

**Entwicklung und Applikationen einer DIP-APCI
Ionenquelle zur direkten Analyse mittels Q-TOF- und
Ion Trap-Massenspektrometrie**

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

-Doktor der Naturwissenschaften-

(Dr. rer. nat.)



vorgelegt von

Sonja Krieger

(staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin)

aus Düsseldorf

Wuppertal, 2014

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20150107-101002-9

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20150107-101002-9>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2011 bis Januar 2014 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz zunächst am Institut für Analytische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal (02/2011 – 08/2012) und später in der Angewandten Analytischen Chemie der Universität Duisburg-Essen (ab 09/2012).

Tag der Disputation: 26.11.2014

Gutachter: Prof. Dr. Oliver J. Schmitz
Prof. Dr. Gertrud Lohaus

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Oliver J. Schmitz durchgeführt und eigenständig verfasst habe. Ich habe keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet.

Wuppertal, 08.08.2014

(Sonja Krieger)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Aufgabenstellung dieser Arbeit sowie seine fachliche Betreuung und stetige Unterstützung bei jeglichem Diskussionsbedarf.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau PROF. DR. GERTRUD LOHAUS für die kontinuierliche Unterstützung bei der Gewinnung von Phloemsaft, die rege Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Koreferats.

Ein großer Dank gilt Herrn ROLF EICHELBERG und den Mitarbeitern der Firma SIM GmbH für das zur Verfügung gestellte Direkteinlass-System sowie die Unterstützung bei jeglichen Problemen.

Bei Herrn PROF. DR. HEIKO HAYEN bedanke ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und sehr wertvolle Fachgespräche.

Ein großer Dank gilt auch dem Zentrum für Graduiertenstudien der Bergischen Universität Wuppertal, dessen finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums mir die Promotion ermöglicht hat.

Frau DENISE REIN danke ich für die Unterstützung während der Durchführung ihrer Bachelorarbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Analytische Chemie sowie bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Management chemischer Prozesse in der Industrie der Bergischen Universität Wuppertal für die sehr angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre und viele Gespräche und Anregungen bedanken.

Ebenfalls sehr herzlich möchte ich mich bei den Mitgliedern der Angewandten Analytischen Chemie der Universität Duisburg-Essen für die sehr freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die gute Arbeitsatmosphäre und jegliche Unterstützung bedanken.

Meinem ehemaligen Mitbewohner Herrn MATTHIAS HORN gilt ein großer Dank für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit sowie seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund FABIAN SCHIPPERGES für sein Verständnis während der Entstehung dieser Arbeit und seine Unterstützung jeglicher Art.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mir während meines gesamten Studiums und der Promotion stets zur Seite stand und mich auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt hat.

Für HELMUT KRIEGER

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| ANOVA | Analysis of variance |
| APCI | Atmospheric pressure chemical ionization |
| APGDDI | Atmospheric pressure glow discharge desorption ionization |
| APLI | Atmospheric pressure laser ionization |
| APPI | Atmospheric pressure photoionization |
| APTDI | Atmospheric pressure thermal desorption ionization |
| ASAP | Atmospheric solids analysis probe |
| ATBC | Acetyltributylcitrat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BBP | Benzylbutylphthalat |
| BfR | Bundesinstitut für Risikobewertung |
| bzw. | beziehungsweise |
| CI | Chemical ionization (Chemische Ionisation) |
| CID | Collision induced dissociation |
| CRM | Charged residue model |
| Da | Dalton |
| DA-APPI | Dopant-assisted Atmospheric pressure photoionization |
| DAPCI | Desorption atmospheric pressure chemical ionization |
| DAPPI | Desorption atmospheric pressure photoionization |
| DART | Direct analysis in real time |
| DBD | Dielectric barrier discharge |
| DBDI | Dielectric barrier discharge ionization |
| DBP | Dibutylphthalat |
| DBS | Dried blood spot |
| DBS | Dibutylsebacat |
| DEHA | Di(2-ethylhexyl)adipat |
| DEHP | Di(2-ethylhexyl)phthalat |
| DESI | Desorption electrospray ionization |

| | |
|---------|--|
| DeSSI | Desorption sonic spray ionization |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DIDP | Diisodecylphthalat |
| DINCH | 1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisononylester |
| DINP | Diisononylphthalat |
| DNOP | Di-n-octylphthalat |
| DoE | Design of Experiments |
| EASI | Easy ambient sonic spray ionization |
| EESI | Extractive electrospray ionization |
| EFSA | European food safety authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) |
| EI | Electron ionization (Elektronenstoßionisation) |
| EIC | Extracted ion chromatogram/chromatogram |
| ELDI | Electrospray-assisted laser desorption ionization |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI | Electrospray ionization (Elektrosprayionisation) |
| FA-APGD | Flowing-afterglow atmospheric pressure glow discharge |
| FAPA | Flowing atmospheric pressure afterglow |
| FD-ESI | Fused-droplet electrospray ionization |
| GC | Gas chromatography (Gaschromatographie) |
| FID | Flame ionization detection (Flammenionisationsdetektion) |
| ggf. | gegebenenfalls |
| HAPGDI | Helium atmospheric pressure glow discharge ionization |
| HILIC | Hydrophilic interaction liquid chromatography |
| HPLC | High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie) |
| ICC | Ion charge control |
| IE | Ion evaporation |
| IEM | Ion evaporation model |
| LAESI | Laser ablation electrospray ionization |
| LC | Liquid chromatography (Flüssigchromatographie) |

| | |
|------------------------|---|
| LFGB | Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch |
| LOD | Limit of detection |
| LOQ | Limit of quantification |
| LTP | Low-temperature plasma |
| M | Analyt |
| MALDESI | Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization |
| MPIS | Multipurpose ion source |
| MS | Mass spectrometry (Massenspektrometrie) |
| MS/MS; MS ³ | Tandem-Massenspektrometrie |
| <i>m/z</i> | Masse-zu-Ladungs-Verhältnis |
| ND-EESI | Neutral desorption extractive electrospray ionization |
| NOAEL | No observed adverse effect level |
| PADI | Plasma-assisted desorption ionization |
| PDPA | Phase Doppler Partikelanalyse |
| PI | Photo ionization (Photoionisation) |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| PSI | Paper spray ionization |
| PTFE | Polytetrafluorethylen |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| RSD | Relative standard deviation (relative Standardabweichung) |
| SPE | Solid-phase extraction |
| SPME | Solid-phase microextraction |
| SPS | Smart parameter setting |
| SSI | Sonic spray ionization |
| TDI | Tolerable daily intake |
| TIC | Total ion chromatogram/chromatogram |
| TOF | Time of flight |
| UV | ultraviolett |
| vgl. | vergleiche |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung und theoretische Grundlagen | 1 |
| 1.1 | Ambiente Massenspektrometrie | 1 |
| 1.1.1 | ESI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden..... | 3 |
| 1.1.1.1 | Desorption electrospray ionization (DESI) | 6 |
| 1.1.1.2 | Desorption sonic spray ionization (DeSSI) und Easy ambient sonic spray ionization (EASI)..... | 10 |
| 1.1.1.3 | Extractive electrospray ionization (EESI) | 10 |
| 1.1.1.4 | Paper spray ionization (PSI)..... | 12 |
| 1.1.1.5 | Electrospray-assisted laser desorption ionization (ELDI), Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) und Laser ablation electrospray ionization (LAESI) | 13 |
| 1.1.2 | APCI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden..... | 15 |
| 1.1.2.1 | Direct analysis in real time (DART) | 18 |
| 1.1.2.2 | Atmospheric solids analysis probe (ASAP) | 22 |
| 1.1.2.3 | Desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI) | 24 |
| 1.1.2.4 | Desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI) | 26 |
| 1.1.2.5 | Weitere APCI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden | 28 |
| 1.1.3 | Potentiale und Limitierungen der ambienten Massenspektrometrie..... | 30 |
| 1.2 | Das Phloem von Pflanzen | 32 |
| 1.2.1 | Transportwege in Pflanzen..... | 33 |
| 1.2.2 | Aufbau des Phloems und Phloembeladung..... | 33 |
| 1.2.3 | Inhaltsstoffe von Phloemsaft..... | 34 |
| 1.2.4 | Gewinnung von Phloemsaft..... | 36 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 2 | Problemstellung und Zielsetzung | 39 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion | 41 |
| 3.1 | Entwicklung und Funktionsweise der DIP-APCI-Ionenquelle | 42 |
| 3.2 | Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein hochauflösendes Q-TOF-Massenspektrometer | 45 |
| 3.2.1 | Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle | 49 |
| 3.2.2 | Einsatz der DIP-APCI-Q-TOF-MS in der qualitativen Analyse | 64 |
| 3.2.2.1 | Analyse von chinesischen Heilpflanzen | 64 |
| 3.2.2.2 | Authentizitätskontrolle von Safran | 86 |
| 3.2.2.3 | Nachweis eines UV-Absorbers | 89 |
| 3.2.3 | Quantifizierung von Cumarin in Zimt und Waldmeister-Getränken mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS und LC-Q-TOF-MS | 91 |
| 3.2.3.1 | Validierung der Cumarin-Bestimmung in Zimt mittels DIP-APCI-MS und LC-MS nach Extraktion | 97 |
| 3.2.3.2 | Quantifizierung von Cumarin in Zimtproben mittels DIP-APCI-MS und LC-MS nach Extraktion | 99 |
| 3.2.3.3 | Semiquantitative Bestimmung von Cumarin direkt aus Zimtpulver mittels DIP-APCI-MS | 102 |
| 3.2.3.4 | Bestimmung von Cumarin in Waldmeister-Getränken und Kaugummi mit Zimtgeschmack mittels DIP-APCI-MS und LC-MS | 105 |
| 3.3 | Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein IonTrap-Massenspektrometer | 112 |
| 3.3.1 | Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle | 114 |
| 3.3.2 | Zerstörungsfreie Analyse von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs | 122 |
| 3.3.2.1 | Untersuchung der Fragmentierung von Weichmacher-Standards mittels DIP-APCI-MS ⁿ | 124 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.3.2.2 | Zerstörungsfreier Nachweis von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs | 135 |
| 3.3.3 | Analyse von Capsaicinoiden in Chili-Produkten | 142 |
| 3.3.4 | Wirkstoffanalyse von Schmerzmitteln | 149 |
| 3.3.5 | Wirkstoffanalyse von Antibiotika | 160 |
| 3.4 | Analyse des Phloemsafts von Nutzpflanzen | 165 |
| 3.4.1 | Analyse von Phloemsaft aus Mais mittels GCxGC-MS und LC-MS | 166 |
| 3.4.2 | Analyse von Phloemsaft mittels DIP-APCI-MS | 167 |
| 3.4.2.1 | Analyse mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS | 167 |
| 3.4.2.2 | Analyse mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS | 178 |
| 3.5 | Ausblick | 197 |
| 4 | Zusammenfassung | 199 |
| 5 | Experimenteller Teil | 203 |
| 5.1 | Gewinnung von Phloemsaft aus Mais und Raps | 203 |
| 5.2 | Kalibrierung des Q-TOF-Massenspektrometers | 204 |
| 5.3 | Kalibrierung des Ion Trap-Massenspektrometers | 204 |
| 5.4 | Herstellung von Standardlösungen und Probenvorbereitung | 205 |
| 5.4.1 | Standardlösungen zur Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle | 205 |
| 5.4.2 | Extraktion von chinesischen Heilpflanzen | 206 |
| 5.4.3 | Quantifizierung von Cumarin in Zimt und Waldmeister-Getränken mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS und LC-Q-TOF-MS | 206 |
| 5.4.3.1 | Methodenvalidierung | 206 |
| 5.4.3.2 | Probenvorbereitung zur DIP-APCI-MS und LC-MS Bestimmung von Cumarin in Zimt nach Extraktion | 207 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 5.4.3.3 | Semiquantitative Bestimmung von Cumarin direkt aus Zimtpulver mittels DIP-APCI-MS | 207 |
| 5.4.3.4 | Probenvorbereitung zur DIP-APCI-MS und LC-MS Bestimmung von Cumarin in Waldmeister-Getränken und Kaugummi mit Zimtgeschmack..... | 207 |
| 5.4.4 | Analyse von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs | 208 |
| 5.4.5 | Analyse von Capsaicinoiden..... | 208 |
| 5.4.6 | Wirkstoffanalyse von Schmerzmitteln und Antibiotika | 208 |
| 5.4.7 | Analyse von Phloemsaft | 209 |
| 5.5 | Geräteeinstellungen zur DIP-APCI-Q-TOF-MS und LC-Q-TOF-MS Analyse | 210 |
| 5.5.1 | DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse | 210 |
| 5.5.2 | LC-Q-TOF-MS Analyse | 212 |
| 5.6 | Geräteeinstellungen zur DIP-APCI-Ion Trap-MS Analyse | 213 |
| 5.7 | Geräte und Materialien..... | 215 |
| 5.7.1 | Gewinnung von Phloemsaft..... | 215 |
| 5.7.2 | Massenspektrometrie und HPLC | 215 |
| 5.7.3 | Probenvorbereitung und Materialien | 217 |
| 5.7.4 | Weitere PC-Systeme und Software..... | 217 |
| 5.8 | Chemikalien | 218 |
| 5.8.1 | Standardsubstanzen..... | 218 |
| 5.8.2 | Lösungsmittel..... | 219 |
| 5.9 | Proben..... | 219 |
| 5.9.1 | Chinesische Heilpflanzen..... | 219 |
| 5.9.2 | Safran | 220 |
| 5.9.3 | Folie mit UV-Absorber | 220 |
| 5.9.4 | Zimt und Getränke mit Waldmeistergeschmack..... | 220 |

| | | |
|-----------------------|---|-----|
| 5.9.5 | Kunststoffgegenstände zur Analyse auf Weichmacher | 220 |
| 5.9.6 | Proben zur Analyse auf Capsaicinoide | 221 |
| 5.9.7 | Schmerzmittel und Antibiotika | 221 |
| Anhang | | 223 |
| Abbildungsverzeichnis | | 255 |
| Tabellenverzeichnis | | 263 |
| Literaturverzeichnis | | 267 |

Abstract

The work presented here describes the development of an ion source based on atmospheric pressure chemical ionization (APCI) that allows the direct mass spectrometric analysis of solid and liquid samples. The ion source makes use of a direct inlet probe (DIP)-system which automatically introduces the samples into the source region using a temperature-programmed push rod. The programmed heating of the push rod leads to a time-shifted vaporization of sample components as a result of their different vapor pressures.

The DIP-APCI ion source was coupled to a high-resolution Q-TOF-MS (Agilent Technologies) and an Ion Trap-MS (Bruker Daltonik) using two different source chambers manufactured at the machine shop of the University of Wuppertal. Gas-flows inside the ion source as well as the position of the probe tip in the ion source were optimized for both the DIP-APCI-Q-TOF-MS and the DIP-APCI-Ion Trap-MS coupling. In positive ionization mode all substances analyzed were detected as protonated molecules ($[M + H]^+$). Ionization in negative ionization mode was made possible by supplying sufficient oxygen to the ion source. In negative ionization mode the formation of $[M - H]^-$ and $[M + O_2]^-$ -ions was observed. Using both couplings a linear concentration response was obtained with caffeine as test analyte. This shows the possibility to perform quantitative analyses using the DIP-APCI ion source.

Employing the Q-TOF-MS the reproducibility of DIP-APCI-MS analyses was shown by the repeated analysis of an extract from *Radix Angelicae sinensis*. The possibility to separate sample components by the programmed heating of the push rod was demonstrated by the analysis of hexanoic acid methyl ester and dodecanoic acid methyl ester. The two fatty acid methyl esters were separated almost completely as a result of their differing vapor pressures.

The DIP-APCI-Q-TOF-MS coupling was applied to the qualitative analysis of plants used in Chinese Herbal Medicine (CHM). The Chinese *Radix Angelicae sinensis* and the Korean *Radix Angelicae gigas* could be differentiated by direct analysis of the powdered plants and augmented detection of coumarins in *Radix Angelicae gigas*. Processed in Xiao Yao pills, a preparation of several plants used in CHM, the application of the European *Radix Angelicae archangelica* instead of the Chinese *Radix Angelicae sinensis* could also be shown via the detection of

coumarins. This demonstrates possible applications of DIP-APCI-MS analyses in authenticity tests and in the quality control of plants and preparations used in CHM.

The possibility of performing quantitative analyses using the DIP-APCI ion source was shown by the determination of coumarin in cinnamon employing the DIP-APCI-Q-TOF-MS coupling. The DIP-APCI-MS determination of coumarin in cinnamon following extraction was validated and showed satisfying linearity, recovery and reproducibility, both using deuterated coumarin as internal standard and without the use of an internal standard. When deuterated coumarin was used as internal standard, the coumarin contents determined in different cinnamon samples by DIP-APCI-MS were in good agreement with the results obtained by a complementary LC-MS analysis. When no internal standard was used high coumarin contents were overestimated in the LC-MS analysis and underestimated in the DIP-APCI-MS analysis. This shows that the use of deuterated coumarin as internal standard is advisable to obtain accurate data with both methods. The determination of coumarin in woodruff-flavored beverages showed that, using ambient ionization mass spectrometry, special attention has to be paid to possible spectral interferences. By means of LC-MS, coumarin could not be detected in the woodruff-flavored liquor analyzed. Due to the influence of the high temperature applied to the woodruff-flavored liquor during DIP-APCI-MS analysis an isobaric artefact was formed. The temperature-programmed vaporization in combination with the use of deuterated coumarin as internal standard helped in recognizing this spectral interference.

Using the DIP-APCI-Ion Trap-MS coupling a non-destructive analysis of phthalates and other plasticizers in plastic articles was performed. The identification of plasticizers was accomplished by MS/MS- and MS³-experiments and comparative analysis of plasticizer standards. In this way plasticizers could be identified in toys, plastic articles intended to come into contact with food and other plastic articles of daily use.

The DIP-APCI-Ion Trap-MS coupling was also applied to the analysis of active ingredients in analgesics and antibiotics. The active ingredients of analgesics (acetylsalicylic acid, diclofenac, ibuprofen, paracetamol and naproxen) and antibiotics (clarithromycin, rifampicin and ethambutol) could all be detected in the tablets and ointments analyzed. The identities of the active ingredients were confirmed by MS/MS-experiments.

In addition to the development of the DIP-APCI ion source a second focus of the work presented here was the analysis of phloem sap. By means of stylectomy phloem sap was gained from maize and rapeseed plants. The direct analysis of phloem sap using DIP-APCI-Q-TOF-MS enabled the detection of twelve components of maize phloem sap and twenty components of rapeseed phloem sap and the deduction of possible molecular formulae from the accurate m/z -values detected. By means of DIP-APCI-Ion Trap-MS, MS/MS-experiments were performed to elucidate the structures of the components detected in phloem sap. Due to the low molecular weight of substances detected in phloem sap as well as low signal intensities and nonspecific fragmentation it was only possible to identify the amino acids valine and leucine, which are known to be contained in phloem sap, by comparative analysis of their respective standards.

1 Einleitung und theoretische Grundlagen

Die Massenspektrometrie ist heutzutage ein unverzichtbarer Bestandteil der instrumentellen Analytik mit breit gefächerten Einsatzgebieten. Ständig steigende Anforderungen an die qualitative und quantitative Analyse immer komplexerer Proben stellen die moderne instrumentelle Analytik vor neue Herausforderungen. Die Anforderungen umfassender Analysen komplexer Proben können nur durch chromatographische oder elektrophoretische Trenntechniken mit anschließender massenspektrometrischer Detektion erfüllt werden. Dennoch ist in der Massenspektrometrie in den letzten Jahren ein Trend hin zur direkten Analyse von Proben ohne Probenvorbereitung und vorhergehende chromatographische oder elektrophoretische Trennung zu beobachten, welcher mit der Einführung der *Desorption electrospray ionization* (DESI) und *Direct analysis in real time* (DART) als erste ambiente Ionisationsmethoden begann.

1.1 Ambiente Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse mit Ionenerzeugung unter Umgebungsbedingungen (ambiente Massenspektrometrie) ist ein Bereich der Massenspektrometrie, welcher sich seit der Einführung der *Desorption electrospray ionization* (DESI) und *Direct analysis in real time* (DART) [1,2] in den Jahren 2004 und 2005 schnell entwickelt hat [3-6]. Insgesamt wurde seit 2004 über die Entwicklung von etwa 30 ambienten Ionenquellen berichtet [4,7,8] und viele verschiedene Akronyme für zum Teil sehr eng verwandte Techniken haben diese Entwicklung geprägt [3-6,9].

Unter ambienter Massenspektrometrie wird allgemein die direkte massenspektrometrische Analyse von Proben ohne oder mit nur wenig vorhergehender Probenvorbereitung und ohne vorhergehende Trennung verstanden. Die Desorption und Ionisation von Probenbestandteilen erfolgt direkt von der Probenoberfläche unter offenen Umgebungsbedingungen [3,6,9,10]. In einigen Fällen wird der Begriff der ambienten Massenspektrometrie auch etwas enger gefasst. So beschreibt WESTON die Beibehaltung des natürlichen Zustands der Probe als Kriterium für die

Einstufung als ambiente Ionisationsmethode [4]. HARRIS et al. beschreibt vier Charakteristika zur Unterscheidung von ambienten Ionisationsmethoden und Ionisationsmethoden bei Atmosphärendruck [11]: Bei ambienten Ionisationsmethoden sollte die Ionisation unter minimaler Probenvorbereitung erfolgen und in Abwesenheit eines Gehäuses stattfinden, sodass die Analyse von Proben jeglicher Gestalt und Größe ermöglicht wird. Ambiente Ionenquellen sollten an die meisten differenziell gepumpten Massenspektrometer gekoppelt werden können und die Ionen sollten nach einer weichen Ionisationsmethode erzeugt werden.

Die Vielzahl an entwickelten ambienten Ionenquellen kann nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Eine Einteilung nach dem zugrundeliegenden Ionisationsmechanismus führt zur Unterscheidung von mit der Elektrosprayionisation (ESI) verwandten Techniken und Techniken, die auf chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (*Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) beruhen. Den ESI-verwandten Techniken sind unter anderem die *Desorption electrospray ionization* (DESI), *Extractive electrospray ionization* (EESI) und Techniken, die ESI mit Laserdesorption kombinieren (*Electrospray laser desorption ionization*, ELDI; *Laser ablation electrospray ionization*, LAESI), zuzurechnen. APCI-verwandte Techniken umfassen koronaentladungsbasierte Methoden, wie *Atmospheric solids analysis probe* (ASAP) und *Desorption atmospheric pressure chemical ionization* (DAPCI), sowie plasmabasierte Methoden wie *Direct analysis in real time* (DART), *Dielectric barrier discharge ionization* (DBDI) und *Plasma-assisted desorption ionization* (PADI) [3,4,6,12]. Neben der Einteilung nach dem zugrundeliegenden Ionisationsmechanismus ist auch eine Unterteilung nach der Art der Desorption möglich. Hierbei können thermische Desorption, Laserdesorption und Desorption durch Aufprall eines Sprays oder eines Gases unterschieden werden [5]. Ferner sind kombinierte Klassifizierungen nach Art der Desorption und Ionisation möglich [8,9,11,13]. Neben diesen Klassifizierungen kann zwischen ambienten Ionisationsmethoden, bei denen Desorption und Ionisation als konzertierter Prozess ablaufen, und solchen, bei denen Desorption und Ionisation getrennte Prozesse darstellen, unterschieden werden [8,12]. Eine Einteilung von ambienten Ionenquellen nach dem zugrundeliegenden Ionisationsmechanismus ist in Abbildung 1 gezeigt.

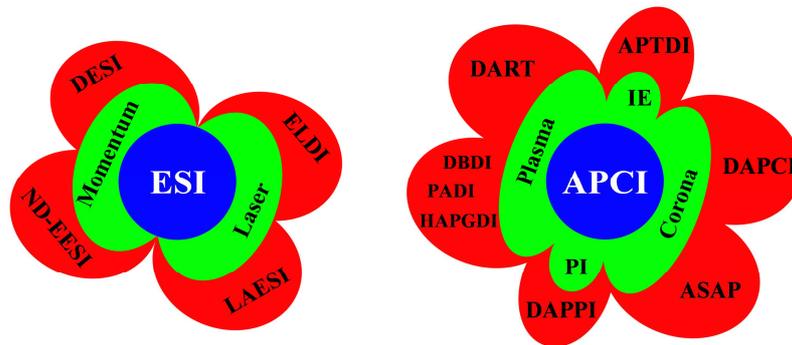


Abbildung 1: Einteilung ambienter Ionenquellen nach dem zugrundeliegenden Ionisationsmechanismus, modifiziert aus [3]. APTDI: *Atmospheric pressure thermal desorption ionization*, DAPPI: *Desorption atmospheric pressure photoionization*, HAPGDI: *Helium atmospheric pressure glow discharge ionization*, IE: *Ion evaporation*, ND-EESI: *Neutral desorption extractive electrospray ionization*, PI: *Photo ionization*.

Die gemessen an der Anzahl erschienener Publikationen am weitesten verbreiteten ambienten Ionisationsmethoden [4,11] werden im Folgenden, unterteilt nach dem zugrundeliegenden Ionisationsmechanismus, näher beschrieben.

1.1.1 ESI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden

In der Gruppe der Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden ist die Elektrosprayionisation das bekannteste Verfahren. Bei der ESI handelt es sich um eine sanfte Methode zur Überführung von Ionen aus der flüssigen Phase in die Gasphase [14]. Entwickelt wurde die Elektrosprayionisation durch die Arbeitsgruppe um DOLE. Durch Elektrosprühen einer verdünnten Lösung aus Polystyren-Molekülen in eine Stickstoff-gefüllte Verdampfungskammer erzeugten sie Ionen, welche sie mit Hilfe eines Faraday-Käfigs detektierten. Sie postulierten, dass die im Elektrospray gebildeten geladenen Tröpfchen durch Verdampfung des Lösungsmittels und Erhöhung der Ladungsdichte elektrisch instabil werden und in kleinere Tröpfchen zerfallen. Auf diese Weise würde ein Zustand erreicht, in dem jedes Tröpfchen nur noch ein Makromolekül enthält, und die Verdampfung des restlichen Lösungsmittels würde zu elektrisch geladenen, gasförmigen Makromolekülen führen [15]. FENN et al. nutzten ESI erstmals zur massenspektrometrischen Analyse, zunächst von kleineren Molekülen [16]. Die Verfügbarkeit eines neueren Quadrupol-

Massenanalysators, welcher Massen bis 1500 Dalton auflösen konnte, ermöglichte die Analyse größerer Moleküle wie Peptide [17]. Die Arbeitsgruppe um FENN setzte die Elektrosprayionisation auch erstmals zur Kopplung der Flüssigchromatographie (LC) mit der Massenspektrometrie (MS) ein [17]. Sie zeigten, dass es sowohl möglich ist, kleine, hitzelabile Moleküle, wie Vitamine, als auch große Moleküle, wie Polymere und Proteine, mittels ESI-MS zu analysieren [18,19]. Bei der ESI-MS Analytik tritt kaum Fragmentierung selbst großer und labiler Moleküle auf. Die Bildung mehrfachgeladener Ionen aus großen Molekülen eröffnet die Möglichkeit, diese Moleküle mit Massenanalysatoren mit begrenztem Massenbereich zu analysieren [18].

Der Mechanismus der Bildung gasförmiger Analytionen aus dem in elektrolythaltiger Lösung befindlichen Analyten mittels ESI kann in drei Teilschritte unterteilt werden [14,20-22]. Der erste Schritt besteht in der Erzeugung eines elektrisch geladenen Sprays. An der Sprühkapillare, welche 1-3 cm von der Gegenelektrode entfernt ist, wird eine Spannung von 2-3 kV angelegt. Die Gegenelektrode wird von einer Platte, welche eine Eintrittsöffnung ins Massenspektrometer besitzt, gebildet [22]. Das angelegte elektrische Feld bewirkt eine partielle Trennung der positiven und negativen Elektrolytionen in der Lösung. Im Positiv-Modus wandern positive Ionen zur Kapillarspitze und negative Ionen zur Kapillarwand, im Negativ-Modus bewegen sich negative Ionen zur Kapillarspitze und positive Ionen zur Kapillarwand. Durch die gegenseitige Abstoßung der Ionen an der Kapillarspitze und die Anziehung durch die Gegenelektrode kommt es zur Ausbildung eines sogenannten Taylor-Konus. Ist das angelegte elektrische Feld ausreichend stark, so überwinden die elektrostatischen Kräfte die Oberflächenspannung der Lösung und ein Flüssigkeitsstrahl beginnt aus dem Taylor-Konus zu emittieren. Der Flüssigkeitsstrahl trägt einen Überschuss an positiven Ionen im Positiv-Modus bzw. an negativen Ionen im Negativ-Modus, deren gegenseitige Abstoßung einen Zerfall in kleine, geladene Tröpfchen, welche auseinanderdriften, bewirkt. Insgesamt führt der Elektrospray-Prozess zu einem feinen Spray geladener Tröpfchen, die sich in Richtung der Gegenelektrode bewegen. Die Elektrospray-Ionenquelle liefert im Positiv-Modus ein kontinuierliches Spray aus positiv geladenen Tröpfchen. Um das Ladungsgleichgewicht zu erhalten, muss daher an der Sprühkapillare eine Oxidation von Anionen und an der Gegenelektrode eine Reduktion der Kationen des Sprays erfolgen. Im Negativ-Modus erfolgt an der Sprühkapillare eine Reduktion

von Kationen und an der Gegenelektrode eine Oxidation der Anionen des Sprays. Die Elektrospray-Ionenquelle stellt somit einen Spezialfall einer elektrolytischen Flusszelle dar, bei dem der Ladungstransport über das elektrisch geladene Spray erfolgt [14,20-22]. Der Prozess der Erzeugung des elektrisch geladenen Sprays ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

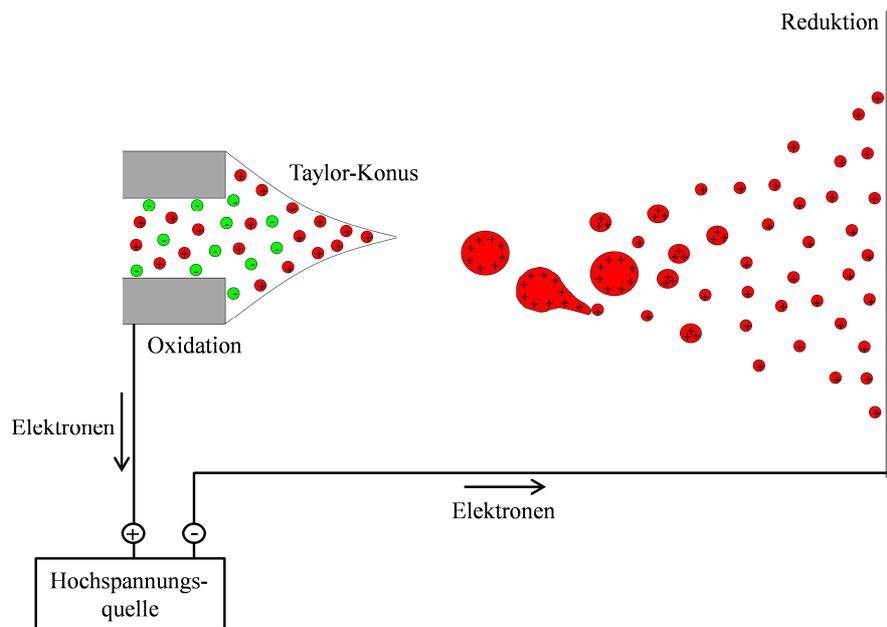


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation im Positiv-Modus, modifiziert aus [20].

Der zweite Schritt der Erzeugung gasförmiger Analytionen liegt in der Reduktion der Tröpfchengröße. Durch Verdampfung des Lösungsmittels schrumpfen die gebildeten Tröpfchen bei gleichbleibender Ladung, die Ladungsdichte nimmt somit zu. Bei Erreichen des Rayleigh-Limits übersteigt die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung und das Tröpfchen zerfällt in kleinere Tröpfchen (Coulomb-Spaltung). Die Coulomb-Spaltung erfolgt über die Bildung eines Konus und die Freisetzung eines Strahls an Tröpfchen aus diesem Konus. Dieser Prozess wird als *Droplet jet fission* bezeichnet. Durch Lösungsmittelverdampfung und mehrfache Coulomb-Spaltung wird die Tröpfchengröße kaskadenartig reduziert [14,20-22].

Der letzte Schritt des Mechanismus der Elektrosprayionisation besteht in der Freisetzung desolvatisierter Ionen in die Gasphase. Hierfür wurden zwei verschiedene Mechanismen postuliert. Nach dem *Charged residue model* (CRM) führen mehrfache Coulomb-Spaltungen

letztendlich zu Tröpfchen, die nur noch ein Analytmolekül enthalten. Bei Verdampfung der letzten Lösungsmittelmoleküle wird die auf dem Tröpfchen verbliebene Ladung auf das Analytmolekül übertragen. Das *Ion evaporation model* (IEM) hingegen postuliert die direkte Emission von Ionen aus hinreichend kleinen (Radius ≈ 10 nm), geladenen Tröpfchen. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass sehr große Moleküle nach dem CRM ionisiert werden und das IEM für kleinere Ionen zutrifft [14,20-22].

ESI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden kombinieren verschiedene Arten der Desorption, beispielsweise Desorption durch Aufprall eines Sprays oder auch Laserdesorption, mit der Ionisation durch ein Elektrospray. Aufgrund des ESI-basierten Ionisationsprozesses werden ESI-ähnliche Massenspektren erhalten [8,12].

1.1.1.1 Desorption electrospray ionization (DESI)

Im Jahr 2004 wurde die *Desorption electrospray ionization* (DESI) als erste der ambienten Ionisationsmethoden vorgestellt [1]. Bei der DESI wird ein pneumatisch unterstütztes Elektrospray aus geladenen Tröpfchen und Lösungsmittelionen auf die zu analysierende Oberfläche gerichtet. Hierbei kann die Oberfläche selbst die zu untersuchende Probe darstellen oder aber die Probe wird zur Analyse auf einer geeigneten Oberfläche deponiert. Durch den Aufprall geladener Tröpfchen kommt es zur Bildung gasförmiger Ionen aus auf der Oberfläche befindlichem Material. Die gebildeten Ionen werden massenspektrometrisch analysiert [1]. Der schematische Aufbau eines DESI Experiments ist in Abbildung 3 dargestellt.

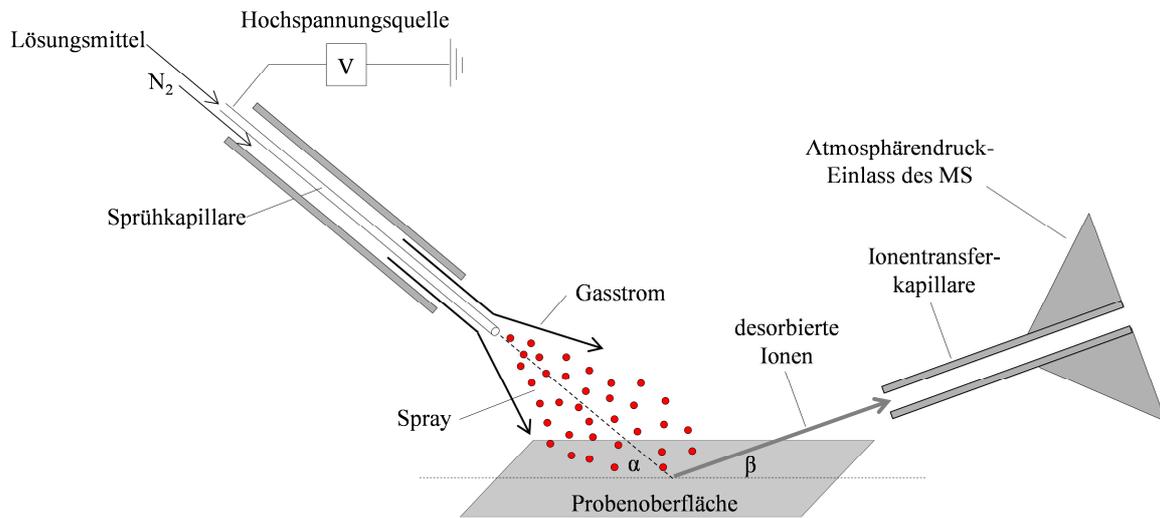


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines DESI Experiments, modifiziert aus [1].

Im Fall von typischerweise mittels ESI untersuchten Analyten sind die mittels DESI erhaltenen Massenspektren den ESI-Massenspektren sehr ähnlich. Bei beiden Techniken treten mehrfachgeladene Ionen und Addukte mit Alkalimetallen auf [1,23]. Als hauptsächlicher Mechanismus der DESI wird ein *droplet pick-up* postuliert. Eine anfängliche Befeuchtung der Probenoberfläche durch das Spray löst den Analyten. Beim Auftreffen weiterer Tröpfchen kommt es zum Verspritzen mit Emission sekundärer Mikrotröpfchen, welche den gelösten Analyten enthalten [24]. Anschließend erfolgt die Ionisation des Analyten über den Mechanismus der Elektrosprayionisation, nach dem *Charged residue* oder *Ion evaporation model* [25]. Belege für den *droplet pick-up* Mechanismus lieferten Untersuchungen zur Geschwindigkeit und zum Durchmesser der Tröpfchen mittels Phase Doppler Partikelanalyse (PDPA) [25] und Simulationen des Spray Transports und des Aufpralls der Tröpfchen auf der Probenoberfläche [26]. Zudem wurde gezeigt, dass die mittels ESI und DESI erzeugten Ionen ähnliche interne Ladungsverteilungen aufweisen, was vergleichbare Prozesse bei der Bildung gasförmiger Ionen aus geladenen Tröpfchen nahe legt und somit die Theorie des *droplet pick-up* unterstützt [27].

Die Effizienz der DESI wird von einer Vielzahl an Parametern beeinflusst. Von besonderer Bedeutung sind geometrische Parameter. Hierzu gehören der Einfallswinkel des Sprays, der Winkel zwischen Probenoberfläche und Ionentransferkapillare des MS (α und β in Abbildung 3),

sowie die Abstände der Sprühkapillare und der Ionentransferkapillare von der Probenoberfläche [23]. Typischerweise liegt der Einfallswinkel des Sprays im Bereich von 30-70°, der Winkel zwischen Probenoberfläche und Ionentransferkapillare bei 10-30° und die Abstände der Sprühkapillare und der Ionentransferkapillare von der Probenoberfläche betragen jeweils 1-5 mm [14]. Zur Eliminierung des Einflusses geometrischer Parameter wurde eine DESI-Quelle entwickelt, bei der sich Sprühkapillare und Ionentransferkapillare in fester geometrischer Anordnung (parallel zueinander und im 90°-Winkel zur Probenoberfläche) befinden. Auf diese Weise sollte die DESI leichter anwendbar und robuster werden [28]. Spray-Parameter, wie die Flussrate des Gases und Spray-Lösungsmittels, sowie die angelegte Spannung, besitzen ebenfalls Einfluss auf die Effizienz der DESI, da sie die Verteilung der Tröpfchengröße, die Ladung der Tröpfchen und ihre Geschwindigkeit bestimmen [23]. Üblich sind ein Lösungsmittelfluss von 3-5 $\mu\text{L}/\text{min}$, ein Sprühgasdruck von 8-12 bar und eine angelegte Spannung im Bereich von 2-6 kV [14]. Ein Bestandteil des *droplet pick-up* Mechanismus der DESI ist das Lösen des Analyten im Lösungsmittelfilm, der sich auf der Probenoberfläche ausbildet. Aus diesem Grund wird die Effizienz der DESI mit steigender Löslichkeit des Analyten im Spray-Lösungsmittel verbessert [29]. Zur Analyse polarer Analyten werden meist Wasser/Methanol-Gemische eingesetzt [24], für hydrophobe Analyten wurde auch die Möglichkeit der Verwendung wasserfreier Spray-Lösungsmittel gezeigt [30]. Auch die Oberfläche, auf der sich der Analyt befindet, beeinflusst die Effizienz der DESI. Sie sollte aus einem isolierenden Material bestehen, um die Neutralisation der aufprallenden Tröpfchen auf der Oberfläche zu vermeiden [1,23]. Zudem sollten die verwendeten Oberflächen nicht zu glatt sein, damit auf der Oberfläche deponierte Proben nicht physikalisch durch die Kraft des Sprays entfernt werden [31], und die Adsorption des Analyten auf der Oberfläche sollte weder zu schwach (instabiles Signal) noch zu stark (schlechte Desorption) sein [32]. Typischerweise zur DESI-MS Analyse verwendete Oberflächen sind Glas, Polytetrafluorethylen (PTFE) und Polymethylmethacrylat (PMMA) [23,31,32].

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit und Selektivität für einen bestimmten Analyten können dem Spray-Lösungsmittel Reagenzien zugesetzt werden. Diese Vorgehensweise wird als *reactive DESI* bezeichnet [24]. Die einfachste Möglichkeit besteht im Zusatz von Kationen oder Anionen zur Adduktbildung. So wurden Alkalimetallkationen [33] sowie Chlorid und Trifluoracetat [34] zur Detektion verschiedener Sprengstoffe eingesetzt. Des Weiteren wurde Dodecylamin zur

Bildung eines Komplexes mit dem Anti-Malaria Wirkstoff Artesunat verwendet [35]. Die Derivatisierung von Cholesterin mit Betainaldehyd unter Bildung eines Hemiacetalsalzes ermöglichte die Detektion dieses unpolaren Analyten mittels DESI-MS [36].

Anwendung findet die DESI-MS unter anderem im Bereich der Forensik und öffentlichen Sicherheit, bei umweltanalytischen Fragestellungen und in der Lebensmittelanalytik, in den Life Sciences sowie der pharmazeutischen Analytik. Forensische Anwendungen und Anwendungen im Bereich der öffentlichen Sicherheit umfassen die Detektion von Spuren verschiedener Sprengstoffe auf unterschiedlichen Oberflächen (Papier, Plastik, Metall, Baumwolle, Seide, Leder) [37-39] sowie auf der Haut [40] und das Screening von organischen Rückständen des Abfeuerns von Schusswaffen [41]. Des Weiteren wurde die DESI-MS zur Analyse verschiedener Drogen (Amphetamine, Kokain, Heroin, Ecstasy) [39,42,43], zu deren Nachweis in Urin [44] und zur Bestimmung von Flunitrazepam in alkoholischen Getränken [45] eingesetzt. In der pharmazeutischen Analytik wurde die DESI-MS zur schnellen Wirkstoffanalyse in pharmazeutischen Proben (Tabletten, Salben, Flüssigkeiten) [43,46,47], zur Quantifizierung des β -Blockers Propranolol [48] und zum Nachweis von Clenbuterol und anderen Medikamenten in Urin [49,50] genutzt. Im Bereich der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie der Life Sciences fand die DESI-MS Anwendung zur Analyse von Sprengstoffen und Agrochemikalien in Wasser [51], zum Nachweis des Fungizids Strobilurin und anderer Agrochemikalien in Lebensmitteln [52,53], sowie zur Analyse von Kohlenhydraten und Steroiden [54], von Triglyceriden in Lebensmitteln [55] und zur Detektion von Alkaloiden in pflanzlichem Gewebe [56]. Davon ab wurde die DESI-MS auch für Profilierungs-Analysen von Anthocyanen in Wein [57] und von intakten Bakterien [58] eingesetzt und im Bereich der Werkstoffkunde zur Identifizierung von Polymer-Additiven verwendet [59]. Ein weiterer Einsatzbereich der DESI liegt in der bildgebenden Massenspektrometrie. Hier wurde die DESI-MS zur Lokalisierung von Medikamenten in tierischem Gewebe [60] und zur räumlich aufgelösten Untersuchung der Lipidverteilung in biologischem Gewebe [61-63] eingesetzt. Die Kombination von bildgebender Massenspektrometrie mittels DESI und multivariater Datenauswertung ermöglichte die Unterscheidung von Krebsgewebe und gesundem Gewebe [64,65]. In Anlehnung an den Einsatz in der bildgebenden Massenspektrometrie kann die DESI auch zur Kopplung der Dünnschichtchromatographie mit der Massenspektrometrie verwendet werden [66,67].

1.1.1.2 Desorption sonic spray ionization (DeSSI) und Easy ambient sonic spray ionization (EASI)

Die *Desorption sonic spray ionization* (DeSSI) [68] ist eine ambiente Ionisationsmethode, welche der DESI vom Aufbau her sehr ähnlich ist. Im Unterschied zur DESI wird bei der DeSSI keine Spannung an die Sprühkapillare angelegt und ein erhöhter Sprühgasdruck von ca. 30 bar, sowie ein Lösungsmittelfluss von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ verwendet [68]. Der sich mit Schallgeschwindigkeit koaxial zum Lösungsmittelstrom bewegend Sprühgasfluss bewirkt eine Bildung geladener Tröpfchen nach dem Prinzip der Schallspray-Ionisation (*sonic spray ionization*, SSI). Es entstehen kleine Tröpfchen mit einer statistischen Ungleichverteilung von Ladung (gleichzeitig positiv und negativ geladene Tröpfchen). Der dichte Strom der geladenen Tröpfchen wird auf die zu untersuchende Probenoberfläche gerichtet und bewirkt dort die Desorption des Analyten von der Oberfläche und dessen Ionisation und Transfer in die Gasphase [68-71]. Kurze Zeit nach ihrer Einführung wurde die DeSSI in *Easy ambient sonic spray ionization* (EASI) umbenannt [69]. Anwendungsbeispiele der DeSSI- bzw. EASI-MS umfassen die Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe direkt von der Tablettenoberfläche [68], das Monitoring der Alterung von Medikamenten [72] sowie Fingerprint-Analysen und Authentizitätsprüfungen von Parfüms [73] und Kraftstoffen [74]. Die DeSSI-/EASI-MS wurde auch zur Charakterisierung der Tenside in Weichspüchern [70] und des Profils der Triglyceride und freien Fettsäuren in pflanzlichen Ölen [71] sowie zur Authentizitätsprüfung von Geldscheinen [75] und Autopapieren [76] eingesetzt. Die Möglichkeit der Kombination der DeSSI-/EASI-MS mit der Dünnschichtchromatographie wurde am Beispiel stickstoffhaltiger Verbindungen, pharmazeutischer Wirkstoffe und pflanzlicher Öle gezeigt [69]. Da bei der DeSSI/EASI keine Spannung an die Sprühkapillare angelegt wird, ist auch ein Einsatz in der *in vivo* Analyse denkbar [68].

1.1.1.3 Extractive electrospray ionization (EESI)

Die im Jahr 2006 vorgestellte *Extractive electrospray ionization* (EESI) [77] ermöglicht die direkte Analyse flüssiger, matrixhaltiger Proben, ohne diese, wie beispielsweise zur DESI-Analyse nötig, auf eine Oberfläche aufbringen zu müssen. Die EESI verwendet zwei separate Sprühköpfe. Ein Sprühkopf zerstäubt die Probelösung und der zweite Sprühkopf wird zur

Erzeugung geladener Lösungsmitteltröpfchen nach dem Elektrospray-Prinzip genutzt. Die Probenröpfchen und die geladenen Lösungsmitteltröpfchen werden miteinander vermischt. Bei Kollisionen der Tröpfchen werden Analyten aus den Probenröpfchen durch Flüssig-Flüssig-Extraktion in die geladenen Lösungsmitteltröpfchen extrahiert, wo sie nach dem ESI-Prinzip ionisiert werden [77]. Der schematische Aufbau der EESI-Quelle ist in Abbildung 4 dargestellt.

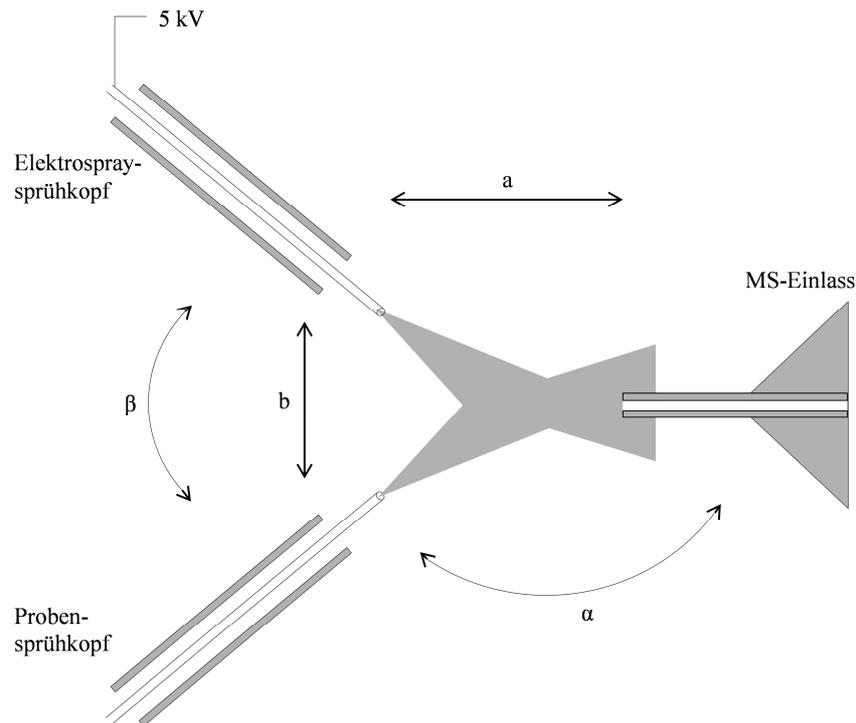


Abbildung 4: Schematische Darstellung der EESI, modifiziert aus [77].

Die EESI zeigt starke Überschneidungen mit der *Fused-droplet electrospray ionization* (FD-ESI), welche zur direkten Analyse von Peptiden und Proteinen in stark salzhaltiger oder puffer- und tensid-haltiger Lösung entwickelt wurde [78,79]. Die Probelösungen wurden hier durch Ultraschall vernebelt [78] bzw. pneumatisch versprüht [79] und mit elektrosprühenden Lösungsmitteltröpfchen in Kontakt gebracht.

Die EESI und die FD-ESI zeigen eine gegenüber der ESI deutlich erhöhte Salztoleranz. Als Erklärung hierfür wurde die schlechte Löslichkeit von beispielsweise NaCl in den organischen Lösungsmitteltröpfchen (Methanol) [78] und die Hypothese, dass Salze durch verstärkte

Solvatisierung bevorzugt im Inneren der Probentröpfchen stabilisiert sind und somit nicht in die Lösungsmitteltröpfchen extrahiert werden [77], postuliert.

Eine Abwandlung der EESI besteht in der Verwendung eines neutralen Gasstroms zur Beprobung von Oberflächen und der Vereinigung dieses Gasstroms mit elektroggesprühten Lösungsmitteltröpfchen. Diese Technik wurde als *Neutral desorption EESI* (ND-EESI) bezeichnet und zur *in vivo* Analyse von Substanzen auf menschlicher Haut eingesetzt [80].

Anwendungsbeispiele der EESI-MS umfassen die direkte Analyse von Atrazin in komplexer Matrix (Urin, Milch) [77], sowie die Quantifizierung von Melamin in Milch [81] und von Kreatinin in Urin [82]. Ferner wurde die EESI-MS zur Detektion nativer Proteine in biologischen Matrices [83] sowie von Diethylphthalat in Parfüm [84] eingesetzt und fand Anwendung in der *in vivo* Fingerprint-Analyse von nichtflüchtigen Verbindungen in menschlichem Atem [85]. Die ND-EESI-MS wurde beispielsweise zur Bestimmung des Reifegrades und der Qualität von Obst [86] sowie zur Detektion von Spuren von Hormonen und Sulfonamiden in viskosen Kosmetika [87] eingesetzt. Mittels ND-EESI-MS lassen sich auch Spuren von Sprengstoffen auf der menschlichen Haut detektieren und verdorbene Nahrungsmittel durch Nachweis typischer Zersetzungsprodukte identifizieren [80].

1.1.1.4 Paper spray ionization (PSI)

Die in der Arbeitsgruppe um COOKS entwickelte *Paper spray ionization* (PSI) [88] generiert Analytionen durch Anlegen einer hohen Spannung an ein Dreieck aus Papier, welches mit einer geringen Lösungsmittelmenge angefeuchtet wurde. Proben können vor der Befeuchtung auf das Papier gegeben, oder dem Lösungsmittel zugesetzt werden. Der Analyttransport erfolgt durch Kapillarkräfte im porösen Papier und durch die angelegte hohe Spannung wird ein Spray aus geladenen Tröpfchen an der Spitze des Papierdreiecks erzeugt [88,89]. Das Prinzip der PSI ist in Abbildung 5 dargestellt.

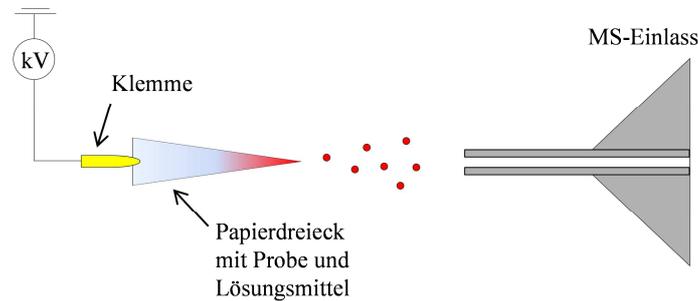


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Paper spray ionization, modifiziert aus [88,89].

Es wurde gezeigt, dass ein Spray nur an scharfen Spitzen des Papiers generiert wird und dass kleinwinklige Papierspitzen die Erzeugung des Sprays begünstigen, da hier die elektrische Feldstärke am höchsten ist [90]. Mittels PSI-MS kann eine große Bandbreite an Substanzen, von kleinen organischen Molekülen bis zu Proteinen, analysiert werden. Hierbei werden ESI-ähnliche Massenspektren erhalten [89]. Die PSI-MS wurde eingesetzt zur Analyse von Medikamenten in Vollblut [88], zur Detektion illegaler Drogen in Urin [89] und zur Analyse von Kontaminanten in Lebensmitteln, beispielsweise von Clenbuterol in Schweinefleisch [91]. Auch die Beprobung von Oberflächen nach dem Prinzip von Wischtests wurde am Beispiel der Detektion von Heroin auf einer Arbeitsfläche und von Agrochemikalien auf Fruchtoberflächen gezeigt [89]. Besonderes Potenzial besitzt die PSI-MS im Bereich der klinischen Anwendungen, insbesondere des Neugeborenen-Screenings, durch die Möglichkeit der direkten Analyse von *Dried blood spots* (DBS) [88].

1.1.1.5 Electrospray-assisted laser desorption ionization (ELDI), Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) und Laser ablation electrospray ionization (LAESI)

Bei der *Electrospray-assisted laser desorption ionization* (ELDI) [92], der *Matrix-assisted laser desorption electrospray ionization* (MALDESI) [93] und der *Laser ablation electrospray ionization* (LAESI) [94] werden Desorption und Ionisation der Probenbestandteile entkoppelt. Im ersten Schritt wird ein Laser auf die Probenoberfläche gerichtet, um Ionen zu produzieren und Neutralteilchen und größere Partikel zu desorbieren. Die Freisetzung von Neutralteilchen und Partikeln dominiert diesen Prozess. Der zweite Schritt besteht in der Nachionisation der

desorbierten Neutralteilchen durch ein Elektrospray, wobei ESI-ähnliche Massenspektren erhalten werden [3,13].

Die ELDI nutzt einen UV-Laser (gepulster Stickstoff-Laser der Wellenlänge 337 nm), welcher in einem Winkel von 45° auf die Probenoberfläche gerichtet wird. Um ein effizientes Vermischen der desorbierten Analyten mit dem elektrosprühenden Lösungsmittel zu erreichen, wird ein geringer Abstand (3 mm) der Elektrospray-Kapillare von der Probenoberfläche gewählt. Zusätzlich sollten die desorbierten Analyten zu einem frühen Zeitpunkt der Elektrosprayionisation, also wenn die geladenen Tröpfchen noch relativ groß sind, in das Spray eingebracht werden [92]. Der schematische Aufbau der ELDI-Quelle ist in Abbildung 6 dargestellt.

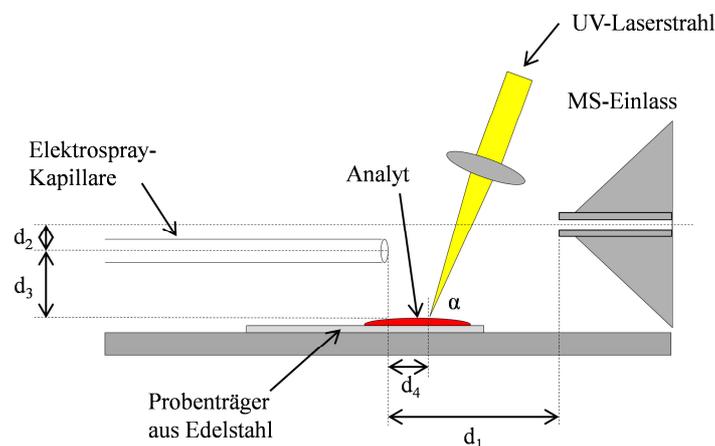


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ELDI, modifiziert aus [92].

Mittels ELDI-MS wurden ESI-ähnliche Massenspektren von Cytochrom C, deponiert auf einer metallischen Oberfläche, sowie des Rauschmittels Methaqualon direkt von der Tablettenoberfläche erhalten [92]. Anwendungen der ELDI-MS umfassen die direkte Detektion von Proteinen aus biologischem Material [95] und die Charakterisierung der chemischen Hauptkomponenten auf verschiedenen Oberflächen, beispielsweise der Farben auf einem Gemälde und der Wirkstoffe in Tabletten [96]. Des Weiteren wurde die ELDI-MS auch zum Monitoring von chemischen Reaktionen [97] und zur bildgebenden massenspektrometrischen Analyse von getrockneten Pilzen [98] eingesetzt.

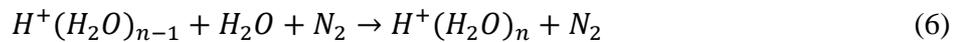
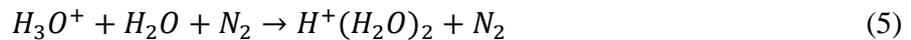
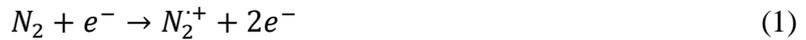
Die MALDESI unterscheidet sich insofern von der ELDI, als dass hier eine organische Säure (2,5-Dihydroxybenzoesäure oder Sinapinsäure) als Matrix eingesetzt wird, um die Laserdesorption zu verbessern. Die Analyse von Peptiden und Proteinen mittels MALDESI-MS zeigte ähnliche Ladungszustände, wie sie bei der Analyse mittels nanoESI-MS erhalten wurden, und belegt somit die Nachionisation laserdesorbierter Neutralteilchen nach dem ESI-Mechanismus [93]. Die MALDESI-MS fand Anwendung zur direkten Charakterisierung intakter Polypeptide [99].

Im Unterschied zur ELDI und zur MALDESI verwendet die LAESI zur Desorption einen IR-Laser (Er:YAG Laser der Wellenlänge 2940 nm), welcher im 90°-Winkel auf die Probe gerichtet wird. Diese Vorgehensweise eignet sich zur Analyse von Proben mit ausreichendem Wassergehalt, da in diesem Wellenlängenbereich OH-Vibrationen angeregt werden. Im Vergleich zur ELDI führt die LAESI zu einer stärkeren Materialabtragung von der Oberfläche und tieferem Eindringen des Laserlichtes in die Probe. Als weiteren Unterschied zur ELDI resultiert bei der LAESI bei größerem Abstand (10-30 mm) der Elektrospray-Kapillare von der Probenoberfläche eine erhöhte Sensitivität, was auf eine Ionisation durch Wechselwirkung größerer Partikel mit elektroggesprühtem Lösungsmittel hinweist [94]. Mittels LAESI-MS wurden kleine Moleküle, wie das Antihistaminikum Fexofenadin, und Proteine bis 66 kDa direkt in biologischen Proben (Urin, Vollblut, Serum) analysiert [94]. Anwendung findet die LAESI insbesondere in der bildgebenden Massenspektrometrie, beispielsweise zur Untersuchung der Verteilung kleiner Metabolite und Lipide in Rattenhirn [100]. Durch Kombination von Mikrodissektion und LAESI-MS unter Verwendung einer Lichtleitfaser konnte eine Analyse der Metabolite in unterschiedlichen Zellkompartimenten erreicht werden [101].

1.1.2 APCI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden

Neben der Elektrosprayionisation stellt die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (*Atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) ein weit verbreitetes Verfahren der Atmosphärendruck-Ionisation dar. Die APCI generiert Anlytionen durch Ion-Molekül-Reaktionen in der Gasphase [14]. Bereits 1973 wurde von HORNING radioaktives ^{63}Ni , ein β -Strahler, eingesetzt, um einen im heißen Stickstoffstrom aus einer Lösung verdampften Analyten bei Atmosphärendruck zu ionisieren. Die vom ^{63}Ni emittierten Elektronen setzen eine Sequenz

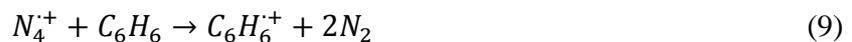
von Reaktionen, beginnend mit der Ionisation von Stickstoff (Primärionisation), in Gang. Bei Vorhandensein von Spuren von Wasser führt die Reaktionssequenz (Gleichung 1-6) letztendlich zur Bildung geladener Wassercluster [102]:



In Abwesenheit eines organischen Lösungsmittels oder Reaktandgases kann die Ionisation des Analyten (M) durch Ladungstransfer ausgehend von N_4^+ (Gleichung 7) oder durch Protonentransfer ausgehend von geladenen Wasserclustern (Gleichung 8) erfolgen [103]. Diese Gasphasenreaktionen laufen in Abhängigkeit der Ionisierungsenergie und der Gasphasenbasizität des Analyten ab.



In Gegenwart eines organischen Lösungsmittels wird nach Primärionisation von Stickstoff die Bildung von Reaktandionen durch das Lösungsmittel postuliert [104]. Bei Verwendung von Benzol würde beispielsweise zunächst Benzol durch Ladungstransfer ionisiert (Gleichung 9) und anschließend könnte dann die Ionisation des Analyten durch Ladungs- oder Protonentransfer erfolgen (Gleichung 10 und 11) [102,103]:



Nach neueren Untersuchungen von BENTER et al. erfolgt die Bildung von $[M + H]^+$ -Ionen in der *Dopant-assisted Atmospheric pressure photoionization* (DA-APPI) nicht durch direkte Reaktion von durch Photoionisation gebildeten Dopantionen mit dem Analyten, sondern über die Bildung protonengebundener Wasser-/Lösungsmittelcluster [105]. Ähnliches sollte für die Bildung von $[M + H]^+$ -Ionen mittels APCI in Gegenwart organischer Lösungsmittel, wie beispielsweise Benzol, gelten.

Analog zur konventionellen chemischen Ionisation (CI) im Vakuum können auch bei der APCI geringe Mengen eines Gases, wie beispielsweise Isobutan oder Ammoniak, in die Ionenquelle eingebracht werden, um dort Reaktandionen zu bilden [104]. Durch Wahl des Reaktandgases kann der Ionisationsprozess zu einem gewissen Grad kontrolliert werden [106]. Bei der APCI kommt es durch den erhöhten Druck im Vergleich zur konventionellen CI zu einer vermehrten Anzahl an Stößen. Dies erhöht zum einen die Effizienz der chemischen Reaktion des Analyten mit Reaktandionen durch verminderte Diffusion und längere Aufenthaltszeiten in der Quelle und reduziert zum anderen durch Stoßkühlung das Ausmaß von Fragmentierungen [107].

Zur Bildung negativer Analytionen in einer APCI-Quelle wurden mehrere Ionisationsmechanismen postuliert [102,108]. Die Bildung des Radikalanions ($M^{\cdot-}$) des Analyten kann durch Elektroneneinfang (Gleichung 12) [102] oder in Gegenwart von Sauerstoff über Elektroneneinfang durch Sauerstoff und die Addition des gebildeten $O_2^{\cdot-}$ an den Analyten (Gleichung 13 und 14) erfolgen [108]:



Häufig erfolgt eine Bildung von $[M - H]^-$ -Ionen des Analyten durch Protonenabstraktion [108]. Die Protonenabstraktion kann beispielsweise durch $O_2^{\cdot-}$ oder durch Chlorid, das in Gegenwart entsprechender Lösungsmittel durch dissoziativen Elektroneneinfang entsteht, erfolgen [108]. Des Weiteren können negative Analytionen durch dissoziativen Elektroneneinfang [102,108] oder durch Adduktbildung mit einem Anion, beispielsweise mit aus Dichlormethan entstandenem Chlorid [108], gebildet werden.

Anstelle der Verwendung von radioaktivem ^{63}Ni können die zur Primäriionisation notwendigen Elektronen auch durch Gleichspannungs-Koronaentladung erzeugt werden. Es wurde gezeigt, dass beide Ionenquellen zur Bildung identischer Reaktandionen führen und ähnliche Nachweisgrenzen erreicht werden. Der Einsatz der Koronaentladung ermöglicht einen größeren dynamischen Bereich der Ionenquelle [103,104].

In der Arbeitsgruppe um HORNING wurde die APCI erstmals zur LC-MS Kopplung eingesetzt [103]. Bei heutzutage verwendeten APCI-Ionenquellen wird das Eluat der LC pneumatisch in einen Verdampfer zerstäubt, wo es zur Verdampfung des Aerosols kommt. Die Primäriionisation

erfolgt durch Koronaentladung an der Spitze einer feinen Nadel (Korona-Nadel). Die an der Korona-Nadel angelegte Spannung liegt üblicherweise im Bereich von 3-5 kV und es werden Stromstärken im Mikroampere-Bereich (3-5 μA) erreicht [107].

APCI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden verwenden meist eine Kombination aus thermischer Desorption und Momentum-Desorption durch einen (heißen) Gasstrom, verbunden mit der Gasphasenionisation nach dem APCI-Prinzip. Es werden APCI-ähnliche Massenspektren erhalten [3,4]. Die Erzeugung der zur Ionisation der Analyten notwendigen Reaktandionen kann durch Koronaentladung oder innerhalb eines durch elektrische Entladung generierten Plasmas erfolgen [3,12].

Hinsichtlich der zugänglichen Analyten sind ESI- und APCI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden komplementär. ESI-basierte ambiente Ionisationsmethoden werden, wie die ESI, zur Ionisation polarer Analyten, auch mit hohem Molekulargewicht, eingesetzt. Durch Bildung mehrfachgeladener Ionen und Adduktbildung können komplexe Massenspektren resultieren. APCI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden eignen sich, wie die APCI, zur Analyse nieder- bis mittelpolarer Analyten, jedoch innerhalb eines eingeschränkten Massenbereichs. Die erhaltenen Massenspektren sind im Allgemeinen einfacher zu interpretieren, da sie durch einfachgeladene Molekülionen des Analyten dominiert werden [3,4,11].

1.1.2.1 Direct analysis in real time (DART)

Kurze Zeit nach der Einführung der DESI wurde im Jahr 2005 die *Direct analysis in real time* (DART)-Ionenquelle vorgestellt [2]. Die DART-Ionenquelle lässt sich in eine eingeschlossene Ionisationszone (Primärionisation und Bildung angeregter, neutraler Spezies) und eine Reaktionszone in offener Umgebung unterteilen [109]. In der Ionisationszone wird ein Gasstrom, meist Helium oder Stickstoff, durch ein segmentiertes Rohr geleitet. Eine elektrische Entladung zwischen einer Nadelelektrode und einer perforierten Scheibenelektrode erzeugt im ersten Segment ein Plasma aus Ionen, Elektronen und angeregten Atomen. Im zweiten Segment werden Ionen durch eine zweite perforierte Scheibenelektrode entfernt. Um eine thermische Desorption der Analyten von der Probenoberfläche zu ermöglichen, wird der Gasstrom im dritten Segment geheizt. Eine Gitterelektrode am Ausgang des segmentierten Rohres dient der Entfernung

entgegengesetzt geladener Ionen, um Signalverluste durch Ion-Ion-Rekombinationen zu verhindern. Der in die Reaktionszone austretende Gasstrom enthält lediglich angeregte, neutrale Spezies und kann auf flüssige oder feste Proben gerichtet werden, sowie mit gasförmigen Proben in Wechselwirkung treten [2,109,110]. Der schematische Aufbau der DART-Ionenquelle ist in Abbildung 7 dargestellt.

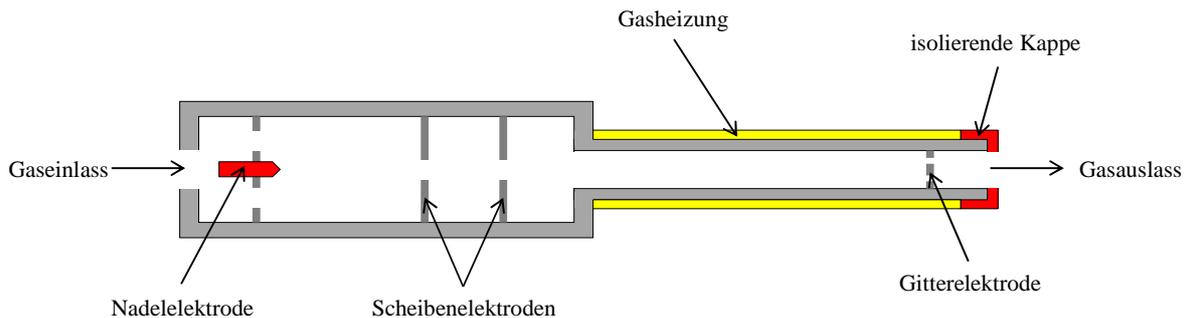


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der DART-Ionenquelle, modifiziert aus [110].

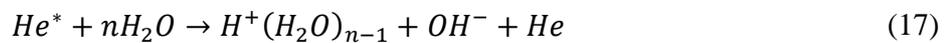
Üblicherweise wird an der Nadelelektrode ein Potential von 1-5 kV angelegt und die erste Scheibenelektrode geerdet. An der zweiten Scheibenelektrode und der Gitterelektrode wird im Positiv-Modus ein positives und im Negativ-Modus ein negatives Potential angelegt [14]. Der Gasfluss aus der DART-Ionenquelle kann entweder direkt auf den MS-Einlass gerichtet und die Probe zwischen dem Gasauslass der DART-Ionenquelle und dem MS-Einlass positioniert werden oder die DART-Ionenquelle wird auf eine Probenoberfläche gerichtet, sodass die Analytione, ähnlich zur DESI, in Richtung des MS-Einlasses reflektiert werden [2].

Basierend auf den grundlegenden Prinzipien der Ionisation könnte DART nach GROSS auch als „*thermal desorption Penning ionization-induced atmospheric pressure chemical ionization*“ bezeichnet werden [109]. Die meisten Anwendungen der DART-Ionenquelle verwenden Helium zur Erzeugung eines Plasmas in der Ionisationszone. In die Reaktionszone treten langlebige, angeregte (metastabile) Heliumatome im 2^3S -Zustand aus, welche eine interne Energie von 19,8 eV besitzen und gasförmige atmosphärische Bestandteile (Stickstoff, Sauerstoff, Wasser) sowie Analytmoleküle gemäß Penning-Mechanismus ionisieren können [2,109,111]. Die gebildeten metastabilen Atome können ihre Energie bei Zusammenstößen mit anderen Atomen auf diese übertragen [112]. Liegt die Ionisierungsenergie des Analyten unter der internen Energie

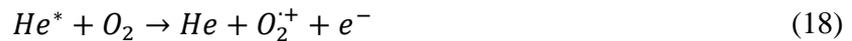
der angeregten Heliumatome kann theoretisch eine direkte Penning-Ionisation des Analyten (Gleichung 15) stattfinden [111]:



Aufgrund des großen Überschusses an Stickstoff wird aber wahrscheinlich hauptsächlich die Penning-Ionisation von Stickstoff sowie auch atmosphärischem Wasser (Gleichung 16 und 17) [109,111] zur Bildung von auch in der Reaktionssequenz der APCI (siehe Gleichung 1-6) auftretenden Reaktandionen führen und so die Ionisation des Analyten über Ladungs- oder Protonentransfer ermöglichen:



Eine Penning-Ionisation anderer atmosphärischer Bestandteile, beispielsweise von Sauerstoff, und anschließender Ladungstransfer (Gleichung 18 und 19) kann ebenfalls zur Ionisation des Analyten führen [109,111]:



Je nach Ionisierungsenergie und Protonenaffinität des Analyten sowie Ionisationsbedingungen (beispielsweise Ausmaß atmosphärischer Feuchtigkeit) kann im Positiv-Modus somit das Radikalkation (M^+) oder der protonierte Analyt ($[M + H]^+$) entstehen.

Hinsichtlich des Ionisationsmechanismus im Negativ-Modus wurde postuliert, dass bei der Reaktion von metastabilen Heliumatomen mit atmosphärischen Bestandteilen oder Oberflächen gebildete thermische Elektronen einem Elektroneneinfang, beispielsweise durch Sauerstoff, unterliegen und somit Reaktandionen generiert werden [2,109]. Die gebildeten O_2^- -Ionen reagieren mit dem Analyten wie unter 1.1.2 beschrieben durch Protonenabstraktion oder Addition/Ladungstransfer. Weitere Ionisationsmechanismen im Negativ-Modus beinhalten den direkten Elektroneneinfang durch den Analyten, dissoziativen Elektroneneinfang und Adduktbildung mit Anionen. Es wurde postuliert, dass DART und *Atmospheric pressure photoionization* (APPI) [113] sowie auch APCI [108] im Negativ-Modus identische Ionisationsmechanismen aufweisen.

Durch Einbringen eines Dotiermittels (*dopant*) in die Reaktionszone der DART-Ionenquelle können Addukte gebildet und so die Empfindlichkeit der Detektion bestimmter Analyten erhöht

werden. Ammoniak kann im Positiv-Modus zur Bildung von Ammoniumaddukten eingesetzt werden. Im Negativ-Modus können Chlorid- und Trifluoracetataddukte durch Einbringen von Dichlormethan bzw. Trifluoressigsäure generiert werden [2,109,111].

Ähnlich wie die DESI findet auch die DART unter anderem Anwendung im Bereich der Forensik und öffentlichen Sicherheit, in der Lebensmittelanalytik, sowie in den Life Sciences und der pharmazeutischen Analytik. In den Bereichen der öffentlichen Sicherheit und Forensik wurde die DART-MS zur Detektion chemischer Kampfstoffe [114] sowie zur Detektion von Sprengstoffen in latenten Fingerabdrücken [115] eingesetzt. Auf Kleidung befindliche Rückstände von Substanzen, die in von Banken verwendeten Diebstahlsicherungen eingesetzt werden, sowie Capsaicin als Rückstand von Pfefferspray konnten mittels DART-MS nachgewiesen werden [116]. Des Weiteren wurde die DART-MS zum Nachweis von Medikamentenfälschungen [117], zur Detektion von Gamma-Hydroxybuttersäure in Getränken [118] und zur Identifizierung von Tinten zur Authentizitätsprüfung von Dokumenten [119] eingesetzt. Anwendungen der DART-MS im Bereich der Lebensmittelanalytik umfassen das Screening von Fruchtoberflächen auf Pestizide nach Beprobung der Oberflächen durch Tupfer [120,121] und direkt von der Fruchtoberfläche [122], die Analyse von Mykotoxinen in Getreide [123] und Fingerprint-Analysen zur Unterscheidung von Tomaten und Paprika aus biologischem und konventionellem Anbau [124]. Die DART-MS wurde außerdem zur Quantifizierung von Koffein in verschiedenen Kaffeeproben [125], zur Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural in Honig [126] und zur Analyse von Isoflavonen in Soja [127] eingesetzt. Additive, wie Weichmacher, UV-Stabilisatoren und Photoinitiatoren, konnten mittels DART-MS in Lebensmittelverpackungen und Spielzeug nachgewiesen werden [128-131]. Weitere Anwendungen der DART-MS in den Life Sciences und der pharmazeutischen Analytik liegen in der Quantifizierung von Medikamenten in biologischen Matrices [132,133], der Analyse von Blutproben zum Neugeborenen-Screening auf Phenylketonurie [134], der Analyse intakter Bakterienzellen zur Differenzierung über das Fettsäuremuster [135] und der Analyse von aus Pflanzen freigesetzten flüchtigen Verbindungen [136]. Die Analyse von chinesischen Heilpflanzen sowie Zubereitungen derselben mittels DART-MS, zum Teil in Kombination mit multivariater Datenauswertung, ermöglicht eine Qualitätskontrolle dieser Produkte [137-141], sowie einen Nachweis des Zusatzes synthetischer Wirkstoffe [142]. Ferner wurde die DART

auch zur Kopplung der Dünnschichtchromatographie mit der Massenspektrometrie eingesetzt [67,143].

1.1.2.2 Atmospheric solids analysis probe (ASAP)

Die im Jahr 2005 vorgestellte *Atmospheric solids analysis probe* (ASAP) [144] stellt eine Atmosphärendruck-Variante der *vacuum solids probe*-Methoden dar, bei denen der Analyt mit Hilfe einer Schubstange ins Vakuum eingebracht und mittels Elektronenstoßionisation (EI) oder CI ionisiert wird. Bei der ASAP wird die feste oder flüssige Probe mit Hilfe einer Schmelzpunktkapillare in die Ionenquelle transportiert. Flüchtige und semiflüchtige Probenbestandteile werden durch den heißen Gasstrom aus einem ESI- oder APCI-Zerstäuber verdampft. Die Ionisation der verdampften Probenbestandteile erfolgt anschließend durch Koronaentladung unter üblichen APCI-Bedingungen [144]. Der schematische Aufbau der ASAP-Ionenquelle ist in Abbildung 8 gezeigt. Verglichen mit einer kommerziellen APCI-Quelle besteht die einzige Modifikation in einer Öffnung, durch die die Schmelzpunktkapillare in die Ionenquelle eingeführt werden kann [144].

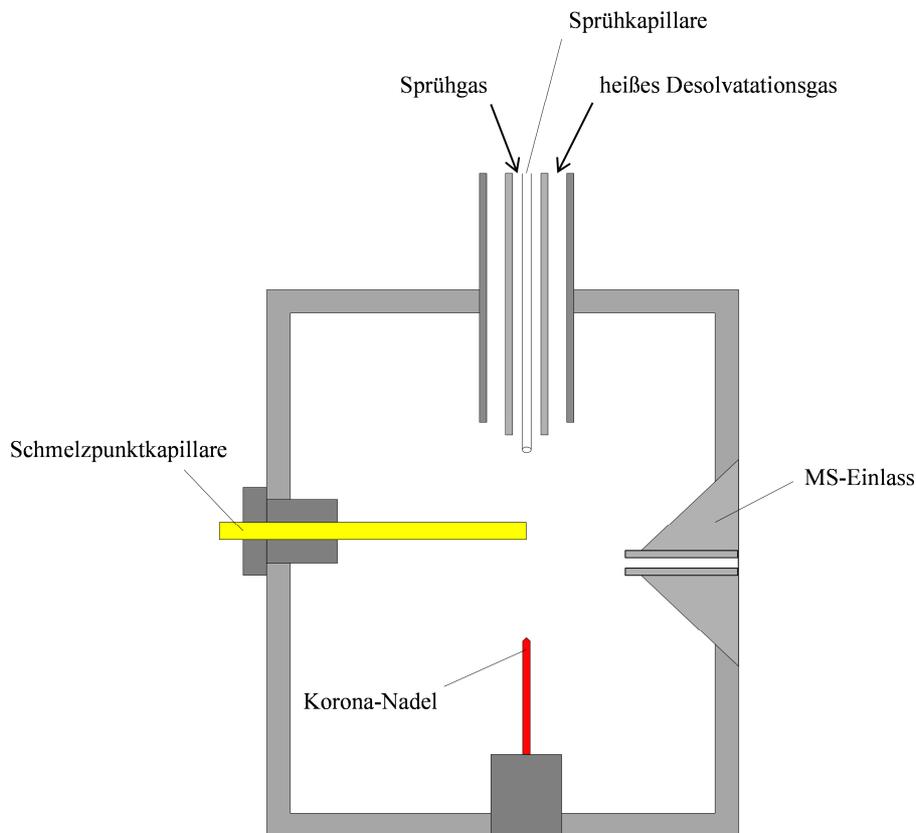


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer ASAP-Ionenquelle (modifizierte LC-MS Ionenquelle), modifiziert aus [144].

Aufgrund der Ionisation durch Koronaentladung unter üblichen (lösungsmittelfreien) APCI-Bedingungen können mittels ASAP-MS Substanzen analysiert werden, die einer APCI-Ionisation zugänglich sind [144]. Am Beispiel der Analyse von Steroiden wurde gezeigt, dass im Positiv-Modus das Ausmaß der Bildung des protonierten Analyten ($[M + H]^+$) und des Radikalkations (M^+) durch den Feuchtigkeitsgehalt in der Ionenquelle beeinflusst werden kann. Ein erhöhter Feuchtigkeitsgehalt in der Ionenquelle fördert die Bildung geladener Wassercluster und somit die Ionisation des Analyten durch Protonentransfer, wogegen in trockener Umgebung eine Ionisation des Analyten durch Ladungstransfer von ionisiertem Stickstoff begünstigt ist [145].

Im Bereich der öffentlichen Sicherheit und Forensik wurde die ASAP-MS zum Screening von Urin auf Metaboliten von Organophosphor-Kampfstoffen [146] eingesetzt. Mittels ASAP-MS/MS konnten isobare Amino-Sulfonamide unterschieden werden, was einen Nachweis von

Medikamentenfälschungen ermöglicht [147]. Die ASAP-MS wurde des Weiteren zur schnellen Wirkstoffanalyse von Medikamenten [148] und zum Nachweis von Medikamentenspuren auf Geldscheinen [144] eingesetzt. Im Bereich der Lebensmittelanalytik fand die ASAP-MS Anwendung zum Nachweis von Strobilurin-Fungiziden in Getreide [149], zur Detektion von Carotinoiden in Spinat [144] und zur Identifizierung künstlichen Vanillearomas in Lebensmitteln [150]. Die Analyse von Pilzzellen zur Untersuchung der Hemmung der Ergosterol-Synthese [151], von Nucleosiden [152] sowie von Gallenflüssigkeit und Urin [153] zeigen Einsatzgebiete der ASAP-MS im Bereich der Life Sciences. Anwendungen der ASAP-MS im Bereich der Werkstoffkunde umfassen die Identifizierung von Polymeren und Polymerzusätzen [154,155] und die Charakterisierung von Polysorbat-Formulierungen [156]. Ferner wurde die ASAP-MS zur Analyse sekundären organischen Aerosols [157] und von Ablagerungen in Ölpipelines [158], zum Reaktionsmonitoring in der organischen Synthese [159] und zur Messung des Dampfdrucks und der Sublimationswärme von Dicarbonsäuren [160] eingesetzt. Die ASAP-Ionenquelle wurde auch mit der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie gekoppelt und zur Analyse von Erdöl [161], der Charakterisierung von Polypropylen [162] und der Identifizierung von Verunreinigungen in pharmazeutischen Produkten [163] verwendet. Abwandlungen der ASAP-Ionenquelle umfassen die Kombination der Probeneinbringung mit Hilfe einer Schmelzpunktkapillare mit der Desorption und Ionisation nach dem DESI-Prinzip [164] und mit der Laserspray-Ionisation [165].

1.1.2.3 Desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI)

Die *Desorption atmospheric pressure chemical ionization* (DAPCI) wurde als erstes von COOKS et al. im Zusammenhang mit der Aufklärung des Mechanismus der DESI-Analyse von Sprengstoffen beschrieben [37]. In der DAPCI-Ionenquelle wurde die Sprühkapillare der DESI-Ionenquelle durch eine Edelstahlnadel, an die eine Spannung im Bereich von 3-6 kV angelegt wurde, ersetzt. Verschiedene Lösungsmitteldämpfe wurden dem Sprühgasfluss als Reaktanden zugesetzt und durch Koronaentladung an der Edelstahlnadel ionisiert [37]. Die in der DAPCI-Ionenquelle ablaufenden Ionisationsmechanismen ähneln denen anderer APCI-basierter Ionenquellen [5]. Hinsichtlich der Desorption wurden verschiedene Mechanismen postuliert. Wird der Sprühgasfluss geheizt [166,167], kann die Desorption thermisch erfolgen. Auch eine

Desorption durch den Aufprall des Sprühgases ist möglich [5]. Zur Erklärung der Desorption in einem sprühgasfreien Aufbau der DAPCI-Ionenquelle [168] wurde eine Ladungsansammlung auf der Probenoberfläche, welche die Desorption von Ionen erleichtert, postuliert [5].

Die DAPCI-MS wurde unter Einsatz eines Methanol/Wasser-Gemisches sowie lösungsmittelfrei zur Analyse pharmazeutischer Tabletten und Salben eingesetzt und mit der DESI-MS und der DART-MS verglichen. Die DAPCI führte hierbei zu einer effizienteren Ionisierung eines schwach polaren Corticosteroids als die DESI. Die Verwendung eines Methanol/Wasser-Gemisches als Reaktand verbesserte die Ionisationseffizienz [166]. Die DAPCI-MS wurde im Negativ-Modus zur selektiven Detektion nitroaromatischer Sprengstoffe unter Verwendung von Acetonitril bzw. Luft als Reaktanden eingesetzt, wobei dieselben Addukte erhalten wurden, wie bei konventioneller APCI [169]. Peroxid-basierte Sprengstoffe konnten mittels DAPCI-MS im Positiv-Modus durch Zusatz von Ammoniumacetat zum Sprühgas als Ammoniumaddukte detektiert werden [38]. Durch Dotierung des Sprühgasflusses mit Naphthalin als Ladungstransfer-Reaktand konnten Analyten, welche nicht durch Protonentransfer ionisierbar sind, wie beispielsweise der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff Chrysen, als Radikalkationen detektiert werden [170]. Ein sprühgas- und lösungsmittelfreier Aufbau der DAPCI-Ionenquelle nutzte Umgebungsluft mit 60 % relativer Luftfeuchtigkeit als Reaktand. Dieser Aufbau wurde unter anderem zur Analyse pulverförmiger pharmazeutischer Zubereitungen, zum Nachweis von Sudanfarbstoffen in Tomatensoße, zur Identifizierung von Markersubstanzen für die Verderbnis von Fisch und zur Detektion von Metaboliten auf der menschlichen Haut eingesetzt [168].

Weitere Anwendungen der DAPCI-MS umfassen beispielsweise die Detektion der Wirkstoffe pharmazeutischer Salben auf menschlicher Haut sowie von Ibuprofen-Metaboliten in menschlichem Urin [166], die Differenzierung verschiedener Teesorten durch Fingerprint-Analyse [171], die Authentifizierung von Ginseng-Produkten [172] und die Detektion von Melamin in Milchprodukten [167]. Die DAPCI-Ionenquelle wurde auch zur bildgebenden massenspektrometrischen Analyse von Dokumenten und deren Authentifizierung eingesetzt [173].

1.1.2.4 Desorption atmospheric pressure photoionization (DAPPI)

Die im Jahr 2007 von HAAPALA et al. vorgestellte *Desorption atmospheric pressure photoionization* (DAPPI) [174] stellt die ambiente Variante der *Atmospheric pressure photoionization* (APPI) dar. Die APPI wurde erstmals im Jahr 2000 zur LC-MS Kopplung eingesetzt [175]. Die Photoionisation erfolgt bei der APPI durch eine Krypton-Entladungslampe, welche UV-Photonen von 10 eV emittiert. Das Eluat der LC wird vor dem Einleiten in die Photoionisationsregion, üblicherweise durch pneumatische Zerstäubung in einen ebenfalls in der APCI verwendeten Verdampfer, vollständig verdampft. Eine direkte Photoionisation des Analyten (Gleichung 20) ist möglich, wenn dessen Ionisierungsenergie unterhalb von 10 eV liegt:



Dies ist jedoch statistisch unwahrscheinlich, da die UV-Photonen eher von den Lösungsmittelmolekülen oder dem Sprühgas absorbiert werden. Übliche in der LC verwendete Lösungsmittel besitzen Ionisierungsenergien oberhalb von 10 eV (Wasser: 12,6 eV; Acetonitril: 12,2 eV; Methanol: 10,8 eV [14]) und werden nicht durch direkte Photoionisation ionisiert. Daher wird dem LC-Eluat ein photoionisierbares Dotiermittel, beispielsweise Toluol oder Aceton, zugesetzt, welches Reaktandionen bildet und den Analyten durch Ladungs- oder Protonentransfer ionisiert [14,175]. Es wurde postuliert, dass mittels APPI ähnliche Substanzen ionisiert werden können, wie mittels APCI und dass ähnliche Ion-Molekül-Reaktionen für die Ionisation des Analyten verantwortlich sind, unabhängig vom unterschiedlichen Bildungsweg der Reaktandionen [175]. Neuere Untersuchungen von BENTER et al. hinsichtlich des Ionisationsmechanismus der APPI und der *Atmospheric pressure laser ionization* (APLI) unter Einsatz von Dotiermitteln bestätigen die Bildung eines Radikalkations des Dotiermittels in der Primärionisation. Anschließend erfolgt nach BENTER et al. jedoch kein direkter Protonentransfer vom Dotiermittel auf den Analyten. Stattdessen erfolgt eine Clusterbildung von Dotiermittellionen mit Wasser oder LC-Lösungsmitteln und komplexe Reaktionen führen nahezu unverzüglich zur Entstehung protonengebundener Wasser-/Lösungsmittelcluster. Diese protonengebundenen Cluster führen letztendlich zur Bildung von $[M + H]^+$ -Ionen des Analyten [105].

Bei der DAPPI wird ein in einem Mikrochip-Zerstäuber erzeugter heißer Strahl aus Lösungsmitteldampf und Sprühgas auf die Probenoberfläche gerichtet und bewirkt dort die thermische Desorption des Analyten. Eine ebenfalls auf die Probenoberfläche gerichtete Krypton-Entladungslampe löst die Photoionisation in der Gasphase oberhalb der Probenoberfläche aus [174]. Der Aufbau der DAPPI-Ionenquelle ist in Abbildung 9 gezeigt.

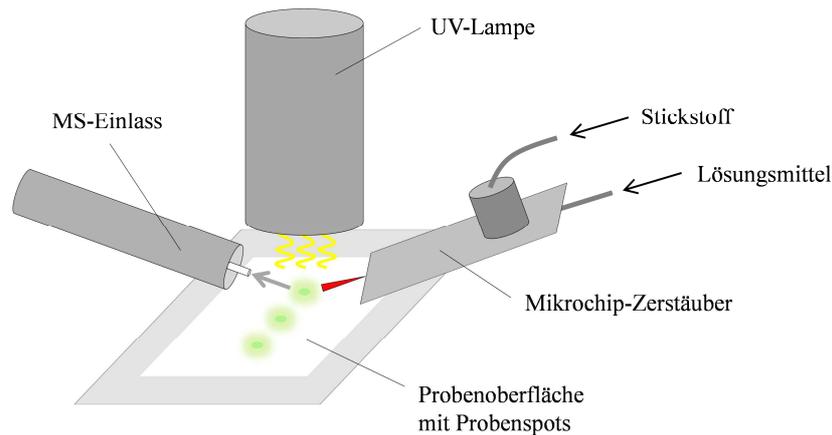


Abbildung 9: Schematische Darstellung der DAPPI-Ionenquelle, modifiziert aus [174].

Verglichen mit der DESI-MS zeigt die DAPPI-MS eine verbesserte Sensitivität für weniger polare Analyten [174]. Es wurde gezeigt, dass die Art der mittels DAPPI gebildeten Ionen, wie bei der APPI auch, vom Analyten und dem Lösungsmittel bzw. Dotiermittel abhängig ist [176]. Im Positiv-Modus werden unpolare Analyten mit geringer Protonenaffinität durch Ladungstransfer von aus dem Dotiermittel gebildeten Radikalkationen ionisiert, was durch die Verwendung von Toluol oder Anisol als Dotiermittel gefördert wird. Polare Analyten mit hoher Protonenaffinität werden beispielsweise von aus Aceton und Hexan erzeugten protonenliefernden Reaktandionen durch Protonentransfer ionisiert [176]. Hier sei noch einmal auf die Untersuchungen von BENTER et al. verwiesen, nach denen die Bildung von $[M + H]^+$ -Ionen nicht durch direkte Reaktion von Dotiermittelionen mit dem Analyten, sondern über die Bildung protonengebundener Wasser-/Lösungsmittelcluster erfolgt [105]. Im Negativ-Modus beeinflusst die Wahl des Dotiermittels lediglich die Signalintensität, nicht aber die Art der gebildeten Ionen. Radikalanionen können durch Elektroneneinfang durch den Analyten oder durch Ladungstransfer von gebildetem O_2^- auf den Analyten entstehen. O_2^- kann ebenfalls zur Protonenabstraktion und der Bildung des $[M - H]^-$ -Ions führen. Der vorherrschende

Ionisationsmechanismus ist abhängig von der Elektronenaffinität und Gasphasenacidität des Analyten, saure Analyten bilden bevorzugt $[M - H]^-$ -Ionen. Die Signalintensität ist abhängig von der vorhandenen Menge an Elektronen, welche wiederum von der Ionisierungsenergie des Dotiermittels abhängt [176].

Die DAPPI-MS wurde zur direkten Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe von der Tablettenoberfläche [174] und zur Analyse verschiedener konfiszierter Drogen [42,177] eingesetzt. Im Bereich der Lebensmittel- und Umweltanalytik wurden Lipide in Lebensmittelproben [178] mittels DAPPI-MS analysiert sowie Pestizide auf der Fruchtoberfläche und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe in einer gespikten Bodenprobe nachgewiesen [179].

1.1.2.5 Weitere APCI-verwandte ambiente Ionisationsmethoden

Die *Plasma-assisted desorption ionization* (PADI) [180], die *Dielectric barrier discharge ionization* (DBDI) [181] sowie die *Low-temperature plasma* (LTP) [182] und *Flowing-afterglow atmospheric pressure glow discharge* (FA-APGD) [107,183] Ionenquellen stellen weitere ambiente Ionisationsmethoden dar, die auf elektrischer Entladung basieren.

Bei der PADI wird ein kaltes Plasma direkt auf die Probenoberfläche gerichtet und bewirkt dort die Desorption und Ionisation der Analyten. Die PADI-Ionenquelle verwendet einen Edelstahldraht, welcher auf der einen Seite nadelähnlich angespitzt ist, als Elektrode. Der Edelstahldraht befindet sich koaxial in einem Keramikrohr, welches wiederum koaxial in einem Quarzrohr sitzt. Das Keramik- und das Quarzrohr besitzen unabhängige Gasanschlüsse, durch sie können ein oder mehrere Gase (meist Helium) geleitet werden. An den Edelstahldraht wird eine Wechselspannung im Radiofrequenzbereich angelegt und somit ein kaltes Plasma durch atmosphärische Glimmentladung erzeugt. Im Unterschied zur DART, ASAP und DAPCI, welche Koronaentladungen verwenden, ist die bei der PADI eingesetzte Glimmentladung durch geringere Spannungen und höhere Ströme charakterisiert. Zudem heizt das bei der PADI generierte kalte Plasma die Probenoberfläche nicht auf [180]. Die PADI-MS wurde zur Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe in Tabletten und Salben [180], zur Fingerprint-Analyse von Polymeren [184] sowie zur Detektion von Nikotin aus Tabak und Thiosulfaten aus Knoblauch [180] eingesetzt.

Die DBDI-Ionenquelle basiert auf der Erzeugung eines Plasmas durch stille elektrische Entladung (*dielectric barrier discharge*, DBD) durch Anlegen einer Wechselspannung zwischen zwei Elektroden, die durch ein Dielektrikum getrennt sind. Eine hohle Stahlnadel, durch die Helium oder ein anderes Gas geleitet wird, dient als Entladungselektrode und eine Kupferplatte als Gegenelektrode. Zwischen die beiden Elektroden, auf die Oberfläche der Kupferplatte, wird eine Glasplatte eingebracht, die gleichzeitig als Dielektrikum und als Probenhalter dient. Durch Anlegen einer Wechselspannung zwischen den Elektroden wird ein kaltes Plasma zwischen der Nadelelektrode und der Glasoberfläche erzeugt. Auf der Glasoberfläche befindliche Analyten werden desorbiert und ionisiert [181]. Mittels DBDI-MS wurden verschiedene Aminosäuren analysiert [181] und Sprengstoffe auf unterschiedlichen Oberflächen (u.a. Papier, Stoff, Glas) detektiert [185].

Die LTP-Ionenquelle basiert ebenfalls auf der Erzeugung eines Plasmas durch stille elektrische Entladung, unterscheidet sich jedoch im Aufbau von der DBDI-Ionenquelle. Die in Form einer Sonde aufgebaute Ionenquelle besteht aus einer Glasröhre, in der sich koaxial eine geerdete Edelstahlelektrode befindet. An der Außenseite der Glasröhre ist Kupferband als Gegenelektrode angebracht und die Glasröhre dient als Dielektrikum. Durch die Glasröhre wird ein Entladungsgas (Helium, Argon, Stickstoff oder auch Luft) geleitet. Durch Anlegen einer hohen Wechselspannung an der Außenelektrode wird ein Plasma erzeugt, welches durch die Kombination aus Gasfluss und elektrischem Feld - ähnlich einer Fackel - aus der LTP-Sonde austritt und auf die Probenoberfläche gerichtet werden kann. Im Unterschied zur DBDI-Ionenquelle muss die Probe bei der LTP-Ionenquelle daher nicht zwischen den beiden Elektroden platziert werden. Die LTP-Ionenquelle kann zur *in vivo* Analyse eingesetzt werden, da die Temperatur der Probenoberfläche in Kontakt mit dem Plasma lediglich ca. 30 °C beträgt und die Gefahr eines Elektroschocks an der Probenoberfläche aufgrund des Aufbaus der Ionenquelle nicht besteht [182]. Anwendungen der LTP-MS umfassen die Detektion von Sprengstoffen auf Oberflächen [182,186], die Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe in Tabletten [182] und die Detektion von Kokain direkt von einem menschlichen Finger [182]. Des Weiteren wurde die LTP-MS zum Screening von Agrochemikalien in Lebensmitteln [187], zur direkten Analyse von Olivenöl [188] und zur direkten Differenzierung von Bakterien aufgrund des Musters der Fettsäureethylester [189] eingesetzt.

Die von ANDRADE et al. vorgestellte FA-APGD-Ionenquelle [107,183] wurde in der Literatur auch als *Flowing atmospheric pressure afterglow* (FAPA) [11], *Helium atmospheric pressure glow discharge ionization* (HAPGDI) [3] oder *Atmospheric pressure glow discharge desorption ionization* (APGDDI) [5] bezeichnet. Die FA-APGD-Ionenquelle besteht aus einer Wolfram-Nadelelektrode und einem Messingblech als Gegenelektrode, die sich in einer mit Helium gefüllten Entladungskammer befinden. Durch Anlegen einer Gleichspannung zwischen Nadel- und Gegenelektrode wird eine Glimmentladung erzeugt. Helium wird über einen Einlass in die Entladungskammer geleitet und angeregte Spezies gelangen durch eine Öffnung im Messingblech in die offene Atmosphäre, wo sie Reaktandionen erzeugen und die Desorption und Ionisation der Analyten bedingen [107,183]. Die FA-APGD-MS wurde zur Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe in Tabletten [183], sowie zur Fingerprint-Analyse verschiedener Polymere [190] und zum Nachweis von Phthalaten in Lebensmittelverpackungen [190] eingesetzt.

1.1.3 Potentiale und Limitierungen der ambienten Massenspektrometrie

Ambiente Ionisationsmethoden ermöglichen die direkte massenspektrometrische Analyse von Proben in ihrem natürlichen Zustand, ohne vorhergehende Probenvorbereitung und Trennung. Der wichtigste Vorteil der ambienten Massenspektrometrie liegt somit in der Vereinfachung und Beschleunigung des Arbeitsablaufs der massenspektrometrischen Analyse mit der Möglichkeit zur Hochdurchsatzanalytik [3,4,8,10,12,13]. Des Weiteren behalten die Proben im Verlauf der Analyse im Allgemeinen ihren Originalzustand bei [9].

Anwendungsgebiete, in denen die Vorzüge der ambienten Massenspektrometrie zum Tragen kommen, liegen insbesondere im Bereich der öffentlichen Sicherheit, Forensik, pharmazeutischen Analytik, Lebensmittelanalytik und Qualitätskontrolle [8,13,191]. Daneben liegen vielversprechende Einsatzgebiete der ambienten Ionisationsmethoden im Bereich der bildgebenden Massenspektrometrie [8,60-65,98] und der *in vivo* Analyse [9,80,85,166,182].

Parallel zum Trend der Entwicklung ambienter Ionisationsmethoden ist ein Trend zur Miniaturisierung von Massenspektrometern zu beobachten. Die Miniaturisierung von Massenspektrometern besitzt das Potential der *in situ* Analyse, beispielsweise der *in situ*

Detektion chemischer Kampfstoffe. Die Kombination mit ambienten Ionisationsmethoden kann die *in situ* Analyse von Proben in ihrem natürlichen Zustand ermöglichen [10,191].

Die massenspektrometrische Analyse von Proben ohne vorhergehende Probenvorbereitung und Trennung bedingt nicht nur den größten Vorteil der ambienten Massenspektrometrie, sondern bringt zugleich einige Limitierungen mit sich.

Das Fehlen einer chromatographischen Trennung der Probenbestandteile vor der massenspektrometrischen Analyse bewirkt einen Verlust an Selektivität und kann zu Problemen bei der spezifischen Detektion eines Probenbestandteils führen. Zur Unterscheidung von in einer Probe enthaltenen Verbindungen gleicher Nominalmasse ist der Einsatz hochauflösender Massenspektrometer erforderlich, Isomere lassen sich, wenn überhaupt, lediglich über MS/MS- oder MSⁿ-Analytik voneinander unterscheiden [4,110,192,193].

Ein weiteres Problem, welches durch das Fehlen einer chromatographischen Trennung verstärkt wird, sind Matrixeffekte. Als Matrixeffekt wird eine Unterdrückung (Suppression) oder Verstärkung des Analytsignals durch den Einfluss der Matrix bezeichnet [194,195]. In der LC-MS Analytik stellen meist in Form einer Ionensuppression auftretende Matrixeffekte eines der größten Probleme dieser Technik dar. Ionensuppressionseffekte treten bei der Ionisation mittels ESI stärker ausgeprägt auf, als bei der Ionisation mittels APCI [194-197], was zum Teil durch die zeitliche Trennung von Verdampfung und Ionisation im Fall der APCI begründet wird [198]. Der Mechanismus der Ionensuppression ist nicht vollständig verstanden. Im Fall der ESI wurde eine Konkurrenz des Analyten mit Matrixbestandteilen um vorhandene Ladung [194,197] sowie Veränderungen der Tröpfcheneigenschaften durch das Vorhandensein von Matrixbestandteilen [196,197] postuliert. Im Fall der APCI sollte keine Konkurrenz von Analyt und Matrixbestandteilen um den Übergang in die Gasphase bestehen. Postulierte Erklärung für beobachtete Ionensuppressionseffekte ist die Konkurrenz des Analyten mit Matrixbestandteilen um die Ionisation in der Gasphase durch unterschiedliche Elektronenaffinitäten bzw. Protonenaffinitäten von Analyt und Matrix [195,198]. Matrixeffekte können in der ambienten Massenspektrometrie verstärkt auftreten, wobei sowohl die Desorption, als auch die Ionisation des Analyten durch die Matrix beeinflusst werden kann [193,198]. Matrixeffekte stellen eine der wichtigsten Beeinträchtigungen der ambienten Massenspektrometrie dar [9,110,125,133] und bewirken insbesondere Limitierungen bei der quantitativen Analyse [10,109].

Der Einsatz der ambienten Massenspektrometrie in der quantitativen Analyse wird auch durch relativ starke Schwankungen der Signalintensitäten zwischen wiederholten Messungen bzw. eine oftmals relativ schlechte Reproduzierbarkeit erschwert [10,110]. Im Fall der DESI können relative Standardabweichungen (%RSD) von wenigen Prozent erreicht werden, meist liegt die relative Standardabweichung jedoch im Bereich von 20 % [10]. Während einer DART-MS Analyse eines Ethylacetat-Extraktes mit Pestizidrückständen wurden relative Standardabweichungen von ca. 60 % beobachtet [52]. Bei vielen ambienten Ionisationsmethoden ist die reproduzierbare Positionierung der Probe in der Ionenquelle von größter Bedeutung [9,193,199]. Zur Kompensation der Schwankungen der Signalintensitäten zwischen wiederholten Messungen können interne Standards eingesetzt werden [110]. Diese Vorgehensweise wurde in fast allen publizierten Anwendungen der ambienten Massenspektrometrie in der quantitativen Analyse gewählt [36,52,60,123,125,133]. Die Verwendung stabilisotopenmarkierter Analyt-Analoga als interner Standard ermöglicht auch die Kompensation von Matrixeffekten [6,110,125,133]. Problematisch ist jedoch der Einsatz eines internen Standards bei der Analyse fester Proben bzw. der Analyse von Oberflächen [10,110].

Aufgrund der beschriebenen Potentiale und Limitierungen der ambienten Massenspektrometrie erscheint, beispielsweise im Bereich der Lebensmittelanalytik, ein Einsatz der ambienten Massenspektrometrie zum vorausgehenden Screening, nicht aber ein Ersatz der Chromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung durch die ambiente Massenspektrometrie, sinnvoll [187].

1.2 Das Phloem von Pflanzen

Pflanzen nehmen Kohlenstoff und Stickstoff in anorganischer Form auf und erzeugen daraus in photosynthetisch aktiven Blättern organische Moleküle. Die erzeugten Metabolite dienen zum einen der Ernährung der verschiedenen Pflanzenorgane. Sie müssen vom Ort ihrer Produktion zu den Orten des Verbrauchs transportiert werden. Zum anderen werden einigen erzeugten Metaboliten Funktionen bei der Regulation des Stoffwechsels und der Entwicklung der Pflanze, sowie der pflanzlichen Abwehr zugeschrieben. Auch diese Funktionen machen einen Transport der entsprechenden Metabolite erforderlich. Ein Nahtransport kann direkt von Zelle zu Zelle erfolgen, für den Ferntransport existiert ein spezielles Leitungssystem [200-204].

1.2.1 Transportwege in Pflanzen

Der in Pflanzen über kurze Distanzen erfolgende Transport von Zelle zu Zelle kann über zwei verschiedene Mechanismen stattfinden. Pflanzenzellen sind untereinander durch zahlreiche Plasmodesmen verbunden. Durch die Plasmodesmen ist eine Diffusion kleiner Ionen und Metabolite von Zelle zu Zelle möglich (symplastischer Transport). Eine alternative Transportmöglichkeit besteht im apoplastischen Transport. Hierbei werden die Transportmoleküle von einer Zelle in den extrazellulären Raum (Apoplast) abgegeben und von einer anderen Zelle in den Symplasten aufgenommen, wofür spezifische Transportproteine zum Transport durch die Plasmamembran erforderlich sind [201].

Das Ferntransportsystem von Pflanzen besteht aus Xylem und Phloem, die gemeinsam mit Parenchymzellen in Leitbündeln zusammengefasst sind. Im Xylem werden hauptsächlich Wasser und gelöste mineralische Nährstoffe von den Wurzeln zu den Blättern transportiert [200,205]. Das Phloem dient dem Transport von Metaboliten, hauptsächlich Kohlenhydrate und Stickstoffverbindungen in Form von Aminosäuren, von den Orten der Produktion (*source*) zu den Orten des Verbrauchs (*sink*) [200,201,205]. Orte des Verbrauchs sind heterotroph wachsende Organe, beispielsweise Knospen und Wurzeln, sowie junge Blätter, die für ihr Wachstum noch mehr Assimilate verbrauchen, als sie durch Photosynthese produzieren. Reifen junge Blätter zu Orten der Produktion heran, ist es erforderlich, dass sich die Transportrichtung des Phloems ändert [200].

1.2.2 Aufbau des Phloems und Phloembeladung

Das Phloem von Angiospermen (Bedecktsamer) besteht aus Siebröhren und Geleitzellen, welche eine funktionelle Einheit (Siebröhren-Geleitzellen-Komplex) bilden und von Phloemparenchymzellen umgeben sind. Die Siebröhren sind die eigentlichen Transportbahnen für den Phloemsaft, sie bestehen aus verlängerten Zellen, die Siebröhrenglieder, welche über Siebplatten (erweiterte Plasmodesmen) miteinander verbunden sind. Die Siebröhrenglieder sind lebende Zellen, die im Verlauf der Differenzierung ihren Zellkern und weitere Zellorganellen verloren haben. Jedes Siebröhrenglied ist durch Plasmodesmen mit einer oder mehreren Geleitzellen eng verbunden. Die Geleitzellen sind essentiell für die Funktion der

Siebröhrenglieder, sie versorgen die Siebröhrenglieder mit Energie und synthetisierten Proteinen und sind an der Beladung des Phloems beteiligt [200,203,205].

Die Beladung des Phloems mit Metaboliten kann über zwei verschiedene Wege erfolgen. Bei der symplastischen Beladung werden die in Mesophyllzellen produzierten Metabolite über Plasmodesmen durch die Geleitzellen bis in die Siebröhren transportiert. Die Durchlässigkeit der Plasmodesmen ist für Moleküle bis zu 1 kDa belegt. Ein Transport gegen einen Konzentrationsgradienten über die Plasmodesmen scheint jedoch nicht möglich, da der Transport über Plasmodesmen passiv erfolgt. Die apoplastische Phloembeladung beinhaltet eine Abgabe der Metabolite in den extrazellulären Raum und die Aufnahme in die Geleitzellen durch aktiven Transport mit Hilfe von Transportproteinen. Ein Beispiel für ein Transportprotein ist der Saccharose-H⁺-Cotransporter SUT1, welcher einen Transport von Saccharose unter Proton-Symport und Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch ermöglicht [200,203,205]. Die meisten Holzpflanzen besitzen eine hohe Plasmodesmendichte um den Siebröhren-Geleitzellen-Komplex und die Phloembeladung erfolgt rein symplastisch. Viele krautige Pflanzen hingegen besitzen wenige oder keine Plasmodesmen um den Siebröhren-Geleitzellen-Komplex und beladen das Phloem apoplastisch. Daneben treten Mischtypen mit beiden Arten der Phloembeladung auf [200].

1.2.3 Inhaltsstoffe von Phloensaft

Phloensaft weist einen leicht alkalischen pH-Wert im Bereich von 7,2-8,5 auf [202,206]. Kalium ist das mengenmäßig überwiegende Kation, daneben kommen Natrium, Magnesium und Calcium im Phloensaft vor. Unter den Anionen ist Chlorid vorherrschend, zudem sind Phosphat und Sulfat im Phloensaft nachweisbar [202,207,208].

Die hauptsächlich im Phloem transportierten Metabolite stammen aus der Gruppe der Kohlenhydrate. Bei Pflanzen mit rein apoplastischer Phloembeladung erfolgt der Kohlenstofftransport fast ausschließlich in Form des Disaccharids Saccharose, je nach Pflanze liegen im Phloensaft Konzentrationen im Bereich von 150-1800 mM vor [201-204,207-217]. Im Fall von Pflanzen mit symplastischer Phloembeladung erfolgt ein Kohlenstofftransport auch in Form von Oligosacchariden der Raffinose-Familie (Trisaccharid Raffinose bzw. Tetrasaccharid Stachyose), wobei die Konzentrationen z.T. die Saccharosekonzentration im entsprechenden

Phloemsaft übersteigen [204,207,209,212]. Einige Pflanzenarten (z.B. Wegerich, Pfirsich, Sellerie, Apfel) transportieren im Phloem auch die Polyole Sorbitol und Mannitol, hier können Konzentrationen im Bereich von 200-850 mM vorliegen [204,207,211]. Hexosen (Monosaccharide), wie Glucose und Fructose, sind im Phloemsaft nicht oder nur in Spuren nachweisbar, weshalb ihre Anwesenheit auch als Indikator für die Verunreinigung von Phloemsaft mit anderen Pflanzensäften herangezogen wird [202,208,211,213,216].

Stickstoff wird im Phloem hauptsächlich in Form von Aminosäuren transportiert. Die Konzentrationen der Summe der transportierten Aminosäuren sind bei den einzelnen Pflanzenarten sehr unterschiedlich und liegen im Bereich von 50-650 mM. Mengemäßig vorherrschende Aminosäuren sind meist Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat, Alanin und Serin [201,202,207,209,210,213-218]. Neben proteinogenen Aminosäuren werden im Phloem auch spezielle Aminosäuren und andere Stickstoffverbindungen, beispielsweise Amide, transportiert [207]. Im Phloemsaft von Weizen nachgewiesenes S-Methylmethionin ist nicht nur für den Stickstofftransport, sondern, neben Glutathion, auch für den Schwefeltransport von Bedeutung [219]. Im Stängellexsudat von Kürbis wurde eine Reihe ungewöhnlicher Aminosäuren, Aminosucker und Amine nachgewiesen [220].

Weitere kleine Metabolite, die im Phloemsaft nachgewiesen wurden, umfassen organische Säuren, wie Äpfelsäure [208], sowie energiereiche Verbindungen, hauptsächlich ATP [217], im Phloemsaft aus Mais, Lipide, insbesondere freie Fettsäuren [206], im Phloemsaft aus Raps und verschiedene Sekundärmetaboliten. Zu den nachgewiesenen Sekundärmetaboliten zählen Glucosinolate in Arabidopsis [221] sowie Phytohormone (Auxine, Gibbereline, Cytokinine und Abscisinsäure) in Rizinus [222]. Dem Transport von Phytohormonen wird eine Signalfunktion zwischen *source* und *sink* zugeschrieben [222].

Neben kleinen Metaboliten wird im Phloem auch eine Reihe von Makromolekülen, unter anderem Proteine und RNA, transportiert. Einige der Makromoleküle dienen der Instandhaltung der Siebröhren, für andere werden Signalfunktionen und eine Beteiligung an regulatorischen Prozessen oder der pflanzlichen Abwehr postuliert [223-228]. Ein Beispiel für ein im Phloem transportiertes Protein, dem Signalfunktion zugeschrieben wird, ist das FT-Protein, das vermutlich als Blühsignal in Arabidopsis fungiert [229]. Die Proteinkonzentration im Phloemsaft liegt im Bereich von 0,2-2 mg/mL [230].

Mais (*Zea mays*) und Raps (*Brassica napus*) sind zwei bedeutende Kulturpflanzen. Für Phloensaft aus Mais sind in der Literatur Saccharosekonzentrationen im Bereich von 800 mM bis 1400 mM unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen angegeben [208,216,217]. Hinsichtlich der Konzentration der Summe der Aminosäuren sind Angaben im Bereich von 25 mM bis 375 mM unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zu finden [208,216,217]. In einer Konzentration von 4,4 mM bis 5,3 mM wurde Malat im Phloensaft aus Mais nachgewiesen [208]. Nach Literaturangaben enthält Phloensaft aus zwei verschiedenen Raps-Genotypen 978 ± 296 mM bzw. 1384 ± 137 mM Saccharose und 204 ± 85 mM bzw. 365 ± 102 mM Aminosäuren [210]. Für Raps, der bei unterschiedlicher Stickstoffversorgung angezogen wurde, wurden Aminosäurekonzentrationen von 381 ± 81 mM bzw. 649 ± 146 mM im Phloensaft bestimmt [218]. Im Stängelsexudat von Raps wurden Lipide, insbesondere freie Fettsäuren, nachgewiesen [206].

1.2.4 Gewinnung von Phloensaft

Die Siebröhren des Phloems stehen unter hohem Druck (15-30 atm [231]) und haben nur einen geringen Anteil (ca. 0,1 % [232]) am Frischgewicht eines Blattes, weshalb die Gewinnung von reinem Phloensaft kompliziert ist [203].

Einige Pflanzen, beispielsweise Kürbisgewächse, produzieren Exsudat bei Einschneiden bzw. Einstechen ihrer Stängel [203]. Bei den meisten Pflanzenspezies stoppt die Produktion von Exsudat jedoch sehr schnell durch Ablagerung von Kallose und P-Protein auf den Siebplatten, welche den Fluss des Phloensafts blockieren [202]. Zur Förderung der Produktion von Exsudat können abgeschnittene Blätter oder Stängel in EDTA-Lösung gestellt werden. EDTA komplexiert Calcium und vermindert die Ablagerung von Kallose auf den Siebplatten [233]. Die Einschnitt-Methoden führen zu einer Unterbrechung des normalen Phloemtransports und zu einer starken Verringerung des Drucks in den Siebröhren, was die Zusammensetzung des Phloensafts beeinflusst. Zusätzlich wird kein reiner Phloensaft, sondern ein Gemisch aus Phloensaft mit Zellsäften der beim Einschnitt verletzten Zellen gewonnen [203,207]. In Stängelsexudat aus Kürbis wurde entsprechend ein ungewöhnlich geringer Zuckergehalt mit einem hohen Anteil an Monosacchariden bestimmt [234]. Auch in unter Einsatz von EDTA

gewonnenem Exsudat aus Salat wurde eine erhöhte Konzentration an Monosacchariden nachgewiesen [213].

Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung von Phloensaft nutzt Blattläuse (Aphiden). Blattläuse ernähren sich von Phloensaft und sind in der Lage ihre Stechrüssel selektiv in die Siebröhren des Phloems zu inserieren. Beim Durchtrennen der Stechrüssel verbleibt der untere Teil des Stechrüssels in der Siebröhre und fungiert als Kapillare, aus der der Phloensaft aufgrund des hohen Drucks, unter dem die Siebröhren stehen, austritt [202,231]. Die Gewinnung von Phloensaft mit Hilfe von Blattläusen wurde erstmals von KENNEDY und MITTLER eingesetzt, die die Stechrüssel großer Blattlausspezies mit Rasierklingen durchtrennten [235]. BARLOW und MCCULLY setzten in Weiterentwicklung dieser Methode erstmals einen Laser zum Durchtrennen der Stechrüssel ein (Laser-Aphiden-Technik) [236]. Nach dem derzeitigen Stand der verfügbaren Methoden lässt sich dem Ziel der Gewinnung von reinem Phloensaft mit der Laser-Aphiden-Technik am nächsten kommen [202], da der normale Phloemtransport durch das Inserieren des Stechrüssels (Durchmesser der Spitze ca. $0,05\ \mu\text{m}$ [231]) nicht unterbrochen wird und bei dieser Methode der geringste Eingriff in die Physiologie der Pflanze erfolgt. Dennoch sezernieren Blattläuse Substanzen in die Pflanze [231], Blattlausbefall kann somit den Stoffwechsel der Pflanze und die Zusammensetzung des Phloensafts beeinflussen [202,203]. Zur Minimierung dieses Effekts sollten die Blattläuse vor dem Durchtrennen der Stechrüssel nur eine begrenzte Zeit mit der Versuchspflanze in Kontakt kommen [237].

2 Problemstellung und Zielsetzung

In den letzten Jahren ist in der Massenspektrometrie ein Trend hin zur Entwicklung ambienter Ionisationsmethoden zu beobachten, welche die direkte massenspektrometrische Analyse von Proben in ihrem natürlichen Zustand, ohne vorhergehende Probenvorbereitung und chromatographische oder elektrophoretische Trennung, ermöglichen. Ambiente Ionisationsmethoden vereinfachen und beschleunigen den Arbeitsablauf der massenspektrometrischen Analyse. Durch das Fehlen der Trennung der Probenbestandteile vor der massenspektrometrischen Analyse kommt es jedoch zu einem Verlust an Selektivität und einer möglichen Verstärkung von Matrixeffekten. Zudem ist bei vielen ambienten Ionenquellen eine relativ schlechte Reproduzierbarkeit zu beobachten, was zum Teil auf Probleme bei der reproduzierbaren Positionierung der Probe in der Ionenquelle zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit soll eine auf chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) basierende Ionenquelle zur direkten massenspektrometrischen Analyse fester und flüssiger Proben entwickelt werden, die eine Vortrennung von Probenbestandteilen und eine reproduzierbare Positionierung der Probe ermöglicht. Als Bestandteil der Ionenquelle wird ein Direkteinlass-System (*Direct inlet probe*, DIP) der Firma SIM GmbH (Oberhausen, D) verwendet, welches üblicherweise zur direkten massenspektrometrischen Analyse fester und flüssiger Proben unter Verwendung eines Massenspektrometers mit EI oder CI Ionisation (GC-MS System) eingesetzt wird.

Die entwickelte Ionenquelle soll an ein hochauflösendes Atmosphärendruck-Q-TOF-Massenspektrometer und an ein Atmosphärendruck-Ion Trap-Massenspektrometer gekoppelt werden und auf diese Weise die Vorteile beider Massenspektrometertypen mit der Möglichkeit zur direkten Analyse kombinieren. Für beide Kopplungen soll zunächst eine Optimierung der Ionenquelle durchgeführt werden. Anschließend sollen Einsatzmöglichkeiten der Ionenquelle in der qualitativen Analyse aufgezeigt und die Möglichkeit eines Einsatzes in der quantitativen Analyse untersucht werden. Bereiche, in denen die entwickelte Ionenquelle eingesetzt werden soll, umfassen lebensmittelanalytische Fragestellungen, die Wirkstoffanalyse von Arzneimitteln,

die Qualitätskontrolle chinesischer Heilpflanzen und auch Fragestellungen der Materialwissenschaften.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit soll die Analyse von Phloemsaft beinhalten. Phloemsaft aus den Kulturpflanzen Mais und Raps soll mit Hilfe der Laser-Aphiden-Technik gewonnen und unter Einsatz massenspektrometrischer Analyseverfahren untersucht werden. Auf diese Weise sollen möglichst viele unbekannte Metabolite im Phloemsaft identifiziert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Ambiente Ionisationsmethoden ermöglichen die direkte massenspektrometrische Analyse von Proben in ihrem natürlichen Zustand, ohne vorhergehende Probenvorbereitung und chromatographische oder elektrophoretische Trennung. Somit erfolgt eine Vereinfachung und Beschleunigung des Arbeitsablaufs der massenspektrometrischen Analyse. Nachteilig ist der Verlust an Selektivität und die mögliche Verstärkung von Matrixeffekten durch das Fehlen der Trennung der Probenbestandteile vor der Ionisation, sowie relativ schlechte Reproduzierbarkeiten, zum Teil durch Probleme bei der reproduzierbaren Positionierung der Probe in der Ionenquelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Ionenquelle zur direkten massenspektrometrischen Analyse fester und flüssiger Proben entwickelt, die eine teilweise Vortrennung von Probenbestandteilen vor der Ionisation und eine reproduzierbare Positionierung der Probe ermöglicht. Die auf chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) basierende Ionenquelle verwendet ein Direkteinlass-System (*Direct inlet probe*, DIP) der Firma SIM GmbH (Oberhausen, D) zum Einbringen fester oder flüssiger Proben in die Ionenquelle. Die DIP nutzt eine temperaturprogrammierbare Schubstange, welche die Proben automatisiert in die Ionenquelle einbringt und so reproduzierbar positioniert. Durch programmiertes Aufheizen der Schubstange in der Ionenquelle kommt es zur Verdampfung flüchtiger und semiflüchtiger Probenbestandteile und zu einer Trennung der Probenbestandteile nach ihren Dampfdrücken. Die entwickelte Ionenquelle wird im Folgenden als DIP-APCI-Ionenquelle bezeichnet.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich im Wesentlichen in drei Teile. Der erste Teil beschreibt die Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein hochauflösendes Q-TOF-Massenspektrometer, die Optimierung der Ionenquelle, sowie die Untersuchung der Reproduzierbarkeit und der Trennung der Probenbestandteile nach ihren Dampfdrücken. Einsatzmöglichkeiten in der qualitativen Analyse werden aufgezeigt und die Möglichkeit des Einsatzes in der quantitativen Analyse untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die DIP-APCI-Ionenquelle an ein Ion Trap-Massenspektrometer gekoppelt und auch hier eine Optimierung durchgeführt. Der Einsatz der

DIP-APCI-Ion Trap-MS zum Nachweis von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs und zur Wirkstoffanalyse von Arzneimitteln wurde untersucht.

Der dritte Teil der Arbeit beschreibt die Gewinnung von Phloemsaft aus den Kulturpflanzen Mais und Raps mit Hilfe der Laser-Aphiden-Technik und dessen Analyse unter Einsatz der DIP-APCI-Q-TOF-MS und der DIP-APCI-Ion Trap-MS.

3.1 Entwicklung und Funktionsweise der DIP-APCI-Ionenquelle

Das Direkteinlass-System (DIP) der Firma SIM GmbH wurde unter Verwendung von zwei verschiedenen, in der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal angefertigten, Quellkörpern an ein hochauflösendes Q-TOF-Massenspektrometer (Agilent Technologies 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF) und ein Ion Trap-Massenspektrometer (Bruker amaZon speed) gekoppelt. Beide Ionenquellen nutzen den Verdampfer und die Korona-Nadel kommerziell erhältlicher APCI-Ionenquellen der jeweiligen Massenspektrometer.

Die DIP wird üblicherweise zur direkten massenspektrometrischen Analyse fester und flüssiger Proben unter Verwendung eines Massenspektrometers mit EI oder CI Ionisation (GC-MS System) eingesetzt. Hierbei wird die Probe mit Hilfe der temperaturprogrammierbaren Schubstange direkt in das Hochvakuum der Ionenquelle verdampft. An der Schubstangenspitze kann eine Probenaufnahme für feste oder für flüssige Proben angebracht werden. Feste Proben werden in Aluminiumtiegel überführt, welche in die Probenaufnahme an der Schubstangenspitze eingebracht werden. In der Probenaufnahme für flüssige Proben ist ein Probentiegel fest eingearbeitet. Abbildung 10 zeigt den schematischen Aufbau der Schubstange sowie die Probenaufnahmen für feste und flüssige Proben und die Probentiegel aus Aluminium.

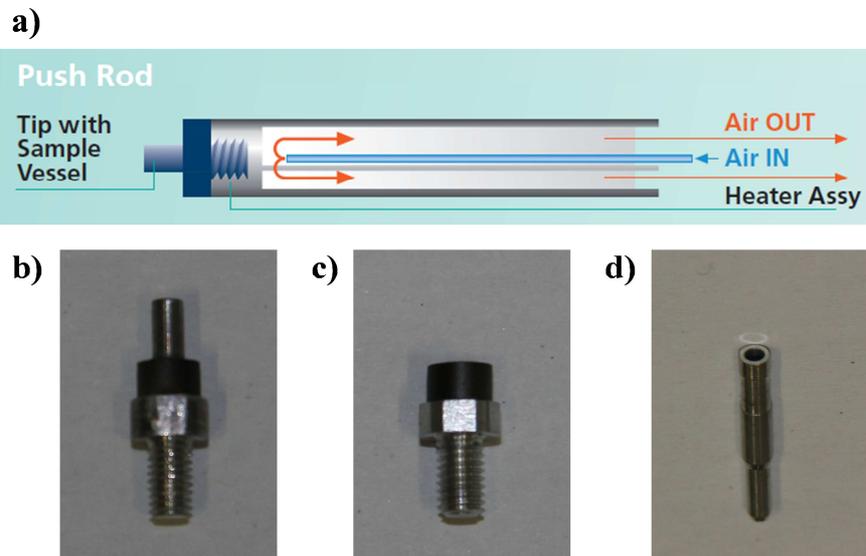


Abbildung 10: Aufbau der Schubstange des Direkteinlass-Systems (DIP) der Firma SIM GmbH (a) und Probenaufnahmen (b-d) für feste und flüssige Proben; (b) Probenaufnahme für flüssige Proben mit eingearbeitetem Probentiegel; (c) Probenaufnahme für feste Proben; (d) Probentiegel für feste Proben.

Zur Verdampfung flüchtiger und semiflüchtiger Probenbestandteile und deren Trennung nach ihren Dampfdrücken kann die Schubstange mit Heizraten von 0,1 bis 2,0 °/s (in Schritten von 0,1 °/s) von 30 °C bis auf 400 °C aufgeheizt werden. Drei Temperaturrampen mit Haltezeiten der Endtemperatur können programmiert werden. Nach Beendigung des Temperaturprogramms wird die Schubstangenspitze mit Pressluft oder Stickstoff, wie in Abbildung 10a dargestellt, gekühlt, um schnellere Analysenzyklen zu ermöglichen.

Die Ionisation verdampfter Probenbestandteile erfolgt in der DIP-APCI-Ionenquelle, wie bei der ASAP-Ionenquelle auch, durch Koronaentladung unter üblichen APCI-Bedingungen. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der Verdampfung und Ionisation in der DIP-APCI-Ionenquelle.

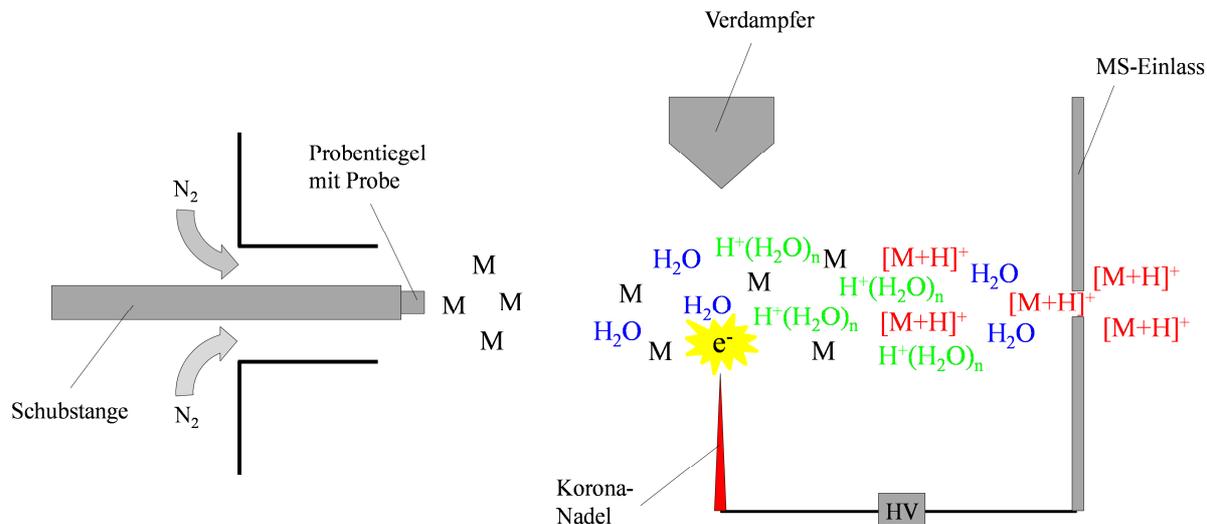


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Verdampfung und Ionisation in der DIP-APCI-Ionenquelle im Positiv-Modus.

Im Unterschied zur ASAP-Ionenquelle erfolgt die Verdampfung flüchtiger und semiflüchtiger Probenbestandteile bei der DIP-APCI-Ionenquelle nicht durch den heißen Gasstrom aus einem ESI- oder APCI-Zerstäuber, sondern durch direktes Aufheizen der im Probentiegel befindlichen Probe durch die temperaturprogrammierbare Schubstange. Die Verwendung eines Temperaturgradienten ermöglicht die Trennung von Probenbestandteilen nach ihren Dampfdrücken. Eine Trennung von Probenbestandteilen wurde auch bei verschiedenen Anwendungen anderer ambienter Ionenquellen angestrebt. Entsprechend wurde der APCI-Verdampfer in einigen Anwendungen der ASAP-Ionenquelle während der Analyse der Probe aufgeheizt und so ein Temperaturgradient des Gasstroms erzeugt [145,161,163]. Bei DART-MS Analysen wurden unterschiedliche Heliumtemperaturen bei der Analyse organischer Verbindungen in Eukalyptus [136] bzw. ein Gradient der Heliumtemperatur von 100-350 °C bei der Analyse von Pestiziden [120] eingesetzt.

Verdampfte Probenbestandteile werden in der DIP-APCI-Ionenquelle durch einen Stickstoffstrom als Hilfsgas, der um die Schubstange geleitet wird, in Richtung der Korona-Nadel und des MS-Einlasses transportiert (siehe Abbildung 11). Die Ionisation erfolgt nach den unter 1.1.2 beschriebenen Ionisationsmechanismen der APCI: Im Positiv-Modus führt die Ionisation von Stickstoff durch Koronaentladung in Gegenwart von Spuren von Wasserdampf

letztendlich zur Bildung geladener Wassercluster. Der Analyt wird anschließend, wie in Abbildung 11 gezeigt, durch Protonentransfer ionisiert.

3.2 Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein hochauflösendes Q-TOF-Massenspektrometer

Die Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein hochauflösendes Q-TOF-Massenspektrometer (Agilent Technologies 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF) kombiniert die Möglichkeit der direkten Analyse fester und flüssiger Proben mit der Möglichkeit zur Bestimmung akkurater m/z -Verhältnisse und der Absicherung der Identifizierung von Probenbestandteilen durch Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Das Q-TOF-MS von Agilent erreicht im Hochauflösungs-Modus eine Auflösung von mindestens 20.000 bei m/z 322 und mindestens 40.000 bei m/z 1522. Die spezifizierte Massengenauigkeit liegt bei 1 ppm. Zur Gewährleistung der Massengenauigkeit führt das MS automatisch eine interne Kalibrierung der m/z -Achse durch. Hierfür wird von einem automatischen Liefersystem kontinuierlich ein geringer Fluss einer Referenzlösung in die Ionenquelle eingebracht. Die Referenzlösung enthält zwei Substanzen, die mit ihren m/z -Verhältnissen von 121.050873 ($[M + H]^+$ für Purin ($C_5H_4N_4$)) und 922.009798 ($[M + H]^+$ für Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$)) einen großen Bereich der m/z -Achse abdecken.

Zur Konstruktion der DIP-APCI-Ionenquelle für das Q-TOF-MS wurde in der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal ein auf dieses MS passender Quellkörper angefertigt. Über einen Flansch wurde die DIP an den Quellkörper gekoppelt. Die DIP-APCI-Ionenquelle nutzt den Verdampfer und die Korona-Nadel einer kommerziell erhältlichen APCI-Ionenquelle des Q-TOF-MS. Abbildung 12 zeigt den Aufbau des für das Q-TOF-MS angefertigten Quellkörpers mit dem Verdampfer und der Korona-Nadel. Im Vergleich zur kommerziell erhältlichen APCI-Ionenquelle wurde die Korona-Nadel um 90° versetzt, da an der ursprünglichen Position der Korona-Nadel die Kopplung der DIP erfolgt. Die Position der Spitze der Korona-Nadel wurde nicht verändert. Der Flansch zur Kopplung der DIP an den Quellkörper besitzt zwei Öffnungen. Die größere Öffnung dient dem Einführen der Schubstange in den Quellkörper und über die

kleinere Öffnung wird das Hilfsgas (Stickstoff) um die Schubstange in die Ionenquelle geleitet (vgl. Abbildung 11).

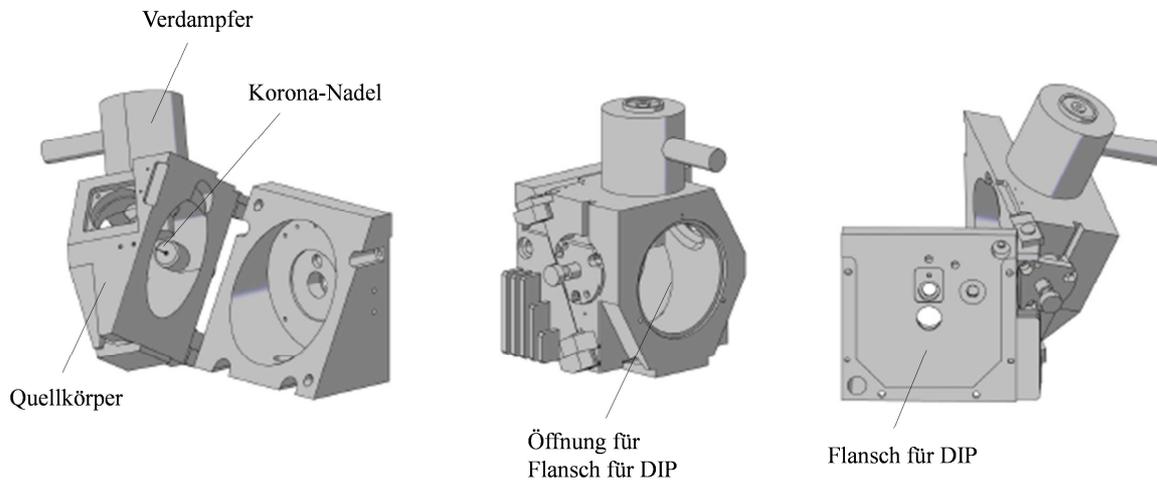


Abbildung 12: Aufbau des Quellkörpers der DIP-APCI-Ionenquelle für das Q-TOF-MS.

Abbildung 13 zeigt ein Foto der Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an das Q-TOF-MS. Die Schubstange befindet sich hier in der Ruheposition mit der Schubstangenspitze außerhalb des Quellkörpers. Die Vakuumschleuse entstammt dem ursprünglichen Einsatz der DIP gekoppelt an Massenspektrometer mit EI oder CI Ionisation, für die Kopplung mit der bei Atmosphärendruck ablaufenden APCI ist sie nicht erforderlich, vermindert aber das Eindringen von Laborluft in die Ionenquelle.

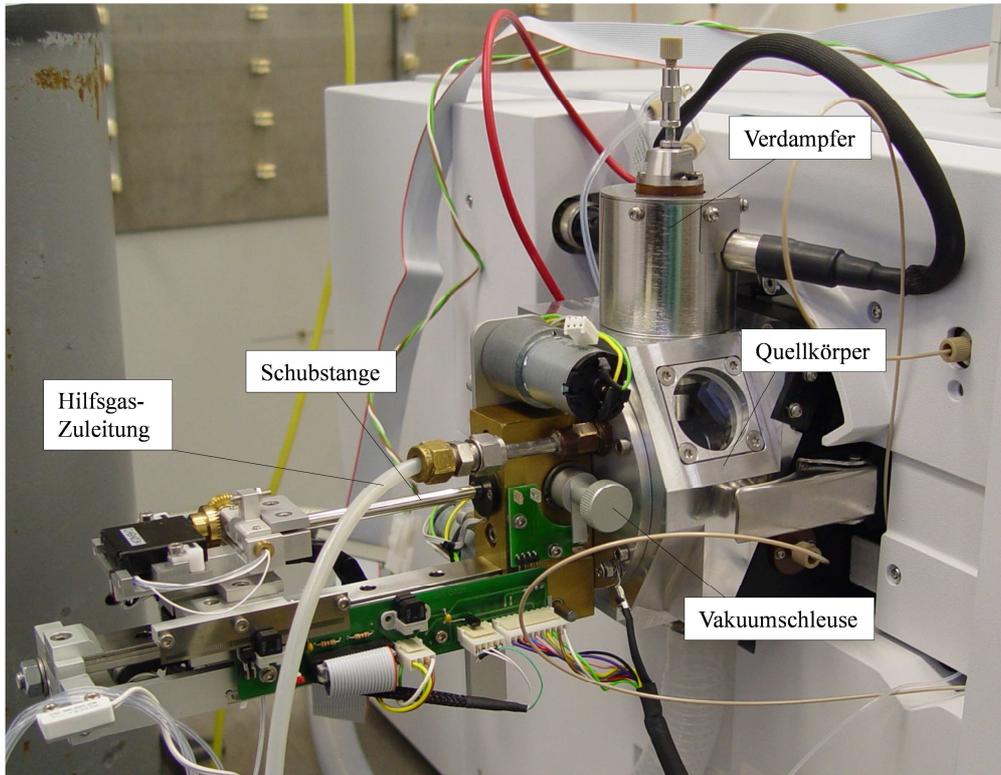


Abbildung 13: DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Agilent Technologies 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF-Massenspektrometer.

Der Ablauf einer DIP-APCI-MS Analyse ist in Abbildung 14 dargestellt. In den Bildern a und b befindet sich die Schubstange in der vertikalen Ladeposition. Bild a zeigt das Einbringen eines Probentiegels in die Probenaufnahme für feste Proben und Bild b die Injektion einer flüssigen Probe in den Probentiegel. Auf Bild c klappt die Schubstange in eine horizontale Position herunter und bewegt sich nach Öffnen der Vakuumschleuse in den Quellkörper der Ionenquelle hinein. In Bild d befindet sich die Schubstangenspitze auf einer definierten Position innerhalb der Ionenquelle. Nach Erreichen der festgelegten Position innerhalb der Ionenquelle startet das Temperaturprogramm der Schubstange automatisch.

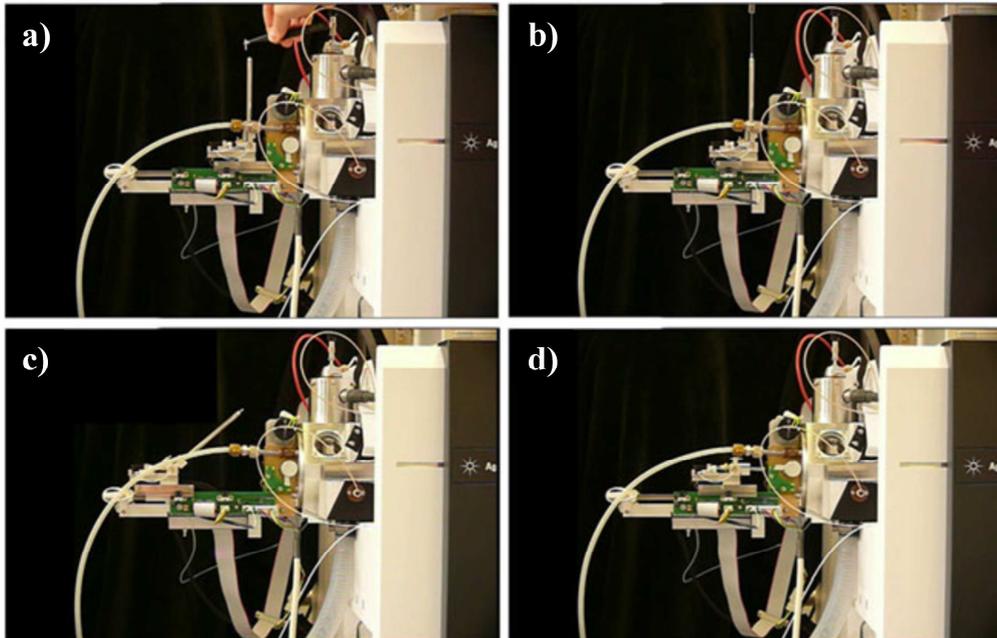


Abbildung 14: Ablauf einer DIP-APCI-MS Analyse; (a) und (b) Schubstange in der Ladeposition; (c) Schubstange klappt in eine horizontale Position herunter und bewegt sich in die Ionenquelle hinein; (d) Schubstange befindet sich in der Ionenquelle.

Alle in Kapitel 3.2 beschriebenen Analysen wurden mit Hilfe des Agilent Technologies 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF-Massenspektrometers in Kopplung mit der DIP-APCI-Ionenquelle oder in LC-MS Kopplung unter Verwendung einer Agilent Technologies Infinity 1290 UHPLC und einer kommerziell erhältlichen ESI-Ionenquelle durchgeführt. Die optimierten Geräteparameter zur DIP-APCI-MS Analyse und die Geräteparameter zur LC-MS Analyse sind in Kapitel 5.5 beschrieben. Im Verlauf der Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle wurden z.T. abweichende Geräteparameter verwendet. Die wichtigsten Abweichungen sind in Kapitel 3.2 angegeben. Die Herstellung von verwendeten Standardlösungen und die eingesetzte Probenvorbereitung ist in Kapitel 5.4 beschrieben.

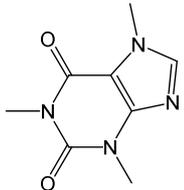
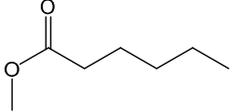
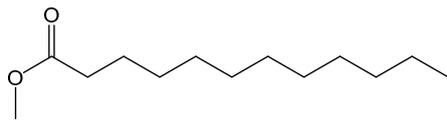
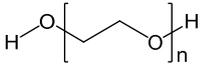
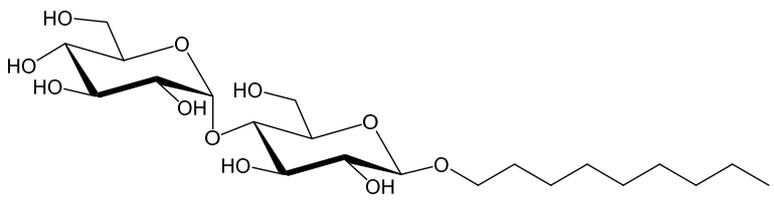
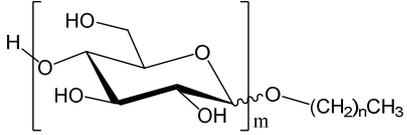
Teile der in den Kapiteln 3.2.1 (Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle) und 3.2.2.1 (Analyse von chinesischen Heilpflanzen) beschriebenen Ergebnisse wurden bereits publiziert (Krieger S, von Trotha A, Leung KS, Schmitz OJ (2013) Development, optimization, and use of an APCI source with temperature-controlled vaporization of solid and liquid samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (4):1373-1381).

3.2.1 Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle

Zur Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle wurden verschiedene Standardsubstanzen und eine komplexe Probe eingesetzt. Tabelle 1 zeigt die eingesetzten Standardsubstanzen mit Strukturformeln und gibt die zur Ionisation verwendete Polarität an. Als komplexe Probe wurde ein Dichlormethanextrakt aus *Radix Angelicae sinensis* (chinesische Angelikawurzel), welche in der chinesischen Heilpflanzenmedizin eingesetzt wird, verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1: Standardsubstanzen zur Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle.

| Standard | Polarität | theoretisches m/z |
|--|-----------|--|
| Coffein ($C_8H_{10}N_4O_2$)  | positiv | $[M + H]^+$: m/z 195.0877 |
| Hexansäuremethylester ($C_7H_{14}O_2$)  | positiv | $[M + H]^+$: m/z 131.1067 |
| Dodecansäuremethylester ($C_{13}H_{26}O_2$)  | positiv | $[M + H]^+$: m/z 215.2006 |
| Polyethylenglycol (PEG 200)  | negativ | |
| N-nonyl- β -D-maltosid ($C_{21}H_{40}O_{11}$)  | negativ | $[M - H]^-$: m/z 467.2498 $[M + O_2]^-$: m/z 500.2474 |
| Alkylpolyglucosid (Glucopon 600)  | negativ | |

Erste Tests der Funktionsfähigkeit der DIP-APCI-Ionenquelle wurden im Positiv-Modus unter Verwendung von Dodecansäuremethylester als Reinsubstanz durchgeführt. Hierzu wurde 1 μ L Dodecansäuremethylester in die Probenaufnahme für flüssige Proben injiziert und die Schubstange lediglich auf 80 °C aufgeheizt, sodass durch die unvollständige Verdampfung des Dodecansäuremethylesters mehrere Analysen ohne erneute Injektion durchgeführt werden

konnten. Abbildung 15 zeigt das resultierende Massenspektrum bei unterschiedlichen *Drying gas*-Flussraten und unterschiedlichen Hilfsgas (N_2)-Flussraten um die Schubstange.

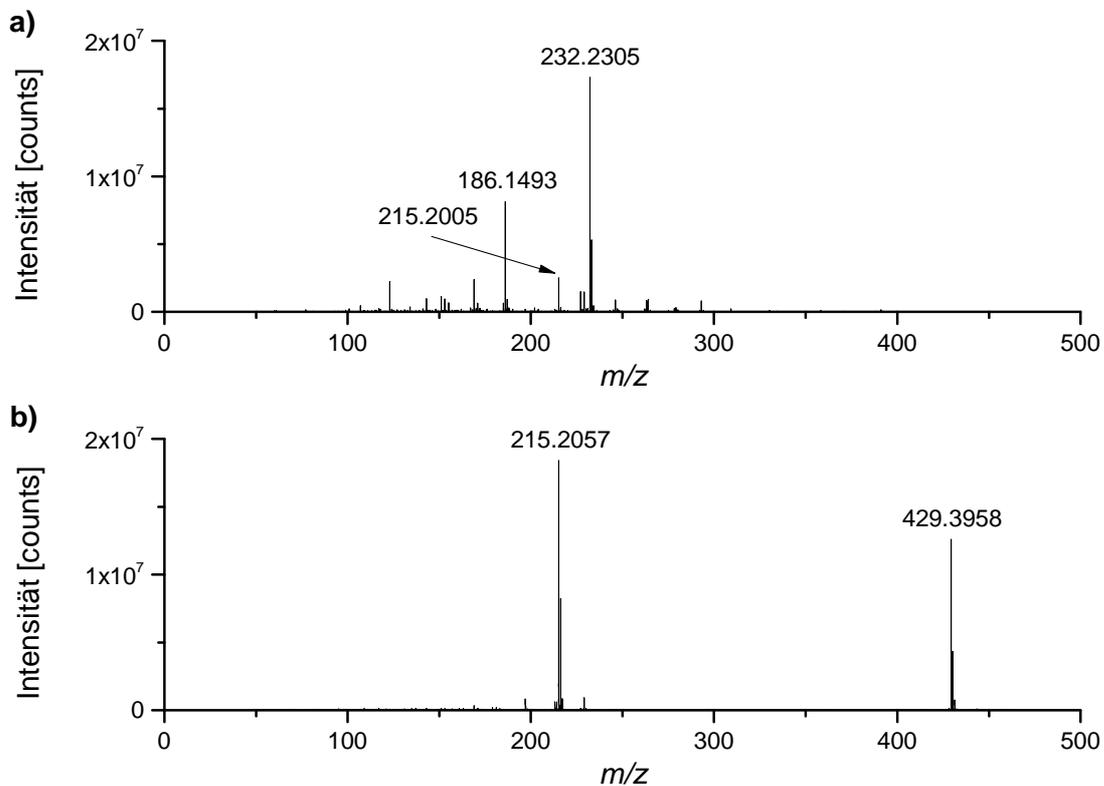


Abbildung 15: Massenspektrum (am Signalmaximum) der Analyse von Dodecansäuremethylester; (a) *Drying gas*: 0,6 L/min, Hilfsgas (N_2): 50 L/h; (b) *Drying gas*: 5,0 L/min, Hilfsgas (N_2): 200 L/h.

Bei geringen *Drying gas*-Flussraten und einem geringen Stickstoff-Fluss um die Schubstange ist das $[M + H]^+$ -Ion des Dodecansäuremethylesters (m/z 215) in vergleichsweise geringer Intensität zu erkennen (vgl. Abbildung 15a). Mit höherer Intensität tritt m/z 232 auf, wobei es sich höchstwahrscheinlich um das Ammoniumaddukt ($[M + NH_4]^+$) des Dodecansäuremethylesters handelt. Es ist wichtig zu beachten, dass m/z 232 und m/z 186 in Abbildung 15a Detektorsättigung erreichen, wodurch die spezifizierete Massengenauigkeit des MS nicht mehr gegeben ist. Nach dem Herausfahren der Schubstange aus der Ionenquelle und dem Rückgang der Signalintensität zeigte m/z 232 ein akkurates m/z -Verhältnis von 232,2272, was dem theoretischen m/z des $[M + NH_4]^+$ -Ions des Dodecansäuremethylesters (m/z 232,2271)

entspricht. Die Bildung des Ammoniumadduktes des Dodecansäuremethylesters lässt sich höchstwahrscheinlich auf das Ansaugen von ammoniakhaltiger Laborluft durch das Vakuum des MS aufgrund des Anbietens von zu wenig (sauberem) Stickstoff in der Ionenquelle zurückführen. Die Bildung von Ammoniumaddukten in Gegenwart von Ammoniak wurde auch bei den APCI-verwandten ambienten Ionisationsmethoden DART [2,109,111] und DAPCI [38] beobachtet. Das Ansaugen von Laborluft könnte auch das Auftreten von m/z 186 und weiteren Signalen im Untergrund des Massenspektrums erklären. Durch Erhöhen des *Drying gas*-Flusses und des Stickstoff-Flusses um die Schubstange wird in der Ionenquelle ausreichend (sauberer) Stickstoff angeboten, um ein Ansaugen von Laborluft durch das Vakuum des MS zu verhindern. Unter diesen Bedingungen wird ein Massenspektrum erhalten, welches das $[M + H]^+$ -Ion (m/z 215) und das $[2M + H]^+$ -Ion (m/z 429) des Dodecansäuremethylesters in hoher Intensität zeigt (vgl. Abbildung 15b). Auch hier ist es wichtig zu beachten, dass m/z 215 und m/z 429 Detektorsättigung erreichen und die spezifizierte Massengenauigkeit des MS nicht gegeben ist. Ein weiterer Vorteil des erhöhten *Drying gas*-Flusses ergibt sich aus dem beschleunigten Signalabfall nach dem Herausfahren der Schubstange aus der Ionenquelle.

Der erste Schritt der Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle bestand in der Untersuchung des Einflusses des Hilfsgas (N_2)-Flusses um die Schubstange und des *Drying gas*-Flusses. Das *Drying gas* umspült die Einlasskapillare des MS und strömt dem Hilfsgas entgegen. Zur Optimierung der Gasflüsse wurde zu jeder Analyse 1 μ L einer Coffein-Lösung der Konzentration 100 mg/L in Dichlormethan in einen in der Probenaufnahme für feste Proben befindlichen Probeniegel injiziert. Die Temperatur des Verdampfers war auf 40 °C und der *Nebulizer*-Druck auf 1 psig eingestellt. Nach Verdampfung des Lösungsmittels außerhalb der Ionenquelle wurde die Schubstange in die Ionenquelle eingebracht und mit einer Heizrate von 2 °/s auf 80 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten. Die Ionisation erfolgte im Positiv-Modus. Der Hilfsgas-Fluss wurde zwischen 50 und 200 L/h und der *Drying gas*-Fluss im Bereich von 0,6-10 L/min variiert.

Es zeigte sich, dass die Intensität des detektierten $[M + H]^+$ -Signals von Coffein (m/z 195) mit steigendem *Drying gas*-Fluss abnahm. Dies entspricht der Erwartung, da verdampfte Probenbestandteile durch einen erhöhten *Drying gas*-Fluss vom MS-Einlass wegbewegt werden. Ein *Drying gas*-Fluss unter 4,0 L/min führte zu starken Intensitätsschwankungen des Coffein-

Signals, insbesondere in Kombination mit einem geringen Hilfsgas-Fluss von nur 50 L/h, und zu einer Erhöhung der Intensität der Hintergrundsignale. Ein *Drying gas*-Fluss über 8,0 L/min erzeugte ebenfalls starke Intensitätsschwankungen und führte zur Bildung des Radikalkations M^+ . Bei dem als Optimum gewählten *Drying gas*-Fluss von 6,0 L/min führte ein Hilfsgas-Fluss von 100 L/h zur höchsten Intensität des $[M + H]^+$ -Signals von Coffein.

Zur Gewährleistung der Massengenauigkeit führt das Q-TOF-MS, wie bereits beschrieben, eine automatische, interne Kalibrierung der m/z -Achse durch. Das Einbringen der hierfür erforderlichen Referenzlösung in die Ionenquelle mit Hilfe des automatischen Liefersystems kann bei der DIP-APCI-Ionenquelle auf zwei Wegen erfolgen. Eine Möglichkeit ist das Einbringen über den Sprayer (*Nebulizer*) und Verdampfer der DIP-APCI-Ionenquelle, analog zur üblichen Einbringung des LC-Eluates in eine APCI-Ionenquelle. Die zweite Möglichkeit besteht im Einbringen der Referenzlösung in Form von kleinen Tropfen, die auf die *Endplate*, neben das *Spray shield* des MS, gegeben werden. Die Verdampfung der Referenzlösung erfolgt in diesem Fall durch die hohe Temperatur der durch das *Drying gas* aufgeheizten *Endplate*. In der LC-APCI Kopplung des Q-TOF-MS wird die Referenzlösung üblicherweise über die *Endplate* in die Ionenquelle eingebracht.

Zur Untersuchung des Einflusses der Referenzlösung und der Art des Einbringens derselben auf die Ionisation in der DIP-APCI-Ionenquelle wurden Referenzlösungen mit Konzentrationen von 10 μM Purin und 2 μM Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin bzw. 1 μM Purin und 0,2 μM Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin, jeweils in Acetonitril/Wasser (95/5; v/v) und Methanol hergestellt. Die unterschiedlichen Referenzlösungen wurden über den Verdampfer (*Vaporizer temperature*: 325 °C; *Nebulizer pressure*: 20 psig) oder über die *Endplate* (*Vaporizer temperature*: 40 °C; *Nebulizer pressure*: 1 psig) in die Ionenquelle eingebracht und ihr Einfluss auf die Detektion des $[M + H]^+$ -Signals von Coffein untersucht. Je 1 μL einer Coffein-Lösung der Konzentration 1000 mg/L in Dichlormethan wurde in die Probeniegel injiziert und die Schubstange nach Verdampfung des Lösungsmittels außerhalb der Ionenquelle mit einer Heizrate von 2 °/s auf 80 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten.

Es zeigte sich, dass bei Einbringen methanolischer Referenzlösungen höhere Intensitäten des $[M + H]^+$ -Signals von Coffein erreicht werden. Zusätzlich konnte eine Intensitätssteigerung

beobachtet werden, wenn der Verdampfer beheizt wurde (*Vaporizer temperature*: 325 °C; *Nebulizer pressure*: 20 psig), was sich auf die Verbesserung der Verdampfung des Coffeins zurückführen lässt. Die Intensität der Referenzen (m/z 121,0509 und m/z 922,0098) wurde nicht wesentlich von der Art des Einbringens in die Ionenquelle beeinflusst und war ausreichend bei Verwendung der Referenzlösung mit einer Konzentration von 1 µM Purin und 0,2 µM Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin in Methanol.

Um die Möglichkeit eines Einsatzes der DIP-APCI-Ionenquelle zur quantitativen Analyse zu überprüfen, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Detektion von Coffein untersucht. Erste Analysen mit Coffein-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,01-10 g/L ließen bei Aufheizen der Schubstange bis auf lediglich 80 °C, insbesondere in Kombination mit einer Verdampfer Temperatur von nur 40 °C, keinen linearen Zusammenhang zwischen der Intensität des $[M + H]^+$ -Signals von Coffein und der Konzentration erkennen. Bei hohen Konzentrationen war eine Verminderung des Anstiegs des Coffein-Signals mit steigender Konzentration zu beobachten. Dass das Coffein-Signal auch bei hohen Konzentrationen nicht zur Detektorsättigung führte, lässt darauf schließen, dass der verminderte Anstieg des Coffein-Signals bei hohen Konzentrationen auf eine unvollständige Verdampfung zurückzuführen ist. Durch Aufheizen der Schubstange bis auf 300 °C konnte eine vollständige Verdampfung des Coffeins erreicht werden. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung der Sensitivität und zum Erreichen eines linearen Zusammenhangs zwischen der Intensität des detektierten $[M + H]^+$ -Signals von Coffein und der Konzentration. Durch Erhöhung der Verdampfer Temperatur auf 325 °C konnte eine weitere Verbesserung der Linearität erreicht werden. Abbildung 16 zeigt die lineare Abhängigkeit der Intensität des $[M + H]^+$ -Signals von Coffein von der Konzentration im Bereich von 0,5-25 mg Coffein/L. Je 1 µL der Coffein-Lösungen in Dichlormethan wurden je dreimal in die Probenziegel injiziert und die Schubstange nach Verdampfung des Lösungsmittels außerhalb der Ionenquelle mit einer Heizrate von 2 °/s auf 300 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten. Der Verdampfer wurde geheizt (*Vaporizer temperature*: 325 °C; *Nebulizer pressure*: 20 psig) und die methanolische Referenzlösung über den Verdampfer in die Ionenquelle eingebracht. Zur Auswertung wurde zum einen das *Extracted ion chromatogram* (EIC) von Coffein generiert und im Bereich des Anstiegs des Coffein-Signals mit dem Temperaturprogramm der Schubstange integriert (Fläche des Coffein-Signals). Zum anderen

wurde im Bereich des Anstiegs des Coffein-Signals mit dem Temperaturprogramm der Schubstange ein gemittelt Massenspektrum generiert und die Signalhöhe des Coffein-Signals (mittlere Intensität des Coffein-Signals) zur Auswertung verwendet. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, führen beide Vorgehensweisen zu vergleichbaren Ergebnissen. Die relativen Standardabweichungen der Dreifachanalysen der einzelnen Coffein-Lösungen lagen bei Auswertung über die Fläche des Coffein-Signals im Bereich von 3,1-29,2 % (0,5 mg/L: 29,2 %RSD; 1,0 mg/L: 8,6 %RSD; 5 mg/L: 13,2 %RSD; 10 mg/L: 3,1 %RSD; 15 mg/L: 4,0 %RSD; 25 mg/L: 3,3 %RSD) und waren bei beiden Vorgehensweisen zur Auswertung vergleichbar.

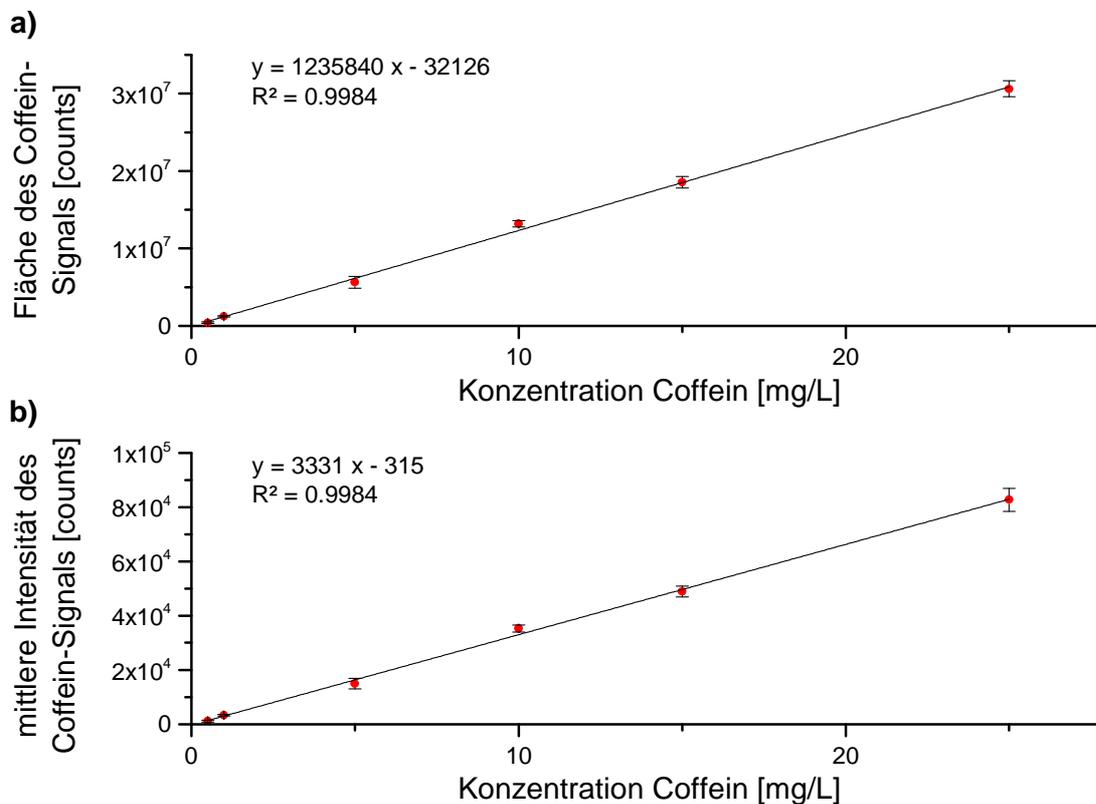


Abbildung 16: Abhängigkeit der Intensität des $[M + H]^+$ -Signals von Coffein von der Konzentration (n=3); (a) Auswertung über die Fläche des Coffein-Signals; (b) Auswertung über die mittlere Intensität des Coffein-Signals.

Zur Demonstration der Reproduzierbarkeit der Analyse einer komplexen Probe wurde ein Dichlormethanextrakt aus *Radix Angelicae sinensis* (chinesische Angelikawurzel) eingesetzt.

1 μL des Extraktes wurde in Fünffachanalyse in die Probentiegel injiziert und die Schubstange mit einer Heizrate von 1 $^{\circ}\text{s}$ auf 400 $^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt und diese Temperatur 5 min gehalten. Die Ionisation erfolgte im Positiv-Modus, der Verdampfer wurde geheizt (*Vaporizer temperature*: 325 $^{\circ}\text{C}$; *Nebulizer pressure*: 20 psig) und die methanolische Referenzlösung über den Verdampfer in die Ionenquelle eingebracht. Abbildung 17 zeigt die *Total ion chromatograms* (TIC) der fünf aufeinanderfolgenden Analysen des Dichlormethanextraktes aus *Radix Angelicae sinensis*. Das reproduzierbare Profil der TICs belegt die Reproduzierbarkeit des Temperaturprogramms der Schubstange. Für jede Analyse wurde ein über die gesamte Analysendauer gemittelt Massenspektrum generiert. Die Signalhöhen aller m/z -Signale mit einer Intensität >10.000 counts in den resultierenden Massenspektren (dies entspricht den 17 m/z -Signalen mit der höchsten Intensität) zeigten relative Standardabweichungen $\leq 8,1\%$. Die relativen Standardabweichungen der Signalhöhen der einzelnen m/z -Signale sind in Tabelle 25 im Anhang aufgelistet.

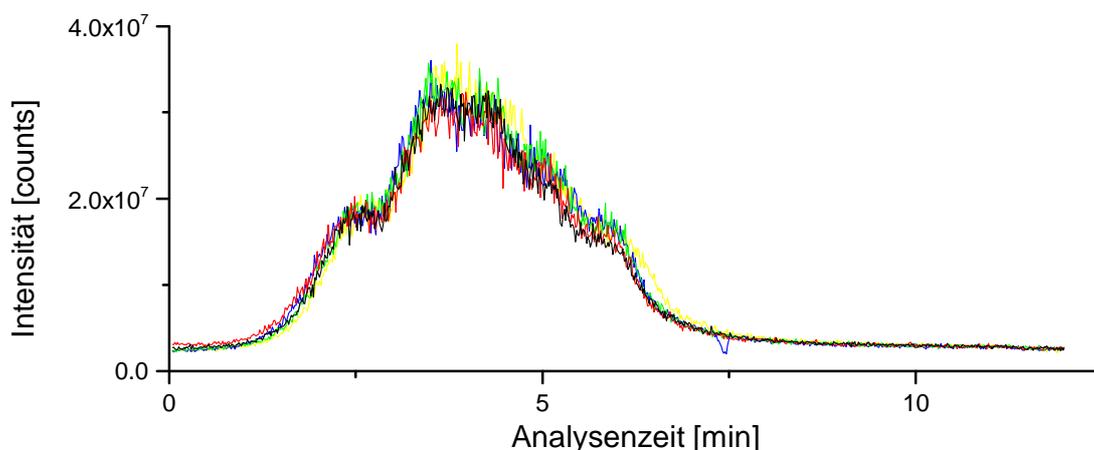


Abbildung 17: TICs von fünf aufeinanderfolgenden Analysen eines Dichlormethanextraktes aus *Radix Angelicae sinensis*.

Zur reproduzierbaren Positionierung der Probe innerhalb der Ionenquelle wird die Schubstange automatisch bis zu einer festgelegten Position der Schubstangenspitze in die Ionenquelle eingebracht. Als weiterer Schritt der Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle wurde daher der Einfluss der Position der Schubstangenspitze innerhalb der Ionenquelle bzw. ihres Abstands von der Korona-Nadel auf die Detektion von Coffein untersucht. Die Position der

Schubstangenspitze wurde zwischen einer Position senkrecht unterhalb der Korona-Nadel und einer Position, in der die Schubstangenspitze 1 cm von dieser Position und vom MS-Einlass wegbewegt wurde, variiert. Für jede Schubstangenposition wurde je 1 μL einer Coffein-Lösung der Konzentration 10 mg/L in Dichlormethan dreimal in die Probentiegel injiziert und die Schubstange mit 2 %/s auf 300 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten. Der Verdampfer wurde geheizt (*Vaporizer temperature*: 325 °C; *Nebulizer pressure*: 20 psig) und die methanolische Referenzlösung über den Verdampfer in die Ionenquelle eingebracht.

Wird die Schubstangenspitze von einer Position senkrecht unterhalb der Korona-Nadel in Richtung der Öffnung zur Einführung der Schubstange in die Ionenquelle (von der Korona-Nadel und vom MS-Einlass weg) bewegt, so wird, wie in Abbildung 18 zu erkennen, eine Position maximaler Empfindlichkeit der Coffein-Detektion durchlaufen. Die Abnahme der Signalintensität mit steigendem Abstand der Schubstangenspitze von der Korona-Nadel wird ab einem Abstand von 7 mm von einer Position senkrecht unterhalb der Korona-Nadel geringer. An diesem Punkt erreicht die Schubstangenspitze den Metallzylinder, durch den die Schubstange in die Ionenquelle eingebracht wird (vgl. Abbildung 11) und alle Substanzen, die innerhalb dieses Zylinders verdampft werden, werden vom Hilfsgas-Fluss in Richtung der Korona-Nadel transportiert.

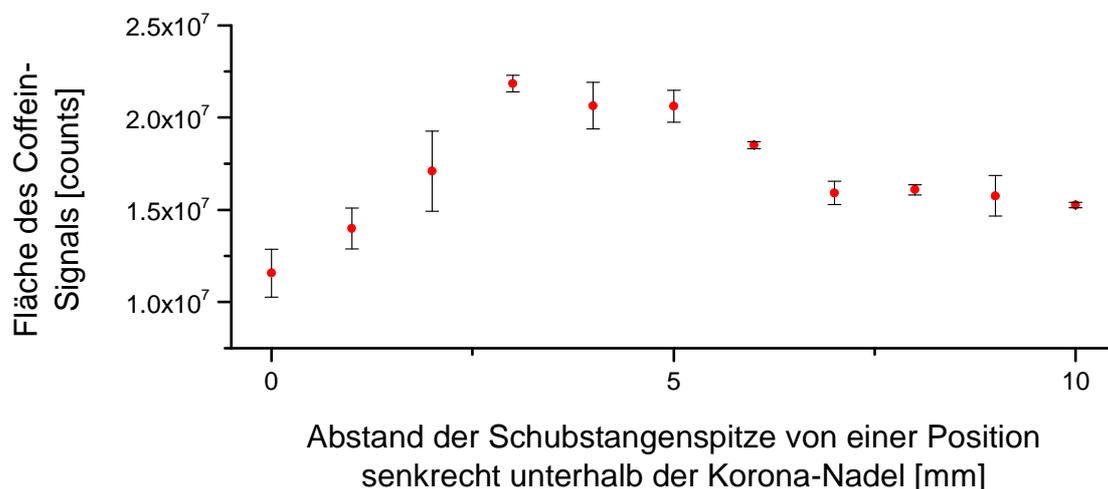


Abbildung 18: Einfluss der Position der Schubstangenspitze in der Ionenquelle auf die Detektion von Coffein; Auswertung über die Fläche unter dem EIC von Coffein (n=3).

Die Möglichkeit der Trennung von Probenbestandteilen nach ihren Dampfdrücken durch programmiertes Aufheizen der Schubstange der DIP-APCI-Ionenquelle wurde mit Hilfe von zwei Fettsäuremethylestern untersucht. Eine Trennung von Probenbestandteilen vor der Ionisation ist vorteilhaft zur Erhöhung der Selektivität der Analyse und ermöglicht die Reduktion von Matrixeffekten, da nicht alle Probenbestandteile gleichzeitig gasförmig in der Ionenquelle vorliegen. Hexansäuremethylester (Siedepunkt: 151 °C) und Dodecansäuremethylester (Siedepunkt: 262 °C) weisen eine Siedepunktsdifferenz von 111 °C auf. Zur Untersuchung der Trennung der Fettsäuremethylester wurde eine Mischung mit je 100 mg/L Hexansäuremethylester und Dodecansäuremethylester in Dichlormethan mittels DIP-APCI-MS analysiert. Die Schubstange wurde mit 1 °/s auf 300 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten. Der Verdampfer wurde geheizt (*Vaporizer temperature: 325 °C; Nebulizer pressure: 20 psig*) und die methanolische Referenzlösung über den Verdampfer in die Ionenquelle eingebracht. Abbildung 19 zeigt die EICs von Hexansäuremethylester und Dodecansäuremethylester. Hexansäuremethylester wird vor Dodecansäuremethylester verdampft und ionisiert und die beiden Fettsäuremethylester aufgrund ihrer unterschiedlichen Dampfdrücke nahezu vollständig voneinander getrennt.

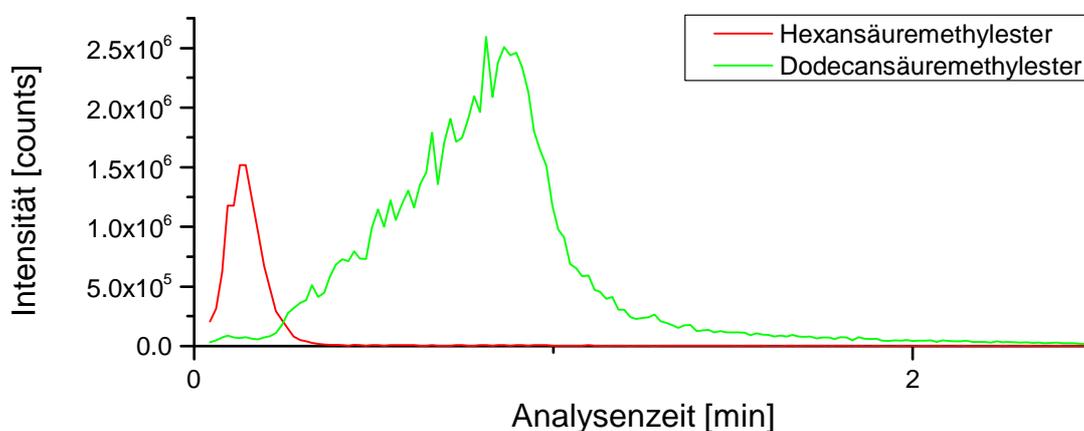


Abbildung 19: EICs von Hexansäuremethylester (m/z 131,1067 \pm 20 ppm) und Dodecansäuremethylester (m/z 215,2006 \pm 20 ppm) analysiert als Mischung.

Die vorgestellten Untersuchungen der Funktion der DIP-APCI-Ionenquelle im Positiv-Modus zeigen, dass unter Verwendung eines ausreichenden Stickstoff-Flusses als Hilfsgas bzw. *Drying*

gas-Flusses ausschließlich das $[M + H]^+$ -Ion der verwendeten Analyten generiert wird. Der Hilfsgas- und der *Drying gas*-Fluss sowie die Position der Schubstangenspitze in der Ionenquelle und das Einbringen der Referenzlösung zur internen Massenkorrektur wurden optimiert. Es wurde gezeigt, dass die Verdampfung und Ionisation in der DIP-APCI-Ionenquelle reproduzierbar erfolgt und dass bei vollständiger Verdampfung des Analyten ein linearer Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration und der Signalintensität besteht. Zusätzlich wurde die Möglichkeit der Trennung von Probenbestandteilen nach ihren Dampfdrücken durch das Temperaturprogramm der Schubstange gezeigt.

Alle bisher vorgestellten Untersuchungen zur Funktionsfähigkeit sowie Optimierungen der DIP-APCI-Ionenquelle wurden bei Ionisation im Positiv-Modus durchgeführt. Erste Tests der Funktionsfähigkeit der DIP-APCI-Ionenquelle im Negativ-Modus unter Verwendung eines Polyethylenglycol-Gemisches und eines Alkylpolyglucosid-Gemisches zeigten eine sehr schlechte Ionisationseffizienz bei Verwendung von Stickstoff als Hilfsgas. Die Verwendung von synthetischer Luft als Hilfsgas verbesserte die Ionisationseffizienz deutlich. Dies lässt sich durch den Mechanismus der APCI-Ionisation im Negativ-Modus (vgl. 1.1.2) erklären: Die Verwendung von synthetischer Luft als Hilfsgas bringt Sauerstoff in die Ionenquelle ein. Sauerstoff unterliegt einem Elektroneneinfang und das gebildete O_2^- -Ion kann den Analyten durch Protonenabstraktion (Bildung des $[M - H]^-$), durch Ladungstransfer (Bildung des M^-) oder durch Adduktbildung (Bildung des $[M + O_2]^-$) ionisieren [108].

Abbildung 20 zeigt das über die gesamte Analysendauer gemittelte Massenspektrum einer Analyse eines Alkylpolyglucosid-Gemisches (Glucopon 600) im Negativ-Modus. Glucopon 600 wurde als Reinsubstanz in den Probeniegel eingebracht und die Schubstange mit einer Heizrate von 1 °/s auf 400 °C aufgeheizt und diese Temperatur 5 min gehalten. Als Hilfsgas wurde synthetische Luft um die Schubstange in die Ionenquelle geleitet. Der Verdampfer wurde geheizt (*Vaporizer temperature*: 325 °C; *Nebulizer pressure*: 20 psig) und die methanolische Referenzlösung über den Verdampfer in die Ionenquelle eingebracht.

Im Massenspektrum sind die $[M - H]^-$ -Ionen der Alkylpolyglucoside mit einer Glucose-Einheit und einem C_{12} -Rest ($C_{18}H_{36}O_6$), mit einer Glucose-Einheit und einem C_{14} -Rest ($C_{20}H_{40}O_6$) und mit zwei Glucose-Einheiten und einem C_{12} -Rest ($C_{24}H_{46}O_{11}$) zu erkennen. Zusätzlich treten m/z -Signale auf, die den $[M - H]^-$ -Ionen gegenüber eine m/z -Differenz von +33 zeigen und von

denen angenommen wird, dass es sich um die jeweiligen $[M + O_2]^-$ -Ionen handelt. Im Massenspektrum sind weitere, nicht identifizierte m/z -Signale zu erkennen, von denen einige möglicherweise auf Fragmentierungen von Alkylpolyglucosiden durch die hohe Temperatur der Schubstange zurückzuführen sind. Beim Heizen der Schubstange auf lediglich 150 °C zur Vermeidung der Fragmentierung der Alkylpolyglucoside waren das $[M - H]^-$ -Ion und das $[M + O_2]^-$ -Ion des Alkylpolyglucosids mit einer Glucose-Einheit und einem C₁₂-Rest (C₁₈H₃₆O₆) in nur sehr geringer Intensität zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass die Alkylpolyglucoside bei dieser Temperatur kaum verdampft werden.

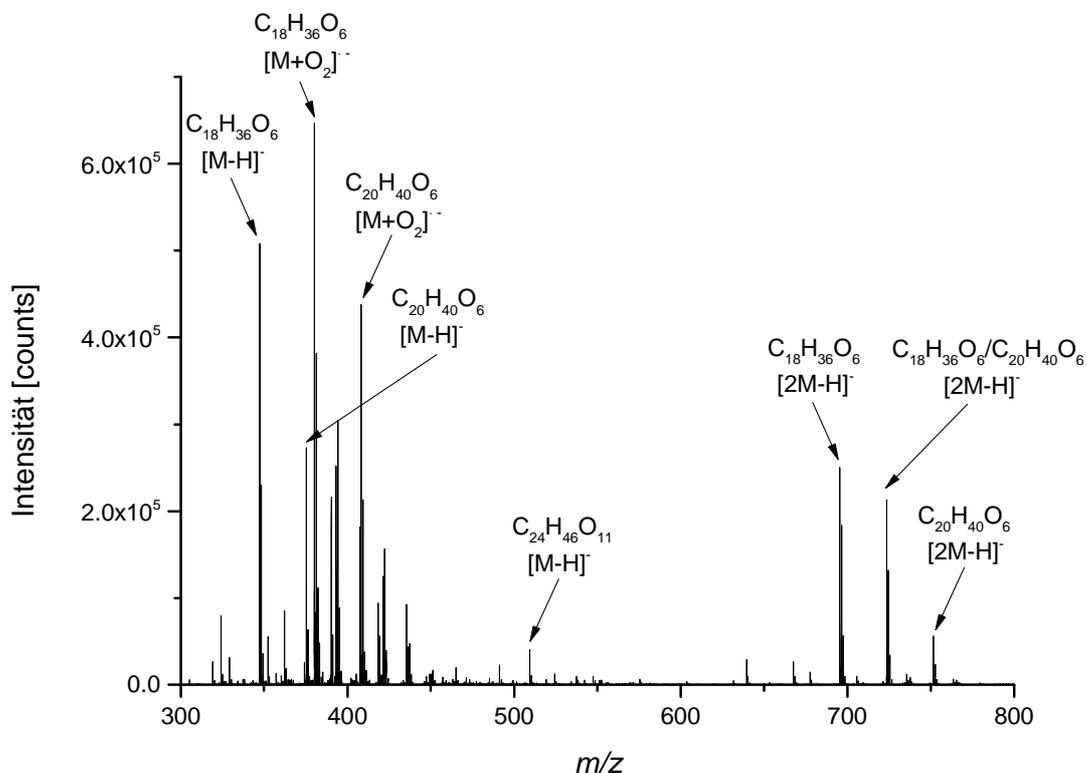


Abbildung 20: Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Analyse von Glucopon 600 (Alkylpolyglucosid-Gemisch) im Negativ-Modus.

Zur Untersuchung der negativen Ionisation eines weniger komplexen Gemisches, welches bei niedrigeren Temperaturen verdampfbar ist, wurde ein Polyethylenglycol (PEG 200) eingesetzt. PEG 200 wurde als Reinsubstanz in den Probeniegel eingebracht und die Schubstange mit einer

Heizrate von 1 °/s auf 150 °C aufgeheizt und diese Temperatur 5 min gehalten. Die weiteren Bedingungen entsprechen den zur Analyse von Glucopon 600 verwendeten Bedingungen.

Im resultierenden Massenspektrum (Abbildung 21) sind zwei Verteilungen zu erkennen. Eine Verteilung ergibt sich aus den $[M - H]^-$ -Ionen der Polyethylenglycole und die zweite Verteilung ist dieser gegenüber um +33 m/z verschoben, sodass auch hier angenommen wird, dass es sich um die entsprechenden $[M + O_2]^-$ -Ionen handelt. Die Verteilung der $[M - H]^-$ -Ionen der Polyethylenglycole liegt mit ihrer maximalen Intensität im Bereich von m/z 200-300 im erwarteten m/z -Bereich für PEG 200.

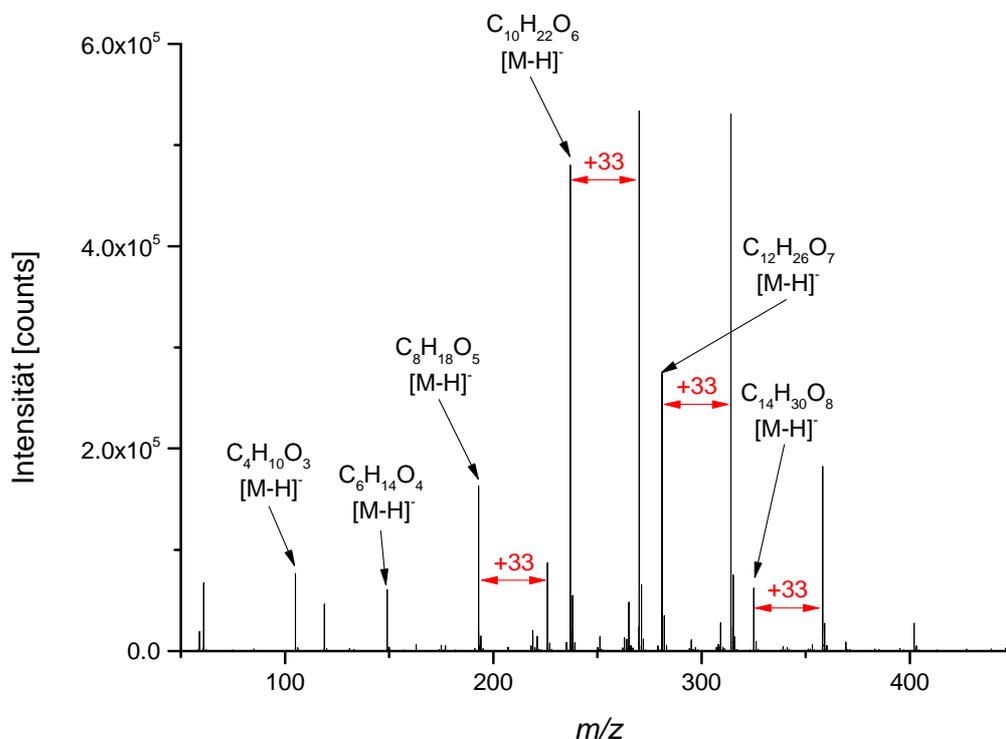


Abbildung 21: Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Analyse von PEG 200 (Polyethylenglycol-Gemisch) im Negativ-Modus.

Um die Bildung von $[M + O_2]^-$ -Ionen im Negativ-Modus zu bestätigen und eine Aussage über Fragmentierungen von Alkylpolyglucosiden bei höherer Temperatur zu treffen, wurde mit N-nonyl- β -D-maltosid eine Einzelsubstanz analysiert. N-nonyl- β -D-maltosid wurde als reiner Feststoff in den Probenziegel eingebracht und die Schubstange mit einer Heizrate von 2 °/s auf

400 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten. Die weiteren Bedingungen entsprechen denen der Analyse von GlucoPON 600.

Abbildung 22 zeigt das Massenspektrum der Analyse von N-nonyl- β -D-maltosid bei einer Temperatur der Schubstangenspitze von ca. 300 °C (Abbildung 22a) und nach Erreichen einer Temperatur von 400 °C (Abbildung 22b). Bei einer Temperatur von 300 °C ist ein Signal mit m/z 467,2514 zu erkennen, welches auf die Bildung des $[M - H]^-$ -Ions des N-nonyl- β -D-maltosids (theoretisches m/z 467,2498) zurückzuführen ist. Zusätzlich tritt ein Signal auf, das dem $[M - H]^-$ -Ion gegenüber eine m/z -Differenz von +33 zeigt und mit m/z 500,2487 dem $[M + O_2]^-$ -Ion des N-nonyl- β -D-maltosids (theoretisches m/z 500,2474) zugeordnet werden kann. Die im Vergleich zum Positiv-Modus verschlechterte Massengenauigkeit des Q-TOF-MS lässt sich auf Probleme bei der Ionisation der Referenzsubstanzen zurückführen. Bei Erreichen einer Temperatur der Schubstangenspitze von 400 °C treten zwei weitere Signale im Massenspektrum auf (vgl. Abbildung 22b), welche auf der Abspaltung einer Glucose-Einheit vom N-nonyl- β -D-maltosid und der Bildung der entsprechenden $[M - H]^-$ - und $[M + O_2]^-$ -Ionen beruhen.

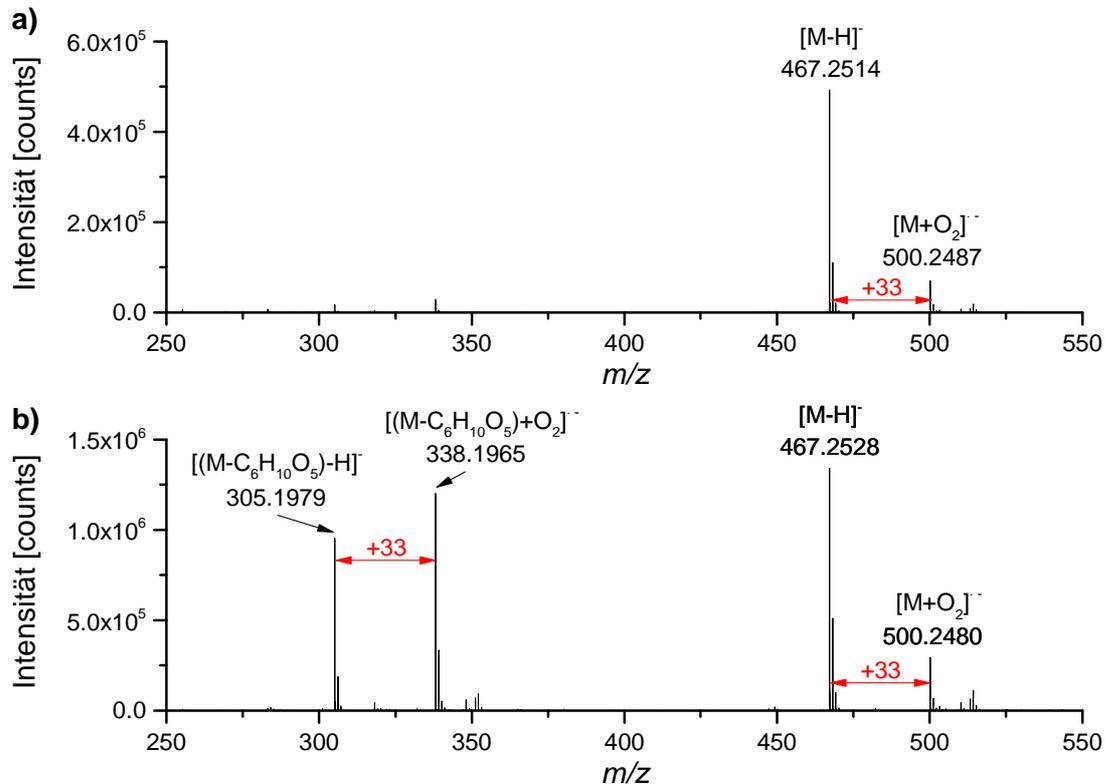


Abbildung 22: Massenspektrum der Analyse von N-nonyl-β-D-maltosid im Negativ-Modus; (a) bei einer Temperatur der Schubstangenspitze von ca. 300 °C; (b) bei einer Temperatur der Schubstangenspitze von 400 °C.

Zur Absicherung der Identität der $[M + O_2]^-$ -Ionen wurden MS/MS-Experimente durchgeführt. Die Kollisions-induzierte Dissoziation (*Collision induced dissociation*, CID) von m/z 500 zeigte m/z 467 als Hauptfragment und m/z 338 fragmentierte zu m/z 305. Dies bestätigt, dass es sich bei m/z 500 bzw. m/z 338 um Addukte von m/z 467 bzw. m/z 305 handelt. Die entsprechenden MS/MS-Spektren sind in Abbildung 114 im Anhang zu finden. Die Bildung von $[M + O_2]^-$ -Ionen steht im Einklang mit Literaturangaben [108] und wurde auch bei der Analyse längerer Alkane sowie von Alkoholen, Fettsäuren und Estern mittels DART-MS im Negativ-Modus beobachtet [238].

Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass bei Verwendung von synthetischer Luft als Hilfsgas, und damit einhergehendem Einbringen von Sauerstoff in die Ionenquelle, ein Einsatz

der DIP-APCI-Ionenquelle im Negativ-Modus möglich ist. Im Negativ-Modus wird eine Bildung von $[M - H]^-$ - und $[M + O_2]^-$ -Ionen beobachtet.

3.2.2 Einsatz der DIP-APCI-Q-TOF-MS in der qualitativen Analyse

Die DIP-APCI-Ionenquelle ermöglicht die direkte massenspektrometrische Analyse fester und flüssiger Proben ohne Probenvorbereitung und ohne chromatographische oder elektrophoretische Vortrennung. Dies führt zu einer Beschleunigung und Vereinfachung des Arbeitsablaufs der massenspektrometrischen Analyse und eröffnet der DIP-APCI-MS potentielle Einsatzgebiete in der qualitativen Analyse (screening) beispielsweise von chinesischen Heilpflanzen, Gewürzen oder auch in der Materialwissenschaft.

3.2.2.1 Analyse von chinesischen Heilpflanzen

Seit mehr als 2000 Jahren hat sich in China eine Heilkunde, die traditionelle chinesische Medizin (TCM), entwickelt, die in den letzten Jahren auch in westlichen Ländern an Bedeutung gewinnt. Die chinesische Heilpflanzenmedizin (*Chinese herbal medicine*, CHM) stellt einen Bestandteil der traditionellen chinesischen Medizin dar. In der CHM erfolgt meist eine Kombination verschiedener Pflanzen zu einer Formulierung [137], die beispielsweise als Aufguss oder in neuerer Zeit in Form von Pillen eingenommen wird. Aufgrund der Herstellung von in der CHM eingesetzten Formulierungen aus verschiedenen Pflanzen, die an sich als Naturprodukte bereits komplexe Proben darstellen, ist die Qualitätskontrolle dieser Formulierungen schwierig. Zusätzlich kann bei der Herstellung der Formulierungen aus Naturprodukten eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Chargen vorliegen [139]. Um die Sicherheit und therapeutische Effektivität der hergestellten Formulierungen zu gewährleisten, ist eine Authentifizierung der verwendeten Pflanzen erforderlich [141]. In einigen Fällen muss eine spezielle Verarbeitung bestimmter Pflanzen erfolgen, um die Effektivität zu gewährleisten und toxische Effekte zu reduzieren [138]. Auch diese Verarbeitungsschritte sollten kontrolliert werden.

Die APCI-verwandten ambienten Ionisationsmethoden DART und DAPCI wurden bereits zur Analyse von in der CHM verwendeten Pflanzen und daraus hergestellten Formulierungen eingesetzt. Die DAPCI-MS wurde zur Authentifizierung von Ginseng-Produkten durch

Fingerprint-Analysen [172] und die DART-MS zur Analyse von Geniposid in einer in der CHM verwendeten Zubereitung [137] genutzt. Die Kombination der DART-MS mit multivariater Datenauswertung ermöglichte die Klassifizierung morphologisch ähnlicher Pflanzen aus der Familie der *Umbelliferae* [141] und die Identifizierung analytischer Marker zur Qualitätskontrolle einer in der CHM eingesetzten Zubereitung [140]. Des Weiteren wurde die DART-MS in Kombination mit multivariater Datenauswertung zum Monitoring der Chargen-Variabilität [139] und zur Kontrolle der Verarbeitung [138] von in der CHM eingesetzten Zubereitungen genutzt.

Das vorliegende Kapitel dieser Arbeit beschreibt die qualitative Analyse von in der CHM eingesetzten Pflanzen und daraus hergestellten Pillen mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS. Die analysierten Proben der chinesischen Angelikawurzel (*Radix Angelicae sinensis*), der koreanischen Angelikawurzel (*Radix Angelicae gigas*) und zwei analysierte Pillen (Xiao Yao Pille und Jiawei Xiao Yao Pille) stammten aus China. Weitere analysierte Xiao Yao Pillen wurden von einer Apotheke in Wuppertal bezogen. Die aus China stammenden Proben wurden sowohl als Feststoffe, als auch in Form ihrer Dichlormethanextrakte analysiert, die Pillen aus der Apotheke in Wuppertal lediglich als Feststoffe. Bei allen Analysen wurde die Schubstange der DIP-APCI-Ionenquelle mit einer Heizrate von 1 °/s auf 400 °C aufgeheizt und diese Temperatur 5 min gehalten. Die Ionisation erfolgte im Positiv-Modus.

Die chinesische Angelikawurzel (*Radix Angelicae sinensis*) gehört zur Gattung *Angelica* innerhalb der Familie der *Apiaceae* oder *Umbelliferae*. Sie ist in der chinesischen Heilpflanzenmedizin weit verbreitet und wird beispielsweise bei unregelmäßiger Menstruation, aber auch zur Behandlung von Asthma oder Rheuma eingesetzt [239]. Aufgrund von Knappheit wird die chinesische Angelikawurzel gelegentlich durch andere Spezies der Gattung *Angelica*, beispielsweise durch die koreanische Angelikawurzel (*Radix Angelicae gigas*) ersetzt. Die verschiedenen Spezies der Gattung *Angelica* weisen jedoch Unterschiede in ihrer chemischen Zusammensetzung auf [239].

Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit von zwei Pflanzen derselben Spezies wurden zwei verschiedene Proben der chinesischen Angelikawurzel in Form der gemahlten Wurzel (als Feststoff) und in Form der daraus hergestellten Dichlormethanextrakte analysiert.

Abbildung 23 zeigt die direkte Analyse der zwei gemahlten *Radix Angelicae sinensis*-Proben.

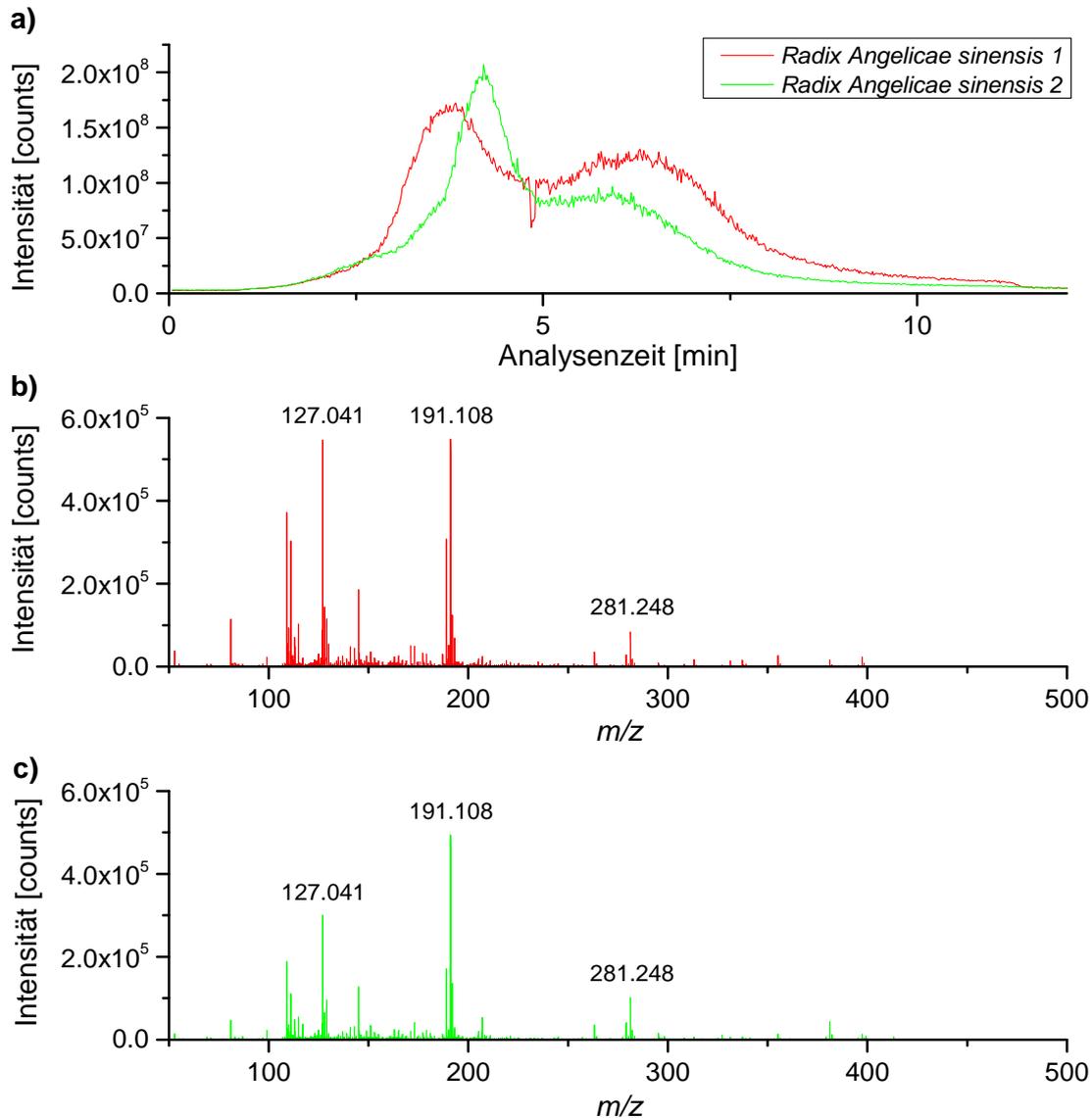


Abbildung 23: Direkte Analyse von zwei gemahlene *Radix Angelicae sinensis*; (a) TIC; (b) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae sinensis* 1; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae sinensis* 2.

Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Profile der TICs (Verdampfungsprofile) der analysierten *Radix Angelicae sinensis*-Proben nur geringfügig. Die in

den Massenspektren zu erkennenden Unterschiede beschränken sich auf Unterschiede in der Intensitätsverteilung der detektierten m/z -Signale, es werden bei beiden Proben dieselben m/z -Signale detektiert. Nach der direkten Analyse der gemahlten Proben können die beiden *Radix Angelicae sinensis* somit als vergleichbar angesehen werden. Unterschiede im Verdampfungsprofil und in der Intensitätsverteilung lassen sich zum Teil höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche in die Probentiegel eingebrachte Probenmengen und die geringen eingebrachten Probenmengen in Kombination mit einer natürlicherweise vorliegenden Probeninhomogenität erklären.

Abbildung 24 zeigt die Analyse der Dichlormethanextrakte der beiden *Radix Angelicae sinensis*-Proben. Bei Analyse der Dichlormethanextrakte ist ein deutlicherer Unterschied zwischen den Verdampfungsprofilen der beiden Proben zu erkennen. *Radix Angelicae sinensis* 1 weist insgesamt einen geringeren Gehalt an mit Dichlormethan extrahierbaren und mittels DIP-APCI-MS analysierbaren Substanzen auf, was an der geringeren Intensität des TIC zu erkennen ist (es wurden gleiche Probenmengen zur Extraktion eingesetzt). Im Massenspektrum von *Radix Angelicae sinensis* 1 ist ein Signal mit m/z 337,274 zu erkennen, welches im Massenspektrum von *Radix Angelicae sinensis* 2 nicht auftritt. Hauptsächlich auf m/z 337,274 ist auch der deutliche Anstieg des TIC bei einer Analysenzeit von 5-7,5 min im Fall von *Radix Angelicae sinensis* 1 zurückzuführen. Abgesehen vom Signal mit m/z 337,274 sind die Massenspektren der beiden *Radix Angelicae sinensis*-Proben bis auf Unterschiede in der Intensitätsverteilung vergleichbar. In den Massenspektren der direkten Analyse der gemahlten *Radix Angelicae sinensis*-Proben sind Signale mit m/z 127,041 und weitere Signale im m/z -Bereich bis 150 zu erkennen, die bei Analyse der Dichlormethanextrakte nicht auftreten. Bei m/z 127,041 handelt es sich höchstwahrscheinlich um Isomaltol ($C_6H_6O_3$, theoretisches m/z 127,0390), welches durch die Karamellisierung von Zuckern bei hohen Temperaturen der Schubstange entsteht. Zucker werden bei Herstellung der Dichlormethanextrakte nicht extrahiert, weshalb m/z 127 und weitere Signale im m/z -Bereich bis 150 bei Analyse der Dichlormethanextrakte nicht auftreten.

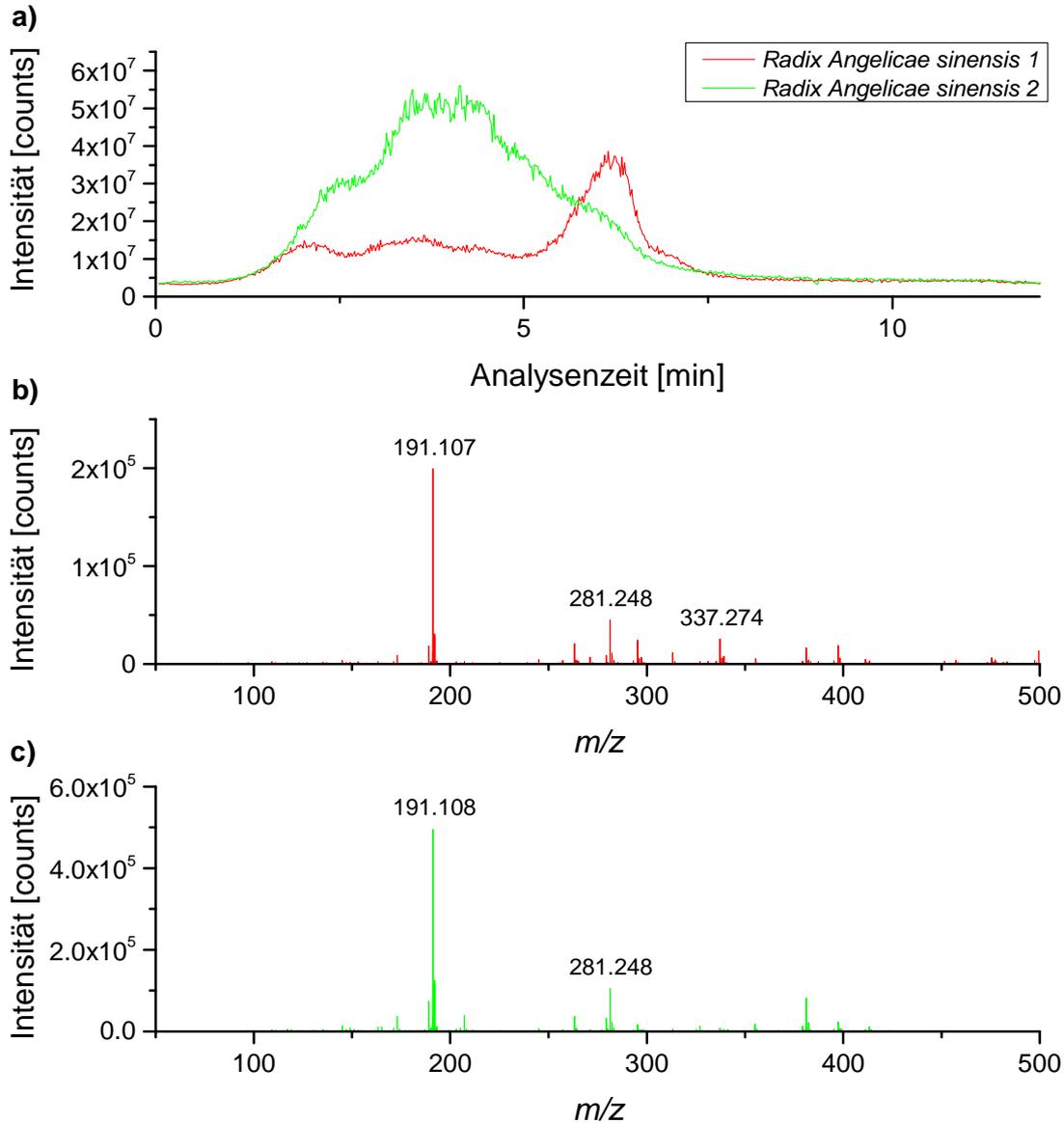


Abbildung 24: Analyse der Dichlormethanextrakte aus zwei *Radix Angelicae sinensis*; (a) TIC; (b) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae sinensis* 1; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae sinensis* 2.

Neben der Analyse der chinesischen Angelikawurzel wurde auch eine Probe der koreanischen Angelikawurzel direkt in Form der gemahlene Wurzel und in Form eines daraus hergestellten

Dichlormethanextraktes analysiert, um zu untersuchen, ob Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der beiden Spezies der *Angelica* mittels DIP-APCI-MS detektiert werden können. In der Arbeitsgruppe von Prof. Schmitz durchgeführte GCxGC-MS Analysen der chinesischen und der koreanischen Angelikawurzel zeigten, dass die koreanische Angelikawurzel bestimmte Cumarine enthält, wogegen in der chinesischen Angelikawurzel keine Cumarine nachgewiesen wurden. Die Strukturformeln der in der koreanischen Angelikawurzel nachgewiesenen Cumarine sind in Abbildung 25 dargestellt. Es sollte überprüft werden, ob diese Cumarine bei direkter Analyse der gemahlten Angelikawurzeln und bei Analyse der daraus hergestellten Dichlormethanextrakte mittels DIP-APCI-MS durch Detektion der entsprechenden akkuraten m/z -Signale nachweisbar sind.

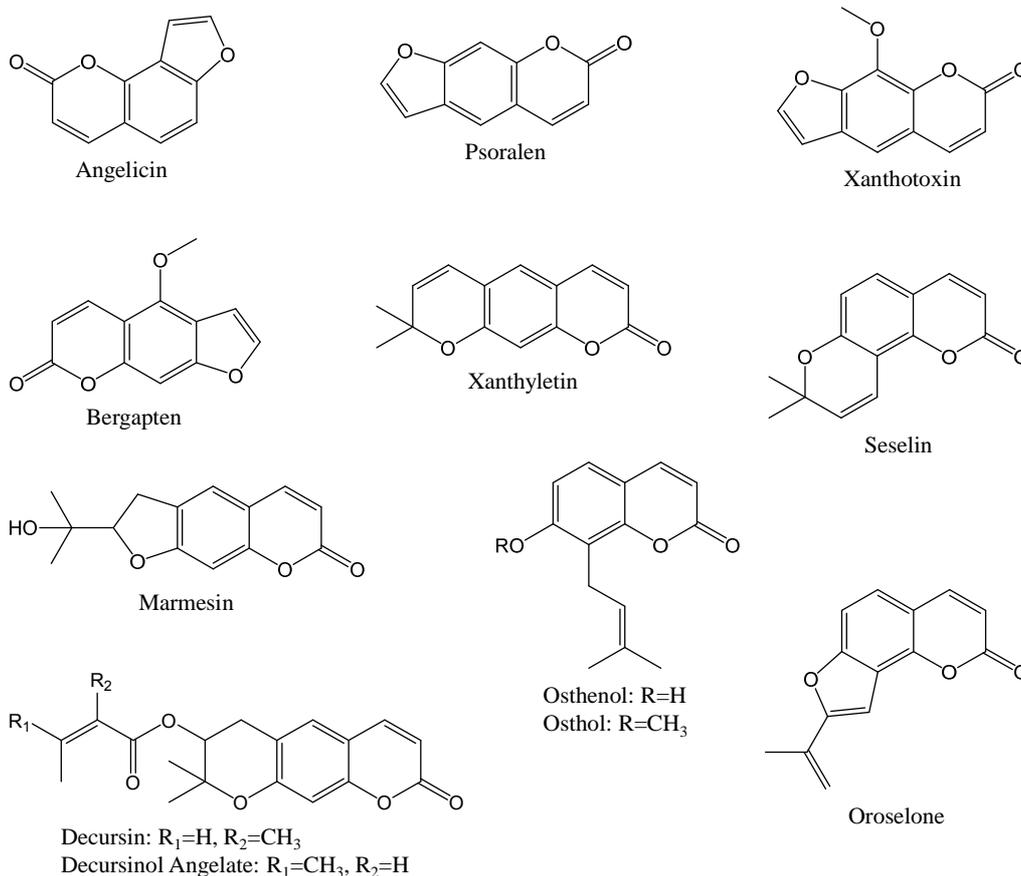


Abbildung 25: In *Radix Angelicae gigas* mittels GCxGC-MS nachgewiesene Cumarine.

Abbildung 26 zeigt die direkte Analyse der gemahlene *Radix Angelicae sinensis* und *Radix Angelicae gigas*.

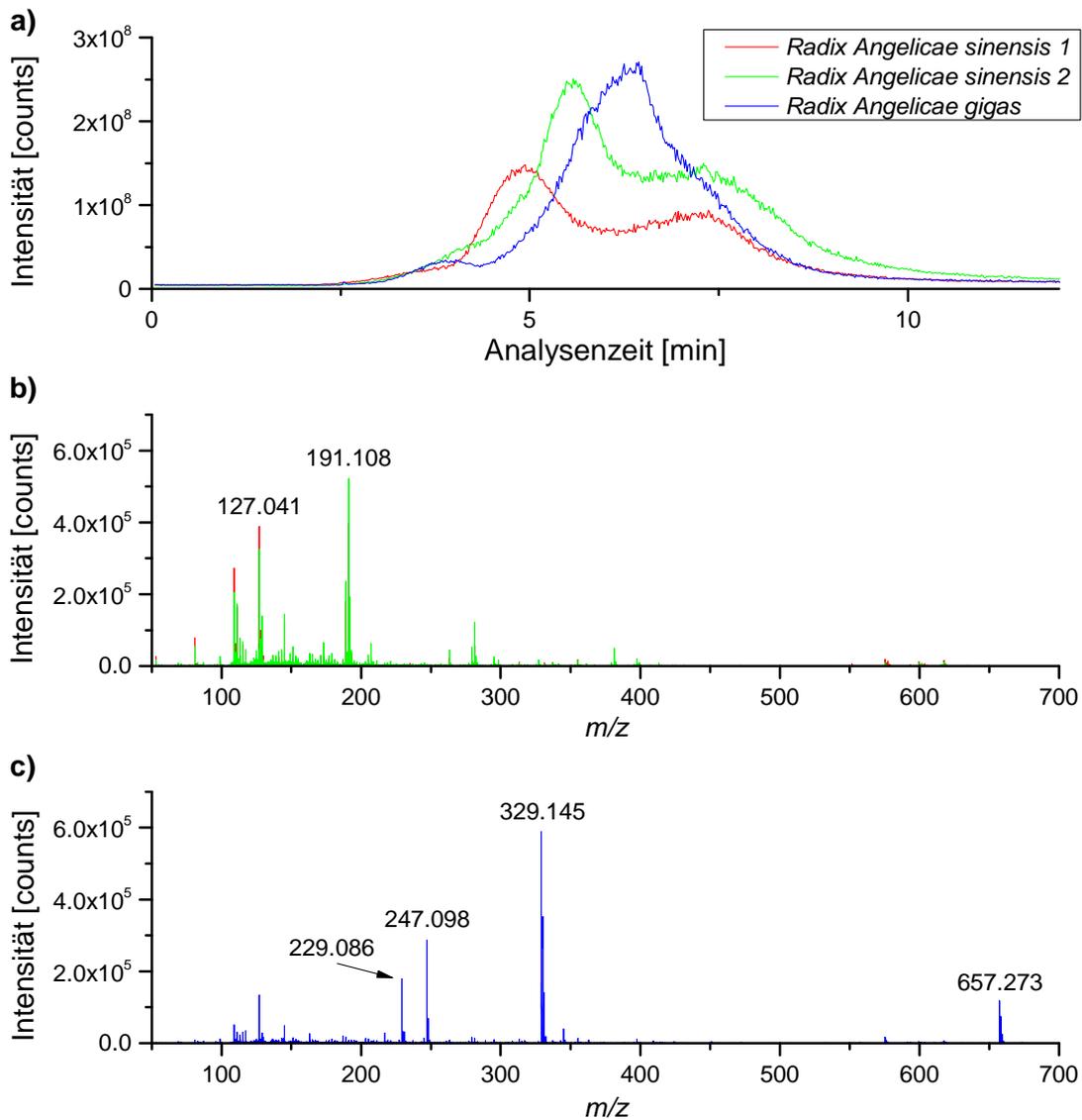


Abbildung 26: Direkte Analyse der gemahlene *Radix Angelicae sinensis* und *Radix Angelicae gigas*; (a) TIC; (b) Massenspektren (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae sinensis* 1 und 2; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae gigas*.

Die direkte Analyse der gemahlten *Radix Angelicae sinensis* und *Radix Angelicae gigas* zeigt deutliche Unterschiede zwischen den in den verschiedenen Spezies der *Angelica* detektierten m/z -Signalen und ermöglicht somit eine Unterscheidung der beiden Spezies. m/z 191,108, als Signal mit der höchsten Intensität in *Radix Angelicae sinensis*, ist in *Radix Angelicae gigas* nur in sehr geringer Intensität nachweisbar. m/z 229,086, m/z 247,098, m/z 329,145 und m/z 657,273 sind hingegen nur bei *Radix Angelicae gigas* in höherer Intensität zu erkennen. Die genannten, nur in *Radix Angelicae gigas* in höherer Intensität detektierten m/z -Signale, lassen sich, wie im Folgenden näher beschrieben, auf die mittels GCxGC-MS nachgewiesenen Cumarine zurückführen. m/z 657,273 entspricht hierbei dem $[2M + H]^+$ -Ion von m/z 329,145 als $[M + H]^+$ -Ion. Die direkte Analyse der gemahlten *Radix Angelicae gigas* mittels DIP-APCI-MS ermöglicht den Nachweis aller mittels GCxGC-MS detektierten Cumarine anhand der Detektion der entsprechenden akkuraten m/z -Signale. Auch in *Radix Angelicae sinensis* konnten Cumarine nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung der isomeren Cumarine (z.B. Angelicin und Psoralen) ist anhand der akkuraten m/z -Signale nicht möglich. Zusätzlich zur Auswertung der Massenspektren wurde für alle theoretischen m/z -Verhältnisse der Cumarine ein *Extracted ion chromatogram* (EIC) generiert, um zu überprüfen, ob ein dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechender Anstieg der Signalintensität bei Analyse von *Radix Angelicae gigas* bzw. *Radix Angelicae sinensis* zu erkennen ist. Abbildung 27 zeigt beispielhaft die EICs für Angelicin und/oder Psoralen in *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis*.

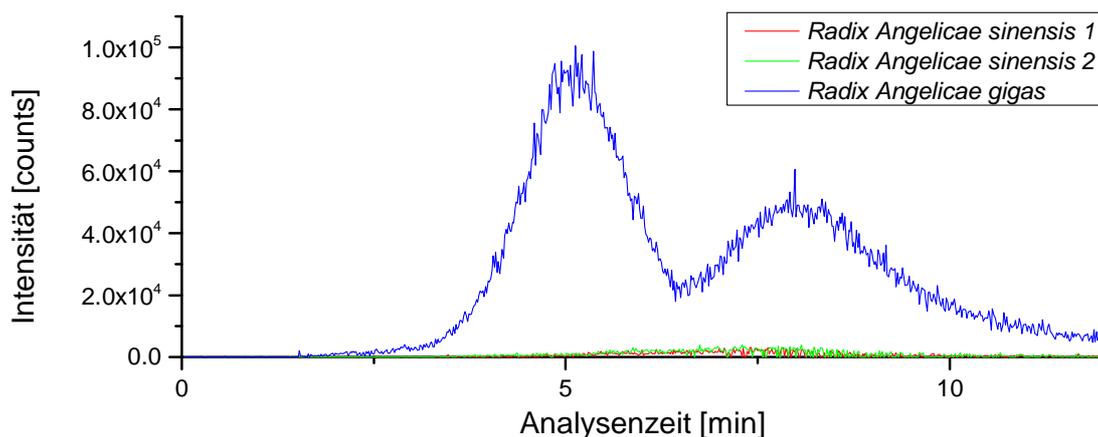


Abbildung 27: EIC von Angelicin und/oder Psoralen (m/z 187,0390 \pm 20 ppm) bei direkter Analyse der gemahlten *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis*.

Im EIC von Angelicin und/oder Psoralen der direkten Analyse der *Radix Angelicae gigas* ist ein deutlicher Anstieg der Signalintensität mit dem Temperaturprogramm der Schubstange zu erkennen, was bei *Radix Angelicae sinensis* nicht der Fall ist. Entsprechende Anstiege der Signalintensität mit dem Temperaturprogramm der Schubstange waren bei allen detektierten Cumarinen zu erkennen.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die in *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis* detektierten Cumarine. Gezeigt sind die Summenformeln des oder bei Isomeren der entsprechenden Cumarine mit Angabe des theoretischen m/z -Verhältnisses des $[M + H]^+$ -Ions und die Abweichungen der in *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis* detektierten m/z -Signale von den theoretischen m/z -Verhältnissen der Cumarine. Die m/z -Verhältnisse der detektierten Signale wurden aus dem über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum entnommen. In Fällen, in denen das detektierte m/z -Signal Detektorsättigung erreichte, wurde das m/z -Verhältnis vor Erreichen der Detektorsättigung angegeben. Um einen Überblick über die Intensitätsverteilung der einzelnen Cumarine zu haben, wurde für *Radix Angelicae gigas* zusätzlich der prozentuale Anteil der einzelnen Cumarine an der Summe der Cumarine, als prozentualer Anteil der Höhe des m/z -Signals des jeweiligen Cumarins an der Summe der Höhe aller m/z -Signale der Cumarine, angegeben. Es zeigt sich, dass mengenmäßig Decursin und/oder Decursinol Angelate vorherrscht, gefolgt von Marmesin und Seselin und/oder Xanthyletin. Decursin oder Decursinol Angelate wurde bereits mittels DART-MS als analytischer Marker für *Angelica gigas* identifiziert [141]. Für *Radix Angelicae sinensis* ist in Tabelle 2 der prozentuale Anteil der Höhe der m/z -Signale der detektierten Cumarine im Vergleich zur Höhe des entsprechenden m/z -Signals bei *Radix Angelicae gigas* angegeben. Lediglich Cumarine, welche in *Radix Angelicae gigas* in geringerer Menge enthalten sind, erreichen hier Werte $> 5\%$. Diese Werte können nur als Anhaltspunkte dienen, da unter anderem aufgrund unterschiedlicher in die Probenziegel eingebrachter Probenmengen und unterschiedlicher Ionisierungsausbeuten keine quantitativen Aussagen getroffen werden können. Insgesamt zeigen diese Werte jedoch, dass die in *Radix Angelicae sinensis* im Vergleich zu *Radix Angelicae gigas* detektierten Cumarinegehalte gering sind, was ihren Nachweis bei der GCxGC-MS Analyse von Extrakten verhinderte.

Tabelle 2: Bei direkter DIP-APCI-MS Analyse der gemahlene *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis* detektierte Cumarine.

| Cumarin | Summenformel und theoretisches m/z des $[M + H]^+$ | <i>Radix Angelicae gigas</i> | | <i>Radix Angelicae sinensis</i> 1 | | <i>Radix Angelicae sinensis</i> 2 | |
|-------------------------------------|--|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| | | ppm ^a | % der Cumarine ^b | ppm ^a | % von R. A. <i>gigas</i> ^c | ppm ^a | % von R. A. <i>gigas</i> ^c |
| Angelicin/ Psoralen | $C_{11}H_6O_3$ m/z 187.0390 | 1.1 | 1.9 | n. d. | - | n. d. | - |
| Xanthotoxin/ Bergapten | $C_{12}H_8O_4$ m/z 217.0495 | 0.5 | 2.5 | 0.9 | 10.0 | 0.5 | 8.4 |
| Oroselone | $C_{14}H_{10}O_3$ m/z 227.0703 | 0.9 | 0.8 | 1.8 | 11.9 | 0.9 | 24.1 |
| Seselin/ Xanthyletin | $C_{14}H_{12}O_3$ m/z 229.0859 | 1.3 | 15.9 | 0.0 | 0.9 | 0.9 | 2.8 |
| Osthenol | $C_{14}H_{14}O_3$ m/z 231.1016 | 1.3 | 2.7 | 0.4 | 5.1 | 0.4 | 18.6 |
| Osthol | $C_{15}H_{16}O_3$ m/z 245.1172 | 0.0 | 0.3 | n. d. | - | n. d. | - |
| Marmesin | $C_{14}H_{14}O_4$ m/z 247.0965 | 0.4* | 25.0 | 0.8 | 0.4 | 0.4 | 1.5 |
| Decursin/ Decursinol Angelate | $C_{19}H_{20}O_5$ m/z 329.1384 | 0.3* | 50.9 | n. d. | - | 0.3 | 0.2 |

n. d.: nicht detektiert;

^a ppm: Abweichung des detektierten m/z vom theoretischen m/z des Cumarins;^b Anteil der Höhe des m/z -Signals des Cumarins an der Summe der Höhe aller m/z -Signale der Cumarine;^c Höhe des m/z -Signals des Cumarins im Vergleich zur Höhe des entsprechenden m/z -Signals bei *Radix Angelicae gigas*;* Signal erreicht Detektorsättigung; Abweichung des detektierten m/z vom theoretischen m/z des Cumarins vor Erreichen der Sättigung.

Abbildung 28 zeigt die Analyse der Dichlormethanextrakte aus *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis*. Auch hier sind deutliche Unterschiede zwischen den in den verschiedenen Spezies der *Angelica* detektierten m/z -Signalen zu erkennen und die beiden Spezies können voneinander unterschieden werden. m/z 191,11 und m/z 381,207 sind in *Radix Angelicae sinensis*

in höherer Intensität nachweisbar, wogegen m/z 329,139 und m/z 397,383 nur in *Radix Angelicae gigas* zu erkennen sind.

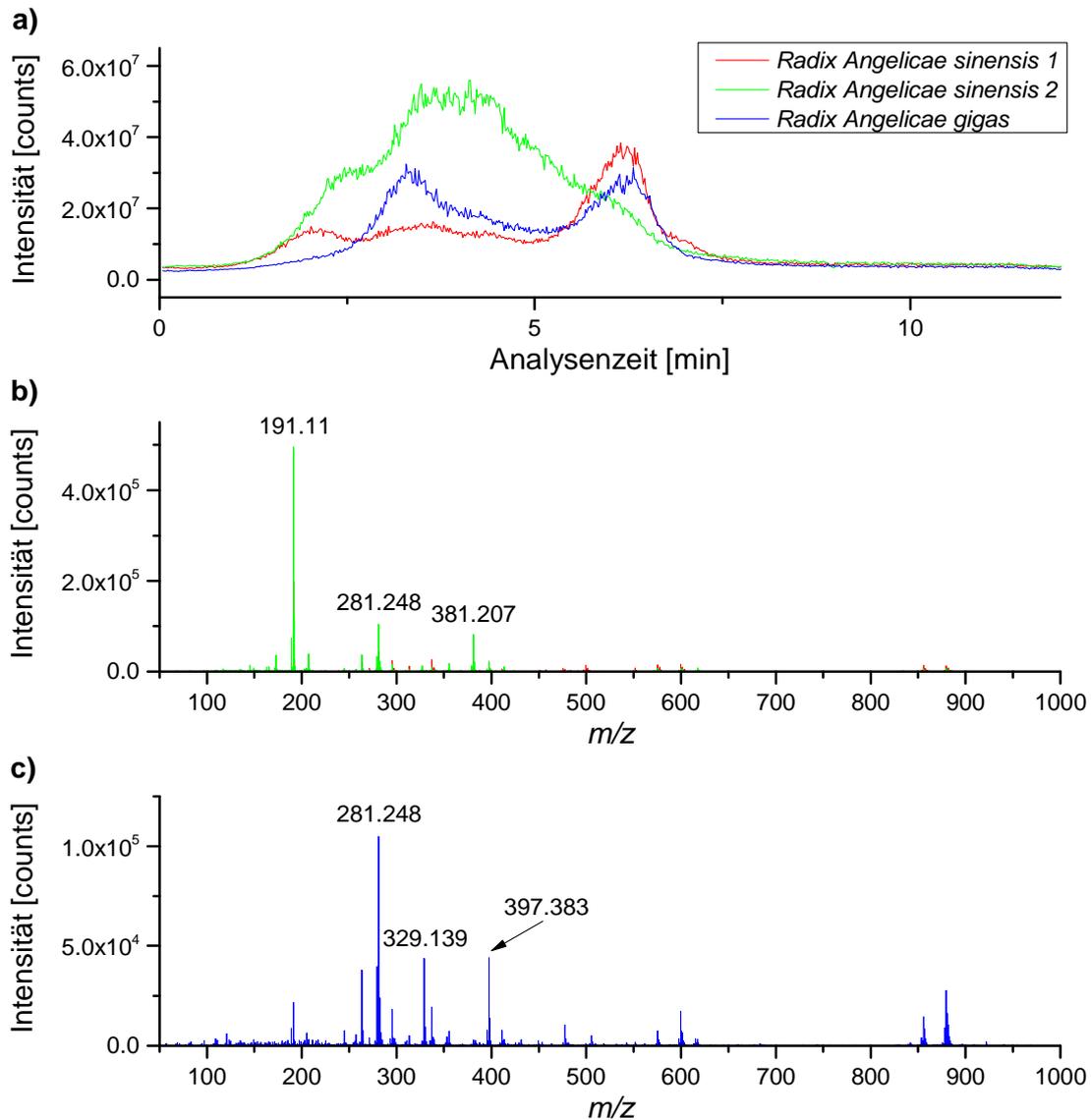


Abbildung 28: Analyse der Dichlormethanextrakte aus *Radix Angelicae sinensis* und *Radix Angelicae gigas*; (a) TIC; (b) Massenspektren (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae sinensis* 1 und 2; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) von *Radix Angelicae gigas*.

Verglichen mit der direkten Analyse der gemahlten Angelikawurzeln sind die erreichten Signalintensitäten bei Analyse der Dichlormethanextrakte geringer, was sich auf die geringere in die Probentiegel eingebrachte Probenmenge im Fall der Dichlormethanextrakte zurückführen lässt.

Im Dichlormethanextrakt aus *Radix Angelicae gigas* konnten bis auf Oroselone alle mittels GCxGC-MS detektierten Cumarine anhand der Detektion der entsprechenden akkuraten m/z -Signale nachgewiesen werden. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die im Dichlormethanextrakt aus *Radix Angelicae gigas* detektierten Cumarine und deren Intensitätsverteilung. Die ermittelte Intensitätsverteilung der Cumarine weicht von der bei direkter Analyse der gemahlten *Radix Angelicae gigas* ermittelten Intensitätsverteilung ab. Die Intensität von Decursin und/oder Decursinol Angelate überwiegt bei Analyse des Dichlormethanextraktes noch stärker. Abweichungen in den ermittelten Intensitätsverteilungen könnten sich durch unterschiedliche Löslichkeiten der Cumarine in Dichlormethan ergeben. Ebenfalls denkbar wäre, dass ein Teil der Cumarine in *Radix Angelicae gigas* an Matrixbestandteile gebunden vorliegt und bei direkter Analyse der gemahlten Proben durch die hohe Temperatur der Schubstange freigesetzt wird oder aber, dass Substanzen mit m/z -Verhältnissen, die den theoretischen m/z -Verhältnissen der Cumarine entsprechen, durch die hohe Temperatur der Schubstange aus Matrixbestandteilen gebildet werden.

Im Dichlormethanextrakt aus *Radix Angelicae sinensis* konnten keine Cumarine nachgewiesen werden. Dass im Dichlormethanextrakt aus *Radix Angelicae sinensis* keine Cumarine nachgewiesen wurden und Oroselone im Dichlormethanextrakt aus *Radix Angelicae gigas* nicht detektiert wurde, ist mit der im Fall der Dichlormethanextrakte geringeren in die Probentiegel eingebrachten Probenmenge zu begründen.

Tabelle 3: Bei DIP-APCI-MS Analyse des Dichlormethanextraktes aus *Radix Angelicae gigas* detektierte Cumarine.

| Cumarin | Summenformel und theoretisches m/z des [$M + H$] ⁺ | <i>Radix Angelicae gigas</i> | |
|----------------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|
| | | ppm ^a | % der Cumarine ^b |
| Angelicin/ Psoralen | $C_{11}H_6O_3$ m/z 187.0390 | 1.6 | 1.8 |
| Xanthotoxin/ Bergapten | $C_{12}H_8O_4$ m/z 217.0495 | 0.9 | 5.4 |
| Oroselone | $C_{14}H_{10}O_3$ m/z 227.0703 | n. d. | - |
| Seselin/ Xanthyletin | $C_{14}H_{12}O_3$ m/z 229.0859 | 0.4 | 2.6 |
| Osthenol | $C_{14}H_{14}O_3$ m/z 231.1016 | 0.4 | 1.0 |
| Osthol | $C_{15}H_{16}O_3$ m/z 245.1172 | 0.8 | 2.3 |
| Marmesin | $C_{14}H_{14}O_4$ m/z 247.0965 | 0.8 | 2.5 |
| Decursin/ Decursinol Angelate | $C_{19}H_{20}O_5$ m/z 329.1384 | 0.9 | 84.3 |

n. d.: nicht detektiert;

^a ppm: Abweichung des detektierten m/z vom theoretischen m/z des Cumarins;^b Anteil der Höhe des m/z -Signals des Cumarins an der Summe der Höhe aller m/z -Signale der Cumarine.

Auch bei den Analysen der Dichlormethanextrakte wurde für alle theoretischen m/z -Verhältnisse der Cumarine ein *Extracted ion chromatogram* (EIC) generiert. Abbildung 29 zeigt beispielhaft die EICs für Angelicin und/oder Psoralen in *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis*. In *Radix Angelicae gigas* ist hier ein deutlicher Anstieg der Signalintensität mit dem Temperaturprogramm der Schubstange zu erkennen. Verglichen mit der direkten Analyse der gemahlene *Radix Angelicae gigas* erfolgt der Anstieg der Signalintensität bei geringerer Temperatur der Schubstange. Dies lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass Angelicin und/oder Psoralen bei Analyse der gemahlene *Radix Angelicae gigas* zunächst aus der festen

Matrix freigesetzt werden muss. Bei allen detektierten Cumarinen war ein dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechender Anstieg der Signalintensität zu erkennen.

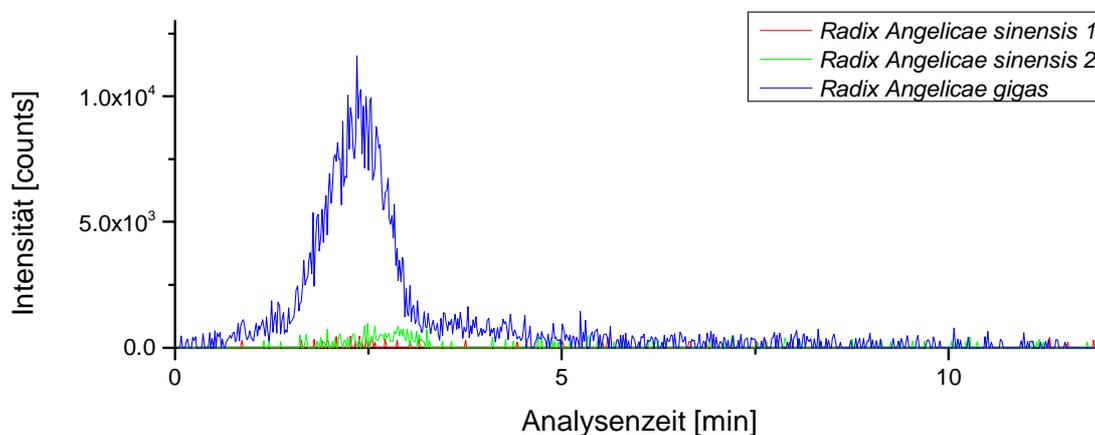


Abbildung 29: EIC von Angelicin und/oder Psoralen (m/z 187,0390 \pm 20 ppm) bei Analyse der Dichlormethanextrakte aus *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae sinensis*.

Neben der Analyse der chinesischen und koreanischen Angelikawurzel wurden mit Xiao Yao Pillen auch in der CHM eingesetzte Formulierungen aus verschiedenen Pflanzen mittels DIP-APCI-MS analysiert. Xiao Yao Pillen enthalten die chinesische Angelikawurzel sowie weitere Pflanzen und einen Pilz. Die Jiawei Xiao Yao Pille enthält neben den Bestandteilen der Xiao Yao Pille Ingwer.

Aus China stammende Xiao Yao Pillen und Jiawei Xiao Yao Pillen wurden direkt in Form der gemörserten Pillen und in Form der daraus hergestellten Dichlormethanextrakte analysiert, um zu untersuchen, ob Unterschiede in der Zusammensetzung der beiden Pillen nachweisbar sind.

Abbildung 30 zeigt die direkte Analyse der gemörserten Xiao Yao und Jiawei Xiao Yao Pillen. Zwischen den Verdampfungsprofilen der Pillen sind kaum Unterschiede zu erkennen. Das Massenspektrum der Jiawei Xiao Yao Pille zeigt ein Signal mit m/z 167,071, welches im Massenspektrum der Xiao Yao Pille nicht auftritt. Dieses m/z -Signal könnte als analytischer Marker für in der Jiawei Xiao Yao Pille enthaltenen Ingwer dienen. Um dies zu bestätigen, wären jedoch weitere Analysen, beispielsweise die Analyse von reinem Ingwer und die Analyse weiterer Xiao Yao und Jiawei Xiao Yao Pillen, nötig. Abgesehen von m/z 167,071 sind die bei Analyse der Xiao Yao und der Jiawei Xiao Yao Pille erhaltenen Massenspektren vergleichbar.

m/z 127,040 und weitere Signale im m/z -Bereich bis 150 können auch hier höchstwahrscheinlich auf Karamellisierungsprodukte von Zuckern zurückgeführt werden.

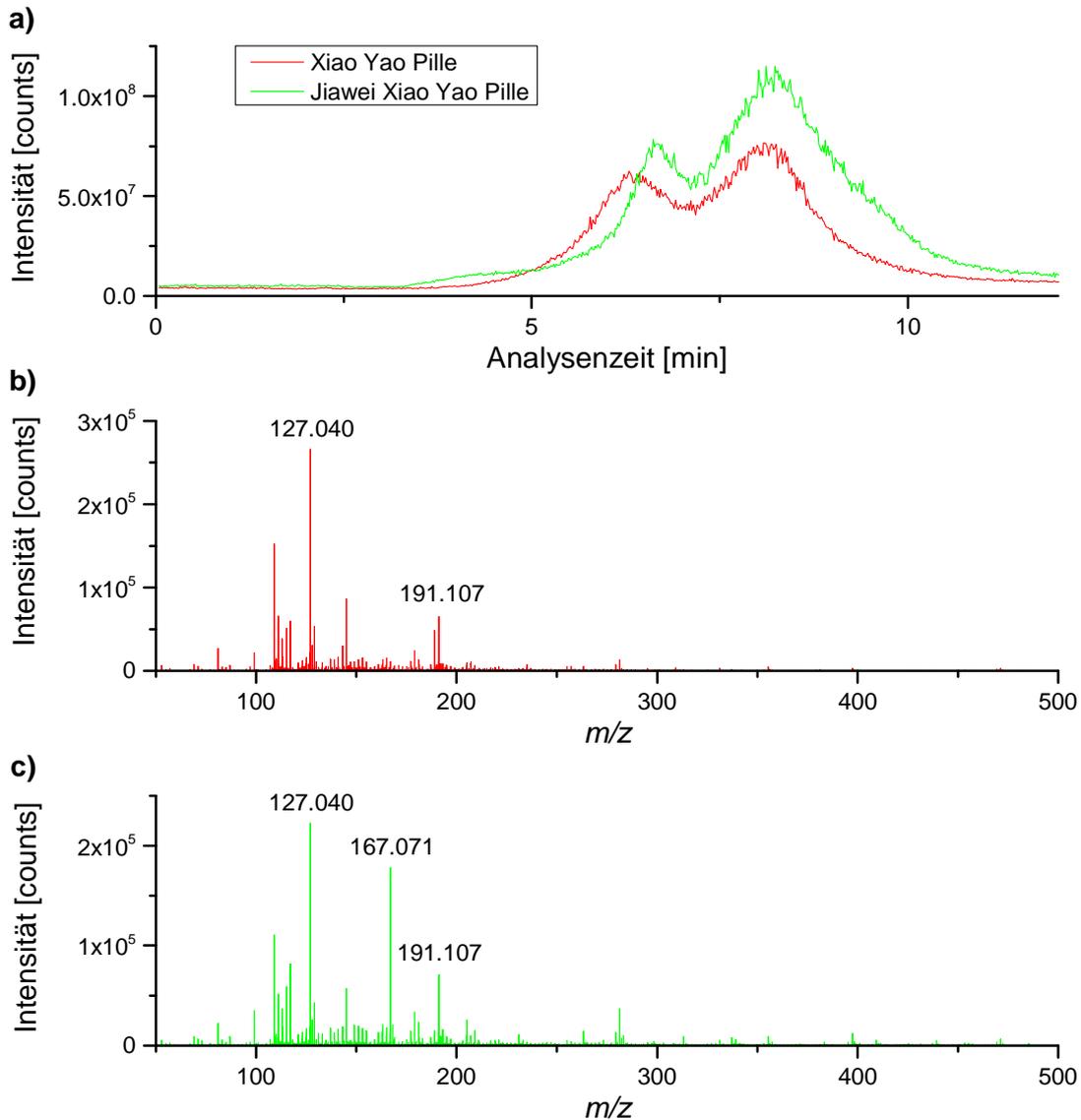


Abbildung 30: Direkte Analyse der gemörserten Xiao Yao Pille und Jiawei Xiao Yao Pille; (a) TIC; (b) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Xiao Yao Pille; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Jiawei Xiao Yao Pille.

Abbildung 31 zeigt die Analyse der Dichlormethanextrakte aus der Xiao Yao Pille und der Jiawei Xiao Yao Pille. Bei Analyse der Dichlormethanextrakte ist ein deutlicherer Unterschied zwischen den Verdampfungsprofilen der beiden Pillen zu erkennen, der sich jedoch hauptsächlich in der erreichten Signalintensität niederschlägt, welche im Fall der Jiawei Xiao Yao Pille deutlich höher ist. Das Massenspektrum der Jiawei Xiao Yao Pille zeigt, wie bei direkter Analyse der gemörserten Pillen auch, das Signal mit m/z 167,071, welches im Massenspektrum der Xiao Yao Pille nicht auftritt. Darüber hinaus ist im Massenspektrum der Jiawei Xiao Yao Pille, aber nicht im Massenspektrum der Xiao Yao Pille, m/z 281,247 in höherer Intensität zu erkennen. Umgekehrt tritt m/z 282,279 nur im Massenspektrum der Xiao Yao Pille in höherer Intensität auf und es sind weitere Unterschiede in der Intensitätsverteilung der m/z -Signale zu erkennen. Verglichen mit der direkten Analyse der gemörserten Xiao Yao und Jiawei Xiao Yao Pillen sind bei Analyse der Dichlormethanextrakte, wie zu erwarten, keine m/z -Signale, die sich auf Karamellisierungsprodukte von Zuckern zurückführen lassen, zu erkennen.

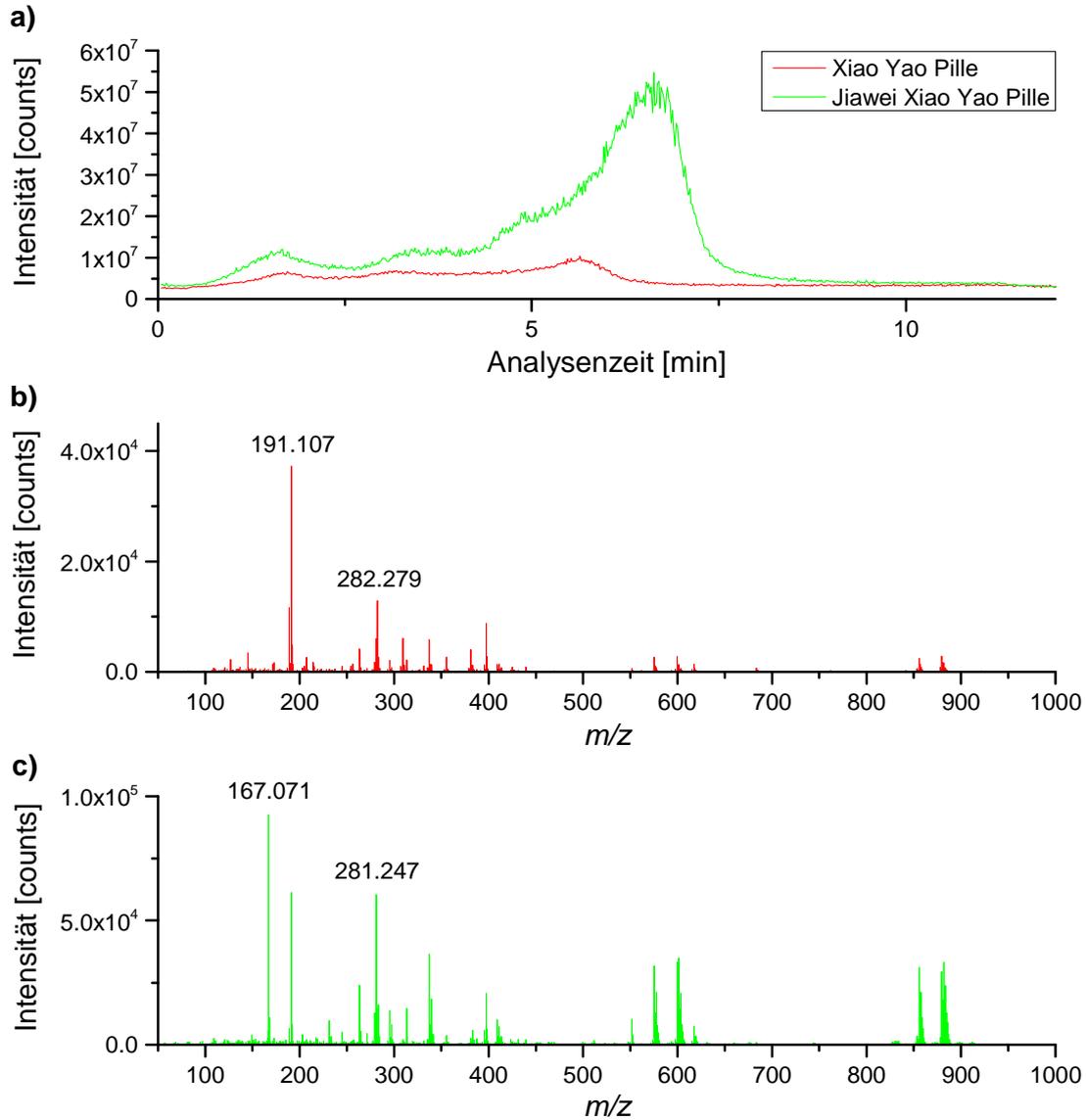


Abbildung 31: Analyse der Dichlormethanextrakte aus der Xiao Yao Pille und der Jiawei Xiao Yao Pille; (a) TIC; (b) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Xiao Yao Pille; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Jiawei Xiao Yao Pille.

Zur Bestätigung, dass es sich bei dem in der Jiawei Xiao Yao Pille aus China detektierten Signal mit m/z 167,071 um einen analytischen Marker für Ingwer handelt, wurden in einer Apotheke in

Wuppertal Xiao Yao Pillen, die sich lediglich in der An- oder Abwesenheit von Ingwer unterscheiden, bezogen. Abbildung 32 zeigt die direkte Analyse der gemörserten Xiao Yao Pillen mit und ohne Ingwer.

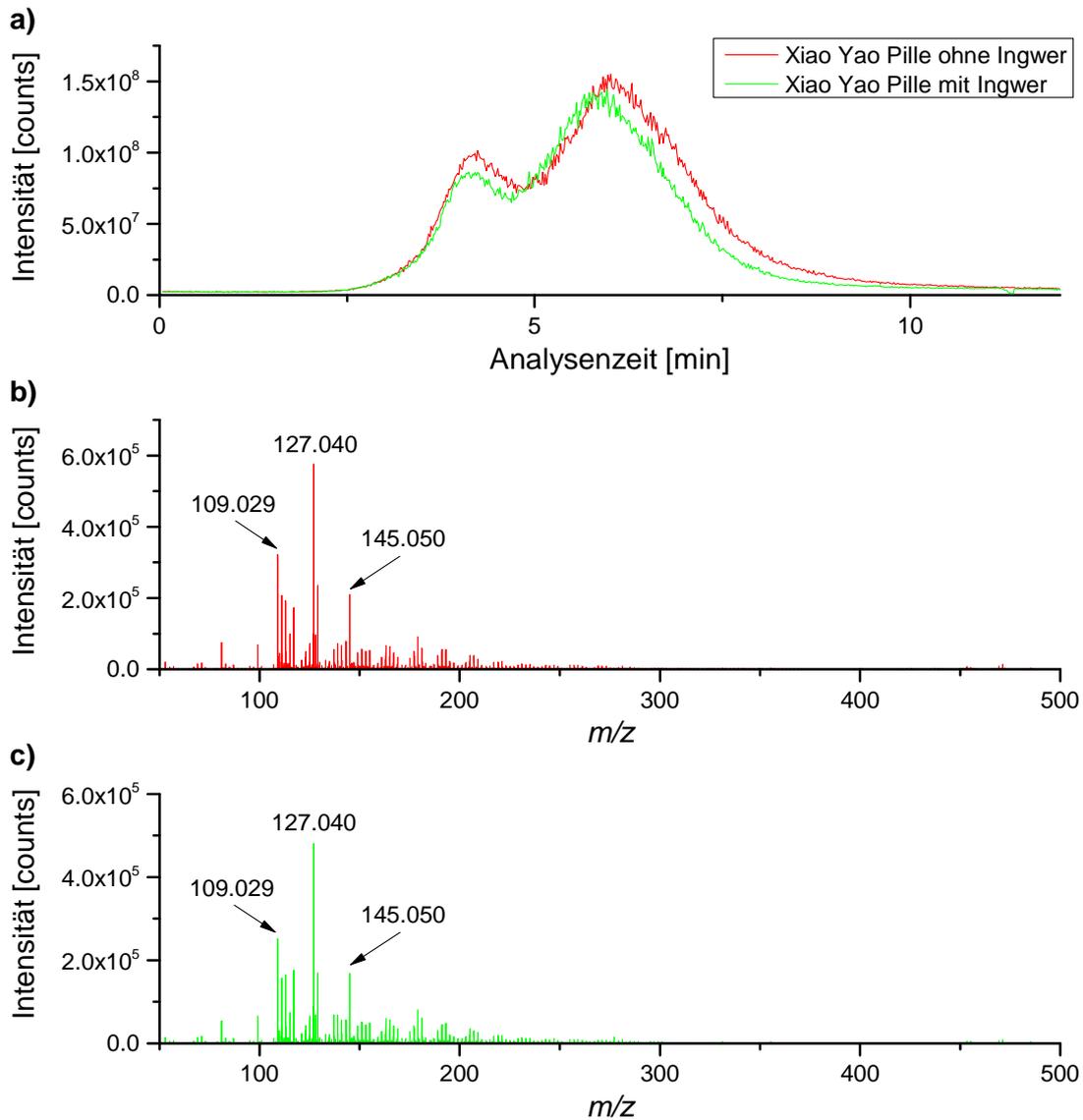


Abbildung 32: Direkte Analyse der gemörserten Xiao Yao Pillen mit und ohne Ingwer aus einer Apotheke in Wuppertal; (a) TIC; (b) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Xiao Yao Pille ohne Ingwer; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Xiao Yao Pille mit Ingwer.

Weder in den Verdampfungsprofilen der Xiao Yao Pillen mit und ohne Ingwer, noch in den entsprechenden Massenspektren, sind Unterschiede zwischen den beiden Pillen zu erkennen. In den Massenspektren treten hauptsächlich m/z -Signale, die auf der Karamellisierung von Zuckern bei den hohen Temperaturen der Schubstange beruhen, auf. Damit unterscheiden sich die Massenspektren der Xiao Yao Pillen aus der Apotheke in Wuppertal deutlich von den Massenspektren der Xiao Yao Pillen aus China. Auch m/z 191, welches bei Analyse der Angelikawurzeln und der Xiao Yao Pillen aus China auftrat, ist hier nicht zu erkennen. m/z 167,071 ist in der Xiao Yao Pille mit Ingwer aus der Wuppertaler Apotheke nicht nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass m/z 167,071 keinen analytischen Marker für Ingwer darstellt. Das Vorhandensein von m/z 167,071 in der Jiawei Xiao Yao Pille aus China, aber nicht in der Xiao Yao Pille aus China, muss auf einen anderen Unterschied in der Zusammensetzung der Pillen zurückzuführen sein.

Zur Überprüfung, ob der Zusatz einer anderen Spezies der *Angelica* als *Angelica sinensis* zu einer Xiao Yao Pille mittels DIP-APCI-MS nachweisbar ist, wurden Xiao Yao Pillen mit *Radix Angelicae sinensis* bzw. *Radix Angelicae archangelica* (europäische Angelikawurzel) in der Apotheke in Wuppertal bezogen. Abbildung 33 zeigt die direkte Analyse der gemörserten Xiao Yao Pillen. Zwischen den Verdampfungsprofilen der Xiao Yao Pillen mit *Radix Angelicae sinensis* und mit *Radix Angelicae archangelica* ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Im Massenspektrum der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica* sind m/z -Signale zu erkennen, die im Massenspektrum der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae sinensis* nicht auftreten. m/z 217,159 und m/z 245,118 treten hier in höherer Intensität auf. Die genannten m/z -Signale lassen sich, wie im Folgenden näher beschrieben, auf bereits mittels GCxGC-MS in *Radix Angelicae archangelica* nachgewiesene Cumarine zurückführen.

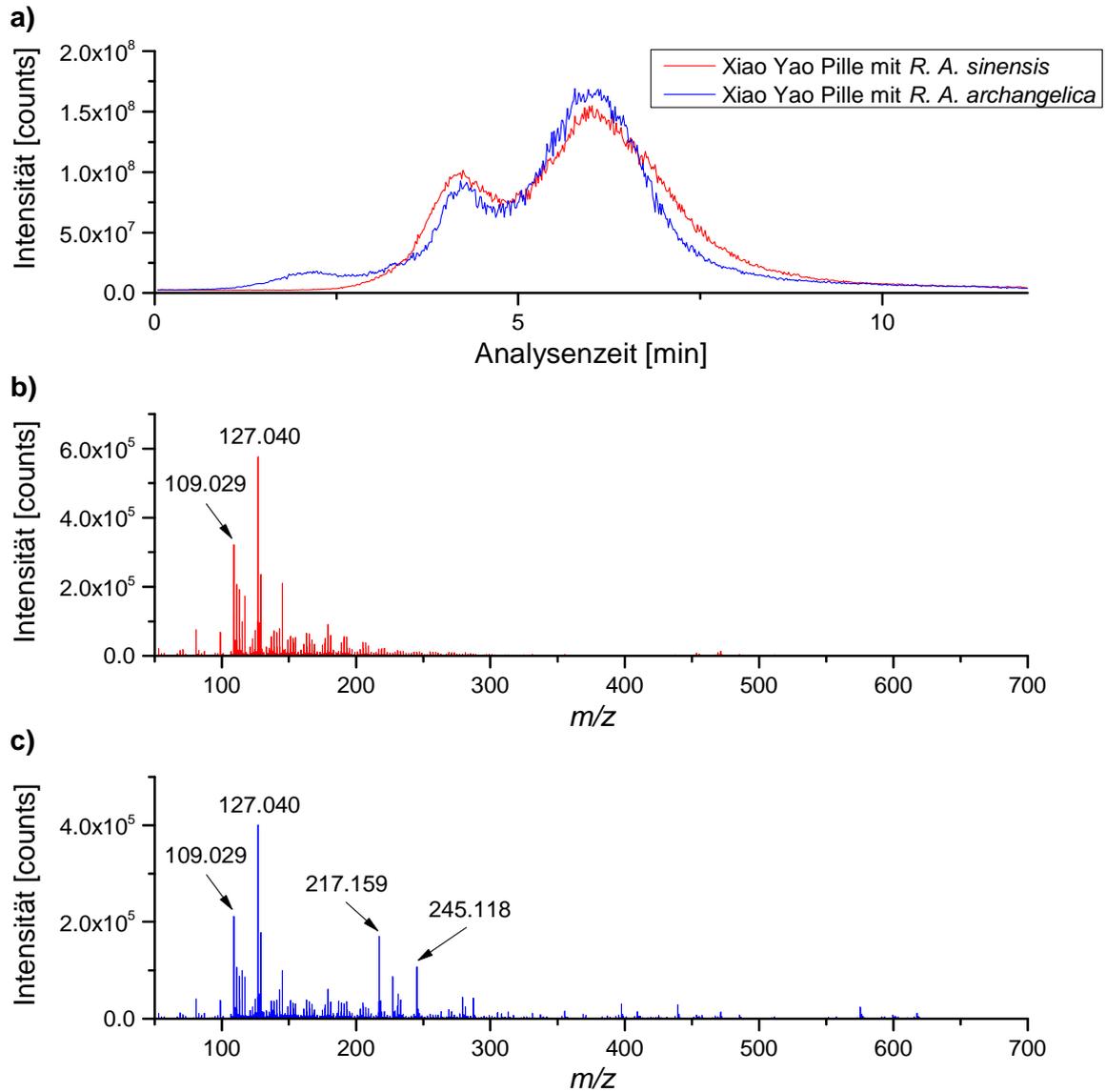


Abbildung 33: Direkte Analyse der gemörserten Xiao Yao Pillen mit *Radix Angelicae sinensis* bzw. *Radix Angelicae archangelica* aus einer Apotheke in Wuppertal; (a) TIC; (b) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae sinensis*; (c) Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica*.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die in der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica* bzw. mit *Radix Angelicae sinensis* anhand der detektierten akkuraten m/z -Signale nachgewiesenen Cumarine.

Tabelle 4: Bei direkter DIP-APCI-MS Analyse der gemörserten Xiao Yao Pillen mit *Radix Angelicae archangelica* bzw. *Radix Angelicae sinensis* aus einer Apotheke in Wuppertal detektierte Cumarine.

| Cumarin | Summenformel und theoretisches m/z des $[M + H]^+$ | Xiao Yao Pille mit <i>R. A. archangelica</i> | | Xiao Yao Pille mit <i>R. A. sinensis</i> | |
|-------------------------------------|--|---|--------------------------------|---|--|
| | | ppm ^a | % der Cumarine ^b | ppm ^a | % von <i>R. A.</i> <i>archangelica</i> ^c |
| Angelicin/ Psoralen | $C_{11}H_6O_3$ m/z 187.0390 | 0.0 | 11.2 | 0.0 | 4.3 |
| Xanthotoxin/ Bergapten | $C_{12}H_8O_4$ m/z 217.0495 | 0.9 | 11.0 | 0.5 | 12.0 |
| Oroselone | $C_{14}H_{10}O_3$ m/z 227.0703 | 0.9* | 26.9 | 0.4 | 5.4 |
| Seselin/ Xanthyletin | $C_{14}H_{12}O_3$ m/z 229.0859 | 0.4 | 4.9 | 0.4 | 74.0 |
| Osthenol | $C_{14}H_{14}O_3$ m/z 231.1016 | 0.4 | 8.0 | 0.0 | 55.2 |
| Osthol | $C_{15}H_{16}O_3$ m/z 245.1172 | 0.8* | 34.1 | 0.4 | 7.8 |
| Marmesin | $C_{14}H_{14}O_4$ m/z 247.0965 | 0.0 | 3.2 | 0.4 | 112.0 |
| Decursin/ Decursinol Angelate | $C_{19}H_{20}O_5$ m/z 329.1384 | 0.0 | 0.7 | 0.3 | 66.4 |

^a ppm: Abweichung des detektierten m/z vom theoretischen m/z des Cumarins;

^b Anteil der Höhe des m/z -Signals des Cumarins an der Summe der Höhe aller m/z -Signale der Cumarine;

^c Höhe des m/z -Signals des Cumarins im Vergleich zur Höhe des entsprechenden m/z -Signals bei der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica*;

* Signal erreicht Detektorsättigung; Abweichung des detektierten m/z vom theoretischen m/z des Cumarins vor Erreichen der Sättigung.

Alle zuvor in *Radix Angelicae gigas* nachgewiesenen Cumarine konnten auch in der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica* detektiert werden, allerdings unterscheiden sich die Intensitätsverteilungen der Cumarine deutlich. In der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica* sind Osthol und Oroselone die mengenmäßig vorherrschenden Cumarine. Die unterschiedlichen Intensitätsverteilungen der Cumarine in *Radix Angelicae gigas* und *Radix Angelicae archangelica* ermöglichen eine Unterscheidung dieser beiden Spezies der *Angelica*. Auch in der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae sinensis* konnten Cumarine nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der Höhe der m/z -Signale der in der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae sinensis* detektierten Cumarine im Vergleich zur Höhe des entsprechenden m/z -Signals bei der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica* erreicht nur bei Cumarinen, welche in der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae archangelica* in geringerer Menge enthalten sind, Werte $> 8\%$. Insgesamt ist der Cumarinegehalte in der Xiao Yao Pille mit *Radix Angelicae sinensis* somit deutlich geringer.

Die EICs der theoretischen m/z -Verhältnisse der Cumarine zeigten für alle detektierten Cumarine einen dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechenden Anstieg der Signalintensität. Beispielhaft zeigt Abbildung 34 die EICs für Angelicin und/oder Psoralen in den Xiao Yao Pillen mit *Radix Angelicae archangelica* bzw. mit *Radix Angelicae sinensis*.

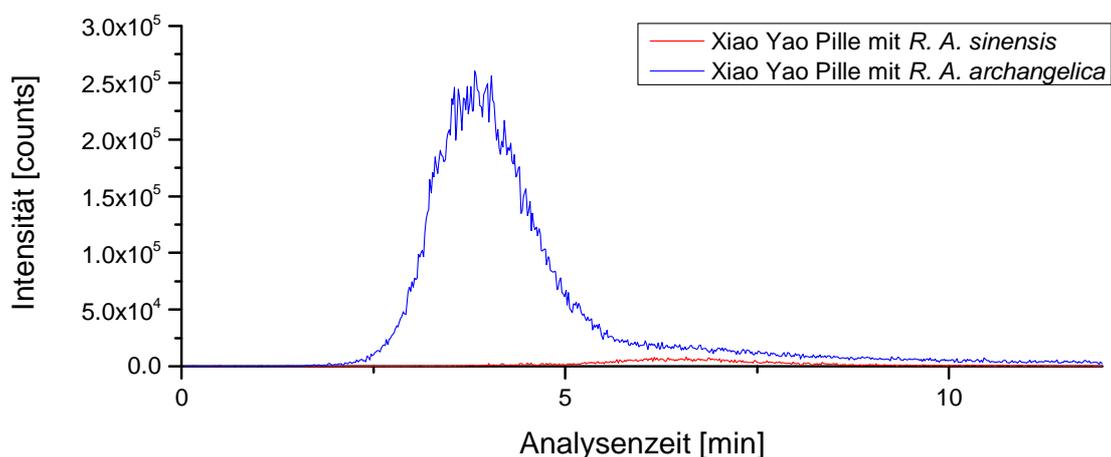


Abbildung 34: EIC von Angelicin und/oder Psoralen (m/z 187,0390 \pm 20 ppm) bei direkter Analyse der gemörserten Xiao Yao Pillen mit *Radix Angelicae archangelica* bzw. *Radix Angelicae sinensis* aus einer Apotheke in Wuppertal.

Die Ergebnisse der Analysen von *Radix Angelicae sinensis* und *Radix Angelicae gigas* mittels DIP-APCI-MS zeigen, dass sowohl bei direkter Analyse der gemahlten Pflanzen, als auch bei Analyse der entsprechenden Dichlormethanextrakte eine Unterscheidung der beiden Spezies der *Angelica* möglich ist. Die zuvor mittels GCxGC-MS in *Radix Angelicae gigas* identifizierte Cumarine konnten mittels DIP-APCI-MS nachgewiesen werden. Auch in der Xiao Yao Pille, als Beispiel für eine in der CHM eingesetzte Formulierung aus mehreren Pflanzen, konnte der Einsatz von *Radix Angelicae archangelica* anstelle von *Radix Angelicae sinensis* anhand der enthaltenen Cumarine bei direkter Analyse der gemörsterten Xiao Yao Pillen mittels DIP-APCI-MS nachgewiesen werden. Dies zeigt die Möglichkeit eines Einsatzes der DIP-APCI-MS zur Authentifizierung von in der CHM verwendeten Pflanzen und zur Qualitätskontrolle von Formulierungen der CHM ohne Einsatz jeglicher Probenvorbereitung.

3.2.2.2 Authentizitätskontrolle von Safran

Safran, die getrockneten Stigmata der Blüten von *Crocus sativus* L., ist eines der teuersten Gewürze weltweit und wird Lebensmitteln aufgrund seines Geschmacks und Aromas sowie zum Färben zugesetzt [240-243]. Das charakteristische Aroma von Safran wird maßgeblich durch die Schlüsselaromastoffe Safranal und Isophoron bestimmt, daneben tragen weitere Substanzen zum Aroma von Safran bei [241,242,244]. Safranal entsteht im Safran während der Trocknung und Lagerung durch Hydrolyse des bitter schmeckenden Glycosids Picrocrocin [242]. Abbildung 35 zeigt die Strukturen von Safranal und Isophoron.

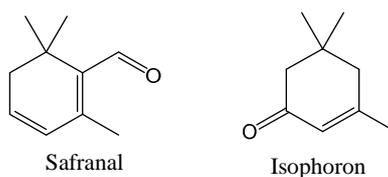


Abbildung 35: Strukturformeln von Safranal und Isophoron.

Die Qualität von Safran wird nach ISO 3632 (2003) bestimmt, wonach Safran aufgrund von physikalischen und chemischen Parametern in drei Kategorien eingeteilt wird. Hier spielt unter anderem die UV-Absorption bei 330 nm, zu der Safranal beiträgt, eine Rolle [243,244].

Aufgrund des hohen Preises von Safran kommt es zu Verfälschungen des Gewürzes. Die häufigste Verfälschung besteht im Zusatz von oder Ersatz durch orangefarben-blühende Pflanzen, wie der Färberdistel (Saflor) [240].

Zur Untersuchung, ob in verschiedenen Safran-Proben bei direkter Analyse mittels DIP-APCI-MS Qualitätsunterschiede zu erkennen sind, wurden vier verschiedene Safran-Proben gemörsert und mittels DIP-APCI-MS bei Ionisation im Positiv-Modus analysiert. Die Schubstange wurde hierbei mit einer Heizrate von 1 °/s auf 400 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten.

Abbildung 36 zeigt die resultierenden Massenspektren, gemittelt über die gesamte Analysendauer, der Analyse der vier Safran-Proben. In den Massenspektren von Safran 3 und Safran 4 sind die akkuraten m/z -Signale von Safranal (theoretisches m/z -Verhältnis des $[M + H]^+$ -Ions: m/z 151.1117) und Isophoron (theoretisches m/z -Verhältnis des $[M + H]^+$ -Ions: m/z 139.1117) in hoher Intensität zu erkennen. Safranal erreicht bei der Analyse von Safran 3 und Safran 4 Detektorsättigung, weshalb die spezifizierte Massengenauigkeit des Q-TOF-MS hier nicht gegeben ist und eine erhöhte Abweichung des detektierten m/z -Signals vom theoretischen m/z -Verhältnis von Safranal beobachtet wird. Bei der Analyse von Safran 4 erreicht auch Isophoron Detektorsättigung, was auch hier die erhöhte Abweichung des detektierten m/z -Signals vom theoretischen m/z -Verhältnis von Isophoron erklärt. In den Massenspektren von Safran 1 und Safran 2 sind die akkuraten m/z -Signale von Safranal und Isophoron nur in vergleichsweise geringer Intensität zu erkennen und treten gegenüber den in Abbildung 36 zu erkennenden m/z -Signalen m/z 139,0753 bzw. m/z 151,0753, von denen sie aufgrund der hohen Auflösung des Q-TOF-MS differenziert werden, in den Hintergrund.

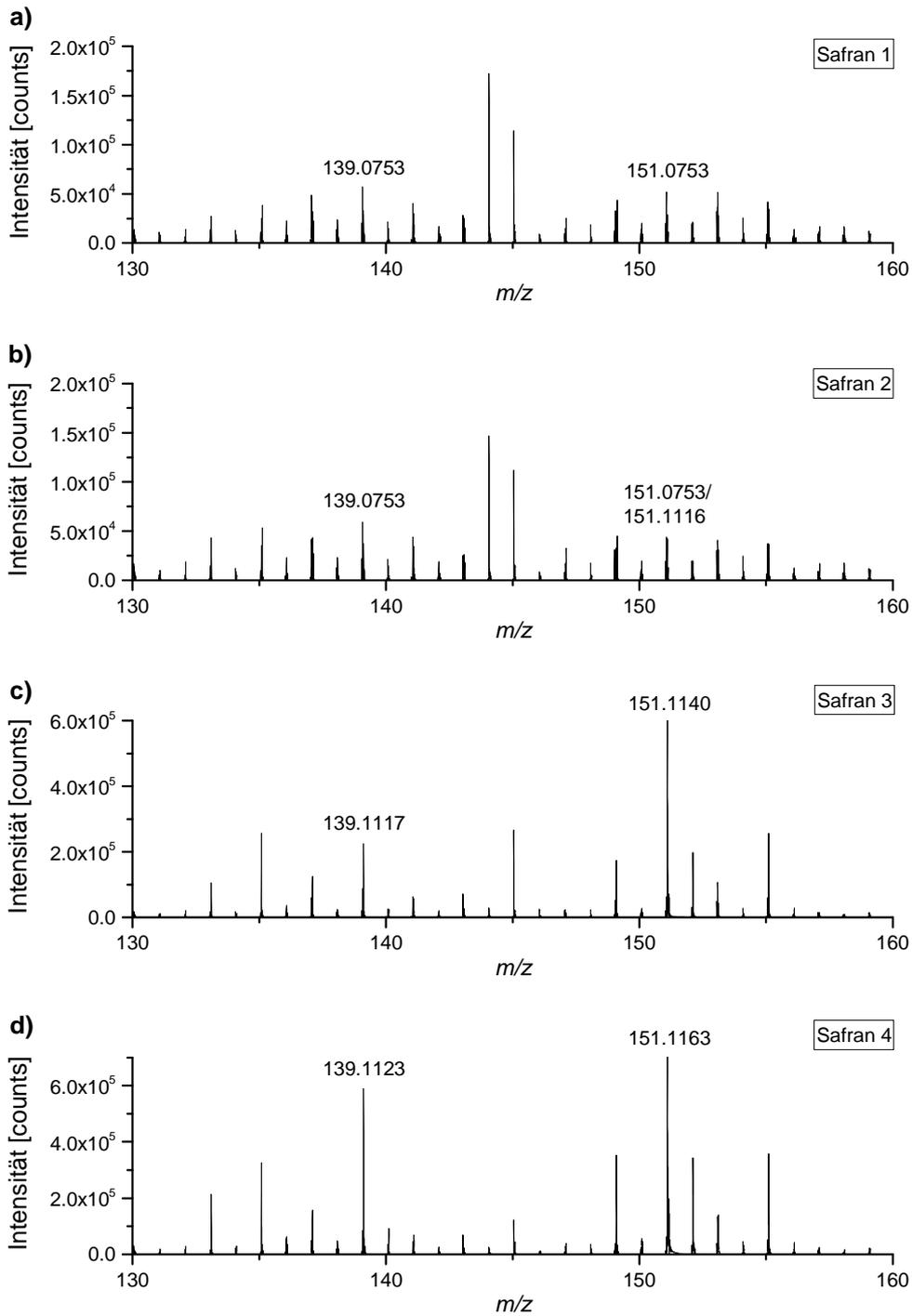


Abbildung 36: Massenspektren (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der direkten Analyse verschiedener Safran-Proben.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Abweichung der detektierten m/z -Signale von den theoretischen m/z -Verhältnissen von Safranal und Isophoron und über die Intensität der detektierten Signale. Die generierten EICs der m/z -Verhältnisse von Safranal und Isophoron zeigten in den Analysen aller Safran-Proben einen dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechenden Signalanstieg.

Tabelle 5: Detektion von Safranal und Isophoron bei direkter Analyse der verschiedenen Safran-Proben.

| Aroma- stoff | Summen- formel und theoretisches m/z des $[M + H]^+$ | Safran 1 | | Safran 2 | | Safran 3 | | Safran 4 | |
|-----------------|--|------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|
| | | ppm ^a | Int. [c.] ^b |
| Isophoron | $C_9H_{14}O$ m/z 139.1117 | 1.4 | 29551 | 0.7 | 37820 | 0.0 | 230308 | 0.0* | 600820 |
| Safranal | $C_{10}H_{14}O$ m/z 151.1117 | 0.7 | 28785 | 0.7 | 41861 | 0.0* | 612257 | 0.0* | 709525 |

^a ppm: Abweichung des detektierten m/z vom theoretischen m/z des Aromastoffs;

^b Int. [c]: Intensität im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum [counts];

* Signal erreicht Detektorsättigung; Abweichung des detektierten m/z vom theoretischen m/z des Aromastoffs vor Erreichen der Sättigung.

Die Tatsache, dass Safranal und Isophoron als Schlüsselaromastoffe von Safran in Safran 1 und 2 nur in sehr geringer Intensität nachweisbar sind, lässt darauf schließen, dass bei Safran 1 und 2 eine Verfälschung oder zumindest Safran niedriger Qualität vorliegt. Die Analyse einer größeren Anzahl authentischer Safran-Proben könnte zeigen, in welcher Intensität Safranal und Isophoron bei authentischem Safran mindestens detektiert werden. Daraufhin könnte die direkte Analyse von Safran mittels DIP-APCI-MS und die Detektion von Safranal und Isophoron eine Authentizitätskontrolle von Safran ermöglichen.

3.2.2.3 Nachweis eines UV-Absorbers

Als Beispiel für den Einsatz der DIP-APCI-MS in der Materialwissenschaft sollte untersucht werden, ob ein in einer Folie enthaltener UV-Absorber direkt aus dieser Folie nachweisbar ist. Bei der untersuchten Folie handelt es sich um ein thermoplastisches Polyurethan (TPU), welches

ein Benzotriazol (2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-methyl-1-phenylethyl)phenol; Handelsname Tinuvin 900) als UV-Absorber zur Erhöhung der Lichtstabilität der Folie enthält. Abbildung 37 zeigt die Strukturformel von Tinuvin 900.

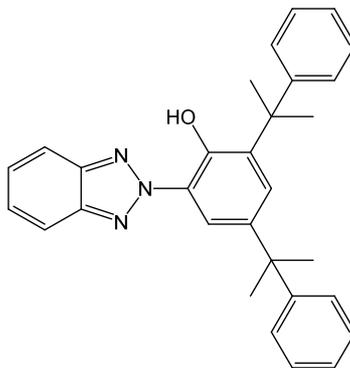


Abbildung 37: Strukturformel von 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-methyl-1-phenylethyl)phenol (Tinuvin 900).

Ein kleines Stück der Folie wurde in einen Probenziegel und dieser in die Probenaufnahme für feste Proben eingebracht. Die Schubstange wurde mit einer Heizrate von 2 °/s auf 400 °C aufgeheizt. Die Ionisation erfolgte im Positiv-Modus. Abbildung 38 zeigt das resultierende, über die gesamte Analysendauer gemittelte Massenspektrum. Im Massenspektrum ist ein m/z -Signal, welches dem theoretischen m/z -Verhältnis des $[M + H]^+$ -Ions von Tinuvin 900 (m/z 448,2383) zugeordnet werden kann, zu erkennen. Das Signal erreichte Detektorsättigung. Vor Erreichen der Sättigung wurde ein m/z -Verhältnis von 448,2388 detektiert. Dies entspricht einer Abweichung von 1,1 ppm vom theoretischen m/z -Verhältnis von Tinuvin 900. Das m/z -Signal von Tinuvin 900 zeigte einen dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechenden Anstieg der Signalintensität.

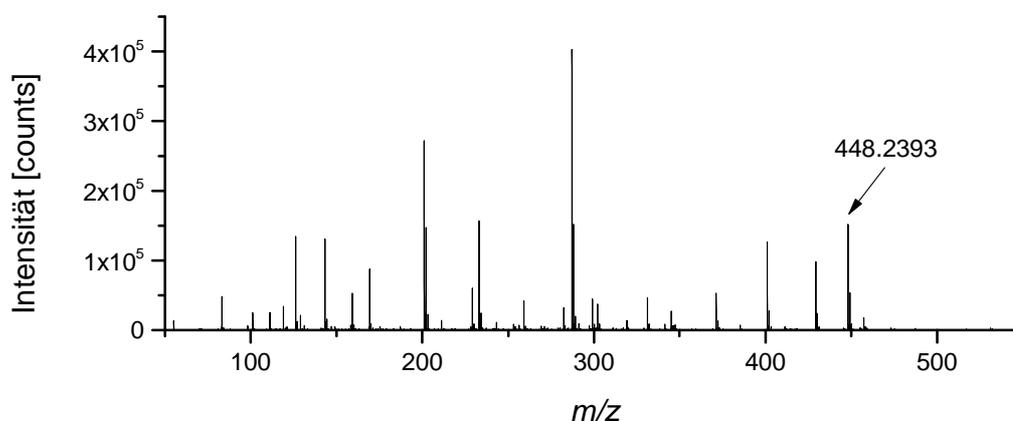


Abbildung 38: Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der direkten Analyse einer Folie aus TPU.

Der Nachweis von Tinuvin 900 direkt aus einer Folie aus TPU zeigt die Möglichkeit des Einsatzes der DIP-APCI-MS bei Fragestellungen der Materialwissenschaften. Als UV-Stabilisatoren eingesetzte Benzotriazole (Tinuvin 326 und Tinuvin 328) und andere Polymeradditive konnten auch mittels DESI-MS direkt aus dem Polymer detektiert werden [59]. DART-MS konnte zum Nachweis von Additiven, unter anderem des Benzotriazols Tinuvin 234, in Lebensmittelverpackungen eingesetzt werden [128].

3.2.3 Quantifizierung von Cumarin in Zimt und Waldmeister-Getränken mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS und LC-Q-TOF-MS

Im vorliegenden Kapitel dieser Arbeit soll die Möglichkeit untersucht werden, quantitative Analysen mittels DIP-APCI-MS durchzuführen. Dies soll am Beispiel der Bestimmung des Cumarin Gehalts in Zimt und in Getränken mit Waldmeistergeschmack erfolgen.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden bereits publiziert (Krieger S, Hayen H, Schmitz OJ (2013) Quantification of coumarin in cinnamon and woodruff-beverages using DIP-APCI-MS and LC-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (25):8337-8345).

Cumarin ist ein natürlich vorkommender sekundärer Pflanzenstoff mit einem angenehmen Aroma, welcher in einer Reihe von Pflanzen, beispielsweise in der Tonkabohne, in Waldmeister und insbesondere in Cassia-Zimt, vorkommt [245,246]. Auf dem europäischen Markt sind zwei

Sorten Zimt, Ceylon-Zimt und Cassia-Zimt, erhältlich [246,247], welche sich in ihren Cumaringehalten deutlich unterscheiden. Nach Literaturangaben weist Ceylon-Zimt Cumaringehalte von unterhalb der Nachweisgrenze bis 190 mg/kg auf, wogegen in Cassia-Zimt Cumaringehalte zwischen 700 und 12230 mg/kg vorliegen [248]. In einer neueren Untersuchung wurden in gemahlenem Ceylon-Zimt Cumaringehalte von unterhalb der Nachweisgrenze (Nachweisgrenze: 30 mg/kg) bis 297 mg/kg bestimmt. In gemahlenem Cassia-Zimt lagen die ermittelten Cumaringehalte im Bereich von 1740-7670 mg/kg [246]. Nach den Ergebnissen von Tierversuchen wird Cumarin als hepatotoxisch und kanzerogen eingestuft [245,247]. Im Jahr 2004 kam die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) zu dem Schluss, dass der kanzerogene Effekt von Cumarin auf einer nicht-genotoxischen Wirkungsweise beruht. Daraufhin wurde eine tolerierbare tägliche Aufnahme (*tolerable daily intake*, TDI) von 0,1 mg Cumarin/kg Körpergewicht, basierend auf dem bei Untersuchungen zur Hepatotoxizität von Cumarin bei Hunden ermittelten *No observed adverse effect level* (NOAEL), festgelegt [249]. Der TDI von 0,1 mg Cumarin/kg Körpergewicht wurde im Jahr 2008 noch einmal von der EFSA [250] und auch basierend auf klinischen Daten zur Hepatotoxizität bei Patienten, die mit Cumarin als Arzneimittel behandelt wurden [251], bestätigt. Im Jahr 2011 zeigte das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), dass die Bioverfügbarkeit von Cumarin aus Zimtpulver nur wenig geringer ist, als die Bioverfügbarkeit von isoliertem Cumarin [252]. Daher kann der für isoliertes Cumarin abgeleitete TDI auch für Cumarin aus zimthaltigen Lebensmitteln angewendet werden [253]. Seit Januar 2011 gelten in der Europäischen Union neue Grenzwerte für den Cumaringehalt bestimmter zimthaltiger Lebensmittel, beispielsweise 50 mg/kg in Zimtsternen, welche in Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 festgelegt wurden [253]. Für den Cumaringehalt von Zimt als Gewürz wurden keine Grenzwerte festgelegt. Zur Bestimmung des Cumaringehalts von Zimt und anderen Lebensmitteln wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden etabliert. Am weitesten verbreitet ist die Analyse mittels LC mit UV-Detektion [245,246,254,255] und mittels LC-MS [245,256].

In der Literatur beschriebene Anwendungen der ambienten Massenspektrometrie umfassen hauptsächlich qualitative Nachweise einzelner Analyten und Fingerprint-Analysen. Es sind jedoch auch einige Beispiele für quantitative Bestimmungen mittels ambienter Massenspektrometrie beschrieben. Die ASAP-MS wurde zur quantitativen Bestimmung von

Azoxystrobin-Rückständen in Getreide [149] eingesetzt und die DART-MS fand Anwendung zur quantitativen Analyse von Strobilurin-Fungiziden in Getreide [52], chemischen Kampfstoffen [114], Coffein in Kaffeeproben [125], Diazepam in Blut [133], Geniposid in einer in der CHM eingesetzten Formulierung [137] und Mycotoxinen in Getreide [123]. Beispiele für quantitative Anwendungen der DESI-MS beinhalten die Bestimmung von Clozapin in tierischem Gewebe [60], Flunitrazepam in alkoholischen Getränken [45], Diphenhydramin in menschlichem Urin sowie Cholesterin in Serum [36]. Wie bereits in Kapitel 1.1.3 erläutert, wird in fast allen in der Literatur beschriebenen quantitativen Anwendungen der ambienten Massenspektrometrie ein interner Standard verwendet, um die relativ starken Schwankungen der Signalintensitäten zwischen wiederholten Messungen zu kompensieren [36,52,60,123,125,133]. Die Verwendung stabilisotopenmarkierter Analytanaloge ermöglicht zusätzlich die Kompensation von Matrixeffekten [110,125,133].

Die Möglichkeit, quantitative Analysen mittels DIP-APCI-MS durchzuführen, soll am Beispiel der Bestimmung von Cumarin in Zimt und Waldmeister-Getränken, sowohl unter Verwendung von d_4 -Cumarin als interner Standard, als auch ohne Verwendung eines internen Standards untersucht werden. Abbildung 39 zeigt die Strukturformeln von Cumarin und d_4 -Cumarin.

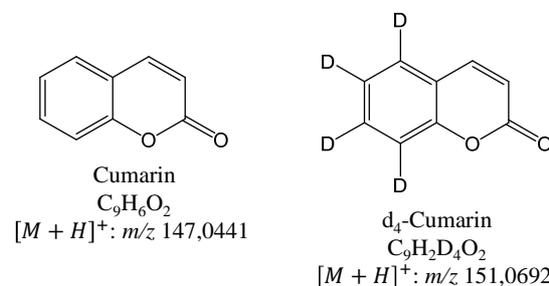


Abbildung 39: Strukturformeln von Cumarin und d_4 -Cumarin.

Zum Zweck der quantitativen Bestimmung von Cumarin wurden zehn Zimtproben (5 Proben Ceylon-Zimt, 2 Proben Cassia-Zimt und 3 Proben ohne Angabe der botanischen Herkunft), zwei Getränke mit Waldmeistergeschmack und ein Kaugummi mit Zimtgeschmack im Einzelhandel erworben. Die Zimtproben wurden sowohl nach Extraktion, als auch direkt mittels DIP-APCI-MS analysiert. Bei der Herstellung der Zimtextakte wurde vor der Extraktion d_4 -Cumarin als interner Standard zugesetzt. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung des internen

Standards und auch ohne Berücksichtigung des internen Standards. Die Getränke mit Waldmeistergeschmack wurden zur DIP-APCI-MS Analyse mit d_4 -Cumarin als interner Standard versetzt und verdünnt. Auch hier erfolgte die Auswertung unter Berücksichtigung des internen Standards und ohne Berücksichtigung des internen Standards. Die mittels DIP-APCI-MS ermittelten Cumaringehalte sollen mit Ergebnissen einer ergänzenden LC-MS Analyse verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde eine LC-MS Methode basierend auf Umkehrphasen-HPLC und ESI-Q-TOF-MS entwickelt und die Zimtextakte und verdünnten Getränke mit Waldmeistergeschmack unter Verwendung der entwickelten Methode analysiert. Abbildung 40 zeigt beispielhaft ein Chromatogramm der LC-MS Analyse einer Kalibrierlösung und eines Extraktes aus Ceylon-Zimt.

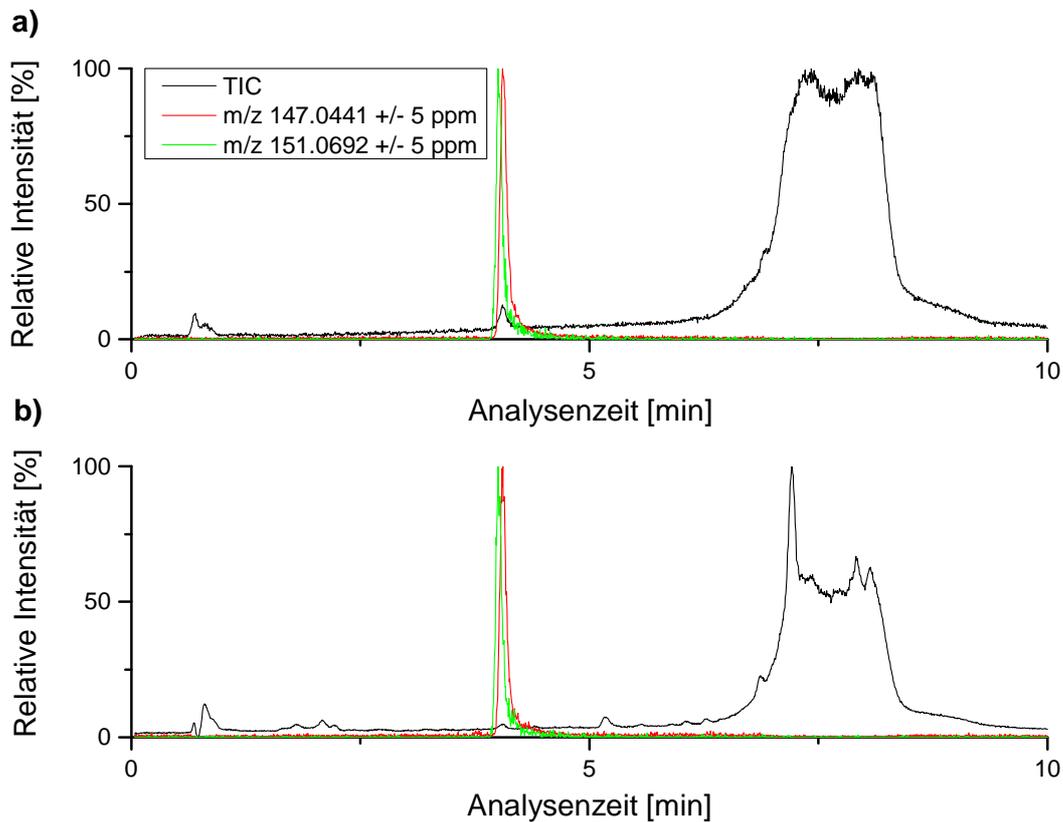


Abbildung 40: Chromatogramm der LC-MS Analyse einer Kalibrierlösung und eines Extraktes aus Ceylon-Zimt; schwarz: TIC; rot: EIC von Cumarin; grün: EIC von d_4 -Cumarin; (a) Kalibrierlösung; (b) Extrakt aus Ceylon-Zimt.

Bei dem in Abbildung 40a gezeigten Chromatogramm handelt es sich um die Analyse einer Kalibrierlösung mit 5,0 mg/L Cumarin und 0,9 mg/L d₄-Cumarin. Die absoluten Peakhöhen betragen $1,1 \times 10^5$ counts im Fall von Cumarin, $2,5 \times 10^4$ counts im Fall von d₄-Cumarin und der TIC erreichte im Bereich von 7-8 min $1,0-1,1 \times 10^7$ counts. Bei dem in Abbildung 40b gezeigten Chromatogramm der Analyse eines Ceylon-Zimtextraktes mit 0,9 mg/L d₄-Cumarin betragen die absoluten Peakhöhen $9,0 \times 10^4$ counts im Fall von Cumarin und $2,5 \times 10^4$ counts im Fall von d₄-Cumarin. Der TIC erreichte im Bereich von 7-8 min $1,6-3,1 \times 10^7$ counts. Es wurde eine gute Abtrennung von Cumarin und d₄-Cumarin von der Zimtmatrix erreicht.

In Abbildung 41 ist beispielhaft das Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse der Kalibrierlösung und des Extraktes aus Ceylon-Zimt gezeigt, deren LC-MS Analyse in Abbildung 40 dargestellt waren.

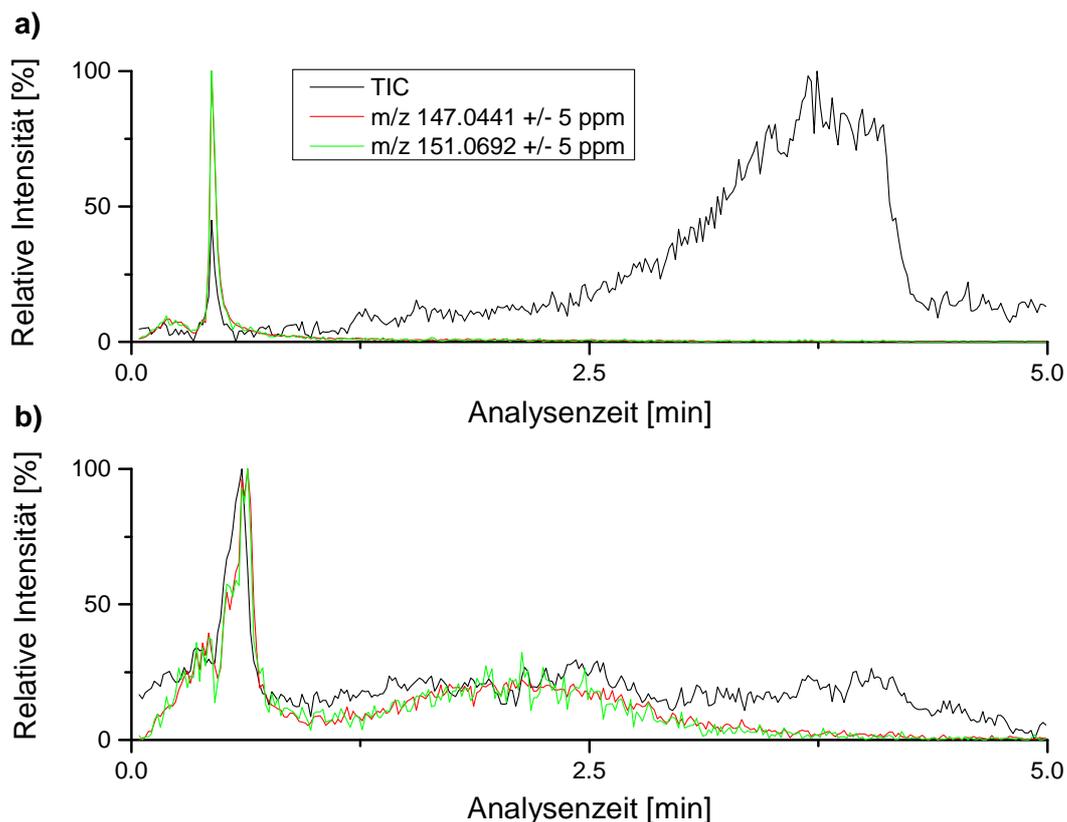


Abbildung 41: Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse einer Kalibrierlösung und eines Extraktes aus Ceylon-Zimt; schwarz: TIC; rot: EIC von Cumarin; grün: EIC von d₄-Cumarin; (a) Kalibrierlösung; (b) Extrakt aus Ceylon-Zimt.

Die maximalen Höhen der m/z -Signale betragen bei der analysierten Kalibrierlösung (Abbildung 41a) $5,1 \times 10^5$ counts im Fall von Cumarin, $9,2 \times 10^4$ counts im Fall von d_4 -Cumarin und der TIC erreichte $1,3 \times 10^7$ counts. Bei der Analyse des Ceylon-Zimtextraktes (Abbildung 41b) erreichten die m/z -Signale Höhen von maximal $7,0 \times 10^4$ counts im Fall von Cumarin und $1,8 \times 10^4$ counts im Fall von d_4 -Cumarin. Der TIC erreichte $3,1 \times 10^7$ counts.

Im DIP-APCI-MS Chronogramm des Ceylon-Zimtextraktes (Abbildung 41b) ist ein zweiter Anstieg der Signalintensität der m/z -Spuren (EICs) von Cumarin und d_4 -Cumarin zu erkennen, welcher im DIP-APCI-MS Chronogramm der Kalibrierlösung (Abbildung 41a) nicht auftritt. Cumarin und d_4 -Cumarin zeigen identisches Verdampfungsverhalten. Dies lässt vermuten, dass der zweite Anstieg der Signalintensität der m/z -Spuren von Cumarin und d_4 -Cumarin auf die Gegenwart von Matrixbestandteilen zurückzuführen ist, welche die Verdampfung von Cumarin und d_4 -Cumarin teilweise verzögern. Um diesen Effekt zu beseitigen, wurde ein Zimtextrakt nach Carrez geklärt. Die Carrez-Klärung wird dazu verwendet, Proteine und andere hochmolekulare Substanzen beispielsweise aus Lebensmittelextrakten zu entfernen [245,257]. Leider konnte die Verzögerung der Verdampfung von Cumarin und d_4 -Cumarin durch die Carrez-Klärung nicht beseitigt werden. Aufgrund des unterschiedlichen Verdampfungsverhaltens von Cumarin bzw. d_4 -Cumarin bei der DIP-APCI-MS Analyse der Kalibrierlösungen und der Zimtextrakte wurden folgende Vorgehensweisen zur Auswertung der DIP-APCI-MS Analysen gewählt: Für jede Analyse wurden die erhaltenen Massenspektren über die gesamte Analysendauer gemittelt und die Höhen der m/z -Signale von Cumarin und d_4 -Cumarin (genannt „mittlere Intensität“) im resultierenden, gemittelten Massenspektrum zur Auswertung herangezogen. Zusätzlich wurden die m/z -Spuren von Cumarin und d_4 -Cumarin mit ± 5 ppm extrahiert (Generierung der EICs) und über die gesamte Analysendauer integriert (genannt „Fläche“).

Die LC-MS Analysen wurden mittels Generierung der EICs von Cumarin und d_4 -Cumarin durch Extraktion der m/z -Spuren mit ± 5 ppm und anschließender Integration der Peaks ausgewertet.

3.2.3.1 Validierung der Cumarin-Bestimmung in Zimt mittels DIP-APCI-MS und LC-MS nach Extraktion

Sowohl die DIP-APCI-MS Methode als auch die LC-MS Methode wurden zur Bestimmung von Cumarin in Zimtpulver nach Extraktion validiert. Hierzu wurden Linearität, Wiederfindung, Wiederholbarkeit, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze ermittelt.

Die Linearität wurde durch wiederholte Analyse (LC-MS: $n = 6$; DIP-APCI-MS: $n = 4$) von Kalibrierlösungen mit 0,1-10 mg Cumarin/L (0,1, 0,5, 1, 5 und 10 mg/L) und jeweils 0,9 mg/L d_4 -Cumarin bestimmt. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde die Ceylon-Zimtprobe mit dem niedrigsten Cumarinegehalt mit vier verschiedenen Konzentrationen (100, 500, 1000 und 5000 mg/kg) an Cumarin versetzt, da kein Cumarin-freier Zimt als Leer-Matrix verfügbar war. Die gespikten Zimtproben wurden extrahiert und mittels LC-MS ($n = 3$) und DIP-APCI-MS ($n = 5$) analysiert. Die ermittelten Cumarinegehalte der Wiederfindungsproben wurden um den Cumarinegehalt des verwendeten Ceylon-Zimts korrigiert. Die Wiederholbarkeit (innerhalb eines Tages und an zwei verschiedenen Tagen) wurde durch Analyse der Wiederfindungsproben an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt. Die Nachweisgrenzen (*Limit of detection*, LOD) und Bestimmungsgrenzen (*Limit of quantification*, LOQ) wurden nach der Kalibriergeradenmethode der DIN 32645 ($\alpha = \beta = 0,05$; $k = 3$) berechnet. Hierzu wurde ein Extrakt der Ceylon-Zimtprobe mit dem niedrigsten Cumarinegehalt hergestellt, mit 1-920 $\mu\text{g } d_4$ -Cumarin/L (1, 5, 9, 46, 92, 460 und 920 $\mu\text{g/L}$) zur LC-MS Analyse bzw. 5-920 $\mu\text{g } d_4$ -Cumarin/L (5, 9, 46, 92, 460 und 920 $\mu\text{g/L}$) zur DIP-APCI-MS Analyse versetzt und die resultierenden Lösungen wiederholt analysiert (LC-MS: $n = 3$; DIP-APCI-MS: $n = 3$). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden für d_4 -Cumarin bestimmt und auf Cumarin übertragen, da kein Cumarin-freier Zimt als Leer-Matrix verfügbar war.

Tabelle 6 zeigt die Validierungsergebnisse für die LC-MS Methode und die DIP-APCI-MS Methode zur Bestimmung von Cumarin in Zimtpulver nach Extraktion.

Tabelle 6: Validierungsergebnisse für die LC-MS Methode und die DIP-APCI-MS Methode zur Bestimmung von Cumarin in Zimtpulver nach Extraktion.

| | LC-MS | | DIP-APCI-MS | | | |
|--|-------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| | interner Standard | kein interner Standard | mittlere Intensität | | Fläche | |
| | | | interner Standard | kein interner Standard | interner Standard | kein interner Standard |
| Linearität R ² (0,1-10 mg/L) ^a | 0.9991 | 0.9995 | 0.9980 | 0.9998 | 0.9999 | 0.9978 |
| Wiederfindung [%] (100-5000 mg/kg) | 97 - 108 | 97 - 113 | 84 - 99 | 95 - 104 | 85 - 97 | 94 - 104 |
| Wiederfindung [%] (100 mg/kg) ^b | 108 | 113 | 84 | 95 | 85 | 94 |
| Wiederfindung [%] (500 mg/kg) ^b | 107 | 109 | 99 | 104 | 97 | 104 |
| Wiederfindung [%] (1000 mg/kg) ^b | 97 | 97 | 94 | 102 | 90 | 98 |
| Wiederfindung [%] (5000 mg/kg) ^b | 98 | 104 | 93 | 96 | 90 | 95 |
| Wiederholbarkeit RSD [%] innerhalb 1 Tag | 0.7 - 3.7 | 0.4 - 2.5 | 0.9 - 3.9 | 2.2 - 12.6 | 1.5 - 11.8 | 3.9 - 13.8 |
| Wiederholbarkeit RSD [%] an 2 Tagen | 2.0 - 3.7 | 8.7 - 13.8 | 1.8 - 3.1 | 2.9 - 9.9 | 2.1 - 8.9 | 4.3 - 10.4 |
| LOD [mg/kg] | 1.1 | - | - | - | 7.2 | - |
| LOQ [mg/kg] | 3.8 | - | - | - | 25.3 | - |

^a LC-MS: n = 6; DIP-APCI-MS: n = 4;^b LC-MS: n = 3; DIP-APCI-MS: n = 5.

Die Validierungsergebnisse zeigen eine zufriedenstellende Linearität sowohl der LC-MS, als auch der DIP-APCI-MS Analyse im untersuchten Konzentrationsbereich, selbst ohne Berücksichtigung des internen Standards bei der Datenauswertung. Auch die ermittelten Wiederfindungen liegen bei beiden Methoden in einem akzeptablen Bereich und es kann keine Abhängigkeit der ermittelten Wiederfindungen vom zugesetzten Cumarin Gehalt festgestellt werden. Interessanterweise werden bei der DIP-APCI-MS Analyse niedrigere Wiederfindungen

erzielt, wenn der interne Standard bei der Datenauswertung berücksichtigt wird. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das m/z -Signal von d_4 -Cumarin in den über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektren der Analyse von Ceylon-Zimtextrakten eine leicht erhöhte Abweichung vom theoretischen m/z -Verhältnis von d_4 -Cumarin zeigte. Dies könnte auf eine Überschätzung von d_4 -Cumarin durch den Einfluss eines massenspektrometrisch nicht vollständig aufgelösten Matrixbestandteils mit einem sehr ähnlichen m/z -Verhältnis hindeuten. Wie zu erwarten, ist die Wiederholbarkeit sowohl der LC-MS als auch der DIP-APCI-MS Analyse innerhalb eines Tages, und wenn der interne Standard bei der Datenauswertung berücksichtigt wird, höher. Hinsichtlich der Wiederholbarkeit der DIP-APCI-MS Analyse führt die Datenauswertung über die mittlere Intensität zu besseren Ergebnissen, als die Auswertung über die Fläche. Dies lässt sich durch die manuelle Integration erklären, die im Verlauf der Datenauswertung über die Fläche durchgeführt wird. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der DIP-APCI-MS Analyse konnte nur mittels Datenauswertung über die Fläche und nicht über die mittlere Intensität ermittelt werden, da das m/z -Signal von d_4 -Cumarin bei sehr geringen Konzentrationen im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum nicht aufgelöst war. Die ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenze der DIP-APCI-MS Analyse ist etwa siebenmal höher, als die ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenze der LC-MS Analyse. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der DIP-APCI-MS Analyse breite Signale über mehrere Minuten, anstelle der bei der LC-MS Analyse vorliegenden scharfen chromatographischen Peaks, erhalten werden. Auch die gewählte Methode der Datenauswertung der DIP-APCI-MS Analyse führt zu einer Erhöhung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Zudem erfolgte die Ionisation bei der LC-MS Analyse unter Verwendung von ESI, was ebenfalls einen Einfluss auf die ermittelte Nachweis- und Bestimmungsgrenze haben kann.

3.2.3.2 Quantifizierung von Cumarin in Zimtproben mittels DIP-APCI-MS und LC-MS nach Extraktion

Um die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Cumarin mittels LC-MS und DIP-APCI-MS, sowie die beiden Vorgehensweisen zur Datenauswertung der DIP-APCI-MS Analyse zu vergleichen, wurden zehn Zimtproben (5 Proben Ceylon-Zimt, 2 Proben Cassia-Zimt und 3 Proben ohne Angabe der botanischen Herkunft) extrahiert und analysiert ($n = 3$). Die Ergebnisse

der LC-MS und DIP-APCI-MS Analysen unter Verwendung von d_4 -Cumarin als interner Standard sind in Abbildung 42 graphisch dargestellt und in Tabelle 26 im Anhang zusammengefasst.

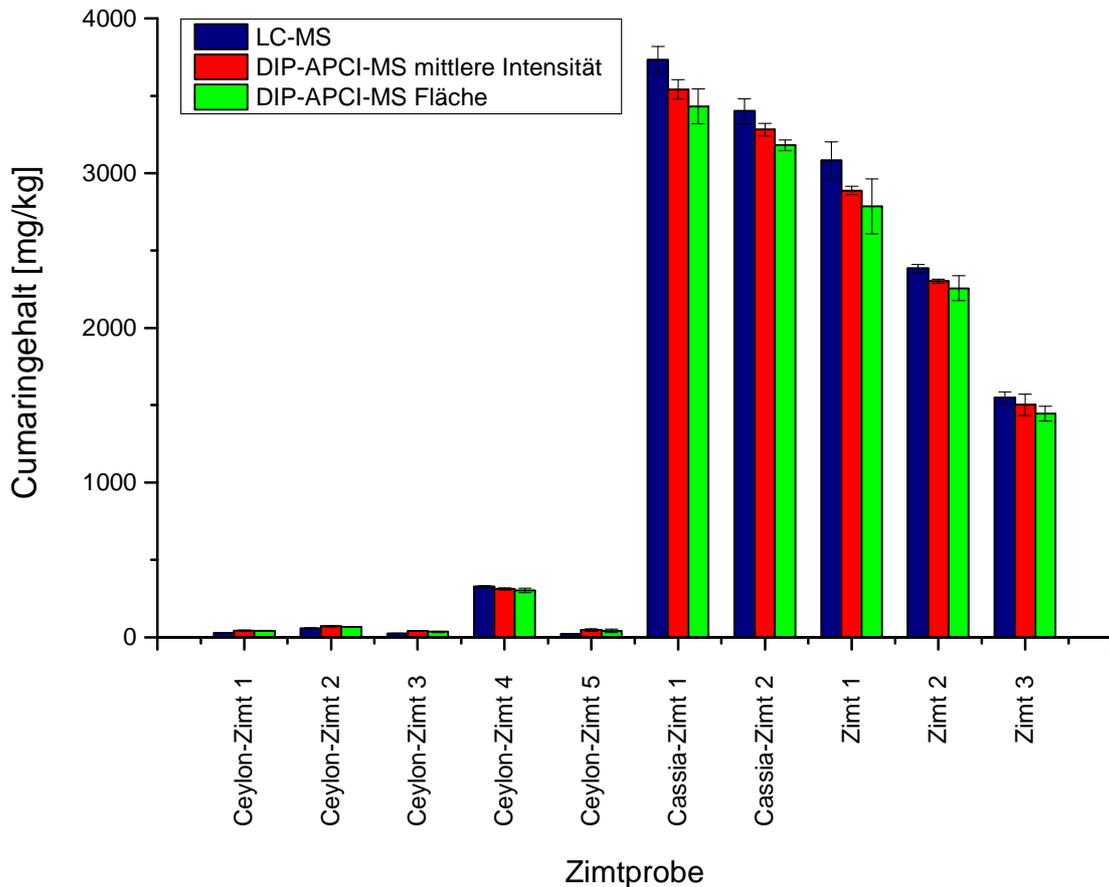


Abbildung 42: Cumarinegehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS (n = 3) unter Verwendung von d_4 -Cumarin als interner Standard; blau: LC-MS; rot: DIP-APCI-MS Datenauswertung über die mittlere Intensität; grün: DIP-APCI-MS Datenauswertung über die Fläche.

Unter Verwendung von d_4 -Cumarin als interner Standard werden mittels LC-MS und DIP-APCI-MS sehr vergleichbare Cumarinegehalte der einzelnen Zimtproben bestimmt. Bei hohen Cumarinegehalten werden mittels DIP-APCI-MS etwas geringere Gehalte ermittelt, als mittels LC-MS und die bei Datenauswertung über die mittlere Intensität ermittelten Gehalte liegen näher an den mittels LC-MS ermittelten Gehalten. Wie zu erwarten, sind die ermittelten

Cumaringehalte der Ceylon-Zimtproben deutlich niedriger, als die der Cassia-Zimtproben. Die Cumaringehalte der untersuchten Ceylon- und Cassia-Zimtproben liegen im nach Literaturangaben zu erwartenden Bereich. Aufgrund des ermittelten Cumaringehalts der untersuchten Zimtproben ohne Angabe der botanischen Herkunft ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Proben um Cassia-Zimt handelt.

Die Ergebnisse der LC-MS und DIP-APCI-MS Analysen ohne Verwendung eines internen Standards sind in Abbildung 43 graphisch dargestellt und in Tabelle 27 im Anhang zusammengefasst.

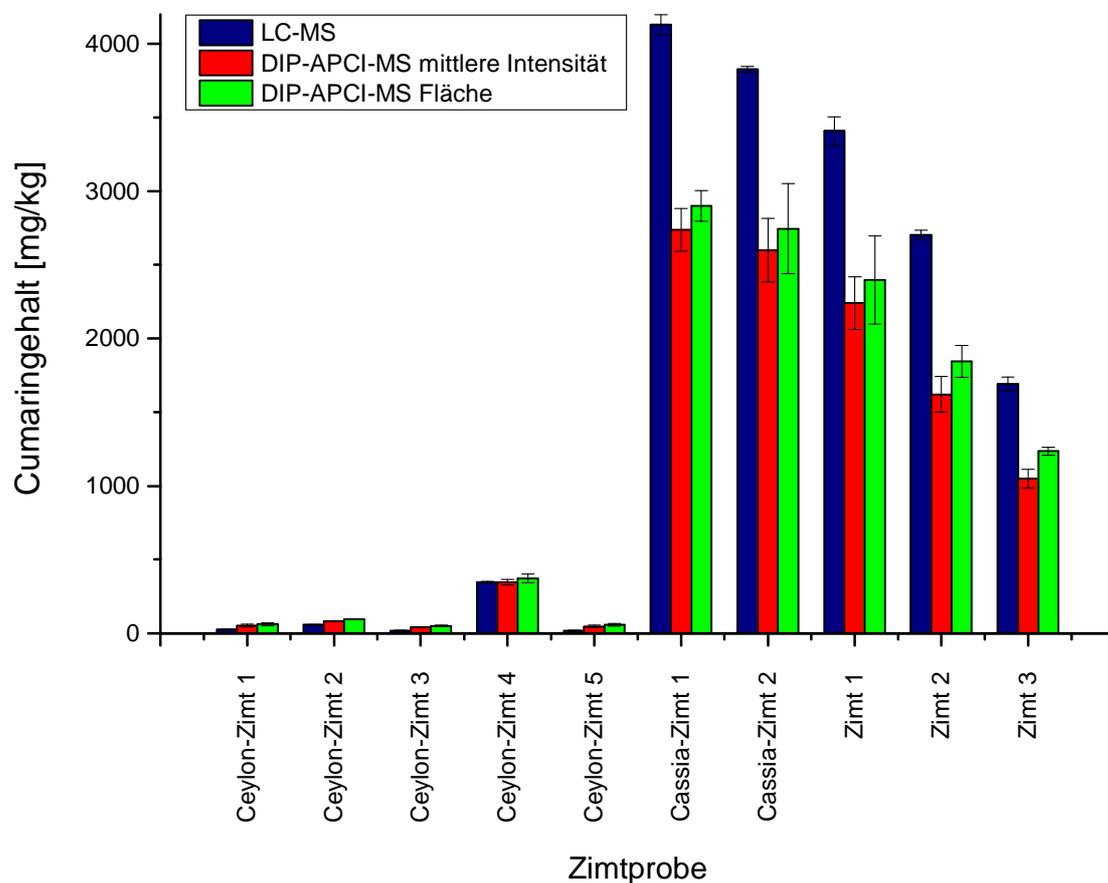


Abbildung 43: Cumaringehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS ($n = 3$) ohne Verwendung eines internen Standards; blau: LC-MS; rot: DIP-APCI-MS Datenauswertung über die mittlere Intensität; grün: DIP-APCI-MS Datenauswertung über die Fläche.

Wird kein interner Standard zur Datenauswertung verwendet, so werden hohe Cumaringehalte bei der Bestimmung mittels LC-MS überschätzt und bei der Bestimmung mittels DIP-APCI-MS unterschätzt. Dies zeigt, dass der Einsatz von d_4 -Cumarin als interner Standard bei beiden Methoden sinnvoll ist, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Bei geringen Cumaringehalten (Ceylon-Zimtproben) werden mittels DIP-APCI-MS unter Verwendung von d_4 -Cumarin als interner Standard etwas geringere Cumaringehalte bestimmt, als ohne Verwendung eines internen Standards zur Datenauswertung. Dies könnte, wie bereits beschrieben, in einer Überschätzung von d_4 -Cumarin durch den Einfluss eines massenspektrometrisch nicht vollständig aufgelösten Matrixbestandteils bei Ceylon-Zimtproben begründet sein.

3.2.3.3 Semiquantitative Bestimmung von Cumarin direkt aus Zimtpulver mittels DIP-APCI-MS

Zusätzlich zur Analyse in Form von Extrakten wurden ca. 0,1 mg der Zimtpulver-Proben direkt in die Probentiegel eingewogen und mittels DIP-APCI-MS analysiert. Abbildung 44 zeigt beispielhaft die Chronogramme der Analyse einer Ceylon-Zimtprobe und einer Cassia-Zimtprobe. Im Fall der Ceylon-Zimtprobe (Abbildung 44a) erreichte das m/z -Signal von Cumarin eine maximale Höhe von $9,4 \times 10^4$ counts und der TIC erreichte $6,7 \times 10^7$ counts. Die maximale Höhe des m/z -Signals von Cumarin betrug bei der Analyse der Cassia-Zimtprobe (Abbildung 44b) $1,3 \times 10^6$ counts und der TIC erreichte $5,8 \times 10^7$ counts.

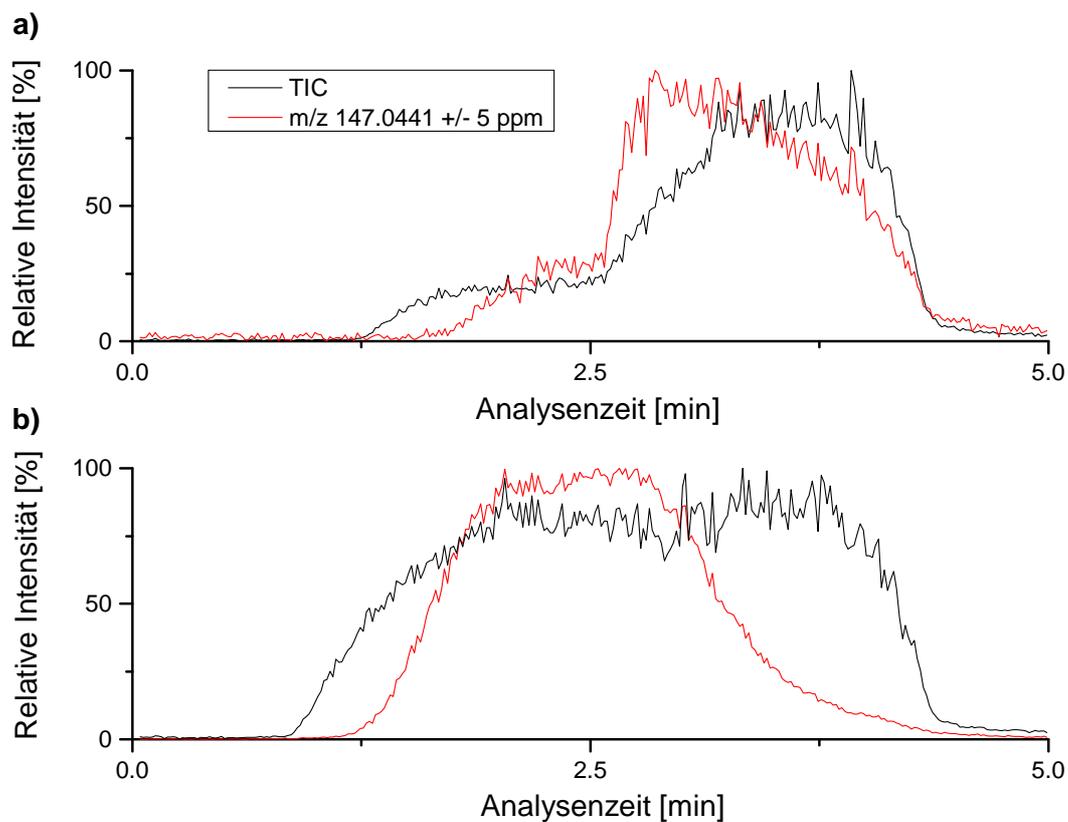


Abbildung 44: Chronogramm der direkten DIP-APCI-MS Analyse von Zimtpulver; schwarz: TIC; rot: EIC von Cumarin; (a) Ceylon-Zimt; (b) Cassia-Zimt.

In Abbildung 44 ist zu erkennen, dass, verglichen mit der Analyse von Zimtextrakten, höhere Temperaturen nötig sind, um das enthaltene Cumarin aus der Zimtmatrix freizusetzen. Die Cumarinegehalte der Zimtproben wurden aus der direkten DIP-APCI-MS Analyse der Zimtpulver und den zuvor analysierten Kalibrierlösungen ermittelt. Die resultierenden Cumarinegehalte der Zimtproben sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Es ist wichtig zu beachten, dass das m/z -Signal von Cumarin bei der direkten DIP-APCI-MS Analyse der Cassia-Zimtproben und der Zimtproben ohne Angabe der botanischen Herkunft Detektorsättigung erreichte.

Tabelle 7: Cumaringehalte der Zimtpulver bestimmt mittels direkter DIP-APCI-MS Analyse (n = 3) der Zimtpulver.

| Zimtprobe | DIP-APCI-MS Cumaringehalt [mg/kg] | |
|---------------|--------------------------------------|------------|
| | mittlere Intensität | Fläche |
| Ceylon-Zimt 1 | 88 ± 27 | 92 ± 28 |
| Ceylon-Zimt 2 | 130 ± 13 | 135 ± 13 |
| Ceylon-Zimt 3 | 146 ± 8 | 152 ± 8 |
| Ceylon-Zimt 4 | 409 ± 95 | 427 ± 95 |
| Ceylon-Zimt 5 | 151 ± 25 | 158 ± 26 |
| Cassia-Zimt 1 | 2399 ± 603 | 2512 ± 591 |
| Cassia-Zimt 2 | 2479 ± 176 | 2628 ± 186 |
| Zimt 1 | 2507 ± 74 | 2672 ± 79 |
| Zimt 2 | 1674 ± 233 | 1771 ± 249 |
| Zimt 3 | 1331 ± 112 | 1400 ± 103 |

Der Vergleich der mittels direkter DIP-APCI-MS Analyse der Zimtpulver ermittelten Cumaringehalte mit den Ergebnissen der Analysen der Zimtextrakte zeigt eine Überschätzung geringer Cumaringehalte und eine Unterschätzung hoher Cumaringehalte bei der direkten DIP-APCI-MS Analyse. Die Unterschätzung hoher Cumaringehalte könnte dadurch zu erklären sein, dass das m/z -Signal von Cumarin bei Analyse dieser Proben Detektorsättigung erreichte.

Der Einsatz eines internen Standards ist bei der direkten Analyse der Zimtpulver nicht möglich. Aus diesem Grund können durch direkte Analyse der Zimtpulver keine verlässlichen quantitativen Aussagen getroffen werden. Ein weiteres Problem der Gewinnung verlässlicher quantitativer Daten aus der direkten Analyse der Zimtpulver liegt in der sehr geringen Menge der Probe, die in die Probenziegel eingebracht werden kann, in Verbindung mit der natürlichen Probeninhomogenität. Auch wenn durch direkte Analyse der Zimtpulver keine quantitativen Aussagen über den Cumaringehalt getroffen werden können, ist die Gewinnung semiquantitativer Informationen möglich. Ein semiquantitatives Screening von Lebensmittelproben könnte eingesetzt werden, um die Anzahl der Proben, welche extrahiert und

quantitativ analysiert werden müssen, zu reduzieren und so zu Zeit- und Lösungsmittelleinsparungen führen.

3.2.3.4 Bestimmung von Cumarin in Waldmeister-Getränken und Kaugummi mit Zimtgeschmack mittels DIP-APCI-MS und LC-MS

Ein Likör sowie ein Erfrischungsgetränk mit Waldmeistergeschmack wurden nach Zusatz von d_4 -Cumarin als interner Standard und Verdünnung mittels LC-MS und DIP-APCI-MS analysiert. Ein Kaugummi mit Zimtgeschmack wurde nach Zusatz von d_4 -Cumarin extrahiert und ebenfalls unter Verwendung beider Methoden analysiert.

Mittels LC-MS konnte im untersuchten Likör mit Waldmeistergeschmack kein Cumarin nachgewiesen werden. Im untersuchten Erfrischungsgetränk mit Waldmeistergeschmack und dem Extrakt des Kaugummis mit Zimtgeschmack wurde Cumarin detektiert, jedoch nicht quantifiziert, da die Signale unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Werden die DIP-APCI-MS Analysen der Getränke mit Waldmeistergeschmack und des Extrakts des Kaugummis mit Zimtgeschmack analog zu den Analysen der Zimtextrikte ausgewertet, so würden signifikante Cumarinegehalte in diesen Proben ermittelt. Abbildung 45 zeigt beispielhaft ein Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse und ein Chromatogramm der LC-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack.

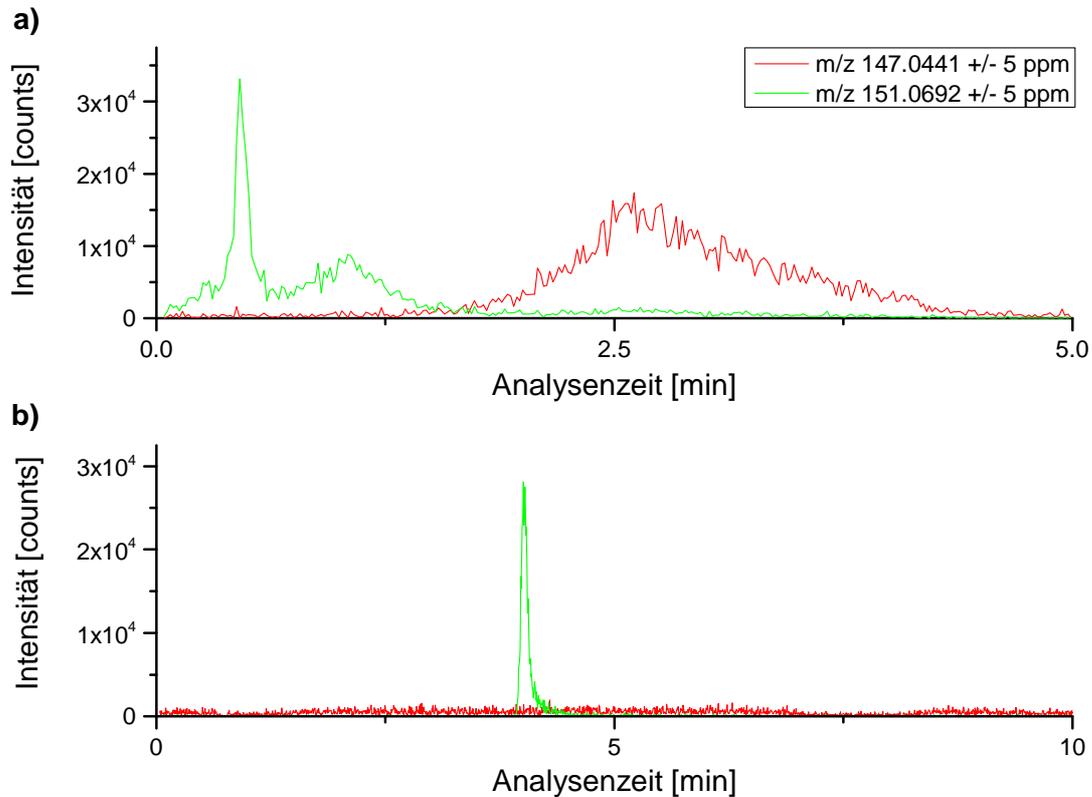


Abbildung 45: (a) Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack; (b) Chromatogramm der LC-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack; rot: EIC von Cumarin; grün: EIC von d_4 -Cumarin; Likör mit Waldmeistergeschmack im Verhältnis 1:9 verdünnt mit Methanol/Wasser (80/20; v/v), Zusatz von 0,9 mg/L d_4 -Cumarin.

Im Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack (Abbildung 45a) ist zu erkennen, dass die m/z -Spur von Cumarin einen verzögerten Intensitätsanstieg, verglichen mit der m/z -Spur von d_4 -Cumarin, zeigt. Analoges Verhalten wurde bei der DIP-APCI-MS Analyse des Erfrischungsgetränks mit Waldmeistergeschmack und des Extrakts des Kaugummis mit Zimtgeschmack beobachtet. Die Tatsache, dass sich die m/z -Spuren von Cumarin und d_4 -Cumarin unterschiedlich verhalten, lässt darauf schließen, dass sich der verspätete Intensitätsanstieg der m/z -Spur von Cumarin nicht auf eine Verzögerung der Verdampfung von Cumarin durch Matrixbestandteile zurückführen lässt. Der verspätete Intensitätsanstieg der m/z -Spur von Cumarin könnte durch die Verdampfung einer isobaren, in der Probe enthaltenen Verbindung zustande kommen. Vorausgesetzt eine solche isobare

Verbindung wird unter den bei der LC-MS Analyse verwendeten Bedingungen von der HPLC-Säule eluiert und ist mittels ESI ionisierbar, sollte diese Verbindung auch im LC-MS Chromatogramm zu erkennen sein, was jedoch nicht der Fall ist (vgl. Abbildung 45b). Eine weitere mögliche Erklärung für den verspäteten Intensitätsanstieg der m/z -Spur von Cumarin in den DIP-APCI-MS Analysen der Getränke mit Waldmeistergeschmack und des Extrakts des Kaugummi mit Zimtgeschmack wäre die Bildung von Cumarin oder eines isobaren Artefakts aus Matrixbestandteilen durch die während der DIP-APCI-MS Analyse auf die Probe einwirkende hohe Temperatur.

Ceylon- und Cassia-Zimt enthalten Cumarin hauptsächlich in freier Form, wogegen Cumarin in anderen Pflanzen, beispielsweise in Waldmeister, zu großen Teilen in Form eines glucosylierten Vorläufers vorliegt und nach Zerstörung der Zellstruktur durch Enzymeinwirkung freigesetzt wird [256,258]. Ein in einigen Pflanzen vorkommender glucosylierter Vorläufer von Cumarin ist 2-Hydroxyzimtsäure- β -D-glucopyranosid, welches biosynthetisch aus Phenylalanin gebildet wird [258,259].

Um zu untersuchen, ob der biosynthetische Vorläufer von Cumarin auch der Vorläufer des während der DIP-APCI-MS Analyse gebildeten Artefakts sein könnte, wurden die m/z -Spuren von 2-Hydroxyzimtsäure- β -D-glucopyranosid und des möglichen Fragmentierungsproduktes 2-Hydroxyzimtsäure aus den LC-MS Chromatogrammen und den DIP-APCI-MS Chromatogrammen extrahiert (Generierung der EICs). 2-Hydroxyzimtsäure- β -D-glucopyranosid wurde mittels LC-MS (Elektrosprayionisation im Positiv- und Negativ-Modus) weder in den Getränken mit Waldmeistergeschmack, noch im Extrakt des Kaugummi mit Zimtgeschmack detektiert. In der LC-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack trat ein Peak geringer Intensität auf, welcher 2-Hydroxyzimtsäure zuzuordnen sein könnte. Im Erfrischungsgetränk mit Waldmeistergeschmack und dem Extrakt des Kaugummi mit Zimtgeschmack wurde 2-Hydroxyzimtsäure mittels LC-MS nicht detektiert. Mittels DIP-APCI-MS wurde sowohl in den Getränken mit Waldmeistergeschmack, als auch im Extrakt des Kaugummi mit Zimtgeschmack, ein m/z -Signal (m/z 165,0546) detektiert, bei dem es sich um 2-Hydroxyzimtsäure handeln könnte. Das Signal mit m/z 165,0546 zeigte einen zum Signal des Artefakts mit dem m/z von Cumarin (m/z 147,0441) identischen Anstieg der Signalintensität mit dem Temperaturprogramm

der Schubstange. Dies legt nahe, dass es sich bei m/z 147,0441 um ein Fragmentierungsprodukt von m/z 165,0546 handeln könnte.

Da 2-Hydroxyzimtsäure nicht verfügbar war, wurde stattdessen 4-Hydroxyzimtsäure mittels DIP-APCI-MS und DIP-APCI-MS/MS analysiert. Abbildung 46 zeigt die DIP-APCI-MS Analysen von 4-Hydroxyzimtsäure, dem Likör mit Waldmeistergeschmack und dem Likör mit Waldmeistergeschmack versetzt mit 4-Hydroxyzimtsäure.

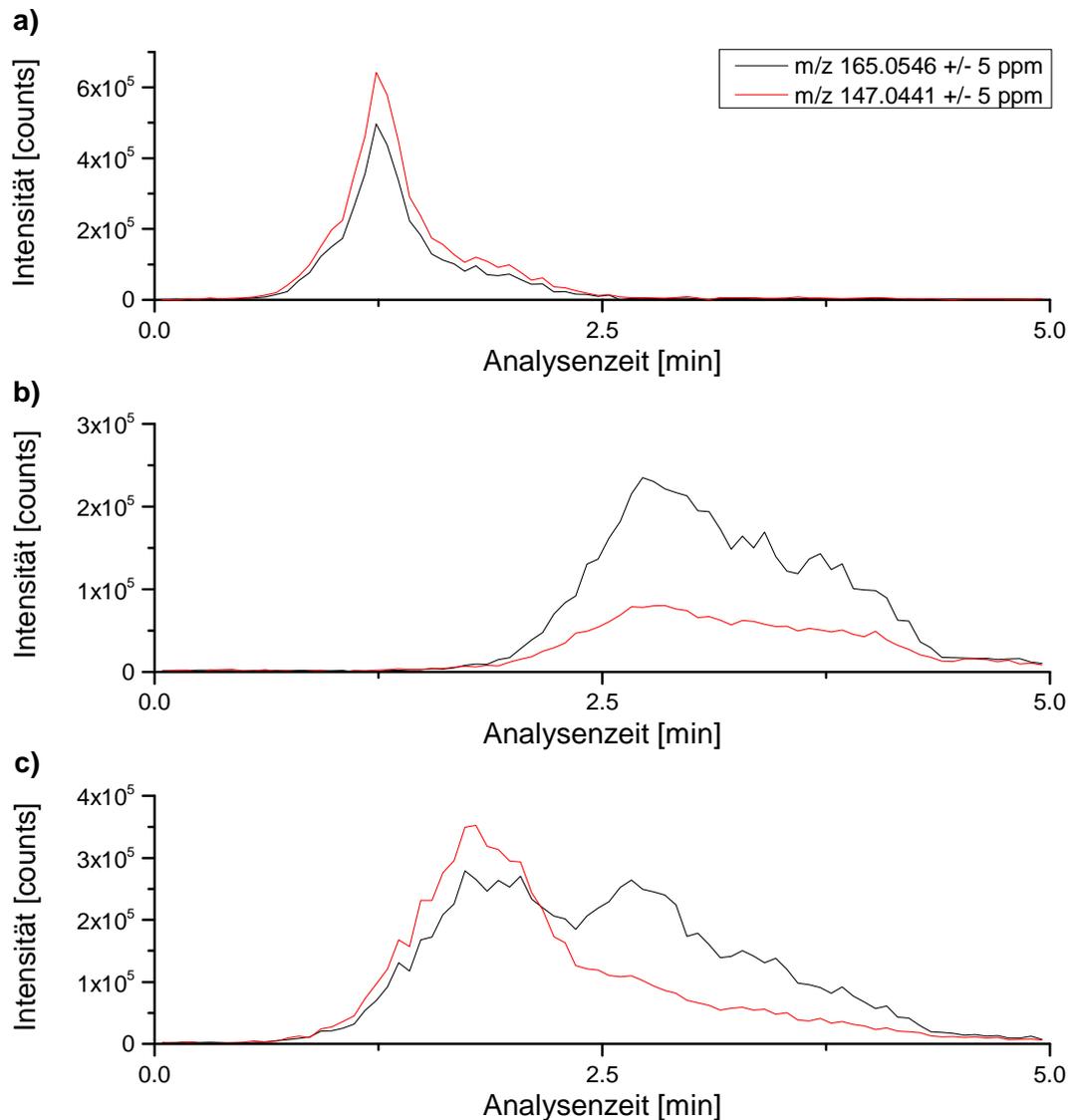


Abbildung 46: DIP-APCI-MS Analyse von 4-Hydroxyzimtsäure und dem Likör mit Waldmeistergeschmack; schwarz: EIC von m/z 165,0546 (z.B. 4-Hydroxyzimtsäure); rot: EIC von m/z 147,0441 (z.B. Cumarin); (a) 4-Hydroxyzimtsäure; (b) Likör mit Waldmeistergeschmack; (c) Likör mit Waldmeistergeschmack versetzt mit 4-Hydroxyzimtsäure.

Wie in Abbildung 46a zu erkennen, unterliegt 4-Hydroxyzimtsäure (m/z 165,0546) während der DIP-APCI-MS Analyse einer Fragmentierung in der Ionenquelle zu m/z 147,0441, höchstwahrscheinlich durch die Abspaltung von Wasser. Die resultierenden Intensitäten von

m/z 165,0546 und m/z 147,0441 sind nahezu identisch. In der DIP-APCI-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack (Abbildung 46b) zeigen m/z 165,0546 und m/z 147,0441, wie bereits beschrieben, identische Anstiege der Signalintensität mit dem Temperaturprogramm. Der Vergleich von Abbildung 46a und b zeigt, dass 4-Hydroxymzimtsäure bei geringerer Temperatur der Schubstange verdampft wird, als m/z 165,0546 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack. Die Fragmentierung von m/z 165,0546 zu m/z 147,0441 in der Ionenquelle erreicht bei der Analyse von 4-Hydroxymzimtsäure und dem Likör mit Waldmeistergeschmack unterschiedliche Ausmaße. Die DIP-APCI-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack versetzt mit 4-Hydroxymzimtsäure (Abbildung 46c) bestätigt, dass 4-Hydroxymzimtsäure nicht der Vorläufer des Artefaktes mit m/z 147,0441 im Likör mit Waldmeistergeschmack sein kann, da zwei separate Verdampfungsmaxima von 4-Hydroxymzimtsäure und m/z 165,0546 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack resultieren. Verglichen mit der Analyse von reiner 4-Hydroxymzimtsäure wird die Verdampfung durch die Matrix des Likörs mit Waldmeistergeschmack verzögert.

Im MS/MS-Experiment fragmentieren sowohl 4-Hydroxymzimtsäure, als auch m/z 165,0546 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack zu m/z 147 und m/z 119. Abbildung 47 zeigt die MS/MS-Spektren von 4-Hydroxymzimtsäure (Abbildung 47a) und m/z 165 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack (Abbildung 47b), analysiert mittels DIP-APCI-MS/MS. Das Vorhandensein zusätzlicher m/z -Signale im MS/MS-Spektrum von m/z 165 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack lässt sich wahrscheinlich durch die Wahl eines Isolationsfensters von 4 m/z zur Isolation des *Precursor*-Ions und vorhandene Matrixbestandteile erklären.

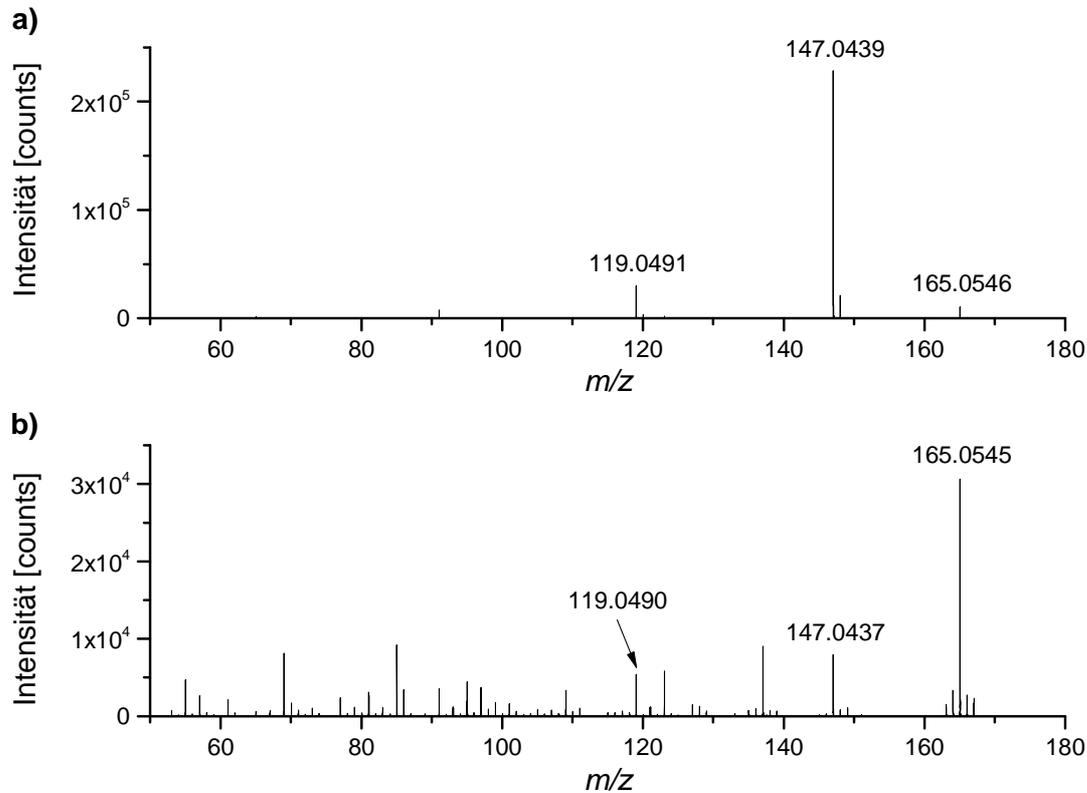


Abbildung 47: DIP-APCI-MS/MS Analyse von 4-Hydroxyzimtsäure und dem Likör mit Waldmeistergeschmack; (a) MS/MS-Spektrum von m/z 165 der 4-Hydroxyzimtsäure; (b) MS/MS-Spektrum von m/z 165 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack.

Das ähnliche Fragmentierungsverhalten von 4-Hydroxyzimtsäure und m/z 165,0546 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack, in Verbindung mit der höheren Temperatur, die nötig ist, um m/z 165,0546 aus dem Likör mit Waldmeistergeschmack freizusetzen, deutet darauf hin, dass es sich bei dem in dem Likör mit Waldmeistergeschmack enthaltenen Vorläufer von m/z 147,0441 um eine Substanz mit höherem Molekulargewicht handelt, die Hydroxyzimtsäure enthält und durch die hohe Temperatur der Schubstange via m/z 165,0546 zu m/z 147,0441 fragmentiert. Die Analyse des Erfrischungsgetränks mit Waldmeistergeschmack (mit und ohne Zusatz von 4-Hydroxyzimtsäure) mittels DIP-APCI-MS und -MS/MS führte zu analogen Schlussfolgerungen. In der ambienten Massenspektrometrie muss möglichen spektralen Interferenzen durch isobare Substanzen [110], die in der Probe enthalten sein oder, besonders bei Einsatz thermischer

Desorption, während der Analyse gebildet werden können, besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Diese Limitierung der ambienten Massenspektrometrie wurde auch während der Quantifizierung von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in Honig mittels DART-MS deutlich [126]. Bedingt durch den Abbau von Kohlenhydraten der Honigmatrix zu HMF durch die bei der DART üblicherweise eingesetzten hohen Temperaturen, war eine Quantifizierung von HMF unmöglich. Die Analyse der Getränke mit Waldmeistergeschmack und des Extraktes des Kaugummis mit Zimtgeschmack mittels DIP-APCI-MS und LC-MS zeigen, dass auch bei Verwendung eines hochauflösenden Q-TOF MS spektrale Interferenzen nicht ausgeschlossen werden können. Durch das Fehlen der Retentionszeit als Identifizierungsmerkmal, kann das Vorhandensein oder die Bildung isobarer Substanzen in der ambienten Massenspektrometrie leicht zu falschen Identifizierungen und Quantifizierungsergebnissen führen. Die temperaturprogrammierte Verdampfung, der die Proben während der DIP-APCI-MS Analyse unterliegen, führt, wie bereits gezeigt, zu einer gewissen Auftrennung der Probenbestandteile nach ihren Dampfdrücken. Insbesondere in Kombination mit dem Einsatz stabilisotopenmarkierter Analytanaloge als interne Standards hilft die temperaturprogrammierte Verdampfung dabei, spektrale Interferenzen zu erkennen und reduziert somit das Risiko, falsche Quantifizierungsergebnisse durch das Vorhandensein oder die Bildung isobarer Substanzen zu erhalten.

3.3 Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein Ion Trap-Massenspektrometer

Die Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein Ion Trap-Massenspektrometer (Bruker AmaZon speed) ermöglicht die Durchführung von MS^n -Experimenten, beispielsweise zur Strukturaufklärung, in Kombination mit der direkten Analyse fester und flüssiger Proben. Zur Konstruktion der DIP-APCI-Ionenquelle für das Ion Trap-MS wurde der Querkörper einer zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelten Mehrzweck-Ionenquelle (*Multipurpose ion source*, MPIS) [260] verwendet. Bei dem Querkörper handelt es sich um eine rechteckige Aluminium-Kammer mit sechs Anschlussöffnungen. Der zur Kopplung der DIP an den Querkörper verwendete Flansch entspricht dem bereits bei der DIP-APCI-Ionenquelle für das Q-TOF-MS verwendeten

Flansch. Auch die DIP-APCI-Ionenquelle für das Ion Trap-MS nutzt den Verdampfer und die Korona-Nadel einer kommerziell erhältlichen APCI-Ionenquelle dieses Massenspektrometers.

Abbildung 48 zeigt den Aufbau der DIP-APCI-Ionenquelle für das Ion Trap-MS.

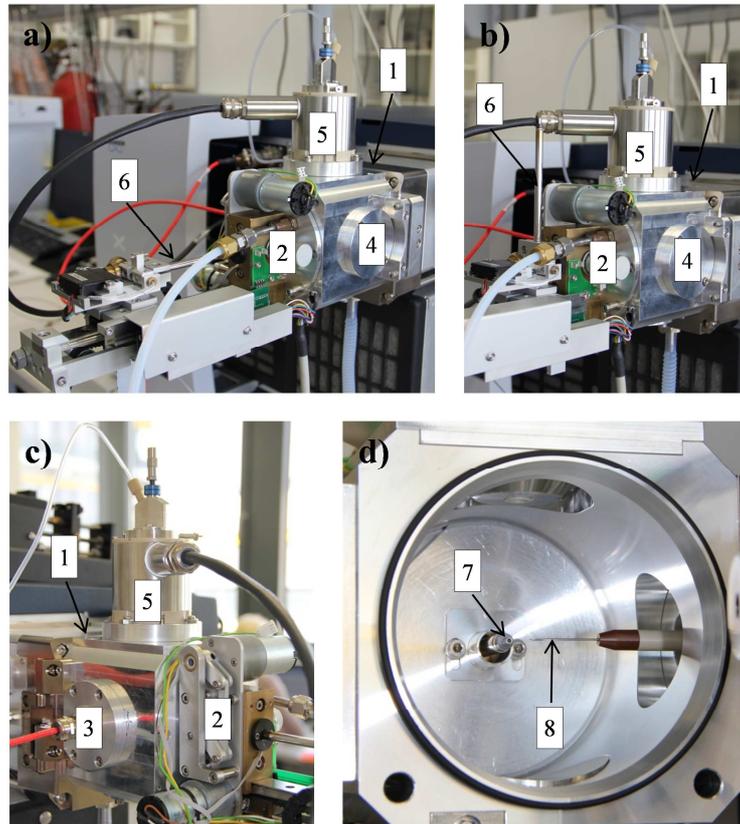


Abbildung 48: DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an Bruker amaZon speed Ion Trap-MS; (a) Schubstange in Ruheposition; (b) Schubstange in Ladeposition; (c) Quellkörper mit Schubstange; (d) Position der Probenspitze relativ zur Korona-Nadel; (1) Anschluss der Ionenquelle an das MS; (2) Anschluss für die DIP; (3) Anschluss der Korona-Nadel; (4) verschlossener Anschluss; (5) Verdampfer; (6) Schubstange; (7) Probenspitze; (8) Korona-Nadel.

Anschluss 1 in Abbildung 48 entspricht dem Anschluss der Bruker Apollo Ionenquellen. Dies ermöglicht die Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an verschiedene Massenspektrometer von Bruker. Über Anschluss 2 wurde die DIP an den Quellkörper gekoppelt. Anschluss 3 trägt die Korona-Nadel und Anschluss 5 den Verdampfer einer APCI-Quelle von Bruker. Anschluss 4 ist verschlossen und kann in Zukunft beispielsweise genutzt werden, um eine VUV-Lampe anzubringen und APPI durchzuführen.

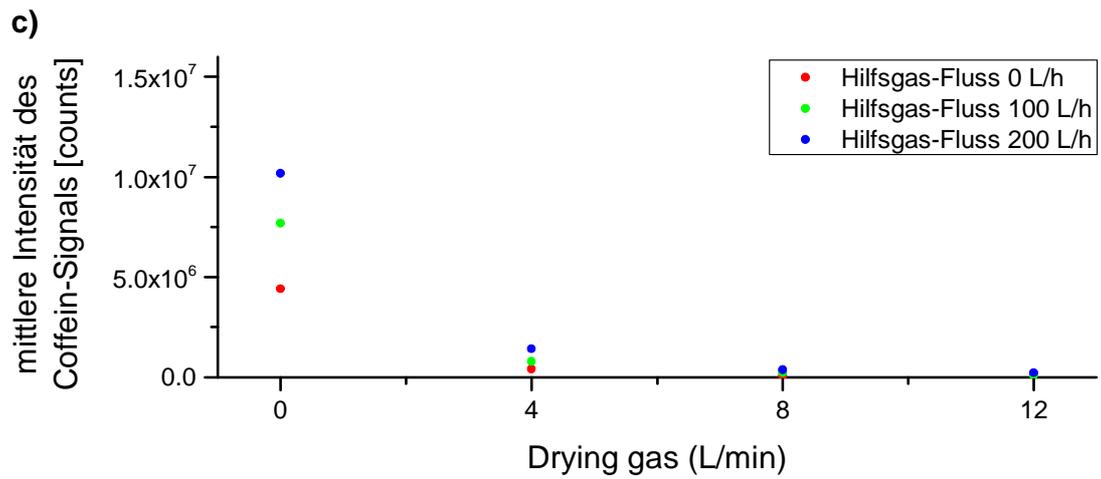
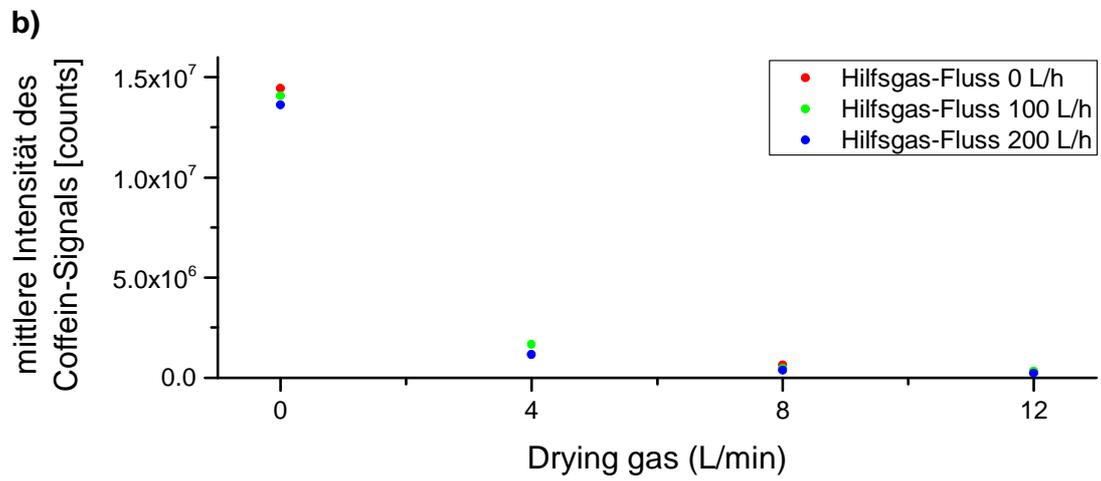
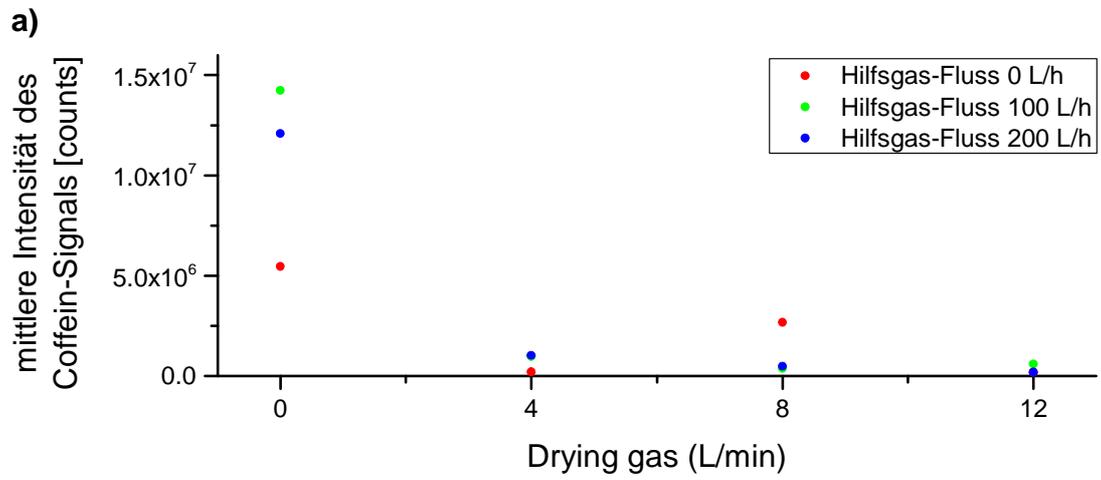
Die in Kapitel 3.3 beschriebenen Analysen wurden unter Verwendung des Bruker Daltonik amaZon speed Ion Trap-Massenspektrometers in Kopplung mit der DIP-APCI-Ionenquelle durchgeführt. Die optimierten Geräteeinstellungen zur DIP-APCI-MS Analyse sind in Kapitel 5.6 beschrieben. Im Verlauf der Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle verwendete abweichende Geräteeinstellungen sind in Kapitel 3.3.1 angegeben. Die Herstellung von verwendeten Standardlösungen und die eingesetzte Probenvorbereitung sind in Kapitel 5.4 beschrieben.

Teile der in den Kapiteln 3.3.1 (Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle) und 3.3.2 (Zerstörungsfreie Analyse von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs) beschriebenen Ergebnisse wurden bereits publiziert (Krieger S, Schmitz OJ (2014) Non-destructive plasticizer screening using a direct inlet probe-atmospheric pressure chemical ionization source and ion trap mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28:1862-1870).

3.3.1 Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle

Die Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Ion Trap-MS wurde unter Verwendung von Coffein bei Ionisation im Positiv-Modus durchgeführt. Der erste Schritt der Optimierung bestand in der Untersuchung des Einflusses des Hilfsgas (N₂)-Flusses, des *Drying gas*-Flusses und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle auf die Detektion von Coffein. Der Hilfsgas-Fluss wurde zwischen 0 und 250 L/h und der *Drying gas*-Fluss im Bereich von 0,0-12 L/min variiert. Die Position der Probenspitze wurde zwischen einem Abstand von ca. 10 mm und einem Abstand von ca. 40 mm von der Korona-Nadel gewählt. Bei einem Abstand von ca. 40 mm von der Korona-Nadel befand sich die Probenspitze etwa 1 cm innerhalb des Metallzylinders, durch den die Schubstange in die Ionenquelle eingebracht wird (vgl. Abbildung 11). Die Optimierung der Gasflüsse und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle erfolgte sowohl „manuell“ durch Variation eines Parameters bei Konstanthalten der anderen Parameter, als auch unter Verwendung der statistischen Versuchsplanung (*Design of Experiments*, DoE). Zu jeder Analyse wurde 1 µL einer Coffein-Lösung der Konzentration 100 mg/L in Dichlormethan in einen in der Probenaufnahme für feste Proben befindlichen Probentiegel oder in die Probenaufnahme für flüssige Proben injiziert.

Zur manuellen Optimierung der Gasflüsse und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle wurde der Hilfsgas-Fluss auf drei Stufen (0, 100 und 200 L/h), der *Drying gas*-Fluss auf vier Stufen (0, 4, 8 und 12 L/min) und die Position der Probenspitze auf vier Stufen (10, 20, 30 und 40 mm Abstand von der Korona-Nadel) variiert. Der *Nebulizer*-Druck war auf 0 psi eingestellt und die maximale Akkumulationszeit betrug 200 ms. Abbildung 49 zeigt den Einfluss der Gasflüsse und der Position der Probenspitze auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals (Signalhöhe im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum).



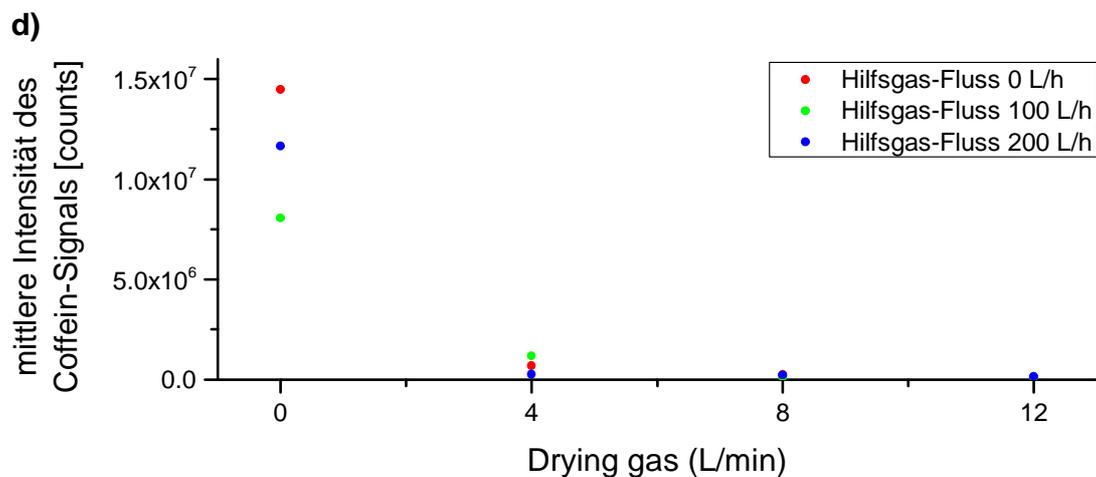


Abbildung 49: Einfluss des Hilfsgas- und des *Drying gas*-Flusses sowie der Position der Probenspitze auf die Detektion von Coffein; (a) Probenspitze 40 mm von der Korona-Nadel; (b) Probenspitze 30 mm von der Korona-Nadel; (c) Probenspitze 20 mm von der Korona-Nadel; (d) Probenspitze 10 mm von der Korona-Nadel.

In Abbildung 49 ist zu erkennen, dass der *Drying gas*-Fluss den größten Einfluss auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals aufweist. Die höchsten Signalintensitäten werden bei ausgeschaltetem *Drying gas* erzielt und eine Erhöhung des *Drying gas*-Flusses führt, wie zu erwarten und bereits im Fall der DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Q-TOF-MS beobachtet, zu einer Abnahme der Signalintensität. Oberhalb eines *Drying gas*-Flusses von 4 L/min tritt nur noch eine geringfügige Abnahme der Signalintensität mit steigendem *Drying gas*-Fluss auf. Hinsichtlich des Einflusses des Hilfsgas-Flusses und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals ist aus der manuellen Optimierung kein eindeutiger Trend zu erkennen. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass mit allen Parameterkombinationen lediglich eine Einfachanalyse durchgeführt wurde und mögliche Schwankungen der Intensität des Coffein-Signals zwischen einzelnen Analysen den Einfluss des Hilfsgas-Flusses und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle überdecken können.

Aufgrund der großen Anzahl der durchzuführenden Analysen ist die manuelle Optimierung der Gasflüsse und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle relativ umständlich. Zur Vereinfachung der Optimierung wurde ein statistischer Versuchsplan entwickelt, welcher aufzeigen soll, welche Parameter einen signifikanten Einfluss auf die Intensität des detektierten

Coffein-Signals aufweisen und wie sich die Parameter gegenseitig beeinflussen. Da der Einfluss von lediglich drei Parametern, Hilfsgas-Fluss, *Drying gas*-Fluss und Position der Probenspitze in der Ionenquelle, untersucht werden sollte, wurde ein *full factorial design* (vollständiger zweistufiger Versuchsplan) gewählt. Hierbei werden die Minimal- und Maximaleinstellungen aller Parameter in allen Kombinationen analysiert. Zusätzlich wird ein *center point* analysiert, bei dem alle Parameter mittlere Einstellungen aufweisen. Zur Erhöhung der Verlässlichkeit der Analysen der einzelnen Parameterkombinationen und um Aussagen über die Reproduzierbarkeit treffen zu können, wurden alle Analysen in Dreifachanalyse durchgeführt. Der *center point* wurde fünffach analysiert. Um systematische Fehler auszugleichen, wurden die Analysen des Versuchsplans in zufälliger Reihenfolge bearbeitet. Die Auswertung des Versuchsplans erfolgte durch Varianzanalyse (*Analysis of variance*, ANOVA), was eine Aussage darüber ermöglicht, welche Parameter einen hohen Einfluss auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals haben. Zur Optimierung der Gasflüsse und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung war der *Nebulizer*-Druck auf 30 psi eingestellt und die maximale Akkumulationszeit betrug 100 ms.

Die Varianzanalyse des bearbeiteten Versuchsplans zeigte, dass alle drei untersuchten Parameter einen signifikanten Einfluss auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals besitzen, wobei der Einfluss des *Drying gas*-Flusses am größten ist. Zusätzlich treten signifikante Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Parametern auf. Abbildung 50 stellt den Einfluss des *Drying gas*-Flusses, des Hilfsgas-Flusses und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals (Signalhöhe im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum) in Form einer *Response surface* graphisch dar.

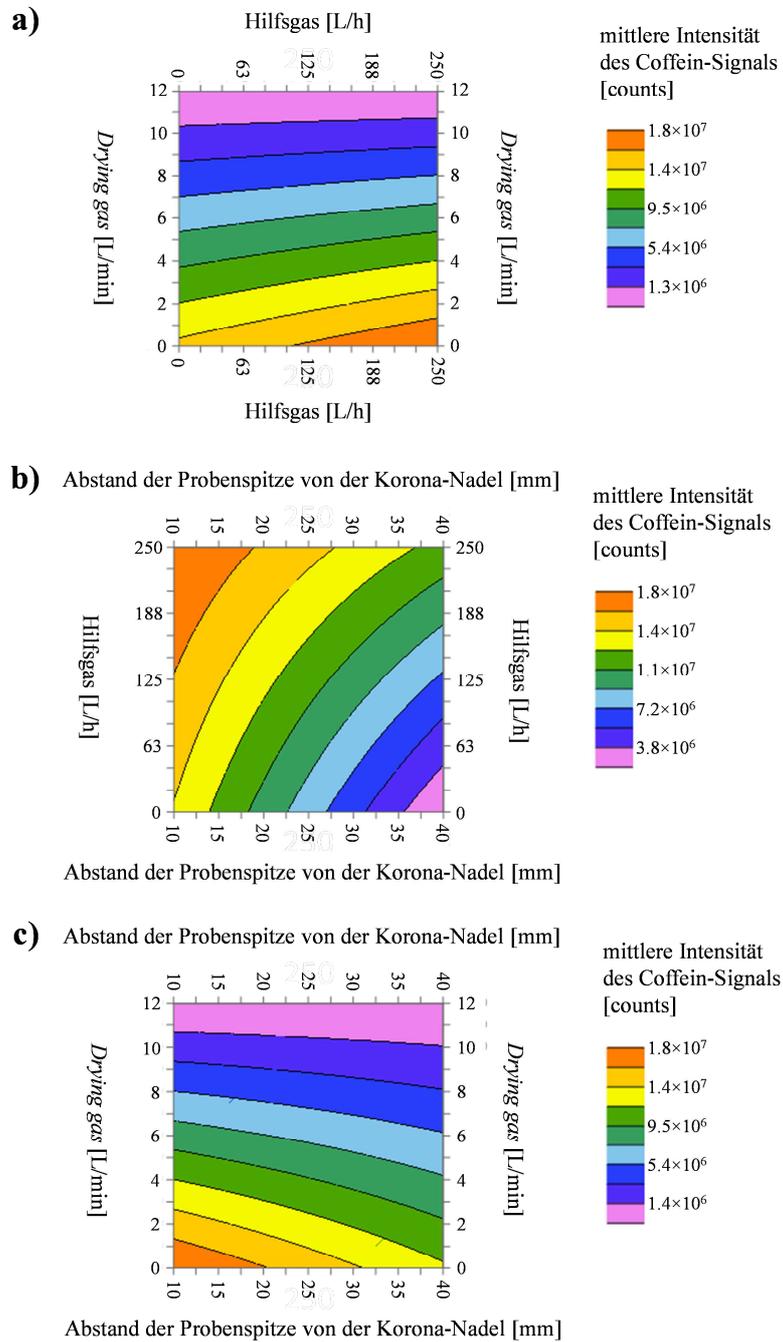


Abbildung 50: Einfluss der Gasflüsse und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle auf die Detektion von Coffein; (a) Hilfsgas-Fluss und *Drying gas*-Fluss (Probenspitze 10 mm entfernt von Korona-Nadel); (b) Abstand der Probenspitze von der Korona-Nadel und Hilfsgas-Fluss (0 L/min *Drying gas*-Fluss); (c) Abstand der Probenspitze von der Korona-Nadel und *Drying gas*-Fluss (250 L/h Hilfsgas-Fluss).

Wie in Abbildung 50 zu erkennen ist, wird die höchste Intensität des Coffein-Signals bei ausgeschaltetem *Drying gas*, einem Hilfgas-Fluss von 250 L/h und einem Abstand der Probenspitze von der Korona-Nadel von 10 mm erreicht. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Intensität des Coffein-Signals (Signalhöhe im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum) wurden bei ausgeschaltetem *Drying gas* zufriedenstellende Werte im Bereich von 2,3-8,3 % RSD (n = 3) erreicht. Bei einem *Drying gas*-Fluss von 6,0 L/min (*center point*) bzw. 12,0 L/min wurde nur in Kombination mit einem Hilfgas-Fluss von 250 L/h und einem Abstand von 10 mm der Probenspitze von der Korona-Nadel eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit (6,3 % RSD) erzielt. Bei anderen Kombinationen war die Reproduzierbarkeit mit 20,3-43,7 % RSD nicht zufriedenstellend. Die Reproduzierbarkeiten der einzelnen Analysen sind in Tabelle 28 im Anhang zusammengefasst.

Durch das Ausschalten des *Drying gas* wird eine Kontamination des Massenspektrometers riskiert, da beispielsweise partikuläre Verunreinigungen nicht vom Einlass des Massenspektrometers wegtransportiert werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss eines geringen *Drying gas*-Flusses auf die Detektion von Coffein (100 mg/L in Dichlormethan) bei einem Hilfgas-Fluss von 250 L/h und einem Abstand der Probenspitze von 10 mm von der Korona-Nadel untersucht. Verglichen mit ausgeschaltetem *Drying gas* führt ein *Drying gas*-Fluss von 1,3 L/min (1,3 L/min ist der minimale *Drying gas*-Fluss, welchen das Massenspektrometer regeln kann) zu einer Reduktion der Intensität des Coffein-Signals um einen Faktor von 1,4 und ein *Drying gas*-Fluss von 2,0 L/min reduziert die Intensität des Coffein-Signals um einen Faktor von 4,5 (vgl. Tabelle 29 im Anhang). Um eine Kontamination des Massenspektrometers zu verhindern, wurde eine Reduktion der Signalintensität um einen Faktor von 1,4 akzeptiert und im Folgenden ein *Drying gas*-Fluss von 1,3 L/min verwendet.

Im Unterschied zur DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Q-TOF-MS gelangt bei der DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Ion Trap-MS üblicherweise kein Lösungsmittel in die Ionenquelle, da im Fall des Ion Trap-MS keine Referenzlösung zur internen Kalibrierung der *m/z*-Achse eingebracht wird. Zum Test, ob durch Lösungsmittelinfusion eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Detektion erzielt werden kann, wurden Methanol, Methanol/Wasser (50/50; v/v) und Wasser (jeweils 10 µL/min) über den Verdampfer in die Ionenquelle eingebracht und der Einfluss auf die Detektion von Coffein (100 mg/L in Dichlormethan) unter optimierten

Bedingungen der Gasflüsse und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle untersucht. Eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Detektion ist beispielsweise durch die Infusion von Wasser und die Bereitstellung einer größeren Menge Wasserdampf zur Bildung geladener Wassercluster denkbar. Neben der Lösungsmittelinfusion wurde der Einfluss der Temperatur des Verdampfers (ohne Lösungsmittelinfusion) untersucht.

Wie bereits im Fall der Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle beobachtet, führt das Beheizen des Verdampfers zu einer Erhöhung der Intensität des detektierten Coffein-Signals. Durch Lösungsmittelinfusion konnte keine weitere Steigerung der Intensität des Coffein-Signals erreicht werden (vgl. Abbildung 115 im Anhang).

Um auch die Möglichkeit eines Einsatzes der DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Ion Trap-MS zur quantitativen Analyse zu demonstrieren, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Detektion von Coffein unter optimierten Bedingungen untersucht. Abbildung 51 zeigt die lineare Abhängigkeit der Intensität des Coffein-Signals (Signalhöhe im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum) von der Konzentration im Bereich von 1,0-100 mg Coffein/L. Je 1 μL der Coffein-Lösungen in Methanol wurden je dreimal in die Probentiegel injiziert. Die relativen Standardabweichungen der Dreifachanalysen der einzelnen Coffein-Lösungen lagen im Bereich von 1,1-5,9 %.

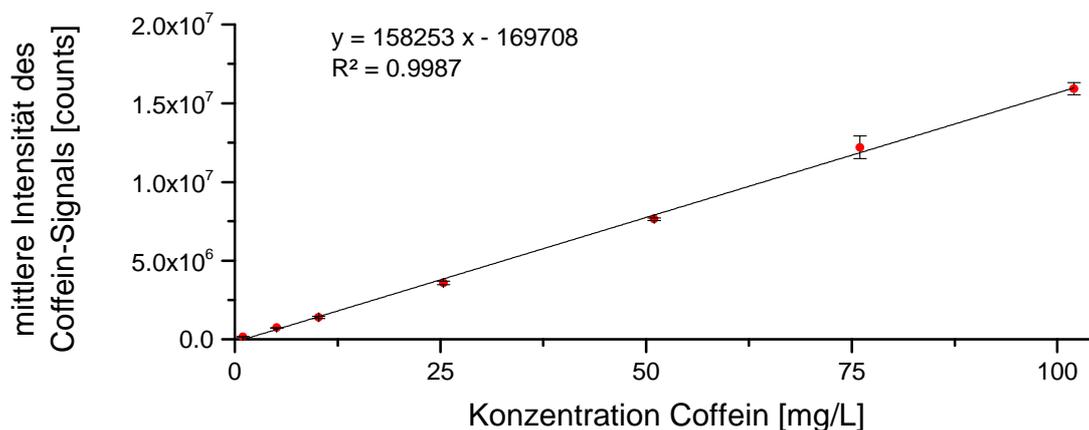


Abbildung 51: Abhängigkeit der Intensität des Coffein-Signals von der Konzentration (n=3).

Verglichen mit der Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an das Q-TOF-MS liegt bei der Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an das Ion Trap-MS ein größerer linearer Bereich der Coffein-Detektion vor.

3.3.2 Zerstörungsfreie Analyse von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs

Zur Verbesserung ihrer Flexibilität, Verarbeitbarkeit und Elastizität werden Kunststoffen bei der Herstellung Weichmacher zugesetzt. Die wichtigsten Kunststoffe, bei denen Weichmacher eingesetzt werden, sind Polyvinylchlorid (PVC), Polyvinylidenchlorid, Polyvinylbutyral, Polyvinylacetat und Polyacrylat. Weichmacher in Kunststoffen sind nicht kovalent an das Polymer gebunden und somit aus der Polymermatrix extrahierbar [261]. Unter den als Weichmacher eingesetzten Substanzen sind Diester der ortho-Phthalsäure (Phthalate) vorherrschend. Daneben werden Ester von Dicarbonsäuren (z.B. Diester der Adipinsäure und Sebacinsäure) und epoxidierte Pflanzenöle (Sojaöl und Leinöl) eingesetzt [261].

Aufgrund von gesundheitsschädlichen Effekten der Phthalate [262] ist ihre Verwendung in der Europäischen Union reglementiert. Nach Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 [263] dürfen Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), Dibutylphthalat (DBP) und Benzylbutylphthalat (BBP) nicht in Konzentrationen von mehr als 0,1 Gewichtsprozent des weichmacherhaltigen Materials in Spielzeug und Babyartikeln verwendet werden. Eine äquivalente Regelung betrifft den Einsatz von Diisononylphthalat (DINP), Diisodecylphthalat (DIDP) und Di-n-octylphthalat (DNOP) in Spielzeug und Babyartikeln, die von Kindern in den Mund genommen werden können. Die Verwendung von Weichmachern und anderen Zusatzstoffen bei Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, ist in Verordnung (EU) Nr. 10/2011 [264] geregelt. Von den Phthalaten dürfen DEHP und DBP nur als Weichmacher in Mehrwegmaterialien und -gegenständen, die mit fettfreien Lebensmitteln in Berührung kommen, eingesetzt werden. BBP, DINP und DIDP dürfen als Weichmacher in Mehrwegmaterialien und -gegenständen, sowie als Weichmacher in Einwegmaterialien und -gegenständen, die mit fettfreien Lebensmitteln in Berührung kommen, außer Säuglingsanfangsnahrung und Folgenahrung sowie Getreidebeikost und andere Beikost für Säuglinge und Kleinkinder, verwendet werden. Andere Weichmacher, z.B. Acetyltributylcitrat (ATBC), Di(2-

ethylhexyl)adipat (DEHA), Dibutylsebacat (DBS) und 1,2-Cyclohexandicarbonsäurediisononyl-ester (DINCH), dürfen generell eingesetzt werden.

Die Bestimmung von Weichmachern in Kunststoffen erfolgt üblicherweise nach Extraktion mittels Gaschromatographie (GC) mit Flammenionisationsdetektion (FID) oder massenspektrometrischer Detektion [262,265-267]. Zur Bestimmung von Weichmachern in Medizinprodukten wurde auch eine direkte Thermodesorption mit anschließender GC-MS Analyse eingesetzt [268]. In der Literatur sind verschiedene Ansätze zur Probenvorbereitung für die GC-FID oder GC-MS Bestimmung von Weichmachern in anderen Matrices beschrieben. Phthalate wurden mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Speichelsimulanz [269] bzw. mittels Festphasenextraktion (*Solid-phase extraction*, SPE) aus Milch [270] extrahiert. *Solid-phase microextraction* [271] und *stir bar sorptive extraction* [272] wurden zur Extraktion von Phthalaten aus menschlichem Serum bzw. aus in Infusionsbeuteln aus PVC enthaltenen Flüssigkeiten eingesetzt. Neben der GC fanden auch die LC-MS und die MALDI-MS Anwendung zur Bestimmung von Phthalaten. Die LC-MS/MS wurde zur Bestimmung von DEHP-Metaboliten in Urin [273] und die MALDI-TOF-MS zur Identifizierung verschiedener Weichmacher in PVC [274] verwendet.

Verschiedene Methoden der ambienten Massenspektrometrie wurden ebenfalls bereits zur Bestimmung von Weichmachern, hauptsächlich von Phthalaten, eingesetzt. Phthalate wurden mittels DART-MS qualitativ in Spielzeug aus PVC [131], in verschiedenen PVC-Proben [275] und in Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln [276] analysiert. Des Weiteren wurde die DART-MS zur Identifizierung von Zusätzen, unter anderem von Phthalaten und anderen Weichmachern, in PVC-Deckeldichtungen von Schraubgläsern [130] und in Lebensmittelverpackungen [128] eingesetzt. DEHP wurde ferner als interner Standard zur Bestimmung akkurater m/z -Verhältnisse während der Analyse des Stabilisators Irgafos 168 in Polyethylen mittels DART-MS verwendet [277]. Abgesehen von der DART-MS wurde Diethylphthalat mittels EESI-MS in Parfum detektiert [84], DEHP und DBP wurden mittels FA-APGD-MS in PVC-basierten Lebensmittelverpackungen nachgewiesen [190], DEHP wurde bei der Analyse brasilianischer Fahrzeugpapiere mittels EASI-MS [76] und DEHP sowie DEHA während der Analyse verschiedener Kontaminanten in Lebensmitteln mittels PSI-MS [91] detektiert.

3.3.2.1 Untersuchung der Fragmentierung von Weichmacher-Standards mittels DIP-APCI-MSⁿ

Um eine Identifizierung von Phthalaten und anderen Weichmachern in Kunststoffgegenständen des täglichen Gebrauchs zu ermöglichen, wurden zunächst Standardlösungen der Phthalate DEHP, DBP, BBP, DINP und DNOP sowie der Weichmacher DEHA, ATBC und DBS mittels DIP-APCI-MS und DIP-APCI-MSⁿ analysiert und das Fragmentierungsverhalten der Weichmacher bei CID untersucht. Bei der DIP-APCI-MS Analyse aller Weichmacher wurde das protonierte Molekül ($[M + H]^+$) des jeweiligen Weichmachers detektiert. Zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens wurden MS/MS-Experimente der $[M + H]^+$ -Ionen der Weichmacher sowie MS³-Experimente der Fragmente mit der höchsten Intensität durchgeführt. Abbildung 52 zeigt beispielhaft das Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse von DEHP sowie das entsprechende Massenspektrum.

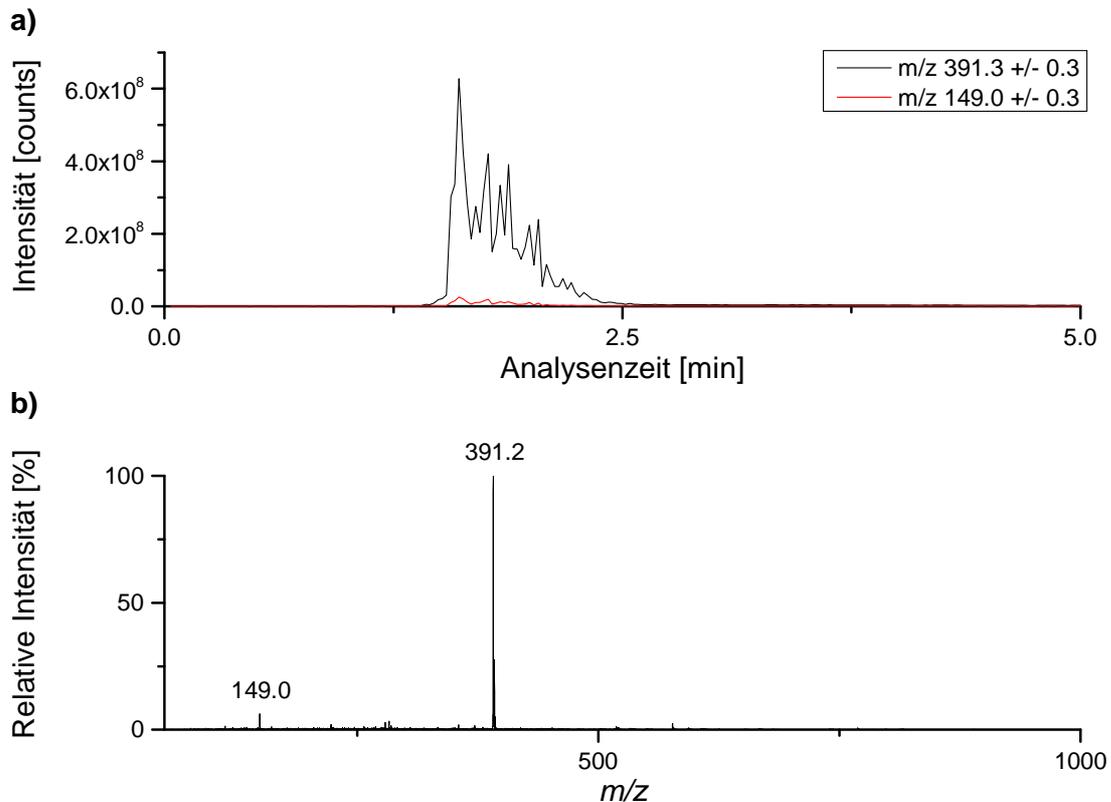


Abbildung 52: DIP-APCI-MS Analyse von DEHP; (a) Chronogramme; schwarz: EIC von $m/z 391,3$ (DEHP); rot: EIC von $m/z 149,0$ (Fragment von DEHP); (b) Massenspektrum gemittelt über die gesamte Analysendauer.

Wie in Abbildung 52 zu erkennen ist, kommt es während der DIP-APCI-MS Analyse von DEHP zur Fragmentierung des $[M + H]^+$ -Ions in der Quelle und zur Bildung von $m/z 149$. $m/z 391$ und $m/z 149$ zeigen einen identischen Verlauf des Intensitätsanstiegs mit dem Temperaturprogramm. Die übrigen analysierten Weichmacher unterliegen während der DIP-APCI-MS Analyse ebenfalls, in unterschiedlichen Ausmaßen, einer Fragmentierung in der Quelle. Dies ist in Tabelle 8 zu erkennen, welche die bei der DIP-APCI-MS Analyse der Weichmacher detektierten m/z -Signale und ihre relativen Intensitäten angibt.

Tabelle 8: Während der DIP-APCI-MS Analyse der Weichmacher detektierte m/z -Signale und ihre relativen Intensitäten im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum.

| Weichmacher | m/z des $[M + H]^+$ | Detektierte m/z -Signale (relative Intensitäten in Klammern) |
|-------------|-----------------------|--|
| DEHP | 391.3 | 391.2 (100), 149.0 (7) |
| DBP | 279.2 | 279.0 (100), 205.0 (25), 148.9 (37) |
| BBP | 313.1 | 313.1 (100), 205.0 (18), 149.0 (19), 91.0 (14) |
| DINP | 419.3 | 419.3 (100), 149.0 (6), 433.3 (41) |
| DNOP | 391.3 | 391.2 (100), 149.0 (9) |
| DEHA | 371.3 | 371.2 (100), 259.1 (4) |
| ATBC | 403.2 | 403.2 (4), 343.1 (100), 269.0 (18), 213.0 (4), 156.9 (3) |
| DBS | 315.2 | 315.2 (100), 259.1 (7) |

Abbildung 53 zeigt beispielhaft die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von DEHP. Im MS/MS-Experiment fragmentiert das $[M + H]^+$ -Ion von DEHP (m/z 391) durch CID zu Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 279, 261, 167, 149 und 113 (vgl. Abbildung 53a). Im MS³-Experiment fragmentiert das gebildete Fragment mit m/z 279 wiederum zu m/z 167 und m/z 149 (vgl. Abbildung 53b) und das gebildete Fragment mit m/z 167 fragmentiert zu m/z 149 (vgl. Abbildung 53c). m/z 149 wird bei der gewählten Reaktionsamplitude nicht weiter fragmentiert (vgl. Abbildung 53d).

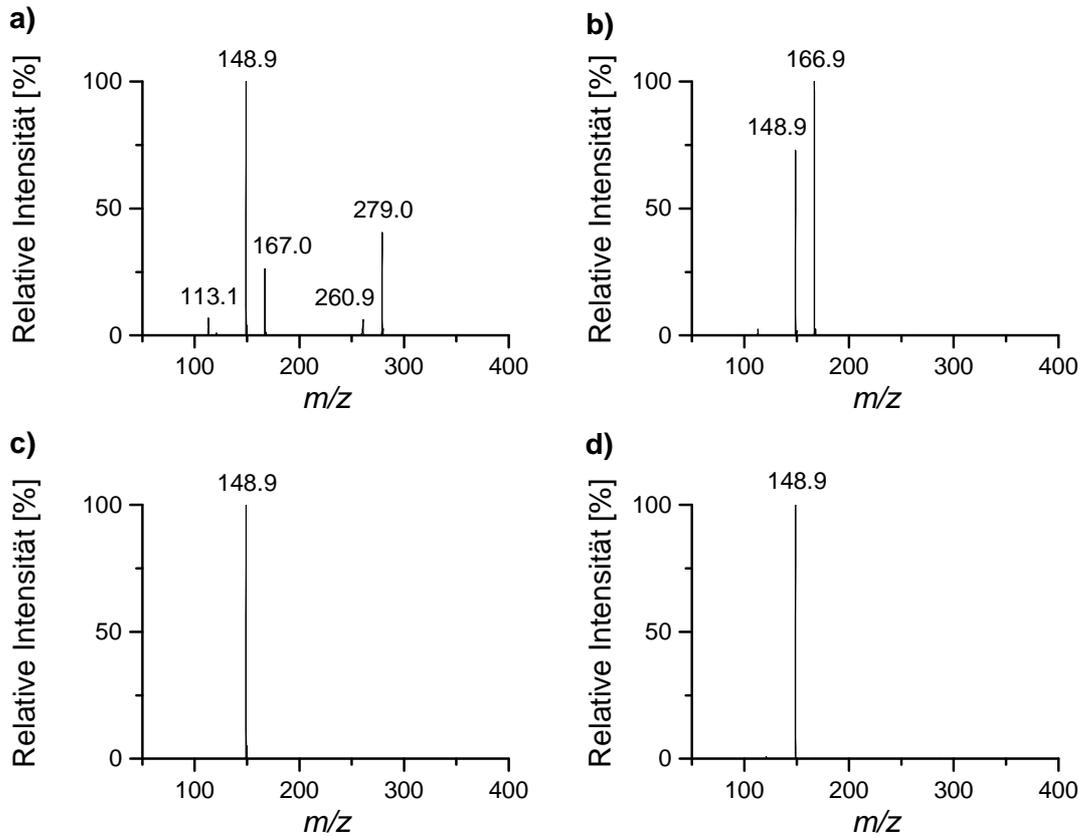


Abbildung 53: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von DEHP; (a) MS/MS von m/z 391; (b) MS^3 von m/z 391 \rightarrow m/z 279; (c) MS^3 von m/z 391 \rightarrow m/z 167; (d) MS^3 von m/z 391 \rightarrow m/z 149.

Tabelle 9 stellt die während der DIP-APCI- MS/MS und DIP-APCI- MS^3 Analyse der Phthalate detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten dar. Die entsprechenden Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse der Phthalate, abgesehen von DEHP, sind in Abbildung 116 bis Abbildung 119 im Anhang zu finden.

Tabelle 9: Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse der Phthalate detektierte *m/z*-Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| Weichmacher | <i>m/z</i> des <i>Precursors</i> | Detektierte <i>m/z</i> -Signale (relative Intensitäten in Klammern) |
|-------------|-------------------------------------|---|
| DEHP | 391.3 | 113.1 (7), 148.9 (100), 167.0 (26), 260.9 (6), 279.0 (41) |
| | 391.3 → 279.0 | 148.9 (73), 166.9 (100) |
| | 391.3 → 167.0 | 148.9 (100) |
| | 391.3 → 149.0 | 148.9 (100) |
| DBP | 279.2 | 148.9 (50), 204.9 (100) |
| | 279.2 → 205.0 | 148.9 (100) |
| | 279.2 → 149.0 | 148.9 (100) |
| BBP | 313.1 | 91.0 (20), 149.0 (100), 205.0 (99), 238.9 (8) |
| | 313.1 → 205.0 | 148.9 (100) |
| | 313.1 → 149.0 | 148.9 (100) |
| DINP | 419.3 | 127.1 (67), 149.0 (47), 167.0 (6), 275.0 (100), 293.1 (58) |
| | 419.3 → 293.1 | 85.1 (4), 127.0 (11), 149.0 (100), 166.9 (24), 275.0 (5) |
| | 419.3 → 275.0 | 85.1 (32), 127.0 (100), 149.0 (30) |
| | 419.3 → 149.0 | 149.0 (100) |
| | 419.3 → 127.1 | 57.1 (15), 71.1 (85), 85.1 (100) |
| DNOP | 391.3 | 149.0 (100), 261.0 (35) |
| | 391.3 → 261.0 | 149.0 (100) |
| | 391.3 → 149.0 | 149.0 (100) |

Die in den MS/MS-Experimenten der Phthalate detektierten Fragmente stimmen mit dem in der Literatur beschriebenen Fragmentierungsmuster der Phthalate überein [131,269,274,278]. Die Produkte der bei der DIP-APCI-MS Analyse beobachteten Fragmentierungen der $[M + H]^+$ -Ionen in der Quelle (vgl. Tabelle 8) treten auch als Fragmente der CID auf. Abbildung 54 zeigt mögliche Fragmentierungswege von DEHP und den übrigen analysierten Phthalaten. Die gezeigten Fragmentierungswege erklären die in den MS/MS-Experimenten und, bis auf die Fragmentierung des R^+ -Fragments von DINP (*m/z* 127), welche hier nicht betrachtet wird, auch die in den MS³-Experimenten detektierten Fragmente. Die vorgeschlagenen Fragmentierungswege laufen bei der Fragmentierung der Phthalate in unterschiedlichem Ausmaß ab und nicht

alle möglichen Fragmente werden tatsächlich bei allen Phthalaten gebildet (vgl. Tabelle 9). Zu beachten ist, dass die isomeren Phthalate DEHP und DNOP ein unterschiedliches Fragmentierungsverhalten zeigen und somit anhand ihrer MS/MS- und MS³-Spektren unterschieden werden können.

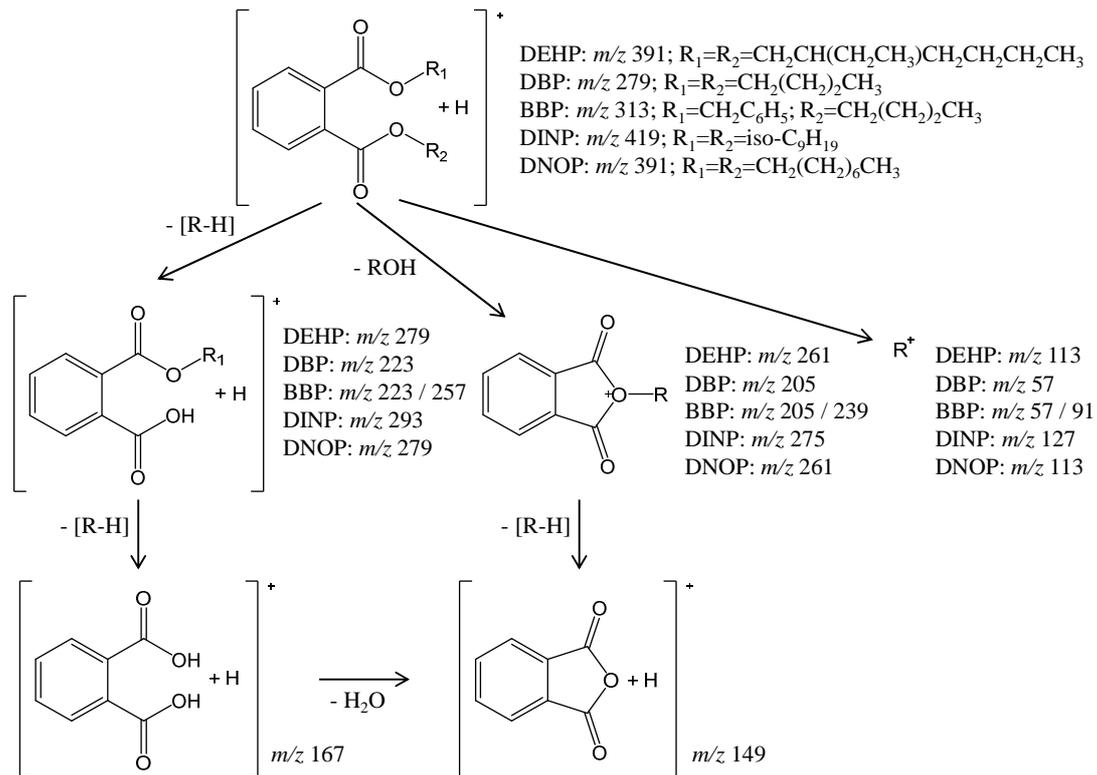


Abbildung 54: Mögliche Fragmentierungswege der Phthalate.

Während der DIP-APCI-MS Analyse von DINP tritt ein Signal mit m/z 433 auf (vgl. Tabelle 8 und Abbildung 118 im Anhang), dessen Herkunft zunächst unklar ist. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieses Signals könnte eine Verunreinigung des DINP-Standards mit einem Phthalat sein, welches an einer Seitenkette eine zusätzliche CH_2 -Gruppe trägt. Die MS/MS-Analyse von m/z 433 unterstützt diese Erklärung. Zusätzlich zu den Fragmenten, welche durch CID von DINP entstehen (m/z 127, m/z 149, m/z 167, m/z 275 und m/z 293), fragmentiert m/z 433 zu m/z 141, m/z 289 und m/z 307 (vgl. Abbildung 120 im Anhang). Diese zusätzlich gebildeten Fragmente lassen sich durch ein Phthalat mit einer zusätzlichen CH_2 -Gruppe an einer Seitenkette erklären. Zur Absicherung dieser Erklärung für das Auftreten von m/z 433 wurde der

DINP-Standard auch mittels hochauflösender ESI-MS analysiert. Hierbei wurde DINP in Form des $[M + H]^+$ -Ions und des $[M + Na]^+$ -Ions detektiert. Zusätzlich traten Signale auf, deren m/z -Verhältnisse dem $[M + H]^+$ -Ion und dem $[M + Na]^+$ -Ion eines Phthalates mit einer zusätzlichen CH_2 -Gruppe an einer Seitenkette entsprechen (vgl. Abbildung 121 im Anhang).

Die während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse von DEHA, ATBC und DBS detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die entsprechenden Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse dieser Weichmacher sind in Abbildung 122 bis Abbildung 124 im Anhang zu finden.

Tabelle 10: Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse von DEHA, ATBC und DBS detektierte *m/z*-Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| Weichmacher | <i>m/z</i> des Precursors | Detektierte <i>m/z</i> -Signale (relative Intensitäten in Klammern) |
|-------------|---------------------------|--|
| DEHA | 371.3 | 111.0 (39), 129.0 (100), 147.0 (66), 241.0 (34) 259.1 (90), 355.0 (3) |
| | 371.3 → 259.1 | 111.0 (20), 129.0 (89), 147.0 (100), 241.0 (30) |
| | 371.3 → 241.0 | 111.0 (31), 129.0 (100), 147.0 (6) |
| | 371.3 → 147.0 | 129.0 (100) |
| | 371.3 → 129.0 | 101.0 (14), 111.0 (100) |
| | 371.3 → 111.0 | 83.0 (100) |
| ATBC | 403.2 | 157.0 (12), 213.0 (16), 217.0 (20), 273.0 (39), 329.1 (100), 361.1 (19) |
| | 403.2 → 361.1 | 129.0 (9), 185.0 (59), 259.0 (100) |
| | 403.2 → 329.1 | 129.0 (21), 138.9 (18), 156.9 (73), 185.0 (22), 213.0 (73), 216.9 (100), 259.1 (12), 269.0 (16), 273.0 (84) |
| | 403.2 → 273.0 | 129.0 (18), 156.9 (35), 185.0 (20), 213.0 (15), 216.9 (100) |
| | 403.2 → 217.0 | 129.0 (100), 138.9 (22), 156.9 (98) |
| | 403.2 → 213.0 | 139.0 (16), 156.9 (100) |
| DBS | 315.2 | 185.1 (37), 203.1 (38), 259.1 (100) |
| | 315.2 → 259.0 | 185.1 (12), 203.1 (10), 259.1 (100) |
| | 315.2 → 203.1 | 185.1 (100), 203.1 (83) |
| | 315.2 → 185.1 | 121.1 (60), 139.1 (100), 149.0 (26) |

Die im MS/MS-Experiment von DEHA detektierten Fragmente wurden bereits in der Literatur beschrieben [274]. Abbildung 55 zeigt mögliche Fragmentierungswege von DEHA, die die im MS/MS-Experiment und zum Teil auch die im MS³-Experiment detektierten Fragmente erklären.

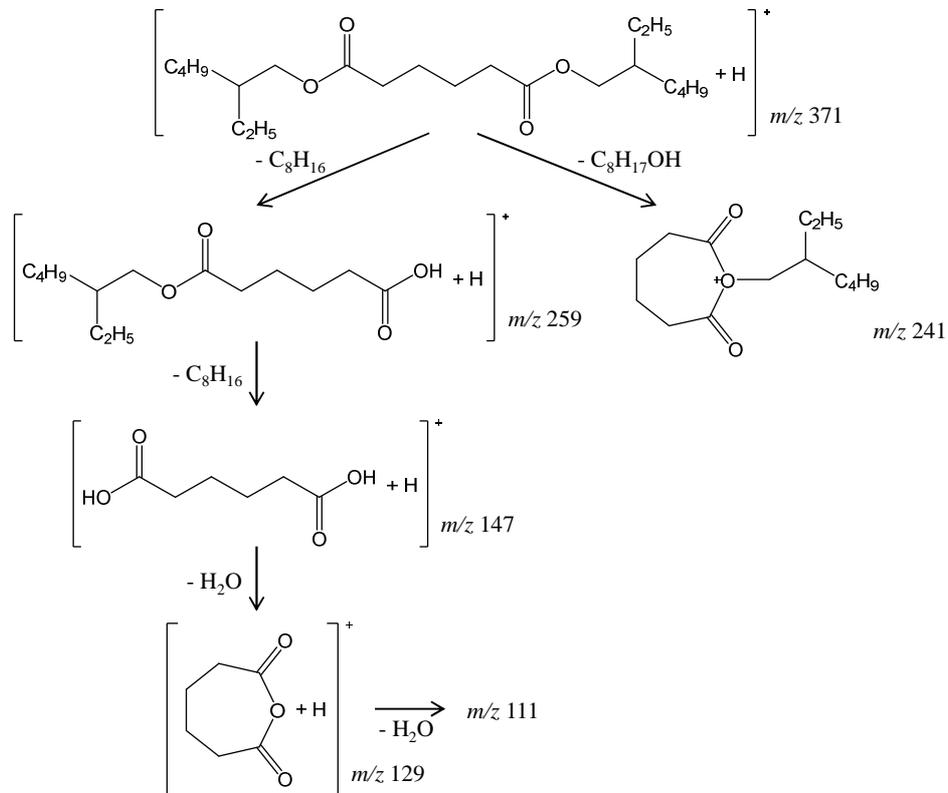


Abbildung 55: Mögliche Fragmentierungswege von DEHA.

Im MS/MS-Experiment von ATBC entstehen Fragmente, die sich durch Fragmentierungswege ähnlich der Fragmentierungswege der Phthalate und von DEHA erklären lassen. Diese möglichen Fragmentierungswege sind in Abbildung 56 gezeigt. Sie erklären die im MS/MS-Experiment und teilweise auch die im MS³-Experiment detektierten Fragmente. Alle im MS/MS-Experiment von ATBC detektierten Fragmente sind, neben weiteren, hier nicht detektierten Fragmenten von ATBC, in der Literatur beschrieben [265], die Fragmentierungswege wurden jedoch nicht erläutert.

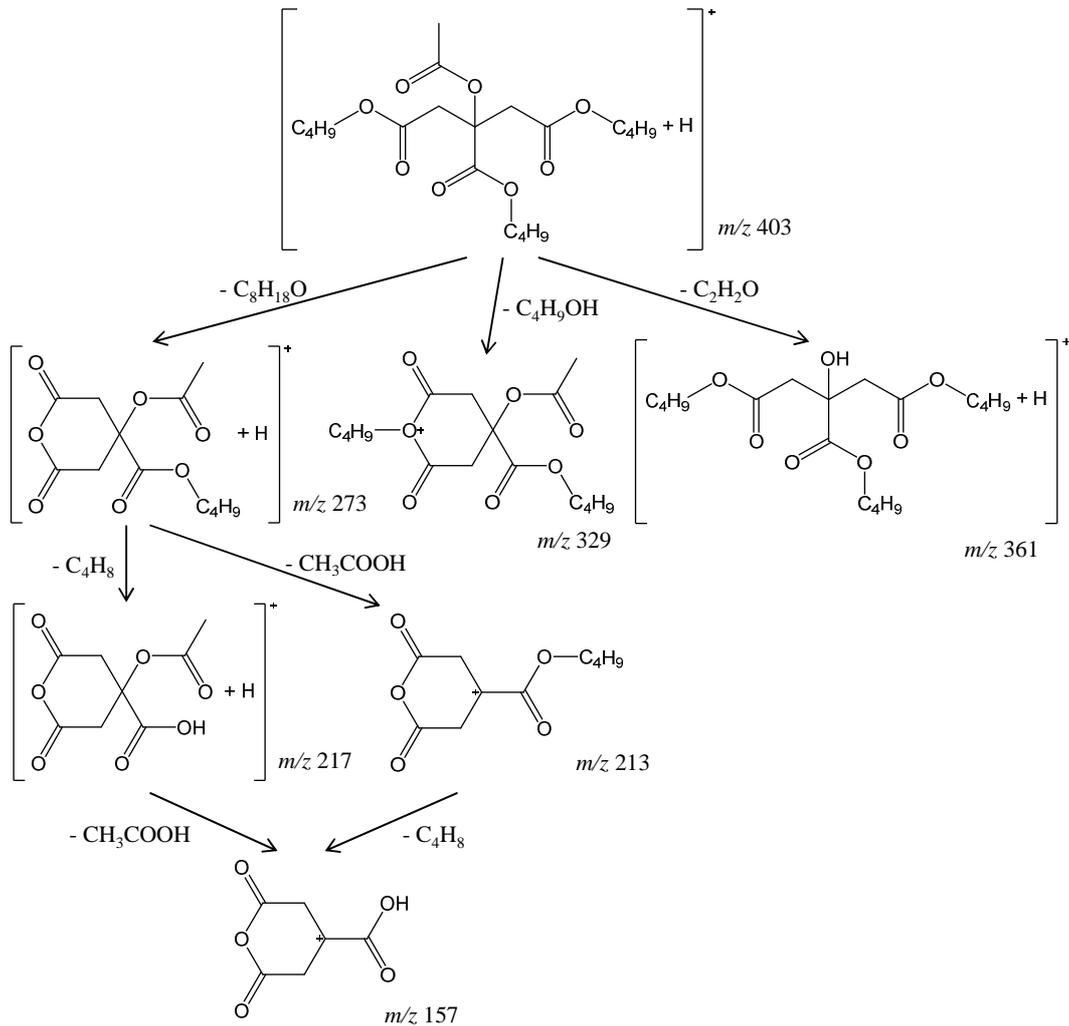


Abbildung 56: Mögliche Fragmentierungswege von ATBC.

DBS, ein Diester der Sebacinsäure, ist strukturell sehr ähnlich zu DEHA, einem Diester der Adipinsäure. Aus diesem Grund ist ein ähnliches Fragmentierungsverhalten dieser beiden Weichmacher zu erwarten. Die im MS/MS-Experiment von DBS detektierten Fragmente lassen sich durch Fragmentierungswege analog zu den Fragmentierungswegen von DEHA erklären. Diese möglichen Fragmentierungswege von DBS erklären die im MS/MS-Experiment und zum Teil die im MS^3 -Experiment gebildeten Fragmente und sind in Abbildung 57 dargestellt.

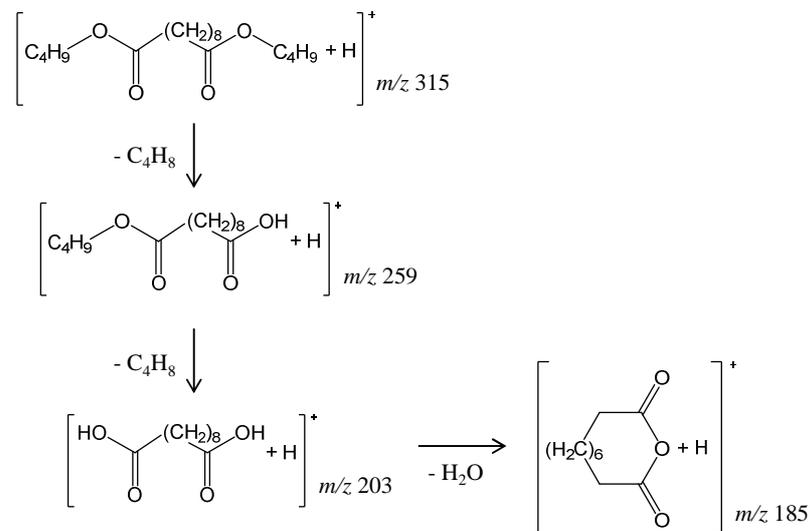


Abbildung 57: Mögliche Fragmentierungswege von DBS.

Wie bereits im Fall der Phthalate beobachtet, treten die während der DIP-APCI-MS Analyse von DEHA und DBS in der Quelle gebildeten Fragmente auch in den entsprechenden MS/MS-Experimenten auf. In der DIP-APCI-MS Analyse von ATBC hingegen treten Signale mit den m/z -Verhältnissen 343 und 269 auf (vgl. Tabelle 8 und Abbildung 123 im Anhang), welche im MS/MS-Experiment von ATBC nicht entstehen. Im MS/MS-Experiment fragmentiert m/z 343 zu m/z 269, m/z 213 und m/z 217 (vgl. Abbildung 125a im Anhang). Aus m/z 269 werden Fragmente mit den m/z -Verhältnissen 213 und 157 gebildet (vgl. Abbildung 125b im Anhang). Diese Fragmente treten auch im MS/MS-Experiment des $[M + H]^+$ -Ions von ATBC auf, was zeigt, dass m/z 343 und m/z 269 mit ATBC zusammenhängen. Zur Klärung der Identität von m/z 343 und m/z 269 wurde der ATBC-Standard mittels hochauflösender ESI-MS analysiert. Hier konnten m/z 343 und m/z 269 nicht nachgewiesen werden, es wurden lediglich das $[M + H]^+$ -Ion und das $[M + Na]^+$ -Ion von ATBC sowie einige Fragmente, die auch bei der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von ATBC gebildet wurden, detektiert (vgl. Abbildung 126 im Anhang). Eine mögliche Erklärung für die Detektion von m/z 343 und m/z 269 in der DIP-APCI-MS Analyse von ATBC wäre, dass eine thermische Degradation von ATBC in der Ionenquelle zu anderen Fragmenten führt, als die Fragmentierung durch CID.

3.3.2.2 Zerstörungsfreier Nachweis von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs

Zur Untersuchung, ob es möglich ist, durch direkte DIP-APCI-MS und DIP-APCI-MSⁿ Analyse von Kunststoffen in den Kunststoffen enthaltene Weichmacher zu detektieren und zu identifizieren, wurden Spielzeuge, Materialien, die dazu bestimmt sind mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen und andere Bedarfsgegenstände analysiert. Die Probeniegel wurden zur Analyse der Kunststoffe lediglich über die Oberflächen der verschiedenen Proben gerieben und das anhaftende Material analysiert. Somit handelt es sich bei der DIP-APCI-MS Analyse der Kunststoffe um eine zerstörungsfreie Analyse. Bei der als zerstörungsfrei bezeichneten DART-MS Analyse von Phthalaten in Spielzeugen aus PVC [131] gibt es Limitierungen hinsichtlich der Zerstörungsfreiheit. Wurde eine Helium-Temperatur von 200 °C verwendet, so konnten keine Schäden an den Spielzeugproben beobachtet werden. Die Verwendung höherer Helium-Temperaturen, welche die Empfindlichkeit der Detektion der Phthalate erhöhen, führte zur teilweisen Zersetzung der Spielzeugproben. Eine weitere Limitierung besteht in der Größe der Proben, die in die DART-Ionenquelle eingebracht werden können [131].

Alle Kunststoffproben wurden zunächst mittels DIP-APCI-MS analysiert. Bei Detektion eines m/z -Signals, bei welchem es sich um das protonierte Molekül ($[M + H]^+$) eines Weichmachers handeln könnte, wurden zur Bestätigung der Identität MS/MS-Experimente dieses m/z -Signals und MS³-Experimente der Fragmente mit der höchsten Intensität durchgeführt. Im Folgenden wird nur auf die Analyse der Kunststoffproben eingegangen, in denen Weichmacher nachgewiesen wurden.

Die Massenspektren der DIP-APCI-MS Analyse der Kunststoffproben, bei denen m/z -Signale detektiert wurden, die sich auf das Vorhandensein von Weichmachern zurückführen lassen, sind in Abbildung 58 dargestellt.

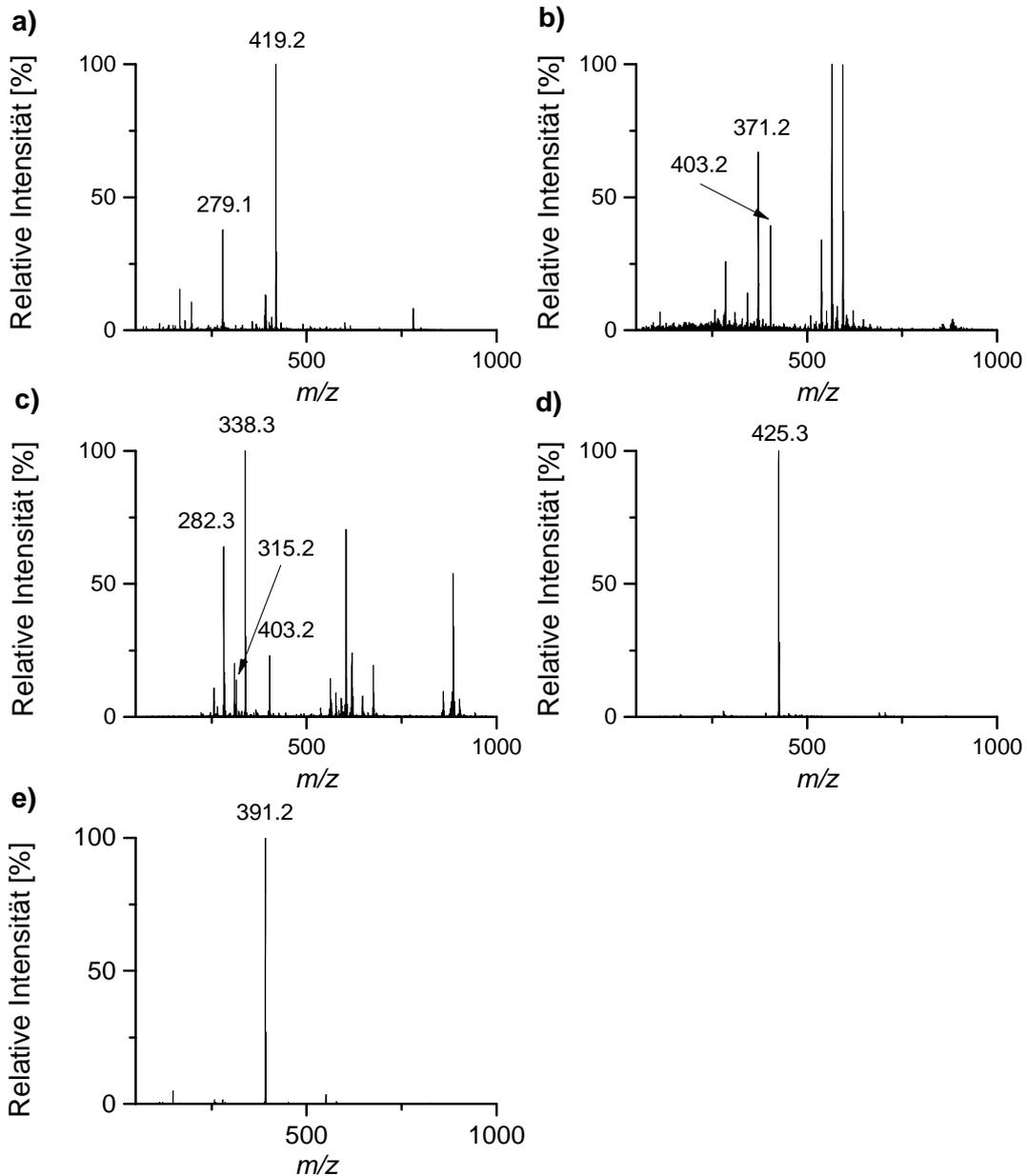


Abbildung 58: Massenspektren (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der DIP-APCI-MS Analyse der Kunststoffproben; (a) Laborhandschuh aus Vinyl; (b) Verpackungsfolie für Käse; (c) Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto; (d) Badeente; (e) Pflanzenbinder.

Auf der Verpackung der analysierten Laborhandschuhe aus Vinyl war angegeben, dass diese DINP enthalten. Im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse des Laborhandschuhs aus

Vinyl (Abbildung 58a) ist ein Signal mit m/z 419 zu erkennen, welches auf das $[M + H]^+$ -Ion von DINP zurückzuführen sein könnte. Tabelle 11 zeigt die in den MS/MS- und MS³-Experimenten dieses m/z -Signals detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten. Die entsprechenden Massenspektren sind in Abbildung 127 im Anhang zu finden.

Tabelle 11: Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse des Laborhandschuhs aus Vinyl detektierte m/z -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| m/z des Precursors | Detektierte m/z -Signale (relative Intensitäten in Klammern) | Weichmacher |
|----------------------|--|-------------|
| 419.3 | 127.0 (58), 148.9 (71), 167.0 (5), 274.9 (100), 293.1 (53) | |
| 419.3 → 293.1 | 127.0 (10), 148.9 (100), 166.9 (20), 275.0 (5) | DINP |
| 419.3 → 275.0 | 85.1 (35), 127.0 (100), 148.9 (80) | |

Die MS/MS- und MS³-Experimente von m/z 419 bestätigen die Detektion von DINP bei direkter DIP-APCI-MSⁿ Analyse des Laborhandschuhs aus Vinyl. Die durch CID von m/z 419 aus dem Laborhandschuh aus Vinyl gebildeten Fragmente stimmen mit den durch CID des DINP-Standards gebildeten Fragmenten überein, wenngleich leicht unterschiedliche Intensitätsverhältnisse vorliegen.

In der DIP-APCI-MS Analyse der Verpackungsfolie für Käse (Abbildung 58b) treten Signale mit m/z 371 und m/z 403 auf. Diese könnten auf die Weichmacher DEHA bzw. ATBC zurückzuführen sein. Tabelle 12 zeigt die in den MS/MS- und MS³-Experimenten von m/z 371 und m/z 403 detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten. Die entsprechenden Massenspektren sind in Abbildung 128 bzw. Abbildung 129 im Anhang dargestellt.

Tabelle 12: Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse der Verpackungsfolie für Käse detektierte *m/z*-Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| <i>m/z</i> des <i>Precursors</i> | Detektierte <i>m/z</i> -Signale (relative Intensitäten in Klammern) | Weichmacher |
|-------------------------------------|--|-------------|
| 371.3 | 111.0 (38), 129.0 (100), 147.0 (59), 241.0 (33), 259.1 (86), 355.0 (49) | |
| 371.3 → 259.1 | 111.0 (19), 129.0 (93), 147.0 (100), 241.0 (34) | |
| 371.3 → 241.0 | 111.0 (28), 129.0 (100) | DEHA |
| 371.3 → 147.0 | 129.0 (100) | |
| 371.3 → 129.0 | 101.0 (14), 111.0 (100) | |
| 371.3 → 111.0 | 83.0 (100) | |
| 403.2 | 157.0 (10), 213.0 (17), 217.0 (21), 273.0 (42), 329.1 (100), 361.2 (19) | |
| 403.2 → 361.1 | 129.0 (7), 185.0 (56), 259.1 (100) | |
| 403.2 → 329.1 | 129.0 (13), 139.0 (18), 157.0 (64), 185.0 (19), 213.0 (71), 217.0 (100), 259.1 (12), 269.1 (19), 273.0 (81) | ATBC |
| 403.2 → 273.0 | 129.0 (15), 157.0 (33), 185.0 (18), 213.0 (17), 217.0 (100) | |
| 403.2 → 217.0 | 129.0 (91), 139.0 (23), 157.0 (100) | |
| 403.2 → 213.0 | 139.0 (17), 157.0 (100) | |

Die MS/MS- und MS³-Experimente von *m/z* 371 bzw. *m/z* 403 bestätigen, dass die Verpackungsfolie für Käse die Weichmacher DEHA und ATBC enthält. Die durch CID von *m/z* 371 bzw. *m/z* 403 aus der Verpackungsfolie gebildeten Fragmente stimmen mit den durch CID des DEHA- bzw. ATBC-Standards gebildeten Fragmenten überein und die gebildeten Fragmente treten in sehr ähnlichen Intensitätsverhältnissen auf.

Im MS/MS-Experiment von *m/z* 371 aus der Verpackungsfolie für Käse (vgl. Tabelle 12) tritt ein Signal mit *m/z* 355 auf, dessen relative Intensität sehr stark von der im MS/MS-Experiment des DEHA-Standards (vgl. Tabelle 10) detektierten relativen Intensität des entsprechenden Signals abweicht. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass *m/z* 355 kein Fragment von DEHA, sondern eines Hintergrundsignals mit *m/z* 371,0, darstellt. Dass es sich bei *m/z* 355 nicht um ein Fragment von DEHA handeln kann, wurde im MS³-Experiment dieses *m/z*-Signals gezeigt. Hier trat bei Analyse der Verpackungsfolie für Käse kein Anstieg der Signalintensität mit dem

Temperaturprogramm der Schubstange auf. Wie bereits bei der Bestimmung von Cumarin in Getränken mit Waldmeistergeschmack (Kapitel 3.2.3.4), hilft die temperaturprogrammierte Verdampfung der Proben bei der DIP-APCI-MS Analyse auch hier, Fehlinterpretationen der Analysendaten zu vermeiden.

Während der DIP-APCI-MS Analyse der Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto (Abbildung 58c) wurden Signale mit m/z 315 und m/z 403 detektiert, welche von den Weichmachern DBS und ATBC stammen könnten. Tabelle 13 fasst die in den MS/MS- und MS³-Experimenten von m/z 315 und m/z 403 detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten zusammen. Die entsprechenden Massenspektren sind in Abbildung 130 bzw. Abbildung 131 im Anhang dargestellt.

Tabelle 13: Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse der Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto detektierte m/z -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| m/z des Precursors | Detektierte m/z -Signale (relative Intensitäten in Klammern) | Weichmacher |
|----------------------|---|-------------|
| 315.2 | 185.0 (40), 203.0 (34), 259.1 (100) | |
| 315.2 → 259.1 | 185.1 (13), 203.0 (9), 259.1 (100) | DBS |
| 315.2 → 203.0 | 185.0 (100), 203.0 (68) | |
| 315.2 → 185.0 | 121.1 (62), 139.1 (100), 149.0 (29) | |
| 403.3 | 156.9 (10), 213.0 (17), 217.0 (20), 273.0 (38), 329.1 (100), 361.1 (18) | |
| 403.2 → 361.1 | 129.0 (6), 185.0 (50), 259.0 (100) | ATBC |
| 403.2 → 329.1 | 129.0 (14), 138.9 (20), 156.9 (71), 185.0 (25), 213.0 (71), 216.9 (100), 259.1 (13), 269.0 (18), 273.0 (85) | |
| 403.2 → 273.0 | 129.0 (14), 157.0 (33), 185.0 (17), 213.0 (15), 217.0 (100) | |
| 403.2 → 217.0 | 129.0 (91), 138.9 (22), 156.9 (100) | |
| 403.2 → 213.0 | 138.9 (17), 156.9 (100) | |

Die durch CID von m/z 315 bzw. m/z 403 aus der Deckeldichtung des Schraubglases mit Pesto gebildeten Fragmente stimmen mit den durch CID des DBS- bzw. ATBC-Standards gebildeten Fragmenten überein. Die Intensitätsverhältnisse der gebildeten Fragmente sind bei Analyse der

Deckeldichtung und bei Analyse der DBS- bzw. ATBC-Standards sehr ähnlich. Die MS/MS- und MS³-Experimente von *m/z* 315 und *m/z* 403 aus der Deckeldichtung des Schraubglases mit Pesto bestätigen somit, dass diese *m/z*-Signale von den Weichmachern DBS und ATBC stammen. Neben den *m/z*-Signalen von DBS und ATBC sind im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse der Deckeldichtung des Schraubglases mit Pesto (Abbildung 58c) Signale mit *m/z* 282 und *m/z* 338 zu erkennen. Diese lassen sich höchstwahrscheinlich auf Oleamid und Erucamid zurückführen, welche in Deckeldichtungen für Schraubgläser häufig als Gleitmittel eingesetzt werden [266,267].

In den untersuchten, für den Kontakt mit Lebensmitteln vorgesehenen Kunststoffmaterialien (Verpackungsfolie für Käse und Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto) wurden die Weichmacher DEHA, ATBC und DBS nachgewiesen. Nach Verordnung (EU) Nr. 10/2011 ist der Zusatz dieser Weichmacher zu Einwegmaterialien, welche mit fetthaltigen Lebensmitteln in Berührung kommen, zulässig.

Die DIP-APCI-MS Analyse einer Badeente (Abbildung 58d) zeigte ein Signal hoher Intensität mit *m/z* 425. Dieses *m/z*-Signal könnte auf den Weichmacher DINCH zurückzuführen sein. Tabelle 14 zeigt die in den MS/MS- und MS³-Experimenten von *m/z* 425 detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten. Die entsprechenden Massenspektren sind in Abbildung 132 im Anhang zu finden.

Tabelle 14: Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse der Badeente detektierte *m/z*-Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| <i>m/z</i> des Precursors | Detektierte <i>m/z</i> -Signale (relative Intensitäten in Klammern) | Weichmacher |
|---------------------------|---|-------------|
| 425.3 | 127.0 (17), 155.0 (45), 281.1 (100), 299.1 (5) | |
| 425.3 → 281.1 | 85.1 (14), 109.0 (8), 127.0 (44), 155.0 (100) | DINCH |
| 425.3 → 155.0 | 81.1 (14), 109.0 (100), 127.0 (60) | |
| 425.3 → 127.0 | 71.1 (52), 85.1 (61), 109.0 (100) | |

Die Analyse eines DINCH-Standards zur Bestätigung der Identität von *m/z* 425 war nicht möglich, da kein DINCH-Standard verfügbar war. Bei allen in den MS/MS- und MS³-Experimenten von *m/z* 425 aus der Badeente detektierten Fragmenten handelt es sich jedoch um

in der Literatur beschriebene Fragmenten von DINCH [265]. Zudem ähnelt die Struktur von DINCH sehr der Struktur der Phthalate, sodass ein ähnliches Fragmentierungsverhalten zu erwarten ist. Abbildung 59 zeigt mögliche, analog zu den Fragmentierungswegen der Phthalate ablaufende, Fragmentierungswege von DINCH, welche die im MS/MS- und zum Teil auch die im MS³-Experiment von m/z 425 aus der Badeente gebildeten Fragmente erklären. Somit ist davon auszugehen, dass die untersuchte Badeente den Weichmacher DINCH enthält. Der Zusatz von DINCH zu Spielzeugen ist in der Europäischen Union nicht reglementiert.

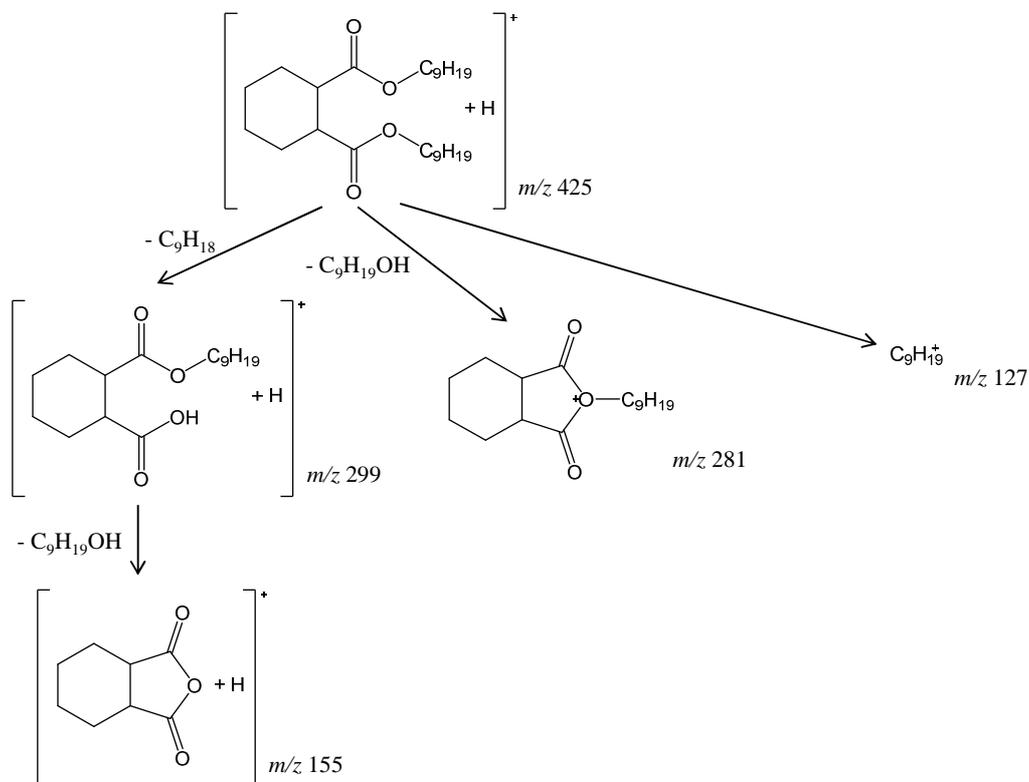


Abbildung 59: Mögliche Fragmentierungswege von DINCH.

In der DIP-APCI-MS Analyse eines Pflanzenbinders (Abbildung 58e) tritt ein Signal mit m/z 391 auf, das auf die isomeren Phthalate DEHP oder DNOP zurückzuführen sein könnte. Die in den MS/MS- und MS³-Experimenten dieses m/z -Signals detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die entsprechenden Massenspektren sind in Abbildung 133 im Anhang dargestellt.

Tabelle 15: Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS³ Analyse des Pflanzenbinders detektierte *m/z*-Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| <i>m/z</i> des Precursors | Detektierte <i>m/z</i> -Signale (relative Intensitäten in Klammern) | Weichmacher |
|---------------------------|---|-------------|
| 391.3 | 113.0 (7), 148.9 (100), 167.0 (27), 260.9 (6), 279.0 (39) | |
| 391.3 → 279.0 | 149.0 (75), 166.9 (100) | DEHP |
| 391.3 → 167.0 | 148.9 (100) | |
| 391.3 → 149.0 | 148.9 (100) | |

Die MS/MS- und MS³-Experimente von *m/z* 391 aus dem Pflanzenbinder zeigen, dass dieses *m/z*-Signal auf DEHP zurückzuführen ist. Die durch CID von *m/z* 391 aus dem Pflanzenbinder gebildeten Fragmente stimmen mit den durch CID des DEHP-Standards gebildeten Fragmenten überein und die gebildeten Fragmente treten in sehr ähnlichen Intensitätsverhältnissen auf. Bei den analysierten Pflanzenbindern handelte es sich um grüne Kunststofffrösche. Nach Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 ist der Einsatz von DEHP als Weichmacher in Spielzeug verboten. Um eine Verwechslung der Pflanzenbinder mit Spielzeug zu verhindern, trugen diese den Hinweis „ACHTUNG! Dieses Produkt ist kein Spielzeug - Nur zur Dekoration!“.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass die DIP-APCI-Ionenquelle einen schnellen und zerstörungsfreien Nachweis von in Kunststoffmaterialien enthaltenen Weichmachern ermöglicht. Die Kopplung der DIP-APCI-Ionenquelle an ein Ion Trap-Massenspektrometer erlaubt ebenfalls die Differenzierung der isomeren Phthalate DEHP und DNOP, was ohne Vortrennung ausschließlich anhand des Fragmentierungsmusters erfolgen kann.

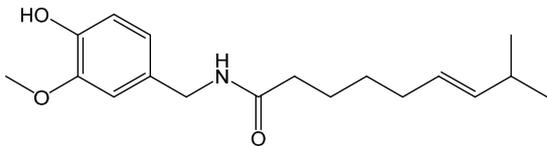
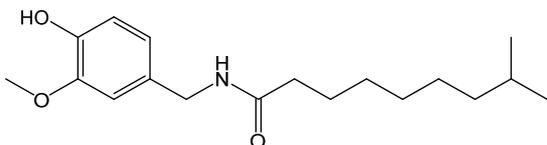
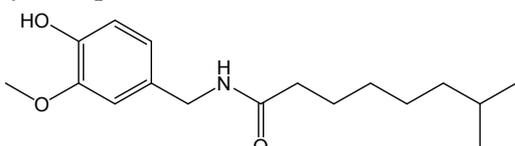
3.3.3 Analyse von Capsaicinoiden in Chili-Produkten

Das vorliegende Kapitel sowie die folgenden zwei Kapitel (Kapitel 3.3.4 und 3.3.5) dieser Arbeit beinhalten Ergebnisse aus der Bachelorarbeit „Potential und Limitierungen der DIP-APCI-MS“ von REIN [279].

Chilis sind Pflanzen der Gattung *Capsicum* innerhalb der Familie der *Solanaceae*, welche aufgrund ihrer Schärfe sowie ihres Aromas und Geschmacks eine große Bedeutung als

Lebensmittelzutat haben [280]. Verantwortlich für die Schärfe von Chilis sind Capsaicinoide, unter denen Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin vorherrschen [280-282]. Tabelle 16 zeigt die Strukturformeln der in Chili vorherrschenden Capsaicinoide und gibt die m/z -Verhältnisse der $[M + H]^+$ -Ionen an. Die gezeigten Capsaicinoide sollten mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS direkt in verschiedenen Chilis und Chili-haltigen Zubereitungen nachgewiesen und ihre Identität über MS/MS-Experimente bestätigt werden.

Tabelle 16: Capsaicinoide in Chili.

| Capsaicinoid | theoretisches m/z |
|---|------------------------------|
| Capsaicin ($C_{18}H_{27}NO_3$)  | $[M + H]^+$: m/z 306,2 |
| Dihydrocapsaicin ($C_{18}H_{29}NO_3$)  | $[M + H]^+$: m/z 308,2 |
| Nordihydrocapsaicin ($C_{17}H_{27}NO_3$)  | $[M + H]^+$: m/z 294,2 |

Zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens der gezeigten Capsaicinoide wurde zunächst eine Standardmischung der Capsaicinoide (65 % Capsaicin, 30 % Dihydrocapsaicin und 5 % Nordihydrocapsaicin) mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS und -MS/MS analysiert. Der prozentuale Anteil der einzelnen Capsaicinoide an der Capsaicinoid-Standardmischung entspricht einer typischerweise in Chili vorkommenden Capsaicinoidzusammensetzung.

Abbildung 60 zeigt das Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der DIP-APCI-MS Analyse der Standardmischung der Capsaicinoide. Zu erkennen ist hier die Detektion der $[M + H]^+$ -Ionen von Capsaicin (m/z 306), Dihydrocapsaicin (m/z 308) und Nordihydrocapsaicin (m/z 294). Des Weiteren treten Signale mit den m/z -Verhältnissen 137 und 172 auf,

wobei sich m/z 137, wie im Folgenden näher erläutert, auf ein Fragment der Capsaicinoide zurückführen lässt.

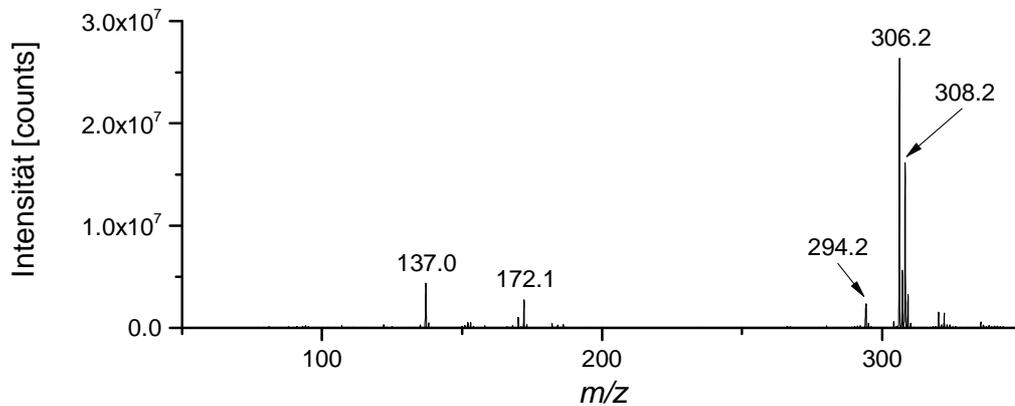


Abbildung 60: Massenspektrum (gemittelt über die gesamte Analysendauer) der DIP-APCI-MS Analyse der Standardmischung der Capsaicinoide.

In Abbildung 61 ist das Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Capsaicin aus der Standardmischung der Capsaicinoide dargestellt. Im MS/MS-Experiment fragmentiert Capsaicin (m/z 306) durch CID zu Fragmenten mit den m/z -Verhältnissen 137, 153, 170 und 182. Die detektierten Fragmente des Capsaicins sind alle in der Literatur beschrieben. Sie wurden bereits bei Analysen mittels ESI-MS/MS [282] sowie APCI-MS/MS [281] nachgewiesen. Abbildung 62 zeigt mögliche Fragmentierungswege des Capsaicins (nach [281,282]), die die Entstehung der detektierten Fragmente erklären. Bei dem Fragment mit dem m/z -Verhältnis 137 handelt es sich um das charakteristische Fragment aller Capsaicinoide, welches bereits durch Fragmentierung in der Ionenquelle während der DIP-APCI-MS Analyse entsteht.

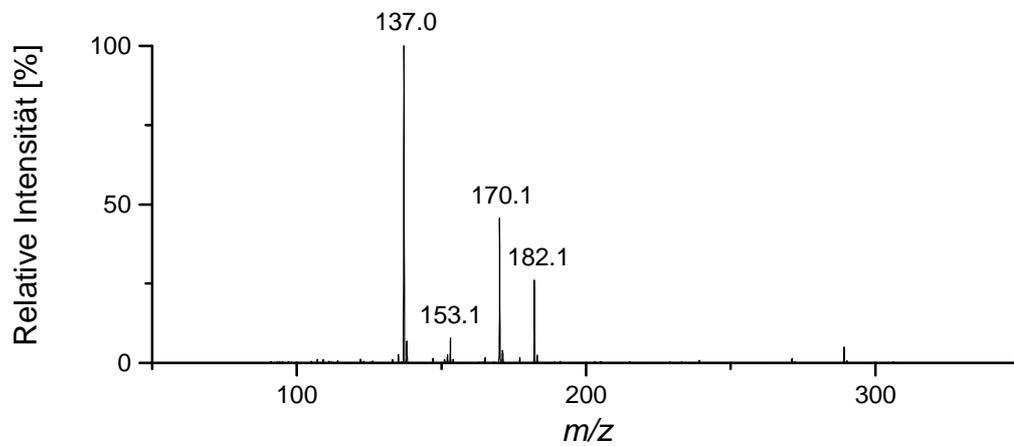


Abbildung 61: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Capsaicin (MS/MS von m/z 306) aus der Standardmischung der Capsaicinoide.

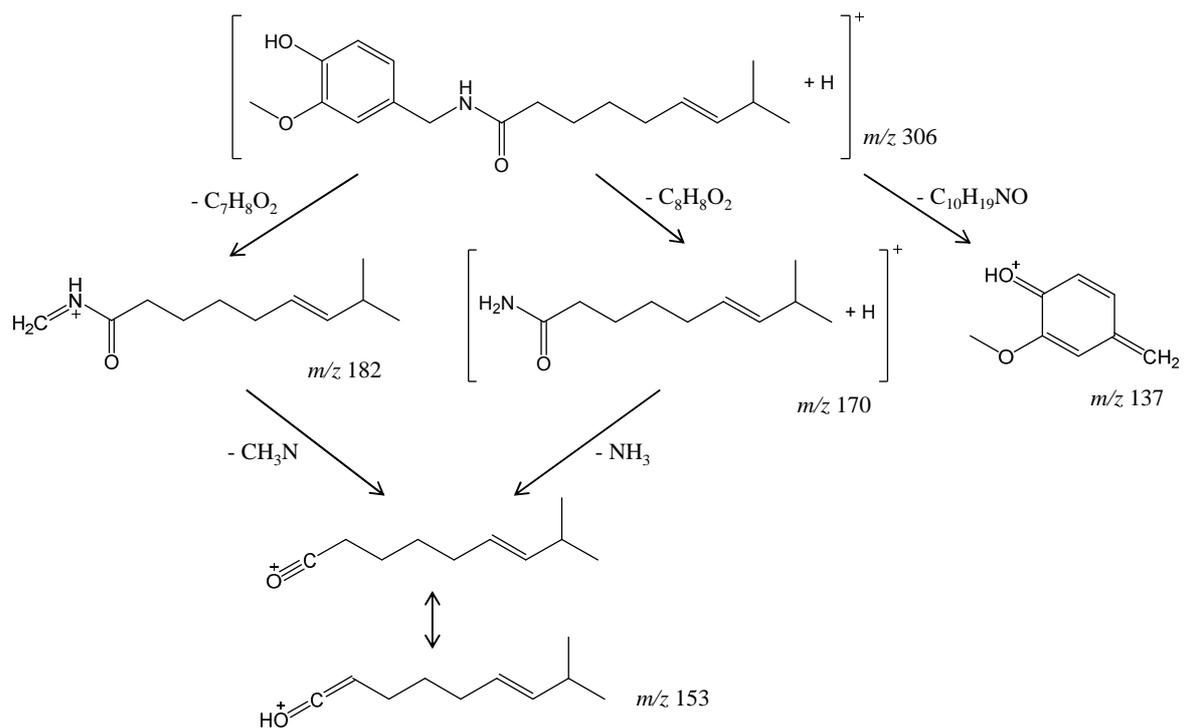


Abbildung 62: Vorgeschlagnene Fragmentierungswege von Capsaicin, modifiziert aus [281,282].

Wie in Abbildung 63 zu erkennen, bildet Dihydrocapsaicin im MS/MS-Experiment lediglich zwei Fragmente. Es entsteht das für Capsaicinoide typische Fragment mit dem m/z -Verhältnis

137, sowie ein Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 184. Mögliche Fragmentierungswege, die zur Entstehung dieser Fragmente führen, entsprechen den Fragmentierungswegen des Capsaicins und sind in Abbildung 64 dargestellt.

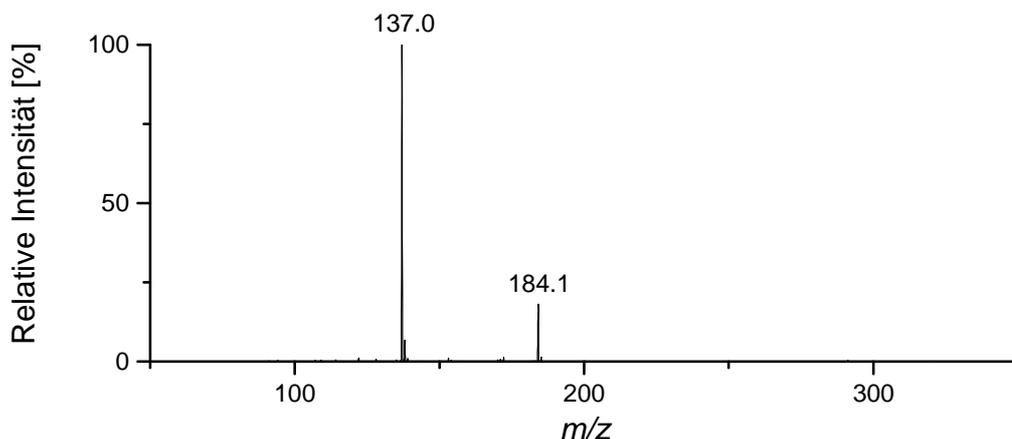


Abbildung 63: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Dihydrocapsaicin (MS/MS von m/z 308) aus der Standardmischung der Capsaicinoide.

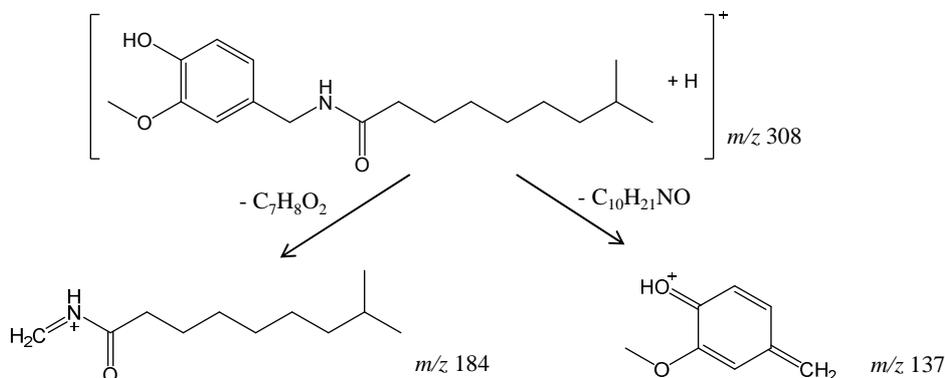


Abbildung 64: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Dihydrocapsaicin.

Analog zur Fragmentierung des Dihydrocapsaicins bildet Nordihydrocapsaicin im MS/MS-Experiment zwei Fragmente mit den m/z -Verhältnissen 137 und 170. Abbildung 65 zeigt das Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse des Nordihydrocapsaicins aus der Standardmischung der Capsaicinoide und Abbildung 66 stellt mögliche Fragmentierungswege des Nordihydrocapsaicins dar. Zusätzlich zu den Fragmenten des Nordihydrocapsaicins ist im Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse des Nordihydrocapsaicins ein Signal mit einem

m/z -Verhältnis von 306 zu erkennen (vgl. Abbildung 65). Dies könnte auf eine Rekombination von Fragmenten des Nordihydrocapsaicins zurückzuführen sein.

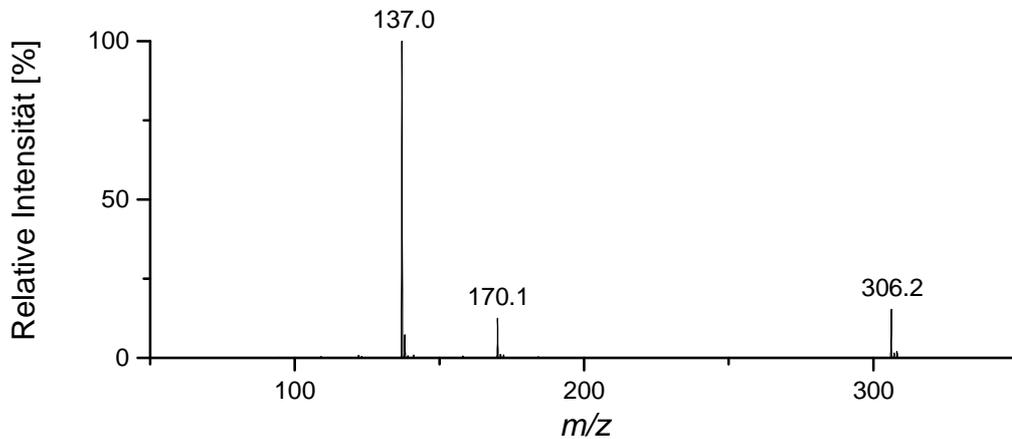


Abbildung 65: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Nordihydrocapsaicin (MS/MS von m/z 294) aus der Standardmischung der Capsaicinoide.

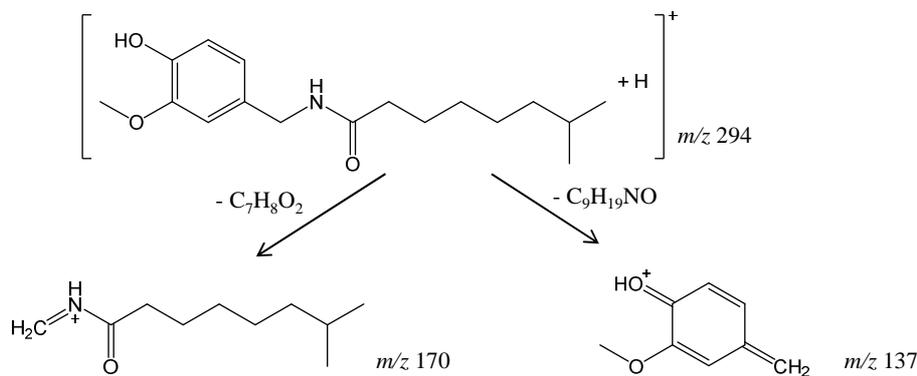


Abbildung 66: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Nordihydrocapsaicin.

Zur Untersuchung der Möglichkeit des Nachweises der Capsaicinoide in realen Proben wurde gemahlener Cayennepfeffer, Sambal Oelek sowie Extrakte aus einer roten und einer grünen Jalapeño mittels DIP-APCI-MS und -MS/MS analysiert. Mittels DIP-APCI-MS konnten in allen analysierten Proben m/z -Signale, die sich auf Capsaicin (m/z 306) und Dihydrocapsaicin (m/z 308) zurückführen lassen, detektiert werden. Die DIP-APCI-MS Analyse der Extrakte der roten und grünen Jalapeño zeigten zusätzlich ein Signal mit einem m/z -Verhältnis von 294, welches von Nordihydrocapsaicin stammen könnte. MS/MS-Experimente der genannten m/z -

Signale bestätigen, dass diese auf die jeweiligen Capsaicinoide zurückzuführen sind. Tabelle 17 zeigt die in den MS/MS-Experimenten detektierten m/z -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

Tabelle 17: Während der DIP-APCI-MS/MS Analyse der Standardmischung der Capsaicinoide sowie der realen Proben detektierte m/z -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten.

| Probe | Capsaicinoid | m/z des <i>Precursors</i> | Detektierte m/z -Signale (relative Intensitäten in Klammern) |
|---------------------------|---------------------|--------------------------------|---|
| Capsaicinoid- Standard | Capsaicin | 306.2 | 137.0 (100), 153.1 (8), 170.1 (46), 182.1 (26) |
| | Dihydrocapsaicin | 308.2 | 137.0 (100), 184.1 (18) |
| | Nordihydrocapsaicin | 294.2 | 137.0 (100), 170.1 (13), 306.2 (15) |
| Cayennepfeffer | Capsaicin | 306.2 | 137.0 (100), 153.1 (8), 170.1 (47), 182.1 (27), 306.2 (80) |
| | Dihydrocapsaicin | 308.2 | 137.0 (100), 184.1 (18) |
| Sambal Oelek | Capsaicin | 306.2 | 137.0 (100), 153.1 (7), 170.1 (43), 182.1 (26) |
| | Dihydrocapsaicin | 308.2 | 137.0 (100), 184.1 (18) |
| Jalapeño rot | Capsaicin | 306.2 | 137.0 (100), 153.1 (7), 170.1 (44), 182.1 (26) |
| | Dihydrocapsaicin | 308.2 | 137.0 (100), 184.1 (20) |
| | Nordihydrocapsaicin | 294.2 | 137.0 (100), 170.1 (14), 306.2 (17) |
| Jalapeño grün | Capsaicin | 306.2 | 137.0 (100), 153.1 (8), 170.1 (45), 182.1 (26) |
| | Dihydrocapsaicin | 308.2 | 137.0 (100), 184.1 (19) |
| | Nordihydrocapsaicin | 294.2 | 137.0 (100), 170.1 (15), 306.2 (11) |

Die bei der Analyse der Proben detektierten Fragmente und ihre relativen Intensitäten stimmen sehr gut mit den bei der Analyse der Standardmischung der Capsaicinoide detektierten Fragmenten und ihren relativen Intensitäten überein. Einziger auffälliger Unterschied ist, dass Capsaicin bei Analyse des Cayennepfeffers unvollständig fragmentiert. Die Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse der auf Capsaicinoide untersuchten Proben sind in

Abbildung 134 bis Abbildung 137 im Anhang dargestellt. Bei Betrachtung der Massenspektren der DIP-APCI-MS Analysen fällt auf, dass im Fall der roten Jalapeño deutlich höhere Signalintensitäten der Capsaicinoide erreicht wurden, als im Fall der grünen Jalapeño. Dies könnte darauf hinweisen, dass die rote Jalapeño einen höheren Schärfegrad aufweist, als die grüne Jalapeño.

3.3.4 Wirkstoffanalyse von Schmerzmitteln

Die Wirkstoffanalyse pharmazeutischer Proben stellt ein wichtiges Anwendungsgebiet der ambienten Massenspektrometrie dar, da diese eine schnelle Analyse von Tabletten oder Salben ohne Probenvorbereitung und somit beispielsweise schnelle Authentizitätsprüfungen erlaubt. In der Literatur sind Beispiele für den Einsatz von nahezu allen ambienten Ionisationsmethoden zur Wirkstoffanalyse pharmazeutischer Proben beschrieben (DESI [43,46,47], EASI [68], DART [117], ASAP [148], DAPPI [174], PADI [180], LTP [182], FA-APGD [183]).

Um die Möglichkeiten der direkten Wirkstoffanalyse pharmazeutischer Proben mittels DIP-APCI-MS zu überprüfen, wurden Schmerzmittel in Tabletten- und Salbenform sowie Antibiotika in Tablettenform analysiert. Bei Detektion von m/z -Signalen, welche sich auf $[M + H]^+$ -Ionen der Wirkstoffe zurückführen lassen könnten, wurde die Identität dieser m/z -Signale mit Hilfe von MS/MS-Experimenten bestätigt.

Bei den analysierten Schmerzmitteln handelt es sich um die gängigsten frei verkäuflichen Produkte, welche die Wirkstoffe Acetylsalicylsäure (Aspirin Tablette und Aspirin-Effect Pulver), Diclofenac (Voltaren Dolo Tablette und Voltaren Schmerzgel), Ibuprofen (IbuHEXAL Tablette und Ibutop Schmerzcreme), Paracetamol (Tablette) und Naproxen (Dolormin für Frauen, Tablette) enthalten. Mittels DIP-APCI-MS konnte bei der Analyse aller untersuchten Schmerzmittel ein m/z -Signal, welches sich auf das $[M + H]^+$ -Ion des Wirkstoffs zurückführen lässt, detektiert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der DIP-APCI-MS Analyse der einzelnen Schmerzmittel beschrieben und die Fragmentierungen der Wirkstoffe im MS/MS-Experiment dargestellt.

Abbildung 67 und Abbildung 68 zeigen die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Aspirin Tablette und des Aspirin-Effect Pulvers mit dem Wirkstoff Acetylsalicylsäure.

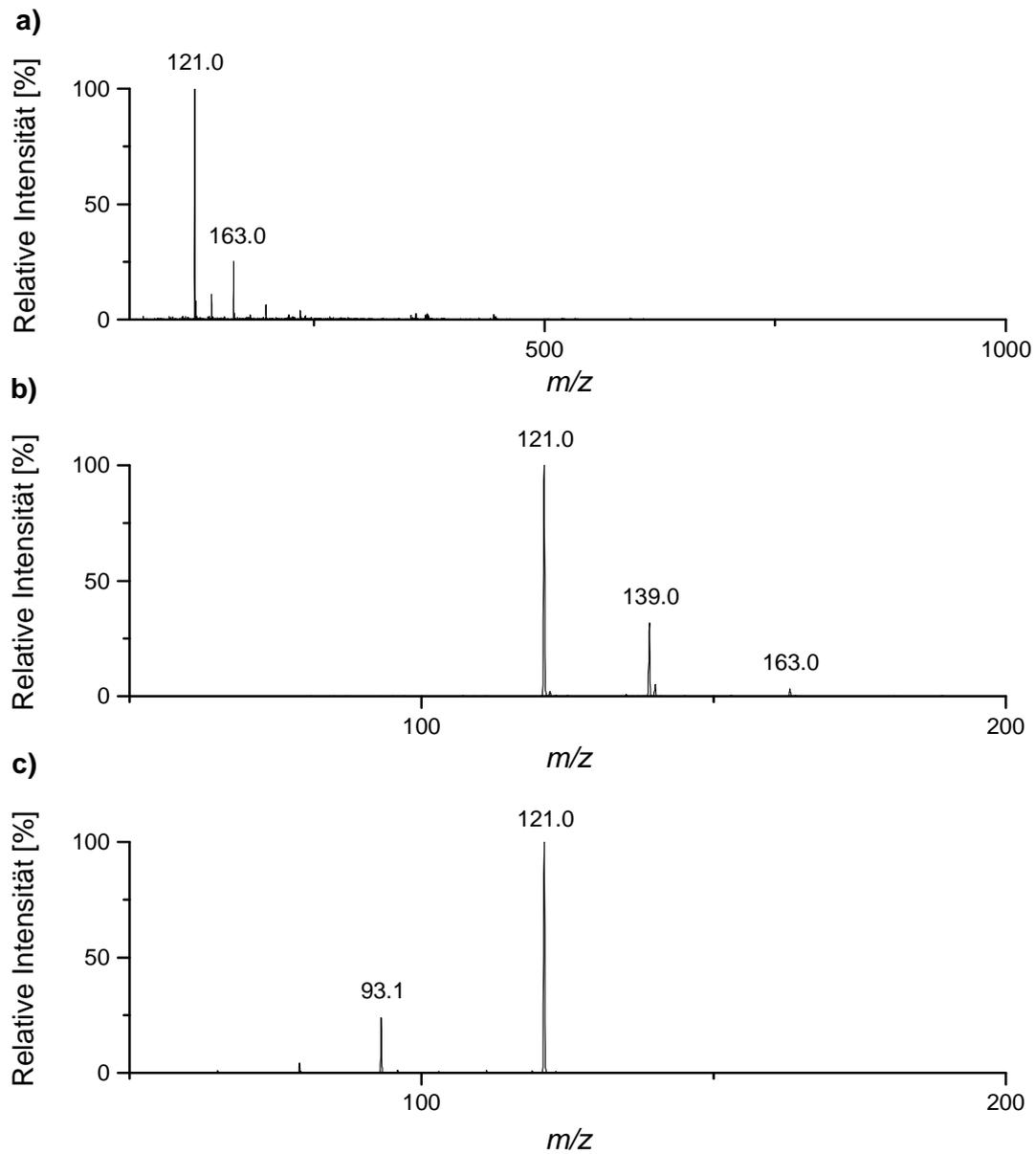


Abbildung 67: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Aspirin Tablette (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 181; (c) MS³ von m/z 181 → m/z 121.

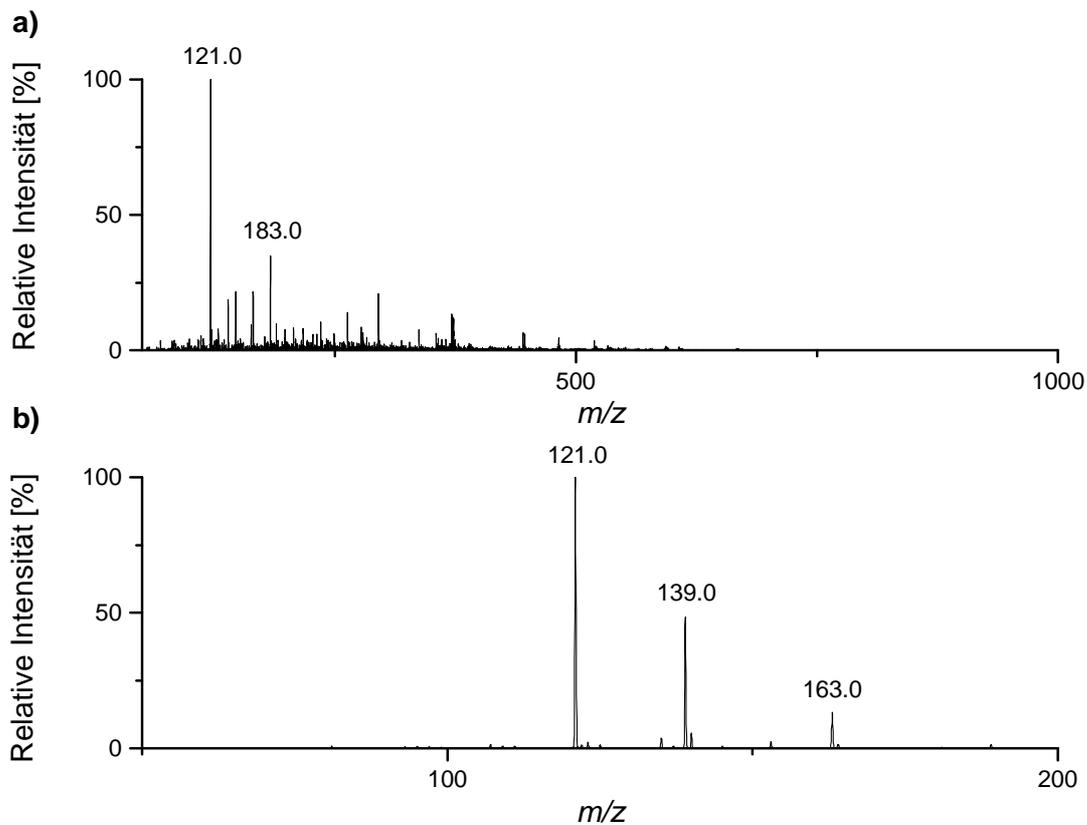


Abbildung 68: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von Aspirin-Effect Pulver (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 181.

Im über die gesamte Analysendauer gemittelten Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse sowohl der Aspirin Tablette, als auch des Aspirin-Effect Pulvers, ist das m/z -Signal des $[M + H]^+$ -Ions der Acetylsalicylsäure (m/z 181) lediglich in sehr geringer Intensität zu erkennen. Im MS/MS-Experiment fragmentiert m/z 181 zu Fragmenten mit den m/z -Verhältnissen 121, 139 und 163 (vgl. Abbildung 67b und Abbildung 68b). Diese m/z -Signale wurden bereits in der DIP-APCI-MS Analyse der Aspirin Tablette und des Aspirin-Effect Pulvers detektiert, was darauf hinweist, dass Acetylsalicylsäure bereits in der Ionenquelle fragmentiert. Die im MS/MS-Experiment von m/z 181 detektierten Fragmente wurden auch während der DESI-MS/MS Analyse von Acetylsalicylsäure nachgewiesen [283]. WILLIAMS et al. schlagen die in Abbildung 69 dargestellten Fragmentierungswege der Acetylsalicylsäure vor, um die Entstehung der detektierten Fragmente zu erklären. Hinsichtlich m/z 121 postulieren sie, dass die Bildung

des ortho-Hydroxybenzoylkations aufgrund der Delokalisierung der positiven Ladung energetisch bevorzugt ist [283]. Im MS³-Experiment fragmentiert m/z 121 zu m/z 93 (vgl. Abbildung 67c), was sich durch die Abspaltung von Wasser erklären lässt und bei beiden vorgeschlagenen Fragmenten mit dem m/z -Verhältnis von 121 möglich sein sollte.

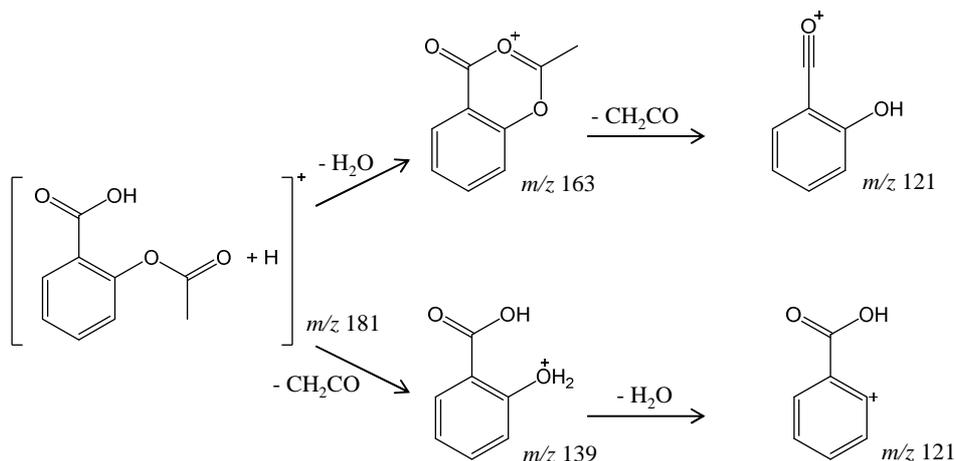


Abbildung 69: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Acetylsalicylsäure [283].

Abbildung 70 und Abbildung 71 zeigen die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Voltaren Dolo Tablette und des Voltaren Schmerzgels. Das $[M + H]^+$ -Ion des in diesen beiden Schmerzmitteln enthaltenen Wirkstoffs Diclofenac weist ein m/z -Verhältnis von 296 auf.

In der DIP-APCI-MS Analyse der Voltaren Dolo Tablette ist das Signal des $[M + H]^+$ -Ions von Diclofenac (m/z 296) nur mit sehr geringer Intensität zu erkennen (vgl. Abbildung 70a). Mit höherer Intensität detektiert wird ein Signal mit einem m/z -Verhältnis von 278, welches das für ein Molekül mit zwei Cl-Atomen typische Isotopenmuster aufweist. m/z 278 entsteht, wie im Folgenden näher erläutert, auch im MS/MS-Experiment von m/z 296 und lässt sich auf das Produkt einer Wasserabspaltung von Diclofenac zurückführen. Zusätzlich wird in der DIP-APCI-MS Analyse der Voltaren Dolo Tablette ein Signal mit einem m/z -Verhältnis von 557 detektiert. Dieses lässt sich auf ein Dimer des Diclofenacs nach Abspaltung von Wasser zurückführen, wobei eines der Diclofenac-Moleküle ein ³⁷Cl-Isotop enthält. Das typische Cl-Isotopenmuster ist auch hier zu erkennen.

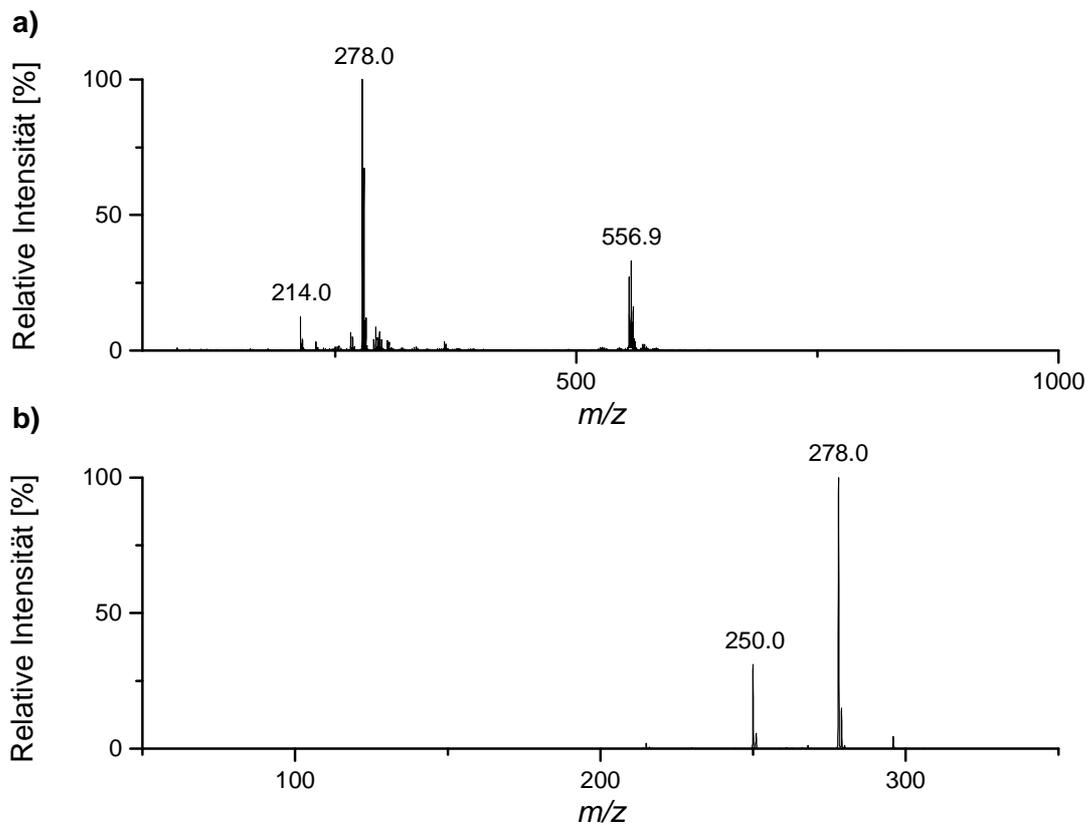


Abbildung 70: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Voltaren Dolo Tablette (Wirkstoff: Diclofenac); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 296.

Im Unterschied zur DIP-APCI-MS Analyse der Voltaren Dolo Tablette ist im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse des Voltaren Schmerzgels das Signal des $[M + H]^+$ -Ions von Diclofenac (m/z 296) als Signal höchster Intensität zu erkennen (vgl. Abbildung 71a). Zusätzlich wird mit m/z 278 das Produkt einer Wasserabspaltung aus Diclofenac detektiert. Der Grund, warum Diclofenac im Fall des Voltaren Schmerzgels nur zu einem geringen Anteil einer Wasserabspaltung in der Ionenquelle unterliegt, ist unklar. Zusätzlich zu den auf den Wirkstoff Diclofenac zurückzuführenden m/z -Signalen sind im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse des Voltaren Schmerzgels eine Reihe weiterer m/z -Signale zu erkennen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Voltaren Schmerzgel im Unterschied zur Voltaren Dolo Tablette neben dem Wirkstoff eine Reihe an Hilfsstoffen enthält.

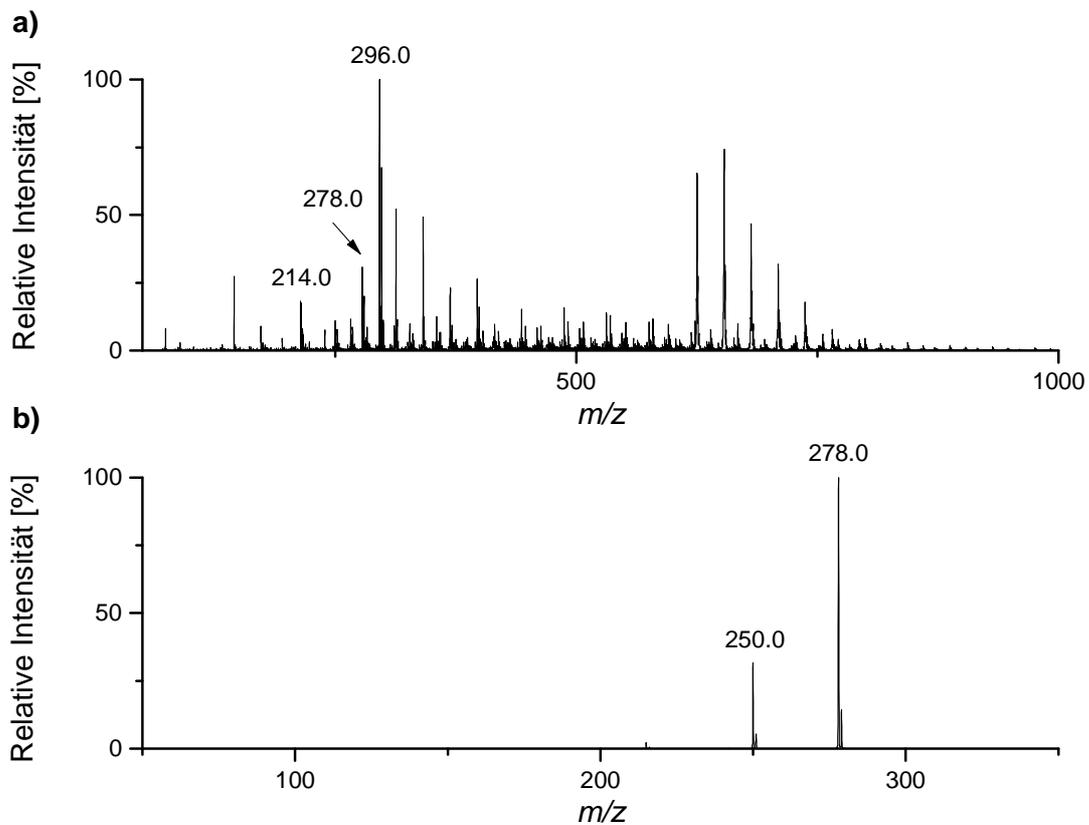


Abbildung 71: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse des Voltaren Schmerzgels (Wirkstoff: Diclofenac); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von *m/z* 296.

Im MS/MS-Experiment bildet *m/z* 296 aus der Voltaren Dolo Tablette (Abbildung 70b) und dem Voltaren Schmerzgel (Abbildung 71b) Fragmente mit den *m/z*-Verhältnissen 278 und 250. Hierbei handelt es sich um in der Literatur beschriebene Fragmente des Diclofenacs, die nach GALMIER et al. durch Abspaltungen von Wasser und CO entstehen [284]. Die entsprechenden Fragmentierungswege des Diclofenacs sind in Abbildung 72 dargestellt.

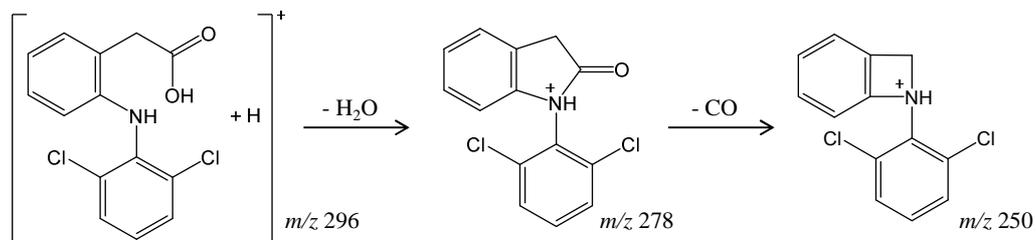


Abbildung 72: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Diclofenac [284].

In Abbildung 73 und Abbildung 74 sind die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer IbuHEXAL Tablette und der Ibutop Schmerzcreme dargestellt. Das $[M + H]^+$ -Ion des in diesen Schmerzmitteln enthaltenen Wirkstoffs Ibuprofen besitzt ein m/z -Verhältnis von 207.

Im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse der IbuHEXAL Tablette (Abbildung 73a) sind neben m/z 207 Signale mit den m/z -Verhältnissen 413 und 161 zu erkennen. Bei m/z 413 handelt es sich höchstwahrscheinlich um das $[2M + H]^+$ -Ion des Ibuprofens. m/z 161 wird auch im MS/MS-Experiment aus m/z 207 gebildet und ist somit auf Fragmentierungen des Ibuprofens in der Ionenquelle zurückzuführen.

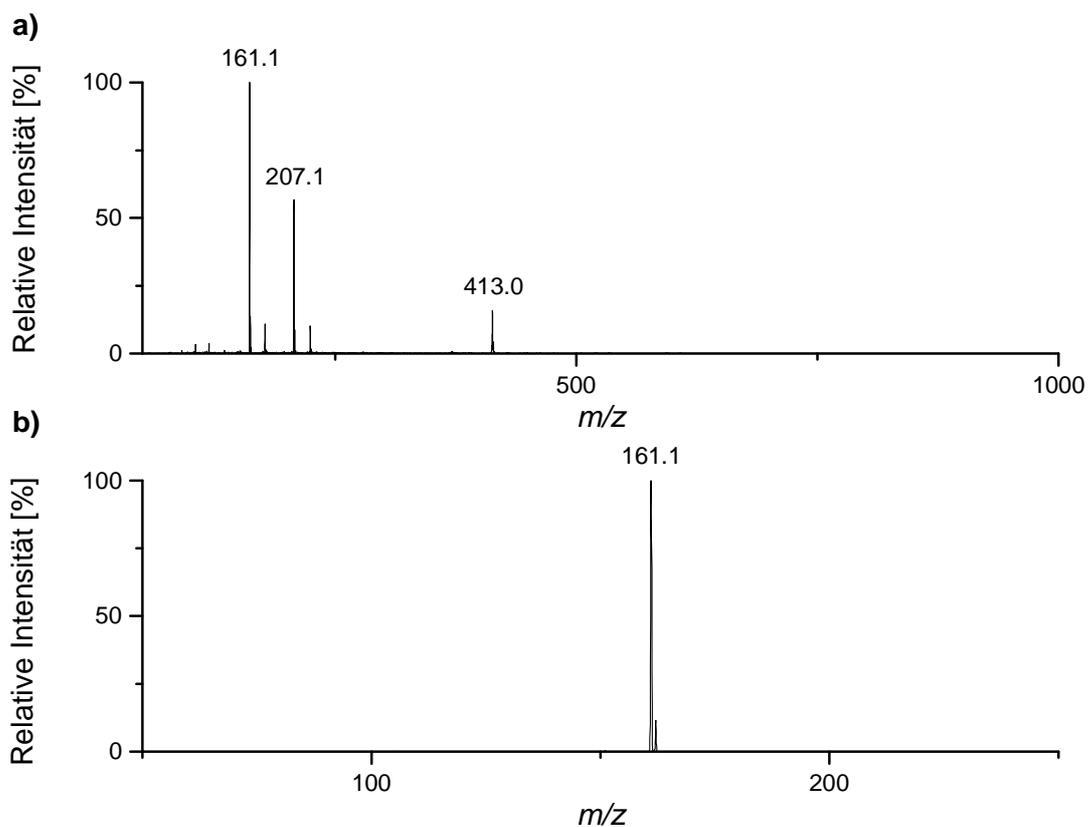


Abbildung 73: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer IbuHEXAL Tablette (Wirkstoff: Ibuprofen); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 207.

In der DIP-APCI-MS Analyse der Ibutop Schmerzcreme werden neben m/z 207 und m/z 161 eine Reihe weiterer m/z -Signale detektiert. Dies lässt sich, wie im Fall des Voltaren Schmerzgels, durch das Vorhandensein von verschiedenen Hilfsstoffen erklären.

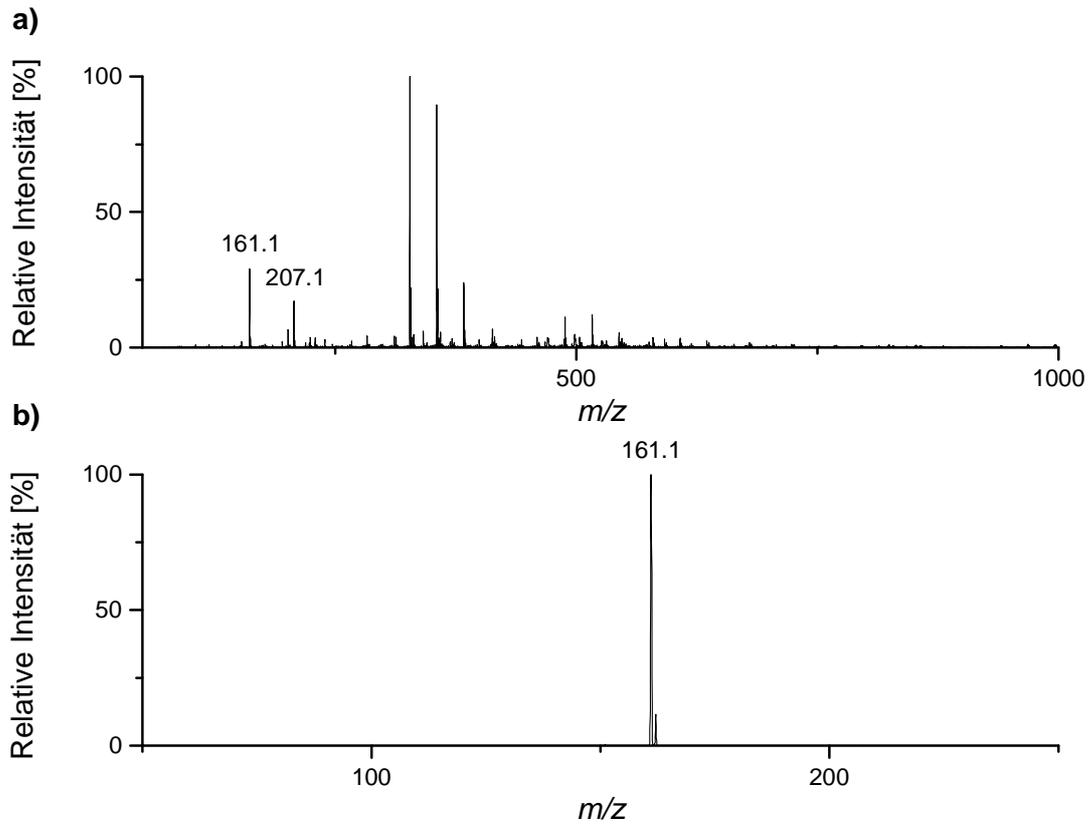


Abbildung 74: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse der Ibutop Schmerzcreme (Wirkstoff: Ibuprofen); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 207.

Im MS/MS-Experiment fragmentiert m/z 207 aus der IbuHEXAL Tablette (Abbildung 73 b) und der Ibutop Schmerzcreme (Abbildung 74b) zu einem Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 161. Dies könnte sich, wie in Abbildung 75 gezeigt, durch die Abspaltung von Wasser und CO erklären lassen.

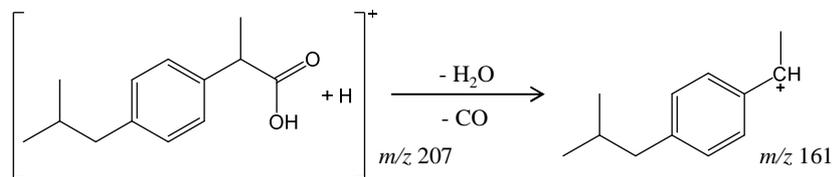


Abbildung 75: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Ibuprofen.

Abbildung 76 zeigt die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Paracetamol Tablette. Mittels DIP-APCI-MS wurde das m/z -Signal des $[M + H]^+$ -Ions des Wirkstoffs Paracetamol (m/z 152) sowie ein Signal mit einem m/z -Verhältnis von 303 detektiert (vgl. Abbildung 76a), welches sich auf das $[2M + H]^+$ -Ion des Paracetamols zurückführen lässt.

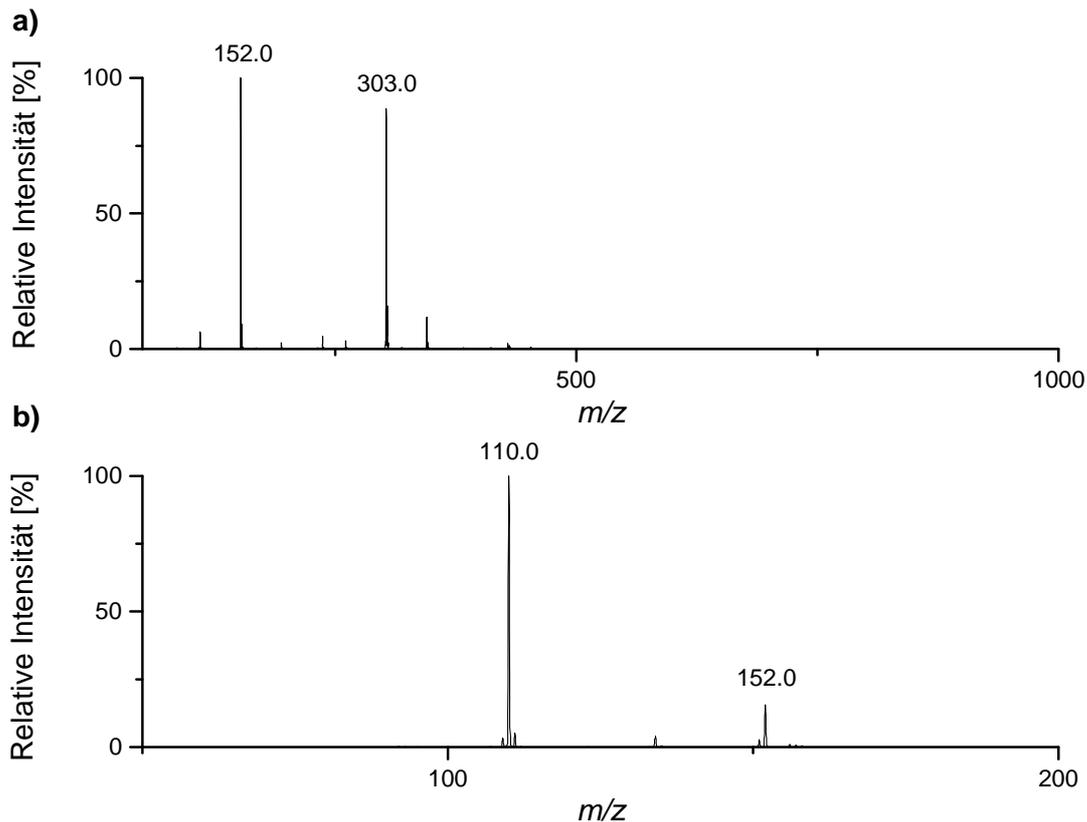


Abbildung 76: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Paracetamol Tablette (Wirkstoff: Paracetamol); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 152.

Im MS/MS-Experiment fragmentiert m/z 152 aus der Paracetamol Tablette zu m/z 110. Dies könnte sich durch den in Abbildung 77 dargestellten Fragmentierungsweg des Paracetamols erklären lassen.

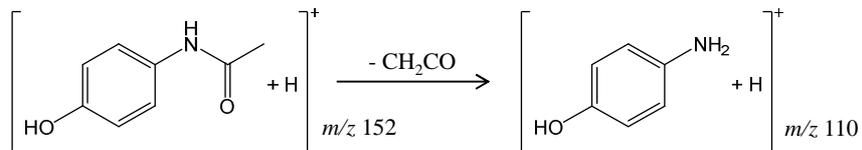


Abbildung 77: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Paracetamol.

In Abbildung 78 sind die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Dolormin für Frauen Tablette dargestellt. Dolormin für Frauen enthält den Wirkstoff Naproxen, dessen $[M + H]^+$ -Ion weist ein m/z -Verhältnis von 231 auf. Im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse ist die Detektion von Signalen mit den m/z -Verhältnissen 231 sowie 185 zu erkennen (vgl. Abbildung 78a). Bei m/z 185 handelt es sich um das ebenfalls im MS/MS-Experiment von m/z 231 gebildete Fragment (vgl. Abbildung 78b), welches bereits durch Fragmentierung in der Ionenquelle entsteht.

Die Entstehung des im MS/MS-Experiment gebildeten Fragments mit einem m/z -Verhältnis von 185 lässt sich, wie in Abbildung 79 vorgeschlagen, durch Abspaltung von Wasser und CO vom Naproxen erklären.

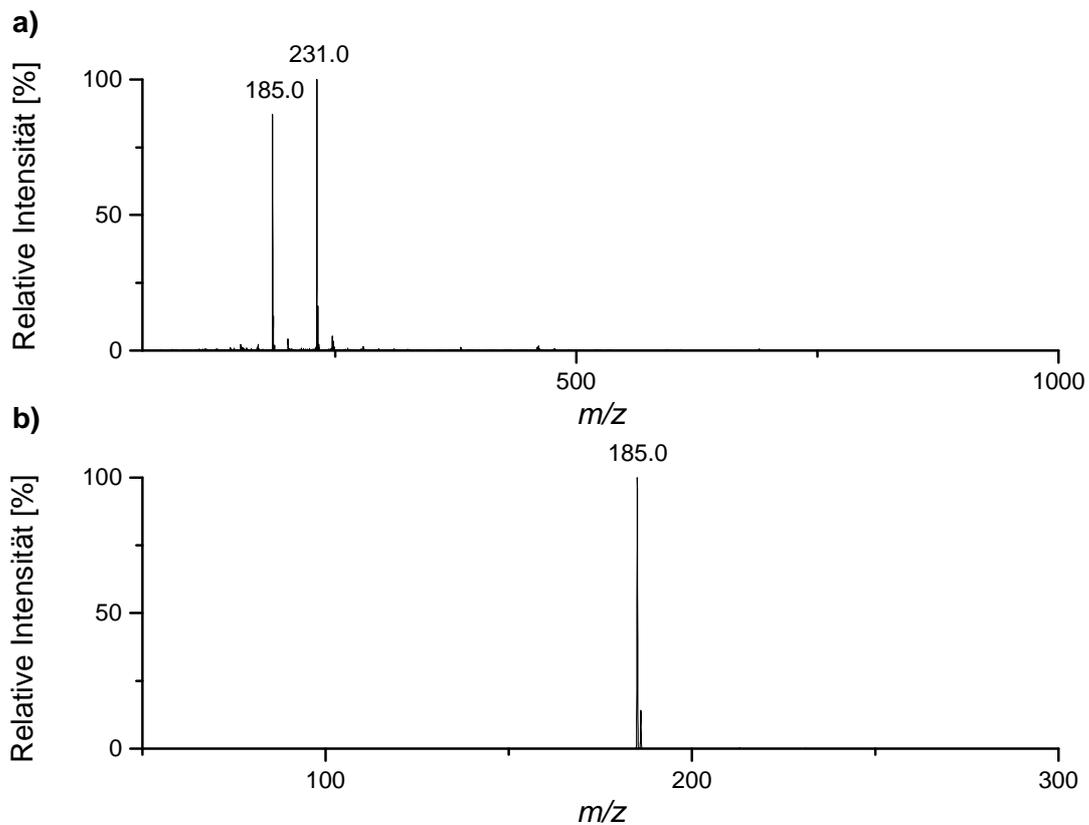


Abbildung 78: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Dolormin für Frauen Tablette (Wirkstoff: Naproxen); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 231.

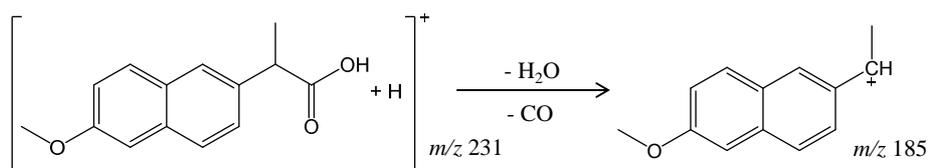


Abbildung 79: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Naproxen.

Die gezeigten Ergebnisse der DIP-APCI-MSⁿ Analyse der Schmerzmittel zeigen, dass eine direkte Detektion der Wirkstoffe der Tabletten und Salben ohne jegliche Probenvorbereitung mittels DIP-APCI-MS möglich ist. Eine Absicherung der Identität der detektierten m/z -Signale der Wirkstoffe kann mit Hilfe von MS/MS-Experimenten erfolgen. Bei allen analysierten Schmerzmitteln trat bereits in der Ionenquelle eine Fragmentierung der enthaltenen Wirkstoffe in

unterschiedlichen Ausmaßen auf. Auch diese Fragmentierung in der Ionenquelle kann als Identifizierungsmerkmal der Wirkstoffe herangezogen werden.

3.3.5 Wirkstoffanalyse von Antibiotika

Zur Untersuchung der Möglichkeiten der direkten Wirkstoffanalyse pharmazeutischer Proben mittels DIP-APCI-MS wurden neben der Analyse von Schmerzmitteln Antibiotika analog zur Analyse der Schmerzmittel analysiert. Bei den untersuchten Antibiotika handelt es sich um die Produkte Clarithromycin (Wirkstoff: Clarithromycin), Eremfat (Wirkstoff: Rifampicin) und EMB-Fatol (Wirkstoff: Ethambutol).

Mittels DIP-APCI-MS konnte bei der Analyse aller untersuchten Antibiotika ein m/z -Signal, welches sich auf das $[M + H]^+$ -Ion des Wirkstoffs zurückführen lässt, detektiert werden. Die DIP-APCI-MS Analyse der einzelnen Antibiotika wird im Folgenden beschrieben und die Fragmentierungen der Wirkstoffe im MS/MS-Experiment erläutert.

Abbildung 80 zeigt die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Clarithromycin Tablette. Im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse ist m/z 748 als Signal höchster Intensität zu erkennen (vgl. Abbildung 80a). Bei m/z 748 handelt es sich um das $[M + H]^+$ -Ion des Wirkstoffs Clarithromycin. Im MS/MS-Experiment fragmentiert m/z 748 aus der Clarithromycin Tablette zu Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 716, 590 und 558 (vgl. Abbildung 80b).

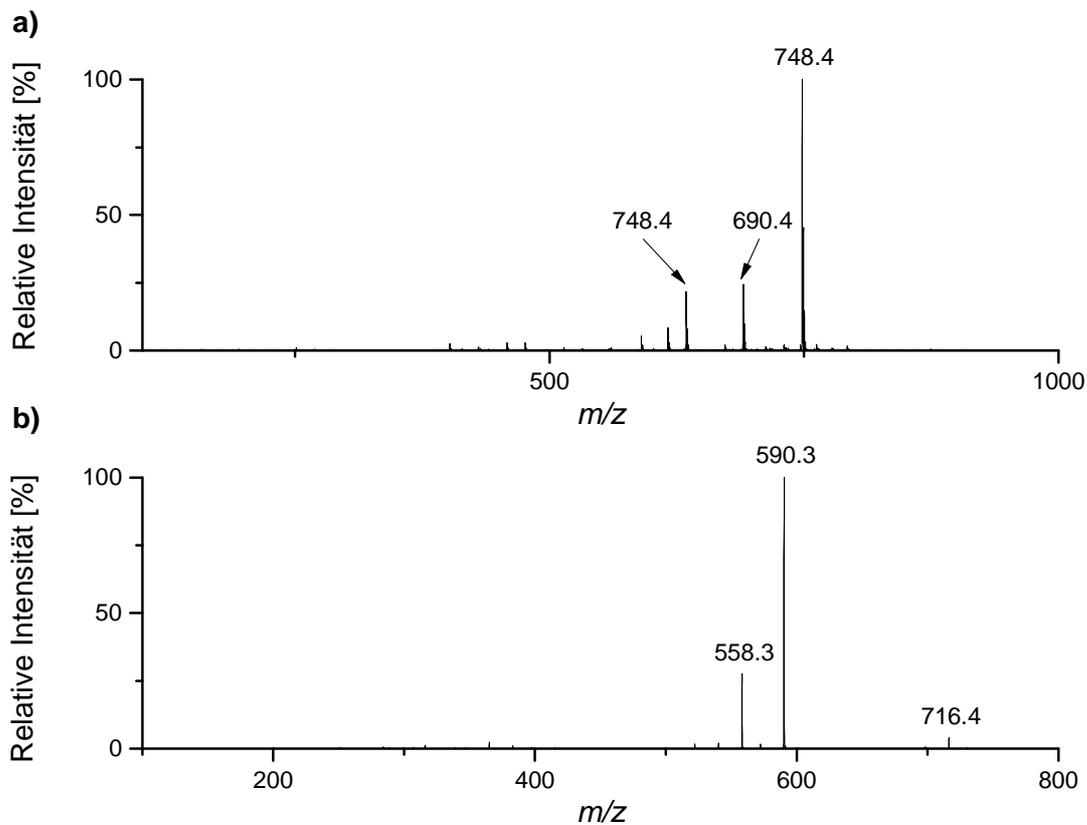


Abbildung 80: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Clarithromycin Tablette (Wirkstoff: Clarithromycin); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 748.

Mögliche Fragmentierungswege von Clarithromycin (m/z 748), die zur Entstehung der im MS/MS-Experiment detektierten Fragmente führen, sind in Abbildung 81 dargestellt. m/z 590 kann durch Abspaltung des Aminozucker-Rests aus m/z 748 hervorgehen. Die Abspaltungen von Methanol von m/z 748 bzw. m/z 590 führen zu Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 716 bzw. 558. Die Abspaltung von Methanol kann, wie in Abbildung 81 gezeigt, am Hauptring des Clarithromycins erfolgen, oder aber die Methylethergruppe des Zucker-Rests wird abgespalten.

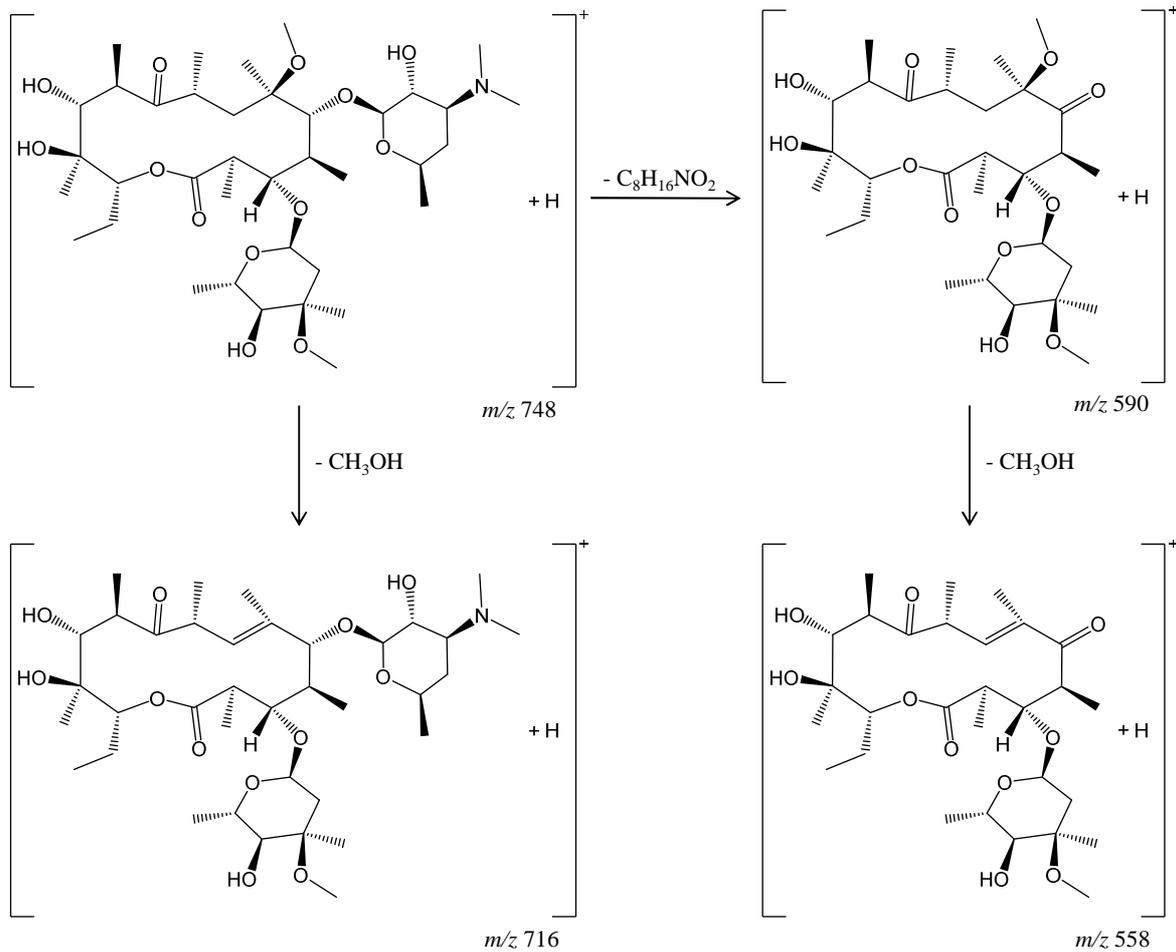


Abbildung 81: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Clarithromycin.

In Abbildung 82 sind die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse der Eremfat Tablette mit dem Wirkstoff Rifampicin gezeigt. Das $[M + H]^+$ -Ion von Rifampicin besitzt ein m/z -Verhältnis von 823 und ist im Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse als Signal höchster Intensität zu erkennen (vgl. Abbildung 82a). Zusätzlich wird ein Signal mit einem m/z -Verhältnis von 791 detektiert, bei dem es sich um das ebenfalls im MS/MS-Experiment von m/z 823 gebildete Fragmentierungsprodukt handelt (vgl. Abbildung 82b). Die Fragmentierung von m/z 823 zu m/z 791 lässt sich, wie in Abbildung 83 gezeigt, durch Abspaltung von Methanol vom Rifampicin erklären.

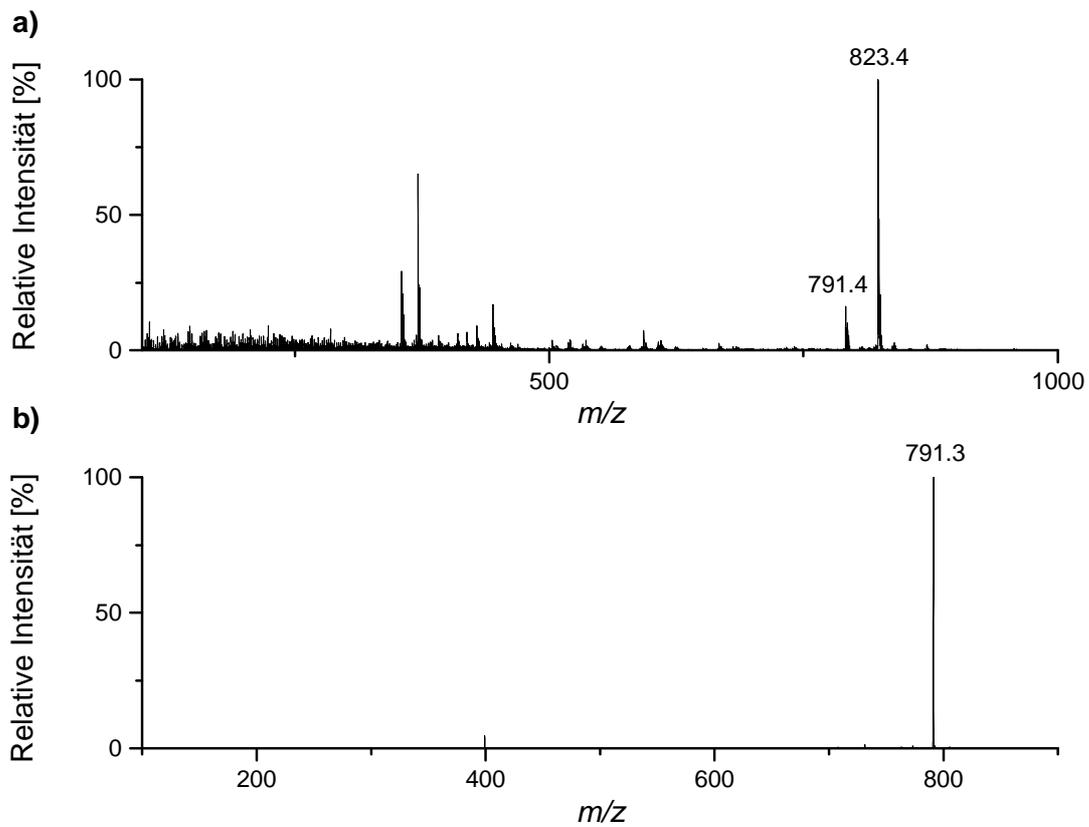


Abbildung 82: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer Eremfat Tablette (Wirkstoff: Rifampicin); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 823.

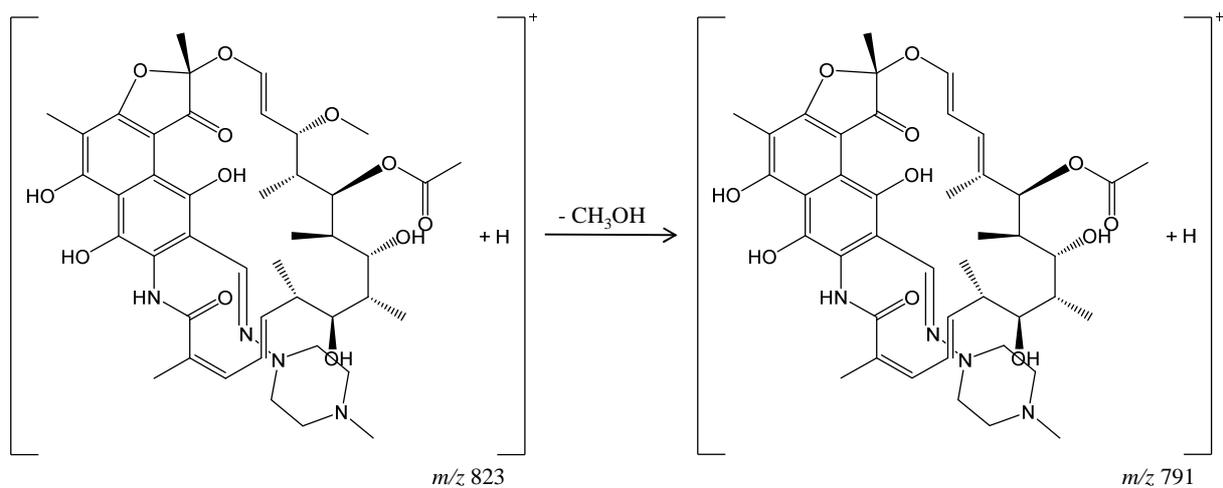


Abbildung 83: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Rifampicin.

Abbildung 84 zeigt die Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer EMB-Fatol Tablette. Das $[M + H]^+$ -Ion des in der EMB-Fatol Tablette enthaltenen Wirkstoffs Ethambutol weist ein m/z -Verhältnis von 205 auf. m/z 205 wurde in der DIP-APCI-MS Analyse der EMB-Fatol Tablette in hoher Intensität detektiert (vgl. Abbildung 84a).

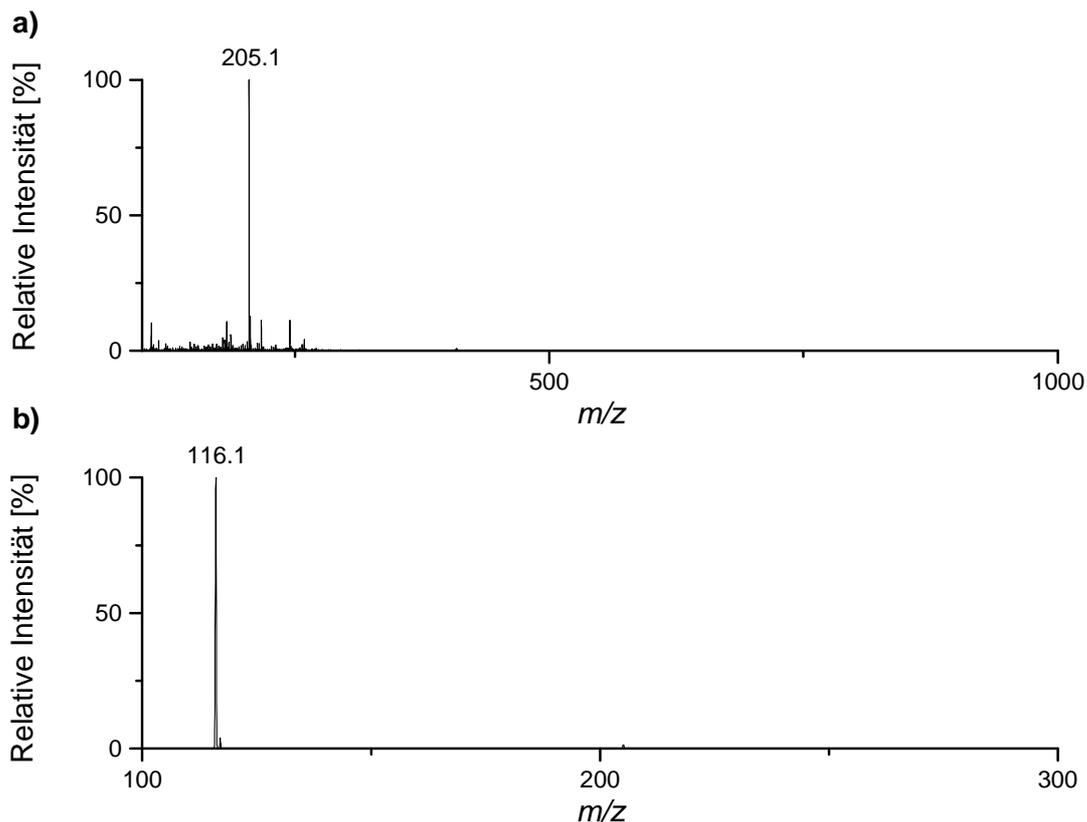


Abbildung 84: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse einer EMB-Fatol Tablette (Wirkstoff: Ethambutol); (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 205.

Im MS/MS-Experiment fragmentiert m/z 205 aus der EMB-Fatol Tablette zu einem Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 116 (vgl. Abbildung 84b). Die Entstehung dieses Fragments lässt sich durch den in Abbildung 85 vorgeschlagenen Fragmentierungsweg von Ethambutol erklären.

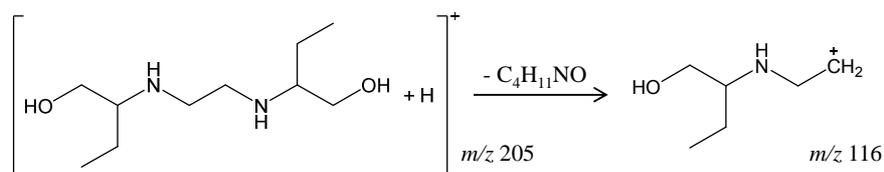


Abbildung 85: Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Ethambutol.

Die gezeigten Ergebnisse der DIP-APCI-MSⁿ Analyse der Antibiotika demonstrieren, dass nicht nur eine direkte Detektion pharmazeutischer Wirkstoffe relativ geringen Molekulargewichts, wie beispielsweise der analysierten Schmerzmittel, mittels DIP-APCI-MS möglich ist, sondern, dass auch pharmazeutische Wirkstoffe höheren Molekulargewichts, wie die Antibiotika Clarithromycin und Rifampicin mittels DIP-APCI-MS detektiert werden können. Eine Absicherung der Identität der detektierten m/z -Signale der Antibiotika konnte erneut mit Hilfe von MS/MS-Experimenten erfolgen.

3.4 Analyse des Phloemsafts von Nutzpflanzen

Das vorliegende Kapitel dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse des Phloemsafts von Nutzpflanzen, mit dem Ziel, möglichst viele Inhaltsstoffe des Phloemsafts aufzuklären. Zu diesem Zweck wurde, wie in Kapitel 5.1 beschrieben, Phloemsaft aus den Nutzpflanzen Mais (*Zea mays*) und Raps (*Brassica napus*) mit Hilfe der Laser-Aphiden-Technik gewonnen. Die Mengen an reinem Phloemsaft, die mit der Laser-Aphiden-Technik aus einem Stechrüssel gewonnen werden können, sind mit etwa 0,1-1 μL sehr gering. Daher müssen zur Analyse des Phloemsafts ausreichend sensitive und selektive Methoden eingesetzt werden.

Zur Gewinnung von Phloemsaft aus Mais und Raps war es erforderlich die Stechrüssel vieler Blattläuse zu durchtrennen, bevor ein Stechrüssel als gut exsudierende Kapillare fungierte. Im Fall von Mais wurden Exsudationsraten von ca. 50-100 nL/h erreicht und bis zu ca. 2 μL Phloemsaft aus einem Stechrüssel gewonnen. Die Exsudationsraten und die maximal aus einem Stechrüssel gewonnene Menge an Phloemsaft lagen im Fall von Raps niedriger.

3.4.1 Analyse von Phloemsaft aus Mais mittels GCxGC-MS und LC-MS

Erste Analysen von Phloemsaft erfolgten mittels GCxGC-MS und LC-MS. Da Mais für die Phloemsaftgewinnung mit Hilfe der Laser-Aphiden-Technik am besten geeignet ist, wurde Phloemsaft aus Mais für die ersten Analysen verwendet. Zur Analyse des Phloemsafts aus Mais mittels GCxGC-MS und LC-MS war es erforderlich, den gewonnenen Phloemsaft, wie in Kapitel 5.1 beschrieben, im Verhältnis 1:100 zu verdünnen, um handhabbare Probenmengen zu erhalten.

Um eventuell im Phloemsaft aus Mais enthaltene unpolare Verbindungen zu identifizieren, wurde ein Aliquot des verdünnten Phloemsafts mit Dichlormethan extrahiert und mittels GCxGC-MS analysiert. Hierbei konnten jedoch keine auf den Phloemsaft zurückzuführenden Signale detektiert werden. Daraufhin wurde zur Analyse unpolarer Verbindungen eine Anreicherung mittels *solid-phase microextraction* (SPME) mit anschließender GC-MS Analyse durchgeführt. Auch hier wurden keine auf den Phloemsaft zurückzuführenden Signale detektiert. Zur Ermöglichung der Analyse polarerer Verbindungen mittels GCxGC-MS wurde der verdünnte Phloemsaft aus Mais silyliert. Durch GCxGC-MS Analyse des silylierten Phloemsafts konnten Saccharose, sowie Spuren von Glucose und Fructose nachgewiesen werden. Die Identifikation erfolgte hier durch Analyse silylierter Standardsubstanzen.

Zur LC-ESI-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais wurde die *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) eingesetzt, da sie gut zur chromatographischen Trennung wasserlöslicher, polarer Substanzen, wie sie im Phloemsaft zu erwarten sind, geeignet ist. Dies machte es jedoch erforderlich, den verdünnten Phloemsaft im Verhältnis 1:10 mit dem verwendeten Eluenten (95 % Acetonitril) zu verdünnen, da die Injektion rein wässriger Lösungen in der HILIC die Retention der Analyten behindert. Mittels LC-ESI-MS konnten im Phloemsaft aus Mais lediglich Saccharose und Glutaminsäure nachgewiesen werden. Die Identifikation erfolgte auch hier durch Analyse entsprechender Standardsubstanzen. Weitere Peaks unbekannter Substanzen wurden nicht detektiert.

Mittels GCxGC-MS und LC-MS konnten keine Substanzen, die nicht schon literaturbekannt sind, im Phloemsaft aus Mais nachgewiesen werden. Nach Literaturangaben ist aber vom Vorhandensein vieler weiterer Substanzen, unter anderem von Signalstoffen, im Phloemsaft auszugehen. Dass keine weiteren Substanzen detektiert wurden, lässt sich höchstwahrscheinlich

durch die zur Analyse des Phloemsafte mittels GCxGC-MS und LC-MS erforderliche Verdünnung um den Faktor 100-1000 erklären. Daher sollte im Folgenden auf eine chromatographische Vortrennung verzichtet und Phloemsaft aus Mais und Raps unverdünnt mittels DIP-APCI-MS analysiert werden.

3.4.2 Analyse von Phloemsaft mittels DIP-APCI-MS

Zur Analyse von Phloemsaft aus Mais und Raps mittels DIP-APCI-MS wurde der gewonnene Phloemsaft direkt aus den zur Gewinnung verwendeten Mikrokapillaren in die Probenziegel injiziert. Zunächst erfolgte eine Analyse von Phloemsaft aus Mais und Raps mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS. Anhand der akkuraten m/z -Verhältnisse von detektierten Bestandteilen des Phloemsafte sollten deren Summenformeln ermittelt werden. Durch MS/MS-Experimente unter Verwendung der DIP-APCI-Ion Trap-MS sollte anschließend eine Strukturaufklärung erfolgen.

3.4.2.1 Analyse mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS

In einer ersten Analyse von Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS wurde die Schubstange mit einer Heizrate von 1 °/s auf 400 °C aufgeheizt. Hierbei zeigte sich, dass ab einer Temperatur von ca. 150 °C, wie es aufgrund der Zusammensetzung von Phloemsaft zu erwarten ist, Karamellisierungsreaktionen ablaufen, die eine Identifizierung von in naturbelassenem Phloemsaft enthaltenen Verbindungen nahezu unmöglich machen. Um Karamellisierungsreaktionen zu vermeiden, wurde die Schubstange in den weiteren DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen zunächst mit 0,2 °/s auf 150 °C aufgeheizt, diese Temperatur 5 min gehalten, und die Schubstange anschließend mit 1 °/s auf 400 °C aufgeheizt und diese Temperatur wiederum 5 min gehalten, um auch schwerer flüchtige Verbindungen zu verdampfen. Die Analysen wurden bis zu einer Temperatur von 150 °C und im Temperaturbereich von 150-400 °C separat ausgewertet. Die DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen von Phloemsaft aus Mais wurden sowohl bei Ionisation im Positiv-Modus, als auch bei Ionisation im Negativ-Modus, durchgeführt. Da sich hierbei zeigte, dass der Positiv-Modus zur Analyse des Phloemsafte besser geeignet ist, wurden die DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen von Phloemsaft aus Raps sowie die DIP-APCI-Ion Trap-MS Analysen ausschließlich bei Ionisation im Positiv-Modus durchgeführt.

In Abbildung 86 ist die DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 150 °C beispielhaft dargestellt. Abbildung 86a zeigt die TICs der Analyse von Phloemsaft aus Mais und der entsprechenden Blindmessung. Der TIC der Analyse des Phloemsafts zeigt einen Anstieg der Intensität mit dem Temperaturprogramm, welcher durch die Verdampfung und Ionisation von Bestandteilen des Phloemsafts zustande kommt.

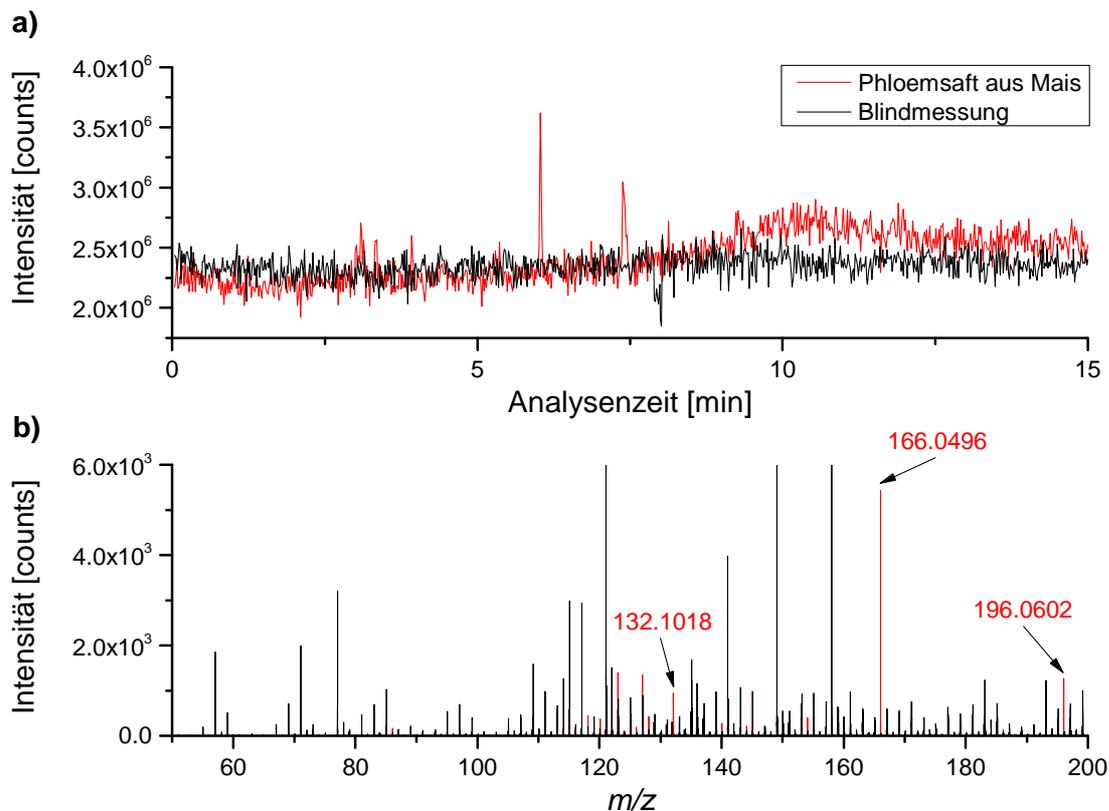


Abbildung 86: DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 150 °C; rot: Phloemsaft aus Mais; schwarz: Blindmessung; (a) TIC; (b) Massenspektren (gemittelt im Temperaturbereich ≤ 150 °C) der Blindmessung und der Analyse des Phloemsafts aus Mais (Massenspektrum der Blindmessung subtrahiert).

Zur Auswertung der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen des Phloemsafts aus Mais und Raps und der Identifizierung von m/z -Signalen, welche sich auf Bestandteile des Phloemsafts zurückführen lassen, wurden die Massenspektren der Analyse des Phloemsafts und der Blindmessung über die Dauer der Analyse im jeweiligen Temperaturbereich (Temperatur ≤ 150 °C bzw. Temperatur

150-400 °C) gemittelt und das resultierende Massenspektrum der Blindmessung von dem der Analyse des Phloemsafts subtrahiert. Auf diese Weise treten solche m/z -Signale hervor, die nur im Massenspektrum der Analyse des Phloemsafts, jedoch nicht im Massenspektrum der Blindmessung auftreten. Abbildung 86b zeigt beispielhaft die resultierenden Massenspektren einer Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 150 °C und im m/z -Bereich von 50-200. Hier sind eine Reihe von m/z -Signalen zu erkennen (z.B. m/z 132,1018 und m/z 166,0496), die nur im Massenspektrum des Phloemsafts aus Mais, nicht aber im Massenspektrum der Blindmessung auftreten. Substanzen mit höheren m/z -Verhältnissen (höheren Molekulargewichten) als 200 wurden im Temperaturbereich bis 150 °C nicht detektiert.

Um zu bestätigen, dass die nur in den Analysen des Phloemsafts auftretenden m/z -Signale auf Bestandteile des Phloemsafts zurückzuführen sind, wurden die m/z -Spuren dieser Signale extrahiert (Generierung der EICs). Abbildung 87 zeigt beispielhaft die EICs von m/z 166,0496 aus der Analyse von Phloemsaft aus Mais und der entsprechenden Blindmessung bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 150 °C. Zu erkennen ist ein dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechender Intensitätsanstieg im Fall der Analyse des Phloemsafts aus Mais, nicht jedoch im Fall der entsprechenden Blindmessung. Dies bestätigt, dass es sich bei der Substanz mit m/z 166,0496 um einen Bestandteil des Phloemsafts aus Mais handeln muss.

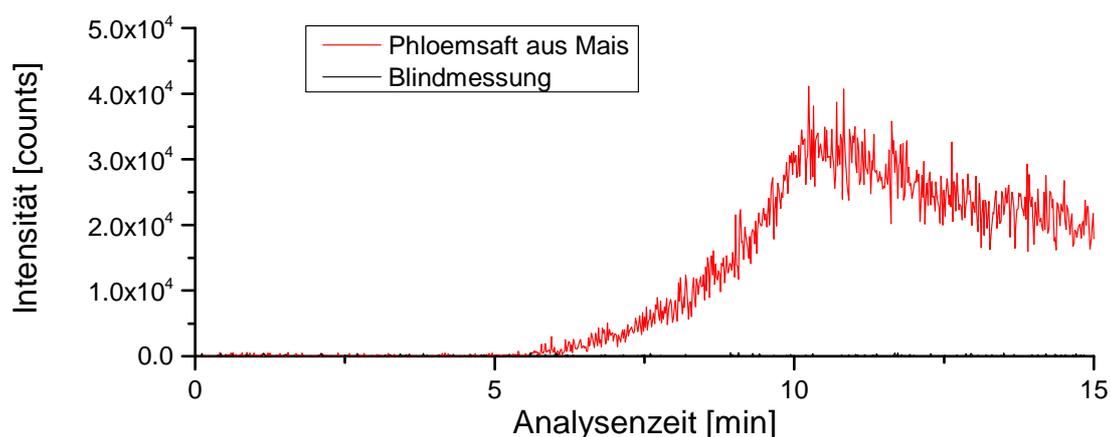


Abbildung 87: EIC von m/z 166,0496 \pm 20 ppm in der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 150 °C; rot: Phloemsaft aus Mais; schwarz: Blindmessung.

Die Intensitäten der im Temperaturbereich bis 150 °C detektierten m/z -Signale, die auf Bestandteile des Phloemsafte zurückzuführen sind, sind zum Teil sehr gering. Aus diesem Grund wurde die DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse des Phloemsafte aus Mais sowohl im Positiv-, als auch im Negativ-Modus, als Dreifachanalyse durchgeführt. Die DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse des Phloemsafte aus Raps wurde im Positiv-Modus als Vierfachanalyse durchgeführt. Als bestätigte Bestandteile von Phloemsaft wurden solche Verbindungen angesehen, deren m/z -Signale in allen Wiederholungsanalysen des Phloemsafte aus Mais bzw. aus Raps nur im Massenspektrum des Phloemsafte und nicht im Massenspektrum der Blindmessung auftraten, deren m/z -Signale im gemittelten Massenspektrum Signalintensitäten (Signalhöhen) von mindestens 50 counts aufwiesen und deren m/z -Spur einen dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechenden Anstieg der Signalintensität zeigte.

Im Temperaturbereich von 150-400 °C traten bei der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais und Raps bedingt durch die verstärkte Verdampfung von Bestandteilen des Phloemsafte deutlich höhere Signalintensitäten auf, als im Temperaturbereich bis 150 °C. Abbildung 88 zeigt beispielhaft die TICs der Analyse von Phloemsaft aus Mais und der entsprechenden Blindmessung im Temperaturbereich bis 400 °C bei Ionisation im Positiv-Modus.

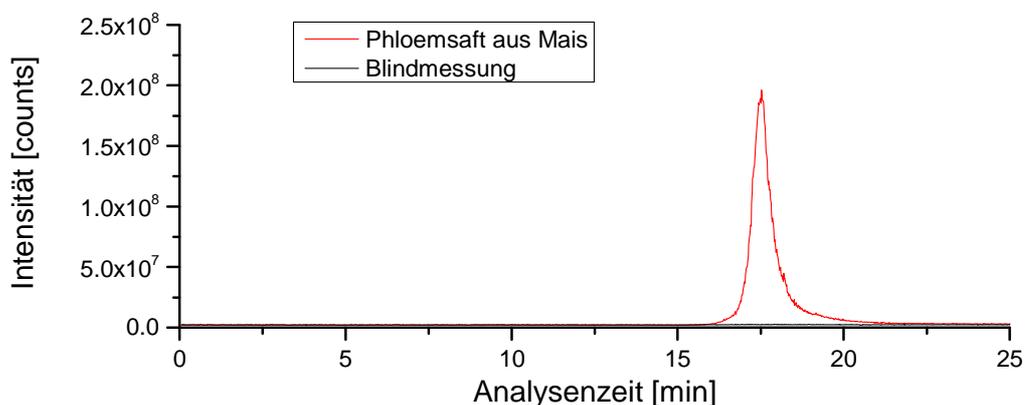


Abbildung 88: TIC der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 400 °C; rot: Phloemsaft aus Mais; schwarz: Blindmessung.

Hinsichtlich der m/z -Signale, welche im über die Analysendauer im Temperaturbereich von 150-400 °C gemittelten Massenspektrum die höchsten Signalintensitäten (Signalintensitäten > 10.000 counts) aufweisen, ist anzunehmen, dass es sich sowohl im Fall der Analyse von Phloemsaft aus Mais im Positiv- und Negativ-Modus, als auch im Fall der Analyse von Phloemsaft aus Raps, ausschließlich um Fragmentierungs- und Karamellisierungsprodukte von Zuckern handelt. Tabelle 30 im Anhang zeigt beispielhaft die bei der Analyse von Phloemsaft aus Mais detektierten m/z -Signale (Signalintensitäten > 10.000 counts im über die Analysendauer im Temperaturbereich von 150-400 °C gemittelten Massenspektrum) sowie mögliche Summenformeln und die Abweichungen der m/z -Verhältnisse der $[M + H]^+$ -Ionen von Substanzen mit diesen Summenformeln von den detektierten m/z -Signalen. Nach den aufgrund der detektierten akkuraten m/z -Verhältnisse abgeleiteten möglichen Summenformeln handelt es sich bei den im Temperaturbereich von 150-400 °C detektierten Substanzen fast ausschließlich um Verbindungen, die lediglich aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff bestehen und maximal zwölf Kohlenstoffatome enthalten. Sowohl bei der Analyse von Phloemsaft aus Mais, als auch bei der Analyse von Phloemsaft aus Raps, wurden im Positiv-Modus mit höchster Intensität Signale mit den m/z -Verhältnissen 109,03, 127,04 und 145,05 detektiert, bei denen es sich um Verbindungen mit den Summenformeln $C_6H_4O_2$, $C_6H_6O_3$ und $C_6H_8O_4$ handeln könnte. Die ermittelten möglichen Summenformeln deuten daraufhin, dass die im Temperaturbereich von 150-400 °C detektierten Verbindungen durch Fragmentierungs- und Karamellisierungsreaktionen aus im Phloemsaft enthaltener Saccharose entstanden sind. Bestätigt wird diese Annahme durch die Analyse einer Phloemsaft-Standardmischung, welche neben Saccharose die Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure, Asparagin, Serin, Valin und Leucin sowie die organischen Säuren Äpfelsäure und Citronensäure enthielt (zur genauen Zusammensetzung siehe Kapitel 5.4.7). Hier wurden im Temperaturbereich von 150-400 °C m/z -Signale (im Positiv-Modus unter anderem m/z 109,03, m/z 127,04 und m/z 145,05) detektiert, die größtenteils mit den bei Analyse des Phloemsafts aus Mais und Raps im Temperaturbereich von 150-400 °C detektierten m/z -Signalen übereinstimmen.

Wie soeben erläutert, entstehen bei der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais und Raps im Temperaturbereich von 150-400 °C Artefakte durch Fragmentierungs- und Karamellisierungsreaktionen von Saccharose. Es ist nicht möglich in diesem Temperaturbereich

detektierte Verbindungen, die möglicherweise nativ im Phloemsaft vorkommen, von bei der Analyse gebildeten Artefakten zu unterscheiden. Daher ist es nicht möglich aus den DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen im Temperaturbereich von 150-400 °C Rückschlüsse auf nativ in Phloemsaft enthaltene Verbindungen zu ziehen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen von Phloemsaft aus Mais und Raps sowie einer Phloemsaft-Standardmischung im Temperaturbereich bis 150 °C beschrieben.

Phloemsaft aus Mais

Mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS konnten im Phloemsaft aus Mais im Temperaturbereich bis 150 °C im Positiv-Modus zwölf Bestandteile nachgewiesen werden. Tabelle 18 zeigt die detektierten m/z -Verhältnisse der nachgewiesenen Bestandteile, sowie mögliche Summenformeln und die Abweichungen der m/z -Verhältnisse der $[M + H]^+$ -Ionen von Substanzen mit diesen Summenformeln von den detektierten m/z -Signalen. Für jeden der nachgewiesenen Bestandteile des Phloemsafts bzw. jedes detektierte m/z -Signal konnte nur eine Summenformel abgeleitet werden, deren m/z -Abweichung der Massengenauigkeit des verwendeten Massenspektrometers gerecht wird. Daher ist davon auszugehen, dass die im Phloemsaft nachgewiesenen Bestandteile die angegebenen Summenformeln aufweisen.

Tabelle 18: Im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus nachgewiesene Bestandteile.

| detektiertes m/z | mögliche Summenformel | m/z des $[M + H]^+$ -Ions | Abweichung [ppm] |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------|
| 109.0761 | $C_6H_8N_2$ | 109.0760 | - 0.7 |
| 118.0863 | $C_5H_{11}NO_2$ | 118.0863 | - 0.4 |
| 123.0553 | $C_6H_6N_2O$ | 123.0553 | - 0.1 |
| 127.0390 | $C_6H_6O_3$ | 127.0390 | - 0.2 |
| 128.0706 | $C_6H_9NO_2$ | 128.0706 | 0.1 |
| 132.1018 | $C_6H_{13}NO_2$ | 132.1019 | 0.8 |
| 140.0705 | $C_7H_9NO_2$ | 140.0706 | 0.8 |
| 144.1018 | $C_7H_{13}NO_2$ | 144.1019 | 0.7 |
| 145.0494 | $C_6H_8O_4$ | 145.0495 | 0.9 |
| 154.0860 | $C_8H_{11}NO_2$ | 154.0863 | 1.7 |
| 166.0497 | $C_8H_7NO_3$ | 166.0499 | 1.0 |
| 196.0603 | $C_9H_9NO_4$ | 196.0604 | 0.7 |

Es ist zu vermuten, dass es sich bei den Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 118,0863 ($C_5H_{11}NO_2$) und 132,1018 ($C_6H_{13}NO_2$) um die Aminosäuren Valin und Leucin handelt, welche bekanntermaßen im Phloemsaft vorkommen. Bei der Verbindung mit dem m/z -Verhältnis 123,0553 ($C_6H_6N_2O$) könnte es sich möglicherweise um Nicotinamid handeln. Die Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 127,0390 und 145,0494 sind auf erste Fragmentierungen von Zuckern durch beginnende Karamellisierungsreaktionen zurückzuführen. Grund für diese Annahme ist, dass diese m/z -Signale im Temperaturbereich von 150-400 °C in sehr hoher Intensität auftreten und in diesem Temperaturbereich, wie bereits beschrieben, in hoher Intensität ausschließlich Fragmente von Zuckern detektiert wurden. Zudem treten diese beiden m/z -Signale auch bei Analyse der Phloemsaft-Standardmischung auf. Bei der Verbindung mit dem m/z -Verhältnis 127,0390 könnte es sich um Maltol oder Isomaltol handeln, welche bei der Karamellisierung von Zuckern entstehen.

Im Negativ-Modus konnten im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS lediglich zwei Bestandteile nachgewiesen werden. Tabelle 19 zeigt die detektierten m/z -Verhältnisse der

nachgewiesenen Bestandteile, sowie mögliche Summenformeln und die entsprechenden m/z -Abweichungen.

Tabelle 19: Im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Negativ-Modus nachgewiesene Bestandteile.

| detektiertes m/z | mögliche Summenformel | m/z des $[M - H]^-$ -Ions | Abweichung [ppm] |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------|
| 116.0718 | $C_5H_{11}NO_2$ | 116.0717 | -0.8 |
| 130.0875 | $C_6H_{13}NO_2$ | 130.0874 | -1.1 |

Beide im Negativ-Modus im Phloemsaft aus Mais nachgewiesenen Bestandteile wurden auch im Positiv-Modus detektiert. Es handelt sich, wie bereits beschrieben, höchstwahrscheinlich um die Aminosäuren Valin und Leucin.

Die Ergebnisse der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen von Phloemsaft aus Mais zeigen, dass im Positiv-Modus mehr Bestandteile des Phloemsafts ionisiert werden können. Aus diesem Grund wurden die DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen des Phloemsafts aus Raps sowie die DIP-APCI-Ion Trap-MS Analysen des Phloemsafts aus Mais und Raps ausschließlich im Positiv-Modus durchgeführt.

Phloemsaft aus Raps

Mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS konnten im Phloemsaft aus Raps im Temperaturbereich bis 150 °C zwanzig Bestandteile nachgewiesen werden. In Tabelle 20 sind die detektierten m/z -Verhältnisse der nachgewiesenen Bestandteile, sowie mögliche Summenformeln und die entsprechenden m/z -Abweichungen zusammengestellt.

Tabelle 20: Im Phloemsaft aus Raps mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus nachgewiesene Bestandteile.

| detektiertes m/z | mögliche Summenformel | m/z des $[M + H]^+$ -Ions | Abweichung [ppm] |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------|
| 72.0811 | C_4H_9N | 72.0808 | -4.6 |
| 86.0966 | $C_5H_{11}N$ | 86.0964 | -2.1 |
| 108.0476 | C_3H_9NOS | 108.0478 | 1.5 |
| 109.0760 | $C_6H_8N_2$ | 109.0760 | 0.2 |
| 112.1121 | $C_7H_{13}N$ | 112.1121 | -0.2 |
| 116.0706 | $C_5H_9NO_2$ | 116.0706 | 0.1 |
| 118.0863 | $C_5H_{11}NO_2$ | 118.0863 | -0.4 |
| 120.0808 | C_8H_9N | 120.0808 | -0.2 |
| 123.0553 | $C_6H_6N_2O$ | 123.0553 | -0.1 |
| 128.0705 | $C_6H_9NO_2$ | 128.0706 | 0.8 |
| 132.1018 | $C_6H_{13}NO_2$ | 132.1019 | 0.8 |
| 137.1072 | $C_8H_{12}N_2$ | 137.1073 | 0.9 |
| 144.0476 | C_6H_9NOS | 144.0478 | 1.1 |
| 144.1017 | $C_7H_{13}NO_2$ | 144.1019 | 1.4 |
| 146.0810 | $C_6H_{11}NO_3$ | 146.0812 | 1.2 |
| 158.1174 | $C_8H_{15}NO_2$ | 158.1176 | 1.0 |
| 160.0788 | $C_7H_{13}NOS$ | 160.0791 | 1.6 |
| 166.0861 | $C_9H_{11}NO_2$ | 166.0863 | 0.9 |
| 183.1127 | $C_9H_{14}N_2O_2$ | 183.1128 | 0.6 |
| 186.1488 | $C_{10}H_{19}NO_2$ | 186.1489 | 0.3 |

Der Vergleich der mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Phloemsaft aus Mais und im Phloemsaft aus Raps detektierten Verbindungen zeigt eine Reihe von Bestandteilen, die im Phloemsaft aus beiden Pflanzen nachweisbar sind. Bei den Verbindungen mit dem m/z -Verhältnissen 118,0863 ($C_5H_{11}NO_2$) und 132,1018 ($C_6H_{13}NO_2$) ist auch beim Phloemsaft aus Raps davon auszugehen, dass es sich um die Aminosäuren Valin und Leucin handelt. Des Weiteren könnte es sich bei den Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 116,0706 ($C_5H_9NO_2$) und 166,0861 ($C_9H_{11}NO_2$) um die Aminosäuren Prolin und Phenylalanin handeln. Auch im Phloemsaft aus Raps wurde eine

Verbindung mit dem m/z -Verhältnis 123,0553 ($C_6H_6N_2O$) nachgewiesen, bei der es sich möglicherweise um Nicotinamid handeln könnte. m/z -Signale, die auf Fragmente von Zuckern durch beginnende Karamellisierungsreaktionen zurückzuführen sind, wurden im Phloemsaft aus Raps im Temperaturbereich bis 150 °C nicht detektiert. Ein auffälliger Unterschied zwischen Phloemsaft aus Mais und Phloemsaft aus Raps besteht in der Detektion schwefelhaltiger Verbindungen im Phloemsaft aus Raps, nicht jedoch im Phloemsaft aus Mais. Eine Erklärung hierfür wäre, dass Raps als Pflanze der Familie der *Brassicaceae* Glucosinolate enthält, mit denen die detektierten schwefelhaltigen Verbindungen zusammenhängen könnten.

Analyse einer Phloemsaft-Standardmischung

Nach Literaturangaben sind im Phloemsaft aus Mais und Raps hauptsächlich das Kohlenhydrat Saccharose und daneben Aminosäuren enthalten (vgl. Kapitel 1.2.3). Von diesen bekannten Bestandteilen des Phloemsafts wurden im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS lediglich die Aminosäuren Valin und Leucin nachgewiesen, welche nicht zu den im Phloemsaft mengenmäßig vorherrschenden Aminosäuren zählen. Um zu überprüfen, ob andere bekannte Bestandteile des Phloemsafts aus Mais unter den verwendeten Analysebedingungen tatsächlich nicht nachweisbar sind, wurde eine Phloemsaft-Standardmischung hergestellt und mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv- und Negativ-Modus analog zur Analyse des Phloemsafts analysiert. Die Phloemsaft-Standardmischung enthielt mit Saccharose, den Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure, Asparagin, Serin, Valin und Leucin, sowie den organischen Säuren Äpfelsäure und Citronensäure bekannte Bestandteile des Phloemsafts aus Mais in den Literaturangaben entsprechender Konzentration in wässriger Lösung. Die genaue Zusammensetzung der Phloemsaft-Standardmischung ist in Kapitel 5.4.7 angegeben.

Von den Bestandteilen der Phloemsaft-Standardmischung konnten im Temperaturbereich bis 150 °C sowohl im Positiv-, als auch im Negativ-Modus, lediglich Valin und Leucin nachgewiesen werden. Abbildung 89 zeigt die extrahierten m/z -Spuren der beiden Aminosäuren bei Analyse der Phloemsaft-Standardmischung und der entsprechenden Blindmessung im Positiv-Modus. Zu erkennen ist ein Anstieg der Signalintensität der m/z -Spuren der Aminosäuren bereits im Temperaturbereich bis 150 °C (Analysenzeit 0-15 min) bei Analyse der Phloemsaft-

Standardmischung, nicht aber bei der entsprechenden Blindmessung. Im Negativ-Modus ist ein analoges Verhalten zu erkennen.

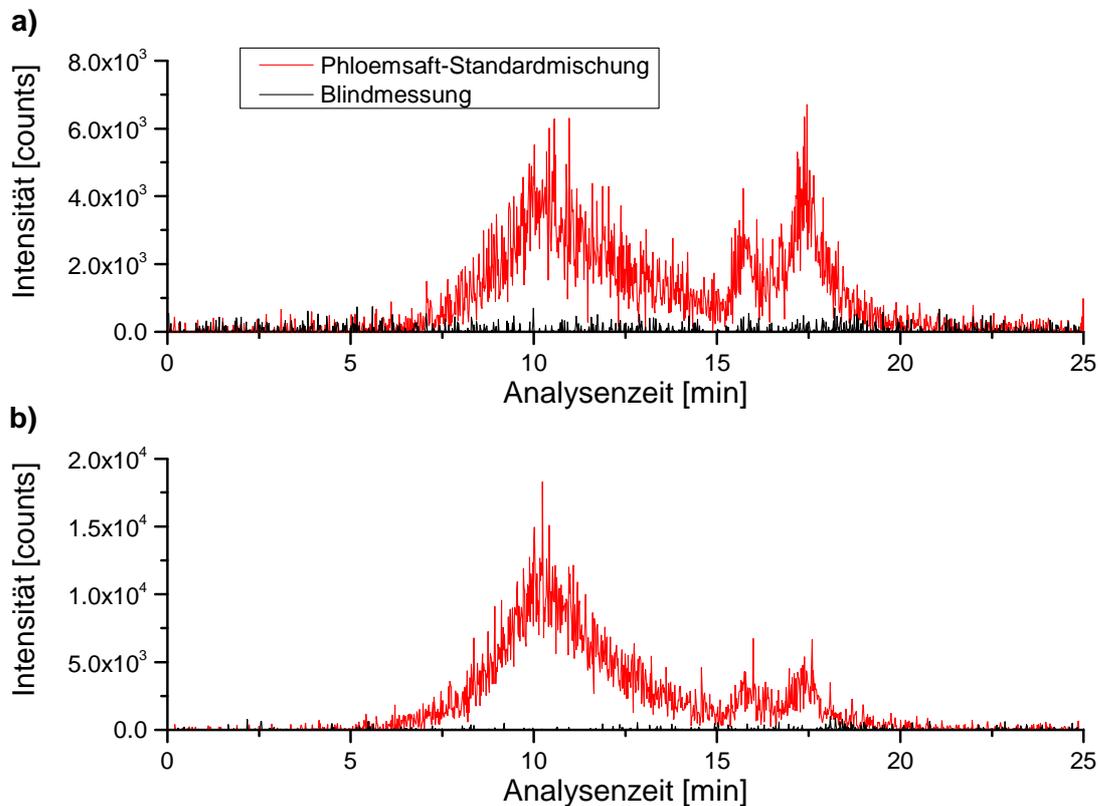


Abbildung 89: DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse der Phloemsaft-Standardmischung bei Ionisation im Positiv-Modus; rot: Phloemsaft-Standardmischung; schwarz: Blindmessung; (a) EIC von m/z 118,0863 \pm 20 ppm (Valin); (b) EIC von m/z 132,1019 \pm 20 ppm (Leucin).

m/z -Signale der übrigen Bestandteile der Phloemsaft-Standardmischung waren im Temperaturbereich bis 150 °C sowohl im Positiv-, als auch im Negativ-Modus, im Massenspektrum nicht zu erkennen und die extrahierten m/z -Spuren dieser Verbindungen zeigten auch keinen Anstieg der Signalintensität in diesem Temperaturbereich. Im Temperaturbereich von 150-400 °C konnten im Positiv-Modus alle Bestandteile der Phloemsaft-Standardmischung, abgesehen von Serin und Äpfelsäure, nachgewiesen werden. Im Negativ-Modus wurden alle Bestandteile der Phloemsaft-Standardmischung, abgesehen von Serin und Citronensäure, im Temperaturbereich von 150-400 °C detektiert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass,

abgesehen von Serin, alle Bestandteile der Phloemsaft-Standardmischung mittels APCI im Positiv- oder Negativ-Modus ionisierbar sind, aber dass lediglich Valin und Leucin bereits im Temperaturbereich bis 150 °C verdampft werden.

Die Tatsache, dass unter den Bestandteilen der Phloemsaft-Standardmischung lediglich Valin und Leucin im Temperaturbereich bis 150 °C detektiert werden konnten, steht im Einklang damit, dass im Phloemsaft aus Mais und Raps im Temperaturbereich bis 150 °C lediglich diese bekannten Bestandteile nachgewiesen wurden.

3.4.2.2 Analyse mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS

Mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS konnten im Phloemsaft aus Mais und im Phloemsaft aus Raps einige Bestandteile detektiert und anhand der akkuraten m/z -Verhältnisse mögliche Summenformeln abgeleitet werden. Die Identifizierung der nachgewiesenen Bestandteile sollte durch MS/MS-Experimente mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS erfolgen. Aufgrund der Ergebnisse der Analysen des Phloemsafts mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS wurde die Schubstange in den DIP-APCI-Ion Trap-MS Analysen mit einer Heizrate von 0,2 °/s auf 150 °C aufgeheizt und diese Temperatur 5 min gehalten. Ein zweiter Heizschritt auf 400 °C erfolgte nicht. Die Analysen mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS wurden ausschließlich im Positiv-Modus durchgeführt.

Analyse der Phloemsaft-Standardmischung

Um zu überprüfen, ob unter Verwendung des Ion Trap-Massenspektrometers MS/MS-Experimente im m/z -Bereich der nachgewiesenen Bestandteile des Phloemsafts erfolgreich durchgeführt werden können, wurde die Phloemsaft-Standardmischung mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS analysiert und MS/MS-Experimente von Valin und Leucin durchgeführt. Abbildung 90 zeigt die Massenspektren der DIP-APCI-Ion Trap-MS/MS Analyse von Valin und Leucin aus der Phloemsaft-Standardmischung.

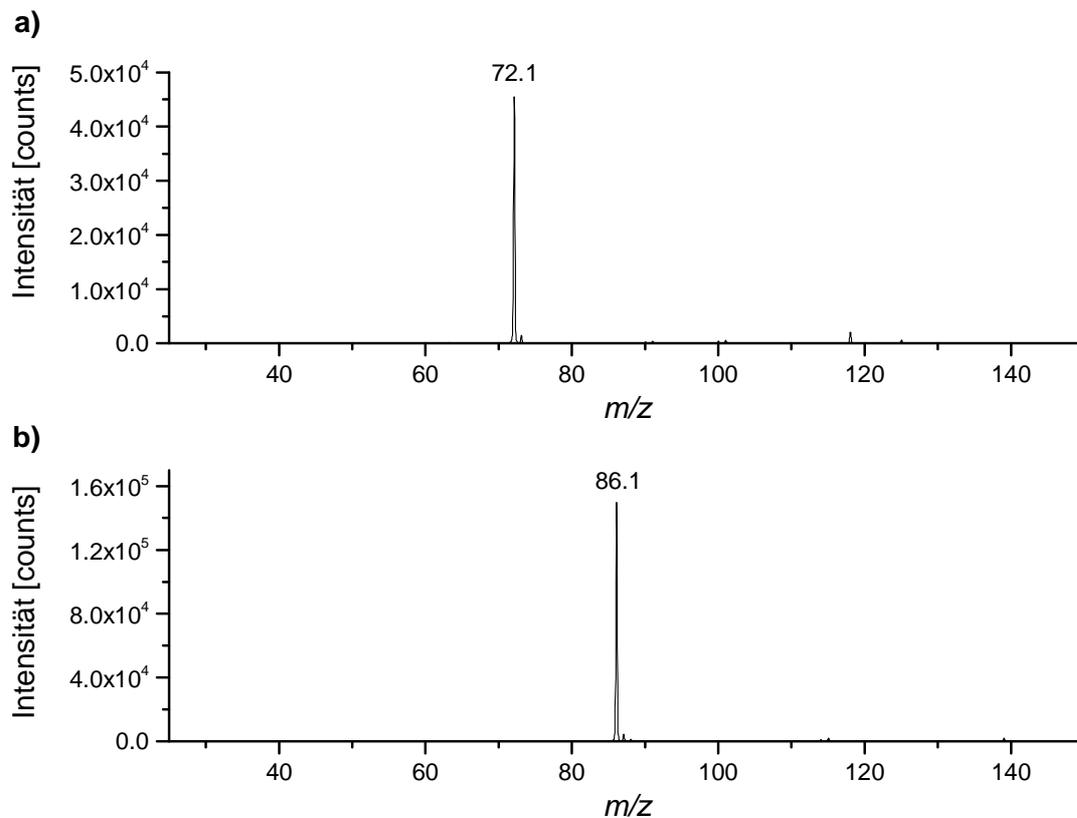


Abbildung 90: Massenspektren der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Valin und Leucin aus der Phloemsaft-Standardmischung; (a) MS/MS von m/z 118 (Valin); (b) MS/MS von m/z 132 (Leucin).

Wie in Abbildung 90 zu erkennen, fragmentieren sowohl Valin, als auch Leucin, zu Verbindungen, die 46 m/z -Einheiten weniger aufweisen, als die entsprechenden *Precursor*-Ionen. Dies könnte sich, wie in Abbildung 91 gezeigt, durch die Abspaltung von Wasser und CO erklären lassen. Die DIP-APCI-Ion Trap-MS/MS Analyse von Valin und Leucin aus der Phloemsaft-Standardmischung zeigt, dass eine Durchführung von MS/MS-Experimenten im m/z -Bereich der nachgewiesenen Bestandteile des Phloemsafts möglich ist.

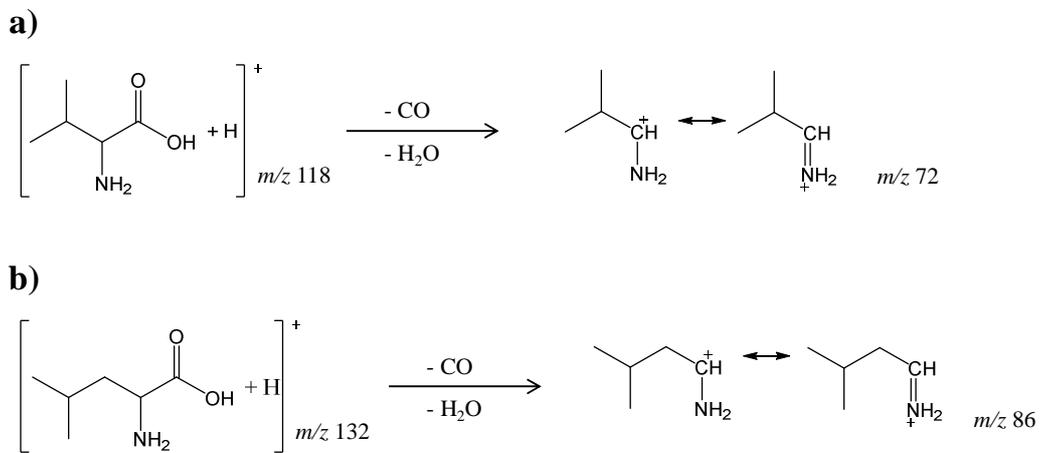


Abbildung 91: Vorgeschlagene Fragmentierungswege von (a) Valin und (b) Leucin.

Analyse von Nicotinamid

Mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS wurde im Phloemsaft aus Mais und im Phloemsaft aus Raps eine Verbindung mit dem m/z -Verhältnis 123,0553 ($C_6H_6N_2O$) detektiert, bei der es sich um Nicotinamid handeln könnte. Um dies zu bestätigen wurde eine wässrige Nicotinamid-Lösung mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS/MS analysiert. Abbildung 92 zeigt die resultierenden Massenspektren der MS/MS-Experimente von Nicotinamid. Unter Verwendung einer *Reaction amplitude* von 100 % konnte keine Fragmentierung des $[M + H]^+$ -Ions von Nicotinamid erreicht werden (vgl. Abbildung 92a). Die Erhöhung der Fragmentierungsenergie (*Reaction amplitude*: 120 %) führte zur Fragmentierung von m/z 123 zu Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 80, 96 sowie 106 (vgl. Abbildung 92b). Mögliche Fragmentierungswege von Nicotinamid, welche die Entstehung der genannten Fragmente erklären, sind in Abbildung 93 dargestellt.

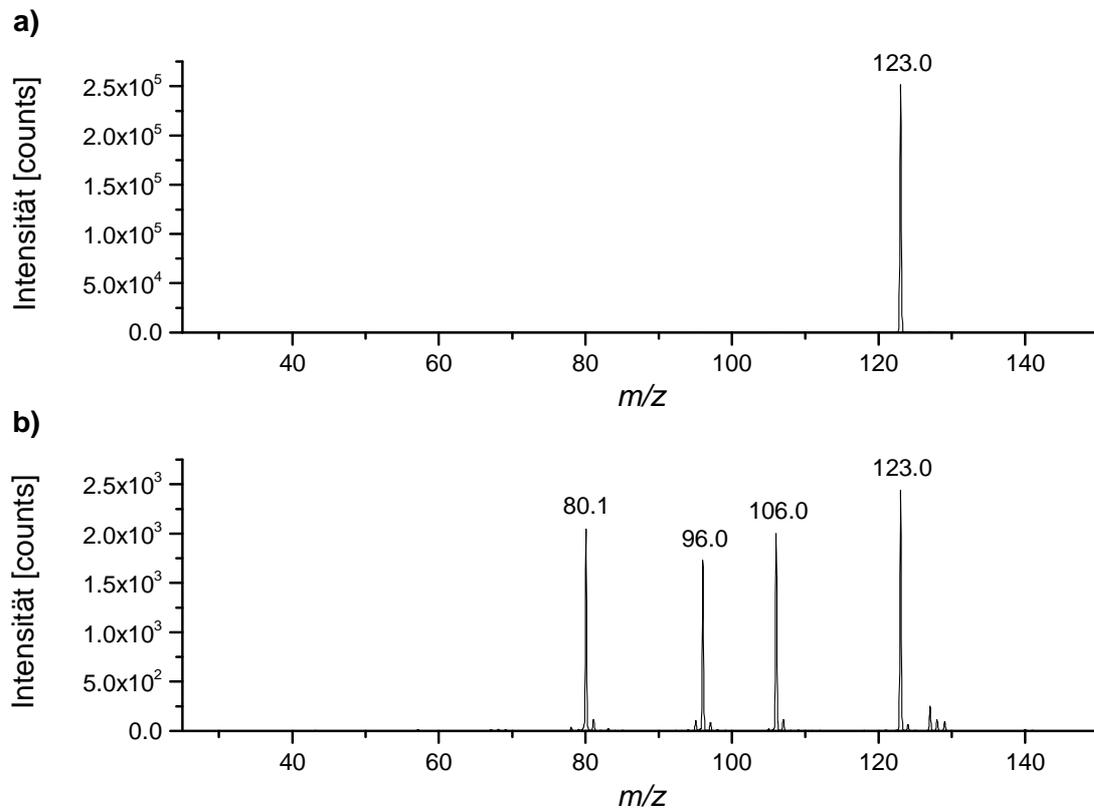


Abbildung 92: Massenspektren der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Nicotinamid (m/z 123); (a) *Reaction amplitude*: 100 %; (b) *Reaction amplitude*: 120 %.

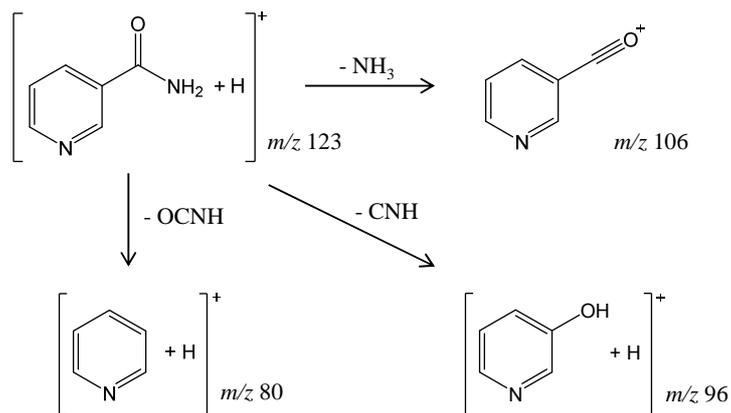


Abbildung 93: Mögliche Fragmentierungswege von Nicotinamid.

Phloemsaft aus Mais

Mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus konnten im Phloemsaft aus Mais zwölf Bestandteile nachgewiesen und mögliche Summenformeln ermittelt werden. Auch mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS konnten m/z -Signale aller im Phloemsaft aus Mais nachgewiesenen Bestandteile detektiert werden und die entsprechenden m/z -Spuren zeigten einen dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechenden Anstieg der Signalintensität. Zur Identifizierung der nachgewiesenen Bestandteile von Phloemsaft aus Mais wurden MS/MS-Experimente der entsprechenden $[M + H]^+$ -Ionen durchgeführt. Aufgrund der zum Teil sehr geringen Signalintensitäten konnten nicht für alle nachgewiesenen Bestandteile aussagekräftige Massenspektren der gebildeten Fragmente erhalten werden. Daher konnten hinsichtlich der Identität der Verbindungen mit den postulierten Summenformeln $C_6H_8N_2$ (m/z 109,0761), $C_7H_9NO_2$ (m/z 140,0705) und $C_8H_{11}NO_2$ (m/z 154,0860) keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der MS/MS-Experimente der übrigen nachgewiesenen Bestandteile des Phloemsafts aus Mais erläutert.

Das MS/MS-Experiment von m/z 118 (Abbildung 94) bestätigt, dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_5H_{11}NO_2$ (m/z 118,0863) um die bekanntermaßen im Phloemsaft enthaltene Aminosäure Valin handelt. Wie im MS/MS-Experiment von Valin in der Phloemsaft-Standardmischung beobachtet, fragmentiert m/z 118 durch Verlust von Wasser und CO zu m/z 72.

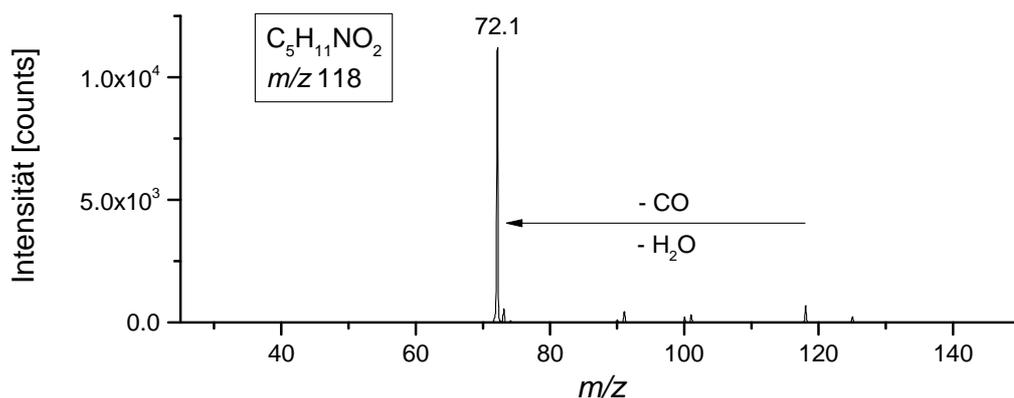


Abbildung 94: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 118 aus dem Phloemsaft aus Mais.

Abbildung 95 zeigt die resultierenden Massenspektren der MS/MS-Experimente der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_6N_2O$ (m/z 123,0553), bei der vermutet wurde, dass es sich um Nicotinamid handeln könnte. Unter Verwendung einer *Reaction amplitude* von 100 % konnte keine Fragmentierung von m/z 123 erreicht werden (vgl. Abbildung 95a). Die Erhöhung der Fragmentierungsenergie (*Reaction amplitude*: 120 %) führte zur Fragmentierung von m/z 123, jedoch nicht zur Detektion eines aussagekräftigen Fragmentspektrums (vgl. Abbildung 95b). Es konnte somit nicht bestätigt werden, dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_6N_2O$ um Nicotinamid handelt.

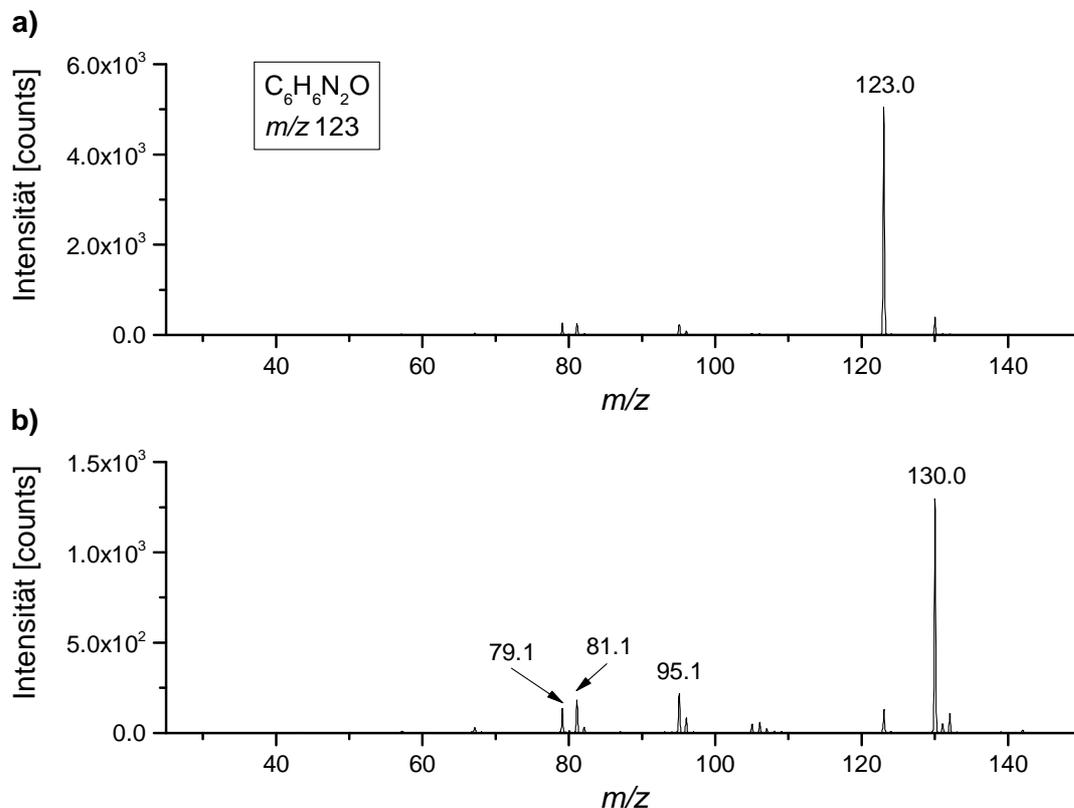


Abbildung 95: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 123 aus dem Phloemsaft aus Mais; (a) *Reaction amplitude*: 100 %; (b) *Reaction amplitude*: 120 %.

Nach den Ergebnissen der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen wird die Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_8O_3$ (m/z 127,0390) als Artefakt aus Saccharose gebildet. Es könnte sich möglicherweise um Maltol oder Isomaltol handeln. Die resultierenden

Massenspektren der MS/MS-Experimente von m/z 127 sind in Abbildung 96 dargestellt. Unter Verwendung einer *Reaction amplitude* von 100 % wurde eine unvollständige Fragmentierung von m/z 127 beobachtet (vgl. Abbildung 96a). Durch Erhöhung der Fragmentierungsenergie (*Reaction amplitude*: 120 %) wurde eine nahezu vollständige Fragmentierung von m/z 127 zu m/z 99 und m/z 69 erreicht (vgl. Abbildung 96b). Die Entstehung dieser Fragmente könnte sich durch Abspaltungen von CO bzw. $C_2H_2O_2$ erklären lassen. Dies würde aufgrund der Strukturen von Maltol und Isomaltol vermuten lassen, dass es sich bei Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_8O_3$ eher um Isomaltol handelt.

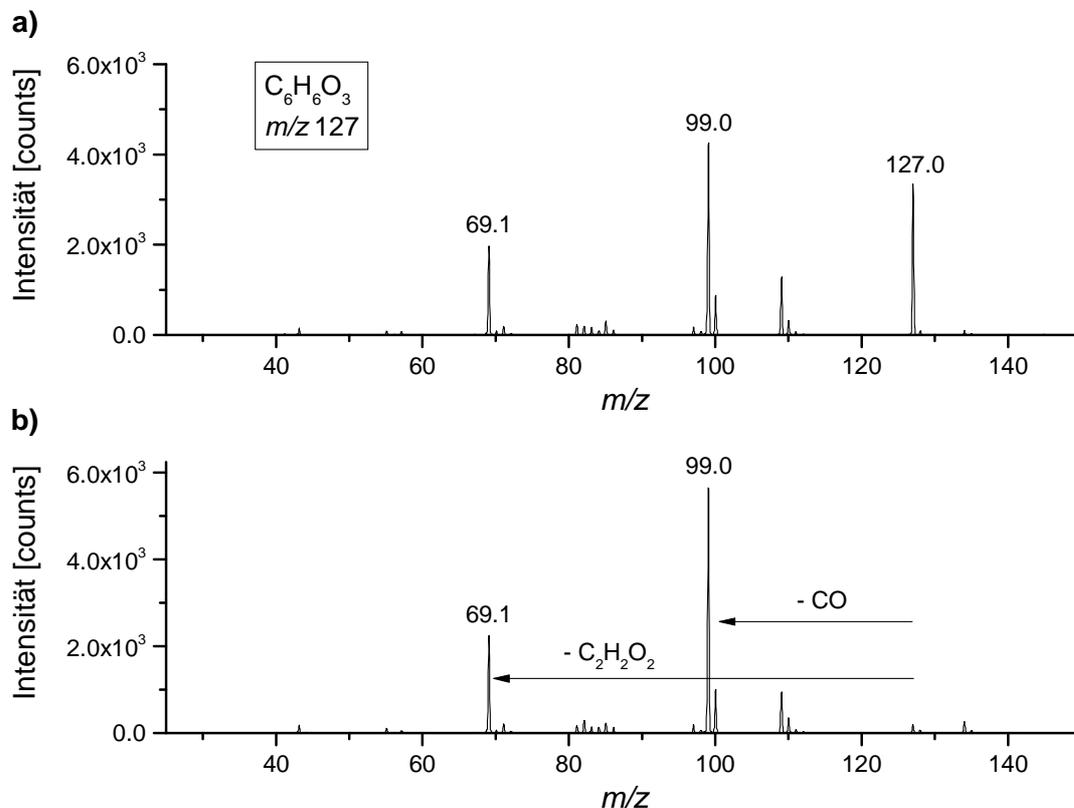


Abbildung 96: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 127 aus dem Phloemsaft aus Mais; (a) *Reaction amplitude*: 100 %; (b) *Reaction amplitude*: 120 %.

Abbildung 97 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_9NO_2$ (m/z 128,0706). m/z 128 fragmentiert hauptsächlich zu

Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 111 und 100, was sich durch die Abspaltung von NH_3 bzw. von CO erklären lassen könnte.

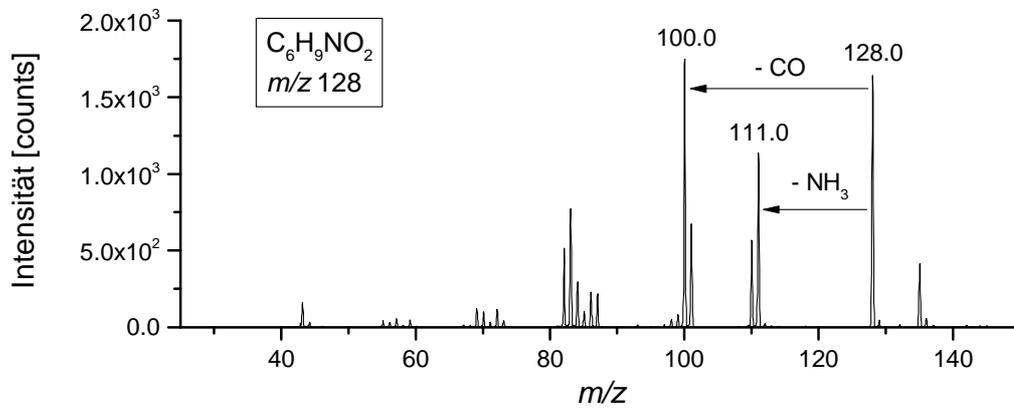


Abbildung 97: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 128 aus dem Phloensaft aus Mais.

Analog zur Bestätigung des Nachweises von Valin im Phloensaft aus Mais, bestätigt das MS/MS-Experiment von m/z 132 (Abbildung 98), dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$ (m/z 132,1018) um die ebenfalls bekanntermaßen im Phloensaft enthaltene Aminosäure Leucin handelt. Wie im MS/MS-Experiment von Leucin in der Phloensaft-Standardmischung beobachtet, fragmentiert m/z 132 durch Verlust von Wasser und CO zu m/z 86.

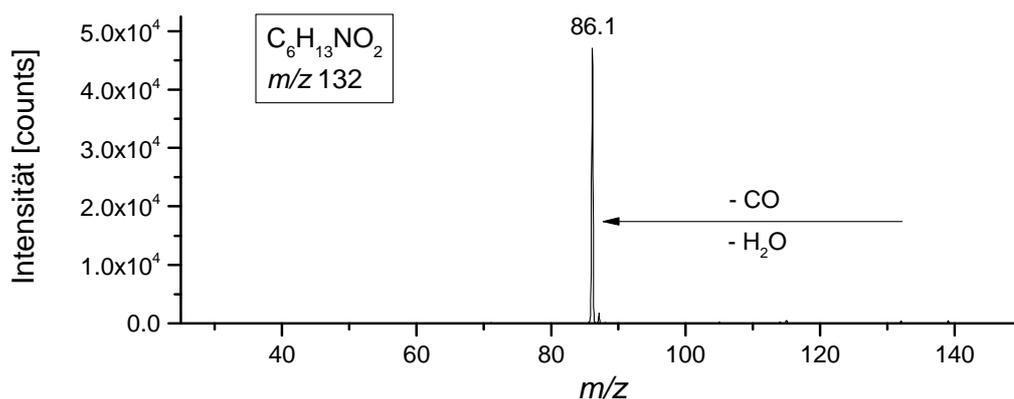


Abbildung 98: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 132 aus dem Phloensaft aus Mais.

Abbildung 99 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_7H_{13}NO_2$ (m/z 144,1018) und Abbildung 100 das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_8O_4$ (m/z 145,0494), welche nach den Ergebnissen der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen als Artefakt aus Saccharose gebildet wird. m/z 145 fragmentiert im MS/MS-Experiment zu Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 127 und 99 (vgl. Abbildung 100), was sich durch aufeinanderfolgende Abspaltungen von Wasser und CO erklären lassen könnte. Der Vergleich der in den MS/MS-Experimenten von m/z 144 und m/z 145 gebildeten Fragmente zeigt, dass m/z 127 und m/z 99 auch im MS/MS-Experiment von m/z 144 auftreten (vgl. Abbildung 99). Dies lässt vermuten, dass unter Verwendung des gewählten Isolationsfensters des *Precursor*-Ions von 0,8 m/z kein reines Massenspektrum der Fragmente von m/z 144 (besitzt eine geringere Signalintensität als m/z 145) generiert werden konnte. Somit können keine weiteren Aussagen hinsichtlich der Identität der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_7H_{13}NO_2$ (m/z 144,1018) getroffen werden.

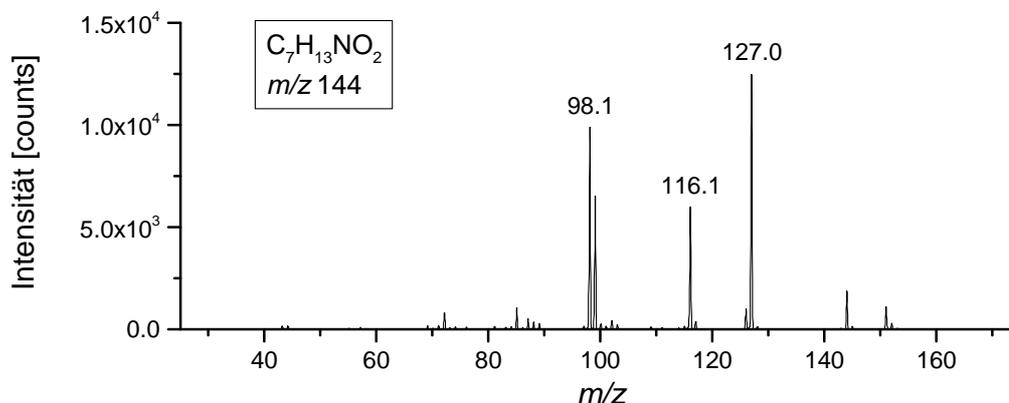


Abbildung 99: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 144 aus dem Phloemsaft aus Mais.

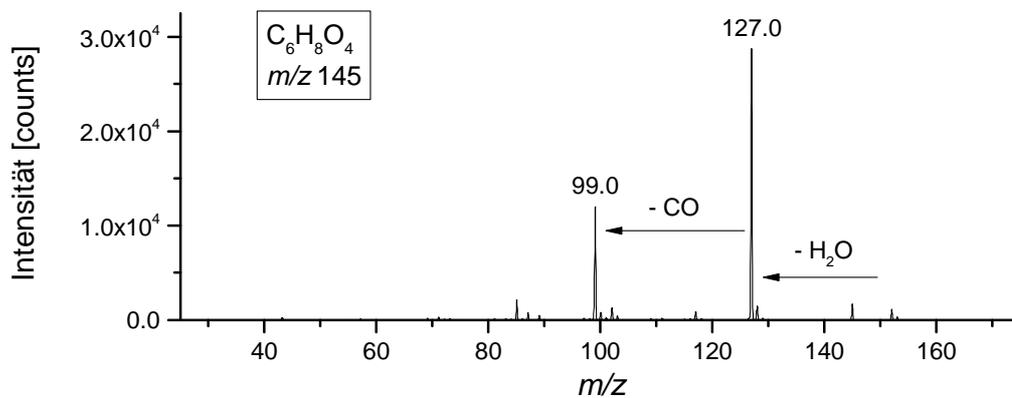


Abbildung 100: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 145 aus dem Phloemsaft aus Mais.

Abbildung 101 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_8H_7NO_3$ (m/z 166,0497). Das Auftreten lediglich eines Fragments, das 46 m/z -Einheiten weniger aufweist, als das entsprechend *Precursor*-Ion, könnte sich durch die Abspaltung von Wasser und CO erklären lassen und erinnert an das Fragmentierungsverhalten der Aminosäuren Valin und Leucin. Ein nahezu identisches Massenspektrum der Fragmente wurde im MS/MS-Experiment der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_{11}NO_2$ (m/z 166,0861) im Phloemsaft aus Raps, bei der vermutet wird, dass es sich um die Aminosäure Phenylalanin handelt, erhalten (vgl. Abbildung 111). Möglicherweise zeigt die Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_8H_7NO_3$ (m/z 166,0497) ein zur Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_{11}NO_2$ (m/z 166,0861) analoges Fragmentierungsverhalten. Eine weitere Möglichkeit wäre eine veränderte Zusammensetzung des Phloemsafts aus Mais zum Zeitpunkt der Gewinnung der Proben für die DIP-APCI-Ion Trap-MS Analyse. So könnte anstelle der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_8H_7NO_3$ (m/z 166,0497) die Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_{11}NO_2$ (m/z 166,0861) vorgelegen haben und mittels DIP-APCI-MS/MS analysiert worden sein.

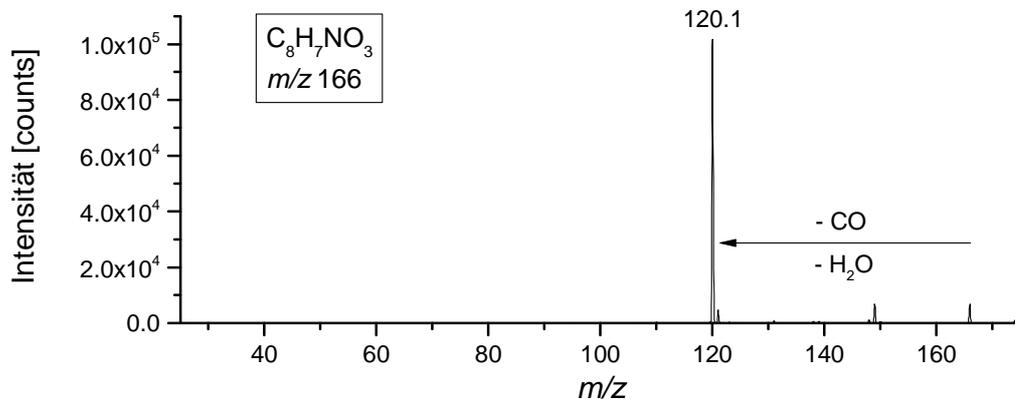


Abbildung 101: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 166 aus dem Phloemsaft aus Mais.

In Abbildung 102 ist das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_9NO_4$ (m/z 196,0603) dargestellt. Unter Verwendung der gewählten Fragmentierungsenergie konnte keine ausreichende Fragmentierung von m/z 196 erzielt werden. Eine Wiederholung des MS/MS-Experiments unter Verwendung einer erhöhten Fragmentierungsenergie war nicht möglich, da kein Phloemsaft aus Mais mehr zur Verfügung stand.

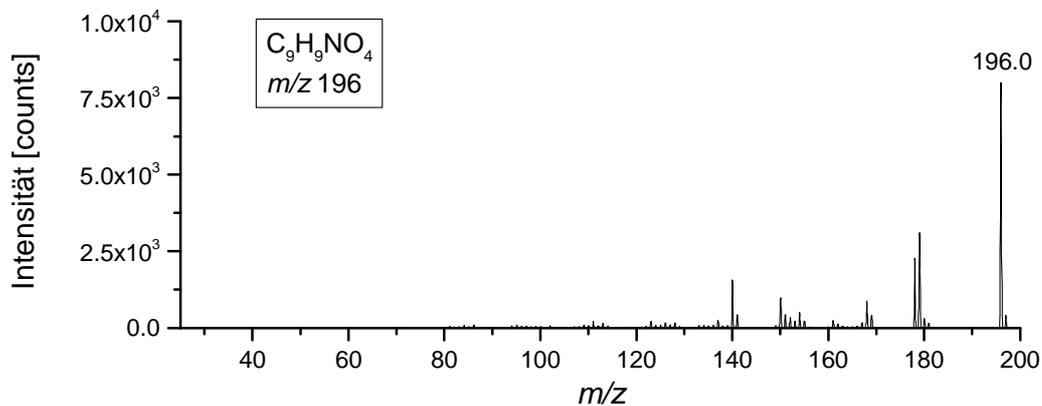


Abbildung 102: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 196 aus dem Phloemsaft aus Mais.

Die mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS durchgeführten MS/MS-Experimente von Bestandteilen des Phloemsafts aus Mais konnten den Nachweis der Aminosäuren Valin und Leucin bestätigen.

Dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_6N_2O$ (m/z 123,0553) um Nicotinamid handelt, konnte nicht bestätigt werden. Hinsichtlich der Identität der übrigen mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS nachgewiesenen Bestandteile von Phloemsaft aus Mais konnten mit Hilfe der durchgeführten MS/MS-Experimente keine Erkenntnisse gewonnen werden. Dies lässt sich unter anderem durch die beobachteten Fragmentierungen durch unspezifische Abspaltungen, beispielsweise von Wasser und CO, begründen.

Phloemsaft aus Raps

Im Phloemsaft aus Raps konnten mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus zwanzig Bestandteile nachgewiesen und mögliche Summenformeln ermittelt werden. m/z -Signale aller dieser nachgewiesenen Bestandteile konnten auch mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS detektiert werden und die entsprechenden m/z -Spuren zeigten einen dem Temperaturprogramm der Schubstange entsprechenden Anstieg der Signalintensität. Um die nachgewiesenen Bestandteile zu identifizieren, wurden auch im Fall von Phloemsaft aus Raps MS/MS-Experimente durchgeführt. Wie bereits bei den MS/MS-Experimenten von Bestandteilen des Phloemsafts aus Mais, war es auch beim Phloemsaft aus Raps nicht möglich für alle nachgewiesenen Bestandteile aussagekräftige Massenspektren der gebildeten Fragmente zu erhalten, da die Signalintensitäten zum Teil sehr gering waren. Hinsichtlich der Identität der Verbindungen mit den postulierten Summenformeln C_4H_9N (m/z 72,0811), $C_5H_{11}N$ (m/z 86,0966), C_3H_9NOS (m/z 108,0476), $C_6H_8N_2$ (m/z 109,0760), $C_7H_{13}N$ (m/z 112,1121), $C_5H_9NO_2$ (m/z 116,0706), C_8H_9N (m/z 120,0808) sowie $C_8H_{12}N_2$ (m/z 137,1072) konnten aus diesem Grund keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der MS/MS-Experimente der übrigen nachgewiesenen Bestandteile des Phloemsafts aus Raps beschrieben.

Analog zum Phloemsaft aus Mais bestätigt das MS/MS-Experiment von m/z 118 (Abbildung 103) auch im Fall des Phloemsafts aus Raps, dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_5H_{11}NO_2$ (m/z 118,0863) um die Aminosäure Valin handelt. Wie im MS/MS-Experiment von Valin in der Phloemsaft-Standardmischung beobachtet, fragmentiert m/z 118 durch Verlust von Wasser und CO zu m/z 72.

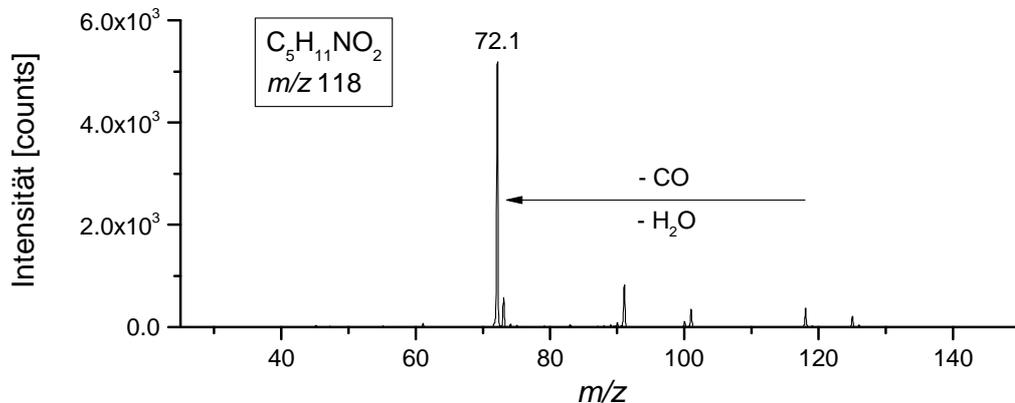


Abbildung 103: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 118 aus dem Phloemsaft aus Raps.

Die MS/MS-Experimente der Verbindung mit der postulierten Summenformel C₆H₆N₂O (m/z 123,0553) führen im Fall des Phloemsafts aus Raps (Abbildung 104) zu denselben Erkenntnissen, wie im Fall des Phloemsafts aus Mais. Unter Verwendung einer *Reaction amplitude* von 100 % konnte erneut keine Fragmentierung von m/z 123 erreicht werden (vgl. Abbildung 104a). Die Erhöhung der Fragmentierungsenergie (*Reaction amplitude*: 120 %) führte zur Fragmentierung von m/z 123, es konnten jedoch keine Fragmente detektiert werden (vgl. Abbildung 104b). Auch im Fall des Phloemsafts aus Raps konnte daher nicht bestätigt werden, dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel C₆H₆N₂O um Nicotinamid handelt.

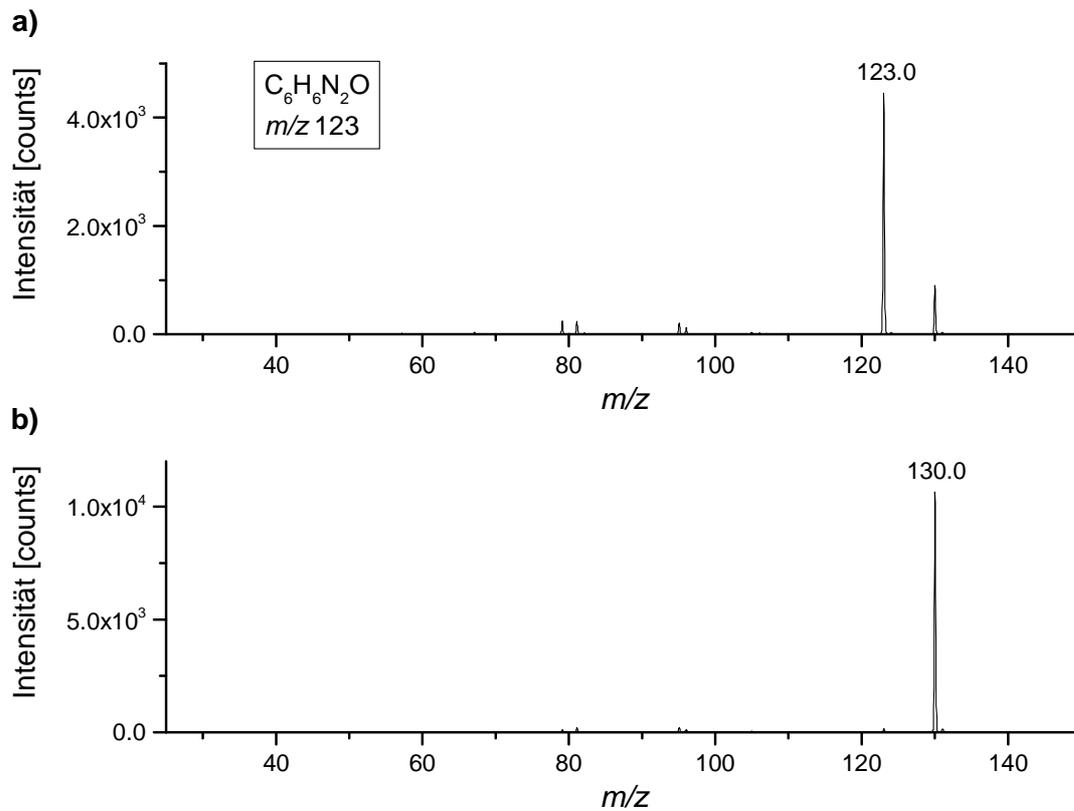


Abbildung 104: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 123 aus dem Phloemsaft aus Raps; (a) *Reaction amplitude*: 100 %; (b) *Reaction amplitude*: 120 %.

In Abbildung 105 ist das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_9NO_2$ (m/z 128,0705) aus dem Phloemsaft aus Raps dargestellt. m/z 128 aus dem Phloemsaft aus Raps fragmentiert, wie m/z 128 aus dem Phloemsaft aus Mais auch, hauptsächlich zu Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 111 und 100, was sich durch die Abspaltung von NH_3 bzw. von CO erklären lassen könnte. Somit scheint es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_9NO_2$ im Phloemsaft aus Mais und Raps um dieselbe Substanz zu handeln.

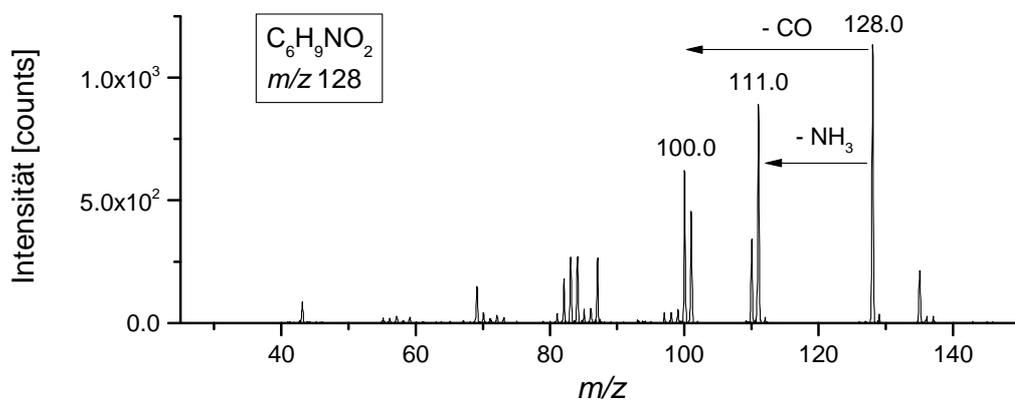


Abbildung 105: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 128 aus dem Phloemsaft aus Raps.

Abbildung 106 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments von m/z 132 aus dem Phloemsaft aus Raps. Dieses bestätigt, dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_{13}NO_2$ (m/z 132,1018), analog zum Phloemsaft aus Mais, auch im Fall des Phloemsafts aus Raps um die Aminosäure Leucin handelt. Wie im MS/MS-Experiment von Leucin in der Phloemsaft-Standardmischung beobachtet, fragmentiert m/z 132 durch Verlust von Wasser und CO zu m/z 86.

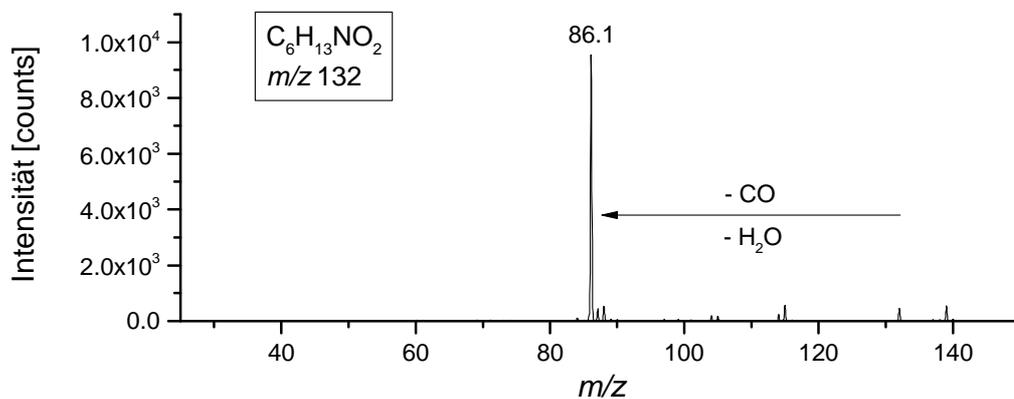


Abbildung 106: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 132 aus dem Phloemsaft aus Raps.

In den DIP-APCI-Q-TOF-MS Analysen konnten im Phloemsaft aus Raps zwei Verbindungen mit einem nominalen m/z -Verhältnis von 144 nachgewiesen werden. Mittels DIP-APCI-Ion

Trap-MS ist es nicht möglich, getrennte MS/MS-Experimente dieser beiden Verbindungen mit den postulierten Summenformeln C_6H_9NOS (m/z 144,0476) und $C_7H_{13}NO_2$ (m/z 144,1017) durchzuführen. Abbildung 107 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments von m/z 144 aus dem Phloemsaft aus Raps. Dieses stimmt nahezu vollständig mit dem Massenspektrum des MS/MS-Experiments von m/z 144 aus dem Phloemsaft aus Mais (vgl. Abbildung 99) überein, für das postuliert wurde, dass aufgrund des Vorhandenseins von m/z 145 kein reines Massenspektrum der Fragmente von m/z 144 generiert werden konnte. Mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS wurden bei Analyse des Phloemsafts aus Raps im Temperaturbereich bis 150 °C keine m/z -Signale, die auf Fragmente von Zuckern durch beginnende Karamellisierungsreaktionen zurückzuführen sind (beispielsweise m/z 127,04 und m/z 145,05), detektiert. Mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS wurden m/z 127,0 und m/z 145,0 hingegen auch bei Analyse des Phloemsafts aus Raps detektiert. Somit ist davon auszugehen, dass auch im Fall des Phloemsafts aus Raps kein reines Massenspektrum der Fragmente von m/z 144 generiert werden konnte.

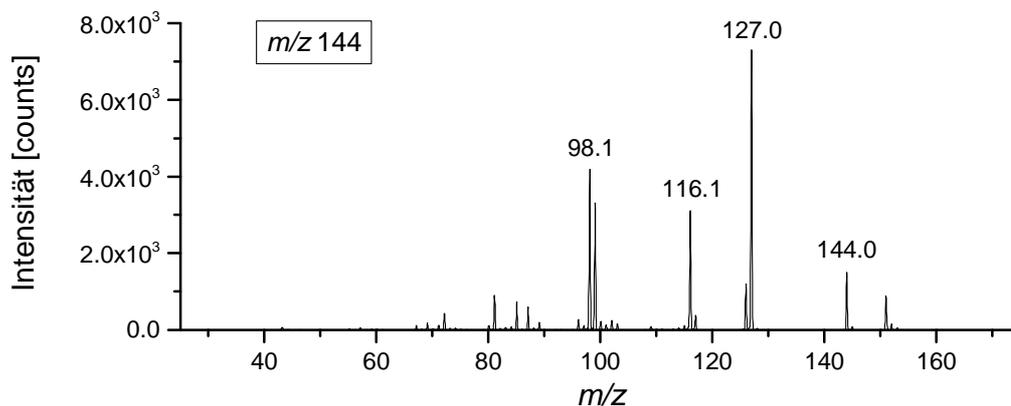


Abbildung 107: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 144 aus dem Phloemsaft aus Raps.

In Abbildung 108 ist das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_{11}NO_3$ (m/z 146,0810) dargestellt. Die detektierten Fragmente könnten sich durch Abspaltungen von NH_3 , Wasser und CO_2 erklären lassen.

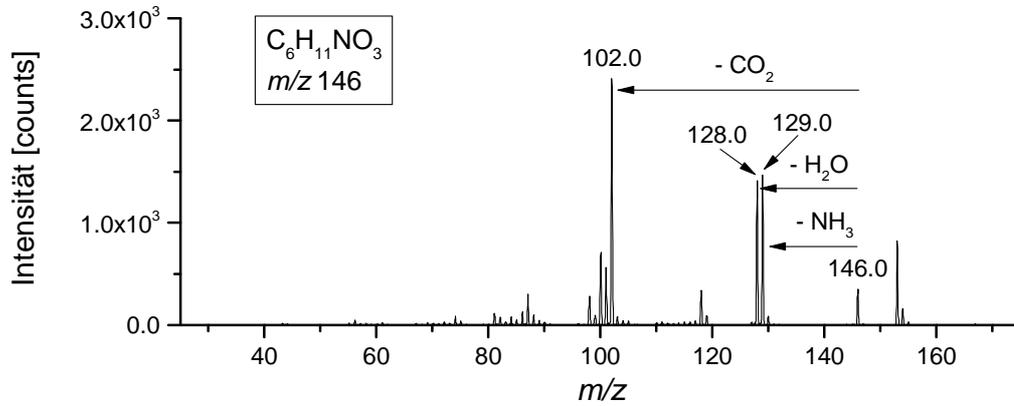


Abbildung 108: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 146 aus dem Phloemsaft aus Raps.

Abbildung 109 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel C₈H₁₅NO₂ (m/z 158,1174). m/z 158 fragmentiert zu Verbindungen mit den m/z -Verhältnissen 140, 130 und 112, was sich durch Abspaltungen von Wasser, CO bzw. Wasser und CO erklären lassen könnte.

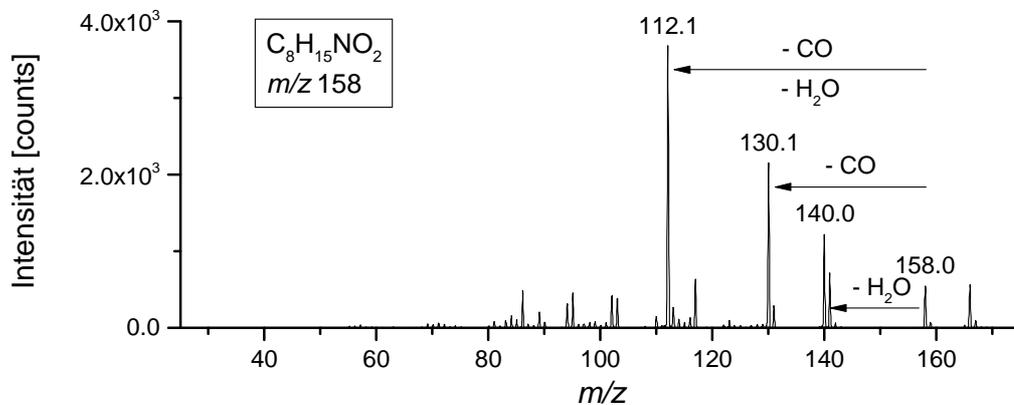


Abbildung 109: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 158 aus dem Phloemsaft aus Raps.

Abbildung 110 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel C₇H₁₃NOS (m/z 160,0788). Die Entstehung der detektierten Fragmente mit den m/z -Verhältnissen 143 und 115 könnte durch Abspaltungen von NH₃ bzw. von NH₃ und CO erklärt werden.

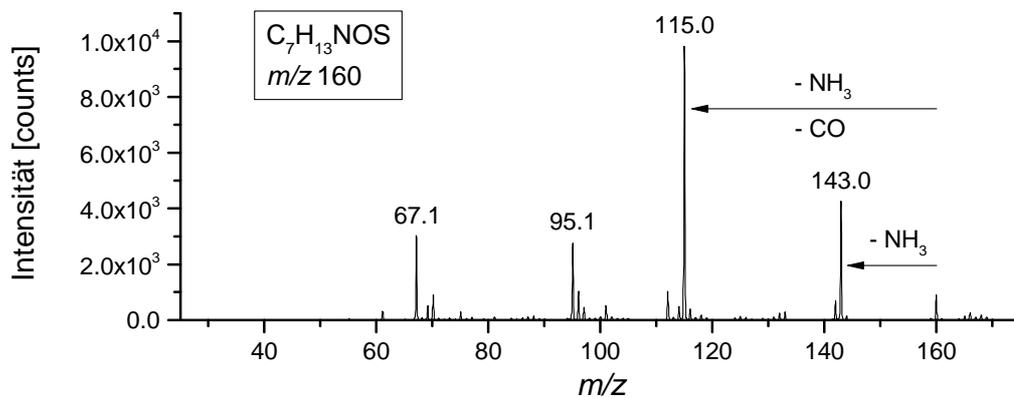


Abbildung 110: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 160 aus dem Phloemsaft aus Raps.

Im Phloemsaft aus Raps wurde mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS eine Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_{11}NO_2$ (m/z 166,0861) nachgewiesen, bei der es sich um die Aminosäure Phenylalanin handeln könnte. In Abbildung 111 ist das Massenspektrum des MS/MS-Experiments dieser Verbindung dargestellt. m/z 166 fragmentiert nahezu ausschließlich zu m/z 120, was sich durch die Abspaltung von Wasser und CO erklären lassen könnte. Dieses Fragmentierungsverhalten entspricht dem der Aminosäuren Valin und Leucin, was darauf hindeutet, dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_{11}NO_2$ tatsächlich um die Aminosäure Phenylalanin handelt.

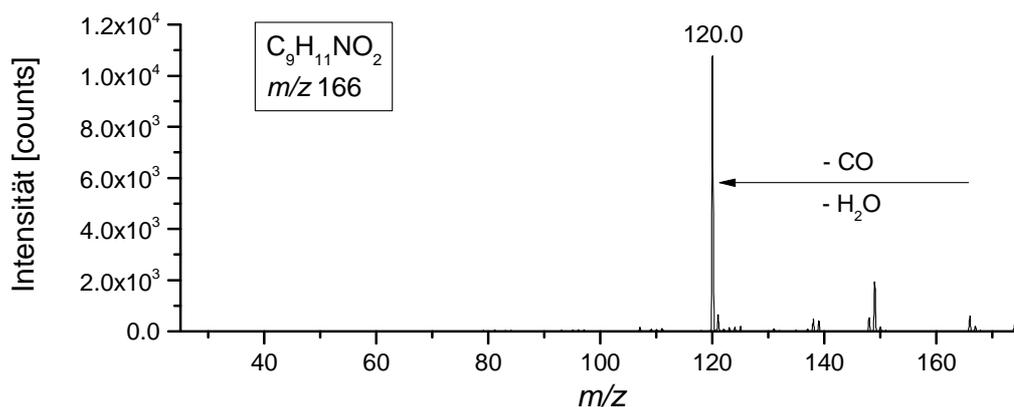


Abbildung 111: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 166 aus dem Phloemsaft aus Raps.

Abbildung 112 zeigt das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_{14}N_2O_2$ (m/z 183,1127). m/z 183 bildet im MS/MS-Experiment lediglich ein Fragment mit einem m/z -Verhältnis von 165. Diese Fragmentierung lässt sich wahrscheinlich durch die Abspaltung von Wasser erklären.

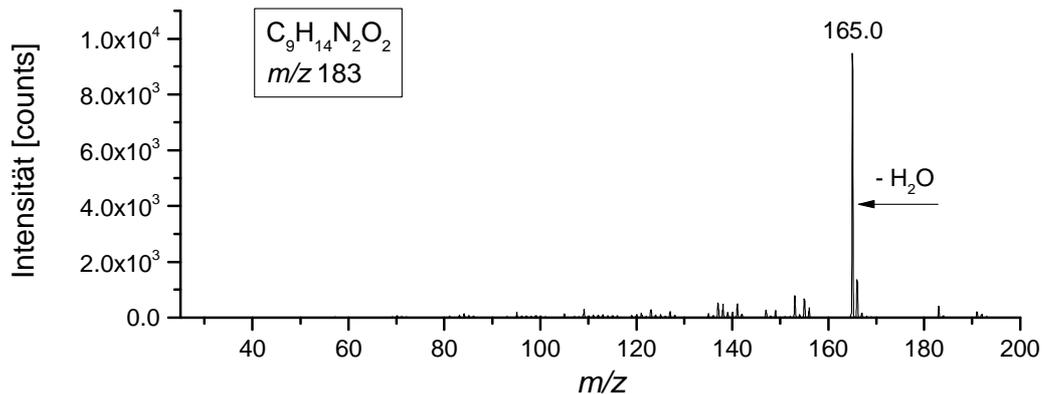


Abbildung 112: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 183 aus dem Phloemsaft aus Raps.

In Abbildung 113 ist das Massenspektrum des MS/MS-Experiments der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_{10}H_{19}NO_2$ (m/z 186,1488) gezeigt. Die aus m/z 186 gebildeten Fragmente mit den m/z -Verhältnissen 168 und 140 könnten durch Abspaltungen von Wasser bzw. von Wasser und CO erklärt werden.

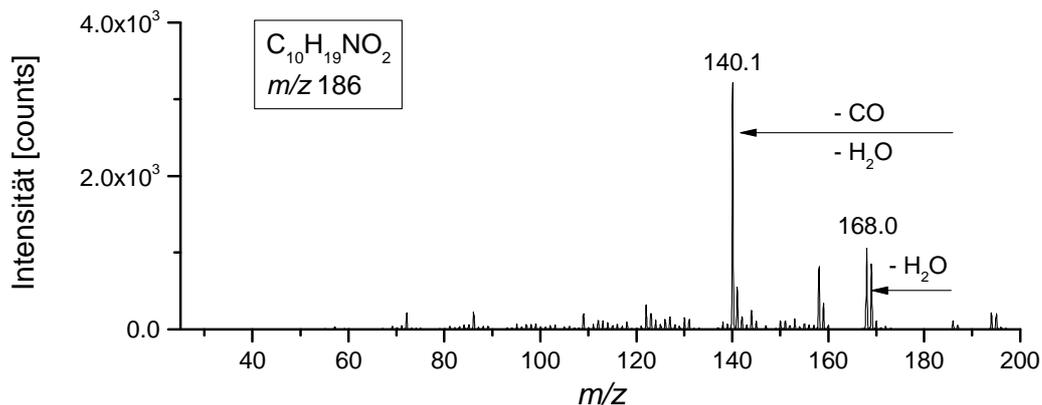


Abbildung 113: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 186 aus dem Phloemsaft aus Raps.

Wie bereits im Fall des Phloemsafts aus Mais konnten die mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS durchgeführten MS/MS-Experimente auch im Fall des Phloemsafts aus Raps den Nachweis der Aminosäuren Valin und Leucin bestätigen. Zusätzlich lieferte das MS/MS-Experiment der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_9H_{11}NO_2$ (m/z 166,0861) einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei dieser Verbindung um die Aminosäure Phenylalanin handelt. Dass es sich bei der Verbindung mit der postulierten Summenformel $C_6H_6N_2O$ (m/z 123,0553) um Nicotinamid handelt, konnte auch im Fall von Phloemsaft aus Raps nicht bestätigt werden. Die durchgeführten MS/MS-Experimente der übrigen mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS nachgewiesenen Bestandteile von Phloemsaft aus Raps lieferten keine ausreichenden Hinweise auf die Identität dieser Verbindungen. Dies lässt sich, wie auch im Fall des Phloemsafts aus Mais, unter anderem dadurch begründen, dass lediglich unspezifische Abspaltungen, beispielsweise von Wasser und CO, beobachtet wurden.

3.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) basierende Ionenquelle (DIP-APCI) zur direkten massenspektrometrischen Analyse fester und flüssiger Proben entwickelt. Einsatzmöglichkeiten der DIP-APCI-MS sowohl in der qualitativen, als auch in der quantitativen Analyse, konnten gezeigt werden.

Zur Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten soll zukünftig eine VUV-Lampe an den Quellskörper der Ionenquelle gekoppelt und auf diese Weise DIP-APPI-MS Analysen ermöglicht werden. Die Entwicklung einer DIP-APPI Ionenquelle sollte eine empfindliche massenspektrometrische Analyse ermöglichen, da im Gegensatz zur LC-APPI-MS lösungsmittelfrei gearbeitet werden kann und somit keine Absorption von VUV-Photonen durch das Lösungsmittel erfolgt.

Eine weitere geplante Modifizierung der Ionenquelle besteht im Ersatz des APCI-Verdampfers durch einen ESI-Sprayer. Dies ermöglicht die Kombination der temperaturprogrammierten Verdampfung durch die Schubstange mit einer Nachionisation nach dem Prinzip der EESI. Auf diese Weise könnte das Spektrum der analysierbaren Substanzen auf polare Analyten, die einer Ionisation mittels APCI weniger zugänglich sind, ausgedehnt werden.

Hinsichtlich der Analyse von Phloemsaft aus Mais und Raps erscheint es sinnvoll, weiteren Phloemsaft zu gewinnen und mittels LC-MS unter Verwendung eines μ -HPLC Systems zu

analysieren. Die im Phloemsaft zu erwartenden polaren Bestandteile sollten einer flüssigchromatographischen Analyse und der Detektion mittels ESI-MS zugänglich sein. Ein μ -HPLC-System ermöglicht Injektionen aus einem Reservoir von lediglich 5 μ L, womit nur eine geringfügige Verdünnung des Phloemsafts vor der Analyse nötig wäre. Dadurch sollte eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit erreicht werden.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) basierende Ionenquelle zur direkten massenspektrometrischen Analyse fester und flüssiger Proben entwickelt. Die Ionenquelle verwendet ein Direkteinlass-System (*Direct inlet probe*, DIP), welches die Proben mit Hilfe einer temperaturprogrammierbaren Schubstange automatisiert in die Ionenquelle einbringt und reproduzierbar positioniert. Durch programmiertes Aufheizen der Schubstange in der Ionenquelle werden flüchtige und semiflüchtige Probenbestandteile getrennt nach ihren Dampfdrücken in die Gasphase überführt.

Die entwickelte DIP-APCI-Ionenquelle wurde unter Verwendung von zwei verschiedenen, in der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal angefertigten, Quellkörpern an ein hochauflösendes Q-TOF-Massenspektrometer (Agilent Technologies) und an ein Ion Trap-Massenspektrometer (Bruker Daltonik) gekoppelt. Für beide Kopplungen wurden die Gasflüsse in der Ionenquelle sowie die Einfahrposition der Schubstange in die Ionenquelle optimiert. Bei Ionisation im Positiv-Modus wurden alle untersuchten Analyten in protonierter Form ($[M + H]^+$) detektiert. Eine Ionisation im Negativ-Modus wurde durch das Einbringen einer ausreichenden Menge an Sauerstoff in die Ionenquelle ermöglicht. Im Negativ-Modus wurde die Bildung von $[M - H]^-$ - und $[M + O_2]^-$ -Ionen der untersuchten Analyten beobachtet. Im Fall beider Kopplungen konnte eine lineare Abhängigkeit der Signalintensität des Testanalyten Coffein von der Konzentration beobachtet werden. Dies zeigt die Möglichkeit eines Einsatzes der DIP-APCI-Ionenquelle in der quantitativen Analyse.

Unter Verwendung des Q-TOF-Massenspektrometers konnte die Reproduzierbarkeit der DIP-APCI-MS Analyse am Beispiel der Analyse eines Extraktes aus der chinesischen Angelikawurzel (*Radix Angelicae sinensis*) demonstriert werden. Die Möglichkeit der Trennung von Probenbestandteilen nach ihren Dampfdrücken durch programmiertes Aufheizen der Schubstange wurde durch die nahezu vollständige Trennung von Hexansäuremethylester und Dodecansäuremethylester gezeigt.

Die DIP-APCI-Q-TOF-MS Kopplung wurde zur qualitativen Analyse von in der chinesischen Heilpflanzenmedizin (CHM) verwendeten Pflanzen eingesetzt. Eine Unterscheidung der

chinesischen Angelikawurzel (*Radix Angelicae sinensis*) und der koreanischen Angelikawurzel (*Radix Angelicae gigas*) konnte durch direkte Analyse der gemahlten Pflanzen und Nachweis der in *Radix Angelicae gigas* vermehrt enthaltenen Cumarine, anhand der Detektion deren akkurater m/z -Verhältnisse, erzielt werden. Auch verarbeitet in Xiao Yao Pillen, einer in der CHM verwendeten Zubereitung verschiedener Pflanzen, konnte die Verwendung der europäischen Angelikawurzel (*Radix Angelicae archangelica*) anstelle der *Radix Angelicae sinensis* über die Detektion von Cumarinen nachgewiesen werden. Dies zeigt die Möglichkeit eines Einsatzes der DIP-APCI-MS zu Authentizitätsprüfungen und Qualitätskontrollen von in der CHM verwendeten Pflanzen und Zubereitungen.

Die Möglichkeit eines Einsatzes der DIP-APCI-Ionenquelle zur quantitativen Analyse konnte am Beispiel der Bestimmung des Cumarinegehalts von Zimt unter Verwendung der DIP-APCI-Q-TOF-MS Kopplung demonstriert werden. Die Validierung der DIP-APCI-MS Bestimmung von Cumarin in Zimt nach Extraktion zeigte zufriedenstellende Linearität, Wiederfindung und Reproduzierbarkeit, sowohl unter Verwendung von deuteriertem Cumarin als interner Standard, als auch ohne den Einsatz eines internen Standards. Unter Verwendung von deuteriertem Cumarin als interner Standard wurden mittels DIP-APCI-MS und mittels LC-MS vergleichbare Cumarinegehalte verschiedener Zimtproben ermittelt. Ohne Verwendung eines internen Standards wurden hohe Cumarinegehalte in der LC-MS Analyse überschätzt und in der DIP-APCI-MS Analyse unterschätzt. Dies zeigt, dass der Einsatz von deuteriertem Cumarin als interner Standard bei beiden Methoden sinnvoll ist, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Die Bestimmung von Cumarin in Getränken mit Waldmeistergeschmack zeigte, dass spektralen Interferenzen in der ambienten Massenspektrometrie besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden muss. Mittels LC-MS konnte in einem Likör mit Waldmeistergeschmack kein Cumarin nachgewiesen werden. Während der DIP-APCI-MS Analyse wurde durch den Einfluss der eingesetzten hohen Temperatur ein zu Cumarin isobares Artefakt gebildet. Die temperaturprogrammierte Verdampfung in Kombination mit dem Einsatz von deuteriertem Cumarin als interner Standard hat zum Erkennen dieser Interferenz geführt.

Unter Verwendung der DIP-APCI-Ion Trap-MS Kopplung wurde eine zerstörungsfreie Analyse von Kunststoffgegenständen auf das Vorhandensein von Phthalaten und anderen Weichmachern durchgeführt. Die Identifizierung von Weichmachern erfolgte mit Hilfe von MS/MS- und MS³-

Experimenten und der vergleichenden Analyse von Standardsubstanzen. Auf diese Weise konnten Weichmacher in Spielzeug, Kunststoffen mit Lebensmittelkontakt und anderen Bedarfsgegenständen aus Kunststoff nachgewiesen werden.

Die DIP-APCI-Ion Trap-MS wurde auch zur Wirkstoffanalyse von Schmerzmitteln und Antibiotika eingesetzt. Die Wirkstoffe aller untersuchten Schmerzmittel (Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen, Paracetamol und Naproxen) und Antibiotika (Clarithromycin, Rifampicin und Ethambutol) konnten direkt aus den untersuchten Tabletten oder Salben nachgewiesen werden. Eine Absicherung der Identität erfolgte über MS/MS-Experimente.

Neben der Entwicklung der DIP-APCI-Ionenquelle lag ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Analyse von Phloemsaft. Mit Hilfe der Laser-Aphiden-Technik konnte Phloemsaft aus den Kulturpflanzen Mais und Raps gewonnen werden. Die direkte Analyse des Phloemsafts mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS ermöglichte den Nachweis von zwölf Bestandteilen des Phloemsafts aus Mais bzw. von zwanzig Bestandteilen des Phloemsafts aus Raps und die Ableitung möglicher Summenformeln aus den detektierten akkuraten m/z -Verhältnissen. Mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS erfolgte ein Versuch der Strukturaufklärung durch MS/MS-Experimente. Aufgrund des geringen Molekulargewichts der im Phloemsaft nachgewiesenen Bestandteile, sowie geringer Signalintensitäten und unspezifischer Fragmentierungen, konnte jedoch lediglich eine Identifizierung der bekanntermaßen im Phloemsaft enthaltenen Aminosäuren Valin und Leucin über die vergleichende Analyse von Standardsubstanzen erfolgen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Gewinnung von Phloemsaft aus Mais und Raps

Die Gewinnung von Phloemsaft aus Mais (*Zea mays*) und Raps (*Brassica napus*) erfolgte unter Verwendung der Laser-Aphiden-Technik (vgl. Kapitel 1.2.4). Die Versuchspflanzen Mais und Raps wurden kontinuierlich im Gewächshaus unter Standardbedingungen angezogen. Zur Gewinnung von Phloemsaft aus Mais wurden Blattläuse der Art *Rhopalosiphum padi* eingesetzt, welche im Brutschrank auf Mais, sowie auf zu diesem Zweck angezogener Gerste (*Hordeum*), nachgezüchtet wurden. Die Gewinnung von Phloemsaft aus Raps erfolgte mit Hilfe von Blattläusen der Art *Myzus persicae*, welche auf Raps nachgezüchtet wurden.

Zur Gewinnung von Phloemsaft wurden ca. zehn Blattläuse in einem kleinen Käfig an die Versuchspflanze (frei von Blattlausbefall) geheftet. Nach einer Wartezeit von ca. zwei Stunden, um den Blattläusen Zeit zu geben, ihre Stechrüssel in das Phloem der Versuchspflanze zu inserieren, wurden die Stechrüssel mit einem Laserstrahl, der mit Hilfe eines Mikroskops geleitet wird, durchtrennt. Nach der Durchtrennung verbleibt der untere Teil des Stechrüssels in den Siebröhren und der Rest der Blattlaus wurde mit einem Pinsel entfernt. Im Fall des Austretens von Phloemsaft aus dem verbleibenden Teil des Stechrüssels wurde nach ca. drei Minuten eine Mikrokapillare (0,5 µL) mit Hilfe von Mikromanipulatoren über den durchtrennten Stechrüssel platziert und der austretende Phloemsaft aufgefangen.

Der in den Mikrokapillaren gesammelte Phloemsaft wurde zur GCxGC-MS und zur LC-MS Analyse in 100 µL Wasser gegeben und bis zur Analyse bei -80 °C tiefgefroren. Hierbei wurden mehrere Phloemsaftproben gepoolt, sodass Konzentrationen von ca. 1000 nL Phloemsaft/100 µL Wasser in den tiefgefrorenen Proben vorlagen. Zur DIP-APCI-MS Analyse wurde gewonnener Phloemsaft unverdünnt in den Mikrokapillaren bei -80 °C tiefgefroren.

5.2 Kalibrierung des Q-TOF-Massenspektrometers

Zur Gewährleistung der spezifizierten Auflösung und Massengenauigkeit des Agilent Technologies 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF-Massenspektrometers wurde das Massenspektrometer in regelmäßigen Abständen kalibriert und getunt. Hierzu wurde die ESI-Ionenquelle an das Massenspektrometer gekoppelt und eine kommerziell erhältliche Kalibrierlösung (ESI-L Low Concentration Tuning Mix) mit Hilfe des automatischen Liefersystems, welches auch zum ständigen Einbringen der Referenzlösung zur internen Massenkorrektur verwendet wird, über den ESI-Sprayer in die Ionenquelle eingebracht und ionisiert. Bei der Kalibrierlösung handelt es sich um einen 10-Komponenten-Mix, der den m/z -Bereich zwischen 110 und 2800 abdeckt. Die Kalibration der Massenachse und das Tuning erfolgten über die Autotune-Funktion der MassHunter Workstation Software (verschiedene Softwareversionen, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Es wurde überprüft, ob die Spezifikationen hinsichtlich der Auflösung erreicht werden (mindestens 10.000 bei m/z 322 und mindestens 20.000 bei m/z 1522 im Modus für einen erweiterten dynamischen Bereich bzw. mindestens 20.000 bei m/z 322 und mindestens 40.000 bei m/z 1522 im Hochauflösungs-Modus) und ob die spezifizierte Massenabweichung von <1 ppm für alle Komponenten der Kalibrierlösung gegeben ist.

5.3 Kalibrierung des Ion Trap-Massenspektrometers

Das Ion Trap-Massenspektrometer wurde vor Beginn der Arbeiten mit der DIP-APCI-Ionenquelle, sowie im Fall der Beobachtung erhöhter Abweichungen der detektierten m/z -Signale von den theoretischen m/z -Verhältnissen der Analyten, kalibriert. Zur Kalibrierung wurde die ESI-Ionenquelle an das Massenspektrometer gekoppelt. Die verwendete Kalibrierlösung wurde durch Verdünnung einer kommerziell erhältlichen Kalibrierlösung (ESI Tuning Mix) mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch hergestellt und mit Hilfe einer Spritzenpumpe über den ESI-Sprayer in die Ionenquelle eingebracht und ionisiert. Bei der Kalibrierlösung handelt es sich um einen 7-Komponenten-Mix, der den m/z -Bereich zwischen 110 und 2800 abdeckt. Die Kalibration der Massenachse erfolgte unter Verwendung der manuellen Kalibrierfunktion der Software Compass (verschiedene Softwareversionen, Bruker

Daltonik, Bremen, D). Hierbei wurde ein manueller Abgleich der detektierten m/z -Signale der Bestandteile der Kalibrierlösung mit deren theoretischen m/z -Verhältnissen durchgeführt.

5.4 Herstellung von Standardlösungen und Probenvorbereitung

Flüssige Proben und Standardlösungen wurden zur DIP-APCI-MS Analyse mit Hilfe einer GC-Spritze in Probentiegel, welche zuvor in die Probenaufnahme für feste Proben eingebracht wurden, oder alternativ in die Probenaufnahme für flüssige Proben injiziert. Die Probenaufnahme für flüssige Proben konnte nur bei rückstandsfreier Verdampfung der injizierten Probe eingesetzt werden. Bei rückstandshinterlassenden Proben wurden die Probentiegel für feste Proben, welche für den einmaligen Gebrauch vorgesehen sind, verwendet. Üblicherweise wurde ein Volumen von 1 μL eingesetzt.

Zur direkten DIP-APCI-MS Analyse fester Proben wurden pulverförmige Proben (z.B. gemahlene *Radix Angelicae sinensis*; Zimtpulver) mit Hilfe eines Spatels in die Probentiegel für feste Proben eingebracht. In der chinesischen Heilpflanzenmedizin eingesetzte Pillen wurden vor der Analyse gemörsert. Bei einigen Proben (Analyse von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs; Wirkstoffanalyse von Arzneimitteln) wurden die Probentiegel lediglich über die Probenoberfläche gerieben bzw. die Probenoberfläche mit den Probentiegeln berührt.

5.4.1 Standardlösungen zur Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle

Zur Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Q-TOF-MS wurden Stammlösungen (1000 mg/L) von Coffein, Hexansäuremethylester und Dodecansäuremethylester in Dichlormethan hergestellt. Coffein-Standardlösungen im Konzentrationsbereich von 0,5-100 mg/L wurden durch entsprechende Verdünnung der Coffein-Stammlösung mit Dichlormethan erhalten. Eine Standardlösung mit Hexansäuremethylester und Dodecansäuremethylester (je 100 mg/L) wurde in Dichlormethan angesetzt. N-nonyl- β -D-maltosid sowie das Polyethylenglycol- und das Alkylpolyglucosid-Gemisch wurden als Reinsubstanzen eingesetzt.

Zur Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Ion Trap-MS wurden Coffein-Standardlösungen mit einer Konzentration von 100 mg/L in Dichlormethan sowie im Konzentrationsbereich von 1,0-100 mg/L in Methanol hergestellt.

5.4.2 Extraktion von chinesischen Heilpflanzen

Chinesische Heilpflanzen und daraus hergestellte Pillen wurden mit Dichlormethan im Ultraschallbad extrahiert. Hierzu wurden 0,25 g der getrockneten, pulverförmigen Pflanzen oder gemörserten Pillen eingewogen, mit 2,5 mL Dichlormethan versetzt und 40 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Extrakte durch einen 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert.

5.4.3 Quantifizierung von Cumarin in Zimt und Waldmeister-Getränken mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS und LC-Q-TOF-MS

Zur Untersuchung der Möglichkeiten der Quantifizierung von Cumarin mittels DIP-APCI-MS wurden zehn Zimtproben (5 Proben Ceylon-Zimt, 2 Proben Cassia-Zimt und 3 Proben Zimt ohne Angabe der botanischen Herkunft), zwei Getränke mit Waldmeistergeschmack und ein Kaugummi mit Zimtgeschmack im Einzelhandel erworben.

Stammlösungen von Cumarin (1000 mg/L) und d₄-Cumarin als interner Standard (460 mg/L) wurden in Methanol angesetzt. Durch Verdünnung mit Methanol/Wasser (80/20; v/v) wurden aus den Stammlösungen Kalibrierlösungen mit 0,1-10 mg Cumarin/L (0,1, 0,5, 1, 5 und 10 mg/L) und jeweils 0,9 mg d₄-Cumarin/L hergestellt.

5.4.3.1 Methodvalidierung

Sowohl die DIP-APCI-MS Methode, als auch die LC-MS Methode, wurden zur Bestimmung von Cumarin in Zimtpulver validiert. Hierzu wurden Linearität, Wiederfindung, Wiederholbarkeit, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze ermittelt. Da kein Cumarin-freier Zimt als Leer-Matrix verfügbar war, wurde die Zimtprobe mit dem niedrigsten Cumarinegehalt zur Bestimmung der Wiederfindung mit vier verschiedenen Konzentrationen (100, 500, 1000 und 5000 mg/kg) an Cumarin versetzt. Die Wiederholbarkeit (innerhalb eines Tages und an zwei verschiedenen Tagen) wurde durch wiederholte Analyse der zur Bestimmung der Wiederfindung hergestellten Proben ermittelt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach der Kalibriergeradenmethode der DIN 32645 ($\alpha = \beta = 0,05$; $k = 3$) aus der Analyse eines

Extraktes der Zimtprobe mit dem niedrigsten Cumaringehalt, versetzt mit 1-920 µg d₄-Cumarin/L (1, 5, 9, 46, 92, 460 und 920 µg/L), berechnet.

5.4.3.2 Probenvorbereitung zur DIP-APCI-MS und LC-MS Bestimmung von Cumarin in Zimt nach Extraktion

Die Extraktion der Zimtproben zur Quantifizierung von Cumarin mittels DIP-APCI-MS und LC-MS erfolgte nach Methode L.00.00-134 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch). 0,5 g der Zimtproben wurden genau eingewogen und nach Zusatz von d₄-Cumarin als interner Standard mit ca. 40 mL Methanol/Wasser (80/20; v/v) für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Extrakte wurden mit Methanol/Wasser (80/20; v/v) auf 50 mL aufgefüllt und durch einen 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert. 100 µL der Extrakte aus den Cassia-Zimtproben und den Zimtproben ohne Angabe der botanischen Herkunft wurden zur Analyse mit 900 µL Methanol/Wasser (80/20; v/v) verdünnt.

Zum Vergleich mit unbehandelten Extrakten wurde ein Zimtextrakt nach Carrez geklärt [245,257]. Hierzu wurden dem Zimtextrakt vor dem Auffüllen auf 50 mL jeweils 2 mL Carrez I-Lösung (K₄[Fe(CN)₆]*3H₂O, 36 g/L) und Carrez II-Lösung (ZnSO₄*7H₂O, 72 g/L) zugesetzt. Der klare Überstand wurde durch einen 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert.

5.4.3.3 Semiquantitative Bestimmung von Cumarin direkt aus Zimtpulver mittels DIP-APCI-MS

Zur semiquantitativen Bestimmung von Cumarin direkt aus Zimtpulver wurden ca. 0,1 mg des Zimtpulvers genau in die Probentiegel eingewogen und mittels DIP-APCI-MS analysiert.

5.4.3.4 Probenvorbereitung zur DIP-APCI-MS und LC-MS Bestimmung von Cumarin in Waldmeister-Getränken und Kaugummi mit Zimtgeschmack

Das Kaugummi mit Zimtgeschmack wurde zur Analyse mittels DIP-APCI-MS und LC-MS zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend analog zu den Zimtproben extrahiert. Die Getränke mit Waldmeistergeschmack wurden nach Zusatz von d₄-Cumarin als

interner Standard lediglich im Verhältnis 1:1 oder 1:9 mit Methanol/Wasser (80/20; v/v) verdünnt und durch einen 0,2 µm PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert.

4-Hydroxymizsäure wurde zu 460 mg/L in Methanol/Wasser (80/20; v/v) gelöst. Zur Analyse der Getränke mit Waldmeistergeschmack versetzt mit 4-Hydroxymizsäure wurden je 0,5 µL des im Verhältnis 1:1 verdünnten Getränks mit Waldmeistergeschmack und der 4-Hydroxymizsäure-Lösung in die Probentiegel injiziert.

5.4.4 Analyse von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs

Zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens der Weichmacher wurden Standardlösungen der einzelnen Weichmacher in Konzentrationen von 10 mg/L im Fall von DEHP, DBP und BBP bzw. 100 mg/L im Fall von DNOP, DINP, ATBC, DEHA und DBS in Dichlormethan hergestellt. Zur Analyse der Kunststoffgegenstände des täglichen Gebrauchs wurden die Probentiegel für feste Proben lediglich über die Kunststoffoberfläche gerieben und das anhaftende Material mittels DIP-APCI-MS und DIP-APCI-MSⁿ analysiert.

5.4.5 Analyse von Capsaicinoiden

Zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens der Capsaicinoide wurde eine Standardlösung eines Capsaicinoidgemisches („natürliches Capsaicin“: 65 % Capsaicin, 30 % Dihydrocapsaicin, 5 % Nordihydrocapsaicin) in einer Konzentration von 1 g/L in Acetonitril hergestellt.

Gemahlener Cayenne-Pfeffer und Sambal Oelek wurden direkt in die Probentiegel für feste Proben gegeben. Grüne und rote Jalapeños wurden vom Stiel befreit, kleingeschnitten und anschließend in der Kryomühle vermahlen. Aliquote der vermahlenden Jalapeños wurden mit derselben Menge Acetonitril versetzt und je 1 µL des erhaltenen Extrakts in die Probentiegel für feste Proben injiziert.

5.4.6 Wirkstoffanalyse von Schmerzmitteln und Antibiotika

Um die Möglichkeiten der direkten Wirkstoffanalyse pharmazeutischer Proben mittels DIP-APCI-MS zu überprüfen, wurden Schmerzmittel in Tabletten- und Salbenform, sowie Antibiotika in Tablettenform, analysiert. Zur Analyse von Tabletten wurden diese mit Hilfe eines

Messers zerteilt und die Innenseite der Tabletten mit einem Probeniegel für feste Proben berührt. Das anhaftende Material wurde mittels DIP-APCI-MS analysiert. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um den wirkstoffhaltigen Teil der Tabletten und nicht möglicherweise vorhandene Überzüge zu beproben. Aufgrund erkennbarer Probeninhomogenität wurde das untersuchte Aspirin-Effect Pulver vor der Analyse gemörsert und das homogenisierte Pulver mit einem Probeniegel für feste Proben durch Berührung beprobt. Zur Analyse von Salben wurden geringe Mengen der Salben in die Probeniegel für feste Proben eingebracht und mittels DIP-APCI-MS analysiert.

Die analysierten (frei verkäuflichen) Schmerzmittel wurden in einer örtlichen Apotheke erworben, die untersuchten Antibiotika wurden von einem Arzt zur Verfügung gestellt.

5.4.7 Analyse von Phloemsaft

Zur Analyse mittels DIP-APCI-MS wurde der Phloemsaft aus Mais und Raps direkt aus den zur Gewinnung verwendeten Mikrokapillaren in die Probeniegel für feste Proben eingebracht. Die Proben wurden gepoolt, sodass im Fall von Mais für jede Analyse 400-480 nL Phloemsaft eingesetzt wurden. Im Fall von Raps wurden zur Analyse unter Verwendung des Q-TOF-MS 250-270 nL Phloemsaft eingesetzt, zur Analyse unter Verwendung des Ion Trap-MS wurden 430-500 nL Phloemsaft verwendet.

Eine wässrige Phloemsaft-Standardmischung wurde nach Literaturangaben zur Zusammensetzung von Phloemsaft aus Mais hergestellt. Tabelle 21 zeigt die Zusammensetzung dieser Standardmischung. Zur DIP-APCI-MS Analyse wurden 500 nL der Phloemsaft-Standardmischung in die Probeniegel für feste Proben injiziert.

Tabelle 21: Zusammensetzung der wässrigen Phloemsaft-Standardmischung.

| Substanzklasse | Substanz | Summenformel | Konzentration [g/L] |
|-------------------|---------------|----------------------|---------------------|
| Kohlenhydrate | Saccharose | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | 340 |
| | Alanin | $C_3H_7NO_2$ | 7 |
| | Glutaminsäure | $C_5H_9NO_4$ | 6 |
| Aminosäuren | Asparagin | $C_4H_8N_2O_3$ | 3 |
| | Serin | $C_3H_7NO_3$ | 1 |
| | Valin | $C_5H_{11}NO_2$ | 0.5 |
| | Leucin | $C_6H_{13}NO_2$ | 0.5 |
| Organische Säuren | Äpfelsäure | $C_4H_6O_5$ | 0.7 |
| | Citronensäure | $C_6H_8O_7$ | 1 |

Zusätzlich zur Phloemsaft-Standardmischung wurde eine wässrige Nicotinamid-Lösung der Konzentration 1,5 g/L zur Analyse mittels DIP-APCI-Ion Trap-MS hergestellt.

5.5 Geräteeinstellungen zur DIP-APCI-Q-TOF-MS und LC-Q-TOF-MS

Analyse

Die Steuerung des Agilent Technologies 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF-MS und die Auswertung der Massenspektren erfolgten unter Verwendung der MassHunter Workstation Software (verschiedene Softwareversionen, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die DIP wurde manuell mit Hilfe eines Controllers (SIM GmbH, Oberhausen, D) gesteuert. Der Hilfsgasfluss um die Schubstange wurde unter Verwendung eines Schwebekörper-Durchflussmessers (Krohne, Duisburg, D) geregelt. Bei LC-MS Analysen wurde die verwendete Agilent Technologies Infinity 1290 UHPLC durch die Software ChemStation (Version B.04, Agilent Technologies, Waldbronn, D) kontrolliert.

5.5.1 DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse

Im Verlauf der Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle wurden unterschiedliche Geräteeinstellungen des Q-TOF-Massenspektrometers und der DIP verwendet.

Unter optimierten Bedingungen wurde das Q-TOF-MS im Hochauflösungs-Modus (Auflösung von mindestens 20.000 bei m/z 322 bzw. 40.000 bei m/z 1522) und im Standard-Massenbereich (bis 3200 m/z) betrieben. Im Positiv-Modus wurde Stickstoff (100 L/h) als Hilfsgas um die Schubstange in die Ionenquelle geleitet und ein Koronastrom von 4 μA angelegt. Im Negativ-Modus wurde synthetische Luft (100 L/h) als Hilfsgas verwendet und ein Koronastrom von 20 μA angelegt. Massenspektren wurden im m/z -Bereich von 50-3200 oder 50-1000 mit einer Aufnahmezeit von 1 Sekunde aufgenommen. Die zur internen Korrektur der m/z -Achse und der Gewährleistung der Massengenauigkeit verwendete Referenzlösung mit einer Konzentration von 1 μM Purin und 0,2 μM Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluorpropoxy)phosphazin in Methanol wurde über den geheizten Verdampfer in die Ionenquelle eingebracht. Die weiteren optimierten Einstellungen des Q-TOF-MS zur DIP-APCI-MS Analyse sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Optimierte Einstellungen des Q-TOF-MS zur DIP-APCI-MS Analyse.

| | |
|-------------------------------|-----------|
| <i>Drying gas flow rate</i> | 6,0 L/min |
| <i>Drying gas temperature</i> | 300 °C |
| <i>Vaporizer temperature</i> | 325 °C |
| <i>Nebulizer pressure</i> | 20 psig |
| <i>Capillary voltage</i> | 3500 V |
| <i>Fragmentor voltage</i> | 150 V |
| <i>Skimmer voltage</i> | 65 V |
| <i>Octupole rf</i> | 750 V |

Unter optimierten Bedingungen wurde die Schubstange zur Analyse bis auf einen Abstand von 4 mm der Schubstangenspitze von einer Position direkt unterhalb der Korona-Nadel in die Ionenquelle eingebracht.

Zur Analyse der Standards und der komplexen Probe im Verlauf der Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle und zu den beschriebenen Einsätzen der DIP-APCI-Q-TOF-MS in der qualitativen Analyse wurden unterschiedliche Temperaturprogramme der DIP eingesetzt. Diese sind in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 angegeben.

Zur Quantifizierung von Cumarin in Zimt und Waldmeister-Getränken (Kapitel 3.2.3) wurde jeweils 1 μL der Standard- und Probelösungen bzw. ca. 0,1 mg Zimtpulver in Probenziegel für feste Proben eingebracht und die Schubstange mit einer Heizrate von 2 $^{\circ}\text{s}$ auf 400 $^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten. Die Ionisation erfolgte im Positiv-Modus. Massenspektren wurden im m/z -Bereich von 50-1000 aufgenommen.

Die zur Analyse des Phloemsafts aus Mais und Raps verwendeten Probenziegel für feste Proben wurden vor den Analysen 5 min bei 400 $^{\circ}\text{C}$ ausgeheizt. Vor Analyse der jeweiligen Phloemsaftprobe erfolgte unter Verwendung des zur Analyse der Probe eingesetzten, ausgeheizten Probenziegels eine Blindmessung unter den zur Analyse des Phloemsafts verwendeten Bedingungen. Die Schubstange wurde zur Analyse des Phloemsafts aus Mais und Raps mit einer Heizrate von 0,2 $^{\circ}\text{s}$ auf 150 $^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt, diese Temperatur 5 min gehalten und die Schubstange anschließend mit einer Heizrate von 1 $^{\circ}\text{s}$ auf 400 $^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt und diese Temperatur wiederum 5 min gehalten. Die Ionisation erfolgte im Fall von Phloemsaft aus Mais im Positiv- und Negativ-Modus, im Fall von Phloemsaft aus Raps wurden lediglich Analysen im Positiv-Modus durchgeführt. Massenspektren wurden im m/z -Bereich von 50-3200 aufgenommen.

MS/MS-Experimente wurden durch CID unter Verwendung von Stickstoff als Kollisionsgas bei einer Kollisionsenergie von 10 eV durchgeführt. Das *Precursor*-Ion wurde mit einem Isolationsfenster von 4 m/z isoliert.

5.5.2 LC-Q-TOF-MS Analyse

Zur LC-Q-TOF-MS Analyse wurde eine Agilent Technologies Infinity 1290 UHPLC über eine Elektrospray-Ionenquelle an das Q-TOF-MS gekoppelt. Die flüssigchromatographische Trennung erfolgte unter Verwendung einer Kinetex 1,7 μm C18 (100x2,1 mm) HPLC-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, D), welche auf 40 $^{\circ}\text{C}$ temperiert wurde. Als Eluent wurde ein Gradient aus Wasser und Methanol, jeweils mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure, in folgendem Gradientenprogramm verwendet: 0-5 min, 20-55 % Methanol; 5-6 min, 55-90 % Methanol; 6-7 min, 90 % Methanol; 7-8 min, 90-20 % Methanol; 8-10 min, 20 % Methanol. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min und das Injektionsvolumen 1 μL . Das Q-TOF-MS wurde im Hochauflösungs-Modus (Auflösung von mindestens 20.000 bei m/z 322 bzw. 40.000 bei m/z 1522) und im

Standard-Massenbereich (bis 3200 m/z) betrieben. Die Ionisation erfolgte mittels Elektrosprayionisation im Positiv-Modus. Massenspektren wurden im m/z -Bereich von 50-1000 mit einer Aufnahmezeit von 3 Spektren/s aufgenommen. Die zur internen Korrektur der m/z -Achse und der Gewährleistung der Massengenauigkeit verwendete Referenzlösung mit einer Konzentration von 10 μM Purin und 2 μM Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin in Acetonitril/Wasser (95/5; v/v) wurde über einen zweiten Elektrospray-Nebulizer in die Ionenquelle eingebracht. Tabelle 23 zeigt die weiteren Einstellungen des Q-TOF-MS zur LC-MS Analyse.

Tabelle 23: Einstellungen des Q-TOF-MS zur LC-MS Analyse.

| | |
|-------------------------------|-----------|
| <i>Drying gas flow rate</i> | 9,0 L/min |
| <i>Drying gas temperature</i> | 325 °C |
| <i>Capillary voltage</i> | 3500 V |
| <i>Nebulizer pressure</i> | 30 psig |
| <i>Fragmentor voltage</i> | 150 V |
| <i>Skimmer voltage</i> | 65 V |
| <i>Octupole rf</i> | 750 V |

5.6 Geräteeinstellungen zur DIP-APCI-Ion Trap-MS Analyse

Die Steuerung des Bruker Daltonik amaZon speed Ion Trap-MS und die Auswertung der Massenspektren erfolgten unter Verwendung des Softwarepaketes Compass (verschiedene Softwareversionen, Bruker Daltonik, Bremen, D). Die DIP wurde manuell mit Hilfe eines Controllers (SIM GmbH, Oberhausen, D) gesteuert. Der Hilfsgasfluss um die Schubstange wurde unter Verwendung eines Schwebekörper-Durchflussmessers (Krohne, Duisburg, D) geregelt.

Während der Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle wurden z.T. von den hier angegebenen Geräteeinstellungen abweichende Einstellungen des Ion Trap-MS und der DIP verwendet.

Unter optimierten Bedingungen wurde das Ion Trap-MS im *Enhanced Resolution*-Modus betrieben. Die Ionisation in der DIP-APCI-Ionenquelle erfolgte im Positiv-Modus, es wurde

Stickstoff (250 L/h) als Hilfsgas um die Schubstange in die Ionenquelle geleitet und ein Koronastrom von 4000 nA angelegt. Ein optimaler Transfer von Ionen von der Ionenquelle bis zur Ion Trap wurde durch Verwendung der Funktion *Smart parameter setting* (SPS) des Massenspektrometers erreicht. Diese Funktion optimiert automatisch den Ionentransfer im Bereich des gewählten m/z -Wertes. Zur Analyse von Standardsubstanzen bzw. eines Zielanalyten wurde das m/z -Verhältnis des jeweiligen Standards bzw. Zielanalyten gewählt. Bei mehreren Zielanalyten wurde ein mittleres m/z -Verhältnis als Kompromiss verwendet. Die Beladung der Ion Trap wurde über die Funktion *Ion charge control* (ICC) des Massenspektrometers gesteuert und ein Zielwert von 200.000 sowie eine maximale Akkumulationszeit von 100 ms verwendet. Massenspektren wurden im m/z -Bereich von 50-1000 aufgenommen und 10 Mikroskans zur Generierung eines Massenspektrums gemittelt. Die weiteren optimierten Einstellungen des Ion Trap-MS zur DIP-APCI-MS Analyse sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Optimierte Einstellungen des Ion Trap-MS zur DIP-APCI-MS Analyse.

| | |
|-------------------------------|-----------|
| <i>Drying gas flow rate</i> | 1,3 L/min |
| <i>Drying gas temperature</i> | 250 °C |
| <i>Capillary voltage</i> | 4500 V |
| <i>End plate offset</i> | 500 V |
| <i>Vaporizer temperature</i> | 300 °C |
| <i>Nebulizer pressure</i> | 30 psi |

Unter optimierten Bedingungen wurde die Schubstange zur Analyse bis auf einen Abstand von 10 mm der Schubstangenspitze von der Korona-Nadel in die Ionenquelle eingebracht.

Bei den Analysen zur Optimierung der DIP-APCI-Ionenquelle, der Analyse von Weichmachern in Gegenständen des täglichen Gebrauchs sowie den Analysen der Capsaicinoide, Schmerzmittel und Antibiotika wurde die Schubstange mit einer Heizrate von 2 °/s auf 400 °C aufgeheizt und diese Temperatur 1 min gehalten.

Analog zur Analyse von Phloemsaft mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS wurden die verwendeten Probenriegel auch im Fall der Analysen des Phloemsafts aus Mais und Raps mit Hilfe der DIP-APCI-Ion Trap-MS (wie unter 5.5.1 beschrieben) vor den Analysen 5 min bei 400 °C ausgeheizt

und Blindmessungen durchgeführt. Die Schubstange wurde zur Analyse der Phloemsaftproben mit einer Heizrate von 0,2 °/s auf 150 °C aufgeheizt und diese Temperatur 5 min gehalten. Massenspektren wurden im m/z -Bereich von 25-1000 aufgenommen.

MS/MS und MS³-Experimente wurden durch CID mit einem Isolationsfenster des *Precursor*-Ions von 0,8 m/z und einer Reaktionsamplitude von 100 % durchgeführt.

5.7 Geräte und Materialien

5.7.1 Gewinnung von Phloemsaft

Nd:Glas-Laser, Modell: U-Point 100; Laserkopf: Schott, Mainz, D; Betriebsgerät: Beck Neu-Isenburg, D

Mikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen, D

Mikrokapillaren 0,5 µL, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D

5.7.2 Massenspektrometrie und HPLC

- Q-TOF-MS-System

6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Ionenquelle ESI

Drying gas: Stickstoff (Generator)

Nebulizer gas: Stickstoff (Generator)

DIP-APCI

Drying gas: Stickstoff (Generator)

Nebulizer gas: Stickstoff (Generator)

Hilfsgas: Stickstoff 5.0, synthetische Luft

Controller: MSD Direct Inlet Probe, SIM, Oberhausen, D

Kontrolle Hilfsgasfluss: Schwebekörper-Durchflussmesser, Krohne, Duisburg, D

Stoßgas

Stickstoff 5.0

Kompressor

SF2FF, Atlas Copco, Stockholm, S

Stickstoff-Generator

NGM, cmc Instruments, Eschborn, D

PC-System

Intel[®] Xeon[®] W3520; 2,66 GHz; 8,0 GB RAM

- | | |
|----------|---|
| Software | MassHunter Workstation Software, Version B.04 und B.05, Agilent Technologies, Santa Clara, USA |
|----------|---|
- Ion Trap-MS-System
amaZon speed, Bruker Daltonik, Bremen, D

| | | |
|-------------|----------|---|
| Ionenquelle | ESI | <i>Drying gas:</i> Stickstoff (<i>boil-off</i> von fl. N ₂) <i>Nebulizer gas:</i> Stickstoff (<i>boil-off</i> von fl. N ₂) |
| | DIP-APCI | <i>Drying gas:</i> Stickstoff (<i>boil-off</i> von fl. N ₂) <i>Nebulizer gas:</i> Stickstoff (<i>boil-off</i> von fl. N ₂) Hilfsgas: Stickstoff (<i>boil-off</i> von fl. N ₂) Controller: MSD Direct Inlet Probe, SIM, Oberhausen, D Kontrolle Hilfsgasfluss: Schwebekörper-Durchflussmesser, Krohne, Duisburg, D |
| Stoßgas | | Helium 5.0 |
| PC-System | | Intel® Xeon® W3520; 2,67 GHz; 3,7 GB RAM |
| Software | | ESI Compass for amaZon, Version 1.3 und 1.5, Bruker Daltonik, Bremen, D |
 - Orbitrap-MS-System
Exactive, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D

| | | |
|-------------|--|---|
| Ionenquelle | | Ion Max API Source |
| PC-System | | Intel® Core™ 2 Duo E8400; 2,99 GHz; 3,2 GB RAM |
| Software | | Xcalibur, Version 2.1, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D |
 - HPLC-System
1290 Infinity UHPLC, Agilent Technologies, Waldbronn, D

| | | |
|-----------|--|---|
| PC-System | | Intel® Xeon® W3520; 2,66 GHz; 8,0 GB RAM |
| Software | | ChemStation Version B.04, Agilent Technologies, Waldbronn, D |

5.7.3 Probenvorbereitung und Materialien

Analysenwaage BP221S (220 g max; d = 0,1 mg), Sartorius, Göttingen, D

Analysenwaage CP324S (320 g max; d = 0,1 mg), Sartorius, Göttingen, D

Analysenwaage M2P (2 g max), Sartorius, Göttingen, D

Ultraschallbad USR 30 H, Merck Eurolab, Bruchsal, D

Wasseraufbereitungssystem GenPure, TKA, Niederelbert, D

Wasseraufbereitungssystem arium pro VF, Sartorius stedim biotech, Göttingen, D

Kryomühle 6850 Freezer/Mill, Spex SamplePrep, Metuchen, USA

DIP Probentiegel für Feststoffe, SIM, Oberhausen, D

GC-Spritze Gastight 10 µL, Hamilton, Bonaduz, CH

Spritze Gastight 500 µL, Hamilton, Bonaduz, CH

Transferpette[®] und Transferpette S[®], verschiedene Volumina, Brand, Wertheim, D

Pipettenspitzen für Transferpette[®], verschiedene Größen und Hersteller

5.7.4 Weitere PC-Systeme und Software

- PC-Systeme (nur Angabe der CPU und RAM)

Intel[®] Core[™] i3; 3,2 GHz, 4,0 GB RAM

Intel[®] Core[™] i5-2430; 2,40 GHz, 4,0 GB RAM

- Software

Windows XP Professional, Microsoft

Windows 7 Professional, Microsoft

Windows 7 Enterprise, Microsoft

Office Professional 2007, Microsoft

Office Professional Plus 2010, Microsoft

The Unscrambler[®], Version 10.1, CAMO Software AS., Oslo, N

Origin Pro, Version 9.0.0, Origin Lab Corporation

Reference Manager, Version 10, Thomson Reuters

EndNote, Version 6.0.1, Thomson Reuters

ChemDraw Pro, Version 13.0.0.3015, CambridgeSoft

5.8 Chemikalien

5.8.1 Standardsubstanzen

ESI-L Low Concentration Tuning Mix G1969-85000, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

ESI Tuning Mix G2421 A, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

API-TOF Reference Mass Solution Kit G1969-85001 (Purin; Hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazin), Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Acetyltributylcitrat (ATBC), ≥ 98 %, SAFC global, Hamburg, D

L-Alanin, ≥ 98 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Alkylpolyglucosid (Glucopon 600), technisches Produkt, ehem. Cognis, Düsseldorf, D

Äpfelsäure, ≥ 98 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

L-Asparagin, ≥ 98 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Benzylbutylphthalat (BBP), 98 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Capsaicin (natürliches Capsaicin: 65 % Capsaicin, 30 % Dihydrocapsaicin, 5 % Nordihydrocapsaicin), Sigma Aldrich, Steinheim, D

Citronensäure, 99-100 %, AppliChem, Darmstadt, D

Coffein, ReagentPlus[®], Sigma Aldrich, Steinheim, D

Coffein, purum, Fluka, Steinheim, D

Cumarin, ≥ 99 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

d₄-Cumarin, 98,8 atom%D, Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, D

Dibutylphthalat (DBP), 99 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Dibutylsebacat (DBS), $\geq 97,0$ %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Di(2-ethylhexyl)adipat (DEHA), $\geq 99,0$ %, Fluka, Steinheim, D

Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), $\geq 99,5$ %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Diisononylphthalat (DINP), Estergehalt ≥ 99 %, Mischung aus C₉-Isomeren, technical grade, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Di-n-octylphthalat (DNOP), $\geq 98,0$ %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Dodecansäuremethylester, $\geq 99,5$ %, Fluka, Steinheim, D

L-Glutaminsäure, ≥ 99 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Hexansäuremethylester, zur Synthese, Merck, Darmstadt, D

4-Hydroxyczimtsäure, 97,5 %, Carl Roth, Karlsruhe, D

Kaliumferrocyanid ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$), analytical grade, Fluka, Steinheim, D

L-Leucin, ≥ 98 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Nicotinsäureamid, für biochemische Zwecke, Merck, Darmstadt, D

N-Nonyl- β -D-maltosid, AppliChem, Darmstadt, D

Polyethylenglycol (PEG 200), technisches Produkt, ehem. Cognis, Düsseldorf, D

D(+)-Saccharose, geeignet für die Biochemie, Acros Organics, Geel, B

L-Serin, ≥ 99 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

L-Valin, ≥ 98 %, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Zinksulfat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), analytical grade, VWR, Leuven, B

5.8.2 Lösungsmittel

Acetonitril, für HPLC, LC-MS grade, VWR, Leuven, B

Acetonitril, LC-MS ChromaSolv, Sigma Aldrich, Steinheim, D

Ameisensäure, analytical grade, ~ 98 %, Fluka, Steinheim, D

Dichlormethan, für HPLC, VWR, Leuven, B

Dichlormethan, für HPLC, Acros Organics, Geel, B

Methanol, für HPLC, LC-MS grade, VWR, Leuven, B

5.9 Proben

5.9.1 Chinesische Heilpflanzen

Gemahlene Proben der *Radix Angelicae sinensis* und *Radix Angelicae gigas* wurden von Kelvin Sze-Yin Leung (Hong Kong Baptist University, CN) zur Verfügung gestellt. Die Ausgangsmaterialien wurden zunächst von einem Botaniker authentifiziert.

Xiao Yao Pillen und Jiawei Xiao Yao Pillen unbekannter Zusammensetzung wurden in China erworben. Xiao Yao Pillen bekannter Zusammensetzung (mit und ohne Ingwer), sowie Xiao Yao Pillen, welche *Radix Angelicae archangelica* anstelle von *Radix Angelicae sinensis* enthielten, wurden von einer Apotheke in Wuppertal hergestellt.

5.9.2 Safran

Bei den untersuchten, als Safran erworbenen Proben handelte es sich um zwei verschiedene Proben aus Ägypten, eine Probe aus einem chinesischen Supermarkt sowie eine Probe der Firma Fuchs.

5.9.3 Folie mit UV-Absorber

Die untersuchte Folie aus einem thermoplastischen Polyurethan (TPU), welche 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-methyl-1-phenylethyl)phenol (Handelsname Tinuvin 900) als UV-Absorber enthielt, wurde von SIM (Oberhausen, D) zur Verfügung gestellt.

5.9.4 Zimt und Getränke mit Waldmeistergeschmack

Die im Folgenden aufgeführten untersuchten Zimtproben und Getränke mit Waldmeistergeschmack wurden im Einzelhandel erworben.

Ceylon-Zimt, lose, aus einer Wuppertaler Gewürzhandlung

Ceylon-Zimt, Bio, der Firma Sonnentor

Ceylon-Zimt, Bio, der Firma Brecht

Ceylon-Zimt, der Firma Pikantum

Ceylon-Zimt, Bio, der Firma Pikantum

Cassia-Zimt, der Firma Pikantum

Cassia-Zimt, Bio, der Firma Pikantum

Zimt, keine Angabe der botanischen Herkunft, der Firma Timbu

Zimt, keine Angabe der botanischen Herkunft, der Firma Hartkorn

Zimt, keine Angabe der botanischen Herkunft, der Firma Ostmann

Waldgeist (Likör mit Farbstoff) der Firma Boente

Dreh + Trink Waldmeister (Waldmeister-Erfrischungsgetränk) der Firma sportfit Fruchtsaft

Big Red (Kaugummi mit Zimtgeschmack) der Firma Wrigley

5.9.5 Kunststoffgegenstände zur Analyse auf Weichmacher

Laborhandschuhe aus Vinyl der Firma Meditrade

Verpackungsfolie für Käse, erworben im Einzelhandel

Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto, erworben im Einzelhandel

Badeente, erworben im Einzelhandel

Pflanzenbinder, erworben im Einzelhandel

5.9.6 Proben zur Analyse auf Capsaicinoide

Die im Folgenden aufgeführten, untersuchten Proben wurden im Einzelhandel erworben.

Cayennepfeffer der Firma Hartkorn

Sambal Oelek der Firma Improba

Jalapeño rot (*Capsicum annuum*)

Jalapeño grün (*Capsicum annuum*)

5.9.7 Schmerzmittel und Antibiotika

Aspirin, Bayer Vital, Leverkusen, D

Aspirin Effect, Bayer Vital, Leverkusen, D

Voltaren Dolo, Novartis Consumer Health, München, D

Voltaren Schmerzgel, Novartis Consumer Health, München, D

IbuHEXAL, Hexal, Holzkirchen, D

Ibutop Schmerzcreme, mibe, Brehna, D

Paracetamol, Ratiopharm, Ulm, D

Dolormin für Frauen, McNeil, Neuss, D

Clarithromycin, Ratiopharm, Ulm, D

Eremfat, Riemser, Greifswald, D

EMB-Fatol, Riemser, Greifswald, D

Anhang

Tabelle 25: Reproduzierbarkeit der DIP-APCI-MS Analyse eines Extraktes aus *Radix Angelicae sinensis*; Intensität (Signalhöhe) und relative Standardabweichung (n=5) der m/z -Signale >10.000 counts.

| m/z -Signal | mittlere Intensität [counts] | relative Standardabweichung [%] (n=5) |
|---------------|---------------------------------|--|
| 173.096 | 25302 | 4.6 |
| 189.091 | 50939 | 5.3 |
| 191.108 | 446669 | 1.8 |
| 191.134 | 37102 | 4.4 |
| 191.147 | 16121 | 6.0 |
| 191.169 | 18393 | 7.4 |
| 191.188 | 13722 | 8.1 |
| 192.110 | 88171 | 4.8 |
| 207.102 | 26285 | 3.6 |
| 263.237 | 27353 | 2.7 |
| 279.232 | 23017 | 4.9 |
| 281.248 | 79844 | 3.2 |
| 282.251 | 16506 | 3.6 |
| 295.263 | 11373 | 6.6 |
| 381.206 | 61628 | 7.0 |
| 382.210 | 16119 | 7.2 |
| 397.383 | 16734 | 3.7 |

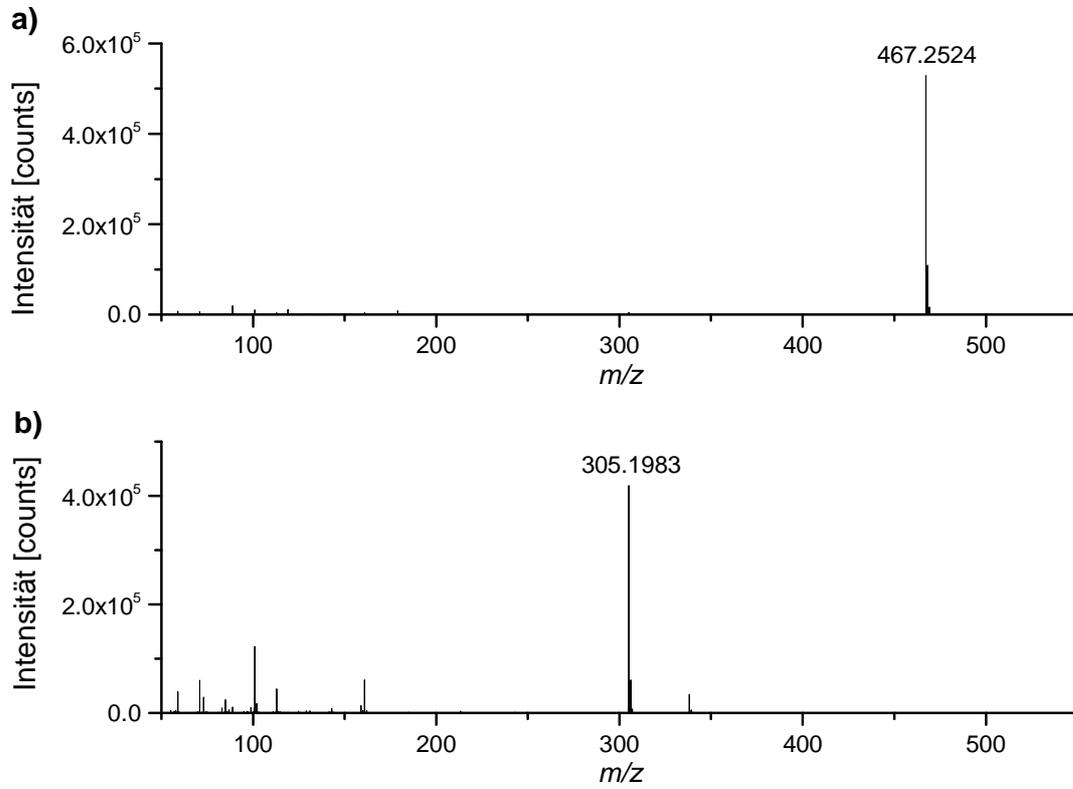


Abbildung 114: MS/MS-Spektren der $[M + O_2]^-$ -Ionen von (a) N-nonyl- β -D-maltosid (m/z 500) und (b) eines durch Abspaltung einer Glucose-Einheit von N-nonyl- β -D-maltosid entstandenen Fragments (m/z 338).

Tabelle 26: Cumaringehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS (n = 3) unter Verwendung von d₄-Cumarin als interner Standard.

| Zimtprobe | LC-MS Cumaringehalt [mg/kg] | DIP-APCI-MS Cumaringehalt [mg/kg] | |
|---------------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| | | mittlere Intensität | Fläche |
| Ceylon-Zimt 1 | 27.3 ± 2.4 | 43.3 ± 3.9 | 41.1 ± 4.6 |
| Ceylon-Zimt 2 | 56.9 ± 3.2 | 71.1 ± 2.0 | 67.1 ± 1.6 |
| Ceylon-Zimt 3 | 22.9 ± 1.8 | 40.0 ± 2.0 | 34.4 ± 3.2 |
| Ceylon-Zimt 4 | 326.4 ± 6.7 | 312.6 ± 6.5 | 303.1 ± 15.0 |
| Ceylon-Zimt 5 | 21.7 ± 2.7 | 46.2 ± 7.7 | 40.9 ± 9.6 |
| Cassia-Zimt 1 | 3732.3 ± 87.9 | 3539.8 ± 62.4 | 3430.7 ± 112.8 |
| Cassia-Zimt 2 | 3400.2 ± 80.3 | 3281.4 ± 39.5 | 3179.5 ± 34.5 |
| Zimt 1 | 3082.3 ± 119.7 | 2887.3 ± 26.7 | 2784.5 ± 178.3 |
| Zimt 2 | 2383.1 ± 27.5 | 2300.8 ± 12.4 | 2255.7 ± 80.3 |
| Zimt 3 | 1547.6 ± 37.2 | 1502.4 ± 69.1 | 1444.7 ± 48.2 |

Tabelle 27: Cumaringehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS (n = 3) ohne Verwendung eines internen Standards.

| Zimtprobe | LC-MS Cumaringehalt [mg/kg] | DIP-APCI-MS Cumaringehalt [mg/kg] | |
|---------------|-----------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| | | mittlere Intensität | Fläche |
| Ceylon-Zimt 1 | 23.7 ± 3.9 | 51.5 ± 9.5 | 62.5 ± 9.7 |
| Ceylon-Zimt 2 | 56.6 ± 3.7 | 81.6 ± 0.7 | 94.7 ± 1.8 |
| Ceylon-Zimt 3 | 17.7 ± 1.3 | 39.3 ± 1.7 | 49.6 ± 4.6 |
| Ceylon-Zimt 4 | 346.3 ± 6.9 | 345.9 ± 18.1 | 372.2 ± 29.5 |
| Ceylon-Zimt 5 | 16.1 ± 2.6 | 45.3 ± 9.4 | 57.5 ± 9.2 |
| Cassia-Zimt 1 | 4131.4 ± 65.9 | 2738.2 ± 145.4 | 2901.1 ± 104.0 |
| Cassia-Zimt 2 | 3827.8 ± 19.9 | 2600.4 ± 215.1 | 2745.9 ± 304.1 |
| Zimt 1 | 3407.2 ± 97.5 | 2240.7 ± 179.8 | 2396.6 ± 299.0 |
| Zimt 2 | 2704.0 ± 31.9 | 1621.5 ± 121.4 | 1845.4 ± 108.3 |
| Zimt 3 | 1692.0 ± 46.4 | 1049.6 ± 63.3 | 1235.0 ± 27.2 |

Tabelle 28: Reproduzierbarkeit der DIP-APCI-MS Analyse von Coffein in Abhängigkeit vom *Drying gas*-Fluss, vom Hilfsgas-Fluss und vom Abstand der Probenspitze von der Korona-Nadel.

| <i>Drying gas</i> - Fluss [L/min] | Hilfsgas- Fluss [L/h] | Abstand der Probenspitze von der Korona-Nadel [mm] | Mittelwert der mittleren Intensität des Coffein- Signals [counts] (n = 3) | relative Standardabweichung [%] (n = 3) |
|---|-----------------------------|---|--|--|
| 0 | 0 | 40 | 3028355 | 3.0 |
| 0 | 0 | 10 | 15060321 | 3.9 |
| 0 | 250 | 40 | 12865358 | 2.3 |
| 12 | 0 | 40 | 367642 | 43.7 |
| 0 | 250 | 10 | 18687495 | 8.3 |
| 12 | 0 | 10 | 286566 | 38.2 |
| 12 | 250 | 40 | 339273 | 20.3 |
| 12 | 250 | 10 | 376676 | 6.3 |
| 6 | 125 | 25 | 479715* | 27.7* |

* *center point*; n = 5.

Tabelle 29: Einfluss eines geringen *Drying gas*-Flusses auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals.

| <i>Drying gas</i> -Fluss [L/min] | Mittelwert der mittleren Intensität des Coffein-Signals [counts] (n = 3) | relative Standardabweichung [%] (n = 3) | Faktor der Reduktion der Intensität (vgl. mit 0,0 L/min <i>Drying gas</i>) |
|-------------------------------------|--|--|--|
| 0.0 | 21215213 | 12.4 | - |
| 1.3 | 14822962 | 4.9 | 1.4 |
| 2.0 | 4699016 | 17.2 | 4.5 |

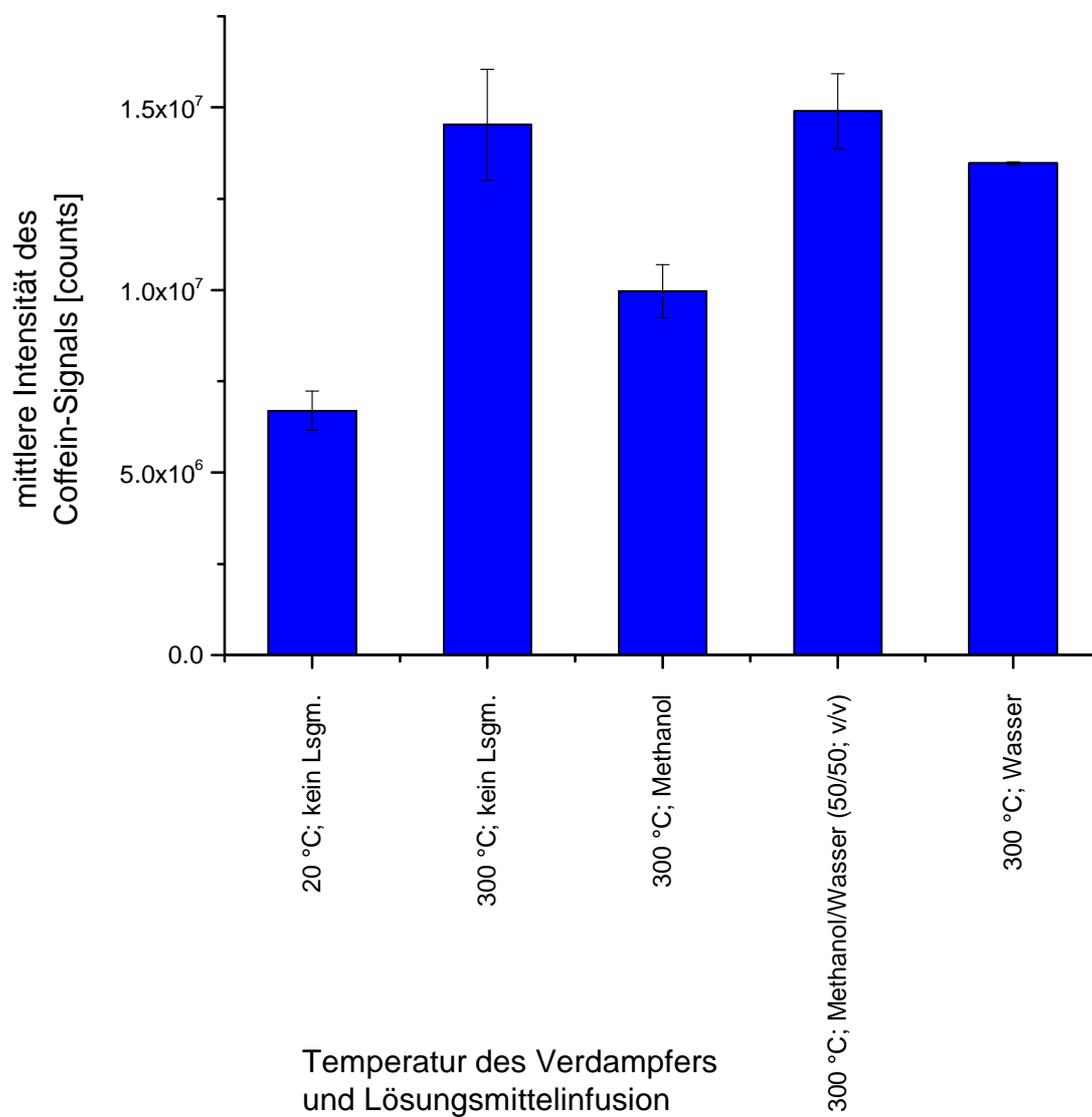


Abbildung 115: Einfluss der Temperatur des Verdampfers und der Infusion von Lösungsmittel auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals (n = 3).

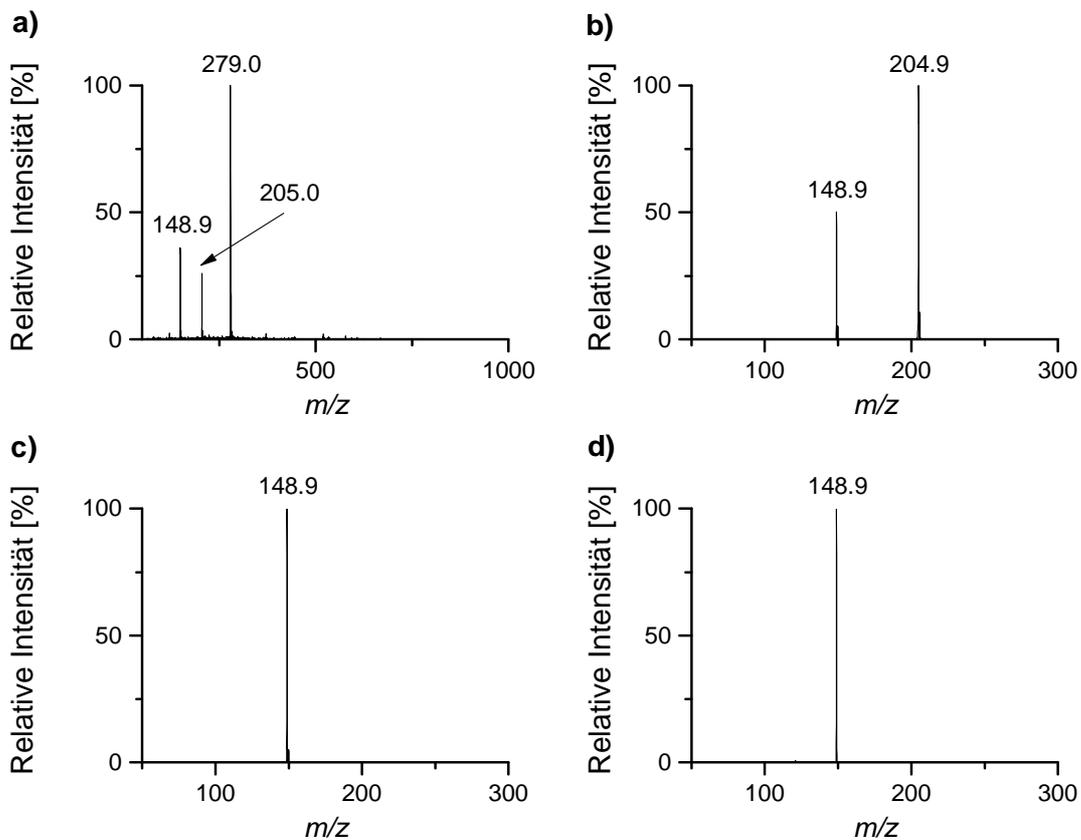


Abbildung 116: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von DBP; (a) MS; (b) MS/MS von m/z 279; (c) MS³ von m/z 279 \rightarrow m/z 205; (d) MS³ von m/z 279 \rightarrow m/z 149.

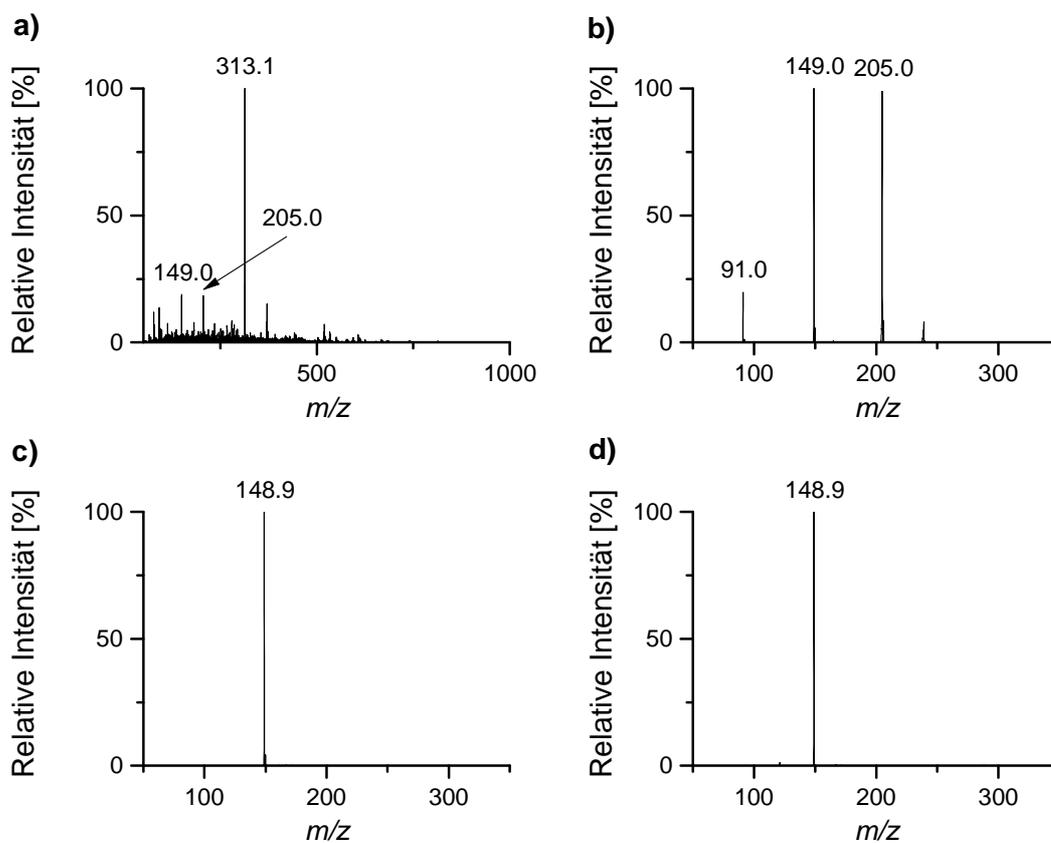


Abbildung 117: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von BBP; (a) MS; (b) MS/MS von m/z 313; (c) MS³ von m/z 313 → m/z 205; (d) MS³ von m/z 313 → m/z 149.

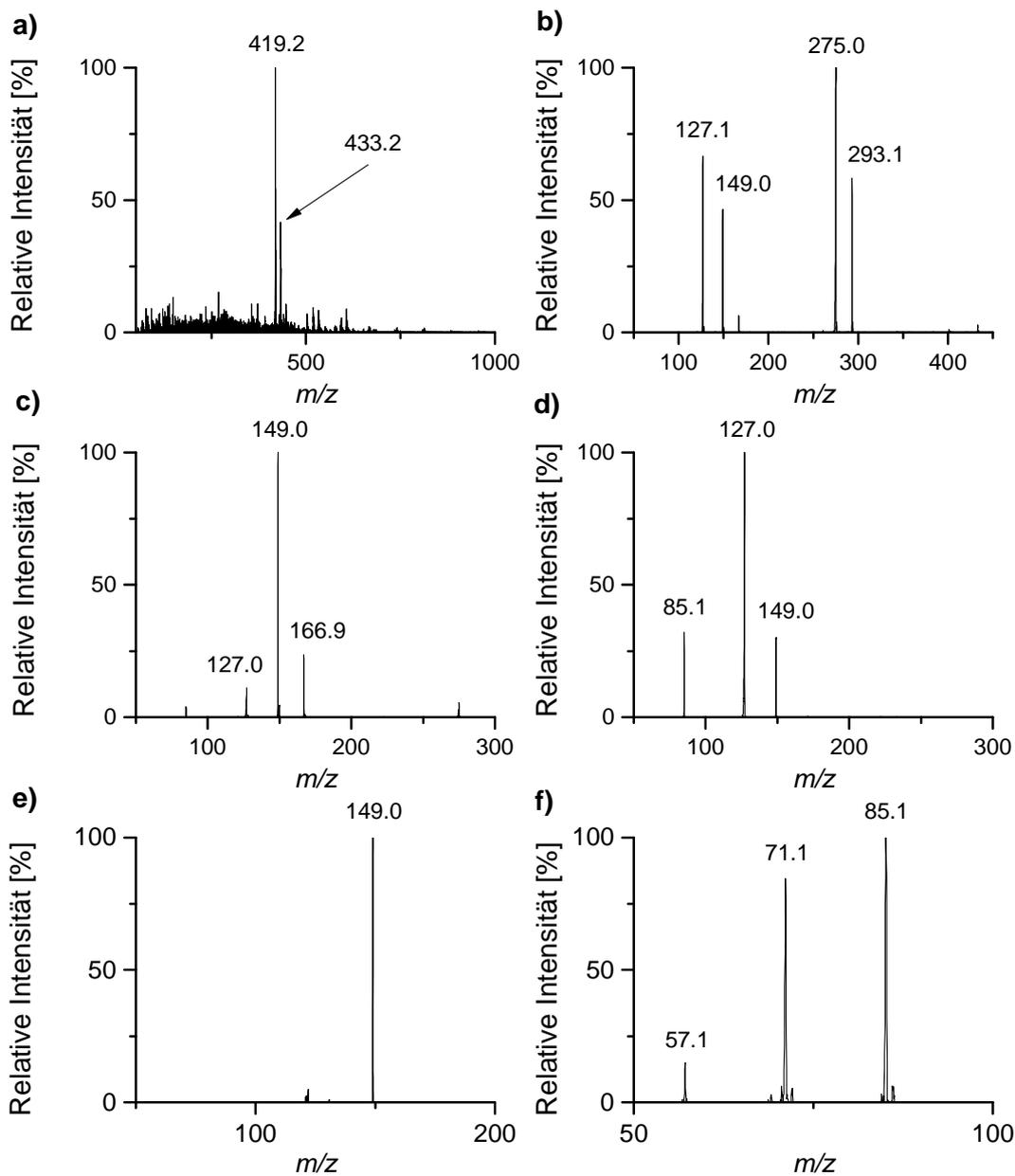


Abbildung 118: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von DINP; (a) MS; (b) MS/MS von m/z 419; (c) MS^3 von m/z 419 \rightarrow m/z 293; (d) MS^3 von m/z 419 \rightarrow m/z 275; (e) MS^3 von m/z 419 \rightarrow m/z 149; (f) MS^3 von m/z 419 \rightarrow m/z 127.

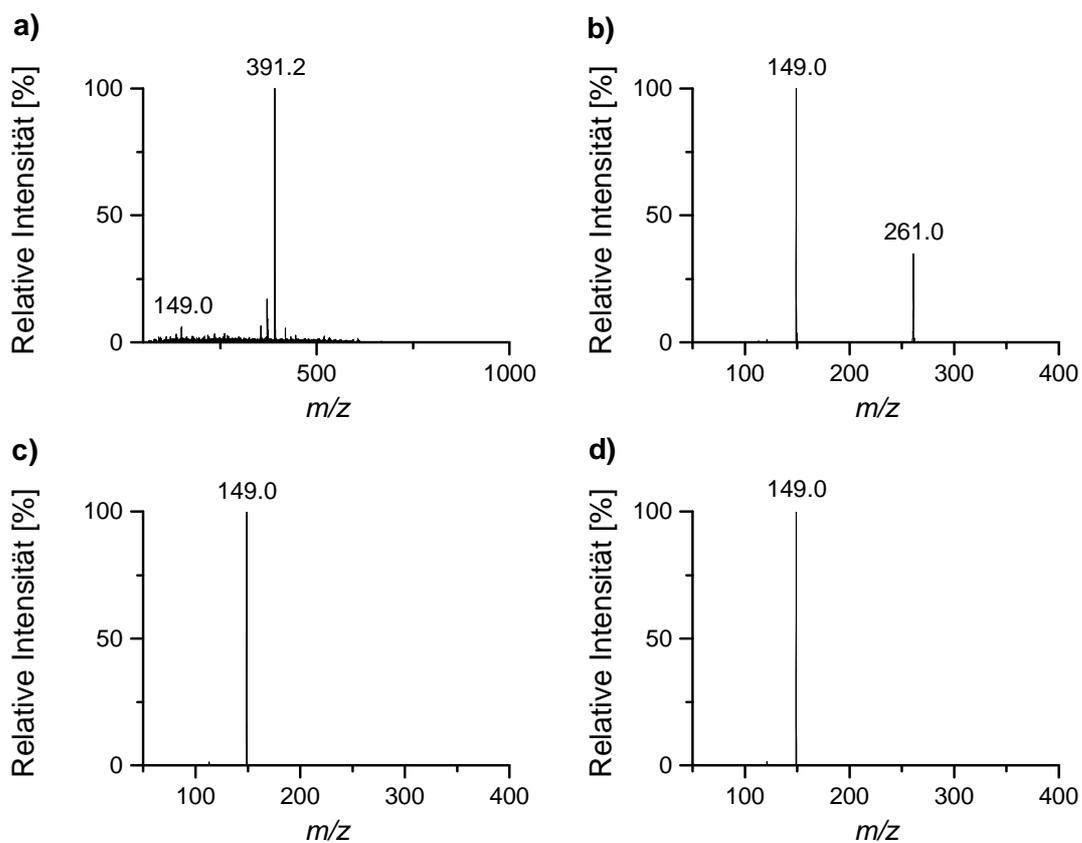


Abbildung 119: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von DNOP; (a) MS; (b) MS/MS von m/z 391; (c) MS^3 von m/z 391 \rightarrow m/z 261; (d) MS^3 von m/z 391 \rightarrow m/z 149.

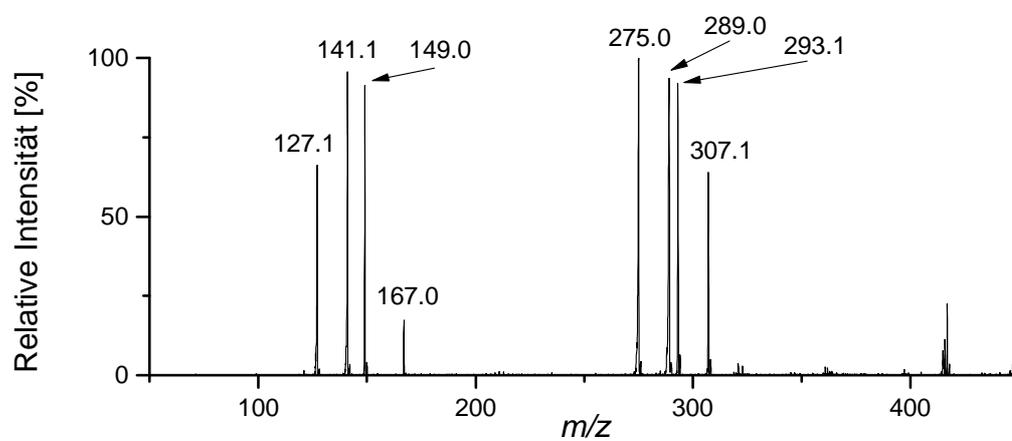


Abbildung 120: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 433 aus dem DINP-Standard.

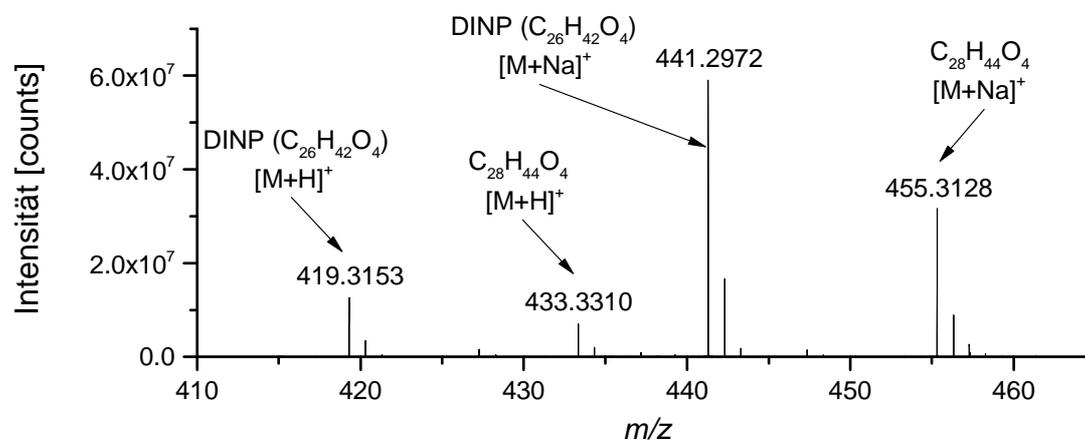


Abbildung 121: ESI-MS Analyse des DINP-Standards (MS: Orbitrap-MS-System (Exactive, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D); Infusion von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ DINP (1 g/L) in MeOH/H₂O (90/10; v/v) + 0,1% HCOOH; ESI(+)-Modus; Spray voltage: 4 kV).

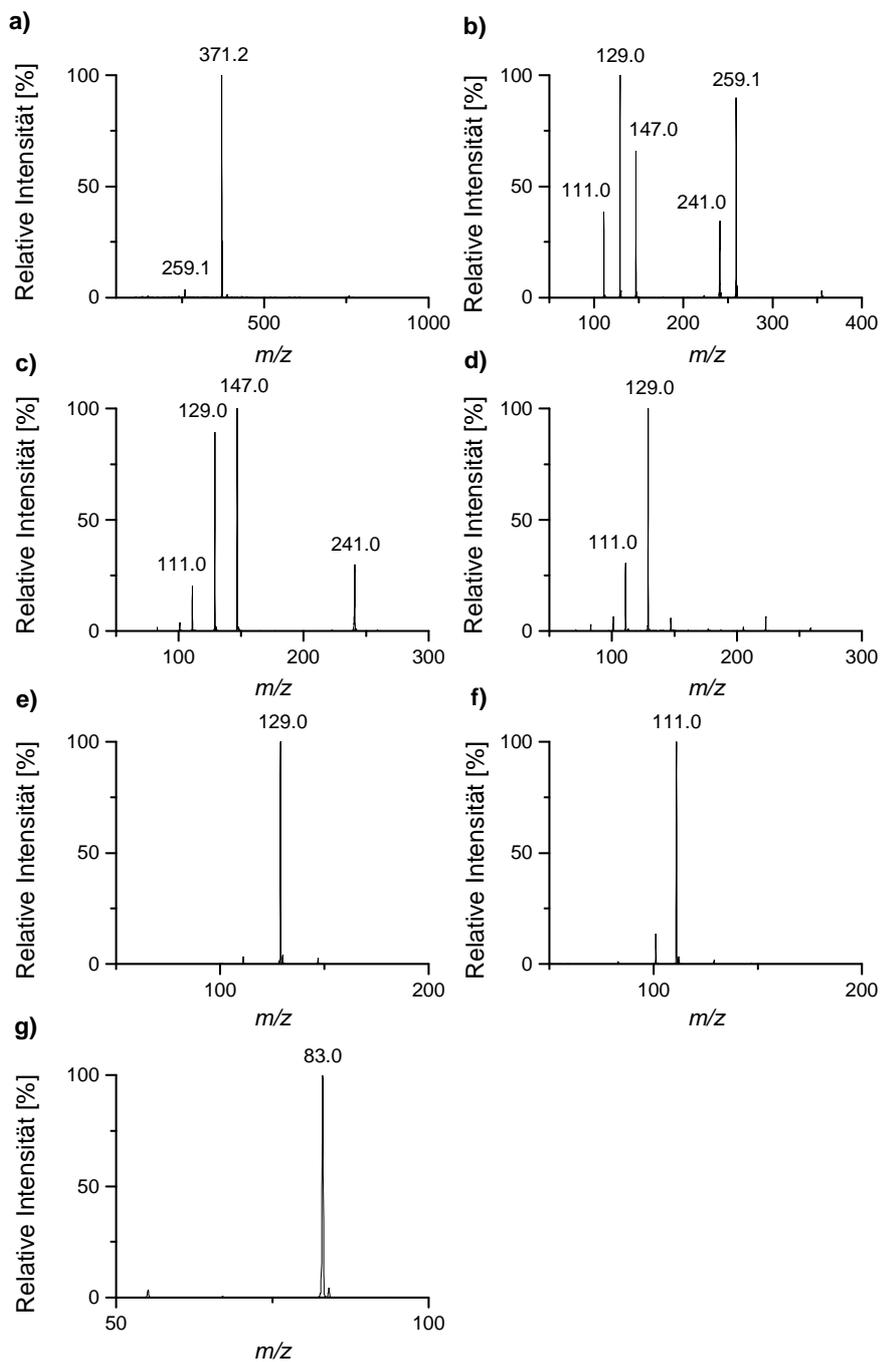


Abbildung 122: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von DEHA; (a) MS; (b) MS/MS von m/z 371; (c) MS³ von m/z 371 → m/z 259; (d) MS³ von m/z 371 → m/z 241; (e) MS³ von m/z 371 → m/z 147; (f) MS³ von m/z 371 → m/z 129; (g) MS³ von m/z 371 → m/z 111.

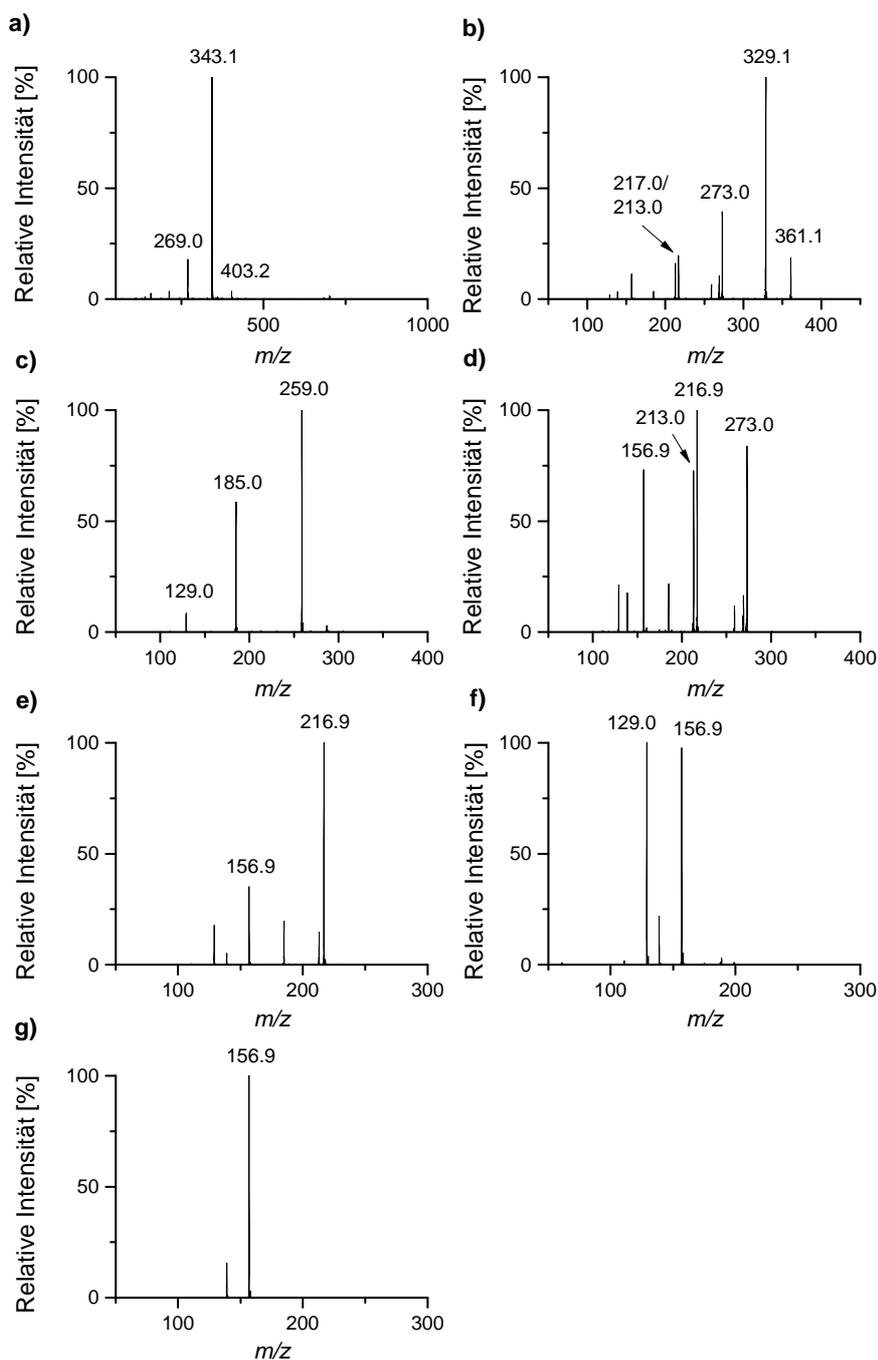


Abbildung 123: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von ATBC; (a) MS; (b) MS/MS von m/z 403; (c) MS³ von m/z 403 → m/z 361; (d) MS³ von m/z 403 → m/z 329; (e) MS³ von m/z 403 → m/z 273; (f) MS³ von m/z 403 → m/z 217; (g) MS³ von m/z 403 → m/z 213.

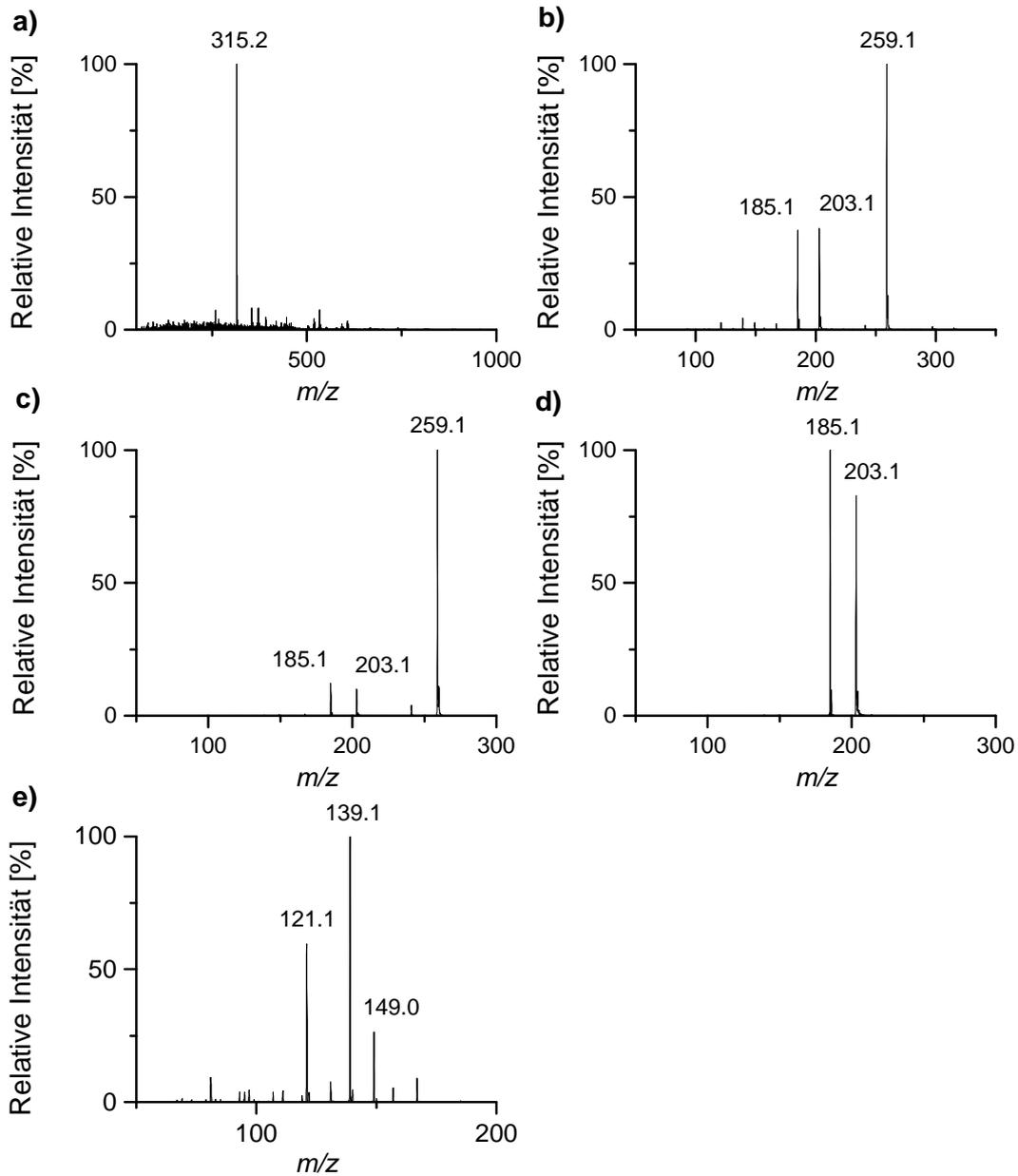


Abbildung 124: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von DBS; (a) MS; (b) MS/MS von m/z 315; (c) MS^3 von m/z 315 \rightarrow m/z 259; (d) MS^3 von m/z 315 \rightarrow m/z 203; (e) MS^3 von m/z 315 \rightarrow m/z 185.

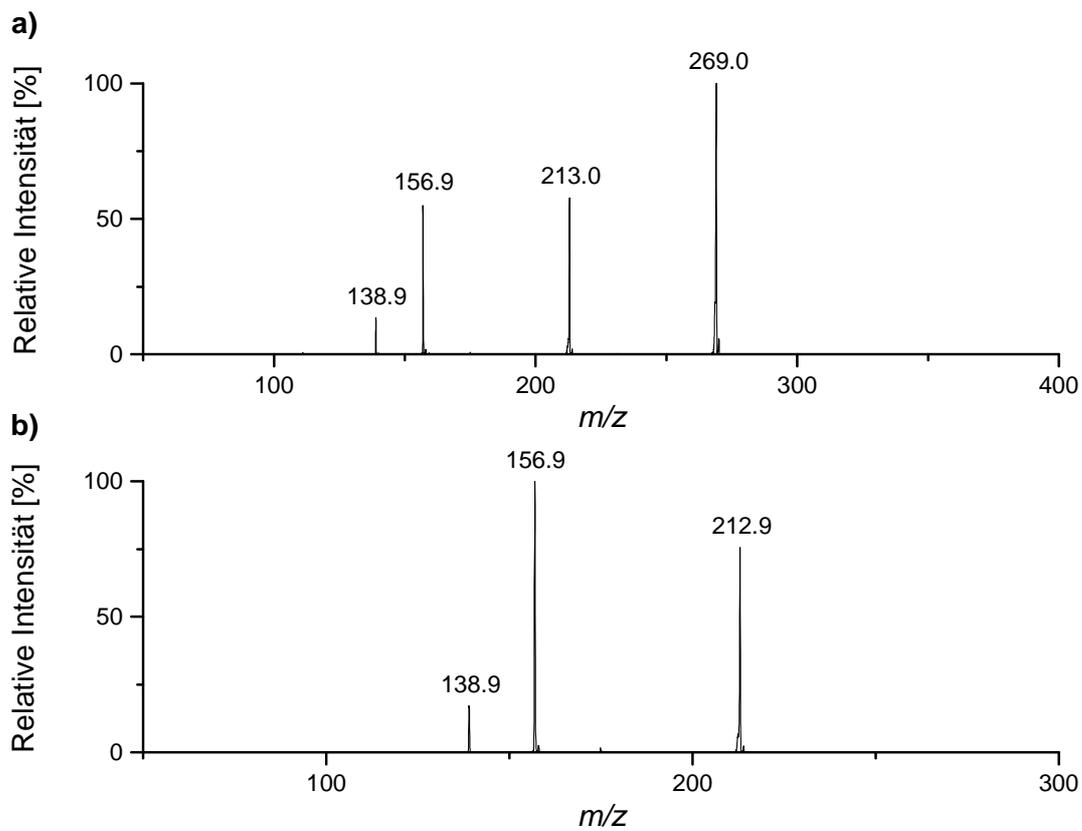


Abbildung 125: Massenspektren der DIP-APCI-MS/MS Analyse von (a) m/z 343 und (b) m/z 269 aus dem ATBC-Standard.

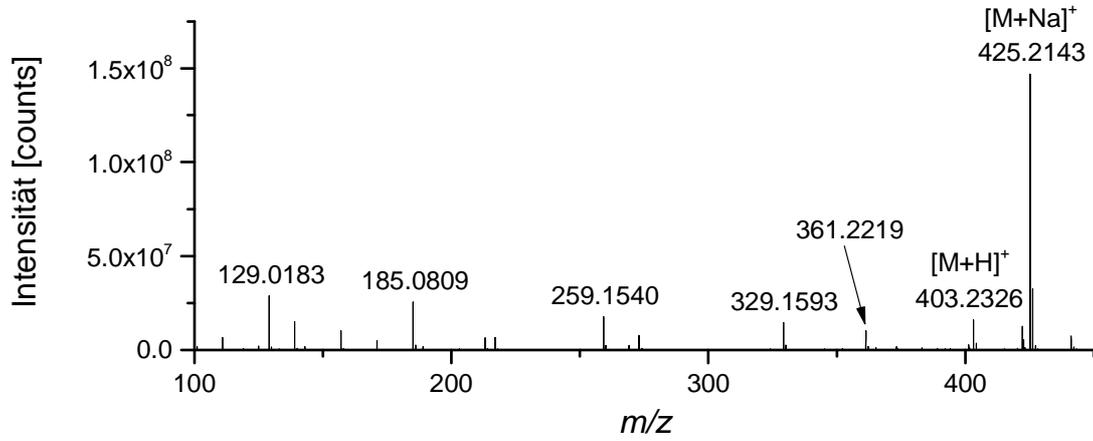


Abbildung 126: ESI-MS Analyse des ATBC-Standards (MS: Orbitrap-MS-System (Exactive, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D); Infusion von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ATBC (1 g/L) in MeOH/H₂O (90/10; v/v) + 0,1% HCOOH; ESI(+)-Modus; Spray voltage: 4 kV).

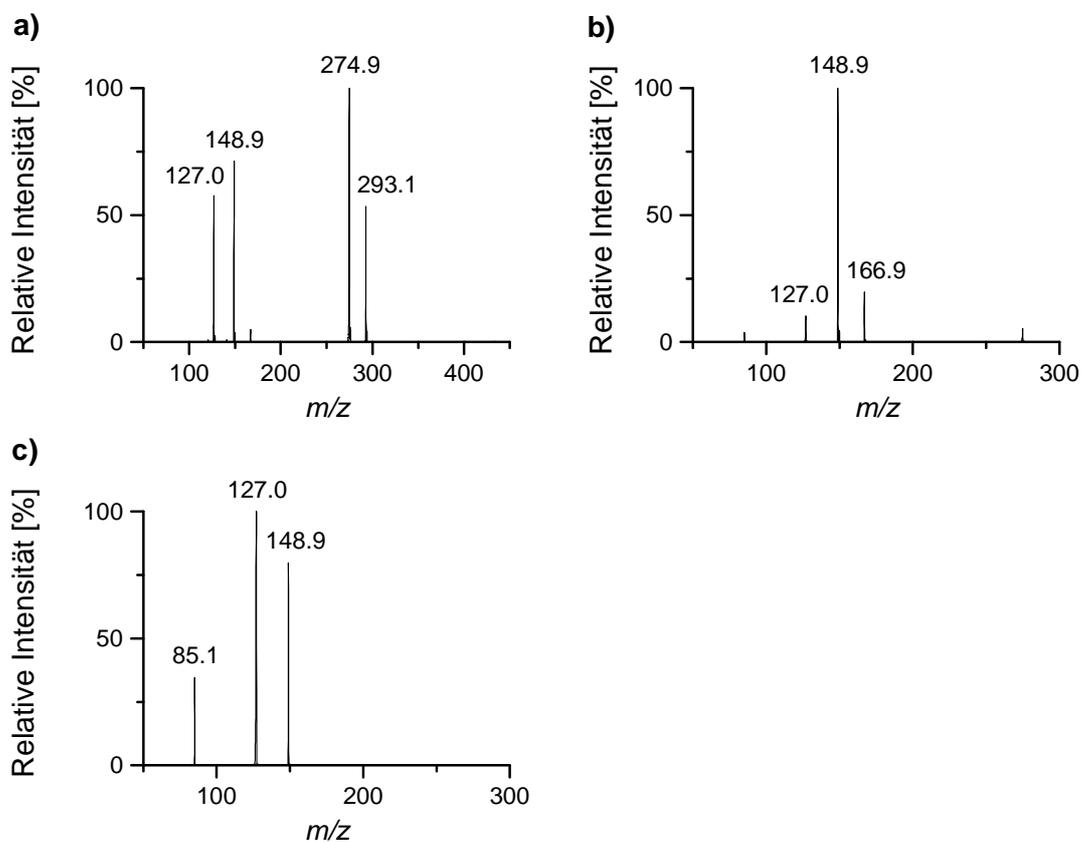


Abbildung 127: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von m/z 419 aus dem Laborhandschuh aus Vinyl; (a) MS/MS von m/z 419; (b) MS³ von m/z 419 → m/z 293; (c) MS³ von m/z 419 → m/z 275.

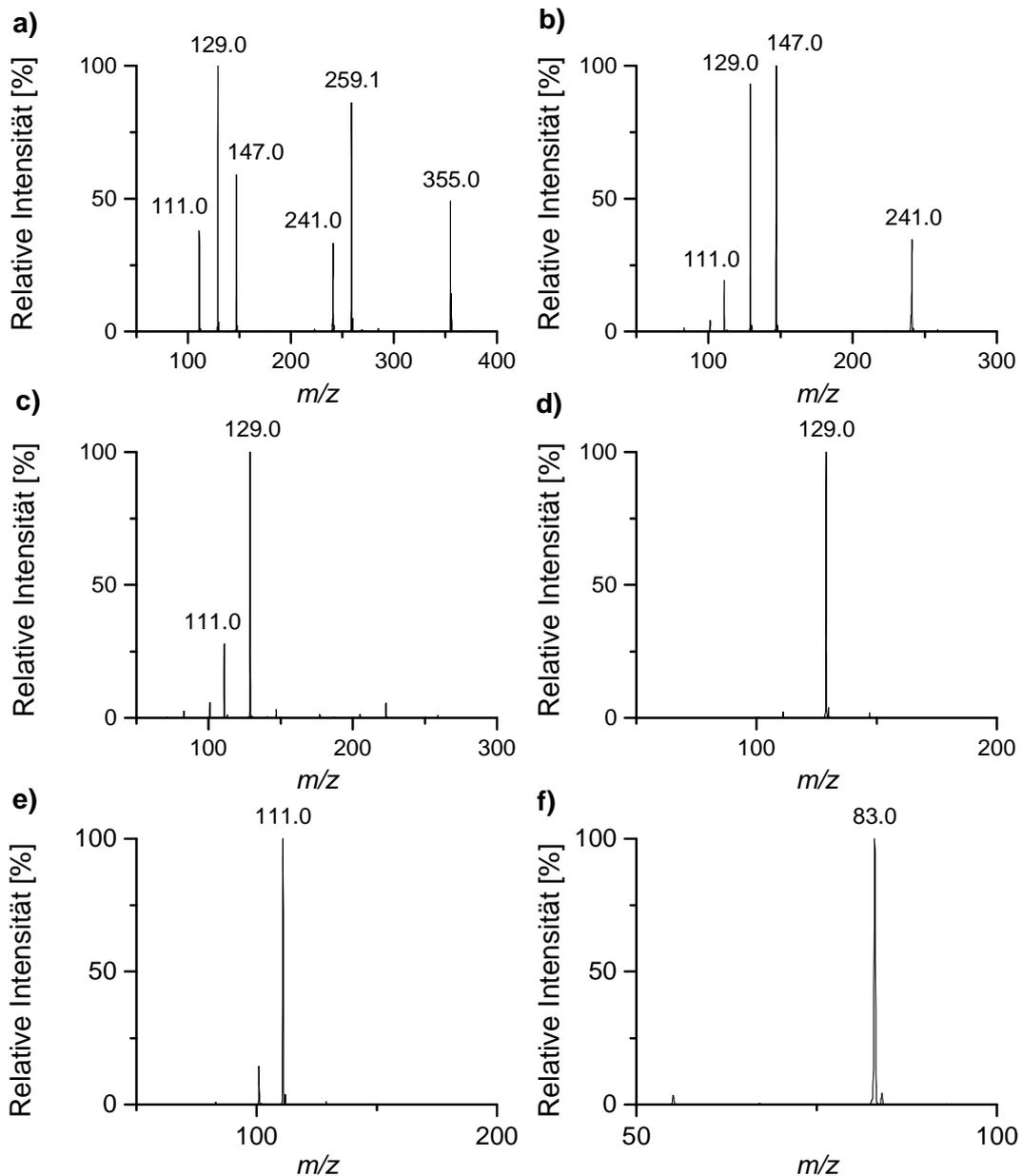


Abbildung 128: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von m/z 371 aus der Verpackungsfolie für Käse; (a) MS/MS von m/z 371; (b) MS^3 von m/z 371 \rightarrow m/z 259; (c) MS^3 von m/z 371 \rightarrow m/z 241; (d) MS^3 von m/z 371 \rightarrow m/z 147; (e) MS^3 von m/z 371 \rightarrow m/z 129; (f) MS^3 von m/z 371 \rightarrow m/z 111.

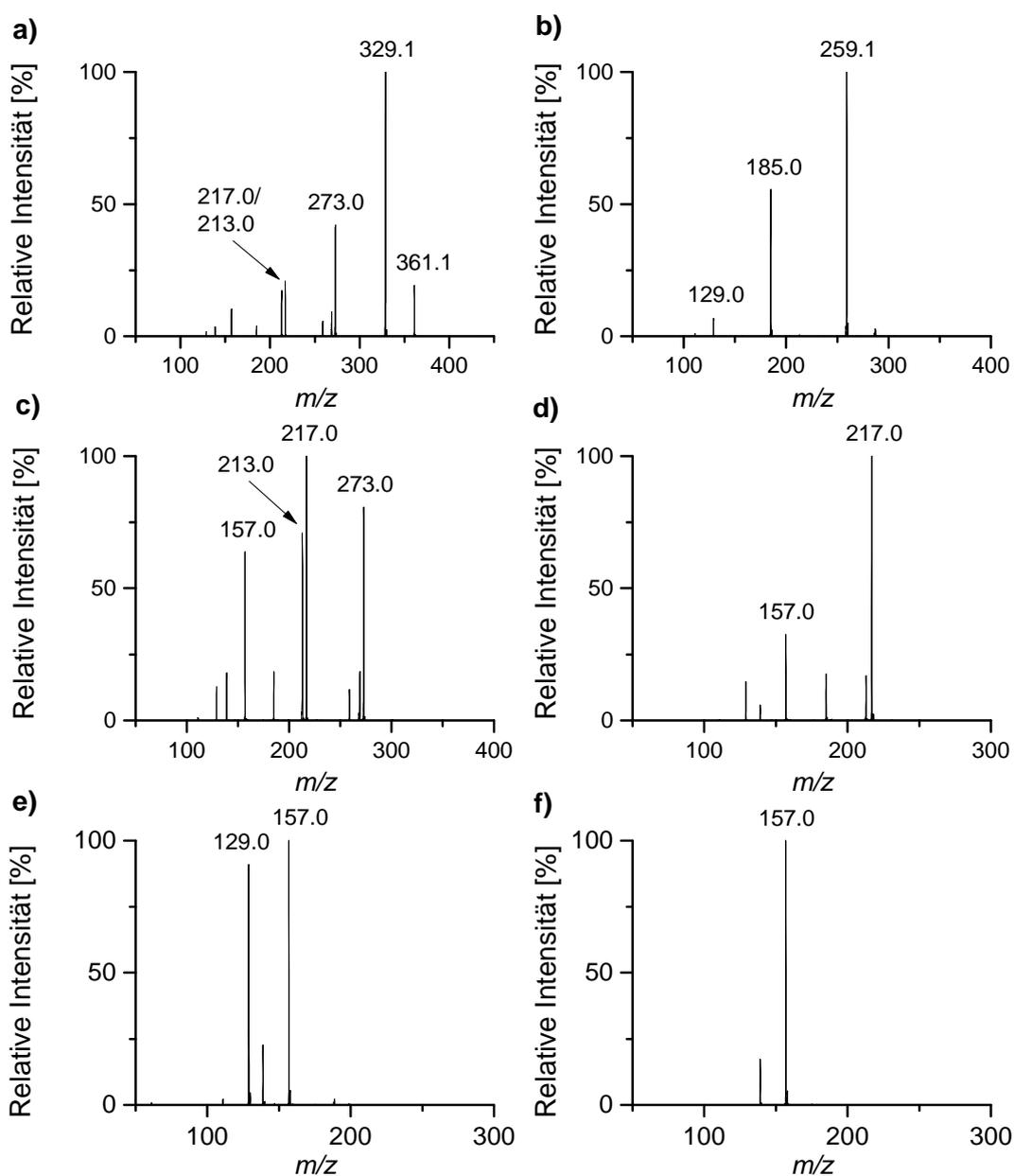


Abbildung 129: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von m/z 403 aus der Verpackungsfolie für Käse; (a) MS/MS von m/z 403; (b) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 361; (c) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 329; (d) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 273; (e) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 217; (f) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 213.

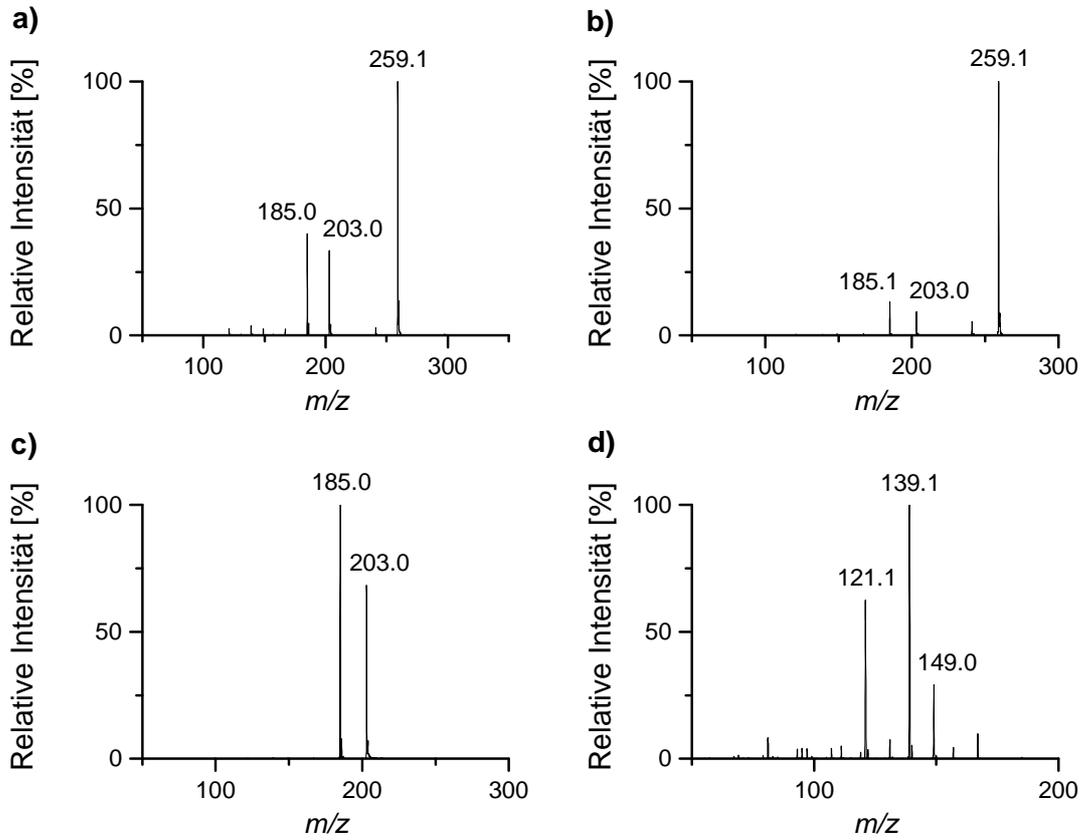


Abbildung 130: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von m/z 315 aus der Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto; (a) MS/MS von m/z 315; (b) MS^3 von m/z 315 \rightarrow m/z 259; (c) MS^3 von m/z 315 \rightarrow m/z 203; (d) MS^3 von m/z 315 \rightarrow m/z 185.

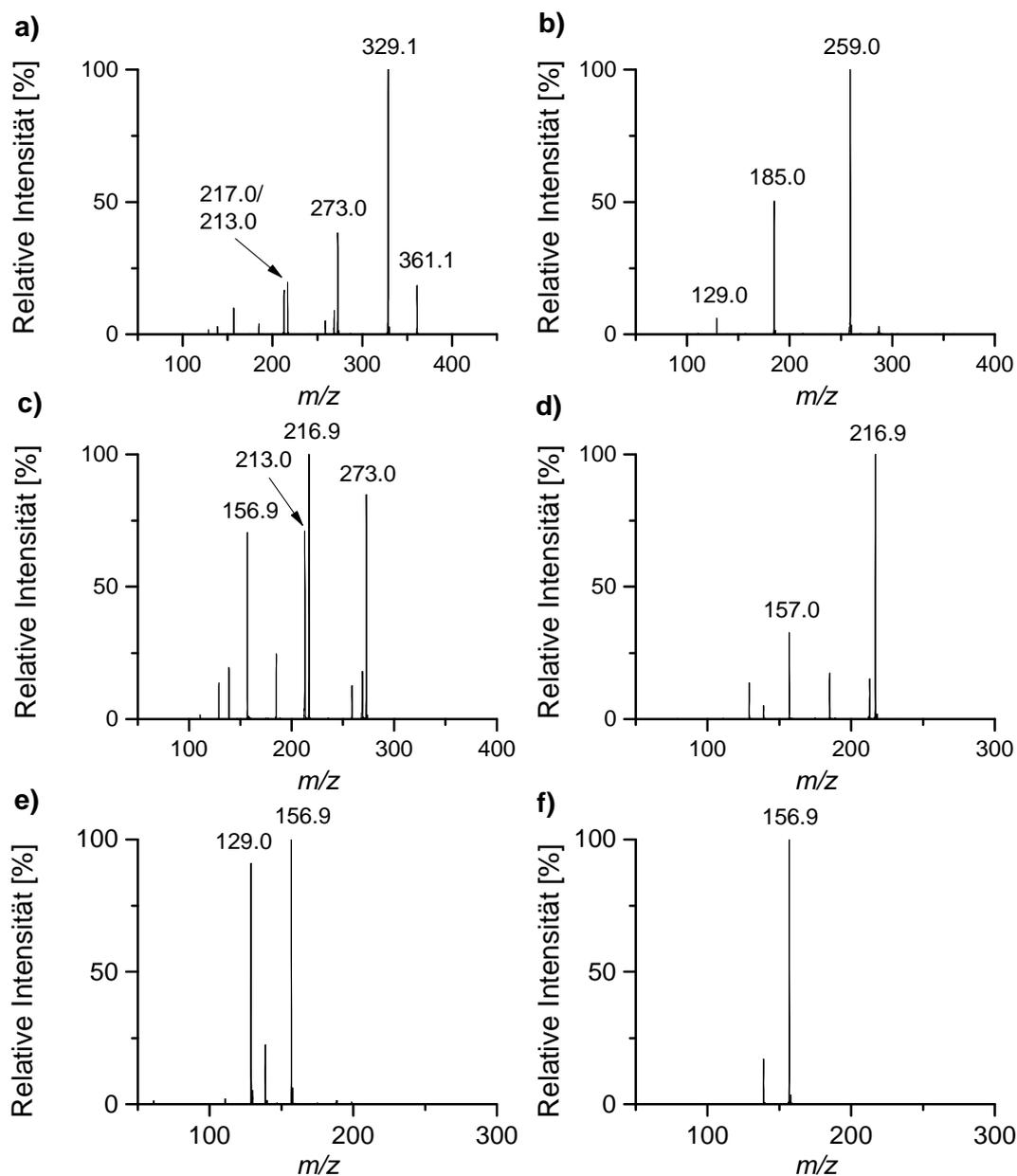


Abbildung 131: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von m/z 403 aus der Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto; (a) MS/MS von m/z 403; (b) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 361; (c) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 329; (d) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 273; (e) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 217; (f) MS^3 von m/z 403 \rightarrow m/z 213.

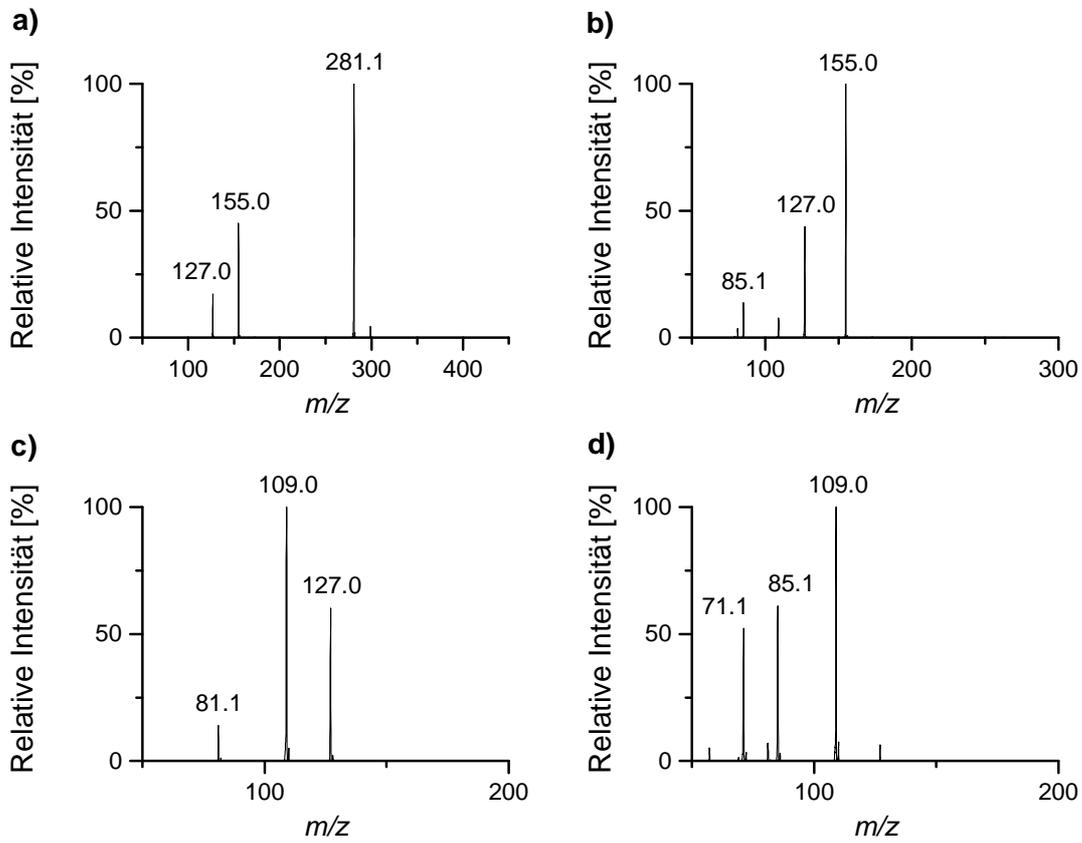


Abbildung 132: Massenspektren der DIP-APCI- MS^n Analyse von m/z 425 aus der Badeente; (a) MS/MS von m/z 425; (b) MS^3 von m/z 425 \rightarrow m/z 281; (c) MS^3 von m/z 425 \rightarrow m/z 155; (d) MS^3 von m/z 425 \rightarrow m/z 127.

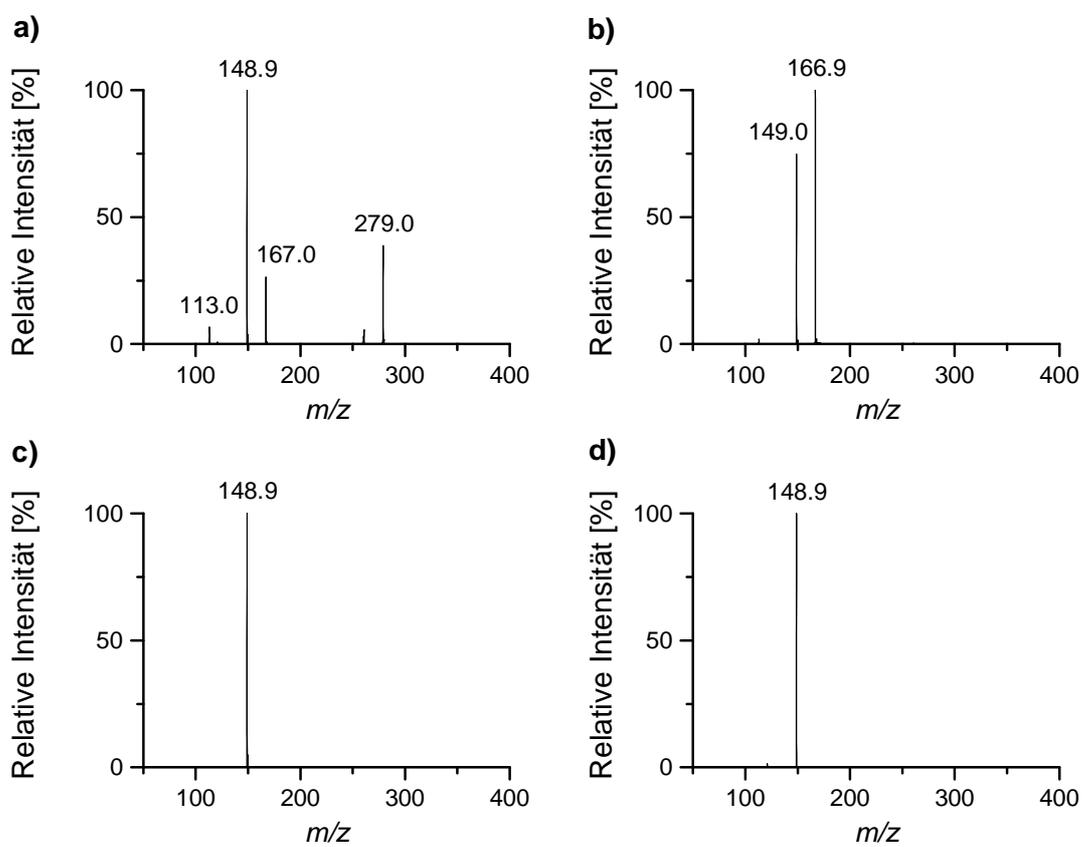


Abbildung 133: Massenspektren der DIP-APCI-MSⁿ Analyse von m/z 391 aus dem Pflanzenbinder; (a) MS/MS von m/z 391; (b) MS³ von m/z 391 → m/z 279; (c) MS³ von m/z 391 → m/z 167; (d) MS³ von m/z 391 → m/z 149.

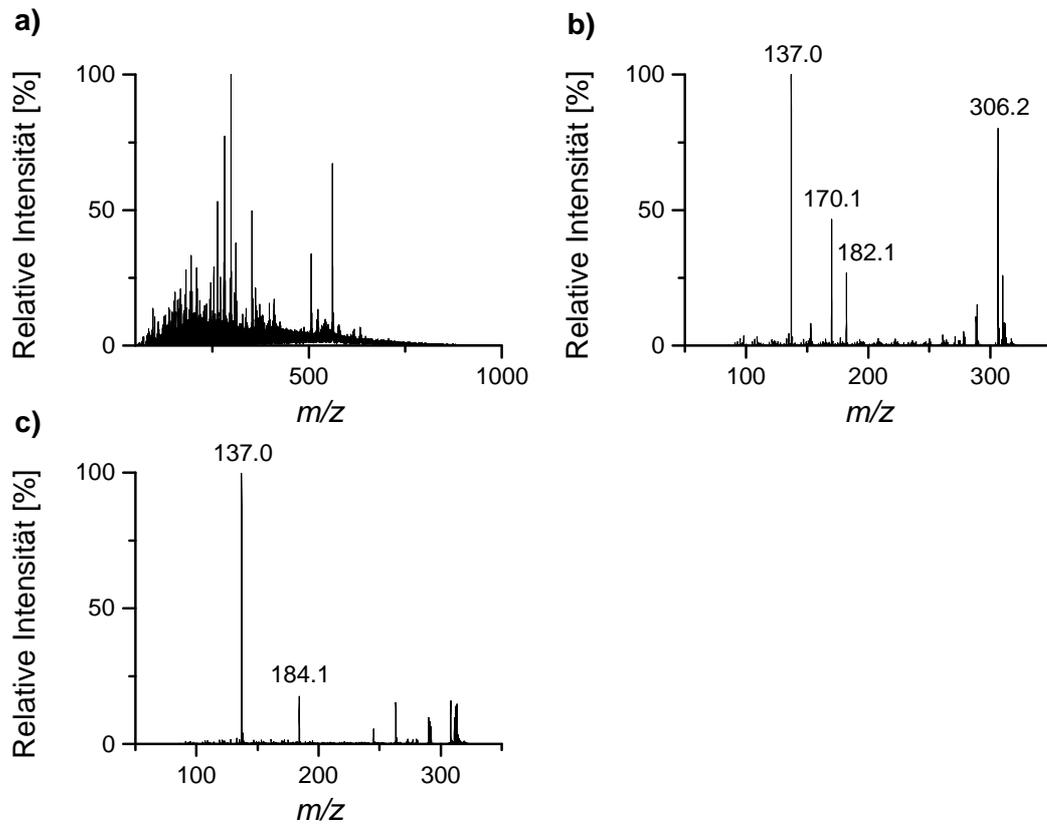


Abbildung 134: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse von Cayennepfeffer; (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 306; (c) MS/MS von m/z 308.

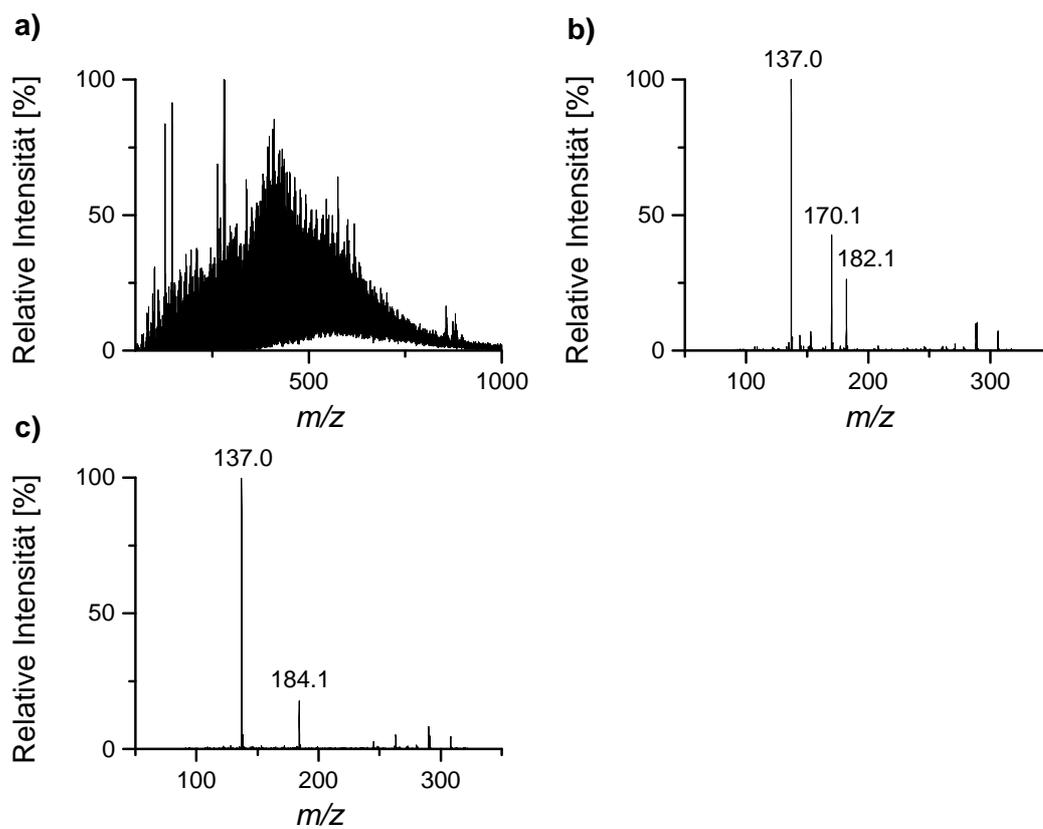


Abbildung 135: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse von Sambal Oelek; (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 306; (c) MS/MS von m/z 308.

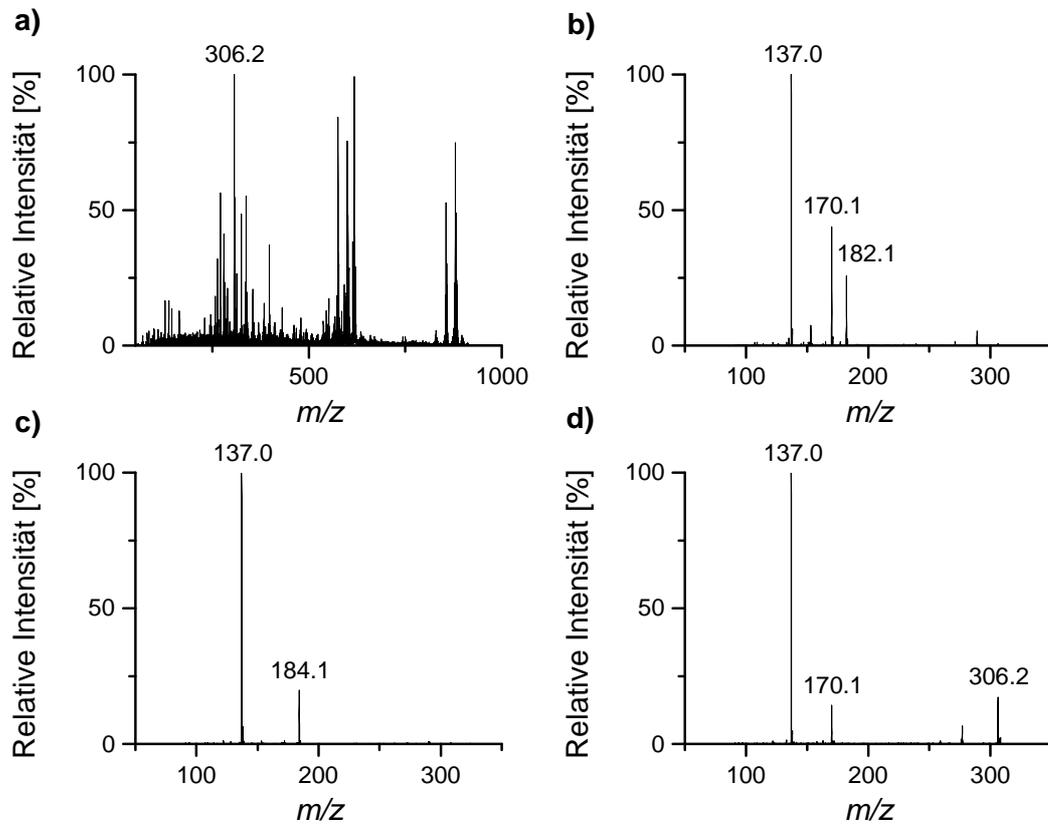


Abbildung 136: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse der roten Jalapeño; (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 306; (c) MS/MS von m/z 308; (d) MS/MS von m/z 294.

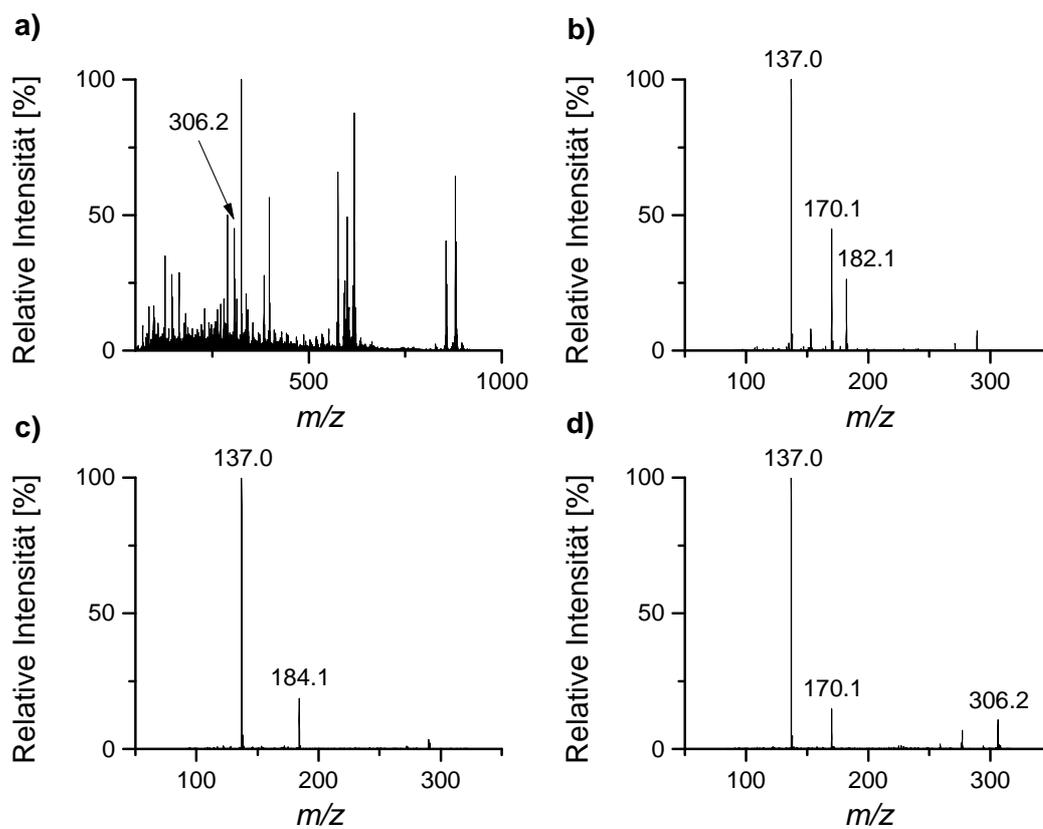


Abbildung 137: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse der grünen Jalapeño; (a) MS (gemittelt über die gesamte Analysendauer); (b) MS/MS von m/z 306; (c) MS/MS von m/z 308; (d) MS/MS von m/z 294.

Tabelle 30: Im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus im Temperaturbereich von 150-400 °C detektierte m/z -Signale.

| detektiertes m/z | mögliche Summenformel | m/z des $[M + H]^+$ -Ions | Abweichung [ppm] |
|--------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------|
| 69.0338 | C_4H_4O | 69.0335 | -4.5 |
| 81.0338 | C_5H_4O | 81.0335 | -3.9 |
| 99.0442 | $C_5H_6O_2$ | 99.0441 | -1.5 |
| 109.0291 | $C_6H_4O_2$ | 109.0284 | -6.4 |
| 110.0319 | $C_5[^{13}C]H_4O_2$ | 110.0318 | -1.3 |
| 111.0442 | $C_6H_6O_2$ | 111.0441 | -1.3 |
| 113.0598 | $C_6H_8O_2$ | 113.0597 | -0.8 |
| 115.0391 | $C_5H_6O_3$ | 115.0390 | -1.1 |
| 117.0548 | $C_5H_8O_3$ | 117.0546 | -1.6 |
| 123.0441 | $C_7H_6O_2$ | 123.0441 | -0.4 |
| 125.0597 | $C_7H_8O_2$ | 125.0597 | 0.1 |
| 127.0404 | $C_6H_6O_3$ | 127.0390 | -11.3 |
| 128.0425 | $C_5[^{13}C]H_6O_3$ | 128.0423 | -1.4 |
| 129.0551 | $C_6H_8O_3$ | 129.0546 | -3.8 |
| 137.0596 | $C_8H_8O_2$ | 137.0597 | 0.8 |
| 139.0389 | $C_7H_6O_3$ | 139.0390 | 0.5 |
| 139.0753 | $C_8H_{10}O_2$ | 139.0754 | 0.4 |
| 141.0546 | $C_7H_8O_3$ | 141.0546 | 0.2 |
| 143.0340 | $C_6H_6O_4$ | 143.0339 | -0.8 |
| 143.0701 | $C_7H_{10}O_3$ | 143.0703 | 1.2 |
| 145.0498 | $C_6H_8O_4$ | 145.0495 | -1.8 |
| 149.0596 | $C_9H_8O_2$ | 149.0597 | 0.7 |
| 151.0753 | $C_9H_{10}O_2$ | 151.0754 | 0.4 |
| 153.0546 | $C_8H_8O_3$ | 153.0546 | 0.1 |
| 155.0702 | $C_8H_{10}O_3$ | 155.0703 | 0.5 |
| 157.0495 | $C_7H_8O_4$ | 157.0495 | 0.2 |
| 159.0651 | $C_7H_{10}O_4$ | 159.0652 | 0.5 |
| 163.0600 | $C_6H_{10}O_5$ | 163.0601 | 0.6 |

| | | | |
|----------|-------------------|----------|------|
| 165.0546 | $C_9H_8O_3$ | 165.0546 | 0.1 |
| 167.0702 | $C_9H_{10}O_3$ | 167.0703 | 0.4 |
| 169.0495 | $C_8H_8O_4$ | 169.0495 | 0.2 |
| 171.0651 | $C_8H_{10}O_4$ | 171.0652 | 0.5 |
| 177.0546 | $C_{10}H_8O_3$ | 177.0546 | 0.1 |
| 179.0702 | $C_{10}H_{10}O_3$ | 179.0703 | 0.4 |
| 181.0495 | $C_9H_8O_4$ | 181.0495 | 0.2 |
| 181.0859 | $C_{10}H_{12}O_3$ | 181.0859 | 0.1 |
| 183.0652 | $C_9H_{10}O_4$ | 183.0652 | -0.1 |
| 185.0808 | $C_9H_{12}O_4$ | 185.0808 | 0.2 |
| 191.0703 | $C_{11}H_{10}O_3$ | 191.0703 | -0.2 |
| 193.0859 | $C_{11}H_{12}O_3$ | 193.0859 | 0.1 |
| 195.0652 | $C_{10}H_{10}O_4$ | 195.0652 | -0.1 |
| 197.0808 | $C_{10}H_{12}O_4$ | 197.0808 | 0.2 |
| 201.0758 | $C_9H_{12}O_5$ | 201.0757 | -0.3 |
| 205.0707 | $C_8H_{12}O_6$ | 205.0707 | -0.2 |
| 205.0857 | $C_{12}H_{12}O_3$ | 205.0859 | 1.1 |
| 207.0653 | $C_{11}H_{10}O_4$ | 207.0652 | -0.6 |
| 209.0809 | $C_{11}H_{12}O_4$ | 209.0808 | -0.3 |
| 221.0809 | $C_{12}H_{12}O_4$ | 221.0808 | -0.3 |
| 225.0758 | $C_{11}H_{12}O_5$ | 225.0757 | -0.2 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1: | Einteilung ambienter Ionenquellen nach dem zugrundeliegenden Ionisationsmechanismus..... | 3 |
| Abbildung 2: | Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation im Positiv-Modus. | 5 |
| Abbildung 3: | Schematischer Aufbau eines DESI Experiments. | 7 |
| Abbildung 4: | Schematische Darstellung der EESI. | 11 |
| Abbildung 5: | Schematische Darstellung der Paper spray ionization..... | 13 |
| Abbildung 6: | Schematische Darstellung der ELDI. | 14 |
| Abbildung 7: | Schematischer Aufbau der DART-Ionenquelle..... | 19 |
| Abbildung 8: | Schematische Darstellung einer ASAP-Ionenquelle (modifizierte LC-MS Ionenquelle). | 23 |
| Abbildung 9: | Schematische Darstellung der DAPPI-Ionenquelle..... | 27 |
| Abbildung 10: | Aufbau der Schubstange des Direkteinlass-Systems (DIP) der Firma SIM GmbH und Probenaufnahmen für feste und flüssige Proben. | 43 |
| Abbildung 11: | Schematische Darstellung der Verdampfung und Ionisation in der DIP-APCI-Ionenquelle im Positiv-Modus. | 44 |
| Abbildung 12: | Aufbau des Querkörpers der DIP-APCI-Ionenquelle für das Q-TOF-MS. | 46 |
| Abbildung 13: | DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an das Agilent Technologies 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF-Massenspektrometer..... | 47 |
| Abbildung 14: | Ablauf einer DIP-APCI-MS Analyse. | 48 |
| Abbildung 15: | Massenspektrum (am Signalmaximum) der Analyse von Dodecansäuremethyl-ester..... | 51 |
| Abbildung 16: | Abhängigkeit der Intensität des $[M + H]^+$ -Signals von Coffein von der Konzentration. | 55 |
| Abbildung 17: | TICs von fünf aufeinanderfolgenden Analysen eines Dichlormethanextraktes aus <i>Radix Angelicae sinensis</i> | 56 |
| Abbildung 18: | Einfluss der Position der Schubstangenspitze in der Ionenquelle auf die Detektion von Coffein. | 57 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 19: EICs von Hexansäuremethylester und Dodecansäuremethylester analysiert als Mischung. | 58 |
| Abbildung 20: Massenspektrum der Analyse von GlucoPON 600 im Negativ-Modus..... | 60 |
| Abbildung 21: Massenspektrum der Analyse von PEG 200 im Negativ-Modus..... | 61 |
| Abbildung 22: Massenspektrum der Analyse von N-nonyl- β -D-maltosid im Negativ-Modus. | 63 |
| Abbildung 23: Direkte Analyse von zwei gemahlene <i>n</i> <i>Radix Angelicae sinensis</i> | 66 |
| Abbildung 24: Analyse der Dichlormethanextrakte aus zwei <i>Radix Angelicae sinensis</i> | 68 |
| Abbildung 25: In <i>Radix Angelicae gigas</i> mittels GCxGC-MS nachgewiesene Cumarine..... | 69 |
| Abbildung 26: Direkte Analyse der gemahlene <i>n</i> <i>Radix Angelicae sinensis</i> und <i>Radix Angelicae gigas</i> | 70 |
| Abbildung 27: EIC von Angelicin und/oder Psoralen bei direkter Analyse der gemahlene <i>n</i> <i>Radix Angelicae gigas</i> und <i>Radix Angelicae sinensis</i> | 71 |
| Abbildung 28: Analyse der Dichlormethanextrakte aus <i>Radix Angelicae sinensis</i> und <i>Radix Angelicae gigas</i> | 74 |
| Abbildung 29: EIC von Angelicin und/oder Psoralen bei Analyse der Dichlormethanextrakte aus <i>Radix Angelicae gigas</i> und <i>Radix Angelicae sinensis</i> | 77 |
| Abbildung 30: Direkte Analyse der gemörserte <i>n</i> Xiao Yao Pille und Jiawei Xiao Yao Pille. .. | 78 |
| Abbildung 31: Analyse der Dichlormethanextrakte aus der Xiao Yao Pille und der Jiawei Xiao Yao Pille. | 80 |
| Abbildung 32: Direkte Analyse der gemörserte <i>n</i> Xiao Yao Pillen mit und ohne Ingwer aus einer Apotheke in Wuppertal..... | 81 |
| Abbildung 33: Direkte Analyse der gemörserte <i>n</i> Xiao Yao Pillen mit <i>Radix Angelicae sinensis</i> bzw. <i>Radix Angelicae archangelica</i> aus einer Apotheke in Wuppertal. | 83 |
| Abbildung 34: EIC von Angelicin und/oder Psoralen bei direkter Analyse der gemörserte <i>n</i> Xiao Yao Pillen mit <i>Radix Angelicae archangelica</i> bzw. <i>Radix Angelicae sinensis</i> aus einer Apotheke in Wuppertal..... | 85 |
| Abbildung 35: Strukturformeln von Safranal und Isophoron..... | 86 |
| Abbildung 36: Massenspektren der direkten Analyse verschiedener Safran-Proben..... | 88 |
| Abbildung 37: Strukturformel von 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-methyl-1-phenylethyl)-phenol (Tinuvin 900)..... | 90 |

| | | |
|---------------|---|-----|
| Abbildung 38: | Massenspektrum der direkten Analyse einer Folie aus TPU..... | 91 |
| Abbildung 39: | Strukturformeln von Cumarin und d ₄ -Cumarin..... | 93 |
| Abbildung 40: | Chromatogramm der LC-MS Analyse einer Kalibrierlösung und eines Extraktes aus Ceylon-Zimt. | 94 |
| Abbildung 41: | Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse einer Kalibrierlösung und eines Extraktes aus Ceylon-Zimt. | 95 |
| Abbildung 42: | Cumaringehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS unter Verwendung von d ₄ -Cumarin als interner Standard..... | 100 |
| Abbildung 43: | Cumaringehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS ohne Verwendung eines internen Standards. | 101 |
| Abbildung 44: | Chronogramm der direkten DIP-APCI-MS Analyse von Zimtpulver. | 103 |
| Abbildung 45: | Chronogramm der DIP-APCI-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack und Chromatogramm der LC-MS Analyse des Likörs mit Waldmeistergeschmack. | 106 |
| Abbildung 46: | DIP-APCI-MS Analyse von 4-Hydroxycumarsäure und dem Likör mit Waldmeistergeschmack..... | 109 |
| Abbildung 47: | DIP-APCI-MS/MS Analyse von 4-Hydroxycumarsäure und dem Likör mit Waldmeistergeschmack..... | 111 |
| Abbildung 48: | DIP-APCI-Ionenquelle gekoppelt an Bruker amaZon speed Ion Trap-MS. | 113 |
| Abbildung 49: | Einfluss des Hilfsgas- und des <i>Drying gas</i> -Flusses sowie der Position der Probenspitze auf die Detektion von Coffein. | 117 |
| Abbildung 50: | Einfluss der Gasflüsse und der Position der Probenspitze in der Ionenquelle auf die Detektion von Coffein. | 119 |
| Abbildung 51: | Abhängigkeit der Intensität des Coffein-Signals von der Konzentration..... | 121 |
| Abbildung 52: | DIP-APCI-MS Analyse von DEHP..... | 125 |
| Abbildung 53: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von DEHP. | 127 |
| Abbildung 54: | Mögliche Fragmentierungswege der Phthalate. | 129 |
| Abbildung 55: | Mögliche Fragmentierungswege von DEHA. | 132 |
| Abbildung 56: | Mögliche Fragmentierungswege von ATBC..... | 133 |
| Abbildung 57: | Mögliche Fragmentierungswege von DBS. | 134 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|-----|
| Abbildung 58: | Massenspektren der DIP-APCI-MS Analyse der Kunststoffproben. | 136 |
| Abbildung 59: | Mögliche Fragmentierungswege von DINCH..... | 141 |
| Abbildung 60: | Massenspektrum der DIP-APCI-MS Analyse der Standardmischung der Capsaicinoide. | 144 |
| Abbildung 61: | Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Capsaicin aus der Standardmischung der Capsaicinoide..... | 145 |
| Abbildung 62: | Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Capsaicin. | 145 |
| Abbildung 63: | Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Dihydrocapsaicin aus der Standardmischung der Capsaicinoide..... | 146 |
| Abbildung 64: | Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Dihydrocapsaicin..... | 146 |
| Abbildung 65: | Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Nordihydrocapsaicin aus der Standardmischung der Capsaicinoide. | 147 |
| Abbildung 66: | Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Nordihydrocapsaicin. | 147 |
| Abbildung 67: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer Aspirin Tablette (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure). | 150 |
| Abbildung 68: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von Aspirin-Effect Pulver (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure). | 151 |
| Abbildung 69: | Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Acetylsalicylsäure. | 152 |
| Abbildung 70: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer Voltaren Dolo Tablette (Wirkstoff: Diclofenac). | 153 |
| Abbildung 71: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse des Voltaren Schmerzgels (Wirkstoff: Diclofenac). | 154 |
| Abbildung 72: | Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Diclofenac. | 154 |
| Abbildung 73: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer IbuHEXAL Tablette (Wirkstoff: Ibuprofen). | 155 |
| Abbildung 74: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse der Ibutop Schmerzcreme (Wirkstoff: Ibuprofen). | 156 |
| Abbildung 75: | Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Ibuprofen. | 156 |
| Abbildung 76: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer Paracetamol Tablette (Wirkstoff: Paracetamol). | 157 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| Abbildung 77: | Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Paracetamol. | 158 |
| Abbildung 78: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer Dolormin für Frauen Tablette (Wirkstoff: Naproxen). | 159 |
| Abbildung 79: | Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Naproxen. | 159 |
| Abbildung 80: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer Clarithromycin Tablette (Wirkstoff: Clarithromycin). | 161 |
| Abbildung 81: | Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Clarithromycin. | 162 |
| Abbildung 82: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer Eremfat Tablette (Wirkstoff: Rifampicin). | 163 |
| Abbildung 83: | Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Rifampicin. | 163 |
| Abbildung 84: | Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse einer EMB-Fatol Tablette (Wirkstoff: Ethambutol). | 164 |
| Abbildung 85: | Vorgeschlagener Fragmentierungsweg von Ethambutol. | 165 |
| Abbildung 86: | DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 150 °C. | 168 |
| Abbildung 87: | EIC von m/z 166,0496 ± 20 ppm in der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 150 °C. | 169 |
| Abbildung 88: | TIC der DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse von Phloemsaft aus Mais bei Ionisation im Positiv-Modus im Temperaturbereich bis 400 °C. | 170 |
| Abbildung 89: | DIP-APCI-Q-TOF-MS Analyse der Phloemsaft-Standardmischung bei Ionisation im Positiv-Modus. | 177 |
| Abbildung 90: | Massenspektren der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Valin und Leucin aus der Phloemsaft-Standardmischung. | 179 |
| Abbildung 91: | Vorgeschlagene Fragmentierungswege von Valin und Leucin. | 180 |
| Abbildung 92: | Massenspektren der DIP-APCI-MS/MS Analyse von Nicotinamid. | 181 |
| Abbildung 93: | Mögliche Fragmentierungswege von Nicotinamid. | 181 |
| Abbildung 94: | Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 118 aus dem Phloemsaft aus Mais. | 182 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 95: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 123 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 183 |
| Abbildung 96: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 127 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 184 |
| Abbildung 97: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 128 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 185 |
| Abbildung 98: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 132 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 185 |
| Abbildung 99: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 144 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 186 |
| Abbildung 100: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 145 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 187 |
| Abbildung 101: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 166 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 188 |
| Abbildung 102: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 196 aus dem Phloemsaft aus Mais..... | 188 |
| Abbildung 103: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 118 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 190 |
| Abbildung 104: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 123 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 191 |
| Abbildung 105: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 128 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 192 |
| Abbildung 106: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 132 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 192 |
| Abbildung 107: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 144 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 193 |
| Abbildung 108: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 146 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 194 |
| Abbildung 109: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 158 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 194 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 110: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 160 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 195 |
| Abbildung 111: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 166 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 195 |
| Abbildung 112: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 183 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 196 |
| Abbildung 113: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 186 aus dem Phloemsaft aus Raps..... | 196 |
| Abbildung 114: MS/MS-Spektren der $[M + O_2]^-$ -Ionen von N-nonyl- β -D-maltosid und eines durch Abspaltung einer Glucose-Einheit von N-nonyl- β -D-maltosid entstandenen Fragments. | 224 |
| Abbildung 115: Einfluss der Temperatur des Verdampfers und der Infusion von Lösungsmittel auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals..... | 229 |
| Abbildung 116: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von DBP..... | 230 |
| Abbildung 117: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von BBP..... | 231 |
| Abbildung 118: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von DINP..... | 232 |
| Abbildung 119: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von DNOP..... | 233 |
| Abbildung 120: Massenspektrum der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 433 aus dem DINP-Standard..... | 234 |
| Abbildung 121: ESI-MS Analyse des DINP-Standards..... | 235 |
| Abbildung 122: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von DEHA..... | 236 |
| Abbildung 123: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von ATBC..... | 237 |
| Abbildung 124: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von DBS..... | 238 |
| Abbildung 125: Massenspektren der DIP-APCI-MS/MS Analyse von m/z 343 und m/z 269 aus dem ATBC-Standard..... | 239 |
| Abbildung 126: ESI-MS Analyse des ATBC-Standards..... | 240 |
| Abbildung 127: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von m/z 419 aus dem Laborhandschuh aus Vinyl..... | 241 |
| Abbildung 128: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von m/z 371 aus der Verpackungsfolie für Käse..... | 242 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 129: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von m/z 403 aus der Verpackungsfolie für Käse. | 243 |
| Abbildung 130: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von m/z 315 aus der Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto..... | 244 |
| Abbildung 131: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von m/z 403 aus der Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto..... | 245 |
| Abbildung 132: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von m/z 425 aus der Badeente. | 246 |
| Abbildung 133: Massenspektren der DIP-APCI-MS ⁿ Analyse von m/z 391 aus dem Pflanzenbinder. | 247 |
| Abbildung 134: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse von Cayennepfeffer. | 248 |
| Abbildung 135: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse von Sambal Oelek. | 249 |
| Abbildung 136: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse der roten Jalapeño. | 250 |
| Abbildung 137: Massenspektren der DIP-APCI-MS und -MS/MS Analyse der grünen Jalapeño. | 251 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|-----|
| Tabelle 1: | Standardsubstanzen zur Optimierung und Charakterisierung der DIP-APCI-Ionenquelle. | 50 |
| Tabelle 2: | Bei direkter DIP-APCI-MS Analyse der gemahlten <i>Radix Angelicae gigas</i> und <i>Radix Angelicae sinensis</i> detektierte Cumarine. | 73 |
| Tabelle 3: | Bei DIP-APCI-MS Analyse des Dichlormethanextraktes aus <i>Radix Angelicae gigas</i> detektierte Cumarine..... | 76 |
| Tabelle 4: | Bei direkter DIP-APCI-MS Analyse der gemörserten Xiao Yao Pillen mit <i>Radix Angelicae archangelica</i> bzw. <i>Radix Angelicae sinensis</i> aus einer Apotheke in Wuppertal detektierte Cumarine..... | 84 |
| Tabelle 5: | Detektion von Safranal und Isophoron bei direkter Analyse der verschiedenen Safran-Proben. | 89 |
| Tabelle 6: | Validierungsergebnisse für die LC-MS Methode und die DIP-APCI-MS Methode zur Bestimmung von Cumarin in Zimtpulver nach Extraktion..... | 98 |
| Tabelle 7: | Cumaringehalte der Zimtproben bestimmt mittels direkter DIP-APCI-MS Analyse der Zimtpulver..... | 104 |
| Tabelle 8: | Während der DIP-APCI-MS Analyse der Weichmacher detektierte <i>m/z</i> -Signale und ihre relativen Intensitäten. | 126 |
| Tabelle 9: | Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS ³ Analyse der Phthalate detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 128 |
| Tabelle 10: | Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS ³ Analyse von DEHA, ATBC und DBS detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 131 |
| Tabelle 11: | Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS ³ Analyse des Laborhandschuhs aus Vinyl detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 137 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tabelle 12: | Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS ³ Analyse der Verpackungsfolie für Käse detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 138 |
| Tabelle 13: | Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS ³ Analyse der Deckeldichtung eines Schraubglases mit Pesto detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 139 |
| Tabelle 14: | Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS ³ Analyse der Badeente detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 140 |
| Tabelle 15: | Während der DIP-APCI-MS/MS und DIP-APCI-MS ³ Analyse des Pflanzenbinders detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 142 |
| Tabelle 16: | Capsaicinoide in Chili. | 143 |
| Tabelle 17: | Während der DIP-APCI-MS/MS Analyse der Standardmischung der Capsaicinoide sowie der realen Proben detektierte <i>m/z</i> -Signale der Fragmente und ihre relativen Intensitäten. | 148 |
| Tabelle 18: | Im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus nachgewiesene Bestandteile. | 173 |
| Tabelle 19: | Im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Negativ-Modus nachgewiesene Bestandteile. | 174 |
| Tabelle 20: | Im Phloemsaft aus Raps mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus nachgewiesene Bestandteile. | 175 |
| Tabelle 21: | Zusammensetzung der wässrigen Phloemsaft-Standardmischung. | 210 |
| Tabelle 22: | Optimierte Einstellungen des Q-TOF-MS zur DIP-APCI-MS Analyse. | 211 |
| Tabelle 23: | Einstellungen des Q-TOF-MS zur LC-MS Analyse. | 213 |
| Tabelle 24: | Optimierte Einstellungen des Ion Trap-MS zur DIP-APCI-MS Analyse. | 214 |
| Tabelle 25: | Reproduzierbarkeit der DIP-APCI-MS Analyse eines Extraktes aus <i>Radix Angelicae sinensis</i> | 223 |
| Tabelle 26: | Cumaringehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS unter Verwendung von d ₄ -Cumarin als interner Standard. | 225 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| Tabelle 27: | Cumaringehalt in Zimtpulver bestimmt mittels LC-MS und DIP-APCI-MS ohne Verwendung eines internen Standards. | 226 |
| Tabelle 28: | Reproduzierbarkeit der DIP-APCI-MS Analyse von Coffein in Abhängigkeit vom <i>Drying gas</i> -Fluss, vom Hilfsgas-Fluss und vom Abstand der Probenspitze von der Korona-Nadel. | 227 |
| Tabelle 29: | Einfluss eines geringen <i>Drying gas</i> -Flusses auf die Intensität des detektierten Coffein-Signals. | 228 |
| Tabelle 30: | Im Phloemsaft aus Mais mittels DIP-APCI-Q-TOF-MS im Positiv-Modus im Temperaturbereich von 150-400 °C detektierte <i>m/z</i> -Signale. | 252 |

Literaturverzeichnis

- [1] Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG (2004) Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306 (5695):471-473.
- [2] Cody RB, Laramée JA, Durst HD (2005) Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Analytical Chemistry* 77 (8):2297-2302.
- [3] Venter A, Nefliu M, Cooks RG (2008) Ambient desorption ionization mass spectrometry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27 (4):284-290.
- [4] Weston DJ (2010) Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst* 135 (4):661-668.
- [5] Van Berkel GJ, Pasilis SP, Ovchinnikova O (2008) Established and emerging atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 43 (9):1161-1180.
- [6] Alberici RM, Simas RC, Sanvido GB, Romão W, Lalli PM, Benassi M, Cunha IBS, Eberlin MN (2010) Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (1):265-294.
- [7] Weston DJ, Ray AD, Bristow AWT (2011) Commentary: Challenging convention using ambient ionization and direct analysis mass spectrometric techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25 (6):821-825.
- [8] Huang MZ, Cheng SC, Cho YT, Shiea J (2011) Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 702 (1):1-15.
- [9] Chen HW, Gamez G, Zenobi R (2009) What Can We Learn from Ambient Ionization Techniques? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (11):1947-1963.

- [10] Cooks RG, Ouyang Z, Takats Z, Wiseman JM (2006) Ambient mass spectrometry. *Science* 311 (5767):1566-1570.
- [11] Harris GA, Galhena AS, Fernandez FM (2011) Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and Current Trends. *Analytical Chemistry* 83 (12):4508-4538.
- [12] Huang MZ, Yuan CH, Cheng SC, Cho YT, Shiea J (2010) Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry* 3:43-65.
- [13] Harris GA, Nyadong L, Fernandez FM (2008) Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry. *Analyst* 133 (10):1297-1301.
- [14] Gross JH (2013) *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*. 1. Auflage, Berlin u.a., Springer Spectrum.
- [15] Dole M, Mack LL, Hines RL (1968) Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics* 49 (5):2240-2249.
- [16] Yamashita M, Fenn JB (1984) Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *Journal of Physical Chemistry* 88 (20):4451-4459.
- [17] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB (1985) Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Analytical Chemistry* 57 (3):675-679.
- [18] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1990) Electrospray Ionization-Principles and Practice. *Mass Spectrometry Reviews* 9 (1):37-70.
- [19] Griffiths J (2008) A brief history of mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 80 (15):5678-5683.
- [20] Kebarle P (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35 (7):804-817.

-
- [21] Cole RB (2000) Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35 (7):763-772.
- [22] Kebarle P, Verkerk UH (2009) Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. *Mass Spectrometry Reviews* 28 (6):898-917.
- [23] Takats Z, Wiseman JM, Cooks RG (2005) Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry* 40 (10):1261-1275.
- [24] Ifa DR, Wu CP, Ouyang Z, Cooks RG (2010) Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview. *Analyst* 135 (4):669-681.
- [25] Venter A, Sojka PE, Cooks RG (2006) Droplet dynamics and ionization mechanisms in desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 78 (24):8549-8555.
- [26] Costa AB, Cooks RG (2007) Simulation of atmospheric transport and droplet-thin film collisions in desorption electrospray ionization. *Chemical Communications* (38):3915-3917.
- [27] Nefliu M, Smith JN, Venter A, Cooks RG (2008) Internal energy distributions in desorption electrospray ionization (DESI). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19 (3):420-427.
- [28] Venter A, Cooks RG (2007) Desorption electrospray ionization in a small pressure-tight enclosure. *Analytical Chemistry* 79 (16):6398-6403.
- [29] Green FM, Salter TL, Gilmore IS, Stokes P, O'Connor G (2010) The effect of electrospray solvent composition on desorption electrospray ionisation (DESI) efficiency and spatial resolution. *Analyst* 135 (4):731-737.

- [30] Badu-Tawiah A, Bland C, Campbell DI, Cooks RG (2010) Non-Aqueous Spray Solvents and Solubility Effects in Desorption Electrospray Ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21 (4):572-579.
- [31] Kauppila TJ, Wiseman JM, Ketola RA, Kotiaho T, Cooks RG, Kostianen R (2006) Desorption electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (3):387-392.
- [32] Kauppila TJ, Talaty N, Salo PK, Kotiah T, Kostianen R, Cooks RG (2006) New surfaces for desorption electrospray ionization mass spectrometry: porous silicon and ultra-thin layer chromatography plates. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (14):2143-2150.
- [33] Cotte-Rodriguez I, Chen H, Cooks RG (2006) Rapid trace detection of triacetone triperoxide (TATP) by complexation reactions during desorption electrospray ionization. *Chemical Communications* (9):953-955.
- [34] Cotte-Rodriguez I, Takats Z, Talaty N, Chen HW, Cooks RG (2005) Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: Sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization. *Analytical Chemistry* 77 (21):6755-6764.
- [35] Nyadong L, Late S, Green MD, Banga A, Fernandez FM (2008) Direct quantitation of active ingredients in solid artesunate antimalarials by noncovalent complex forming reactive desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19 (3):380-388.
- [36] Wu CP, Ifa DR, Manicke NE, Cooks RG (2009) Rapid, Direct Analysis of Cholesterol by Charge Labeling in Reactive Desorption Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry* 81 (18):7618-7624.
- [37] Takats Z, Cotte-Rodriguez I, Talaty N, Chen HW, Cooks RG (2005) Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chemical Communications* (15):1950-1952.

- [38] Cotte-Rodriguez I, Hernandez-Soto H, Chen H, Cooks RG (2008) In situ trace detection of peroxide explosives by desorption electrospray ionization and desorption atmospheric pressure chemical ionization. *Analytical Chemistry* 80 (5):1512-1519.
- [39] Talaty N, Mulligan CC, Justes DR, Jackson AU, Noll RJ, Cooks RG (2008) Fabric analysis by ambient mass spectrometry for explosives and drugs. *Analyst* 133 (11):1532-1540.
- [40] Justes DR, Talaty N, Cotte-Rodriguez I, Cooks RG (2007) Detection of explosives on skin using ambient ionization mass spectrometry. *Chemical Communications* (21):2142-2144.
- [41] Morelato M, Beavis A, Ogle A, Doble P, Kirkbride P, Roux C (2012) Screening of gunshot residues using desorption electrospray ionisation-mass spectrometry (DESI-MS). *Forensic Science International* 217 (1-3):101-106.
- [42] Luosujarvi L, Laakkonen UM, Kostiainen R, Kotiaho T, Kauppila TJ (2009) Analysis of street market confiscated drugs by desorption atmospheric pressure photoionization and desorption electrospray ionization coupled with mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (9):1401-1404.
- [43] Leuthold LA, Mandscheff JF, Fathi M, Giroud C, Augsburg M, Varesio E, Hopfgartner G (2006) Desorption electrospray ionization mass spectrometry: direct toxicological screening and analysis of illicit Ecstasy tablets. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (2):103-110.
- [44] Kauppila TJ, Talaty N, Kuuranne T, Kotiaho T, Kostiainen R, Cooks RG (2007) Rapid analysis of metabolites and drugs of abuse from urine samples by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Analyst* 132 (9):868-875.
- [45] D'Aloise P, Chen H (2012) Rapid determination of flunitrazepam in alcoholic beverages by desorption electrospray ionization-mass spectrometry. *Science & Justice* 52 (1):2-8.

- [46] Chen HW, Talaty NN, Takats Z, Cooks RG (2005) Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. *Analytical Chemistry* 77 (21):6915-6927.
- [47] Williams JP, Lock R, Patel VJ, Scrivens JH (2006) Polarity switching accurate mass measurement of pharmaceutical samples using desorption electrospray ionization and a dual ion source interfaced to an orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry* 78 (21):7440-7445.
- [48] Ifa DR, Manicke NE, Rusine AL, Cooks RG (2008) Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (4):503-510.
- [49] Lin ZQ, Zhang SC, Zhao MX, Yang CD, Chen DP, Zhang XR (2008) Rapid screening of clenbuterol in urine samples by desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (12):1882-1888.
- [50] Thunig J, Flo L, Pedersen-Bjergaard S, Hansen SH, Janfelt C (2012) Liquid-phase microextraction and desorption electrospray ionization mass spectrometry for identification and quantification of basic drugs in human urine. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26 (2):133-140.
- [51] Mulligan CC, MacMillan DK, Noll RJ, Cooks RG (2007) Fast analysis of high-energy compounds and agricultural chemicals in water with desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (22):3729-3736.
- [52] Schurek J, Vaclavik L, Hooijerink H, Lacina O, Poustka J, Sharman M, Caldow M, Nielen MWF, Hajslova J (2008) Control of Strobilurin Fungicides in Wheat Using Direct Analysis in Real Time Accurate Time-of-Flight and Desorption Electrospray Ionization Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 80 (24):9567-9575.

- [53] Garcia-Reyes JF, Jackson AU, Molina-Diaz A, Cooks RG (2009) Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Trace Analysis of Agrochemicals in Food. *Analytical Chemistry* 81 (2):820-829.
- [54] Kauppila TJ, Talaty N, Jackson AU, Kotiaho T, Kostianen R, Cooks RG (2008) Carbohydrate and steroid analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chemical Communications* (23):2674-2676.
- [55] Gerbig S, Takats Z (2010) Analysis of triglycerides in food items by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (15):2186-2192.
- [56] Talaty N, Takats Z, Cooks RG (2005) Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization. *Analyst* 130 (12):1624-1633.
- [57] Hartmanova L, Ranc V, Papouskova B, Bednar P, Havlicek V, Lemr K (2010) Fast profiling of anthocyanins in wine by desorption nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217 (25):4223-4228.
- [58] Song YS, Talaty N, Tao WA, Pan ZZ, Cooks RG (2007) Rapid ambient mass spectrometric profiling of intact, untreated bacteria using desorption electrospray ionization. *Chemical Communications* (1):61-63.
- [59] Reiter SM, Buchberger W, Klampfl CW (2011) Rapid identification and semi-quantitative determination of polymer additives by desorption electrospray ionization/time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (8):2317-2322.
- [60] Vismeh R, Waldon DJ, Teffera Y, Zhao ZY (2012) Localization and Quantification of Drugs in Animal Tissues by Use of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Analytical Chemistry* 84 (12):5439-5445.

- [61] Wiseman JM, Puolitaival SM, Takats Z, Cooks RG, Caprioli RM (2005) Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization. *Angewandte Chemie-International Edition* 44 (43):7094-7097.
- [62] Wiseman JM, Ifa DR, Song QY, Cooks RG (2006) Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* 45 (43):7188-7192.
- [63] Ifa DR, Wiseman JM, Song QY, Cooks RG (2007) Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *International Journal of Mass Spectrometry* 259 (1-3):8-15.
- [64] Dill AL, Eberlin LS, Costa AB, Zheng C, Ifa DR, Cheng LA, Masterson TA, Koch MO, Vitek O, Cooks RG (2011) Multivariate Statistical Identification of Human Bladder Carcinomas Using Ambient Ionization Imaging Mass Spectrometry. *Chemistry-a European Journal* 17 (10):2897-2902.
- [65] Gerbig S, Golf O, Balog J, Denes J, Baranyai Z, Zarand A, Raso E, Timar J, Takats Z (2012) Analysis of colorectal adenocarcinoma tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometric imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (8):2315-2325.
- [66] Van Berkel GJ, Ford MJ, Deibel MA (2005) Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using desorption electrospray ionization. *Analytical Chemistry* 77 (5):1207-1215.
- [67] Morlock G, Schwack W (2010) Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 29 (10):1157-1171.
- [68] Haddad R, Sparrapan R, Eberlin MN (2006) Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (19):2901-2905.

- [69] Haddad R, Milagre HMS, Catharino RR, Eberlin MN (2008) Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. *Analytical Chemistry* 80 (8):2744-2750.
- [70] Saraiva SA, Abdeinur PV, Catharino RR, Nunes G, Eberlin MN (2009) Fabric softeners: nearly instantaneous characterization and quality control of cationic surfactants by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (3):357-362.
- [71] Simas RC, Catharino RR, Cunha IBS, Cabral EC, Barrera-Arellano D, Eberlin MN, Alberici RM (2010) Instantaneous characterization of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analyst* 135 (4):738-744.
- [72] Amaral PH, Fernandes R, Eberlin MN, Hoehr NF (2011) Direct monitoring of drug degradation by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: the case of enalapril. *Journal of Mass Spectrometry* 46 (12):1269-1273.
- [73] Haddad R, Catharino RR, Marques LA, Eberlin MN (2008) Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (22):3662-3666.
- [74] Alberici RM, Simas RC, de Souza V, de Sa GF, Daroda RJ, Eberlin MN (2010) Analysis of fuels via easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 659 (1-2):15-22.
- [75] Eberlin LS, Haddad R, Neto RCS, Cosso RG, Maia DRJ, Maldaner AO, Zacca JJ, Sanvido GB, Romao W, Vaz BG, Ifa DR, Dill A, Cooks RG, Eberlin MN (2010) Instantaneous chemical profiles of banknotes by ambient mass spectrometry. *Analyst* 135 (10):2533-2539.

- [76] Romao W, Vaz BG, Lalli PM, Bueno MIMS, Correa DN, Telles VLCN, de Castro EVR, Eberlin MN (2012) Analyzing Brazilian Vehicle Documents for Authenticity by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Forensic Sciences* 57 (2):539-543.
- [77] Chen HW, Venter A, Cooks RG (2006) Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation. *Chemical Communications* (19):2042-2044.
- [78] Chang DY, Lee CC, Shiea J (2002) Detecting large biomolecules from high-salt solutions by fused-droplet electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74 (11):2465-2469.
- [79] Shieh IF, Lee CY, Shiea J (2005) Eliminating the interferences from TRIS buffer and SDS in protein analysis by fused-droplet electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 4 (2):606-612.
- [80] Chen H, Yang S, Wortmann A, Zenobi R (2007) Neutral desorption sampling of living objects for rapid analysis by extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* 46 (40):7591-7594.
- [81] Zhu L, Gamez G, Chen HW, Chingin K, Zenobi R (2009) Rapid detection of melamine in untreated milk and wheat gluten by ultrasound-assisted extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS). *Chemical Communications* (5):559-561.
- [82] Li X, Fang XW, Yu ZQ, Sheng GY, Wu MH, Fu JM, Chen HW (2012) Direct quantification of creatinine in human urine by using isotope dilution extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 748:53-57.
- [83] Hu B, Yang SP, Li M, Gu HW, Chen HW (2011) Direct detection of native proteins in biological matrices using extractive electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 136 (18):3599-3601.

-
- [84] Chingin K, Chen HW, Gamez G, Zhu L, Zenobi R (2009) Detection of Diethyl Phthalate in Perfumes by Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 81 (1):123-129.
- [85] Chen HW, Wortmann A, Zhang WH, Zenobi R (2007) Rapid in vivo fingerprinting of nonvolatile compounds in breath by extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* 46 (4):580-583.
- [86] Chen HW, Sun YP, Wortmann A, Gu HW, Zenobi R (2007) Differentiation of maturity and quality of fruit using noninvasive extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79 (4):1447-1455.
- [87] Liu Y, Zhang XL, Ouyang YZ, Hu Z, Ma L, Zhang JH, Lin JM, Chen HW (2011) Trace detection of hormones and sulfonamides in viscous cosmetic products by neutral desorption extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 46 (8):794-803.
- [88] Wang H, Liu JJ, Cooks RG, Ouyang Z (2010) Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* 49 (5):877-880.
- [89] Liu JJ, Wang H, Manicke NE, Lin JM, Cooks RG, Ouyang Z (2010) Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. *Analytical Chemistry* 82 (6):2463-2471.
- [90] Yang Q, Wang H, Maas JD, Chappell WJ, Manicke NE, Cooks RG, Ouyang Z (2012) Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 312:201-207.
- [91] Zhang ZP, Cooks RG, Ouyang Z (2012) Paper spray: a simple and efficient means of analysis of different contaminants in foodstuffs. *Analyst* 137 (11):2556-2558.

- [92] Shiea J, Huang MZ, HSu HJ, Lee CY, Yuan CH, Beech I, Sunner J (2005) Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for direct ambient analysis of solids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (24):3701-3704.
- [93] Sampson JS, Hawkrige AM, Muddiman DC (2006) Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17 (12):1712-1716.
- [94] Nemes P, Vertes A (2007) Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79 (21):8098-8106.
- [95] Huang MZ, Hsu HJ, Lee LY, Jeng JY, Shiea JT (2006) Direct protein detection from biological media through electrospray-assisted laser desorption ionization/mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 5 (5):1107-1116.
- [96] Huang MZ, Hsu HJ, Wu CI, Lin SY, Ma YL, Cheng TL, Shiea J (2007) Characterization of the chemical components on the surface of different solids with electrospray-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (11):1767-1775.
- [97] Cheng CY, Yuan CH, Cheng SC, Huang MZ, Chang HC, Cheng TL, Yeh CS, Shiea J (2008) Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for continuously monitoring the states of ongoing chemical reactions in organic or aqueous solution under ambient conditions. *Analytical Chemistry* 80 (20):7699-7705.
- [98] Huang MZ, Cheng SC, Jhang SS, Chou CC, Cheng CN, Shiea J, Popov IA, Nikolaev EN (2012) Ambient molecular imaging of dry fungus surface by electrospray laser desorption ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 325:172-182.
- [99] Sampson JS, Hawkrige AM, Muddiman DC (2007) Direct characterization of intact polypeptides by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization quadrupole

- Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (7):1150-1154.
- [100] Nemes P, Woods AS, Vertes A (2010) Simultaneous Imaging of Small Metabolites and Lipids in Rat Brain Tissues at Atmospheric Pressure by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 82 (3):982-988.
- [101] Stolee JA, Shrestha B, Mengistu G, Vertes A (2012) Observation of Subcellular Metabolite Gradients in Single Cells by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* 51 (41):10386-10389.
- [102] Horning EC, Horning MG, Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN (1973) New Picogram Detection System Based on A Mass-Spectrometer with An External Ionization Source at Atmospheric-Pressure. *Analytical Chemistry* 45 (6):936-943.
- [103] Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN, Haegele KD, Horning EC (1975) Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry - Corona Discharge Ion-Source for Use in Liquid Chromatograph Mass Spectrometer-Computer Analytical System. *Analytical Chemistry* 47 (14):2369-2373.
- [104] Dzidic I, Carroll DI, Stillwell RN, Horning EC (1976) Comparison of Positive-Ions Formed in Nickel-63 and Corona Discharge Ion Sources Using Nitrogen, Argon, Isobutane, Ammonia and Nitric-Oxide as Reagents in Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 48 (12):1763-1768.
- [105] Klee S, Albrecht S, Derpmann V, Kersten H, Benter T (2013) Generation of ion-bound solvent clusters as reactant ions in dopant-assisted APPI and APLI. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (22):6933-6951.
- [106] Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN, Horning MG, Horning EC (1974) Subpicogram Detection System for Gas-Phase Analysis Based Upon Atmospheric-Pressure Ionization (Api) Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 46 (6):706-710.

- [107] Andrade FJ, Shelley JT, Wetzel WC, Webb MR, Gamez G, Ray SJ, Hieftje GM (2008) Atmospheric pressure chemical ionization source. 1. Ionization of compounds in the gas phase. *Analytical Chemistry* 80 (8):2646-2653.
- [108] McEwen CN, Larsen BS (2009) Ionization Mechanisms Related to Negative Ion APPI, APCI, and DART. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (8):1518-1521.
- [109] Gross JH (2014) Direct analysis in real time - a critical review on DART-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (1):63-80.
- [110] Hajslova J, Cajka T, Vaclavik L (2011) Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 30 (2):204-218.
- [111] Cody RB (2009) Observation of Molecular Ions and Analysis of Nonpolar Compounds with the Direct Analysis in Real Time Ion Source. *Analytical Chemistry* 81 (3):1101-1107.
- [112] Penning FM (1927) Ionisation by metastable atoms. *Naturwissenschaften* 15:818-818.
- [113] Song LG, Dykstra AB, Yao HF, Bartmess JE (2009) Ionization Mechanism of Negative Ion-Direct Analysis in Real Time: A Comparative Study with Negative Ion-Atmospheric Pressure Photoionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20 (1):42-50.
- [114] Nilles JM, Connell TR, Durst HD (2009) Quantitation of Chemical Warfare Agents Using the Direct Analysis in Real Time (DART) Technique. *Analytical Chemistry* 81 (16):6744-6749.
- [115] Rowell F, Seviour J, Lim AY, Elumbaring-Salazar CG, Loke J, Ma J (2012) Detection of nitro-organic and peroxide explosives in latent fingerprints by DART- and SALDI-TOF-mass spectrometry. *Forensic Science International* 221 (1-3):84-91.

- [116] Pfaff AM, Steiner RR (2011) Development and validation of AccuTOF-DART (TM) as a screening method for analysis of bank security device and pepper spray components. *Forensic Science International* 206 (1-3):62-70.
- [117] Chernetsova ES, Bochkov PO, Zatonskii GV, Abramovich RA (2011) New Approach to Detecting Counterfeit Drugs in Tablets by Dart Mass Spectrometry. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 45 (5):306-308.
- [118] Bennett MJ, Steiner RR (2009) Detection of Gamma-Hydroxybutyric Acid in Various Drink Matrices via AccuTOF-DART. *Journal of Forensic Sciences* 54 (2):370-375.
- [119] Jones RW, Cody RB, McClelland JF (2006) Differentiating writing inks using direct analysis in real time mass spectrometry. *Journal of Forensic Sciences* 51 (4):915-918.
- [120] Edison SE, Lin LA, Gamble BM, Wong J, Zhang K (2011) Surface swabbing technique for the rapid screening for pesticides using ambient pressure desorption ionization with high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25 (1):127-139.
- [121] Crawford E, Musselman B (2012) Evaluating a direct swabbing method for screening pesticides on fruit and vegetable surfaces using direct analysis in real time (DART) coupled to an Exactive benchtop orbitrap mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (10):2807-2812.
- [122] Farre M, Pico Y, Barcelo D (2013) Direct Peel Monitoring of Xenobiotics in Fruit by Direct Analysis in Real Time Coupled to a Linear Quadrupole Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* 85 (5):2638-2644.
- [123] Vaclavik L, Zachariasova M, Hrbek V, Hajslova J (2010) Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta* 82 (5):1950-1957.
- [124] Novotna H, Kmiecik O, Galazka M, Krtkova V, Hurajova A, Schulzova V, Hallmann E, Rembialkowska E, Hajslova J (2012) Metabolomic fingerprinting employing DART-

- TOFMS for authentication of tomatoes and peppers from organic and conventional farming. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 29 (9):1335-1346.
- [125] Danhelova H, Hradecky J, Prinosilova S, Cajka T, Riddelova K, Vaclavik L, Hajslova J (2012) Rapid analysis of caffeine in various coffee samples employing direct analysis in real-time ionization-high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (10):2883-2889.
- [126] Chernetsova ES, Morlock GE (2012) Assessing the capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey. *International Journal of Mass Spectrometry* 314:22-32.
- [127] Lojza J, Cajka T, Schulzova V, Riddelova K, Hajslova J (2012) Analysis of isoflavones in soybeans employing direct analysis in real-time ionization-high-resolution mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 35 (3):476-481.
- [128] Ackerman LK, Noonan GO, Begley TH (2009) Assessing direct analysis in real-time-mass spectrometry (DART-MS) for the rapid identification of additives in food packaging. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 26 (12):1611-1618.
- [129] Bentayeb K, Ackerman LK, Lord T, Begley TH (2013) Non-visible print set-off of photoinitiators in food packaging: detection by ambient ionisation mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 30 (4):750-759.
- [130] Rothenbacher T, Schwack W (2010) Rapid identification of additives in poly(vinyl chloride) lid gaskets by direct analysis in real time ionisation and single-quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (1):21-29.
- [131] Rothenbacher T, Schwack W (2009) Rapid and nondestructive analysis of phthalic acid esters in toys made of poly(vinyl chloride) by direct analysis in real time single-

- quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (17):2829-2835.
- [132] Yu SX, Crawford E, Tice J, Musselman B, Wu JT (2009) Bioanalysis without Sample Cleanup or Chromatography: The Evaluation and Initial Implementation of Direct Analysis in Real Time Ionization Mass Spectrometry for the Quantification of Drugs in Biological Matrixes. *Analytical Chemistry* 81 (1):193-202.
- [133] Mirnaghi FS, Pawliszyn J (2012) Reusable Solid-Phase Microextraction Coating for Direct Immersion Whole-Blood Analysis and Extracted Blood Spot Sampling Coupled with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Direct Analysis in Real-Time Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 84 (19):8301-8309.
- [134] Wang CY, Zhu HB, Cai ZW, Song FR, Liu ZQ, Liu SY (2013) Newborn screening of phenylketonuria using direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (10):3159-3164.
- [135] Pierce CY, Barr JR, Cody RB, Massung RF, Woolfitt AR, Moura H, Thompson HA, Fernandez FM (2007) Ambient generation of fatty acid methyl ester ions from bacterial whole cells by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Chemical Communications* (8):807-809.
- [136] Maleknia SD, Vail TM, Cody RB, Sparkman DO, Bell TL, Adams MA (2009) Temperature-dependent release of volatile organic compounds of eucalypts by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (15):2241-2246.
- [137] Li YJ, Wang ZZ, Bi YA, Ding G, Sheng LS, Qin JP, Xiao W, Li JC, Wang YX, Wang X (2012) The evaluation and implementation of direct analysis in real time quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for characterization and quantification of geniposide in Re Du Ning Injections. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26 (11):1377-1384.

- [138] Zhu HB, Wang CY, Qi Y, Song FR, Liu ZG, Liu SY (2012) Rapid quality assessment of Radix Aconiti Preparata using direct analysis in real time mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 752:69-77.
- [139] Zeng SS, Chen T, Wang L, Qu HB (2013) Monitoring batch-to-batch reproducibility using direct analysis in real time mass spectrometry and multivariate analysis: A case study on precipitation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 76:87-95.
- [140] Zeng SS, Wang L, Chen T, Wang YF, Mo HB, Qu HB (2012) Direct analysis in real time mass spectrometry and multivariate data analysis: A novel approach to rapid identification of analytical markers for quality control of traditional Chinese medicine preparation. *Analytica Chimica Acta* 733:38-47.
- [141] Lee SM, Kim HJ, Jang YP (2012) Chemometric Classification of Morphologically Similar Umbelliferae Medicinal Herbs by DART-TOF-MS Fingerprint. *Phytochemical Analysis* 23 (5):508-512.
- [142] Zhou ZG, Zhang JL, Zhang W, Bai Y, Liu HW (2011) Rapid screening for synthetic antidiabetic drug adulteration in herbal dietary supplements using direct analysis in real time mass spectrometry. *Analyst* 136 (12):2613-2618.
- [143] Howlett SE, Steiner RR (2011) Validation of Thin Layer Chromatography with AccuTOF-DART (TM) Detection for Forensic Drug Analysis. *Journal of Forensic Sciences* 56 (5):1261-1267.
- [144] McEwen CN, McKay RG, Larsen BS (2005) Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. *Analytical Chemistry* 77 (23):7826-7831.
- [145] Ray AD, Hammond J, Major H (2010) Molecular ions and protonated molecules observed in the atmospheric solids analysis probe analysis of steroids. *European Journal of Mass Spectrometry* 16 (2):169-174.

-
- [146] Zydel F, Smith JR, Pagnotti VS, Lawrence RJ, McEwen CN, Capacio BR (2012) Rapid screening of chemical warfare nerve agent metabolites in urine by atmospheric solids analysis probe-mass spectroscopy (ASAP-MS). *Drug Testing and Analysis* 4 (3-4):308-311.
- [147] Barry SJ, Wolff JC (2012) Identification of isobaric amino-sulfonamides without prior separation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26 (4):419-429.
- [148] Petucci C, Diffendal J (2008) Atmospheric solids analysis probe: a rapid ionization technique for small molecule drugs. *Journal of Mass Spectrometry* 43 (11):1565-1568.
- [149] Fussell RJ, Chan D, Sharman M (2010) An assessment of atmospheric-pressure solids-analysis probes for the detection of chemicals in food. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 29 (11):1326-1335.
- [150] Lee PJ, Ruel AM, Balogh MP, Young PB, Burgess JA (2010) Analysis of vanilla flavoured food products using atmospheric-pressure solids analysis probe. *Agro Food Industry Hi-Tech* 21 (3):25-28.
- [151] McEwen C, Gutteridge S (2007) Analysis of the inhibition of the ergosterol pathway in fungi using the atmospheric solids analysis probe (ASAP) method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18 (7):1274-1278.
- [152] Rozenski J (2011) Analysis of nucleosides using the atmospheric-pressure solids analysis probe for ionization. *International Journal of Mass Spectrometry* 304 (2-3):204-208.
- [153] Twohig M, Shockcor JP, Wilson ID, Nicholson JK, Plumb RS (2010) Use of an Atmospheric Solids Analysis Probe (ASAP) for High Throughput Screening of Biological Fluids: Preliminary Applications on Urine and Bile. *Journal of Proteome Research* 9 (7):3590-3597.
- [154] Trimpin S, Wijerathne K, McEwen CN (2009) Rapid methods of polymer and polymer additives identification: Multi-sample solvent-free MALDI, pyrolysis at atmospheric

- pressure, and atmospheric solids analysis probe mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 654 (1):20-25.
- [155] Smith MJP, Cameron NR, Mosely JA (2012) Evaluating Atmospheric pressure Solids Analysis Probe (ASAP) mass spectrometry for the analysis of low molecular weight synthetic polymers. *Analyst* 137 (19):4524-4530.
- [156] Snelling JR, Scarf CA, Scrivens JH (2012) Characterization of Complex Polysorbate Formulations by Means of Shape-Selective Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 84 (15):6521-6529.
- [157] Bruns EA, Perraud V, Greaves J, Finlayson-Pitts BJ (2010) Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry: A New Approach for Airborne Particle Analysis. *Analytical Chemistry* 82 (14):5922-5927.
- [158] Sutton PA, Smith BE, Rowland SJ (2010) Mass spectrometry of polycyclic tetracarboxylic ('ARN') acids and tetramethyl esters. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (21):3195-3204.
- [159] Lee PJ, Murphy BP, Balogh MP, Eaton SF, Burgess JA (2011) Improving organic synthesis workflow efficiency Using rapid ambient sampling mass spectrometry. *Chimica Oggi-Chemistry Today* 29 (2):24-26.
- [160] Bruns EA, Greaves J, Finlayson-Pitts BJ (2012) Measurement of Vapor Pressures and Heats of Sublimation of Dicarboxylic Acids Using Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry. *Journal of Physical Chemistry A* 116 (24):5900-5909.
- [161] Ahmed A, Cho YJ, No MH, Koh J, Tomczyk N, Giles K, Yoo JS, Kim S (2011) Application of the Mason-Schamp Equation and Ion Mobility Mass Spectrometry To Identify Structurally Related Compounds in Crude Oil. *Analytical Chemistry* 83 (1):77-83.
- [162] Barrere C, Maire F, Afonso C, Giusti P (2012) Atmospheric Solid Analysis Probe-Ion Mobility Mass Spectrometry of Polypropylene. *Analytical Chemistry* 84 (21):9349-9354.

- [163] Pan HF, Lundin G (2011) Rapid detection and identification of impurities in ten 2-naphthalenamines using an atmospheric pressure solids analysis probe in conjunction with ion mobility mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry* 17 (3):217-225.
- [164] Lloyd JA, Harron AF, McEwen CN (2009) Combination Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe and Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Ion Source. *Analytical Chemistry* 81 (21):9158-9162.
- [165] Zydel F, Trimpin S, McEwen CN (2010) Laserspray Ionization Using an Atmospheric Solids Analysis Probe for Sample Introduction. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21 (11):1889-1892.
- [166] Williams JP, Patel VJ, Holland R, Scrivens JH (2006) The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (9):1447-1456.
- [167] Yang SP, Ding JH, Zheng J, Hu B, Li JQ, Chen HW, Zhou ZQ, Qiao XL (2009) Detection of Melamine in Milk Products by Surface Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 81 (7):2426-2436.
- [168] Chen HW, Zheng J, Zhang X, Luo MB, Wang ZC, Qiao XL (2007) Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination. *Journal of Mass Spectrometry* 42 (8):1045-1056.
- [169] Song YS, Cooks RG (2006) Atmospheric pressure ion/molecule reactions for the selective detection of nitroaromatic explosives using acetonitrile and air as reagents. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (20):3130-3138.
- [170] Jjunju FPM, Badu-Tawiah AK, Li AY, Soparawalla S, Roqan IS, Cooks RG (2013) Hydrocarbon analysis using desorption atmospheric pressure chemical ionization. *International Journal of Mass Spectrometry* 345:80-88.

- [171] Chen HW, Liang HZ, Ding JH, Lai JH, Huan YF, Qiao XL (2007) Rapid differentiation of tea products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (25):10093-10100.
- [172] Yue H, Ma L, Pi Z, Chen H, Wang Y, Hu B, Liu S (2013) Fast screening of authentic ginseng products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Planta Med* 79 (2):169-174.
- [173] Li M, Jia B, Ding LY, Hong F, Ouyang YZ, Chen R, Zhou SM, Chen HW, Fang X (2013) Document authentication at molecular levels using desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry imaging. *Journal of Mass Spectrometry* 48 (9):1042-1049.
- [174] Haapala M, Pol J, Saarela V, Arvola V, Kotiaho T, Ketola RA, Franssila S, Kauppila TJ, Kostianen R (2007) Desorption atmospheric pressure photoionization. *Analytical Chemistry* 79 (20):7867-7872.
- [175] Robb DB, Covey TR, Bruins AP (2000) Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 72 (15):3653-3659.
- [176] Luosujarvi L, Arvola V, Haapala M, Pol J, Saarela V, Franssila S, Kotiaho T, Kostianen R, Kauppila TJ (2008) Desorption and ionization mechanisms in desorption atmospheric pressure photoionization. *Analytical Chemistry* 80 (19):7460-7466.
- [177] Kauppila TJ, Arvola V, Haapala M, Pol J, Aalberg L, Saarela V, Franssila S, Kotiaho T, Kostianen R (2008) Direct analysis of illicit drugs by desorption atmospheric pressure photoionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (7):979-985.
- [178] Suni NM, Aalto H, Kauppila TJ, Kotiaho T, Kostianen R (2012) Analysis of lipids with desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry (DAPPI-MS) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS). *Journal of Mass Spectrometry* 47 (5):611-619.

- [179] Luosujarvi L, Kanerva S, Saarela V, Franssila S, Kostiainen R, Kotiaho T, Kauppila TJ (2010) Environmental and food analysis by desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (9):1343-1350.
- [180] Ratcliffe LV, Rutten FJM, Barrett DA, Whitmore T, Seymour D, Greenwood C, Aranda-Gonzalvo Y, Robinson S, McCoustra M (2007) Surface analysis under ambient conditions using plasma-assisted desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 79 (16):6094-6101.
- [181] Na N, Zhao MX, Zhang SC, Yang CD, Zhang XR (2007) Development of a dielectric barrier discharge ion source for ambient mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18 (10):1859-1862.
- [182] Harper JD, Charipar NA, Mulligan CC, Zhang XR, Cooks RG, Ouyang Z (2008) Low-Temperature Plasma Probe for Ambient Desorption Ionization. *Analytical Chemistry* 80 (23):9097-9104.
- [183] Andrade FJ, Shelley JT, Wetzel WC, Webb MR, Gamez G, Ray SJ, Hieftje GM (2008) Atmospheric pressure chemical ionization source. 2. Desorption-ionization for the direct analysis of solid compounds. *Analytical Chemistry* 80 (8):2654-2663.
- [184] Salter TL, Gilmore IS, Bowfield A, Olabanji OT, Bradley JW (2013) Ambient Surface Mass Spectrometry Using Plasma-Assisted Desorption Ionization: Effects and Optimization of Analytical Parameters for Signal Intensities of Molecules and Polymers. *Analytical Chemistry* 85 (3):1675-1682.
- [185] Na N, Zhang C, Zhao MX, Zhang SC, Yang CD, Fang X, Zhang XR (2007) Direct detection of explosives on solid surfaces by mass spectrometry with an ambient ion source based on dielectric barrier discharge. *Journal of Mass Spectrometry* 42 (8):1079-1085.

- [186] Garcia-Reyes JF, Harper JD, Salazar GA, Charipar NA, Ouyang Z, Cooks RG (2011) Detection of Explosives and Related Compounds by Low-Temperature Plasma Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 83 (3):1084-1092.
- [187] Wiley JS, Garcia-Reyes JF, Harper JD, Charipar NA, Ouyang Z, Cooks RG (2010) Screening of agrochemicals in foodstuffs using low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. *Analyst* 135 (5):971-979.
- [188] Garcia-Reyes JF, Mazzoti F, Harper JD, Charipar NA, Oradu S, Ouyang Z, Sindona G, Cooks RG (2009) Direct olive oil analysis by low-temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (19):3057-3062.
- [189] Zhang JI, Costa AB, Tao WA, Cooks RG (2011) Direct detection of fatty acid ethyl esters using low temperature plasma (LTP) ambient ionization mass spectrometry for rapid bacterial differentiation. *Analyst* 136 (15):3091-3097.
- [190] Jecklin MC, Gamez G, Zenobi R (2009) Fast polymer fingerprinting using flowing afterglow atmospheric pressure glow discharge mass spectrometry. *Analyst* 134 (8):1629-1636.
- [191] Ifa DR, Jackson AU, Paglia G, Cooks RG (2009) Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (8):1995-2008.
- [192] Garcia-Reyes JF, Gilbert-Lopez B, Agüera A, Fernandez-Alba AR, Molina-Diaz A (2012) The Potential of Ambient Desorption Ionization Methods combined with High-Resolution Mass Spectrometry for Pesticide testing in Food. In: Fernandez-Alba AR (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry - Volume 58*, Amsterdam u.a., Elsevier, 339-366.

- [193] Shelley JT, Hieftje GM (2011) Ambient mass spectrometry: Approaching the chemical analysis of things as they are. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (11):2153-2159.
- [194] Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 75 (13):3019-3030.
- [195] Sangster T, Spence M, Sinclair P, Payne R, Smith C (2004) Unexpected observation of ion suppression in a liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric bioanalytical method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18 (12):1361-1364.
- [196] Annesley TM (2003) Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 49 (7):1041-1044.
- [197] Jessome LL, Volmer DA (2006) Ion suppression: A major concern in mass spectrometry. *Lc Gc North America* 24 (5):498-510.
- [198] Shelley JT, Hieftje GM (2010) Ionization matrix effects in plasma-based ambient mass spectrometry sources. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (3):345-350.
- [199] Chernetsova ES, Morlock GE (2011) Determination of Drugs and Drug-Like Compounds in Different Samples with Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 30 (5):875-883.
- [200] Schopfer P, Brennicke A (2010) *Pflanzenphysiologie*. 7. Edition, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- [201] Lalonde S, Wipf D, Frommer WB (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* 55:341-372.

- [202] Dinant S, Bonnemain JL, Girousse C, Kehr J (2010) Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *Comptes Rendus Biologies* 333 (6-7):504-515.
- [203] Turgeon R, Wolf S (2009) Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 60:207-221.
- [204] Dinant S, Lemoine R (2010) The phloem pathway: New issues and old debates. *Comptes Rendus Biologies* 333 (4):307-319.
- [205] Heldt HW, Piechulla B (2010) *Plant Biochemistry*. 4. Edition, Amsterdam, Academic Press.
- [206] Madey E, Nowack LM, Thompson JE (2002) Isolation and characterization of lipid in phloem sap of canola. *Planta* 214 (4):625-634.
- [207] Ziegler H (1975) Nature of Transported Substances. In: Zimmermann MH, Milburn JA (Eds.), *Transport in Plants 1 - Phloem Transport*, Heidelberg, Springer, 59-100.
- [208] Lohaus G, Hussmann M, Pennewiss K, Schneider H, Zhu JJ, Sattelmacher B (2000) Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal of Experimental Botany* 51 (351):1721-1732.
- [209] Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW (1995) Further-Studies of the Phloem Loading Process in Leaves of Barley and Spinach - the Comparison of Metabolite Concentrations in the Apoplastic Compartment with Those in the Cytosolic Compartment and in the Sieve Tubes. *Botanica Acta* 108 (3):270-275.
- [210] Lohaus G, Moellers C (2000) Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B-carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* 211 (6):833-840.

- [211] Nadwodnik J, Lohaus G (2008) Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* 227 (5):1079-1089.
- [212] Knop C, Stadler R, Sauer N, Lohaus G (2004) AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis*. *Plant Physiology* 134 (1):204-214.
- [213] Vanhelden M, Tjallingii WF, Teris A, Vanbeek TA (1994) Phloem Sap Collection from Lettuce (*Lactuca-Sativa L*) - Chemical Comparison Among Collection Methods. *Journal of Chemical Ecology* 20 (12):3191-3206.
- [214] Winter H, Lohaus G, Heldt HW (1992) Phloem Transport of Amino-Acids in Relation to Their Cytosolic Levels in Barley Leaves. *Plant Physiology* 99 (3):996-1004.
- [215] Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW (1991) Amino-Acid and Sucrose Content Determined in the Cytosolic, Chloroplastic, and Vacuolar Compartments and in the Phloem Sap of Spinach Leaves. *Plant Physiology* 97 (1):227-233.
- [216] Weiner H, Blechschmidtschneider S, Mohme H, Eschrich W, Heldt HW (1991) Phloem Transport of Amino-Acids - Comparison of Amino-Acid Contents of Maize Leaves and of the Sieve Tube Exudate. *Plant Physiology and Biochemistry* 29 (1):19-23.
- [217] Ohshima T, Hayashi H, Chino M (1990) Collection and Chemical-Composition of Pure Phloem Sap from *Zea-Mays l*. *Plant and Cell Physiology* 31 (5):735-737.
- [218] Tilsner J, Kassner N, Struck C, Lohaus G (2005) Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus L.*) under different nitrogen conditions. *Planta* 221 (3):328-338.
- [219] Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li CJ, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, Gage DA, Hanson AD (1999) S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11 (8):1485-1497.

- [220] Fiehn O (2003) Metabolic networks of *Cucurbita maxima* phloem. *Phytochemistry* 62 (6):875-886.
- [221] Chen SX, Petersen BL, Olsen CE, Schulz A, Halkier BA (2001) Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127 (1):194-201.
- [222] Baker D (2000) Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Regulation* 32 (2-3):157-160.
- [223] Atkins CA, Smith PMC, Rodriguez-Medina C (2011) Macromolecules in phloem exudates-a review. *Protoplasma* 248 (1):165-172.
- [224] Gaupels F, Buhtz A, Knauer T, Deshmukh S, Waller F, van Bel AJE, Kogel KH, Kehr J (2008) Adaptation of aphid stylectomy for analyses of proteins and mRNAs in barley phloem sap. *Journal of Experimental Botany* 59 (12):3297-3306.
- [225] Barnes A, Bale J, Constantinidou C, Ashton P, Jones A, Pritchard J (2004) Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *Journal of Experimental Botany* 55 (402):1473-1481.
- [226] Kehr J, Buhtz A (2008) Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany* 59 (1):85-92.
- [227] Giavalisco P, Kapitza K, Kolasa A, Buhtz A, Kehr J (2006) Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* 6 (3):896-909.
- [228] Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J (2008) Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant Journal* 53 (5):739-749.
- [229] Corbesier L, Vincent C, Jang SH, Fornara F, Fan QZ, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316 (5827):1030-1033.

- [230] Fisher DB, Wu Y, Ku MSB (1992) Turnover of Soluble-Proteins in the Wheat Sieve Tube. *Plant Physiology* 100 (3):1433-1441.
- [231] Dixon FG (1975) Aphids and Translocation. In: Zimmermann MH, Milburn JA (Eds.), *Transport in Plants 1 - Phloem Transport*, Heidelberg, Springer, 154-170.
- [232] Winter H, Robinson DG, Heldt HW (1993) Subcellular Volumes and Metabolite Concentrations in Barley Leaves. *Planta* 191 (2):180-190.
- [233] King RW, Zeevaart JA (1974) Enhancement of Phloem Exudation from Cut Petioles by Chelating-Agents. *Plant Physiology* 53 (1):96-103.
- [234] Richardson PT, Baker DA, Ho LC (1982) The Chemical-Composition of Cucurbit Vascular Exudates. *Journal of Experimental Botany* 33 (137):1239-1247.
- [235] Kennedy JS, Mittler TE (1953) A Method of Obtaining Phloem Sap Via the Mouth-Parts of Aphids. *Nature* 171 (4351):528-528.
- [236] Barlow CA, McCully ME (1972) The Ruby Laser As An Instrument for Cutting Stylets of Feeding Aphids. *Canadian Journal of Zoology* 50 (11):1497-1498.
- [237] Fisher DB, Frame JM (1984) A Guide to the Use of the Exuding-Stylet Technique in Phloem Physiology. *Planta* 161 (5):385-393.
- [238] Cody RB, Dane AJ (2013) Soft Ionization of Saturated Hydrocarbons, Alcohols and Nonpolar Compounds by Negative-Ion Direct Analysis in Real-Time Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 24 (3):329-334.
- [239] Lao SC, Li SP, Kan KKW, Li P, Wan JB, Wang YT, Dong TTX, Tsim KWK (2004) Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction. *Analytica Chimica Acta* 526 (2):131-137.

- [240] Babaei S, Talebi M, Bahar M (2014) Developing an SCAR and ITS reliable multiplex PCR-based assay for safflower adulterant detection in saffron samples. *Food Control* 35 (1):323-328.
- [241] Cullere L, San-Juan F, Cacho J (2011) Characterisation of aroma active compounds of Spanish saffron by gas chromatography-olfactometry: Quantitative evaluation of the most relevant aromatic compounds. *Food Chemistry* 127 (4):1866-1871.
- [242] Tarantilis PA, Polissiou MG (1997) Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (2):459-462.
- [243] Maggi L, Sanchez AM, Carmona M, Kanakis CD, Anastasaki E, Tarantilis PA, Polissiou MG, Alonso GL (2011) Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry* 127 (1):369-373.
- [244] Maggi L, Carmona M, del Campo CP, Kanakis CD, Anastasaki E, Tarantilis PA, Polissiou MG, Alonso GL (2009) Worldwide market screening of saffron volatile composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (11):1950-1954.
- [245] Raters M, Matissek R (2008) Analysis of coumarin in various foods using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *European Food Research and Technology* 227 (2):637-642.
- [246] Woehrlin F, Fry H, Abraham K, Preiss-Weigert A (2010) Quantification of Flavoring Constituents in Cinnamon: High Variation of Coumarin in Cassia Bark from the German Retail Market and in Authentic Samples from Indonesia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (19):10568-10575.
- [247] Fotland TO, Paulsen JE, Sanner T, Alexander J, Husoy T (2012) Risk assessment of coumarin using the bench mark dose (BMD) approach: Children in Norway which regularly eat oatmeal porridge with cinnamon may exceed the TDI for coumarin with several folds. *Food and Chemical Toxicology* 50 (3-4):903-912.

- [248] Miller KG, Poole CF, Chichila TMP (1995) Solvent-Assisted Supercritical-Fluid Extraction for the Isolation of Semivolatile Flavor Compounds from the Cinnamons of Commerce and Their Separation by Series-Coupled Column Gas-Chromatography. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* 18 (8):461-471.
- [249] EFSA (2004) Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to coumarin, adopted on 6 October 2004. *The EFSA Journal* 104:1-36.
- [250] EFSA (2008) Coumarin in flavourings and other food ingredients with flavouring properties, scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC), adopted on 8 July 2008. *The EFSA Journal* 793:1-15.
- [251] Abraham K, Wohrlin F, Lindtner O, Heinemeyer G, Lampen A (2010) Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on human data. *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (2):228-239.
- [252] Abraham K, Pfister M, Wohrlin F, Lampen A (2011) Relative bioavailability of coumarin from cinnamon and cinnamon-containing foods compared to isolated coumarin: A four-way crossover study in human volunteers. *Molecular Nutrition & Food Research* 55 (4):644-653.
- [253] BfR (2012) Neue Erkenntnisse zu Cumarin in Zimt. Stellungnahme Nr. 036/2012 des BfR vom 27. September 2012 (<http://www.bfr.bund.de/cm/343/neue-erkenntnisse-zu-cumarin-in-zimt.pdf>).
- [254] Sproll C, Ruge W, Andlauer C, Godelmann R, Lachenmeier DW (2008) HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food Chemistry* 109 (2):462-469.
- [255] Lungarini S, Aureli F, Coni E (2008) Coumarin and cinnamaldehyde in cinnamon marketed in Italy: A natural chemical hazard? *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 25 (11):1297-1305.

- [256] Rychlik M (2008) Quantification of free coumarin and its liberation from glucosylated precursors by stable isotope dilution assays based on liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (3):796-801.
- [257] Matissek R, Steiner G, Fischer M (2010) *Lebensmittelanalytik*. 4. Auflage, Heidelberg u.a., Springer.
- [258] Edwards KG, Stoker JR (1967) Biosynthesis of Coumarin - Isomerization Stage. *Phytochemistry* 6 (5):655-661.
- [259] Yang ZY, Kinoshita T, Tanida A, Sayama H, Morita A, Watanabe N (2009) Analysis of coumarin and its glycosidically bound precursor in Japanese green tea having sweet-herbaceous odour. *Food Chemistry* 114 (1):289-294.
- [260] Schiewek R, Lorenz M, Giese R, Brockmann K, Benter T, Gab S, Schmitz OJ (2008) Development of a multipurpose ion source for LC-MS and GC-API MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392 (1-2):87-96.
- [261] Gaechter R, Mueller H (1990) *Taschenbuch der Kunststoff-Additive*. 3. Ausgabe, München, Carl Hanser Verlag.
- [262] Fierens T, Servaes K, Van Holderbeke M, Geerts L, De Henauw S, Sioen I, Vanermen G (2012) Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food and Chemical Toxicology* 50 (7):2575-2583.
- [263] Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 (zu finden unter <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServdo?uri=CONSLEG:2006R1907:20130306:EN:PDF> letzter Zugriff 27.12.2013).
- [264] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 (zu finden unter <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServdo?uri=CONSLEG:2011R0010:20130101:EN:PDF> letzter Zugriff 27.12.2013).

-
- [265] Biedermann-Brem S, Biedermann M, Pfenninger S, Bauer M, Altkofer W, Rieger K, Hauri U, Droz C, Grob K (2008) Plasticizers in PVC toys and childcare products: What succeeds the phthalates? Market survey 2007. *Chromatographia* 68 (3-4):227-234.
- [266] Biedermann-Brem S, Biedermann M, Fiselier K, Grob K (2005) Compositional GC-FID analysis of the additives to PVC, focusing on the gaskets of lids for glass jars. *Food Additives and Contaminants* 22 (12):1274-1284.
- [267] Ezerskis Z, Morkunas V, Suman M, Simoneau C (2007) Analytical screening of polyadipates and other plasticisers in poly(vinyl chloride) gasket seals and in fatty food by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 604 (1):29-38.
- [268] Wahl HG, Hoffmann A, Haring HU, Liebich HM (1999) Identification of plasticizers in medical products by a combined direct thermodesorption-cooled injection system and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 847 (1-2):1-7.
- [269] Earls AO, Axford IP, Braybrook JH (2003) Gas chromatography-mass spectrometry determination of the migration of phthalate plasticisers from polyvinyl chloride toys and childcare articles. *Journal of Chromatography A* 983 (1-2):237-246.
- [270] Casajuana N, Lacorte S (2004) New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (12):3702-3707.
- [271] Colon I, Dimandja JMD (2004) High-throughput analysis of phthalate esters in human serum by direct immersion SPME followed by isotope dilution-fast GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380 (2):275-283.
- [272] Sun M, Dai JN, Wang XF, Zhao X, Bi KS, Chen XH (2012) Determination of phthalate esters in polyvinyl chloride infusion bag by stir bar sorptive extraction combined with GC. *Journal of Separation Science* 35 (24):3486-3491.
- [273] Solymos E, Guddat S, Geyer H, Flenker U, Thomas A, Segura J, Ventura R, Platen P, Schulte-Mattler M, Thevis M, Schanzer W (2011) Rapid determination of urinary di(2-

- ethylhexyl) phthalate metabolites based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry as a marker for blood transfusion in sports drug testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401 (2):517-528.
- [274] Keki S, Szilagyi LS, Deak G, Zsuga M (2003) Identification and fragmentation study of plasticizers with post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (8):783-787.
- [275] Akos K, Lajos N, Miklos Z, Sandor K (2011) Fast identification of phthalic acid esters in poly(vinyl chloride) samples by Direct Analysis In Real Time (DART) tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 303 (2-3):225-228.
- [276] Self RL, Wu WH (2012) Rapid qualitative analysis of phthalates added to food and nutraceutical products by direct analysis in real time/orbitrap mass spectrometry. *Food Control* 25 (1):13-16.
- [277] Fouyer K, Lavastre O, Rondeau D (2012) Direct Monitoring of the Role Played by a Stabilizer in a Solid Sample of Polymer Using Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry: The Case of Irgafos 168 in Polyethylene. *Analytical Chemistry* 84 (20):8642-8649.
- [278] Friocourt MP, Picart D, Floch HH (1980) Mass-Spectral Fragmentation of Phthalic-Acid Esters. *Biomedical Mass Spectrometry* 7 (5):193-200.
- [279] Rein D (2013) Potential und Limitierungen der DIP-APCI-MS. Bachelorarbeit, Universität Duisburg-Essen.
- [280] Meckelmann SW, Riegel DW, van Zonneveld MJ, Rios L, Pena K, Ugas R, Quinonez L, Mueller-Seitz E, Petz M (2013) Compositional Characterization of Native Peruvian Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (10):2530-2537.
- [281] Schweiggert U, Carle R, Schieber A (2006) Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-

- performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 557 (1-2):236-244.
- [282] Wolf R, Huschka C, Raith K, Wohlrab W, Neubert RHH (1999) Rapid quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in human skin extracts after dermal administration using HPLC-ESI-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 22 (4):531-539.
- [283] Williams JP, Nibbering NMM, Green BN, Patel VJ, Scrivens JH (2006) Collision-induced fragmentation pathways including odd-electron ion formation from desorption electrospray ionisation generated protonated and deprotonated drugs derived from tandem accurate mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 41 (10):1277-1286.
- [284] Galmier MJ, Bouchon B, Madelmont JC, Mercier F, Pilotaz F, Lartigue C (2005) Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38 (4):790-796.