem Muschelextrakt (siehe Kapitel 6.7.1) gelöst und gaschromatographisch mit dem in Tabelle 6.1 angegebenen Temperaturprogramm getrennt. Zur Ionisation wurde ein DPSS-Laser (Wellenlänge: $\lambda = 266 \text{ nm}$) mit einer Pulsenergie von $65 \mu\text{J}$ bei einer Repetitionsrate von 100 Hz genutzt. Die Injektortemperatur betrug $375 \text{ }^\circ\text{C}$, die GC-Transferline wurde mit einem N_2 -Sheathgasfluss von $0,5 \text{ L min}^{-1}$ bei $332,5 \text{ }^\circ\text{C}$ betrieben. Die Trennung erfolgte auf einer Phenomenex ZB5-HT inferno Kapillarsäule (ID: $0,25 \text{ mm}$, Schichtdicke: $0,25 \mu\text{m}$) mit zeitprogammiertem He-Eluentenfluss: 1 mL min^{-1} für 0,5 min halten und mit 2 mL min^{-2} auf 2 mL min^{-1} erhöht; dieser Fluss wurde bis zum Ende der Analyse gehalten.

Tabelle 6.1: Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analyse von Alkyl-PAK

Heizrate [$^\circ\text{C min}^{-1}$]	Temperatur [$^\circ\text{C}$]	Zeit [min]
—	75	0,8
35	200	0,0
2,5	225	0,0
3	266	0,0
5	300	0,0
10	320	4,5
20	350	5,0

6.1.2 Messungen zum Einfluss des Drygases bei verschiedenen MS-Einlassgeometrien

Die GC-APLI-Analysen zur Evaluierung des Drygas-Einflusses (Abbildung 3.15) mit verschiedenen MS-Einlassgeometrien wurden auf einer Phenomenex ZB5-HT inferno Kapillarsäule (ID: 0,25 mm, Schichtdicke: 0,25 μm) mit dem in Tabelle 6.2 angegebenen Temperaturprogramm bei einem konstantem He-Fluss von 2 mL min^{-1} durchgeführt. Injiziert wurde eine Lösung des PAK-Mix 31 (siehe Tabelle 7.2.3) mit einer Massenkonzentration von $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, gelöst in einem Muschelextrakt (siehe Kapitel 6.7.1), in einen auf $360\text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Injektor. Die Ionisation erfolgte mit einem KrF*-Excimerlaser (Wellenlänge: $\lambda = 248\text{ nm}$) mit einer Pulsenergie von 4 mJ bei einer Repetitionsrate von 50 Hz . Die GC-Transferline wurde bei $375\text{ }^\circ\text{C}$ mit einem Sheathgasfluss von $0,5\text{ L min}^{-1}$ betrieben.

Tabelle 6.2: Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analyse für die Evaluation des Einflusses von Drygas bei verschiedenen MS-Einlassgeometrien

Heizrate [$^\circ\text{C min}^{-1}$]	Temperatur [$^\circ\text{C}$]	Zeit [min]
—	100	0,25
40	360	0,2

6.1.3 GC-APLI-Analysen von komplexen Proben (z. B. Muschelextrakten) zur PAK-Bestimmung für einen Vergleich des Excimer- und DPSS-Lasers

Gaschromatographische Analysen komplexer Proben wie die in Kapitel 6.7.1 beschriebenen Extrakte von Muschelgewebe (vgl. Abbildung 3.39) zur Bestimmung von PAK wurden mit dem in Tabelle 6.3 beschriebenen Temperaturprogramm durchgeführt. Zur Trennung wurde eine ZB-5-HT Kapillarsäule (30 m, ID: 0,25 mm, Filmdicke: $0,25\text{ }\mu\text{m}$) der Fa. Phenomenex verwendet. Die Analysen wurden mit einem Trägergasflussgradienten durchgeführt: Start der Analyse mit 1 mL min^{-1} für $0,25\text{ min}$, dann mit $0,05\text{ mL min}^{-2}$ auf $1,7\text{ mL min}^{-1}$ oder $2,5\text{ mL min}^{-1}$ bis zum Ende der Trennung. Die Injektion erfolgte Splitlos in den auf $350\text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Split/Splitless (S/SL)-Injektor. Die Transferline wurde bei einer konstanten Temperatur von $322,5$ bis $350\text{ }^\circ\text{C}$ mit einem Sheathgasfluss von $0,5\text{ L min}^{-1}$ (N_2) betrieben. Zur Ionisation wurden sowohl der Excimerlaser (Repetitionsrate: 100 Hz , Pulsenergie: 5 mJ) als auch der DPSS-Laser (Repetitionsrate: 100 Hz oder 200 Hz , Pulsenergie: 60 bis $65\text{ }\mu\text{J}$) eingesetzt.

Tabelle 6.3: Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analyse von PAK in komplexen Proben (z. B. Muschelextrakten)

Heizrate [°C min ⁻¹]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
—	75 (55*)	0,2 (0,5*)
16 (25*)	200	0,0
3,3	225	0,0
3,5	266	0,0
5	300	0,0
10	340	9,5

*: alternatives Programm

6.2 HPLC-Analysen - Chromatographische Bedingungen

Im Folgenden sind die Analysenbedingungen für die durchgeführten HPLC-Analysen angegeben. Analysen mit Gradientenelution erfolgten mit einer 3-Kanal Doppelkolbengradientenpumpe (Merck-Hitachi L 6200 A) mit den angegebenen Lösungsmitteln in HPLC gradient-grade (oder besser) oder Mischungen mit bspw. Zusätzen von Säuren oder Salzen. Isokratische Analysen erfolgten ebenfalls mit dieser Pumpe oder einer 1-Kanal Doppelkolbenpumpe (Merck-Hitachi L 6000 A). Als Elutionslösungsmittel wurden hier ebenfalls reine Lösungsmittel in HPLC gradient-grade (oder besser) bzw. Mischungen mit Zusätzen von Säuren oder Salzen verwendet. Die Injektionsvolumina sind bei den jeweiligen Analysenbedingungen angegeben. Verwendet wurden kommerziell erhältliche und ausgewiesene Probenschleifen mit definierten Volumina oder selbst hergestellte Probenschleifen, deren Innendurchmesser und Länge als Berechnungsgrundlage für das Innenvolumen herangezogen wurden. Die Probeninjektionen erfolgten mit einem manuellen oder im Massenspektrometer eingebauten Rheodyne 6- bzw. 7-Wege-Ventil. Wenn nicht anders angegeben, wurde die MPIS-Quelle bei einer konstanten Temperatur von 110 °C betrieben.

6.2.1 Vergleich der Peakintensitäten und S/N bei HPLC-APLI mit Excimer- und DPSS-Laser

Die Mehrfachmessungen der drei Analyten Anthracen (**29**), 7,9-Dimethylbenz[c]acridin (**30**) und Nicotin (**31**) wurden unter isokratischen Bedingungen mit einem MeOH/H₂O-Gemisch (V/V = 90%/10%) bei einer Eluentenflussrate von 0,75 mL min⁻¹ durchgeführt. Als Trennphase wurde eine Pinnacle II PAH-Säule der Fa. Restek der Dimensionen 50 mm × 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm für die Messungen mit Anthracen und 7,9-DMBA verwendet. Die Nicotininlösungen wurden über eine HALO C18 Phase der Fa. Advanced Materials Technology mit den Dimensionen 30 mm × 4,6 mm, Partikelgröße 2,7 µm getrennt. Von den Analyten wur-

den jeweils 5 μL als verdünnte Lösungen (10 bzw. 50 nM) in einem MeOH/H₂O-Gemisch (V/V = 70%/30%) eingesetzt. Der Excimerlaser wurde mit einer Repetitionsrate von 200 Hz bei einer Pulsenergie von 5 mJ und der DPSS-Laser mit einer Repetitionsrate von 100 Hz bei einer Pulsenergie von 64 μJ betrieben.

6.2.2 HPLC-APLI-Analyse von (Anthracen-9-yl)methoxyessigsäure-3-pyridin-3-yl-propylester (**18**)

Die von DEIBEL durchgeführte Synthese zur Darstellung von **18** erfolgte durch Reaktion von 5 μL einer 10 μM -Lösung von **17** in Dichlormethan (DCM) mit 3 μL einer 100 mM DMAP-Lösung, 20 μL einer 20 mM Lösung von **16** sowie 50 μL einer 100 mM **32**-Lösung, jeweils in DCM, und Zusatz von 50 μL DCM über Nacht bei 1000 rpm. Die erhaltene Reaktionslösung wurde unter reduziertem Druck in einer Zentrifuge eingengt, in 50 μL ACN sowie 50 μL H₂O resuspendiert und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde zur HPLC-APLI-Analyse eingesetzt.

Die Analyse erfolgte durch Injektion von 20 μL des Überstands auf eine Waters C18-Trennsäule (75 mm \times 4,6 mm, Partikelgröße 3,5 μm) mit einem Eluentenfluss von 1,2 mL min⁻¹ (isokratisch, ACN/H₂O V/V = 70%/30%). Zur Ionisation wurde ein KrF*-Excimerlaser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsenergie von 5 mJ verwendet.

6.2.3 Analyse komplexer PAK-Mischungen mit HPLC-APLI

HPLC-APLI-Analysen zur Trennung komplexer PAK-Gemische wurden bei einem Eluentenfluss von 1,5 mL min⁻¹ mit dem in Tabelle 6.4 angegebenen Gradientenprogramm durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine Agilent Zorbax Eclipse PAH-Säule (250 mm \times 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm) bei Raumtemperatur benutzt. Injiziert wurden jeweils 5 μL der entsprechenden Probelösungen. Zur Ionisation wurde ein KrF*-Excimerlaser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz mit einer Pulsenergie von 5 mJ verwendet.

Tabelle 6.4: Programm der Gradientenelution für die Analyse komplexer PAK-Mischungen mittels HPLC-APLI-(TOF)MS

Zeit t [min]	H ₂ O [%]	ACN [%]
0,0	60	40
0,7	60	40
22,0	0	100
28,0	0	100
30,0	60	40
32,0	60	40

6.2.4 Vergleich der Ionensuppression bei HPLC-APLI

Für den Vergleich der Ionensuppression zwischen HPLC-APCI, -APLI und -ESI wurde eine angereicherte Urinprobe (Injektionsvolumen 10 μL ; SPE-Aufbereitung in Kapitel 6.7.3) auf einer Phenomenex Luna 3 μm NH_2 100 \AA Trennsäule (150 mm \times 2 mm, Partikelgröße 3 μm) getrennt und das Eluat mit einer Anthracen-9-methanollösung (**8**, $c = 20 \text{ nmol L}^{-1}$ in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ V/V = 70 %/30 %) in einem T-Stück vereinigt. Die Flussrate des $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -Eluenten (V/V = 70 %/30 %) betrug 0,3 mL min^{-1} . Die Flussrate der Anthracen-9-methanollösung 0,2 mL min^{-1} (gefördert durch eine Spritzenpumpe). Für die Laserionisation wurde ein KrF^* -Excimerlaser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz mit einer Pulsenergie von 5 mJ verwendet.

6.2.5 Peakbreitenoptimierung mit dem *elevated floor*

Zur Optimierung der Peakbreiten bei der HPLC-APLI-(TOF)MS wurde der Einsatz des sogenannten *elevated floor* getestet. Dieser wurde für die Messungen an eine Verbindungsstelle im Quellenkörperboden eingebaut. Eine schematische Darstellung liefert Abbildung 3.8a. Diese erste Version des *elevated floor* wurde mit einem Axiallüfter betrieben, dessen Drehzahl von der angelegten Betriebsspannung abhängig ist (Nennspannung $U_{max} = 16 \text{ V}$). Die Spannung wurde im Verlauf der Messreihe stufenweise zwischen 0 V, 5 V, 10 V und 15 V variiert. Hierzu wurde ein getaktetes Labornetzteil (0 - 80 V DC, 0 - 2,5 A, 200 W) genutzt.

Die HPLC-APLI-Messungen erfolgten isokratisch bei einer Flussrate von 0,5 mL min^{-1} mit einem $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ -Eluenten (V/V = 70 %/30 %). Injiziert wurden 5 μL einer Anthracenlösung (**29**, 50 nmol L^{-1} im Eluenten). Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Pinnacle II PAH-Trennsäule (50 mm \times 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm). Um Kondensationen des Eluenten zu verhindern, wurde der Quellenkörper auf 100 $^\circ\text{C}$ temperiert. Zur Ionisation wurde ein KrF^* -Excimerlaser mit einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsenergie von 5 mJ genutzt.

6.2.6 HPLC-APLI-Analysen von 1-Hydroxypyren

HPLC-APLI-Analysen von 1-Hydroxypyrenhaltigen Lösungen (Injektionsvolumen: 5 μL) wurden mit einem isokratischen Eluentenfluss ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ V/V = 75 %/25 %) von 0,5 mL min^{-1} unter Verwendung einer Phenomenex Kinetex C18-Trennsäule (75 mm \times 3,0 mm, Partikelgröße 2,6 μm) durchgeführt. Die Ionisation erfolgte dabei mit einem KrF^* -Excimerlaser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsenergie von 5 mJ.

6.2.7 HPLC-APLI-Analysen von derivatisierten Aminosäuren in der TC-MPIS

Um den Einfluss der Ionenquellentemperatur der temperaturkontrollierten MPIS zu demonstrieren, wurden verschiedene Aminosäuren mit dem Ionisationsmarker **4** derivatisiert (Reaktionsbedingungen in Kapitel 6.8.1) und mit HPLC-APLI-(TOF)MS analysiert. Hierzu wurde

die TC-MPIS sowohl temperiert auf 110 °C als auch nicht temperiert (ca. 45 °C) betrieben. Injiziert wurden 5 µL der beschriebenen Probe. Die Trennung wurde auf einer Pinnacle II PAH-Säule (50 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm) der Fa. Restek bei Raumtemperatur durchgeführt. Der verwendete Gradient ist in Tabelle 6.5 aufgelistet und wurde von einer Merck-Hitachi HPLC-Pumpe L-6200 A mit einem Volumenfluss von 2,0 mL min⁻¹ zur Analyse bereitgestellt. Die Verdampfereinheit der Ionenquelle wurde bei 350 °C betrieben. Die Ionisation erfolgte mit einem KrF*-Excimerlaser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz und 5 mJ.

Tabelle 6.5: Gradientendaten für die Analyse von derivatisierten Aminosäuren mittels HPLC-APLI-(TOF)MS

Zeit [min]	H ₂ O [%]	MeOH [%]
0,0	90	10
4,0	10	90
5,0	10	90
6,5	90	10
8,0	90	10

6.3 SFC-Analysen - Chromatographische Bedingungen

Bei allen SFC-APLI-Analysen wurde ein Agilent 1260 Infinity SFC-System benutzt. Alle Probelösungen wurden vom systemintegrierten Autosampler über eine feste 5 µL Injektionsschleife injiziert. Sowohl isokratische als auch Gradientenelutionen wurden immer mit CO₂ (4.5) als superkritischem Lösungsmittel durchgeführt. Als organischer Modifier wurde bei Bedarf ausschließlich MeOH ohne Zusätze verwendet.

6.3.1 Erste Experimente zum Aufbau der SFC-APLI-Kopplung

Für erste Experimente zur Kopplung der SFC mit APLI-(TOF)MS (vgl. Kapitel 3.4.3) wurden die in Tabelle 6.6 aufgeführten Bedingungen und Parameter gewählt.

6.3.2 Vergleich zwischen 25 und 50 µm ID-Kapillaren für die SFC-APLI-Kopplung

Zum Vergleich von ersten Ergebnissen der neu entwickelten SFC-APLI-Kopplung mit weiterführenden Experimenten zur Optimierung des Systems durch Verwenden einer 50 µm-ID-Restriktionskapillare wurden die in Tabelle 6.7 aufgeführten Bedingungen und Parameter gewählt.

Tabelle 6.6: Bedingungen und Parameter für erste Experimente zum Aufbau der SFC-APLI-Kopplung

	Parameter	Einstellung
SFC	CO ₂ /MeOH	70%/30%
	Eluentenfluss	1,5 mL min ⁻¹
	BPR-Rückdruck	235 bar
	Säulentemperatur	40 °C
	Säule	Phenomenex Aqua C18 250 mm × 3 mm, Partikelgröße 5 µm
	Restriktionskapillare	1250 mm, 25 µm ID
GC	Ofentemperatur	150 °C
	Transferlinetemperatur	150 °C
	Sheathgasfluss	0,5 L min ⁻¹ N ₂
MPIS	Vaporizer-Gasdruck	2,4 bar
	MPIS-Temperatur	110 °C
Laser	Repetitionsrate	50 Hz
	Energie	5 mJ

6.3.3 Isokratische Analysen zur Optimierung der SFC-APLI-Kopplung

Zur Optimierung verschiedener Parameter der SFC-APLI-(TOF)MS-Kopplung wurden die Analysen mit einem isokratischen CO₂/MeOH-Eluenten bei einer Flussrate von 2 mL min⁻¹ durchgeführt. Als Trennsäule diente eine auf 60 °C temperierte Agilent ZORBAX Eclipse PAH-Säule (250 mm × 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm). Injiziert wurde die in Tabelle 7.2.3 angegebene deuterierte PAK-Mischung mit einer Konzentration von 50 µg L⁻¹. Die zur Optimierung veränderten Parameter sind in Tabelle 6.8 aufgeführt. Die Parameter des Massenspektrometers wurden konstant gehalten und die Ionenquelle konstant auf 110 °C temperiert.

6.3.4 SFC-APLI-Analyse von komplexen PAK-Mischungen

Für Trennungen von komplexen PAK-Mischungen wurde eine Agilent Eclipse PAH-Säule (250 mm × 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm) verwendet, deren Temperatur konstant auf 60 °C gehalten wurde. Die Trennung erfolgte mit dem in Tabelle 6.9 angegebenen Programm für einen binären CO₂/MeOH-Gradienten bei einer Eluentenflussrate von 2,0 mL min⁻¹. Der BPR-Systemdruck wurde auf 275 bar und die BPR-Temperatur auf 60 °C eingestellt. Die Restriktionsleitung zum Massenspektrometer bestand aus einer Kombination zweier fused-silica-Kapillaren (750 mm × 0,05 mm + 330 mm × 0,53 mm) und wurde durch den konstant auf 250 °C temperierten GC-Ofen und die auf 330 °C geheizte Transferline (Sheathgasfluss:

Tabelle 6.7: Parameter einer SFC-APLI-Analyse von PAK-Mix 31 mit 50 μm -fs-Kapillare bei isokratischem CO_2/MeOH -Fluss

	Parameter	Einstellung
SFC	CO_2/MeOH	70%/30%
	Eluentenfluss	2,0 mL min^{-1}
	BPR-Rückdruck	275 bar
	Säulentemperatur	60 °C
	Säule	Agilent Eclipse PAH 250 mm \times 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm
	Restriktionskapillare	1250 mm, 50 μm ID
GC	Ofentemperatur	200 °C
	Transferlinietemperatur	200 °C
	Sheathgasfluss	0,75 L min^{-1} N_2
MPIS	Vaporizer-Gasdruck	2,4 bar
	MPIS-Temperatur	110 °C
Laser	Repetitionsrate	100 Hz
	Energie	5 mJ

Tabelle 6.8: Auflistung der variablen Parameter für Optimierungsexperimente bei SFC-APLI. Alle Analysen wurden mit einer isokratischen CO_2/MeOH -Mischung als Eluent durchgeführt.

	Parameter	Einstellung im Bereich von...
SFC	BPR-Rückdrücke	130 bis 275 bar
	CO_2 -Eluentenflüsse	1 bis 2,5 mL min^{-1}
	MeOH-Gehalte im Eluenten	0 bis 40 %
	Restriktionskapillar- -ID	25, 50 und 75 μm
	-längen -erweiterungen (Länge 330 mm)	750, 1000 und 1250 mm 180, 250 und 530 μm ID
GC	Ofentemperaturen	100 bis 300 °C
	Transferlinietemperaturen	100 bis 330 °C
MPIS	Vaporizergasdrücke	0, 1,2, 2,4 und 3,6 bar

0,8 L min^{-1}) in die Ionenquelle (temperiert auf 110 °C) geführt. Die Laserionisation erfolgte mit einem KrF*-Excimerlaser mit einer Repetitionsrate von 100 Hz bei einer Pulsenergie von 5 mJ.

Tabelle 6.9: SFC-APLI-Gradientenprogramm für die Analyse komplexer PAK-Mischungen

Zeit [min]	CO ₂ [%]	MeOH [%]
0	100	0
3	100	0
8	60	40
11	60	40
12	100	0
13	100	0

6.3.5 SFC-APLI-Analyse von SPE-Extrakten von Urin

Zur SFC-APLI-(TOF)MS-Analyse der unter 6.7.2 vorbereiteten Lösungen wurde eine auf 60 °C temperierte Agilent ZORBAX RX-SIL Trennsäule (150 mm × 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm) verwendet. Die Trennung erfolgte bei einem BPR-Gegendruck von 275 bar (60 °C) mit dem in Tabelle 6.10 angegebenen Gradienten bei einer Eluentenflussrate von 2,0 mL min⁻¹. Die Restriktion wurde mit einer Kombination zweier fused-silica Kapillaren (750 mm × 0,05 mm + 330 mm × 0,53 mm) bei einer GC-Ofentemperatur von 250 °C und einer Transferlinientemperatur von 330 °C bei einem Sheathgasfluss von 0,8 L min⁻¹ durchgeführt. Die Laserionisation erfolgte mit einem KrF*-Excimerlaser mit einer Repetitionsrate von 100 Hz bei einer Pulsenergie von 5 mJ.

Tabelle 6.10: SFC-Gradientenprogramm für die Analyse von 1-HP in Urinextrakten

Zeit [min]	CO ₂ [%]	MeOH [%]
0	95	5
3	60	40
3,5	60	40
4	95	5
5	95	5

6.4 Kontinuierliche Analytzufuhr zur Aufnahme der dynamischen Ionenakzeptanz

Für die experimentelle Bestimmung der dynamischen Ionenakzeptanz bei GC- und HPLC-APLI wurde eine kontinuierliche Analytzufuhr sichergestellt, die in den folgenden Abschnitten näher beschrieben ist. Die orts aufgelösten Messungen erfolgten durch Umpositionierung des DPSS-Lasers mithilfe der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Versuchsanordnung.

6.4.1 HPLC

Um die Signalintensität von Anthracen (**29**), Nicotin (**31**) und 7,9-Dimethylbenz[c]acridin (**30**) in Abhängigkeit des Ionisationsorts für die Ionisation mit dem DPSS-Laser zu bestimmen, wurden kontinuierlich Lösungen der Analyten (**29**: 10 nM, **31** und **30**: 50 nM) in einem MeOH/H₂O-Gemisch (V/V = 70%/30%) bei einer Flussrate von 0,25 mL min⁻¹ und 0,75 mL min⁻¹ mithilfe einer Einkanal-HPLC-Pumpe in die Ionenquelle gegeben. Der DPSS-Laser wurde zur Ionisation mit einer Repetitionsrate von 100 Hz bei einer Pulsenergie von 62 µJ betrieben und manuell über die x-y-Vorrichtung in Schritten von 1 mm bewegt. Die Position der Laserfluoreszenz wurde mithilfe eines auf das Austrittsfenster der Ionenquelle aufgetragenen Millimeterpapiers bestimmt. Als Referenzpunkt der Position wurde der Einlass des Massenspektrometers gewählt und als x = 0 mm / y = 0 mm definiert. Die waagerechte Positionsänderung wird durch die x-Koordinate, die senkrechte Änderung durch die y-Koordinate beschrieben. Für diese Experimente wurden die Ionenquellenparameter wie Sprayshield- und Kapillarspannung konstant gehalten. Die Einstellungen der Ionentransmissionsoptik wurden den jeweiligen Analyten angepasst.

6.4.2 GC

Zur kontinuierlichen Analytzufuhr bei der Aufnahme der DIA bei GC-APLI wurde das bereits von SCHIEWEK und MÖNNIKES beschriebene, von der feinmechanischen Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal konstruierte sogenannte *Töpfchen* verwendet [68, 69]. Das *Töpfchen* ist ein gasdichter Metallzylinder, in den eine flüssige oder feste Probe eingebracht werden kann. Das Gefäß besitzt zwei dichtende Verschraubungen für fs-Kapillaren, durch die einerseits ein Trägergas zugeführt und andererseits das mit Analyt angereicherte Gas in Richtung GC-Transferline bzw. Ionenquelle abgeführt werden kann. Um eine konstante und erhöhte Temperatur zum Verdampfen des Analyten zu gewährleisten, wird das *Töpfchen* in den GC-Ofen des Versuchsaufbaus platziert. Für die in Abbildung 3.36 in Kapitel 3.3.3 vorgestellte Messung wurde Anthracen als Feststoff in einem offenen GC-Vial in das *Töpfchen* gestellt und mit dem S/SL-Injektor des Gaschromatographen sowie über die GC-Transferline mit der Ionenquelle verbunden. Der GC-Ofen wurde konstant auf 75 °C temperiert. Die Aufnahme der DIA erfolgte analog zu dem in Kapitel 6.4.1 beschriebenen Verfahren (Laserposition verändern und mithilfe von Millimeterpapier bestimmen usw.). Die Ionisation erfolgte mit dem

DPSS-Laser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz mit einer Pulsenergie von 63 μJ .

6.5 DI-APLI-Messungen verschiedener Verbindungen

Zur massenspektrometrischen Bestimmung verschiedener Analyten ohne vorgeschaltete chromatographische Trennung wurden DI-APLI-Analysen durchgeführt. Die Proben wurden hierzu in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und darin auf Konzentrationen im unteren bis mittleren μmol -Bereich verdünnt. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe (Flussrate zwischen 50 und $250 \mu\text{L min}^{-1}$) wurden die Verdünnungen in den Verdampfer (zwischen 350 und 450°C) der LC-APLI-Konfiguration überführt. Die Verdampfung wurde von N_2 -Vaporizerdrücken von 2,5 bis 4 bar assistiert. Die Ionisation erfolgte mit einem KrF*-Excimerlaser (100 bis 200 Hz, 5 mJ) oder einem Nd:YAG-DPSS-Laser (100 Hz, 65 bis $70 \mu\text{J}$) an optimierten Positionen bei geeigneten MS-Parametern (Ionenoptik).

6.6 Esquire-Messungen

Um den Einfluss der Potentialdifferenz zwischen verschiedenen Komponenten der Ionenoptik (Kapillarausgang, Skimmer) auf die Fragmentierung verschiedener Alkyl-PAK zu bestimmen, wurden APLI-Messungen an einem Bruker esquire6000 Ionenfallenmassenspektrometer durchgeführt. Als Probe wurde die Gasphase über dem festen oder flüssigen Analyten genutzt und kontinuierlich in die Ionenquelle überführt. Zum Transport der Gasphase wurde ein seichter, variabler Stickstoffstrom (bis maximal $0,5 \text{ L min}^{-1}$) in ein geschlossenes Gefäß mit dem Analyten eingebracht und über einen Teflonschlauch direkt in die Ionenquelle geleitet. Zum Ausgleich der Gasbilanz in der Ionenquelle (aufrechterhalten des Atmosphärendrucks), wurde zusätzlich ein N_2 -Sheathgasfluss in die Ionenquelle hinzugeregelt. Die Ionisation erfolgte in einer an der Bergischen Universität Wuppertal entwickelten geschlossenen Laminarflussionenquelle (engl.: *laminar-flow ion source*, LFIS) [184] mit einem DPSS-Laser bei einer Repetitionsrate von 100 Hz und einer Pulsenergie von 63 μJ . Die Ionenparameter CapExit-Voltage und Skimmer-Voltage wurden entsprechend der Anforderung an fragmentative bzw. nicht fragmentative Bedingungen gewählt.

6.7 Probenvorbereitung / Extraktionsmethoden

6.7.1 QuEChERS

Zur Extraktion von Muschelgewebe mit einer Variante der QuEChERS-Methode [167, 217, 219, 220] wurde eine bestimmte Menge des möglichst zerkleinerten Gewebes (im Allgemeinen zwischen 0,5 und 3 g; getrocknet oder als Feuchtgewebe) in ein 50 mL-Sarstedt-Röhrchen eingewogen, evtl. mit einer Lösung internen Standards versetzt, auf 5 g mit Reinstwasser aufgefüllt und 10 s mit der Hand geschüttelt. Nach erfolgter Zugabe von 5 mL ACN wird das

Gefäß in eine Schüttelapparatur gestellt und zwischen 10 und 30 Minuten bei ca. 100 rpm geschüttelt. Zur Trennung der Phasen werden der Suspension (bei einem 5 g-Ansatz) zwischen 1,0 und 2,5 g getrocknetes MgSO_4 sowie 0,5 bis 1,5 g NaCl zugesetzt und wiederum in der Schüttelapparatur geschüttelt (5 min). Anschließend wird das Gefäß bei 4000 rpm und 10 °C für 5 min zentrifugiert und die organische Phase als Probe abpipettiert.

6.7.2 Festphasenextraktionen (SPE) zum Anreichern von 1-Hydroxypyren in Urin

Die beschriebene Extraktionsmethode wurde nur für mit 1-HP dotierten Urin angewendet. Zur Bestimmung von originärem 1-HP in Urin muss die Probe zuvor enzymatisch oder sauer hydrolysiert werden, um das glucuronidisch gebundene 1-HP in freier Form zu erhalten.

Eine Urinprobe wird mit einer 1-Hydroxypyrenlösung (1 mg L^{-1} in ACN) derart dotiert, dass eine Endkonzentration von $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ erhalten wird. Von dieser dotierten Lösung werden 25 mL auf eine zuvor mit einmal 3 mL Acetonitril und zweimal 3 mL Reinstwasser konditionierte SPE-Säule (ABS-Elut Nexus 3 mL) gegeben und zweimal mit 1 mL Reinstwasser nachgespült. Die Elution erfolgt mit zweimal 0,75 mL ACN, welches im Anschluss bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom entfernt wird. Der Rückstand wird mit 1,5 mL ACN resuspendiert (ca. 1 min Ultraschallbad) und zur Analyse eingesetzt.

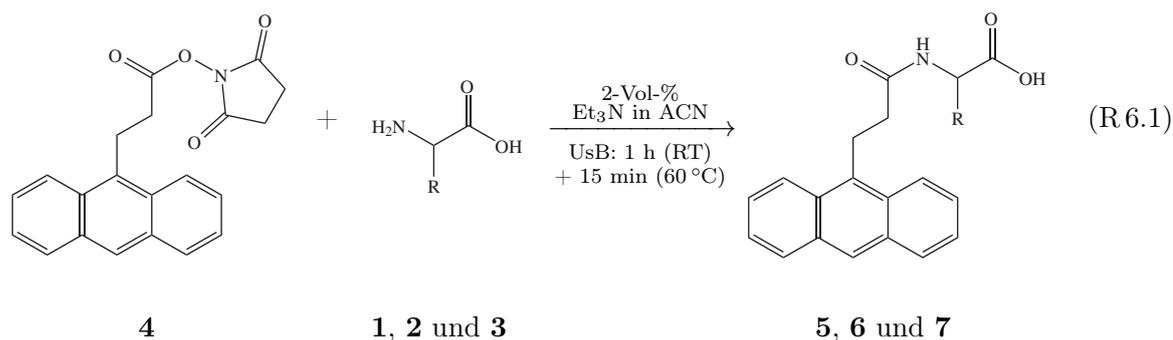
6.7.3 Generieren einer Matrix aus Urin für Supprimierungsmessungen in der HPLC

Die zur Bestimmung der Ionensuppression bei ESI, APCI und APLI verwendete Probelösung wurde mithilfe einer Festphasenextraktion von Urin gewonnen. Hierzu wurden etwa 5 mL Urin auf eine zuvor mit zweimal 3 mL MeOH und zweimal 2,5 mL Reinstwasser konditionierte SPE-Säule (SEP-Pak C18, 360 mg, 55 - 105 μm Partikelgröße) gegeben und zweimal mit 2,5 mL Reinstwasser nachgespült. Zur Elution wurden zweimal 5 mL MeOH verwendet. Das erhaltene Eluat wurde im Verhältnis 1:1 mit Reinstwasser gemischt und zur Analyse eingesetzt.

6.8 Derivatisierungsreaktionen

6.8.1 Aminosäurelabeling

Als Grundlage für die Reaktion des Reaktiven NHS-Esters **4** dienen folgende Schriften [272, 273]. Eine Mischung aus Glycin (**1**), L-Serin (**2**) und L-Leucin (**3**) (je etwa 10 bis 20 mg) wurde in einem Milliliter einer Lösung von **4** ($\beta = 1,3 \text{ g L}^{-1}$) in 2 Vol-% Triethylamin (Et_3N) in ACN aufgenommen, 60 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 15 Minuten bei 60 °C im Ultraschallbad zur Reaktion gebracht. 10 μL der Reaktionslösung wurden 1:100 mit einer MeOH/ H_2O -Mischung (V/V = 25%/75%) verdünnt.



mit R: $-\text{H}$ (Gly) (**1** / **5**), $-\text{CH}_2\text{OH}$ (L-Ser) (**2** / **6**), $-\text{C}_4\text{H}_9$ (L-Leu) (**3** / **7**)

Abbildung 6.1: Derivatisierung von Aminosäuren mit Verbindung **4**

6.8.2 Veresterung der Ionisationsmarker

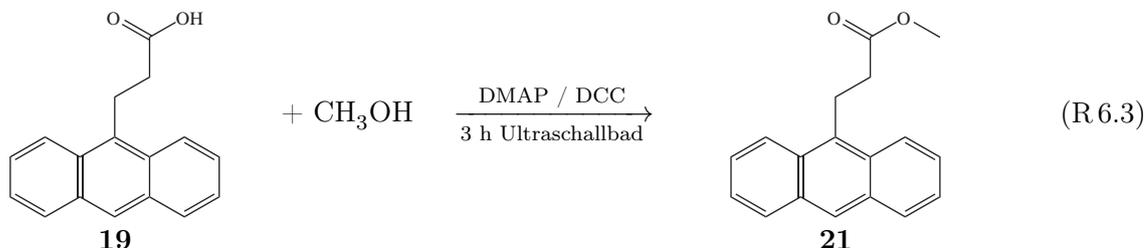
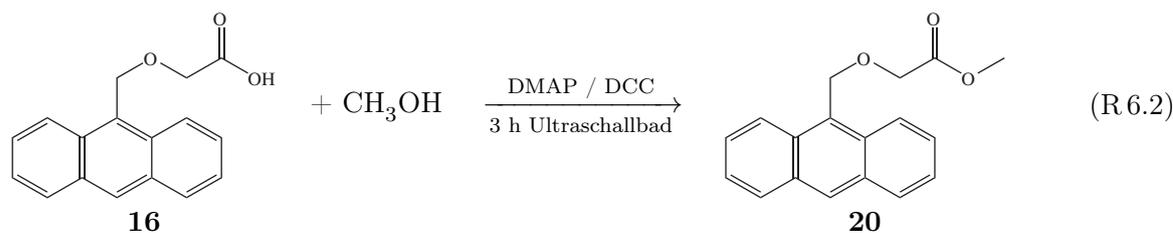


Abbildung 6.2: Veresterung der Ionisationsmarker (**16** und **19**) mit MeOH zu den jeweiligen Methylestern (**20** und **21**)

Zur Darstellung des jeweiligen Methylesters der Verbindungen **16** und **19** wurden 0,12 mmol der jeweiligen Verbindung eingewogen, in 1 mL Dichlormethan gelöst und mit einem Überschuss an Methanol (ca. 0,2 mL) unter Vermittlung von 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP (**33**), 25 mg mL⁻¹ in DCM) und *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC (**32**), 0,26 g mL⁻¹ in DCM) für 3 Stunden im Ultraschallbad zur Reaktion gebracht. Die Reaktionslösung wurde bis zur Trockene eingengt und über Kieselgel mit DCM als Laufmittel gereinigt ($R_{f20, \text{NP, DCM}} = 0,29$, $R_{f21, \text{NP, DCM}} = 0,54$). Reine Fraktionen wurden vereinigt, eingengt und über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Neben der Bestimmung der Molekülmasse wurde zur Identifikation

die Kernresonanzspektroskopie verwendet.

(Anthracen-9-yl-)methoxyessigsäuremethylester (20)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 3,84$ (s, 3H), 4,26 (s, 2H), 5,70 (s, 2H), 7,49 - 7,61 (m, 4H), 8,05 (d, 2H), 8,45 - 8,51 (m, 3H)

(Anthracen-9-yl-)propansäuremethylester (21)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 2,80$ (t, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,98 (t, 2H), 7,43 - 7,57 (m, 4H), 8,02 (d, 2H), 8,26 (d, 2H), 8,38 (s, 1H)

Die NMR-Experimente wurden an einem Avance 400 MHz der Firma Bruker durchgeführt.

6.9 *ab-initio*-Berechnungen [75]

Zur Berechnung der Energie verschiedener Reaktionswege von betrachteten ionischen oder neutralen Molekülen wurde Gaussian 03W zusammen mit der graphischen Benutzeroberfläche GaussView 4.1 verwendet. Die berechneten Gibbs-Energien und enthalpiekorrigierten Gesamtenergien wurden aus Geometrieoptimierungen und anschließenden Frequenzberechnungen erhalten. Hierfür wurde die Dichtefunktionaltheorie (engl.: *Density Functional Theory*) mit einer Kombination des „Becke-3-Parameter-Lee-Yang-Parr“-Funktional (B3LYP) und dem 6-31++G(d,p)-Basisset genutzt. Diese Kombination nutzt die Berechnungszeit optimal aus [274].

6.10 MALDI-Experimente

MALDI-(TOF)MS-Messungen erfolgten im positiven Reflektronmodus mit einem Beschleunigungspotential von 20 kV. Zur Desorption/Ionisation wurde ein N_2 -Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 337$ nm und einer Pulsbreite von 3 ns genutzt. Die erhaltenen Massenspektren wurden akkumuliert über 441 Profilspektren mit 10 Laserschüssen pro Profil bei einer Repetitionsrate von 5 Hz. Die spektrale Massenkalkulation wurde zuvor mit einer Polyethylenglykol (PEG)-Polymerverteilung bestimmt. Der PEG-Standard wurde in MeOH gelöst und mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix versetzt und vermessen.

Feste Proben wurden zunächst in Tetrahydrofuran (THF) gelöst ($\beta = 2 \text{ g L}^{-1}$). Ein Aliquot von 20 μL der Probelösung wurde mit 20 μL einer Matrixlösung (1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol) $\beta = 20 \text{ g L}^{-1}$) vermischt und von dieser Mischung 0,5 μL auf das zuvor mit 2 μL Silbertrifluoracetatlösung ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ in THF) beschichtete MALDI-Target aufgetragen.

6.11 Background-oriented Schlieren-Aufnahmen

Die Abbildung aus der *background-oriented Schlieren*-Aufnahme wurde mithilfe von Daten aus der sogenannten Kreuzkorrelationsfunktion erstellt, die aus den Messbilddaten und den Referenzbilddaten berechnet wurden. Zur Berechnung wurde das auf der Programmiersprache Python basierende Open PIV [275, 276] genutzt. Zum Herausfiltern zu großer Werte wurde der bei Abbildung 3.54a angegebene Rauschfilterwert verwendet und mit dem Wert 0 gleichgesetzt.

Das Mess- und das Referenzbild wurde mit einer Canon 600D Digitalspiegelreflexkamera mit einem Standardobjektiv (18 bis 55 mm Brennweite) mit Blende 36 und einer Belichtungszeit von 0,25 s aufgenommen. Als zufälliges Punktemuster für den Hintergrund wurde ein Ausschnitt eines mit dem Programm MATLAB der Fa. MathWorks erzeugten Punktemusters mit $1 \cdot 10^7$ 0,03 mm großen, schwarzen Punkten auf weißem Grund bei einer Druckskalierung von 80 % gewählt, mit einem Schwarz/Weiß-Laserdrucker ausgedruckt und in die MPIS eingeklebt.

6.12 Numerische Simulationen

Nachfolgend sind die im vorliegenden Text abgebildeten numerischen Simulationen näher beschrieben und die Simulationsbedingungen angegeben. Die exakten Verfahren können in weiteren Schriften nachgeschlagen werden. Dazu zählen u. a. [183, 187].

6.12.1 Simulationsbedingungen für die Simulation fluiddynamisch modellierter, zeitintegrierter Gasflüsse und -geschwindigkeiten: Abbildungen 3.7a und 3.7b

Die Flusslinien, Ionentrajektorien und die Geschwindigkeitsverteilung wurden mithilfe des Programms COMSOL Multiphysics simuliert. Für die Flusslinien des simulierten Hauptgasflusses in der MPIS wurde ein Drygasfluss von $3,8 \text{ L min}^{-1}$ angenommen. Der Gasfluss durch den Verdampfer wurde aufgrund seiner vergleichsweise geringen mittleren Geschwindigkeit als laminar mit einem nur geringen Turbulenzgrad von 1 % angenommen. Als Massenfluss wurde $0,0237 \text{ g s}^{-1}$ festgelegt, was einem Volumenfluss von $0,7 \text{ L min}^{-1}$ bei 183°C entspricht. Die Flusslinien in der Simulation starten am Verdampferausgang in der Ionenquelle. Die Linien tragen eine Farbcodierung für die integrierte Aufenthaltszeit eines Gas-/Fluidpakets, das diesen Flusslinien folgt. Besonders beachtenswert ist das Farbspektrum an der Ausflussöffnung zur Gasentsorgung. Die Aufenthaltszeit für ein Gas-/Fluidpaket in der Ionenquelle liegt bei mindestens 1 s. Viele Flusslinien zeigen eine Aufenthaltszeit von über 3 s. Die höchste Aufenthaltsdauer mit dem für Abbildung 3.7b angewandten Datensatz beträgt über 30 s. Die in Abbildung 3.7a dargestellte Farbcodierung zeigt die Geschwindigkeitsverteilung der Gasflüsse in der Quelle. Die Flusslinien entsprechen den in Abbildung 3.7b dargestellten zeitintegrierten Trajektorien der Fluidpakete.

6.12.2 Simulationsbedingungen für die Simulation von Iontrajektorien für verschiedene Einlassgeometrien bei GC-API: Abbildungen 3.12 und 3.13b

Die numerischen Simulationen der Iontrajektorien in den Abbildungen 3.12 und 3.13b wurden mit dem Programm SIMION durchgeführt. Die relevanten Eingangsparameter sind in Tabelle 6.11 für die genannten Abbildungen aufgelistet. Die simulierten Ionen eines m/z 202 starten jeweils auf der GC-Transferline.

Tabelle 6.11: Eingangsparameter für die numerischen Simulationen der Iontrajektorien

	SSSA		<i>nano-GC-Cap</i>
	low DG	high DG	
	Abb.3.12a	Abb.3.12b	Abb.3.13b
Ionenanzahl		150	150
Ionenmasse [m/z]		202	202
Kapillarspannung [V]		-1000	-1000
Sprayshieldspannung [V]		0	0
Drygasgeschwindigkeit [m s^{-1}]	0,0	0,1556	0,2
Drygasfluss [L min^{-1}]	0,0	3,2	4,1

6.12.3 Simulationsbedingungen für die Simulation von Gasflüssen für verschiedene Einlassgeometrien bei GC-API: Abbildungen 3.13a (*nano-GC-Cap*) und 3.14 (weiterentwickelte SSSA)

Die Drygasflussgeschwindigkeit und -richtung wurde mit dem Programm COMSOL Multiphysics für die *nano-GC-Cap* und die weiterentwickelte SSSA simuliert und visualisiert. Die Eingangsparameter für die Drygasgeschwindigkeit in die Simulationsrechnung sind $0,2 \text{ m s}^{-1}$ für Abbildung 3.13a und $0,15 \text{ m s}^{-1}$ für Abbildung 3.14. Als Einsauggeschwindigkeiten der MS-Einlasskapillare wurde in beiden Fällen 80 m s^{-1} und als austretende Gasgeschwindigkeit aus dem Verdampfer der Ionenquelle $0,25 \text{ m s}^{-1}$ – jeweils für Stickstoff – ausgewählt. Die Flussvektoren sind in beiden Abbildungen als rote Pfeile dargestellt.

6.12.4 Simulationsbedingungen für die Simulation fluiddynamisch modellierter Gasflüsse und -geschwindigkeiten im Vergleich zur BOS bei SFC-APLI: Abbildung 3.54b

Die Simulation des fluiddynamischen Modells der Gasflüsse und -geschwindigkeiten des Versuchsaufbaus der SFC-APLI über die GC-Transferline wurde mit dem Programm COMSOL Multiphysics simuliert und visualisiert. Als Eingangsparameter für die Simulation wurden

Stickstoffgasgeschwindigkeiten von $0,01 \text{ m s}^{-1}$ aus dem Verdampfer der Ionenquelle sowie 127 m s^{-1} aus der Restriktionskapillare der Transferline gewählt. Für die Einsauggeschwindigkeit der MS-Einlasskapillare wurde eine Stickstoffgasgeschwindigkeit von 80 m s^{-1} angenommen. Stickstoff wurde als aus der Restriktionskapillare austretendes Gas gewählt, weil für dieses Modell kein Diffusions-/Konvektionsmodell für eine zweite Gasart (im speziellen Fall CO_2) zur Verfügung stand.

6.13 Lösungen, Verdünnungen und Mischungen

Stammlösungen wurden durch (analysen-)genaues Abwiegen der Reinsubstanz auf einer Feinwaage und anschließendem Lösen in einem bekannten Volumen eines geeigneten Lösungsmittels angesetzt. Die Stammlösungen wurden ggf. mit einem geeigneten Lösungsmittel auf kleinere Konzentrationen verdünnt. Mischungen wurden aus den Stammlösungen oder ihren Verdünnungen hergestellt oder kommerziell erworben und ggf. mit einem geeigneten Lösungsmittel verdünnt.

7 Anhang

7.1 Geräte

7.1.1 Massenspektrometer

- micrOTOF, orthogonal beschleunigendes Flugzeitmassenspektrometer
Bruker Daltonik GmbH, Bremen, DE
- esquire6000, Massenspektrometer mit Quadrupolionenfalle
Bruker Daltonik GmbH, Bremen, DE
- Axima Performance, MALDI CID MS/MS (TOF/TOF)
Shimadzu Biotech, Manchester, UK

Ionenquellen

- MPIS, Multimode-Ionenquelle
- TC-MPIS, temperaturkontrollierbare Multimode-Ionenquelle
- LFIS, Laminarflussionensquelle
Konstruiert und gefertigt von der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal, DE
- Temperaturregelung durch:
- HT-MC1, Mikroprozessor-Temperaturregler für Pt-100-Temperaturfühler
Horst GmbH, Lorsch, DE

7.1.2 Laser

- ATL-ATLEX SI 300, KrF*-Excimerlaser, $\lambda = 248$ nm
ATL Lasertechnik GmbH, Wermelskirchen, DE
- DPSS-Laser, Diodengepumpter, Nd:YAG-Festkörperlaser, $\lambda = 266$ nm
Crylas GmbH, Berlin, DE

7.1.3 Chromatographie

HPLC

- L 6000 A, HPLC-Doppelkolbenpumpe für isokratische Elution
- L 6200 A, 3-Kanal HPLC-Doppelkolbenpumpe für Gradientenelution
Merck-Hitachi, Hitachi Instrument Division Ltd., Tokyo, JP

GC

- GC7890A, Gaschromatograph mit Split/Splitless-Injektor und elektronischer Druckkontrolle
Agilent Technologies Inc., Shanghai, CN

SFC

- Infinity 1260 SFC, SFC-System
- Aurora Fusion A5, Rückdruckregulator und CO₂-Bereitstellung
Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, DE

7.1.4 Chromatographische Säulen und Restriktionskapillaren

7.1.4.1 HPLC- und SFC-Trennsäulen

- Pinnacle II PAH, (50 mm × 4,6 mm, Partikelgröße: 5 µm)
Restek Co., Bellefonte, PA, US
- Luna 3 µ NH₂ 100 Å, 150 mm × 2 mm, Partikelgröße: 3 µm
- Kinetex C18, Core-Shell-Trennsäule (75 mm × 3 mm, Partikelgröße: 2,6 µm)
Phenomenex Inc., Torrance, CA, US
- HALO C18, Core-Shell-Trennsäule (30 mm × 4,6 mm, Partikelgröße: 2,7 µm)
Advanced Materials Technology Inc., Wilmington, DE, US
- Agilent Zorbax PAH, 250 mm × 4,6 mm, Partikelgröße: 5 µm
- Agilent Zorbax C18, 250 mm × 4,6 mm, Partikelgröße: 5 µm
- Zorbax RX-Sil, 150 mm × 4,6 mm, Partikelgröße: 5 µm
- Zorbax RX-Sil, 250 mm × 4,6 mm, Partikelgröße: 5 µm
Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, US

7.1.4.2 GC-Kapillarsäulen

- DB-EUPAH, Dünnschichtkapillarsäule (20 m, ID: 0,18 mm, Filmdicke: 0,14 µm)
Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, US
- HP5-MS, Dünnschichtkapillarsäule (20 m, ID: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm)
Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, US
- ZB-5-HT Inferno, Dünnschichtkapillarsäule (30 m, ID: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm)
Phenomenex Inc., Torrance, CA, US

7.1.4.3 Restriktionskapillaren für SFC

- unbelegte oder desaktivierte Kapillaren der folgenden Hersteller
(ID: 15, 20, 25, 50 150, 180, 250 und 530 µm)
SGE Analytical Science, Melbourne, AU

BGB Analytik AG, Boeckten, CH

CS - Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, DE

7.1.4.4 SPE-Kartuschen

- ABS-Elut Nexus 3 mL
Varian GmbH, Darmstadt, DE
- SEP-Pak C18, 360 mg, 55 - 105 µm Partikelgröße
Waters Corp., Milford, MA, US

7.1.5 Gasflussregler und -kontroller

- EL-FLOW select, Massenflussregler für Gase (5 NL min^{-1})
Bronkhorst Mättig GmbH, Kamen, DE
- MassFlo-Controller; Massenflussregler für Gase (10 bis $10 \cdot 10^3 \text{ sccm min}^{-1}$)
- MultiGasController 647C, Steuereinheit für MassFlo-Controller
MKS Instruments Deutschland GmbH, München, DE
- ADM 1000 Flow Meter, Gasflussmessgerät
Agilent Technologies, Wilmington, DE, US

7.1.6 EDV-Systeme und Software

EDV-Hardware (Auswahl)

- Intel Xeon; 3.20 GHz; 3 GB RAM mit Microsoft Windows XP SP3, 2002
- Intel Core 2; 2,4 GHz GHz; 3 GB RAM mit Microsoft Windows XP SP3, 2002
Hewlett-Packard Development Company L. P., Palo Alto, CA, US
- MacBookPro13", Frühjahr 2011, Intel Core i7; 2,7 GHz; 8 GB RAM
mit Mac OS X Lion 10.7.5
Apple Inc., Cupertino, CA, US

Software (Auswahl)

- DataAnalysis 3.3, Bruker Daltonik GmbH, 2005, Bremen, DE
- DataAnalysis 4.0, Bruker Daltonik GmbH, 2008, Bremen, DE
- micrOTOF-Control Version 1.1, Bruker Daltonik GmbH, 2005, Bremen, DE
- esquireControl Version 6.1, Bruker Daltonik GmbH, 2007, Bremen, DE
- Launchpad software Version 2.8.3, Shimadzu Biotech, Manchester, UK
- matlab R2010a, R2011a & R2013a, The MathWorks Inc., Natick, MA, US
- Chemdraw Ultra, Version 7.0.1, CambridgeSoft Co., Cambridge, MA, US

7.1.7 Sonstige Materialien

- KDS100, Spritzenpumpe
KD Scientific, Holliston, MA, US

- 789100C, Spritzenpumpe
Cole Parmer, Vernon Hills, IL, US
- Kieselgelpplatten TLC Silica gel 60 F₂₅₄
- poröses Kieselgel LiChroprep Si60 15-25 µm
Merck KGaA, Darmstadt, DE
- Voltcraft PSP 1803, getaktetes Labornetzteil (0 - 80 V DC, 0 - 2,5 A, 200 W)
Conrad Electronic SE, Hirschau, DE
- GenPure 08.2207 UV-TOC/UF, Aufbereitungsanlage für Reinstwasser
TKA, Niederelbert, DE
- desaktivierte Universalverbinder
- T-Stücke, Kapillaren und Kapillarverbinder aus PEEK
CS-Chromatographie Service, Langerwehe, DE
- Kapillarsäulenverbinder (zweifach 0,25 mm ID)
- Stahlkapillaren (verschiedene ID)
- Verbinder für Stahlkapillaren
SGE Analytical Science, Melbourne, AU
- Transferpette, Kolbenhubpipette (1 bis 5000 µL)
- Pipettenspitzen
Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
- Finnpette, Kolbenhubpipette (100 µL)
ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
- Kolbenhubpipette (100 bis 5000 µL)
- Reaktionsgefäße
Eppendorf AG, Hamburg, DE
- Pasteurpipetten aus Glas (20 cm)
VWR International GmbH, Darmstadt, DE
- Einmalpipetten (2 mL)
- Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2, 15 und 50 mL)
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE

7.2 Chemikalien

7.2.1 Synthetisierte Substanzen

An der Bergischen Universität Wuppertal wurden u. a. die nachfolgenden Substanzen über verschiedene Syntheserouten hergestellt, chromatographisch oder mit anderen geeigneten Verfahren aufgereinigt, getrocknet und die Identität unter anderem über eine Massenbestimmung (ESI-MS oder APLI-MS) und Kernresonanzspektroskopie (400 MHz bzw. 600 MHz) sichergestellt (Ergebnisse der Massenbestimmung und NMR sind hier nicht abgebildet).

- (Anthracen-9-yl)-methoxyessigsäure (**16**)
- (Anthracen-9-yl)-methoxyessigsäuremethylester (**20**)
- (Anthracen-9-yl)-methoxyessigsäure-3-pyridin-3-yl-propylester (**18**)
- (Anthracen-9-yl)-propionsäure (**19**)
- (Anthracen-9-yl)-propionsäuremethylester (**21**)
- (Anthracen-9-yl)-propionsäure-*N*-succinimidester (**4**)
- (Anthracen-9-yl)-propionsäureglycinamid (**5**)
- (Anthracen-9-yl)-propionsäureserinamid (**6**)
- (Anthracen-9-yl)-propionsäureleucinamid (**7**)
- 1-(3-Anthracen-9-yl-propionyl)-1,3-dicyclohexylharnstoff (**22**)
- 1,3,5-Tris((5-(7-(thiophen-2-yl)benzo[*c*][1,2,5]thiadiazol-4-yl)thiophen-2-yl)ethinyl)-benzol (**23**)
- Bis(2-phenylpyridino)-(6-[3,6-bis(4-hydroxyphenyl)-carbazol-9-yl]-5-hydroxo-2,2-dimethyl-hex-4-en-3-on)-iridium(III) (**24**)
- 9,9,9',9',9'',9''-Hexaoctyl-9*H*,9'*H*,9''*H*-[2,2',7',2'']terfluoren (**25**)
- 7-Monobrom-9,9,9',9',9'',9''-hexaoctyl-9*H*,9'*H*,9''*H*-[2,2',7',2'']terfluoren (**26**)
- 7,7''-Dibrom-9,9,9',9',9'',9''-hexaoctyl-9*H*,9'*H*,9''*H*-[2,2',7',2'']terfluoren (**27**)
- X,7,7''-Tribrom-9,9,9',9',9'',9''-hexaoctyl-9*H*,9'*H*,9''*H*-[2,2',7',2'']terfluoren (**28**)

7.2.2 Reinsubstanzen und Lösungsmittel

In den nachfolgenden Tabellen sind die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel inklusive Summenformel, CAS¹-Nummer, Reinheit und Hersteller aufgeführt. Die Reinheitsangabe bezieht sich auf die Angabe des Herstellers. Eine Aufschlüsselung der Herstellerkennzeichen erfolgt im Anschluss an die Tabelle.

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]	Hersteller
34	Acenaphthylen	C ₁₂ H ₈	208-96-8	97	a
35	Acetonitril	C ₂ H ₃ N	75-05-8	99,9	g
36	Acridin	C ₁₃ H ₉ N	260-94-6	98,5	a
29	Anthracen	C ₁₄ H ₁₀	120-12-7	99,9	c
37	Anthracen-d10	C ₁₄ D ₁₀	1719-06-8	99,5	a
8	Anthracen-9-methanol	C ₁₅ H ₁₂ O	1468-95-7	97	b
38	Benzo[<i>a</i>]pyren	C ₂₀ H ₁₂	50-32-8	98	b
39	Benzo[<i>a</i>]pyren-d12	C ₂₀ D ₁₂	63466-71-7	99,0	a
40	Benzo[<i>e</i>]pyren	C ₂₀ H ₁₂	192-97-2	99,5	a
41	Chinolin	C ₉ H ₇ N	91-22-5	99,0	a
42	Chloranthracen, 1-	C ₁₄ H ₉ Cl	4985-70-0	97	d

¹Chemical Abstracts Service-Nummer - Internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Substanzen

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]	Hersteller
43	Chloroform-d1	CDCl ₃	865-49-6	99,8*	b
44	Chrysen	C ₁₈ H ₁₂	218-01-9	99,2	a
45	Chrysen-d12**	C ₁₈ D ₁₂	1719-03-5	98,5	a
46	Coronen	C ₂₄ H ₁₂	191-07-1	99,5	a
46	Coronen	C ₂₄ H ₁₂	191-07-1	97	d
47	Cyclohexan	C ₆ H ₁₂	110-82-7	99,8	f
48	Dichlormethan	CH ₂ Cl ₂	75-09-2	99,80	l
32	Dicyclohexylcarbodiimid, <i>N,N'</i> - Diesel o. Additive nach DIN H53	C ₁₃ H ₂₂ N ₂	538-75-0	99 100	g a
49	Dihydroxybenzoesäure, 2,5-	C ₇ H ₆ O ₄	490-79-9	≥99,5	b
50	Diisopropylethylamin	C ₈ H ₁₉ N	7087-68-5	99,5	b
33	Dimethylpyridin-4-amin, <i>N,N'</i> -	C ₇ H ₁₀ N ₂	1122-58-3	99	i
15	Dimethylantracen, 9,10-	C ₁₆ H ₁₄	781-43-1	99	d
30	Dimethylbenz[<i>c</i>]acridin, 7,9-	C ₁₉ H ₁₅ N	963-89-3	techn.	d
12	Dimethylnaphthalin, 1,2-	C ₁₂ H ₁₂	573-98-8	95	a
11	Dimethylnaphthalin, 1,4-	C ₁₂ H ₁₂	571-58-4	95	a
51	Essigsäureethylester	C ₄ H ₈ O ₂	141-78-6	99,93	m
14	Ethylantracen, 2-	C ₁₆ H ₁₄	52251-71-5	98	d
10	Ethyl-naphthalin, 2-	C ₁₂ H ₁₂	939-27-5	99,5	a
52	Fluoranthren	C ₁₆ H ₁₀	206-44-0	99	d
53	Fluoren	C ₁₃ H ₁₀	86-73-7	95	h
1	Glycin	C ₂ H ₅ O ₂ N	56-40-6	99,7	f
54	Heptan	C ₇ H ₁₆	142-82-5	99,0	g
55	Hexan	C ₆ H ₁₄	110-54-3	97	g
56	Hydroxypyren, 1-	C ₁₆ H ₁₀ O	5315-79-7	98	b
57	Iodacetonitril	C ₂ H ₂ NI	624-75-9	98	b
58	Kohlenstoffdioxid	CO ₂	124-38-9	99,995 (4.5)	j
3	Leucin, L-	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	61-90-5	> 99	g
59	Magnesiumsulfat	MgSO ₄	7487-88-9	70	f
60	Methanol	CH ₄ O	67-56-1	99,90	k
13	Methylantracen, 1-	C ₁₅ H ₁₂	610-48-0	99,5	a
9	Methylnaphthalin, 1-	C ₁₁ H ₁₀	90-12-0	99,5	a
61	Naphthalin-d8	C ₁₀ D ₈	1146-65-2	99,3	a
62	Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	99,5	e
31	Nicotin	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	54-11-5	99	b
63	Perylen	C ₂₀ H ₁₂	198-55-0	99,0	a

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]	Hersteller
64	Phenanthren	C ₁₄ H ₁₀	85-01-8	98-99	c
65	Propionitril	C ₃ H ₅ N	107-12-0	99	b
66	Pyren	C ₁₆ H ₁₀	129-00-0	99	c
67	Pyren-d10	C ₁₆ D ₁₀	1718-52-1	99	a
68	Ribose, D-	C ₅ H ₁₀ O ₅	50-69-1	99	b
2	Serin, L-	C ₃ H ₇ O ₃ N	56-45-1	> 99	f
69	Tetrahydrofuran	C ₄ H ₈ O	109-99-9	99,9	k
70	Triethylamin	C ₆ H ₁₅ N	121-44-8	99,5	b
71	Triethylphosphin	C ₆ H ₁₅ P	554-70-1	99	b
72	Trifluoressigsäure Silbersalz	C ₂ O ₂ F ₃ Ag	2966-50-9	99,99	b
73	Trihydroxyanthracen, 1,2,10-	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	577-33-3	85	b
74	Trihydroxyanthracen, 1,8,9-	C ₁₄ H ₁₀ O ₃	1143-38-0	≥98,5	b

* Atom-% D **als 10 ng µL⁻¹-Lösung in ACN

Herstellerliste:

- a : Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, DE
- b : Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
- c : EGA-Chemie, Steinheim, DE
- d : Sigma-Aldrich Co. Inc., Milwaukee, WI, US
- e : Grüssing GmbH Analytika, Filsum, DE
- f : Merck KGaA, Darmstadt, DE
- g : Fluka Chemie AG, Buchs, CH
- h : Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, DE
- i : Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
- j : AirLiquide GmbH, Düsseldorf, DE
- k : Karl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
- l : VWR International, Leuven, BE
- m : Fisher Scientific UK, Loughborough, Leics, UK

7.2.3 Mischungen

In den nachfolgenden Tabellen sind die verwendeten PAK-Mischungen aufgeführt. Die angegebenen Konzentrationen und die Reinheit beziehen sich auf die Angaben des Herstellers (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, DE).

PAK-Mix 9 (deuteriert)

US-EPA-PAK-Mischung (deuteriert, Reinheit $\geq 95\%$) mit jeweils 10 mg L^{-1} in Cyclohexan

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.
75	Acenaphthen-d10	$\text{C}_{12}\text{D}_{10}$	15067-26-2
76	Acenaphthylen-d8	C_{12}D_8	93951-97-4
37	Anthracen-d10	$\text{C}_{14}\text{D}_{10}$	1719-06-8
77	Benz[a]anthracen-d12	$\text{C}_{18}\text{D}_{12}$	1718-53-2
78	Benzo[b]fluoranthren-d12	$\text{C}_{20}\text{D}_{12}$	93951-98-5
79	Benzo[k]fluoranthren-d12	$\text{C}_{20}\text{D}_{12}$	93952-01-3
80	Benzo[ghi]perylen-d12	$\text{C}_{22}\text{D}_{12}$	93951-66-7
39	Benzo[a]pyren-d12	$\text{C}_{20}\text{D}_{12}$	63466-71-7
45	Chrysen-d12	$\text{C}_{18}\text{D}_{12}$	1719-03-5
81	Dibenz[ah]anthracen-d14	$\text{C}_{22}\text{D}_{14}$	13250-98-1
82	Fluoranthren-d10	$\text{C}_{16}\text{D}_{10}$	93951-69-0
83	Fluoren-d10	$\text{C}_{13}\text{D}_{10}$	81103-79-9
84	Indeno[1,2,3-cd]pyren-d12	$\text{C}_{22}\text{D}_{12}$	203578-33-0
61	Naphthalin-d8	C_{10}D_8	1146-65-2
85	Phenanthren-d10	$\text{C}_{14}\text{D}_{10}$	1517-22-2
67	Pyren-d10	$\text{C}_{16}\text{D}_{10}$	1718-52-1

PAK-Mix 14

US-EPA-PAK-Mischung plus 1- & 2-Methylnaphthalin mit jeweils 10 mg L^{-1} in Cyclohexan

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]
86	Acenaphthen	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}$	83-32-9	99,5
34	Acenaphthylen	C_{12}H_8	208-96-8	99,0
29	Anthracen	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}$	120-12-7	98,5
87	Benz[a]anthracen	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}$	56-55-3	99,0
88	Benzo[b]fluoranthren	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$	205-99-2	99,0
89	Benzo[k]fluoranthren	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$	207-08-9	99,0
90	Benzo[ghi]perylen	$\text{C}_{22}\text{H}_{12}$	191-24-2	99,5
38	Benzo[a]pyren	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$	50-32-8	99,0
44	Chrysen	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}$	218-01-9	99,0

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]
91	Dibenz[ah]anthracen	C ₂₂ H ₁₄	53-70-3	99,5
52	Fluoranthen	C ₁₆ H ₁₀	206-44-0	98,5
53	Fluoren	C ₁₃ H ₁₀	86-73-7	99,0
92	Indeno[1,2,3-cd]pyren	C ₂₂ H ₁₂	193-39-5	99,0
93	Methylnaphthalin, 1-	C ₁₁ H ₁₀	90-12-0	98,0
94	Methylnaphthalin, 2-	C ₁₁ H ₁₀	91-57-6	99,5
95	Naphthalin	C ₁₀ H ₈	91-20-3	99,5
64	Phenanthren	C ₁₄ H ₁₀	85-01-8	99,5
66	Pyren	C ₁₆ H ₁₀	129-00-0	99,0

PAK-Mix 31

Deuterierte PAK-Mischung zum Einsatz als interner Standard mit jeweils 1000 mg L⁻¹ in Toluol

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]
75	Acenaphthen-d10	C ₁₂ D ₁₀	15067-26-2	99,0
45	Chrysen-d12	C ₁₈ D ₁₂	1719-03-5	98,5
61	Naphthalin-d8	C ₁₀ D ₈	1146-65-2	99,5
96	Perylen-d12	C ₂₀ D ₁₂	1520-96-3	99,5
85	Phenanthren-d10	C ₁₄ D ₁₀	1517-22-2	98,5

PAK-Mix 183

EU-priority-PAK-Mischung plus 5-Methylchrysen mit jeweils 10 mg L⁻¹ in Cyclohexan

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]
87	Benz[a]anthracen	C ₁₈ H ₁₂	56-55-3	99,5
88	Benzo[b]fluoranthen	C ₂₀ H ₁₂	205-99-2	99,5
97	Benzo[j]fluoranthen	C ₂₀ H ₁₂	205-82-3	98,5
89	Benzo[k]fluoranthen	C ₂₀ H ₁₂	207-08-9	99,5
98	Benzo[c]fluoren	C ₁₇ H ₁₂	205-12-9	98,2
90	Benzo[ghi]perylen	C ₂₂ H ₁₂	191-24-2	99,0
38	Benzo[a]pyren	C ₂₀ H ₁₂	50-32-8	98,0
44	Chrysen	C ₁₈ H ₁₂	218-01-9	99,0
99	Cyclopenta[cd]pyren	C ₁₈ H ₁₀	27208-37-3	99,0
91	Dibenz[ah]anthracen	C ₂₂ H ₁₄	53-70-3	99,5
100	Dibenzo[a,e]pyren	C ₂₄ H ₁₄	192-65-4	98,8

Lfd. Nr.	Substanz	Summenformel	CAS-Nr.	Reinheit [%]
101	Dibenzo[<i>a,h</i>]pyren	C ₂₄ H ₁₄	189-64-0	99,0
102	Dibenzo[<i>a,i</i>]pyren	C ₂₄ H ₁₄	189-55-9	99,9
103	Dibenzo[<i>a,l</i>]pyren	C ₂₄ H ₁₄	191-30-0	99,0
92	Indeno[<i>1,2,3-cd</i>]pyren	C ₂₂ H ₁₂	193-39-5	99,0
104	Methylchrysen, 5-	C ₁₉ H ₁₄	3697-24-3	99,5

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Schema der Photonenanregung / -ionisation	13
1.2	Phasendiagramm von CO ₂	15
1.3	Numerische Lösung der vereinfachten, erweiterten Golay-Gleichung für HPLC, SFC und GC	19
1.4	Übersicht über die Einsatzmöglichkeiten der SFC	21
1.5	Verschiedene Metabolismusregionen an PAK	24
3.1	Explorative CAD-Zeichnung der TC-MPIS in GC-Konfiguration	30
3.2	Fotografien des LiF-Fensters zur Lasereinkopplung bei hohen H ₂ O-Gehalten und versch. Temperaturen	32
3.3	Vergleich von TIC-Basislinien der HPLC-APLI bei 45 °C und 110 °C	32
3.4	Eingesetzte Aminosäuren zur Derivatisierung	33
3.5	Ionisationsmarker zur Derivatisierung von AS: APA-NHS 4	33
3.6	HPLC-APLI-Chromatogramme der Aminosäurederivate bei 45 °C und 110 °C	34
3.7	Numerische Simulation der Gasgeschwindigkeit und zeitintegrierten Fluidpakete in der MPIS	37
3.8	CAD-Zeichnung und Fotografie des <i>elevated floor</i> in der MPIS	38
3.9	HPLC-APLI-Chromatogramme der Versuchsreihe mit <i>elevated floor</i>	39
3.10	<i>S/N</i> , Peakbasis- und -halbhöhenbreite der HPLC-APLI-Experimente mit <i>elevated floor</i>	40
3.11	Schematische Darstellung des Einlassbereichs und Fotografie verschiedener Bauteile der MS-Einlassstufe	42
3.12	Simulation der Ionentrajektorien für verschiedene MS-Einlassgeometrien	43
3.13	Numerische Simulationen der Gasflüsse, -geschwindigkeiten und Feldgradienten für die <i>nano-GC-Cap</i>	44
3.14	Numerische Simulation der Gasgeschwindigkeit und Flussfelder (weiterentwickelte SSSA)	45
3.15	GC-APLI-Chromatogramme für verschiedene Einlassgeometrien und Drygasflüsse	45
3.16	Vergleich der mittleren Peakfläche in Abhängigkeit des Drygasflusses und verschiedener MS-Einlassgeometrien bei GC-APLI	46
3.17	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Suppressionsmessung	48
3.18	Vergleich der Suppression bei HPLC-APCI und HPLC-APLI	49
3.19	Schematische Zeichnung eines oa-(TOF)MS	50

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

3.20	GC-APLI-Chromatogramm einer Analyse von 7 Alkyl-PAK	54
3.21	Massenspektren von Alkyl-Naphthalinen aus einer GC-APLI-Analyse	55
3.22	Massenspektren von Alkyl-Anthracenen aus einer GC-APLI-Analyse	56
3.23	APLI-QIT-Massenspektren von 1-Methylnaphthalin	58
3.24	APLI-QIT-Massenspektren von 1-Methylanthracen	59
3.25	HPLC-APLI-Chromatogramm und Struktur von 18	62
3.26	Strukturen zweier Ionisationsmarker für die APLI-MS	62
3.27	Ergebnisse der <i>ab-initio</i> -Berechnungen für verschiedene Bindungsbrüche in 20	63
3.28	Ergebnisse der <i>ab-initio</i> -Berechnungen für verschiedene Bindungsbrüche in 21	63
3.29	APLI-QIT-Massenspektren von 20	64
3.30	APLI-QIT-Massenspektren von 21	64
3.31	Fotografien der verwendeten Lasersysteme	67
3.32	HPLC-APLI-Chromatogramme für den Vergleich der beiden Lasersysteme	69
3.33	Fotografie des montierten DPSS-Lasers	71
3.34	DIA bei HPLC-APLI für drei Analyten, Flussrate $0,25 \text{ mL min}^{-1}$	72
3.35	DIA bei HPLC-APLI für drei Analyten, Flussrate $0,75 \text{ mL min}^{-1}$	73
3.36	Vergleich der Laserstrahlausmaße und orts aufgelöste DIA bei GC-APLI	74
3.37	Fotografien der aus der Transferline austretenden GC-Säule bei untersch. Ofentemperaturen	75
3.38	Schema der verwendeten QuEChERS-Extraktionsmethode	77
3.39	GC-APLI-Chromatogramme einer Muschelextraktion mit beiden Lasern	78
3.40	GC-APLI-Chromatogramme von PAK-Massenspuren mit MICEE	80
3.41	Molekülstruktur der Verbindung 22	81
3.42	GC-APLI-Chromatogramme von PAK-Massenspuren mit Zusatz von 22 für einen induzierten MICEE	81
3.43	Molekülstruktur der Verbindung 23	83
3.44	Vergleich der APLI- und MALDI-Massenspektren von 23	83
3.45	Molekülstruktur der Verbindung 24	84
3.46	Vergleich der Massenspektren eines org. Ir-Komplexes mit beiden Lasern	85
3.47	Grundstruktur der Verbindung 25	86
3.48	Vergleich der Massenspektren zur Bestimmung des Bromierungsgrades eines org. Polymerbausteins	86
3.49	Vergleich der Massenspektren zur Bestimmung des Bromierungsgrades eines org. Polymerbausteins mit Excimer- und DPSS-Laser	87
3.50	Fotografie des SFC-APLI-Aufbaus	91
3.51	Schematischer Aufbau der SFC-APLI	92
3.52	SFC-APLI-Chromatogramm des ersten Tests mit Chrysen-d12	93
3.53	SFC-APLI-Chromatogramme zum qualitativen Vergleich zwischen $25 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m}$ ID fs-Restriktionskapillare	95
3.54	BOS und numerische Simulation der SFC-APLI-Kopplung	98

3.55	Desaktivierte Verbindertypen für fs-Kapillaren	99
3.56	SFC-APLI-Chromatogramme bei verschiedenen Austrittskapillar-ID	100
3.57	SFC-APLI-Chromatogramme zum Vergleich unterschiedlicher Restriktionskapillarlängen	102
3.58	SFC-APLI-Chromatogramme zum Vergleich versch. GC-Ofentemperaturen . .	104
3.59	Peakfläche des Phenanthren-d10-Peaks in Abhängigkeit des Sheathgasflusses bei SFC-APLI	105
3.60	SFC-APLI-Chromatogramme zum Vergleich versch. Verdampfergasdrücke . .	107
3.61	Typisches SFC-APLI-Chromatogramm einer d-PAK-Mischung	109
3.62	Vergleich der Linearität von Chrysen bei SFC- und HPLC-APLI	112
3.63	Typische SFC-APLI-Chromatogramme eines Muschelextrakts (TIC und EIC)	115
3.64	Massenspektrum von 1-HP mit HPLC-APLI-(TOF)MS	118
3.65	Vom Phenol abgeleiteter möglicher Fragmentationsweg für 1-HP	118
3.66	Massenspektrum von 1-HP mit SFC-APLI-(TOF)MS	119
3.67	Vergleich der Analyse derselben 1-Hydroxypyrenlösung mit HPLC- und SFC-APLI-(TOF)MS	120
3.68	Linearität des 1-HP-Signals bei SFC-APLI	121
3.69	SFC-APLI-Chromatogramme von Urinextrakten mit und ohne zudotiertem 1-HP	122
6.1	Derivatisierung von Aminosäuren mit 4	139
6.2	Veresterung der Ionisationsmarker 16 & 19 zu den Methylestern	139

TABELLENVERZEICHNIS

1.1	Thermodynamische Daten ausgesuchter superkritischer Substanzen	14
1.2	Charakteristische Stoffdaten von Gasen, Flüssigkeiten und superkritischen Fluiden	16
3.1	Zusammensetzung einer synthetischen Mischung verschiedener Alkyl-PAK	54
3.2	Ergebnisse der <i>ab-initio</i> -Berechnung für 1-Me-Naphthalin und 1-Me-Anthracen	60
3.3	Ergebnisse der <i>ab-initio</i> -Berechnungen für weitere Alkyl-PAK	61
3.4	Ergebnisse der <i>ab-initio</i> -Berechnung für die Bruchstellen in 20	63
3.5	Ergebnisse der <i>ab-initio</i> -Berechnung für die Bruchstellen in 21	63
3.6	Vergleich verschiedener Parameter des DPSS- und des Excimerlasers	66
3.7	Vergleich der <i>S/N</i> bei HPLC-APLI mit beiden Lasersystemen	70
3.8	Vergleich der Gasaustrittsparameter bei GC und SFC	98
3.9	Berechnetes Splitverhältnis und relative Peakflächen in Abhängigkeit der Restriktionskapillarlänge	102
3.10	Vergleich der Peakhalbwertsbreiten bei SFC- und HPLC-APLI	109
3.11	Vergleich der Nachweisgrenzen bei HPLC-, GC- und SFC-APLI	111
3.12	Vergleich der Reproduzierbarkeit (Peakfläche & Retentionszeit) bei SFC- und HPLC-APLI	113
3.13	Vergleich der ermittelten PAK-Gehalte in Muscheln mit den Referenzwerten	116
6.1	Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analyse von Alkyl-PAK	127
6.2	Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analyse für die Evaluation des Einflusses von Drygas bei verschiedenen MS-Einlassgeometrien	128
6.3	Temperaturprogramm der gaschromatographischen Analyse von PAK in komplexen Proben (z. B. Muschelextrakten)	129
6.4	Gradient zur Trennung komplexer PAK-Gemische mit HPLC-APLI	130
6.5	Gradient für die Analyse derivatisierter Aminosäuren mit HPLC-APLI	132
6.6	Parameter für erste SFC-APLI-Experimente	133
6.7	Parameter der SFC-APLI zur Analyse von PAK-Mix 31	134
6.8	Variable Parameter der SFC-APLI-Experimente zur Optimierung des Systems	134
6.9	SFC-APLI-Gradientenprogramm für die Analyse komplexer PAK-Mischungen	135
6.10	SFC-Gradientenprogramm für die Analyse von 1-HP in Urinextrakten	135
6.11	Eingangsparameter für die numerischen Simulationen der Ionentrajektorien	142

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. J. Cotter, *Time-of-flight mass spectrometry: instrumentation and applications in biological research*, American Chemical Society, Washington, D.C., **1997**.
- [2] K. Cammann, *Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 1. Aufl., Nachdr., **2010**.
- [3] J. H. Gross, *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [4] H. Budzikiewicz, M. Schäfer, *Massenspektrometrie: eine Einführung*, Wiley-VCH, Weinheim, 5. vollst. überarb. und aktualisierte Aufl., Nachdr., **2010**.
- [5] J. J. Thomsom, *Rays of positive electricity and their application to chemical analysis*, (Hrsg.: M. A. Grayson), American Society for Mass Spectrometry, **2013, originally in 1913**.
- [6] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, 7. überarb. Aufl., **2005**.
- [7] G. Schwedt, *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Thieme, Stuttgart, **1995**.
- [8] H. Naumer, W. Heller, *Untersuchungsmethoden in der Chemie: Einführung in die moderne Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim, 3. erw. und Neubearb. Aufl., **2002**.
- [9] M. Otto, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 4. überarb. und erg. Aufl., **2011**.
- [10] Q. Z. Hu, R. J. Noll, H. Y. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, "The Orbitrap: a new mass spectrometer", *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 430–443.
- [11] W. E. Stephens, "A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion", *Physical Review* **1946**, *69*, 691–691.
- [12] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski, "Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry", *Mass Spectrometry Reviews* **2000**, *19*, 65–107.
- [13] M. Guilhaus, "Principles and Instrumentation in Time-Of-Flight Mass-Spectrometry - Physical and Instrumental Concepts", *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 1519–1532.
- [14] persönliche Mitteilung: Schmitz, O. J. (Universität Duisburg-Essen), Wuppertal, **2013**.
- [15] S. Lacorte, A. R. Fernandez-Albaz, "Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food", *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25*, 866–880.

LITERATURVERZEICHNIS

- [16] D. I. Carroll, I. Dzidic, E. C. Horning, R. N. Stillwell, "Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry", *Applied Spectroscopy Reviews* **1981**, *17*, 337–406.
- [17] L. Sleno, D. A. Volmer, "Ion activation methods for tandem mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 1091–1112.
- [18] H. H. Maurer, "Liquid chromatography mass spectrometry in forensic and clinical toxicology", *Journal of Chromatography B* **1998**, *713*, 3–25.
- [19] K. W. D. Ledingham, R. P. Singhal, "High intensity laser mass spectrometry - A review", *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, *163*, 149–168.
- [20] D. M. Lubman, *Lasers and mass spectrometry*, Oxford University Press, New York, **1990**.
- [21] J. Abian, "The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 157.
- [22] A. P. Bruins, "Mass-Spectrometry with Ion Sources Operating at Atmospheric-Pressure", *Mass Spectrometry Reviews* **1991**, *10*, 53–77.
- [23] M. Yamashita, J. B. Fenn, "Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme", *Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 4451–4459.
- [24] J. Griffiths, "A brief history of mass spectrometry", *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 5678–5683.
- [25] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, "Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers", *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 675–679.
- [26] L. Tang, P. Kebarle, "Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass-Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution", *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 3654–3668.
- [27] J. B. Fenn, "Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)", *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 3871–3894.
- [28] M. Constapel, M. Schellentrager, O. J. Schmitz, S. Gäb, K. J. Brockmann, R. Giese, T. Benter, "Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 326–336.
- [29] J. Y. Cai, J. Henion, "Elucidation of LSD in vitro metabolism by liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry", *Journal of Analytical Toxicology* **1996**, *20*, 27–37.

- [30] R. Pacifici, S. Pichini, I. Altieri, A. Caronna, A. R. Passa, P. Zuccaro, "High-Performance Liquid-Chromatographic Electrospray Mass-Spectrometric Determination of Morphine and Its 3-Glucuronides and 6-Glucuronides - Application to Pharmacokinetic Studies", *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **1995**, *664*, 329–334.
- [31] S. L. Zhou, K. D. Cook, "A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: Charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, *12*, 206–214.
- [32] J. F. Garcia-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, A. Molina-Diaz, A. R. Fernandez-Alba, "Searching for non-target chlorinated pesticides in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2780–2788.
- [33] M. Schilling, D. Janasek, J. Franzke, "Electrospray-ionization driven by dielectric polarization", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 555–561.
- [34] E. C. Horning, M. G. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, "New Picogram Detection System Based on A Mass-Spectrometer with An External Ionization Source at Atmospheric-Pressure", *Analytical Chemistry* **1973**, *45*, 936–943.
- [35] P. Hommerson, A. M. Khan, G. J. de Jong, G. W. Somsen, "Ionization Techniques in Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry: Principles, Design, and Application", *Mass Spectrometry Reviews* **2011**, *30*, 1096–1120.
- [36] S. Klee, S. Albrecht, V. Derpmann, H. Kersten, T. Benter, "Generation of ion-bound solvent clusters as reactant ions in dopant-assisted APPI and APLI", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 6933–6951.
- [37] D. I. Carroll, I. Dzidic, R. N. Stillwell, K. D. Haegele, E. C. Horning, "Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry - Corona Discharge Ion-Source for Use in Liquid Chromatograph Mass Spectrometer-Computer Analytical System", *Analytical Chemistry* **1975**, *47*, 2369–2373.
- [38] E. C. Horning, D. I. Carroll, I. Dzidic, K. D. Haegele, M. G. Horning, R. N. Stillwell, "Liquid Chromatograph Mass Spectrometer-Computer Analytical Systems - Continuous-Flow System Based on Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry", *Journal of Chromatography* **1974**, *99*, 13–21.
- [39] H. Itoh, S. Kawasaki, J. Tadano, "Application of liquid chromatography atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry to pesticide analysis", *Journal of Chromatography A* **1996**, *754*, 61–76.
- [40] R. K. Mitchum, W. A. Korfmacher, G. F. Moler, D. L. Stalling, "Capillary Gas-Chromatography Atmospheric-Pressure Negative Chemical Ionization Mass-Spectrometry of the 22 Isomeric Tetrachlorodibenzo-P-Dioxins", *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 719–722.

- [41] T. Portoles, L. Cherta, J. Beltran, F. Hernandez, "Improved gas chromatography-tandem mass spectrometry determination of pesticide residues making use of atmospheric pressure chemical ionization", *Journal of Chromatography A* **2012**, *1260*, 183–192.
- [42] T. Portoles, J. G. J. Mol, J. V. Sancho, F. Hernandez, "Advantages of Atmospheric Pressure Chemical Ionization in Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Pyrethroid Insecticides as a Case Study", *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 9802–9810.
- [43] T. Bristow, M. Harrison, M. Sims, "The application of gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation time-of-flight mass spectrometry to impurity identification in Pharmaceutical Development", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24*, 1673–1681.
- [44] J. F. Anacleto, L. Ramaley, R. K. Boyd, S. Pleasance, M. A. Quilliam, P. G. Sim, F. M. Benoit, "Analysis of Polycyclic Aromatic-Compounds by Supercritical Fluid Chromatography Mass-Spectrometry Using Atmospheric-Pressure Chemical Ionization", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, *5*, 149–155.
- [45] D. Thomas, P. G. Sim, F. M. Benoit, "Capillary Column Supercritical-Fluid Chromatography Mass-Spectrometry of Polycyclic Aromatic-Compounds Using Atmospheric-Pressure Chemical-Ionization", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1994**, *8*, 105–110.
- [46] Y. Takada, M. Sakairi, H. Koizumi, "Atmospheric-Pressure Chemical-Ionization Interface for Capillary Electrophoresis Mass-Spectrometry", *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 1474–1476.
- [47] P. Hommerson, A. M. Khan, G. J. de Jong, G. W. Somsen, "Capillary Electrophoresis-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Using an Orthogonal Interface: Set-Up and System Parameters", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 1311–1318.
- [48] A. Raffaelli, A. Saba, "Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry", *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 318–331.
- [49] J. A. Syage, M. D. Evans, "Photoionization mass spectrometry - A powerful new tool for drug discovery", *Spectroscopy* **2001**, *16*, 14–+.
- [50] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, "Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry", *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3653–3659.
- [51] S. Droste, M. Schellentrager, M. Constapel, S. Gäb, M. Lorenz, K. J. Brockmann, T. Benter, D. Lubda, O. J. Schmitz, "A silica-based monolithic column in capillary HPLC and CEC coupled with ESI-MS or electrospray-atmospheric-pressure laser ionization-MS", *Electrophoresis* **2005**, *26*, 4098–4103.

- [52] J. N. Driscoll, "Evaluation of A New Photoionization Detector for Organic-Compounds", *Journal of Chromatography* **1977**, *134*, 49–55.
- [53] J. N. Driscoll, J. B. Clarici, "New Photoionization Detector for Gas-Chromatography", *Chromatographia* **1976**, *9*, 567–570.
- [54] R. Schiewek, M. Schellentragner, R. Monnikes, M. Lorenz, R. Giese, K. J. Brockmann, S. Gäb, T. Benter, O. J. Schmitz, "Ultrasensitive determination of polycyclic aromatic compounds with atmospheric-pressure laser ionization as an interface for GC/MS", *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4135–4140.
- [55] D. C. Locke, B. S. Dhingra, A. D. Baker, "Liquid-Phase Photo-Ionization Detector for Liquid-Chromatography", *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 447–450.
- [56] J. N. Driscoll, D. W. Conron, P. Ferioli, I. S. Krull, K. H. Xie, "Trace Analysis of Organic-Compounds by High-Performance Liquid-Chromatography with Photoionization Detection", *Journal of Chromatography* **1984**, *302*, 43–50.
- [57] P. Hommerson, A. M. Khan, T. Bristow, M. W. Harrison, G. J. de Jong, G. W. Somsen, "Drug impurity profiling by capillary electrophoresis/mass spectrometry using various ionization techniques", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 2878–2884.
- [58] R. Mol, G. J. de Jong, G. W. Somsen, "On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance", *Electrophoresis* **2005**, *26*, 146–154.
- [59] M. Himmelsbach, M. Haunschmidt, W. Buchberger, C. W. Klampfl, "Microemulsion electrokinetic chromatography with on-line atmospheric pressure photoionization mass spectrometric detection", *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 1564–1568.
- [60] R. Mol, G. J. de Jong, G. W. Somsen, "Atmospheric pressure photoionization for enhanced compatibility in on-line micellar electrokinetic chromatography - Mass spectrometry", *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 5277–5282.
- [61] C. Hutzler, A. Luch, J. G. Filser, "Analysis of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in complex environmental mixtures by LC-APPI-MS/MS", *Analytica Chimica Acta* **2011**, *702*, 218–224.
- [62] T. J. Kauppila, R. Kostianen, A. P. Bruins, "Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 808–815.
- [63] A. Cappiello, *Advances in LC-MS instrumentation*, Elsevier, Amsterdam, 1. ed., **2007**.
- [64] D. Klink, K. J. Brockmann, T. Benter, O. J. Schmitz in Poster MP01-003 at 59th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, **2011**.
- [65] E. Deibel, D. Klink, O. J. Schmitz in Poster MP29-675 at 60th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Vancouver, BC, CAN, **2012**.

LITERATURVERZEICHNIS

- [66] R. Schiewek, R. Mönnikes, V. Wulf, S. Gäb, K. J. Brockmann, T. Benter, O. J. Schmitz, "A Universal Ionization Label for the APLI-(TOF)MS Analysis of Small Molecules and Polymers", *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 9989–9992.
- [67] E. Deibel, Diss., in Bearbeitung - Universität Duisburg-Essen, **2014**.
- [68] R. Schiewek, Diss., urn:nbn:de:hbz:468-20090039 - Bergische Universität Wuppertal, **2008**.
- [69] R. N. Mönnikes, Diss., urn:nbn:de:hbz:468-20090720 - Bergische Universität Wuppertal, **2009**.
- [70] M. Lorenz, R. Schiewek, K. J. Brockmann, O. J. Schmitz, S. Gäb, T. Benter, "The distribution of ion acceptance in atmospheric pressure ion sources: Spatially resolved APLI measurements", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*, 400–410.
- [71] R. D. Smith, J. A. Loo, C. J. Barinaga, C. G. Edmonds, H. R. Udseth, "Collisional activation and collision-activated dissociation of large multiply charged polypeptides and proteins produced by electrospray ionization", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1990**, *1*, 53–65.
- [72] H. J. Heger, R. Zimmermann, R. Dorfner, M. Beckmann, H. Griebel, A. Kettrup, U. Boesl, "On-line emission analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons down to pptv concentration levels in the flue gas of an incineration pilot plant with a mobile resonance enhanced multiphoton ionization time-of-flight mass spectrometer", *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 46–57.
- [73] H. Kersten, M. Lorenz, K. J. Brockmann, T. Benter, "Evaluation of the Performance of Small Diode Pumped UV Solid State (DPSS) Nd:YAG Lasers as New Radiation Sources for Atmospheric Pressure Laser Ionization Mass Spectrometry (APLI-MS)", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*, 1063–1069.
- [74] R. Schiewek, M. Lorenz, R. Giese, K. Brockmann, T. Benter, S. Gäb, O. J. Schmitz, "Development of a multipurpose ion source for LC-MS and GC-API MS", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *392*, 87–96.
- [75] H. Kersten, V. Funcke, M. Lorenz, K. J. Brockmann, T. Benter, R. O'Brien, "Evidence of Neutral Radical Induced Analyte Ion Transformations in APPI and Near-VUV APLI", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 1868–1880.
- [76] P. Schmitt-Kopplin, M. Englmann, R. Rossello-Mora, R. Schiewek, K. J. Brockmann, T. Benter, O. J. Schmitz, "Combining chip-ESI with APLI (cESILI) as a multimode source for analysis of complex mixtures with ultrahigh-resolution mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 2803–2809.
- [77] N. Sethi, A. Anand, G. Jain, K. S. Srinivas, K. K. Chandrul, "Supercritical Fluid Chromatography - A Hybrid of GC and LC", *Chronicales of Young Scientists* **2010**, *1*, 12–22.

- [78] T. L. Chester, J. D. Pinkston, D. E. Raynie, "Supercritical-Fluid Chromatography and Extraction", *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, R106–R130.
- [79] G. Schwedt, C. Vogt, *Analytische Trennmethode*n, Wiley-VCH, Weinheim, 1. Aufl., **2010**.
- [80] M. L. Lee, K. E. Markides, "Chromatography with Supercritical Fluids", *Science* **1987**, *235*, 1342–1347.
- [81] D. R. Lide, *CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data*, CRC Press, Boca Raton, 85. ed, **2004**.
- [82] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Principles of instrumental analysis*, Saunders College Pub., Fort Worth, 4. ed., **1992**.
- [83] C. F. Prutton, S. H. Maron, *Principles of physical chemistry*, Macmillan, New York, 3rd ed. of Fundamental Principles of Physical Chemistry, **1958**.
- [84] C. C. de la Tour, "Exposé de quelques résultats obtenu par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides, tels que l'eau, l'alcool, l'éther sulfurique et l'essence de pétrole rectifiée", *Annales de chimie et de physique* **1822**, *21*, 127–132.
- [85] T. Andrews, "The Bakerian Lecture: On the Continuity of the Gaseous and Liquid States of Matter", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1869**, *159*, 575–590.
- [86] G. Schwedt, *Chromatographische Trennmethode*n: theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen, Thieme, Stuttgart, 3. erw. Aufl., **1994**.
- [87] T. H. Gouw, R. E. Jentoft, "Supercritical Fluid Chromatography", *Journal of Chromatography* **1972**, *68*, 303.
- [88] W. Majewski, E. Valery, O. Ludemann-Hombourger, "Principle and applications of supercritical fluid chromatography", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005**, *28*, 1233–1252.
- [89] Y. Arai, *Supercritical fluids: molecular interactions, physical properties, and new applications*, Springer, Berlin, **2002**.
- [90] E. Anklam, H. Berg, L. Mathiasson, M. Sharman, F. Ulberth, "Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review", *Food Additives and Contaminants* **1998**, *15*, 729–750.
- [91] D. P. Ndiomu, C. F. Simpson, "Some Applications of Supercritical Fluid Extraction", *Analytica Chimica Acta* **1988**, *213*, 237–243.
- [92] K Zosel, "Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen", *Patent: DBP1493190* **1964**.
- [93] C. M. Harris, "The SFC comeback - Pharmaceuticals give supercritical fluid chromatography a fighting chance", *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 87A–91A.

LITERATURVERZEICHNIS

- [94] Z. Zekovic, I. Pfaf-Sovljanski, O. Grujic, "Supercritical fluid extraction of hops", *Journal of the Serbian Chemical Society* **2007**, *72*, 81–87.
- [95] F. B. Li, Y. S. Hsieh, "Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry for chemical analysis", *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 1231–1237.
- [96] H. S. Bhatt, G. F. Patel, N. V. Vekariya, S. K. Jadav, "Super critical fluid chromatography-an overview", *Journal of Pharmacy Research* **2009**, *2*, 1606.
- [97] T. L. Chester, "The Role of Supercritical Fluid Chromatography in Analytical-Chemistry", *Journal of Chromatographic Science* **1986**, *24*, 226–229.
- [98] L. T. Taylor, "Supercritical fluid chromatography for the 21st century", *Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *47*, 566–573.
- [99] M. T. Combs, M. Ashraf-Khorassani, L. T. Taylor, "Packed column supercritical fluid chromatography mass spectroscopy: A review", *Journal of Chromatography A* **1997**, *785*, 85–100.
- [100] P. Sandra, A. Pereira, M. Dunkle, C. Brunelli, F. David, "Green Chromatography (Part 2): The Role of GC and SFC", *Lc Gc Europe* **2010**, *23*, 396.
- [101] L. T. Taylor, "Supercritical Fluid Chromatography", *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 4925–4935.
- [102] J. J. Langenfeld, S. B. Hawthorne, D. J. Miller, J. Pawliszyn, "Effects of Temperature and Pressure on Supercritical Fluid Extraction Efficiencies of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons and Polychlorinated-Biphenyls", *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 338–344.
- [103] S. Kromidas, H.-J. Kuss, *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [104] S. R. Springston, M. Novotny, "Kinetic Optimization of Capillary Supercritical Fluid Chromatography Using Carbon-Dioxide As the Mobile Phase", *Chromatographia* **1981**, *14*, 679–684.
- [105] J. J. VanDeemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, "Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer As Causes of Nonideality in Chromatography", *Chemical Engineering Science* **1956**, *5*, 271–289.
- [106] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Wiley-VCH, Weinheim, 10. vollst. überarb. und erw. Aufl., **2009**.
- [107] E. Klesper, A. H. Corwin, D. A. Turner, "High Pressure Gas Chromatography Above Critical Temperatures", *Journal of Organic Chemistry* **1962**, *27*, 700.
- [108] M. Novotny, S. R. Springston, P. A. Peaden, J. C. Fjeldsted, M. L. Lee, "Capillary supercritical fluid chromatography", *Analytical Chemistry* **1981**, *53*, 407A–414A.
- [109] D. R. Gere, R. Board, D. Mcmanigill, "Supercritical Fluid Chromatography with Small Particle Diameter Packed-Columns", *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 736–740.

- [110] D. Berger, "Supercritical fluid chromatography (SFC): A review of technical developments", *Lc Gc Europe* **2007**, *20*, 164–167.
- [111] T. A. Norris, M. G. Rawdon, "Determination of Hydrocarbon Types in Petroleum Liquids by Supercritical Fluid Chromatography with Flame Ionization Detection", *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, 1767–1769.
- [112] M. G. Rawdon, "Modified Flame Ionization Detector for Supercritical Fluid Chromatography", *Analytical Chemistry* **1984**, *56*, 831–832.
- [113] R. M. Campbell, N. M. Djordjevic, K. E. Markides, M. L. Lee, "Supercritical Fluid Chromatographic Determination of Hydrocarbon Groups in Gasolines and Middle Distillate Fuels", *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 356–362.
- [114] E. E. Tarver, H. H. Hill, "Comparison of A Pulsed Electron-Capture Detector and A Fourier-Transform Ion Mobility Detector After Capillary Supercritical Fluid Chromatography", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1992**, *344*, 453–459.
- [115] T. A. Berger, B. K. Berger, "Minimizing UV noise in supercritical fluid chromatography. I. Improving back pressure regulator pressure noise", *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 2320–2326.
- [116] E. Lesellier, E. Destandau, C. Grigoras, L. Fougere, C. Elfakir, "Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector", *Journal of Chromatography A* **2012**, *1268*, 157–165.
- [117] 5990-9564EN, "Infinitely better SFC performance", *Agilent Technologies Inc. - Portfolio prospekt* **2012**.
- [118] J. C. Fetzer, *Large ($C \geq 24$) polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and analysis*, Wiley, New York, **2000**.
- [119] P. Simko, "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, *770*, 3–18.
- [120] <http://bit.ly/12GCyHc>, *Umweltprobenbank des Bundes - zuletzt geprüft am 26.02.2013 21:33 Uhr MEZ*.
- [121] R. A. Kanaly, S. Harayama, "Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria", *Journal of Bacteriology* **2000**, *182*, 2059–2067.
- [122] V. Koß, *Umweltchemie: eine Einführung für Studium und Praxis*, Springer, Berlin, **1997**.
- [123] F.-X. Reichl, *Taschenatlas der Toxikologie: Substanzen, Wirkungen, Umwelt*, Thieme, Stuttgart, 2. aktualisierte Aufl, **2002**.
- [124] B. G. Loganathan, P. K.-S. Lam, *Global contamination trends of persistent organic chemicals*, CRC Press, Boca Raton, **2012**.

LITERATURVERZEICHNIS

- [125] E. Lesellier, "Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons by supercritical fluid chromatography (SFC)", *Analisis* **1999**, *27*, 241–249.
- [126] J. Jacob, "The Significance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons As Environmental Carcinogens. 35 Years Research on PAH - A Retrospective", *Polycyclic Aromatic Compounds* **2008**, *28*, 242–272.
- [127] N. Wessel, D. Menard, K. Pichavant-Rafini, H. Ollivier, J. Le Goff, T. Burgeot, F. Akcha, "The Toxicity of Benzo[A]Pyrene on Sole (*Solea Solea*) Hepatocytes: Assessment of Genotoxic and Enzymatic Effects", *Polycyclic Aromatic Compounds* **2010**, *30*, 346–354.
- [128] E. D. Stein, J. S. Brown, T. S. Hogue, M. P. Burke, A. Kinoshita, "Stormwater contaminant loading following southern California wildfires", *Environmental Toxicology and Chemistry* **2012**, *31*, 2625–2638.
- [129] D. M. Heaton, K. D. Bartle, A. A. Clifford, P. Myers, B. W. King, "Rapid Separation of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons by Packed-Column Supercritical-Fluid Chromatography", *Chromatographia* **1994**, *39*, 607–611.
- [130] R. J. Law, J. L. Biscaya, "Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons (Pah) - Problems and Progress in Sampling, Analysis and Interpretation", *Marine Pollution Bulletin* **1994**, *29*, 235–241.
- [131] S. M. Shariff, M. M. Robson, K. D. Bartle, "Supercritical fluid chromatography of polycyclic aromatic compounds: A review", *Polycyclic Aromatic Compounds* **1997**, *12*, 147–185.
- [132] R. Simon, S. Palme, E. Anklam, "Validation (in-house and collaborative) of a method based on liquid chromatography for the quantitation of 15 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke flavourings: HPLC-method validation for 15 EU priority PAH in smoke condensates", *Food Chemistry* **2007**, *104*, 876–887.
- [133] R. Atkinson, J. Arey, "Atmospheric Chemistry of Gas-Phase Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons - Formation of Atmospheric Mutagens", *Environmental Health Perspectives* **1994**, *102*, 117–126.
- [134] W. Reineke, M. Schlömann, *Umweltmikrobiologie*, Elsevier, Spektrum Akad. Verl., München, 1. Aufl., **2007**.
- [135] A. Ramesh, S. A. Walker, D. B. Hood, M. D. Guillen, K. Schneider, E. H. Weyand, "Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons", *International Journal of Toxicology* **2004**, *23*, 301–333.
- [136] P. G. Seybold, "Topological Influences on the Carcinogenicity of Aromatic-Hydrocarbons - 1. The Bay Region Geometry", *International Journal of Quantum Chemistry* **1983**, 95–101.

- [137] L. S. Yan, "Study of the Carcinogenic Mechanism for Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons - Extended Bay Region Theory and Its Quantitative Model", *Carcinogenesis* **1985**, *6*, 1–6.
- [138] A. Luch, W. Schober, V. J. Soballa, G. Raab, H. Greim, J. Jacob, J. Doehmer, A. Seidel, "Metabolic activation of dibenzo[a,l]pyrene by human cytochrome P450 1A1 and P450 1B1 expressed in V79 Chinese hamster cells", *Chemical Research in Toxicology* **1999**, *12*, 353–364.
- [139] R. Braun, *Spezielle Toxikologie für Chemiker: eine Auswahl toxischer Substanzen*, Teubner, Stuttgart, **1999**.
- [140] A. Luch, S. L. Coffing, Y. M. Tang, A. Schneider, V. Soballa, H. Greim, C. R. Jefcoate, A. Seidel, W. F. Greenlee, W. M. Baird, J. Doehmer, "Stable expression of human cytochrome P450 1B1 in V79 Chinese hamster cells and metabolically catalyzed DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene", *Chemical Research in Toxicology* **1998**, *11*, 686–695.
- [141] H. Marquardt, *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Unveränd. Sonderausg. der 1. Aufl., **1997**.
- [142] E. Lesellier, "Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns", *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 1881–1890.
- [143] E. J. Lavoie, D. T. Coleman, N. G. Geddie, J. E. Rice, "Studies on the Mutagenicity and Tumor-Initiating Activity of Methylated Fluorenes", *Chemico-Biological Interactions* **1985**, *52*, 301–309.
- [144] E. J. Lavoie, D. T. Coleman, J. E. Rice, N. G. Geddie, D. Hoffmann, "Tumor-Initiating Activity, Mutagenicity, and Metabolism of Methylated Anthracenes", *Carcinogenesis* **1985**, *6*, 1483–1488.
- [145] J. E. Rice, A. Rivenson, J. Braley, E. J. Lavoie, "Methylated Derivatives of Pyrene and Fluorene - Evaluation of Genotoxicity in the Hepatocyte Dna-Repair Test and Tumorigenic Activity in Newborn Mice", *Journal of Toxicology and Environmental Health* **1987**, *21*, 525–532.
- [146] C. Zeigler, K. MacNamara, Z. D. Wang, A. Robbat, "Total alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon characterization and quantitative comparison of selected ion monitoring versus full scan gas chromatography/mass spectrometry based on spectral deconvolution", *Journal of Chromatography A* **2008**, *1205*, 109–116.
- [147] J. E. Rice, G. S. Makowski, T. J. Hosted, E. J. Lavoie, "Methylene-Bridged Bay Region Chrysene and Phenanthrene Derivatives and Their Keto-Analogs - Mutagenicity in Salmonella-Typhimurium and Tumor-Initiating Activity on Mouse Skin", *Cancer Letters* **1985**, *27*, 199–206.
- [148] J. Pataki, H. Lee, R. G. Harvey, "Carcinogenic Metabolites of 5-Methylchrysene", *Carcinogenesis* **1983**, *4*, 399–402.

LITERATURVERZEICHNIS

- [149] P. G. Seybold, "Topological Influences on the Carcinogenicity of Aromatic-Hydrocarbons - 2. Substituent Effects", *International Journal of Quantum Chemistry* **1983**, 103–108.
- [150] J. Digiovanni, L. Diamond, R. G. Harvey, T. J. Slaga, "Enhancement of the Skin Tumor-Initiating Activity of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons by Methyl-Substitution at Non-Benzo Bay-Region Positions", *Carcinogenesis* **1983**, *4*, 403–407.
- [151] R. Reupert, G. Brausen, "Determination of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in Water, Sludges, Sediments, and Soils by High-Performance Liquid-Chromatography", *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **1994**, *22*, 202–215.
- [152] N. Barco-Bonilla, J. L. M. Vidal, A. G. Frenich, R. Romero-Gonzalez, "Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry", *Talanta* **2009**, *78*, 156–164.
- [153] C. Sanchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo, "Rapid method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils by sonication-assisted extraction in small columns", *Journal of Separation Science* **2006**, *29*, 2166–2172.
- [154] J. L. M. Vidal, A. G. Frenich, M. D. B. Bonilla, R. Romero-Gonzalez, J. A. P. Sanchez, "Simultaneous extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in agricultural soils by pressurized liquid extraction and determination by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *395*, 1551–1562.
- [155] H. Palma-Fleming, A. J. Asencio, E. Gutierrez, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of Corral Bay, south central Chile", *Journal of Environmental Monitoring* **2004**, *6*, 229–233.
- [156] A. Meyer, W. Kleibohmer, "Supercritical-Fluid Extraction of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons from A Marine Sediment and Analyte Collection Via Liquid-Solid Trapping", *Journal of Chromatography A* **1993**, *657*, 327–335.
- [157] V. Khalili-Fard, K. Ghanemi, Y. Nikpour, M. Fallah-Mehrjardi, "Application of sulfur microparticles for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from sea water and wastewater samples", *Analytica Chimica Acta* **2012**, *714*, 89–97.
- [158] S. B. Hawthorne, C. B. Grabanski, D. J. Miller, J. P. Kreitinger, "Solid-phase microextraction measurement of parent and alkyl polycyclic aromatic hydrocarbons in milliliter sediment pore water samples and determination of K-DOC values", *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 2795–2803.
- [159] V. Fernandez-Gonzalez, E. Concha-Grana, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, "Solid-phase microextraction-gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons towards the European Union water directive 2006/0129 EC", *Journal of Chromatography A* **2007**, *1176*, 48–56.

- [160] D. W. Potter, J. Pawliszyn, "Rapid-Determination of Polyaromatic Hydrocarbons and Polychlorinated-Biphenyls in Water Using Solid-Phase Microextraction and Gcms", *Environmental Science & Technology* **1994**, *28*, 298–305.
- [161] B. Disdier, C. Arfi, J. Pastor, A. M. Pauli, H. Portugal, "Analysis by GC-MS of monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in thermolysed waste products", *Analisis* **1999**, *27*, 235–241.
- [162] C. M. Gittins, M. J. Castaldi, S. M. Senkan, E. A. Rohlfing, "Real-time quantitative analysis of combustion-generated polycyclic aromatic hydrocarbons by resonance-enhanced multiphoton ionization time-of-flight mass spectrometry", *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 286–293.
- [163] A. Stella, M. T. Piccardo, R. Coradeghini, A. Redaelli, S. Lanteri, C. Armanino, F. Valerio, "Principal component analysis application in polycyclic aromatic hydrocarbons "mussel watch" analyses for source identification", *Analytica Chimica Acta* **2002**, *461*, 201–213.
- [164] G. D. Wang, A. S. Lee, M. Lewis, B. Kamath, R. K. Archer, "Accelerated solvent extraction and gas chromatography mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 1062–1066.
- [165] N. E. Wydra, Diss., urn:nbn:de:hbz:468-20130108-155028-8 - Bergische Universität Wuppertal, **2012**.
- [166] V. Fernandez-Gonzalez, E. Concha-Grana, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, E. Fernandez-Fernandez, D. Prada-Rodriguez, "A matrix solid-phase dispersion-gel permeation chromatography-programmed temperature vaporisation-GC-MS procedure for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel samples", *Journal of Separation Science* **2010**, *33*, 3741–3750.
- [167] M. J. Ramalhosa, P. Paiga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M. B. P. P. Oliveira, "Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method", *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 3529–3538.
- [168] P. Baumard, H. Budzinski, P. Garrigues, "Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, *359*, 502–509.
- [169] A. D. McIntosh, C. F. Moffat, G. Packer, L. Webster, "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) concentration and composition determined in farmed blue mussels (*Mytilus edulis*) in a sea loch pre- and post-closure of an aluminium smelter", *Journal of Environmental Monitoring* **2004**, *6*, 209–218.

LITERATURVERZEICHNIS

- [170] A. Meyer, W. Kleibohmer, K. Cammann, "SFE of PAHs from Soils with A High-Carbon Content and Analyte Collection Via Combined Liquid-Solid Trapping", *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **1993**, *16*, 491–494.
- [171] L. Webster, L. Angus, G. Topping, E. J. Dalgarno, C. F. Moffat, "Long-term monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels (*Mytilus edulis*) following the Braer oil spill", *Analyst* **1997**, *122*, 1491–1495.
- [172] J. Chen, J. B. Pawliszyn, "Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid-Chromatography", *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 2530–2533.
- [173] E. Lesellier, "Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by solid phase micro-extraction/supercritical fluid chromatography (SPME/SFC)", *Analusis* **1999**, *27*, 363–368.
- [174] S. A. Wise, L. C. Sander, W. E. May, "Determination of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons by Liquid-Chromatography", *Journal of Chromatography* **1993**, *642*, 329–349.
- [175] A. Kot, P. Sandra, F. David, "Selectivity Tuning in Packed-Column Sfc Separation of the 16 Priority Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons As An Example", *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **1994**, *17*, 277–279.
- [176] R. Taheri, Diss., urn:nbn:de:hbz:468-20060105- Bergische Universität Wuppertal, **2006**.
- [177] C. Stader, F. Beer, C. Achten, "Environmental PAH analysis by gas chromatography–atmospheric pressure laser ionization–time-of-flight–mass spectrometry (GC–APLI–MS)", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 7041–7052.
- [178] M. Lorenz, Diss., urn:nbn:de:hbz:468-20111014-145040-5 - Bergische Universität Wuppertal, **2010**.
- [179] S. A. Cohen, D. P. Michaud, "Synthesis of A Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino-Acids Via High-Performance Liquid-Chromatography", *Analytical Biochemistry* **1993**, *211*, 279–287.
- [180] K. M. Deantonis, P. R. Brown, S. A. Cohen, "High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Synthetic Peptides Using Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate", *Analytical Biochemistry* **1994**, *223*, 191–197.
- [181] D. J. Strydom, S. A. Cohen, "Comparison of Amino-Acid Analyses by Phenylisothiocyanate and 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate Precolumn Derivatization", *Analytical Biochemistry* **1994**, *222*, 19–28.
- [182] M. Lorenz, K. J. Brockmann, W. Wissdorf, D. Klink, O. J. Schmitz, T. Benter in Poster TP04-069 at 59th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, **2011**.

- [183] T. Poehler, R. Kunte, H. Hoenen, P. Jeschke, W. Wissdorf, K. J. Brockmann, T. Benter, "Numerical Simulation and Experimental Validation of the Three-Dimensional Flow Field and Relative Analyte Concentration Distribution in an Atmospheric Pressure Ion Source", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*, 2061–2069.
- [184] I. Barnes, H. Kersten, W. Wissdorf, T. Poehler, H. Hoenen, S. Klee, K. J. Brockmann, T. Benter in Poster WP28-607 at 58th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, UT, USA, **2010**.
- [185] T. Poehler, R. Kunte, H. Hoenen, P. Jeschke, W. Wissdorf, T. Benter in Poster TP04-068 at 59th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, CO, USA, **2011**.
- [186] K. J. Brockmann, W. Wissdorf, M. Lorenz, D. Müller, T. Poehler, R. Kunte, T. Benter in Poster MP29-671 at 60th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Vancouver, BC, CAN, **2012**.
- [187] W. Wissdorf, Diss., in Bearbeitung - Bergische Universität Wuppertal, **2014**.
- [188] W. M. A. Niessen, "Advances in instrumentation in liquid chromatography mass spectrometry and related liquid-introduction techniques", *Journal of Chromatography A* **1998**, *794*, 407–435.
- [189] persönliche Mitteilung: Arthen-Engeland, T.; Brekenfeld, A.; Holle, A. (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) Wuppertal (Telefonkonferenz), **2011**.
- [190] T. M. Annesley, "Ion suppression in mass spectrometry", *Clinical Chemistry* **2003**, *49*, 1041–1044.
- [191] L. L. Jessome, D. A. Volmer, "Ion suppression: A major concern in mass spectrometry", *Lc Gc North America* **2006**, *24*, 498–510.
- [192] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 942–950.
- [193] C. R. Mallet, Z. L. Lu, J. R. Mazzeo, "A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 49–58.
- [194] J. P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec, "The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue", *Analytica Chimica Acta* **2005**, *529*, 129–136.
- [195] C. H. P. Bruins, C. M. Jeronimus-Stratingh, K. Ensing, W. D. van Dongen, G. J. de Jong, "On-line coupling of solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis of biological samples I. Determination of clenbuterol in urine", *Journal of Chromatography A* **1999**, *863*, 115–122.

LITERATURVERZEICHNIS

- [196] M. W. J. van Hout, H. A. G. Niederlander, R. A. de Zeeuw, G. J. de Jong, "Ion suppression in the determination of clenbuterol in urine by solid-phase extraction atmospheric pressure chemical ionisation ion-trap mass spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 245–250.
- [197] K. Chen, D. Z. Liu, L. H. Nie, S. Z. Yao, "Determination of Urea in Urine Using A Conductivity Cell with Surface-Acoustic-Wave Resonator-Based Measurement Circuit", *Talanta* **1994**, *41*, 2195–2200.
- [198] E. Salkowski, "Untersuchungen über die Ausscheidung der Alkalisalze", **1871**, *53*, 209–234.
- [199] F. Wang, S. G. Ma, D. X. Zhang, R. G. Cooks, "Proton affinity and gas-phase basicity of urea", *Journal of Physical Chemistry A* **1998**, *102*, 2988–2994.
- [200] J. E. Huheey, E. A. Keiter, R. L. Keiter, R. Steudel, *Anorganische Chemie: Prinzipien von Struktur und Reaktivität*, de Gruyter, Berlin, 3. durchges. Aufl., **2003**.
- [201] micrOTOF User Manual Version 1.0, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, **2006**.
- [202] L. L. Miller, G. D. Nordblom, E. A. Mayeda, "Simple, comprehensive correlation of organic oxidation and ionization potentials", *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 916–918.
- [203] P. L. Houston, *Chemical kinetics and reaction dynamics*, Dover Publ., **2006**.
- [204] P. W. Atkins, A. Höpfner, A. Schleitner, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 3. korrigierte Aufl., 1. Nachdr., **2004**.
- [205] J. Schorr, Diss., <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:16-opus-44120> - (zuletzt aufgerufen am 12.07.2013 um 01:11 Uhr MESZ) - Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2003**.
- [206] L. C. Short, S. S. Cai, J. A. Syage, "APPI-MS: Effects of mobile phases and VUV lamps on the detection of PAH compounds", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 589–599.
- [207] Users Manual Excimer Laser ATLEX-SI, ATL Lasertechnik GmbH, Wermelskirchen.
- [208] M. Lorenz, W. Wissdorf, S. Klee, H. Kersten, K. J. Brockmann, T. Benter in Poster WP28-610 at 58th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City, UT, USA, **2010**.
- [209] *DIN 32645: Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze ; Ermittlung unter Wiederholbedingungen ; Begriffe, Verfahren, Auswertung*, Beuth, Berlin, **2008**.
- [210] H. Kaiser, H. Specker, "Bewertung und Vergleich von Analysenverfahren", **1956**, *149*, 46–66.
- [211] H. Kaiser, "Zum Problem der Nachweisgrenze", **1965**, *209*, 1–18.

- [212] A. Thony, M. J. Rossi, "Gas-phase UV spectroscopy of anthracene, xanthone, pyrene, 1-bromopyrene and 1,2,4-trichlorobenzene at elevated temperatures", *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* **1997**, *104*, 25–33.
- [213] J. Hellou, C. Upshall, J. F. Payne, S. Naidu, M. A. Paranjape, "Total Unsaturated-Compounds and Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in Mollusks Collected from Waters Around Newfoundland", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1993**, *24*, 249–257.
- [214] <http://bit.ly/13Y42ON>, *Planet Wissen Webseite - zuletzt geprüft am 26.07.2011 08:27 Uhr MESZ*.
- [215] *EG 1881/2006: Verordnung zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln*, Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 364, S.5 vom 20.12.2006.
- [216] M. de la Guardia, S. Garrigues, *Handbook of Green Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2012**.
- [217] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, "Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce", *Journal of Aoac International* **2003**, *86*, 412–431.
- [218] U. Koesukwiwat, S. J. Lehotay, N. Leepipatpiboon, "Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables", *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 7039–7050.
- [219] F. J. Schenck, J. E. Hobbs, "Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach to pesticide residue analysis", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2004**, *73*, 24–30.
- [220] S. J. Lehotay, K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. S. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon, "Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables", *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 2548–2560.
- [221] P. Paya, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, "Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1697–1714.

LITERATURVERZEICHNIS

- [222] L. Wiest, A. Bulete, B. Giroud, C. Fratta, S. Amic, O. Lambert, H. Pouliquen, C. Arnaudguilhem, "Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection", *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 5743–5756.
- [223] M. Anastassiades, K. Mastovska, S. J. Lehotay, "Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides", *Journal of Chromatography A* **2003**, *1015*, 163–184.
- [224] J. Hajslova, K. Holadova, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempny, "Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues", *Journal of Chromatography A* **1998**, *800*, 283–295.
- [225] D. R. Erney, T. M. Pawlowski, C. F. Poole, "Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography: Is there a solution?", *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **1997**, *20*, 375–378.
- [226] D. R. Erney, A. M. Gillespie, D. M. Gilvydis, C. F. Poole, "Explanation of the Matrix-Induced Chromatographic Response Enhancement of Organophosphorus Pesticides During Open-Tubular Column Gas-Chromatography with Splitless Or Hot On-Column Injection and Flame Photometric Detection", *Journal of Chromatography* **1993**, *638*, 57–63.
- [227] J. Hajslova, J. Zrostlikova, "Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices", *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 181–197.
- [228] C. F. Poole, "Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography", *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158*, 241–250.
- [229] F. J. Schenck, S. J. Lehotay, "Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food?", *Journal of Chromatography A* **2000**, *868*, 51–61.
- [230] L. Dabrowski, H. Giergielewicz-Mozajska, L. Gorski, M. Biziuk, J. Namiesnik, B. Janicki, "Determination of environmental pollutants in soil and sediments - Some aspects of sample clean-up and GC analysis", *Journal of Separation Science* **2002**, *25*, 290–296.
- [231] D. R. Erney, C. F. Poole, "A Study of Single Compound Additives to Minimize the Matrix Induced Chromatographic Response Enhancement Observed in the Gas-Chromatography of Pesticide-Residues", *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* **1993**, *16*, 501–503.
- [232] M. Kirchner, R. Huskova, E. Matisova, J. Mocak, "Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants", *Journal of Chromatography A* **2008**, *1186*, 271–280.

- [233] K. Mastovska, S. J. Lehotay, M. Anastassiades, "Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticide residues in food matrixes", *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 8129–8137.
- [234] Certificate of Analysis for Standard Reference Material 1974b: Organics in Mussel Tissue (*mytilus edulis*), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899, US, **2003**.
- [235] M. Constapel, M. Schellenträger, S. Möschter, O. J. Schmitz, S. Gäb, K. J. Brockmann, R. Giese, T. Benter in Poster 146 at 52nd ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, USA, **2004**.
- [236] S. Pelz, J. Zhang, I. Kanelidis, D. Klink, L. Hyzak, V. Wulf, O. J. Schmitz, J.-C. Gasse, R. Frahm, A. Pütz, A. Colsmann, U. Lemmer, E. Holder, "Synthesis and Characterization of Star-Shaped Donor–Acceptor–Donor Structures", *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013*, 4761–4769.
- [237] N. Tian, D. Lenkeit, S. Pelz, L. H. Fischer, D. Escudero, R. Schiewek, D. Klink, O. J. Schmitz, L. Gonzalez, M. Schaferling, E. Holder, "Structure-Property Relationship of Red- and Green-Emitting Iridium(III) Complexes with Respect to Their Temperature and Oxygen Sensitivity", *European Journal of Inorganic Chemistry* **2010**, 4875–4885.
- [238] W. M. Haynes, *CRC Handbook of chemistry and physics on DVD*, CRC, Boca Raton, Version 2012, **2012**.
- [239] T. A Berger, *Packed column SFC*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1995**.
- [240] 5990-7972EN, "Infinitely better SFC performance", *Agilent Technologies Inc. - (M. Dunkle G. Vanhoenacker F. David P. Sandra und M. Vollmer)* **2011**.
- [241] E. Meister, *Grundpraktikum Physikalische Chemie: Theorie und Experimente*, UTB, Stuttgart, Neuaufl., **2006**.
- [242] A. Fenghour, W. A. Wakeham, V. Vesovic, "The viscosity of carbon dioxide", *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1998**, *27*, 31–44.
- [243] R. Span, W. Wagner, "A new equation of state for carbon dioxide covering the fluid region from the triple-point temperature to 1100 K at pressures up to 800 MPa", *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1996**, *25*, 1509–1596.
- [244] H. Schade, E. Kunz, F. Kameier, *Strömungslehre*, de Gruyter, Berlin, 3. neu bearb. Aufl., **2007**.
- [245] H. Zobl, J. Kruschik, *Strömung durch Rohre und Ventile: Tabellen und Berechnungsverfahren zur Dimensionierung von Rohrleitungssystemen*, Springer, Wien, 2. neubearb. Aufl., **1982**.
- [246] <http://bit.ly/118Xc5g>, *Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt - zuletzt geprüft am 20.03.2013 13:34 Uhr MEZ*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [247] H. Richard, M. Raffel, “Principle and applications of the background oriented schlieren (BOS) method”, *Measurement Science & Technology* **2001**, *12*, 1576–1585.
- [248] D. Ramanah, S. Raghunath, D. J. Mee, T. Rosgen, P. A. Jacobs, “Background oriented schlieren for flow visualisation in hypersonic impulse facilities”, *Shock Waves* **2007**, *17*, 65–70.
- [249] K. H. Näser, *Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure*, Deutscher Verl. f. Grundstoffindustrie, Leipzig, 13. Aufl., **1974**.
- [250] W. Sutherland, “LII. The viscosity of gases and molecular force”, *Philosophical Magazine Series 5* **1893**, *36*, 507–531.
- [251] P. Sandra, *Agilent e-Seminar vom 16.11.2011 (<http://bit.ly/1bVFHtw>) - zuletzt geprüft am 23.06.2013 11:55 Uhr MEZ*.
- [252] *DIN EN ISO 15753:2006: Tierische und pflanzliche Fette und Öle: Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen*, Beuth, Berlin, November 2011, **2011**.
- [253] A. Bednarikova, B. Sklarsova, E. Kolek, M. Polovka, P. Simko, “New Rapid HPLC Method for Separation and Determination of Benzo[A]Pyrene Hydroxyderivatives”, *Polycyclic Aromatic Compounds* **2011**, *31*, 350–369.
- [254] O. Yosypchuk, J. Barek, V. Vyskocil, “Determination of 1-hydroxypyrene in human urine by HPLC with electrochemical detection at a boron-doped diamond film electrode”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *404*, 693–699.
- [255] P. J. Boogaard, N. J. Vansittert, “Exposure to Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in Petrochemical Industries by Measurement of Urinary 1-Hydroxypyrene”, *Occupational and Environmental Medicine* **1994**, *51*, 250–258.
- [256] M. T. Wu, I. F. Mao, C. K. Ho, D. Wypij, P. L. Lu, T. J. Smith, M. L. Chen, D. C. Christiani, “Urinary 1-hydroxypyrene concentrations in coke oven workers”, *Occupational and Environmental Medicine* **1998**, *55*, 461–467.
- [257] S. S. Hecht, “Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer”, *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 907–922.
- [258] K. Forster, R. Preuss, B. Rossbach, T. Bruning, J. Angerer, P. Simon, “3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries”, *Occupational and Environmental Medicine* **2008**, *65*, 224–229.
- [259] F. J. Jongeneelen, R. B. M. Anzion, C. M. Leijdekkers, R. P. Bos, P. T. Henderson, “1-Hydroxypyrene in Human-Urine After Exposure to Coal-Tar and A Coal-Tar Derived Product”, *International Archives of Occupational and Environmental Health* **1985**, *57*, 47–55.
- [260] P. J. Boogaard, “Urinary biomarkers in the risk assessment of PAHs”, *Occupational and Environmental Medicine* **2008**, *65*, 221–222.

- [261] P. Gerde, B. A. Muggenburg, G. G. Scott, J. L. Lewis, K. H. Pyon, A. R. Dahl, "Local metabolism in lung airways increases the uncertainty of pyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure", *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 493–500.
- [262] K. H. Harper, "The Intermediary Metabolism of Pyrene", *British Journal of Cancer* **1958**, *12*, 116–120.
- [263] F. J. Jongeneelen, C. M. Leijdekkers, R. P. Bos, J. L. G. Theuws, P. T. Henderson, "Excretion of 3-Hydroxy-Benzo(a)Pyrene and Mutagenicity in Rat Urine After Exposure to Benzo(a)Pyrene", *Journal of Applied Toxicology* **1985**, *5*, 277–282.
- [264] C. Viau, G. Carrier, A. Vyskocil, C. Dodd, "Urinary-Excretion Kinetics of 1-Hydroxypyrene in Volunteers Exposed to Pyrene by the Oral and Dermal Route", *Science of the Total Environment* **1995**, *163*, 179–186.
- [265] L. Campo, F. Rossella, S. Fustinoni, "Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2008**, *875*, 531–540.
- [266] <http://1.usa.gov/1b6XbFw>, NIST Mass Spectrometry Data Center - Chemistry Web-Book - zuletzt geprüft am 30.06.2013 20:59 Uhr MESZ.
- [267] F. W. McLafferty, *Interpretation of mass spectra*, University Science Books, 3rd ed., **1980**.
- [268] F. W. McLafferty, F. Turecek, *Interpretation von Massenspektren*, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, **1995**.
- [269] <http://bit.ly/15B1zWv>, Universität Hannover; AK Duddeck (*Spektroskopie in der Organischen Chemie; Massenspektrometrie (Fragmentierungen 1)*) - zuletzt geprüft am 03.07.2013 11:26 Uhr MESZ.
- [270] <http://bit.ly/12GBCT7>, Freie Universität Berlin; T. Lehmann (*Inst. f. Chem. u. Biochem.*); *Org. Chem. Grundausbildung (1998/2010)* - zuletzt geprüft am 03.07.2013 11:24 Uhr MESZ.
- [271] <http://1.usa.gov/15B2eab>, NIST Mass Spectrometry Data Center - Chemistry Web-Book - zuletzt geprüft am 30.06.2013 20:32 Uhr MESZ.
- [272] W. Q. Wang, D. Ackermann, A. M. Mehlich, S. König, "False labelling due to quenching failure of N-hydroxy-succinimide-ester-coupled dyes", *Proteomics* **2010**, *10*, 1525–1529.
- [273] J. R. Srinivasan, L. J. Romano, R. J. Levis, "Velocity Distributions for A Laser-Vaporized, Anthracene-Labeled Nucleotide", *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 13272–13279.

LITERATURVERZEICHNIS

- [274] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, “Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields”, *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 11623–11627.
- [275] <http://bit.ly/15ZjiGU>, *GNU Project 'open project particle image velocity'* - zuletzt geprüft am 27.03.2013 11:16 Uhr MEZ.
- [276] Z. J. Taylor, R. Gurka, G. A. Kopp, A. Liberzon, “Long-Duration Time-Resolved PIV to Study Unsteady Aerodynamics”, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* **2010**, *59*, 3262–3269.