

RIJKSINSTITUUT VOOR
VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU
BILTHOVEN

Rapport nr. 502501037

Electrospray ionisatie massaspectrometrie:

Verkenning van het toepassingsgebied.

E. van der Heeft, G.J. ten Hove en A.P.J.M. de Jong

april 1996

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Directie RIVM in het kader van project nr. 502501, mijlpaal: verkenning/inventarisatie toepassingsgebied en mogelijkheden van de koppeling van microborekolom-HPLC en CZE met ESI-MS.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven,

tel. 030-2749111, fax 030-2742971

VERZENDLIJST

1	Directie RIVM
2	Dr. R.A. Baumann
3	Dr. E.C. Beuvery
4	Dr. Ir. R.F.M.J. Cleven
5	Mw. Dr. C. van Els
6	Dr. L.A. van Ginkel
7	Dr. E.A. Hogendoorn
8	Dr. Ir. P. Hoogerhout
9	Dr. Ir. E.H.J.M. Jansen
10	Dr. W. Jiskoot
11	Dr. H.A. van 't Klooster
12	Drs. A.K.D. Liem
13	Dr. J.T. Poolman
14	P.L.W.J. Schwillens
15	Dr. R.W. Stephany
16	Mw. Drs. A.A.M. Stolker
17	Dr. G. van de Werken
18	Ir. H. J. van de Wiel
19	Dr. G. Zomer
20	Dr. P. van Zoonen
21 - 23	Auteurs
24	Hoofd Voorlichting & Public Relations
25	Bureau Rapportenregistratie
26 - 27	Bibliotheek RIVM
28 - 47	Reserve-exemplaren ten behoeve van Bureau Rapportenbeheer
48 - 52	Reserve exemplaren
	Mede ter informatie aan:
53	Depot voor Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie

INHOUDSOPGAVE

	<u>Blz.</u>
Verzendlijst	2
Inhoudsopgave	3
Summary	7
Samenvatting	9
1. Inleiding	12
2. Theorie electrospray ionisatie massaspectrometrie	14
2.1 Het ionisatieproces	14
2.2 Moleculaire eigenschappen in relatie tot ESI massaspectra	18
2.3 De koppeling tussen HPLC en ESI-MS	21
2.4 Collision Induced Dissociation	25
3. Materialen en methoden	26
3.1 De bepaling van de molmassa van enkele eiwitten	26
3.1.1 Materialen	26
3.1.2 Methoden	26
3.2 De bepaling van de molmassa van enkele synthetische peptiden	28
3.2.1 Materialen	28
3.2.2 Methoden	28
3.3 De bepaling van monolinuron in oppervlaktewater	29
3.3.1 Materialen	29
3.3.2 Methoden	30
3.4 De bepaling van een in microsomen gevormde metaboliet van naftaleen	31
3.4.1 Materialen	31
3.4.2 Methoden	31

3.5	De ontwikkeling van een LC-ESI-MS methode voor de bepaling van tylosine	33
3.5.1	Materialen	33
3.5.2	Methoden	33
4.	Resultaten en discussie	35
4.1	De bepaling van de molmassa van enkele eiwitten	35
4.2	De bepaling van de molmassa van enkele synthetische peptiden	39
4.3	De bepaling van monolinuron in oppervlaktewater	40
4.4	De bepaling van een in microsomen gevormde metaboliet van naftaleen	43
4.5	De ontwikkeling van een LC-ESI-MS methode voor de bepaling van tylosine	47
5.	Literatuur	54
Figuren		
1	Schematische weergave van een gedeelte van de electrospray ionenbron	15
2	ESI-massaspectrum van testosteron	57
3	Schematische weergave van het kolomschakelsysteem	56
4	ESI-massaspectrum (som van 18 spectra) van 2,5 pmol trypsinogeen	57
5	Getransformeerd ESI-spectrum van 2,5 pmol trypsinogeen	58
6	ESI-massaspectrum (som van 11 spectra) van 9,5 pmol albumine	58
7	Getransformeerd ESI-spectrum van 9,5 pmol albumine	59
8	Getransformeerd ESI-spectrum van 13 pmol myoglobine. In de eiwitoplossing was NaCl aanwezig op een concentratieniveau van 1 mmol.L ⁻¹	59
9	Getransformeerd ESI-spectrum van 14 pmol myoglobine verkregen na éénmaal ontzouten van een oplossing met 0,1 M NaCl	60
10	Getransformeerd ESI-spectrum van 10 pmol myoglobine verkregen na tweemaal ontzouten van een oplossing met 0,1 M NaCl	60
11	ESI-massaspectrum (som van 9 spectra) van een synthetisch peptide met een molekuulmassa van 4626 dalton	61
12	ESI-massaspectrum (som van 10 spectra) van een synthetisch peptide met een	61

	molekuulmassa van 4953 dalton	
13	Getransformeerd ESI-spectrum van een synthetisch peptide met een molekuulmassa van 4626 dalton	62
14	Getransformeerd ESI-spectrum van een synthetisch peptide met een molekuulmassa van 4953 dalton	62
15	Molekuulformule van monolinuron	41
16	ESI-massaspectrum van monolinuron. Oplosmiddel: water/acetonitril (50:50 v/v)	63
17	HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 215) van een monolinuron standaard (concentratie: 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$)	63
18	HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 215) van leidingwater waaraan monolinuron was toegevoegd op een concentratieniveau van 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	64
19	HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 215) van gezuiverd oppervlaktewater waaraan monolinuron was toegevoegd.	64
20	ESI-massaspectrum van de naftaleenmetaboliet	65
21	CID-ESI-massaspectrum van de naftaleenmetaboliet	65
22	Negatieve ionen ESI-massaspectrum van de naftaleenmetaboliet.	66
23	Negatieve ionen ESI-massaspectrum van de naftaleenmetaboliet na verandering van het HPLC gradiëntprogramma	66
24	Negatieve ionen ESI-massaspectrum van 1-naftol, verkregen door analyse van gehydrolyseerd monstermateriaal	67
25	Negatieve ionen ESI-massaspectrum van 1-naftol, verkregen door analyse van een standaardoplossing	67
26	Mogelijke structuurformule van de naftaleenmetaboliet	46
27	De structuurformule van tylosine	47
28	ESI-massaspectrum van tylosine	68
29	Het signaal van het MH^+ -ion van tylosine als functie van het vloeistofdebiet	50
30	HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	68
31	HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van 0,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	69

32	HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Inwendige diameter HPLC-kolom: 2,1 mm	69
33	CID-ESI-massaspectrum van tylosine	70
34	Fragmentionen van tylosine gevormd onder CID-ESI-condities	53
35	HPLC-ESI-MS ionchromatogrammen (m/z 174, 772 en 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van 4,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. De analyse werd onder CID-condities uitgevoerd.	70

Tabellen

1	Gemiddelde molekuulmassa's van trypsinogeen en albumine bepaald met behulp van ESI-MS en de relatieve afwijkingen van de werkelijke molekuulmassa's.	38
---	--	----

SUMMARY

This report describes the results of a study into the applicability of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) to research that has been carried out at RIVM in 1995.

The potential of the technique for protein and peptide analysis, for structure elucidation of polynuclear aromatic hydrocarbons and for the detection of polar pesticides and macrolide antibiotics, was investigated. ESI-MS was employed with continuous infusion of solutions of peptides and proteins and combined with HPLC for the analysis of low-molecular-weight compounds.

ESI-MS combined with continuous infusion constitutes a technique capable of determining the molecular weight of proteins at low picomole level. However, the purity of a protein may significantly affect the accuracy obtainable. The mass accuracy of ESI-MS is demonstrated by the analysis of trypsinogen, a 24 kDa protein. The molecular weight determination of this protein was achieved with an accuracy better than 0.01%. The amount of sample consumed during the experiment, was 2.5 picomole.

Impurities in the sample may interfere with the measurement of the mass of proteins. ESI mass spectra of albumin, a 66 kDa protein, suggested sample heterogeneity arising from various proteins closely related to albumin. Due to small molecular mass differences between albumin and the impurities, accurate mass measurements could not be obtained. Depending on the algorithm used to calculate the mass, the molecular mass was found to be 0.015% - 0.2% higher than the molecular mass calculated from the amino acid sequence.

Sodium salts may interfere with electrospray mass spectrometry. ESI-MS of the 17 kDa protein myoglobin in aqueous sodium chloride solution, did not yield useful results. A simple gel filtration method appeared to remove the sodium ions sufficiently to allow accurate mass measurement. After desalting the sample, the molecular weight was measured to within 0.01%.

The utility of electrospray mass spectrometry for synthetic peptides was investigated by measuring the molecular weight of two 5000 Da peptides. Differences between observed and theoretical molecular weights were 0.002% and 0.008%. In this case ESI-MS was indispensable because FAB-MS failed to produce spectra of these peptides.

Combined HPLC - electrospray mass spectrometry was evaluated for the analysis of low mass compounds. The results of three applications show the merits and limitations.

The herbicide monolinuron could be detected in surface water fortified at $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$. To attain a limit of detection of $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$, interfering matrix components had to be removed prior to HPLC-ESI-MS analysis. The HPLC analysis of metabolites of naphthalene showed the potential of ESI-MS for structure elucidation. The ESI mass spectra provided information about the molecular weight and substructure of an unknown the metabolite. The identity of the metabolites was proposed based on the premise that the compounds would be expected to retain much of the parent structure. Although ESI-MS appeared to be a useful method for structure elucidation, additional spectrometric analyses will often be necessary to achieve unequivocal identification. The availability of a base-deactivated HPLC column appeared to be essential for the analysis of tylosin, a member of the macrolide group of antibiotics. The analyt, a strong base, could be chromatographed using a mobile phase containing 1 mM ammonium acetate in water-acetonitrile. The estimated detection limit for the method was $0.01 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (200 pg on-column) and the repeatability was 11% (relative standard deviation). As no samples were available yet, these data are based on the analyses of standards.

Based on the results of the study, the following conclusions can be made regarding the on-line coupling of HPLC with ESI-MS:

- To achieve adequate detection limits, the use of microbore columns (I.D. < $300 \mu\text{m}$) is often required
- Addition of buffers to the mobile phase does not cause problems as long as volatile buffers at low concentration level (estimated: < 10mmol.L^{-1}) are used.
- Due to limitations to the mobile phase composition, the determination of basic and polar compounds, which interact with silanol groups, requires a base-deactivated column.

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft de resultaten van een studie naar de toepasbaarheid van electrospray ionisatie massaspectrometrie (ESI-MS) bij onderzoek dat in 1995 bij het RIVM is uitgevoerd. Er werd onderzoek verricht op het gebied van de eiwit- en peptide-analyse en naar de bepaling van polaire bestrijdingsmiddelen, macrolide antibiotica en metabolieten van polycyclische aromatische koolwaterstoffen. De techniek werd zowel toegepast met continue infusie van peptide- en eiwitoplossingen als in combinatie met HPLC voor de bepaling van laag-moleculaire verbindingen.

ESI-MS in combinatie met continue infusie, is een techniek waarmee in relatief korte tijd de molekuulmassa van een eiwit of een peptide bepaald kan worden en waarbij slechts picomolen van de stof nodig zijn. De zuiverheid van het eiwit speelt echter een belangrijke rol bij de nauwkeurigheid van de resultaten. Dat ESI-MS vrij nauwkeurige resultaten kan opleveren, bleek uit de analyse van trypsinogeen, een eiwit met een molekuulmassa van 24 kDa. De molekuulmassa van dit eiwit werd met een nauwkeurigheid van beter dan 0,01% bepaald. Er werd 2,5 pmol van het eiwit verbruikt tijdens de analyse.

In hoeverre verontreinigingen bij een analyse storen, is afhankelijk van het type verontreiniging en de molekuulmassa van het eiwit. Dit bleek uit de analyse van albumine, een eiwit met een molekuulmassa van 66 kDa. De oplossing bevatte naast albumine nog andere eiwitten. Door het relatief geringe massaverschil tussen de eiwitten, bleken deze verontreinigingen de analyse te storen. De nauwkeurigheid waarmee de molekuulmassa van het eiwit kon worden bepaald, was in dit geval sterk afhankelijk van de berekeningsmethode en varieerde van 0,015% tot 0,2%.

Ook natriumzouten kunnen problemen veroorzaken. Van myoglobine, een eiwit met een molekuulmassa van 17 kDa, dat zich in een oplossing bevond waarin ook NaCl aanwezig was, kon de molekuulmassa niet nauwkeurig bepaald worden. Met behulp van een eenvoudige gelfiltratiemethode was het mogelijk de oplossing voldoende te ontzouten. Na ontzouten werd de molekuulmassa met een nauwkeurigheid van beter dan 0,01% gemeten.

Bij de controle van de identiteit van gesynthetiseerde peptiden kan ESI-MS gebruikt worden om de molekuulmassa te bepalen. Twee peptiden met een molekuulmassa van rond de 5000

dalton werden geanalyseerd. De afwijking tussen de experimenteel bepaalde en de verwachte molekuulmassa bedroeg 0,002% en 0,008%. In dit geval bleek ESI-MS onmisbaar te zijn omdat deze peptiden met de gebruikelijke massaspectrometrische methode (FAB-MS) niet te bepalen waren.

De mogelijkheden van ESI-MS als detectiemethode voor HPLC, werden onderzocht door middel van een drietal toepassingen. De aanwezigheid van het bestrijdingsmiddel monolinuron in oppervlaktewater kon op een concentratieniveau van $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ aangetoond worden. Om een voldoende lage detectiegrens te bereiken, moesten de monsters vóórdat de HPLC-ESI-MS analyse werd uitgevoerd, worden gezuiverd van storende matrixcomponenten. De HPLC-analyse van metabolieten van naftaleen, gaf een indruk over de mogelijkheden van ESI-MS bij de structuuropheldering. De ESI-massaspectra gaven informatie over de molekuulmassa en over gedeelten van de structuur. Er werd een voorstel over de identiteit van een onbekende metaboliet gedaan dat gebaseerd was op de veronderstelling dat de aromatische structuur in de metaboliet behouden blijft. ESI-MS is bruikbaar bij de structuuropheldering maar zal over het algemeen in combinatie met andere spectrometrische technieken toegepast moeten worden om een éénduidig structuuropheldering te verschaffen. Bij de ontwikkeling van een HPLC-ESI-MS methode voor het antibioticum tylosine, bleek het belang van de beschikbaarheid van een inerte HPLC-kolom. Door gebruik te maken van een goed gedeactiveerde stationaire fase, kon het sterk basische tylosine als symmetrische piek van de kolom geëluëerd worden met een 'eenvoudige' mobiele fase waaraan slechts de vluchtige buffer ammoniumacetaat op een concentratieniveau van 1 mM was toegevoegd. De detectiegrens van de methode werd geschat op $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (200 pg geïnjecteerd) en de herhaalbaarheid bleek 11% te bedragen (relatieve standaardafwijking). Doordat er nog geen monsters beschikbaar waren, werden detectiegrens en herhaalbaarheid bepaald door standaarden te analyseren.

Ten aanzien van de koppeling tussen HPLC en ESI-MS, kunnen op basis van de resultaten van het onderzoek een aantal conclusies getrokken worden:

- Het gebruik van kolommen met een kleine inwendige diameter ($< 300 \mu\text{m}$) is in veel gevallen noodzakelijk om een voldoende lage detectiegrens te bereiken.
- De toevoeging van buffers aan de mobiele fase levert geen problemen op zolang de buffers

- vluchtig zijn en de concentratie niet te hoog is (schatting: $< 10 \text{ mmol.L}^{-1}$).
- Het gebruik van goed gedeactiveerde stationaire fasen is veelal noodzakelijk voor de bepaling van verbindingen die interacties met silanolgroepen vertonen omdat er ten aanzien van de samenstelling van de mobiele fase beperkingen zijn bij gebruik van ESI-MS als detectietechniek.

1. INLEIDING

Door de ontwikkeling van relatief goedkope apparatuur, is massaspectrometrie een veel toegepaste analysemethode geworden. Vooral in combinatie met gaschromatografie of vloeistofchromatografie ontstaat een krachtige analysetechniek die onder andere in de milieu- en bioanalyse wordt gebruikt. De eerste stap bij de massaspectrometrische analyse is de ionisatie van de analyten. Hiervoor zijn diverse ionisatiemethoden ontwikkeld. De gevormde ionen worden vervolgens in de massaspectrometer op basis van verschillen in massa/ladingsverhouding van elkaar gescheiden, hetgeen slechts mogelijk is als de ionen zich in een hoogvacuüm bevinden. De 'klassieke' ionisatiemethoden electron impact en chemische ionisatie vereisen dat de analyt eerst in de gasfase wordt gebracht voordat ionisatie kan plaats vinden. Hierdoor is de toepasbaarheid van de massaspectrometrie (MS) lang beperkt gebleven tot de analyse van relatief vluchtige verbindingen. Een grote groep organische molekulen, waaronder de biopolymeren, zijn zo weinig vluchtig dat ze niet door verwarming in de gasfase gebracht kunnen worden. Deze molekulen zijn reeds ontleed voordat ze enige dampspanning hebben opgebouwd. De ontwikkelingen in de massaspectrometrie zijn de laatste jaren dan ook voornamelijk gericht op de uitbreiding van de toepassingsmogelijkheden naar de analyse van hoog moleculaire en thermolabele verbindingen. Aan het eind van de zeventiger jaren is de ontwikkeling van technieken op gang gekomen die ionen in de gasfase kunnen creëren zonder gebruik te maken van warmte. Dit heeft geleid tot het ontstaan van ionisatiemethoden als fast atom bombardment, plasma desorptie, laser desorptie, thermospray en electrospray.

Het electrosprayproces wordt al sinds het begin van deze eeuw bestudeerd en toegepast. In 1984 zijn de eerste publikaties verschenen over de toepassing van electrospray als ionisatiemethode voor de massaspectrometrie [1, 2]. Ook electrospray ionisatie (ESI) is een techniek waarbij ionen in de gasfase worden gevormd zonder gebruik te maken van warmte. Een voorwaarde is dat de analyten als ion in een oplossing aanwezig zijn. De toepasbaarheid van ESI op diverse onderzoeksterreinen en dan met name de biologie en de biochemie, is in vergelijking met andere ionisatiemethoden, in potentie veel groter. Dit wordt veroorzaakt door twee karakteristieke eigenschappen van ESI.

Ten eerste worden uit grote molekulen zoals eiwitten tijdens het ESI-proces meervoudig geladen ionen gevormd [3]. Het bereik van een massaspectrometer is niet beperkt in massa maar in massa/ladingsverhouding. Het massabereik van een massaspectrometer neemt rechtevenredig toe met de lading van de ionen. De vorming van meervoudig geladen ionen impliceert dat molekulen met een massa van meer dan 100.000 dalton met eenvoudige massaspectrometers gemeten kunnen worden. Eiwitten met een massa van meer dan 100 kDa zijn inmiddels succesvol met ESI-MS geanalyseerd [4].

Ten tweede vereist ESI dat de analyten zijn opgelost in een vloeistof. In tegenstelling tot hetgeen bij enkele andere ionisatietechnieken gebruikelijk is, behoeven dit geen exotische vloeistoffen te zijn zoals bijvoorbeeld glycerol maar kunnen oplosmiddelen als water, methanol of acetonitril gebruikt worden. Dit maakt ESI-MS bij uitstek geschikt als detectiemethode voor de HPLC.

Uit het grote aantal publikaties dat de laatste jaren over ESI-MS is verschenen, blijkt dat deze analysetechniek inmiddels zijn intrede heeft gedaan op vele onderzoeksgebieden.

Het doel van het in dit rapport beschreven onderzoek was de bestudering van de toepassingsmogelijkheden van ESI-MS op voor het RIVM relevante onderzoeksgebieden. Daartoe werd ESI-MS gebruikt bij de analyse van eiwitten, peptiden, polaire bestrijdingsmiddelen, macrolide antibiotica en metabolieten van polycyclische aromatische koolwaterstoffen. Door enkele toepassingen van ESI-MS te beschrijven, willen de auteurs de mogelijkheden en beperkingen van de techniek aangeven. De theoretische achtergronden van ESI-MS worden vrij uitgebreid behandeld. De lezer wordt hiermee de mogelijkheid geboden zich voldoende in de materie te verdiepen om in de toekomst zelf een inschatting te kunnen maken of ESI-MS zijn analyseprobleem kan helpen oplossen.

2. THEORIE ELECTROSPRAY IONISATIE MASSASPECTROMETRIE

2.1 Het ionisatieproces

Electrospray ionisatie (ESI) is een techniek waarbij in een vloeistof aanwezige ionen in de gasfase worden gebracht. ESI is te verdelen in twee opeenvolgende processen:

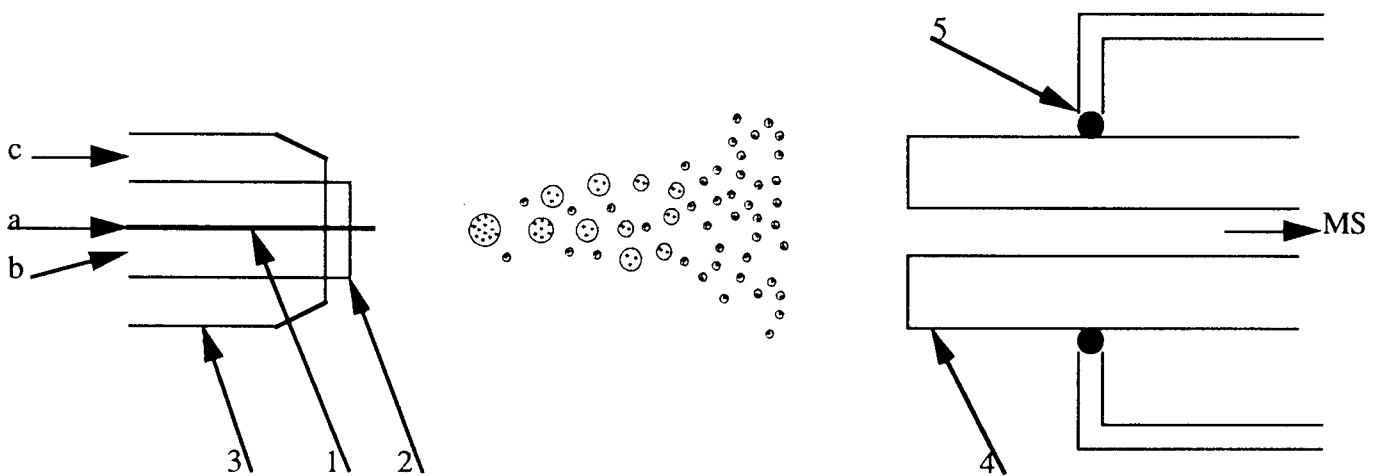
1. Het monster in oplossing wordt via een capillair in de ionenbron van de massaspectrometer gebracht. Hier wordt de oplossing onder invloed van een elektrisch veld en bij atmosferische druk verneveld tot een spray van geladen vloeistofdruppeltjes.
2. Onder invloed van elektrische velden en drukverschillen, bewegen de geladen vloeistofdruppeltjes zich van het atmosferische gedeelte van de ionenbron naar het hoogvacuüm van de massa-analysator. Op hun weg door de massaspectrometer verliezen de druppeltjes hun oplosmiddelmolekulen en ontstaan er uiteindelijk ionen in de gasfase.

De vorming van een spray.

Figuur 1 (pag. 15) is een schematische weergave van een gedeelte van een electrospray ionenbron. Door een fused silica capillair (1) stroomt een vloeistof (oplossing van een analyt of HPLC-eluens). Als oplosmiddel worden meestal mengsels van water en acetonitril of water en methanol gebruikt maar ook andere min of meer polaire oplosmiddelen zijn mogelijk. Het fused silica capillair is concentrisch gemonteerd in een metalen capillair (2, het sheath liquid capillair) met een inwendige diameter die net iets groter is dan de uitwendige diameter van het fused silica capillair. Door dit metalen capillair kan eventueel een tweede vloeistof stromen, de zogenaamde sheath liquid, die zich vermengt met de uit het fused silica capillair stromende vloeistof. De beide capillairen bevinden zich in een kegelvormig stuk metaal, de nozzle (3). Tussen nozzle en sheath liquid capillair kan men een gas laten stromen, het sheath gas.

Tegenover de nozzle met capillairen is een metalen capillair gemonteerd dat verwarmd wordt. De afstand tussen fused silica capillair en dit metalen capillair bedraagt ongeveer 5 mm.

Tussen de nozzle en het verwarmde capillair wordt een spanningsverschil van 3 tot 5 kV aangelegd. Doordat de nozzle en het sheath liquid capillair elektrisch verbonden zijn staan beiden op dezelfde potentiaal.



Figuur 1. Schematische weergave van een gedeelte van de electrospray ionenbron (niet op schaal).

1. Fused silica capillair. Inwendige diameter = 100 μm . Uitwendige diameter = 200 μm .
 2. Sheath liquid capillair. Inwendige diameter = 260 μm .
 3. Nozzle.
 4. Verwarmd capillair. Inwendige diameter = 0,3 mm. Lengte = 12 cm.
 5. Vacuüm-dichte afsluiting.
- a. Oplossing van analyt of HPLC-eluens.
 - b. Sheath liquid.
 - c. Sheath gas (droge stikstof).

Zodra er een vloeistof uit het fused silica capillair stroomt vormt zich door de geringe afstand tussen dit capillair en het sheath liquid capillair, een vloeistoffilm tussen beide capillairen. Indien de vloeistof enige elektrische geleidbaarheid bezit, zal de vloeistof aan het uiteinde van het fused silica capillair, op dezelfde potentiaal worden gebracht als het sheath liquid capillair.

Bij het verlaten van het fused silica capillair komt de vloeistof in een sterk elektrisch veld terecht. Polaire oplosmiddelen als water, methanol en acetonitril bevatten altijd, ook als er geen zouten, zuren of basen aan zijn toegevoegd, een geringe hoeveelheid ionen. Als de nozzle op een hogere potentiaal staat dan het verwarmde capillair zal een deel van de

positieve ionen in de vloeistof onder invloed van het elektrisch veld naar het vloeistofoppervlak bewegen terwijl een deel van de negatieve ionen naar de wand van het sheath liquid capillair beweegt. De opeenhoping van positieve lading aan het vloeistofoppervlak leidt tot vervorming van de uit het capillair stromende vloeistof tot een kegel in de richting van het elektrisch veld. Boven een bepaalde kritische veldsterkte zal de afstotende kracht tussen de positieve ladingen de oppervlaktespanning van de vloeistof overtreffen en zullen zich aan de punt van de kegel positief geladen druppeltjes (met een diameter van circa 1 μm) van de vloeistof afscheiden. De positieve lading van de druppeltjes wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van een overmaat aan positieve ionen. Er zal een min of meer stabiele toestand ontstaan waarbij het aantal per tijdseenheid gevormde druppeltjes constant is (er heeft zich een stabiele electrospray gevormd). Door de opeenhoping van negatieve ionen bij de wand van het sheath liquid capillair, kunnen hier elektrochemische oxidatiereacties optreden waarbij er elektronen aan het capillair worden afgegeven.

Het gebruik van sheath liquid is noodzakelijk als de uit het fused silica capillair stromende vloeistof een hoog percentage water (> 80%) bevat. De oppervlaktespanning van de vloeistof is dan zo groot dat zich geen stabiele spray kan vormen. Door een sheath liquid te gebruiken die bestaat uit een organisch oplosmiddel (methanol, acetonitril, 2-propanol) of uit een mengsel van water en een organisch oplosmiddel (met een laag percentage water), kan de oppervlaktespanning verlaagd worden en een stabiele electrospray worden gevormd. Ook indien de samenstelling van de vloeistof in de tijd sterk verandert zoals bij gradiëntelutie in de HPLC, is het gebruik van een sheath liquid aan te bevelen. Door een sheath liquid met een constante samenstelling te gebruiken waarvan het debiet bovendien wat groter is dan het debiet van de uit het fused silica capillair stromende vloeistof, verandert de samenstelling van de vloeistof veel minder sterk hetgeen een stabielere electrospray tot gevolg heeft.

Een vloeistof kan slechts met behulp van een elektrisch veld verneveld worden tot een spray als het debiet niet groter is dan ongeveer 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Bij een groter debiet zijn er naast het elektrisch veld andere middelen nodig om de vloeistof te verstuiven. Eén der mogelijkheden is om een gas met grote snelheid langs een capillair waaruit de te vernevelen vloeistof komt te laten stromen. De combinatie van gas en elektrisch veld leidt dan tot een stabiele electrospray

bij een vloeistofdebiet tot enkele honderden microliters per minuut. Daarnaast heeft het gas een positieve invloed op de stabiliteit van de spray bij sterk wisselende vloeistofsamenstellingen.

De vorming van de electrospray vindt plaats bij atmosferische druk. Een massaspectrometer werkt onder hoogvacuüm omstandigheden. De electrospray ionenbron bevat een aantal onderdelen die als functie hebben om de druk stapsgewijs te verlagen van atmosferisch tot hoogvacuüm. Eén van die onderdelen is het verwarmde capillair dat ervoor zorgt dat de druk wordt verlaagd van 1×10^5 Pa (1 atmosfeer) aan het begin van het capillair tot 1×10^2 Pa (1×10^{-3} atmosfeer) aan het eind (MS-kant) van het capillair.

De vorming van ionen in de gasfase.

De overmaat aan positieve ionen bevindt zich aan het oppervlak van de druppeltjes en creëert daar een elektrisch veld waarvan de grootte afhankelijk is van de grootte en nettolading van de druppeltjes. De geladen druppeltjes bewegen zich onder invloed van het elektrisch veld in de richting van het verwarmde capillair. Op hun weg naar het verwarmde capillair verliezen de druppeltjes oplosmiddelmolekules en worden kleiner terwijl hun nettolading gelijk blijft. Het gevolg is een toename van de elektrische veldsterkte aan het oppervlak. Als de druppeltjes bij het metalen capillair zijn aangekomen wordt een deel het capillair ingezogen terwijl de rest op het capillair botst en wordt ontladen. Op hun weg door het capillair, dat een temperatuur van 200 tot 250 °C heeft, verliezen de druppeltjes nog meer oplosmiddelmolekules totdat de kracht waarmee de positieve ionen elkaar afstoten de oppervlaktespanning van de vloeistof overschrijdt. De druppeltjes worden dan instabiel en vallen uiteen in een aantal kleinere deeltjes [5]. Dit proces van verdamping van oplosmiddel en desintegratie kan zich een aantal malen herhalen en heeft tot gevolg dat de ladingsdichtheid aan het oppervlak steeds groter wordt. Er kan dan een proces optreden dat ionverdamping wordt genoemd [6]. De afstotende krachten tussen de positieve ionen zijn zo groot geworden dat een deel van de ionen uit de druppeltjes kan ontsnappen en in de gasfase terecht komt. Ook zeer grote molekules zoals eiwitten kunnen door ionverdamping overgaan van de vloeistoffase naar de gasfase, mits ze als ion in de vloeistoffase aanwezig zijn en het elektrisch veld aan het oppervlak van de druppeltjes groot genoeg is om de interactie tussen

het eiwit en de molekulen van het oplosmiddel te verbreken. De ionen in de gasfase bewegen zich onder invloed van elektrische velden verder in de richting van de magneet van de massaspectrometer waar ze op basis van massa/ladingsverhouding (m/z) van elkaar gescheiden worden.

Het wordt niet algemeen geaccepteerd dat ionverdamping verantwoordelijk is voor de vorming van gasfase ionen. Er zijn diverse alternatieve mechanismen voorgesteld. Een beschrijving hiervan valt buiten het bestek van dit rapport. Ongeacht welk mechanisme ten grondslag ligt aan de vorming van gasfase ionen, worden deze ionen gevormd in een toestand waarbij ze niet of nauwelijks extra inwendige energie bevatten. De vorming van fragmentionen komt bij ESI-MS dan ook vrijwel niet voor.

Bij de beschrijving van het ionisatieproces is er vanuit gegaan dat de potentiaal van de nozzle hoger is dan die van het verwarmde capillair. In dat geval worden er positief geladen druppeltjes gevormd en zullen er uitsluitend positief geladen ionen in de gasfase terecht komen. Uiteraard kan men de potentiaal van de nozzle ook lager kiezen dan de potentiaal van het verwarmde capillair. Er worden dan negatief geladen druppeltjes gevormd en negatief geladen gasfase ionen.

2.2 Moleculaire eigenschappen in relatie tot ESI-massaspectra

Uit de beschrijving van het ionisatieproces blijkt dat (ESI-MS) slechts een geschikte analysetechniek is voor die verbindingen die als een ion in het gebruikte oplosmiddel voorkomen. Hierbij kan op basis van moleculaire structuur het volgende onderscheid gemaakt worden:

a. Basische verbindingen.

De potentiaal van de nozzle wordt hoger ingesteld dan de potentiaal van het verwarmde capillair.

Door aanpassing van de pH van het oplosmiddel kan ervoor gezorgd worden dat deze verbindingen in ionogene vorm in de vloeistof aanwezig zijn. Wordt water als oplosmiddel gebruikt dan is de helft van het aantal molekulen van een basische analyt geprotoneerd als de pH gelijk is aan de pK_a van het geconjugeerde zuur. Vaak is het echter niet nodig om het oplosmiddel aan te zuren. Als de basische analyt wordt opgelost in water, eventueel gemengd

met methanol of acetonitril, dan is de overmaat aan positieve lading in de vloeistofdruppeltjes voornamelijk aanwezig in de vorm van H_3O^+ -ionen. Door verdamping van oplosmiddelmolekulen neemt het volume van de druppeltjes af. Tegelijkertijd blijft het aantal H_3O^+ -ionen in de druppeltjes gelijk en dus neemt de pH van de vloeistof af. Deze afname van de pH is over het algemeen ruimschoots voldoende om ervoor te zorgen dat alle analytmolekulen geprotoneerd worden. Toevoeging van een zuur aan het oplosmiddel is dan niet nodig.

Een éénwaardige base is als éénwaardig geladen ion in de vloeistof aanwezig. Door ionverdamping komen deze geprotoneerde molekuulionen (MH^+ -ionen) in de gasfase terecht. In de ESI- massaspectra van deze verbindingen komt over het algemeen slechts één piek voor bij een m/z-waarde van één hoger dan de molekuulmassa van de analyt.

Als een molekuul meer dan één plaats bevat waarop het geprotoneerd kan worden, dan is het afhankelijk van de grootte van het molekuul of er meervoudig geladen ionen in de gasfase gevormd zullen worden. Bij kleine molekulen liggen de basische plaatsen te dicht op elkaar. Meervoudige protonering treedt niet op omdat de afstotende kracht tussen de H^+ -ionen te groot zou worden. Grotere molekulen zoals peptiden en met name eiwitten zijn wel in staat om meer dan één proton in het molekuul op te nemen. De ESI-massaspectra van deze verbindingen bevatten een serie pieken alle afkomstig van $[M+nH]^{n+}$ ionen. Het aantal opgenomen protonen (n) varieert van minimaal één tot een maximum dat vaak gelijk is aan het aantal (beschikbare) basische plaatsen in het molekuul. Het aantal basische plaatsen in een peptide of eiwitmolekuul wordt bepaald door het aantal basische aminozuren. Bij eiwitten speelt ook de driedimensionale structuur een rol [7]. De vorming van meervoudig geladen ionen is er verantwoordelijk voor dat eiwitten met een molekuulmassa tot meer dan 100 kDa met behulp van ESI-MS gedetecteerd kunnen worden.

b. Zure verbindingen.

De potentiaal van de nozzle wordt lager ingesteld dan de potentiaal van het verwarmde capillair.

Deze verbindingen zijn, afhankelijk van de pH van het oplosmiddel, in meer of mindere mate als negatieve ionen ($[M-H]^-$ -ionen) in de vloeistof aanwezig en worden in deze vorm met behulp van ESI-MS bepaald. Ten aanzien van de pH van het oplosmiddel, de pKa van het

zuur, de noodzakelijkheid van toevoeging van een base aan het oplosmiddel en het voorkomen van éénwaardig dan wel meervoudig geladen ionen, kunnen dezelfde opmerkingen worden gemaakt als voor de basische verbindingen.

c. Polaire verbindingen.

Polaire verbindingen die noch basische noch zure eigenschappen hebben, zijn als neutrale deeltjes in de vloeistof aanwezig. Veel van dit soort verbindingen bezitten echter de eigenschap dat ze in de vloeistof aanwezige ionen zoals ammonium, natrium en kalium, aan zich kunnen binden. Het gevormde ion-molekuulcomplex (een adduct) kan vervolgens door ionverdamming in de gasfase terecht komen. Is het adduct ook in de gasfase stabiel dan wordt het door de massaspectrometer als zodanig gedetecteerd. In de ESI-massaspectra komen pieken voor bij m/z -waarden van 18 (ammonium-adducten, $[M+NH_4]^+$), 23 (natrium-adducten, $[M+Na]^+$) en 39 (kalium-adducten, $[M+K]^+$) eenheden boven de molekuulmassa van de analyt. De vorming van adducten kan bevorderd worden door ammonium, natrium of kalium zouten in zeer geringe hoeveelheid (concentraties van rond de 1 mM zijn meestal voldoende) aan het oplosmiddel toe te voegen. Bij grotere molekulen is de vorming van meervoudig geladen adducten mogelijk.

Verbindingen die onder normale omstandigheden in oplossing geen ionen vormen, kunnen dit onder de bij electrospray ionisatie heersende omstandigheden toch doen. Een voorbeeld hiervan is testosteron. Deze verbinding is in het bezit van een met een dubbele binding geconjugeerde carbonylgroep. Testosteron is, ook in aangezuurde oplossingen, als neutraal deeltje aanwezig. In de bij het electrosprayproces gevormde geladen vloeistofdruppeltjes is echter zo'n grote overmaat aan positieve lading aanwezig dat testosteron molekulen in staat zijn een proton op te nemen en als geprotoneerd molekuulion de gasfase bereiken. In het ESI-massaspectrum van testosteron (figuur 2, pag. 57) komen pieken voor van MH^+ -ionen bij m/z -waarden van 289 (^{12}C -isotooppiek) en 290 (^{13}C -isotooppiek). Het proton is waarschijnlijk gebonden aan de carbonylgroep. Door de conjugatie met de dubbele binding is delocalisatie van de positieve lading mogelijk hetgeen de stabiliteit van het ion bevordert. Toevoeging van een zuur aan het oplosmiddel is niet nodig.

2.3 De koppeling tussen HPLC en ESI-MS

Electrospray ionisatie massaspectrometrie is een analysetechniek voor analyten die zich in een vloeistof bevinden. Mengsels van water met methanol of acetonitril zijn bij uitstek geschikte oplosmiddelen. Het gebruik van ESI-MS als detectietechniek in de reversed-phase HPLC ligt dan ook voor de hand. Met de combinatie HPLC-ESI-MS heeft men een zeer krachtige analysetechniek ter beschikking die inmiddels veelvuldig wordt gebruikt op diverse onderzoeksgebieden.

Niet elke HPLC-methode die is ontwikkeld voor gebruik met detectietechnieken als ultraviolet of fluorescentie kan zonder aanpassingen in combinatie met ESI-MS gebruikt worden. De samenstelling van de mobiele fase dient aan een aantal randvoorwaarden te voldoen:

a. Niet-vluchtige buffers zoals fosfaten, kunnen niet gebruikt worden. Als deze buffers in de massaspectrometer terecht zouden komen, veroorzaken ze hier een permanente vervuiling waardoor de massaspectrometer op den duur niet goed meer functioneert en zelfs beschadigd kan worden.

b. Vluchtige buffers kunnen wel gebruikt worden maar de concentratie mag niet te hoog zijn. Een te hoge bufferconcentratie heeft de volgende gevolgen:

1. De elektrische geleidbaarheid van de mobiele fase kan te groot worden. Als de geleidbaarheid van een vloeistof te hoog wordt, kan hieruit geen electrospray gevormd worden [8].

2. Door de verdamping van oplosmiddel worden de geladen druppeltjes in de electrospray steeds kleiner. Tegelijkertijd verandert het aantal ionen in de druppeltjes niet. De concentratie aan ionen neemt dus sterk toe. De concentratie aan ionen in de druppeltjes kan zo hoog worden dat de verdamping van oplosmiddel vrijwel tot stilstand komt. De druppeltjes bereiken niet of nauwelijks de omvang waarbij ionverdamping kan optreden. De analyten worden niet of met zeer geringe gevoeligheid gedetecteerd.

3. Toevoeging van een buffer aan de mobiele fase leidt altijd tot een afname van de gevoeligheid ook als de bufferconcentratie niet zo hoog is dat de oplosmiddelverdamping wordt belemmerd [5]. Een verhoging van de concentratie ionen in de mobiele fase veroorzaakt een toename van de lading van de druppeltjes. De toename van de lading is

echter niet rechtevenredig met de toename van de concentratie aan ionen [9]. De lading neemt slechts weinig toe. Een fractie van de in de druppeltjes aanwezige lading komt in de vorm van ionen in de gasfase terecht. Deze fractie is nagenoeg onafhankelijk van de lading van de druppeltjes. Een verhoging van de bufferconcentratie zal dus een geringe toename van het aantal gasfase ionen tot gevolg hebben. Er ontstaat echter ook een competitie om het aantal beschikbare plaatsen aan het oppervlak van de druppeltjes tussen analyt- en bufferionen. Aangezien de bufferionen altijd in een veel grotere concentratie aanwezig zijn dan analytioneen zijn het voornamelijk de bufferionen die de plaatsen aan het oppervlak innemen en de gasfase kunnen bereiken. Het aantal gasfase analytioneen neemt af en daarmee de gevoeligheid.

De maximale bufferconcentratie die gebruikt kan worden is afhankelijk van het soort buffer en de pH en ligt zo rond de 5 tot 10 mmol.L⁻¹. Vanwege het nadelige effect op de gevoeligheid moet ernaar gestreefd worden de bufferconcentratie zo laag mogelijk te houden.

c. Amine modifiers kunnen niet gebruikt worden. Bij de HPLC-analyse van basische verbindingen worden vaak amines zoals triëthylamine aan de mobiele fase toegevoegd om de interactie tussen analyt en silanolgroepen van het silica dragermateriaal tegen te gaan. Door toevoeging van amines aan de mobiele fase ontstaat in de geladen vloeistofdruppeltjes echter een competitie om lading en plaatsen aan het oppervlak tussen analyt en amine modifier. Aangezien amine modifiers zowel basisch zijn als oppervlakte actieve eigenschappen hebben, zijn het voornamelijk ionen van de amine modifier die in de gasfase terecht komen. Het signaal van een analyt die een uitstekende ESI-MS respons heeft, wordt niet zelden geheel weggedrukt als er een amine modifier aan de mobiele fase wordt toegevoegd.

d. Ionpaar reagentia worden bijvoorkeur niet gebruikt. Niet-vluchtige ionpaar reagentia kunnen niet gebruikt worden. Vluchtige ionpaar reagentia zoals trifluorazijnzuur kunnen wel toegepast worden maar dit heeft nadelige gevolgen voor de gevoeligheid en de stabiliteit van de electrospray [10].

Ionpaar reagentia vormen met positief of negatief geladen ionen van een analyt ionparen. Tijdens het electrospray ionisatieproces kunnen uitsluitend ionen en geen neutrale ionparen van de vloeistoffase overgaan naar de gasfase. Toevoeging van een ionpaar reagens aan de

mobiele fase zal een sterke afname van de gevoeligheid tot gevolg hebben. Een ionpaar reagens als trifluorazijnzuur verhoogt, doordat het een vrij sterk zuur is ($K_a = 0,6$), bovendien de geleidbaarheid van de vloeistof hetgeen een onstabiele electrospray tot gevolg heeft. Als uit oogpunt van HPLC-scheiding het gebruik van een ionpaar reagens onvermijdelijk is, kan men proberen om met gebruik van sheath liquid en sheath gas een stabiele electrospray te vormen en de nadelige effecten op de gevoeligheid enigzins tegen te gaan.

Het is van belang dat men zich realiseert dat ESI-MS een concentratiegevoelig proces is [11]. Dit wil zeggen dat het signaal dat een bepaalde analyt in de massaspectromter veroorzaakt, afhankelijk is van de concentratie van de analyt in het HPLC-eluens. Het verband tussen signaal en concentratie is bovendien rechtevenredig tot analytconcentraties van ongeveer 10^{-5} M [12]. Dit heeft twee belangrijke implicaties:

1. Niet het gehele kolomeluens hoeft naar de massaspectrometer gestuurd te worden. Door het eluens na de kolom te splitsen zodat slechts een deel in de ionenbron van de massaspectrometer terecht komt, verandert de analytconcentratie en dus ook het signaal niet (dit in tegenstelling tot een massafLOWgevoelige detector waarbij splitten wel gevolgen voor het signaal zou hebben). Aangezien de gevoeligheid van ESI-MS toeneemt als het debiet van de mobiele fase afneemt [5], is het zelfs beter het eluens te splitsen. Ook neemt de vervuiling van de massaspectrometer af als er minder eluens in terecht komt.
2. Een afname van de interne diameter van de HPLC-kolom zal een toename van de gevoeligheid tot gevolg hebben.

In het ideale geval elueert een analyt als Gaussvormige piek van de kolom. De maximale concentratie van de analyt in de piek wordt dan gegeven door [13]:

$$C_{\max} = \frac{V_i C}{\frac{1}{4} \pi d^2 L \epsilon (1 + k')} \sqrt{\frac{N}{2\pi}} \quad (1)$$

- C_{\max} = de maximale concentratie van de analyt in de piek
 V_i = het geïnjecteerde volume
 C = de concentratie van de analyt in de geïnjecteerde oplossing
 d = de inwendige diameter van de kolom
 L = de lengte van de kolom

- k' = de capaciteitsfactor van de analyt
 N = het schotelgetal van de kolom
 ϵ = correctiefactor voor het gedeelte van de kolom dat vaste fase bevat

Als twee kolommen met verschillende inwendige diameter maar van gelijke lengte gepakt zijn met hetzelfde materiaal, een gelijk schotelgetal hebben en de capaciteitsfactor van de analyt op beide kolommen gelijk is dan volgt uit vergelijking 1:

$$\frac{C_{\max,1}}{C_{\max,2}} = \frac{V_{i,1}}{V_{i,2}} \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2 \quad (2)$$

- $C_{\max,1}$ = de maximale concentratie van de analyt in de piek bij gebruik van kolom 1
 $C_{\max,2}$ = de maximale concentratie van de analyt in de piek bij gebruik van kolom 2
 $V_{i,1}$ = het geïnjecteerde volume op kolom 1
 $V_{i,2}$ = het geïnjecteerde volume op kolom 2
 d_1 = de inwendige diameter van kolom 1
 d_2 = de inwendige diameter van kolom 2

Als bovendien op beide kolommen hetzelfde volume wordt geïnjecteerd volgt uit 2:

$$\frac{C_{\max,1}}{C_{\max,2}} = \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2 \quad (3)$$

De gevoeligheidswinst die behaald kan worden door verkleining van de inwendige diameter van de kolom is aanzienlijk. Door in plaats van een HPLC-kolom met een interne diameter van 4,6 mm een kolom met een interne diameter van 0,2 mm te gebruiken, kan een toename in de gevoeligheid van ongeveer 500 bereikt worden. Deze gevoeligheidswinst is overigens alleen haalbaar als op beide kolommen evenveel geïnjecteerd kan worden ($V_{i,1} = V_{i,2}$). In de normale configuratie waarin het geïnjecteerde monster direct op de analytische kolom wordt gebracht, is dat niet mogelijk. Door echter gebruik te maken van een kolomschakelsysteem, waarin het monster eerst op een kort kolommetje wordt geconcentreerd alvorens het op de

analytische kolom terecht komt, is het mogelijk om op een kolom met een interne diameter van 0,2 mm of kleiner net zoveel te injecteren als op een 4,6 mm kolom [14].

2.4 Collision Induced Dissociation

ESI behoort tot de zachte ionisatietechnieken. De gevormde gasfase molekuulionen hebben bij het ionisatieproces niet of nauwelijks extra interne energie verkregen. Er is in de molekuulionen dus geen energie beschikbaar die gebruikt kan worden om bindingen te verbreken. De massaspectra bevatten slechts pieken die afkomstig zijn van molekuulionen (MH^+ , $[M+Na]^+$, $[M-H]^-$, etc.). Fragmentionen komen in ESI-massaspectra vrijwel niet voor. Dit beperkt de mogelijkheden om ESI-MS te gebruiken als hulpmiddel bij de structuuropheldering. Als ESI-MS wordt toegepast bij in het kader van wetshandhaving uitgevoerd onderzoek zoals residu-analyse, dan volstaat het vaak niet om identificatie van een analyt uitsluitend op het al of niet voorkomen van één piek in een massaspectrum te baseren. Een massaspectrometer die is uitgerust met een electrospray ionenbron is dan ook voorzien van de mogelijkheid om fragmentionen te vormen. Nadat de ionen het verwarmde capillair zijn gepasseerd komen ze in een gedeelte van de massaspectrometer waar de druk nog relatief hoog (ongeveer 1×10^2 Pa) is. Hier kunnen de ionen door middel van een elektrisch veld versneld worden. De versnelde ionen botsen met gasmolekulen (voornamelijk stikstof) en zetten daarbij hun kinetische energie om in interne energie. De overmaat interne energie in de ionen kan vervolgens de vorming van fragmentionen veroorzaken. Deze techniek wordt Collision Induced Dissociation (CID) genoemd. Welke en hoeveel fragmentionen er gevormd worden is afhankelijk van de botsingsenergie en dus van de sterkte van het elektrisch veld. De sterkte van het elektrisch veld kan men zelf binnen bepaalde grenzen instellen.

In het vervolg van dit rapport zullen enkele CID-ESI-massaspectra besproken worden.

3. MATERIALEN EN METHODEN

3.1 De bepaling van de molmassa van enkele eiwitten

3.1.1 Materialen

3.1.1.1 Reagentia

Methanol HPLC grade, Baker

Azijnzuur (100%) p.a., Merck

Gedestilleerd water, gezuiverd over een Milli-Q zuiveringssysteem

Polypropyleenglycol 2000, Aldrich, cat. nr. 20,233-9

Natriumchloride p.a., Baker

3.1.1.2 Eiwitten

Alle eiwitten waren afkomstig van Sigma.

Trypsinogeen, cat. nr. T1143

Albumine, cat. nr. A7638

Myoglobine, cat. nr. M0630

3.1.1.3 Gelfiltratie

PD-10 kolom gevuld met Sephadex G-25M (Pharmacia, cat. nr. 17-0851-01)

3.1.2 Methoden

Alle metingen werden uitgevoerd met een Finnigan MAT 95 massaspectrometer die was voorzien van een Finnigan MAT ESI-2 ionenbron.

Trypsinogeen werd opgelost in een mengsel van water, methanol en azijnzuur (50:50:0,5 v/v/v). De concentratie trypsinogeen bedroeg $2,5 \times 10^{-6}$ M ($2,5 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Van albumine werd een oplossing in een mengsel van water, methanol en azijnzuur (50:50:1 v/v/v) gemaakt met een concentratie van $9,8 \times 10^{-6}$ M ($9,8 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Van myoglobine werd een oplossing gemaakt in water/methanol/azijnzuur (50/50/2 v/v/v) met een concentratie van 14×10^{-6} M

(14 pmol. μl^{-1}). Aan deze oplossing werd NaCl toegevoegd op een concentratieniveau van 1 mM.

Om de gelfiltratie ontzoutingsprocedure te testen, werd een oplossing van myoglobine gemaakt in water/methanol/azijnzuur (45:45:10 v/v/v) met een concentratie van 20×10^{-6} M (20 pmol. μl^{-1}) waaraan NaCl werd toegevoegd op een concentratieniveau van 0,1 molair. Een kolom gevuld met Sephadex G-25M werd gespoeld met 25 ml van een mengsel van water, methanol en azijnzuur (50:50:2 v/v/v). Vervolgens werd 2,5 ml van de eiwitoplossing op het kolommetje gebracht. Hierna werd het eiwit van het kolommetje geëluëerd met 3,5 ml water/methanol/azijnzuur (50:50:2 v/v/v). Deze gezuiverde oplossing werd geanalyseerd met behulp van ESI-MS. De gehele ontzoutingsprocedure werd vervolgens nog een keer herhaald met de gezuiverde eiwitoplossing.

De eiwitoplossingen werden met behulp van een Harvard syringepomp met een constant debiet van $2 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ in de ionenbron van de massaspectrometer gebracht. Er werden massaspectra opgenomen door het magneetveld van de massaspectrometer te scannen met een snelheid van $10 \text{ s} \cdot \text{decade}^{-1}$. De resolutie van de massaspectrometer bedroeg ongeveer 1000. Nadat de acquisitie beëindigd was, werd er een aantal massaspectra gesommeerd tot één nieuw massaspectrum dat werd gebruikt om de molmassa van het eiwit te bepalen.

Voor elke meting werd de m/z-schaal van de massaspectrometer gecalibreerd door een $4,8 \times 10^{-5}$ M oplossing van polypropyleenglycol 2000 in water/methanol (50:50 v/v), waaraan wat NaCl was toegevoegd (concentratie: 1×10^{-3} M), met een constant debiet van $2 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ in de ionenbron van de massaspectrometer te brengen. Uit het verschil tussen de theoretische m/z-waarde van de natriumadducten van polypropyleenglycol en de gemeten m/z-waarde kon de m/z-schaal gecalibreerd worden.

De molekuulmassa van een eiwit werd op twee manieren uit het ESI-massaspectrum berekend:

Methode 1.

Voor iedere piek in het massaspectrum werd de lading van de daarbij behorende ionen berekend. Uit de lading en de plaats van de piek in het massaspectrum (de m/z-waarde) kon vervolgens de molekuulmassa van het eiwit berekend worden. Door dit voor iedere piek te doen, werden een aantal waarden voor de molekuulmassa verkregen waardoor het mogelijk

was een standaarddeviatie te berekenen die een schatting is van de reproduceerbaarheid van de methode.

Methode 2.

Deze methode maakte gebruik van een computerprogramma dat het oorspronkelijke massaspectrum, waarin het detectorsignaal van de massaspectrometer als functie van de m/z-waarde was uitgezet, omzette in een spectrum waarin het detectorsignaal als functie van uitsluitend de massa was uitgezet. De molekuulmassa volgde direct uit het getransformeerde spectrum door te bepalen bij welke massa het detectorsignaal zijn maximum bereikte. Het valt buiten het bestek van dit rapport om het algoritme van deze methode, die ook wel deconvolutie genoemd wordt, te beschrijven (raadpleeg hiervoor referentie 15).

3.2 De bepaling van de molmassa van enkele synthetische peptiden

3.2.1 Materialen

3.2.1.1 Reagentia

Methanol HPLC grade, Baker

Azijnzuur (100%) p.a., Merck

Gedestilleerd water, gezuiverd over een Milli Q zuiveringssysteem

Polypropyleenglycol 2000, Aldrich, cat. nr. 20,233-9

Natriumchloride p.a., Baker

3.2.1.2 Peptiden

De peptiden werden gesynthetiseerd bij het laboratorium voor vaccinontwikkeling en immuniteits- mechanismen (LVM) in het kader van het project 'Ontwikkeling vaccin tegen meningococcon' (projectnummer: 343602). De peptiden werden in vaste vorm aangeleverd.

3.2.2 Methodes

Alle metingen werden uitgevoerd met een Finnigan MAT 95 massaspectrometer die was voorzien van een Finnigan MAT ESI-2 ionenbron.

De peptiden werden opgelost in een mengsel van water, methanol en azijnzuur (49,5:49,5:1 v/v/v). De oplossingen werden met behulp van een Harvard syringepomp met een constant debiet van $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ in de ionenbron van de massaspectrometer gevoerd. Er werden massaspectra opgenomen door het magneetveld van de massaspectrometer te scannen met een snelheid van $10 \text{ s}\cdot\text{decade}^{-1}$. De resolutie van de massaspectrometer bedroeg ongeveer 1200. Nadat de acquisitie beëindigd was werd er een aantal massaspectra gesommeerd tot één nieuw massaspectrum dat werd gebruikt om de molmassa van de peptiden te bepalen.

Voor aanvang van de metingen werd de m/z-schaal van de massaspectrometer gecalibreerd door een $4,8 \times 10^{-5} \text{ M}$ oplossing van polypropyleenglycol 2000 in water/methanol (50:50 v/v), waaraan wat NaCl was toegevoegd (concentratie: $1 \times 10^{-3} \text{ M}$), met een constant debiet van $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ in de ionenbron van de massaspectrometer te brengen. Uit het verschil tussen de theoretische m/z-waarde van de natriumadducten van polypropyleenglycol en de gemeten m/z-waarde kon de m/z-schaal gecalibreerd worden.

3.3 De bepaling van monolinuron in oppervlaktewater

3.3.1 Materialen

3.3.1.1 Reagentia

Acetonitril HPLC grade S, Rathburn

Gedestilleerd water, gezuiverd over een Milli Q zuiveringssysteem

3.3.1.2 Monstermateriaal

Oppervlaktewater. Het monstermateriaal was afkomstig van de afdeling bestrijdingsmiddelen van het laboratorium voor organisch-analytische chemie (LOC).

3.3.1.3 Chromatografiemateriaal

Fused silica capillair met inwendige diameter van 0,2 en 0,3 mm, Polymicro Technologies

Hypersil BDS C₁₈ HPLC-pakkingsmateriaal, Shandon

3.3.1.4 Apparatuur

Perkin Elmer 250 HPLC-pomp

Gynkotec 300 HPLC-pomp

ABI 759A UV-detector

Finnigan MAT 95 massaspectrometer uitgerust met een Finnigan MAT ESI-2 ionenbron

3.3.2 Methoden

De analyses werden uitgevoerd met behulp van een HPLC-kolomschakelsysteem (figuur 3, pag. 56) [14]. Het kolomschakelsysteem bestond uit een trapkolom die via een zespoortkraan verbonden was met een analytische kolom. De trapkolom was een fused silica capillair met een inwendige diameter van 0,2 mm dat was gevuld met een C₁₈ stationaire fase (10 µm deeltjes). De lengte van de pakking was 10 cm. De analytische kolom bestond uit een fused silica capillair met een inwendige diameter van 0,3 mm dat was gevuld met Hypersil BDS C₁₈ stationaire fase (3 µm deeltjes). De lengte van de pakking was 15 cm. Beide kolommen werden gemaakt bij de afdeling molekuulspectrometrie van het LOC.

Van de monsters werd met behulp van een injectiekraan 40 µl in het kolomschakelsysteem geïnjecteerd. De monstercomponenten werden vervolgens naar de trapkolom gevoerd. De mobiele fase voor de trapkolom bestond uit een mengsel van water en acetonitril in de volumeverhouding 9:1. Het debiet van de mobiele fase was 20 µl.min⁻¹. Vijf minuten na injectie werd de zespoortkraan omgeschakeld waardoor de trapkolom in tegengestelde richting werd doorspoeld met water/acetonitril (50:50 v/v). Het debiet was 3 µl.min⁻¹. De op de trapkolom vastgehouden componenten werden van deze kolom geëluëerd en naar de analytische kolom gevoerd waar de scheiding isocratisch (water/acetonitril 50:50 v/v) plaats vond.

De van de kolom eluerende verbindingen werden via een UV-detector naar de electrospray ionenbron van de massaspectrometer geleid. Door de massaspectrometer met een snelheid van 5 s.decade⁻¹ te scannen van m/z 100 tot 400 werden alle in de ionenbron gevormde ionen met een m/z tussen deze grenzen gedetecteerd. De resolutie van de massaspectrometer werd op een waarde van 1000 ingesteld.

3.4 De bepaling van een in microsomen gevormde metaboliet van naftaleen .

3.4.1 Materialen

3.4.1.1 Reagentia

Methanol HPLC grade, Baker

Gedestilleerd water, gezuiverd over een Milli-Q zuiveringssysteem

Azijnzuur (100%) p.a., Merck

3.4.1.2 Monstermateriaal

Extracten in water van microsomen geïncubeerd met naftaleen. Het monstermateriaal was afkomstig van het laboratorium voor toxicologie (TOX).

3.4.1.3 Chromatografiemateriaal

Fused silica capillair met inwendige diameter van 0,3 en 0,5 mm, Polymicro Technologies

Hypersil BDS C₁₈ HPLC-pakkingsmateriaal, Shandon

Waters Symmetry C₁₈ HPLC-kolom. Lengte: 15 cm. Inwendige diameter: 2,1 mm.

3.4.1.4 Apparatuur

Perkin Elmer 250 HPLC-pomp

Gynkotec 300 HPLC-pomp

Gynkotec 480 HPLC-pomp

ABI 759A UV-detector

Finnigan MAT 95 massaspectrometer uitgerust met een Finnigan MAT ESI-2 ionenbron

3.4.2 Methoden

Positieve ionen ESI.

De analyses werden uitgevoerd met behulp van een HPLC-kolomschakelsysteem (figuur 3, pag. 56) [14]. Het kolomschakelsysteem bestond uit een trapkolom die via een zespoortkraan verbonden was met een analytische kolom. De trapkolom was een fused silica capillair met

een inwendige diameter van 0,5 mm dat was gevuld met een C₁₈ stationaire fase (40 µm deeltjes). De lengte van de pakking was 3 cm. De analytische kolom bestond uit een fused silica capillair met een inwendige diameter van 0,3 mm dat was gevuld met Hypersil BDS C₁₈ stationaire fase (3 µm deeltjes). De lengte van de pakking was 15 cm. Beide kolommen werden bij de afdeling molekuulspectrometrie van het LOC gepakt.

De monsters werden twintig maal verdund met water. Van deze verdunningen werd met behulp van een injectiekraan 40 µl in het kolomschakelsysteem geïnjecteerd. Het monster werd naar de trapkolom gevoerd waar de monstercomponenten werden geconcentreerd. De mobiele fase voor de trapkolom was water en het debiet bedroeg 30 µl.min⁻¹. Ongeveer vijf minuten na de injectie werd de zespoortkraan omgeschakeld en werden de monstercomponenten in tegengestelde richting van de trapkolom geëluëerd en naar de analytische kolom gevoerd. De mobiele fase bestond uit 60% water in methanol. Het debiet van de mobiele fase bedroeg 2,5 µl.min⁻¹.

Na scheiding op de analytische kolom werden de monstercomponenten via een UV-detector naar de electrospray ionenbron van de massaspectrometer gevoerd. Na de UV-detector werd er via een T-stuk een mengsel van water, methanol en azijnzuur (50:50:0,5 v/v/v) met een debiet van 2 µl.min⁻¹ toegevoegd aan de mobiele fase.

Door de massaspectrometer met een snelheid van 5 s.decade⁻¹ te scannen van m/z 50 tot 500, werden alle in de ionenbron gevormde ionen met een m/z tussen deze grenzen gedetecteerd. De resolutie van de massaspectrometer bedroeg 1200.

Negatieve ionen ESI.

Van de monsters werd 50 µl op een Waters Symmetry C₁₈ HPLC-kolom geïnjecteerd. De monstercomponenten werden van elkaar gescheiden met behulp van een gradiënt van methanol in water. Er werden twee gradiëntprogramma's gebruikt:

a. water/methanol (9:1 v/v)

b. water/methanol (1:9 v/v)

Programma 1: 40% b (8 min.), in 12 min. naar 55% b, in 5 min. naar 100% b.

Programma 2: 0% b (15 min.), in 4 min. naar 40% b, gedurende 8 min. 40% b, in 12 min. naar 55% b, in 5 min. naar 100% b.

Het debiet was 150 µl.min⁻¹.

Via een UV-detector werd het eluens naar de ionenbron van de massaspectrometer gevoerd. Na de UV-detector werd het eluens met behulp van een T-stuk gesplitst zodat het debiet naar de massaspectrometer $40 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ bedroeg. Door de massaspectrometer met een snelheid van $5 \text{ s}\cdot\text{decade}^{-1}$ te scannen van m/z 100 tot 600, werden de van de kolom eluerende verbindingen gedetecteerd die onder ESI-condities negatieve ionen vormen met een m/z tussen deze grenzen. De resolutie van de massaspectrometer bedroeg 800.

3.5 De ontwikkeling van een LC-ESI-MS methode voor de bepaling van tylosine

3.5.1 Materialen

3.5.1.1 Reagentia

Tylosinetartraat, Sigma, cat. nr. T6134

Acetonitril HPLC grade S, Rathburn

Gedestilleerd water, gezuiverd over een Milli-Q zuiveringssysteem

Ammoniumacetaat, Gold Label, Aldrich

3.5.1.2 Chromatografiemateriaal

HPLC-kolommen gevuld met Waters Symmetry C_{18} stationaire fase. Lengte: 15 cm.

Inwendige diameter: 3,9 en 2,1 mm.

3.5.1.3 Apparatuur

Gynkotec 480 HPLC-pomp

Finnigan MAT 95 massaspectrometer uitgerust met een Finnigan MAT ESI-2 ionenbron

3.5.2 Methoden

Er werd een oplossing van tylosinetartraat in acetonitril bereid met een tylosineconcentratie van $0,443 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Deze oplossing werd gebruikt om verdunningen in water te maken met concentraties van 1 en $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Aangezien tylosine niet stabiel is in water, werden de verdunningen steeds vlak voor het begin van een analyse gemaakt.

Met behulp van een injectiekraan werd 20 μl van de tylosineoplossingen op de kolom gebracht. Als mobiele fase werd een oplossing van ammoniumacetaat in water/acetonitril (58:42 v/v) gebruikt. De ammoniumacetaat-concentratie bedroeg 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Er werden experimenten uitgevoerd met twee HPLC-kolommen gevuld met hetzelfde pakkingsmateriaal maar met verschillende inwendige diameter. Het debiet van de mobiele fase was 0,7 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (3,9 mm I.D. kolom) of 0,15 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (2,1 mm I.D. kolom).

Na de HPLC-kolom werd het eluens zodanig gesplitst dat het debiet naar de ESI-bron van de massaspectrometer 40 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ bedroeg. Door de magneet van de massaspectrometer te scannen bij een resolutie van 1000 werd het van de HPLC-kolom eluerende tylosine gedetecteerd.

4. RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.1 De bepaling van de molmassa van enkele eiwitten

De toepasbaarheid van ESI-MS voor de bepaling van de molekuulmassa van eiwitten is reeds eerder door ons onderzocht [16]. De molekuulmassa van de bij deze studie gebruikte eiwitten varieerde van ongeveer 5,7 tot 17 kDa. Om de mogelijkheden van ESI-MS in de eiwitanalyse verder te onderzoeken, werd van twee wat grotere, commercieel verkrijgbare, eiwitten getracht de molekuulmassa te bepalen

Eiwitmolekulen vormen in oplossing ionen doordat de basische aminozuren worden geprotoneerd. Het aantal protonen dat een eiwitmolekuul in een geladen vloeistofdruppeltje van de electrospray op een bepaald moment heeft opgenomen, is afhankelijk van de ladingsdichtheid op het oppervlak van het druppeltje op dat moment [17]. De druppeltjes veranderen op hun weg door de ionenbron voortdurend van grootte hetgeen een continu veranderende ladingsdichtheid tot gevolg heeft. Hierdoor verandert ook het aantal protonen dat een eiwitmolekuul heeft opgenomen. Al deze in verschillende mate geprotoneerde eiwitmolekulen kunnen door ionverdamping de druppeltjes verlaten. Aldus ontstaat er een verzameling gasfase eiwitionen waarvan de positieve lading een bepaald gebied bestrijkt. Dit resulteert in een zeer karakteristiek massaspectrum dat bestaat uit een aantal pieken waarvan de plaats in het spectrum bepaald wordt door de massa/ladingsverhouding (m/z) van het corresponderende ion:

$$m/z = \frac{M + z \cdot m_H}{z} \quad (4)$$

M = de molekuulmassa van het eiwit

m_H = de massa van een waterstofatoom

z = het aantal ladingen (protonen) dat het ion bevat.

Figuur 4 (pag. 57) toont het ESI-massaspectrum (som van 18 spectra) van trypsinogeen. Tijdens de acquisitie van de massaspectra werd 2,5 pmol trypsinogeen verbruikt. Zoals uit het massaspectrum blijkt, werden geprotoneerde molekuulionen gedetecteerd waarvan de lading,

uitgedrukt in aantal elementair ladingen, uiteen liep van 10+ tot 17+. De lading van een bij een bepaalde piek uit het massaspectrum behorend ion is op eenvoudige wijze te bepalen [16, pag. 7].

De molekuulmassa van het eiwit werd op twee manieren uit het ESI-massaspectrum berekend. Voor de berekening volgens methode 1 werden de zes pieken met de grootste intensiteit geselecteerd. Dit leverde zes waarden op voor de gemiddelde molekuulmassa van het eiwit. Het gemiddelde en de standaardafwijking van de zes berekende molekuulmassa's is respectievelijk 23979,7 dalton en 1,6 dalton (relatieve standaardafwijking: 67 ppm). De gemiddelde molekuulmassa van trypsinogeen bedraagt 23981,1. De afwijking tussen experimentele en theoretische waarde is -1,4 dalton (-58 ppm)

Voor de berekening volgens methode 2 werd het ESI-massaspectrum van trypsinogeen getransformeerd tot het in figuur 5 (pag. 58) getoonde spectrum waarin het detectorsignaal als functie van de massa is uitgezet. De gemiddelde molekuulmassa van trypsinogeen volgt direct uit dit spectrum door de centroid van de grootste piek te bepalen. Het resultaat was in dit geval gelijk aan 23980,2 hetgeen -0,9 dalton ofwel -37 ppm afwijkt van de theoretische waarde.

Het verschil tussen beide methoden is dat bij deconvolutie de bijdrage die iedere piek uit het massaspectrum aan het uiteindelijk resultaat levert, toeneemt naarmate de intensiteit van de piek toeneemt. De deconvolutiemethode levert een gewogen gemiddelde voor de molmassa op waarbij de intensiteiten van de pieken in het oorspronkelijke massaspectrum de weegfactoren zijn. Bij de andere methode tellen alle geselecteerde pieken evenveel mee.

Deze resultaten komen zowel wat nauwkeurigheid als reproduceerbaarheid betreft overeen met eerder behaalde resultaten [16].

In het ESI-massaspectrum van trypsinogeen komen ook pieken voor die niet kunnen worden toegeschreven aan geprotoneerde eiwitmolekulen. Het betreft hier adducten van zwavelzuur of fosforzuur. Uit de literatuur is bekend dat deze zuren aan geprotoneerde eiwitmolekulen kunnen binden [18]. Deze reagentia zijn waarschijnlijk door de fabrikant bij de zuivering van het eiwit gebruikt. Omdat de pieken van deze adducten voldoende gescheiden zijn van de geprotoneerde molekuulionpieken, storen ze de bepaling van de molmassa niet.

Figuur 6 (pag. 58) geeft het ESI-massaspectrum (som van 11 spectra) van albumine weer.

Tijdens de acquisitie van de spectra werd 9,5 pmol albumine verbruikt. Voor de berekening van de molekuulmassa van het eiwit volgens methode 1 werden 28 pieken uit het massaspectrum geselecteerd. De lading van de corresponderende ionen liep uiteen van 27+ tot en met 54+. Het gemiddelde van de 28 verkregen waarden voor de molmassa was 66566 dalton en de standaardafwijking 33 dalton (500 ppm). De molmassa van albumine bedraagt 66430. De experimenteel bepaalde molmassa wijkt +136 dalton ofwel +2050 ppm af van de theoretische waarde.

Het getransformeerde spectrum van albumine is weergegeven in figuur 7 (pag. 59). Er komt tussen 66 en 67 kDa duidelijk meer dan één piek voor. Dit wijst erop dat de geanalyseerde oplossing meer dan één eiwit bevatte. Als er vanuit wordt gegaan dat albumine de hoofdcomponent is, dan zou de centroid van de grootste piek in het getransformeerde spectrum overeen moeten komen met de molmassa van albumine. De centroid van deze piek is 66420 hetgeen -10 dalton ofwel -150 ppm afwijkt van de theoretische waarde.

De afwijking tussen de theoretische en gemeten molmassa van albumine is veel groter als de molmassa volgens methode 1 berekend wordt dan wanneer dit gebeurt door spectrumtransformatie. De oorzaak is gelegen in het feit dat de geanalyseerde oplossing meer dan één eiwit bevat. Ook in de literatuur is vermeld dat albumine vaak niet zuiver is [19]. De identiteit van de overige verbindingen, waarvan de molmassa groter is dan van albumine, is niet bekend. Mogelijk zijn dit adducten van albumine (met vetzuren, bilirubine, hexose, etc.) of gemodificeerde albumine-eiwitten (aminozuur-modificaties). De pieken in het massaspectrum van deze verbindingen zijn slechts gedeeltelijk van de albumine-pieken gescheiden. Ook nadat een aantal afzonderlijke massaspectra gesommeerd werd (zoals in figuur 6) was de signaal-ruis verhouding van dien aard dat het niet mogelijk was de afzonderlijke bijdragen van de componenten aan een piek van elkaar te onderscheiden. Wordt de molmassa volgens methode 1 bepaald dan zit er niets anders op dan voor iedere piek de centroid te bepalen op een zodanige wijze dat de gehele piek, inclusief de bijdrage van de overige eiwitten, wordt meegenomen. Dit leidt uiteraard tot een te hoge molmassa. Werd daarentegen de deconvolutiemethode gebruikt dan ontstond een spectrum met een veel betere signaal-ruis verhouding dan het oorspronkelijke massaspectrum. Er was een duidelijk onderscheid tussen de albumine-piek en de overige pieken waarneembaar zodat de molmassa

van albumine met een redelijke nauwkeurigheid bepaald kon worden.

In tabel 1 zijn de resultaten nog eens samengevat.

Tabel 1. Gemiddelde molekuulmassa's van trypsinogeen en albumine bepaald met behulp van ESI-MS en de relatieve afwijkingen van de werkelijke molekuulmassa's.

Eiwit	Gemiddelde molekuulmassa [Da]	Gemeten gemiddelde molekuulmassa [Da]		Relatieve afwijking [ppm]	
		methode 1	methode 2	methode 1	methode 2
Trypsinogeen	23981,1	23979,7 (± 1.6)	23980,2	-58	-37
Albumine	66430	66566 (± 33)	66420	2050	-150

Geprotoneerde eiwitmolekulen kunnen waterstofionen uitwisselen voor in de oplossing aanwezige natriumionen. De gevormde natriumadducten, die ook in de gasfase stabiel zijn, kunnen de bepaling van de molmassa verstoren. In figuur 8 (pag. 59) wordt het getransformeerde ESI-massaspectrum van het eiwit myoglobine dat een molmassa van 16950,5 dalton heeft, getoond. Het spectrum werd verkregen door een oplossing waarin naast het eiwit ook NaCl (concentratie: 1 mM) aanwezig was, in de ionenbron van de massaspectrometer te brengen. De grootste piek in het spectrum is ontstaan door transformatie van de geprotoneerde molekuulionen uit het oorspronkelijke spectrum. De overige pieken in het spectrum zijn afkomstig van natriumadducten ($[M+Na]$, $[M+2Na]$, etc.). In dit geval zijn de natriumadducten nog gescheiden van de geprotoneerde molekuulionen en kan de molmassa van het eiwit redelijk nauwkeurig bepaald worden. Als de massa van het eiwit echter toeneemt wordt deze scheiding steeds minder totdat bij een bepaalde massa de $[M+zH]^{z+}$ -ionen niet meer gescheiden worden van de $[M+(z-1)H+Na]^{z+}$ -ionen. Deze ionen vormen één piek die is opgebouwd uit de isotopiepieken van beide soorten ionen. Als dergelijke pieken worden gebruikt om de molmassa te bepalen wordt een waarde gevonden die hoger is dan de werkelijke molmassa van het eiwit, ongeacht of methode 1 of 2 wordt gebruikt. Het verhogen van de resolutie van de massaspectrometer helpt niet omdat de isotopieclusters van beide soorten ionen door elkaar heen lopen. De enige remedie is het ontzouten van de eiwitoplossing.

Gelfiltratie is een eenvoudige methode om eiwitoplossingen te ontzouten. Om te controleren

of met behulp van gelfiltratie de concentratie natriumionen voldoende kon worden verlaagd, werd een NaCl bevattende oplossing van myoglobine ontzout met behulp van een Sephadex kolom. De NaCl concentratie van de oplossing bedroeg 0,1 molair. Nadat de oplossing was ontzout, resulteerde het in figuur 9 (pag. 60) getoonde getransformeerde spectrum. Het spectrum bevat nog wel een $[M+Na]$ -piek maar deze is van geringe intensiteit. Uit vergelijking van de figuren 8 en 9 kan de conclusie getrokken worden dat de concentratie natriumionen in de ontzoute oplossingen aanzienlijk lager is dan 1 mM. Om de concentratie natriumionen nog verder te verlagen doorliep het monster nogmaals de ontzoutingsprocedure met als resultaat het in figuur 10 (pag. 60) getoonde spectrum. De intensiteit van de natriumadduct-piek is nog verder gedaald. Een bijkomend voordeel is dat de gevoeligheid van ESI-MS voor het eiwit toeneemt ten gevolge van de ontzouting. Een nadeel van de methode is dat de eiwitoplossing door de gelfiltratie met een factor van ongeveer 1,5 verdund wordt. De met behulp van methode 2 berekende molmassa bedroeg na één keer ontzouten 16953,1 hetgeen +153 ppm afwijkt van de theoretische waarde. Nadat de eiwitoplossing tweemaal ontzout was, werd het resultaat beter. De gemeten molmassa bedroeg 16950,7 dalton, een afwijking van +12 ppm.

Uit deze resultaten blijkt dat het mogelijk is om met gelfiltratie de concentratie van natriumionen (en ook van andere anorganische ionen) te verlagen tot een voor ESI-MS aanvaardbaar niveau.

4.2 De bepaling van de molmassa van enkele synthetische peptiden.

De molmassa van twee peptiden, die beide een cyclisch gedeelte bezaten, werd bepaald ter verificatie van de identiteit. De peptiden werden gesynthetiseerd ten behoeve van de ontwikkeling van een vaccin tegen meningococcon. De gemiddelde molekuulmassa van de peptiden zou gelijk moeten zijn aan 4626,3 en 4952,7. Gebruikelijk is dat de molekuulmassa van dit soort peptiden bepaald wordt met behulp van fast atom bombardment (FAB) massaspectrometrie. In dit geval leverde FAB-MS echter niet het gewenste resultaat. In de FAB-massaspectra was bij de verwachte molekuulmassa van de peptiden slechts een nauwelijks van de ruis te onderscheiden signaal aanwezig.

Er werd daarom besloten om ESI-MS te gebruiken ter bepaling van de molekuulmassa. De

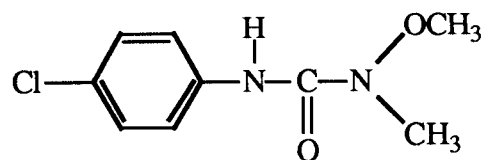
figuren 11 en 12 (pag. 61) tonen de ESI-massaspectra van de peptiden. De massaspectra bevatten voornamelijk pieken die afkomstig zijn van geprotoneerde molekuulionen van de peptiden. Behalve de m/z-waarde is ook de lading van deze geprotoneerde molekuulionen boven de pieken weergegeven. De kleinste van de twee peptiden bevat 6 basische aminozuren. Uit het massaspectrum blijkt dat er geprotoneerde molekuulionen werden gevormd met een lading van ten hoogste 6+, hetgeen overeenkomt met het aantal beschikbare protoneringsplaatsen in het molecuul. Uit het tweede peptide, dat 8 basische aminozuren bezit, werden geprotoneerde molekuulionen gevormd met een lading van ten hoogste 8+.

Met behulp van een computerprogramma werden de ESI-massaspectra getransformeerd tot de in de figuren 13 en 14 (pag. 62) weergegeven spectra. Door de centroid van de meest intensieve piek in beide spectra te bepalen, werd de gemiddelde molekuulmassa van beide peptiden berekend. De isotopiepieken zijn bij de gebruikte massaspectrometer resolutie niet van elkaar gescheiden maar vormen één enkele piek. De centroid van zo'n piek komt overeen met de gemiddelde molekuulmassa van het peptide.

De experimenteel bepaalde gemiddelde molekuulmassa's van de peptiden bedroegen 4626,4 en 4952,3. De afwijking van de theoretische molekuulmassa bedraagt daarmee +0,1 dalton (+ 22 ppm) en -0,4 dalton (-81 ppm). Deze afwijkingen vallen binnen de geschatte nauwkeurigheid van de methode van ± 100 ppm [16]. De resultaten vormen een sterke aanwijzing dat de synthese van de peptiden succesvol is verlopen. Uit de resultaten blijkt tevens dat ESI-MS een bruikbare analysetechniek kan zijn voor peptiden die voor FAB-MS niet geschikt zijn.

4.3 De bepaling van monolinuron in oppervlaktewater

Het bestrijdingsmiddel monolinuron (figuur 15, pag 41) heeft zure nog basische eigenschappen en is dus als neutraal molecuul in oplossing aanwezig. Als een standaardoplossing van monolinuron in water/acetonitril (50:50 v/v) in de electrospray-ionenbron van de massaspectrometer wordt gebracht dan resulteert het in figuur 16 (pag. 63) weergegeven massaspectrum. De pieken bij m/z 215 en 217 zijn afkomstig van geprotoneerde molekuulionen van monolinuron (217 is de ^{37}Cl -isotopiepiek). Ondanks dat monolinuron niet basisch is, vormt het onder electrospray omstandigheden toch stabiele gasfase ionen. Zoals



Figuur 15. Molekuulformule van monolinuron. Molekuulmassa: 214.

reeds is vermeld bij de beschrijving van de ESI-theorie, kunnen sommige polaire verbindingen ook al zijn ze niet basisch, in de geladen vloeistofdruppeltjes van de electrospray toch positieve ionen vormen door een proton op te nemen. Dit is te danken aan de overmaat aan positieve lading in de vloeistofdruppeltjes. Monolinuron blijkt geen adducten met natrium of kalium te vormen.

Bij de afdeling bestrijdingsmiddelen van het LOC is in het kader van het project 'Inspectie-onderzoek water/drinkwater' (projectnummer: 731011) een analysemethode ontwikkeld voor de bepaling van monolinuron in water. De methode is gebaseerd op een HPLC-kolomstelsel met UV-detectie. Een aantal oppervlaktewatermonsters veroorzaakten een respons van de UV-detector bij de retentietijd van monolinuron. Er werd verzocht deze resultaten te bevestigen met behulp van HPLC-ESI-MS.

Figuur 17 (pag. 63) toont het resultaat van een HPLC-ESI-MS analyse van een standaardoplossing van monolinuron. De concentratie monolinuron was $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (geïnjecteerde hoeveelheid: 2 ng). In figuur 17 is de respons van de detector van de massaspectrometer die veroorzaakt wordt door ionen met een m/z van 215, uitgezet als functie van de analysetijd. De piek bij 11 minuten en 48 seconden in dit zogenaamde ionchromatogram is toe te schrijven aan monolinuron. Vanwege wettelijke normen ten aanzien van de concentraties bestrijdingsmiddelen in water, is het noodzakelijk dat een analysemethode voor de bepaling van deze verbindingen een detectiegrens heeft die lager is dan $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (concentratie analyt in het water). In figuur 18 (pag. 64) is het resultaat te zien van de HPLC-ESI-MS analyse van leidingwater waaraan monolinuron was toegevoegd op een concentratieniveau van $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$. De piek bij een retentietijd van 11:37 is afkomstig van monolinuron. Hieruit blijkt dat de gewenste detectiegrens werd gehaald. Gezien de signaal/ruisverhouding kan worden gesteld dat het gebruik van microbore HPLC-kolommen in dit geval beslist noodzakelijk is om een voldoende lage detectiegrens te

bereiken.

In de geanalyseerde monsters kon met ESI-MS geen monolinuron aangetoond worden. Op basis van de HPLC-UV-methode werd voor deze monsters een concentratie monolinuron van ongeveer $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ berekend. Gezien de detectiegrens van de HPLC-ESI-MS methode zoals die voor leidingwater behaald werd, zou monolinuron in deze monsters aan te tonen moeten zijn. Bij gebruik van ESI-MS moet men er echter op bedacht zijn dat de detectiegrens voor een analyt in een eenvoudige matrix zoals een standaardoplossing of leidingwater, veel lager kan zijn dan de detectiegrens voor dezelfde analyt in een gecompliceerde matrix. De gevoeligheid van ESI-MS voor een bepaalde analyt is behalve van de moleculaire eigenschappen van de analyt (base/zuur, aantal en aard van de heteroatomen, grootte van het molecuul) ook afhankelijk van de samenstelling van de vloeistof waarin de analyt zich bevindt op het moment dat de ionenbron van de massaspectrometer wordt bereikt. Van de overmaat aan positieve lading in de vloeistofdruppeltjes, kan slechts een zeer beperkt deel in de vorm van ionen in de gasfase en daarmee in de massaspectrometer terecht komen. In de druppeltjes kan er een competitie tussen diverse molekulen ontstaan om de beschikbare positieve lading (voornamelijk aanwezig in de vorm van H_3O^+ -ionen) en plaatsen aan het oppervlak van de druppeltjes. Molekulen met de grootste protonaffiniteit zullen de meeste H^+ -ionen aan zich binden en de meeste kans maken uit de druppeltjes te ontsnappen. Monolinuron is geen basische verbinding. Slechts indien er zich in de vloeistof geen verbindingen bevinden die basischer zijn dan monolinuron, zal deze verbinding voldoende lading kunnen binden en met een redelijke gevoeligheid door ESI-MS gedetecteerd worden. Als er tezamen met monolinuron andere basischer verbindingen van de kolom elueren dan zal de respons van de analyt sterk onderdrukt worden. Daarnaast kunnen ook verbindingen die onder ESI-condities geen ionen vormen een storende invloed hebben als ze in relatief hoge concentraties aanwezig zijn. Als de geladen druppeltjes op hun weg door de ionenbron vloeistof verliezen neemt hun volume af en de concentratie van in deze druppeltjes aanwezige verbindingen toe. Bevatten de druppeltjes niet-vluchtige verbindingen in relatief hoge concentraties dan verliezen de druppeltjes op een gegeven moment de eigenschappen van een vloeistoffase. De verdamping van de resterende oplosmiddelmolekulen stopt nagenoeg. Als dit op een te vroeg tijdstip in het proces gebeurt, bereiken de druppeltjes nooit

een omvang die klein genoeg is om het ionverdampingsproces op gang te brengen. In de vloeistof aanwezige analyten worden niet of met zeer geringe gevoeligheid gedetecteerd.

Om te controleren of er matrixeffecten optraden, werd aan één van de monsters een geringe hoeveelheid van een standaardoplossing van monolinuron toegevoegd. De hoeveelheid toegevoegde standaard werd zodanig gekozen dat de concentratie monolinuron na toevoeging gelijk was aan $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ mits het oorspronkelijke monster geen monolinuron bevatte. In dit verrijkte monster kon met HPLC-ESI-MS géén monolinuron worden aangetoond.

Er werd daarom besloten om één van de monsters verder op te zuiveren. Bij de afdeling bestrijdingsmiddelen van het LOC werd een monster met behulp van een HPLC-kolomschakelsysteem gezuiverd. Vervolgens werd er een HPLC-ESI-MS analyse van deze HPLC- fractie uitgevoerd. In het monster werd geen monolinuron aangetroffen. Om te controleren of het monster voldoende opgezuiverd was, werd er aan $100 \mu\text{l}$ van de HPLC-fractie $10 \mu\text{l}$ van een standaardoplossing van monolinuron met een concentratie van $250 \text{pg}.\mu\text{l}^{-1}$ toegevoegd. De concentratie analyt komt dan overeen met een concentratie van $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ in het oorspronkelijke monster. Het geringe volume van de toegevoegde standaardoplossing verdunde de HPLC-fractie nauwelijks zodat de concentratie van eventueel aanwezige storende componenten slechts weinig afnam. Figuur 19 (pag. 64) toont het resultaat van de HPLC-ESI-MS analyse van dit monster. De aanwezigheid van monolinuron werd aangetoond door de respons op m/z-waarde 215 bij de retentietijd van monolinuron. Het monster was dus voldoende opgezuiverd. Dit resultaat toont aan dat de monsterzuivering een belangrijke stap is bij gebruik van HPLC-ESI-MS analyses.

Het analyseresultaat kan tot twee conclusies leiden:

1. Het monster bevat geen monolinuron.
2. De concentratie monolinuron in het monster is aanzienlijk lager dan $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$.

4.4 De bepaling van een in microsomen gevormde metaboliet van naftaleen

Bij het laboratorium voor toxicologie wordt in het kader van het project 'Ontwikkeling en Evaluatie Biomarkers' (projectnummer: 623830) onderzoek verricht naar het metabolisme van polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's). Er wordt een HPLC-UV methode gebruikt om de metabolieten te bepalen van polycyclische aromatische koolwaterstoffen, die

gevormd zijn na incubatie van microsomen. Uit naftaleen bleek 1-naftol en het 1,4-diol of 1,4-dion van naftaleen gevormd te worden. Naast de pieken van deze metabolieten kwam in het HPLC-chromatogram een piek voor van een verbinding, waarschijnlijk een metaboliet, die niet geïdentificeerd kon worden met HPLC-UV. Er is geprobeerd om met behulp van HPLC-ESI-MS de identiteit van deze metaboliet te achterhalen.

Niet elke verbinding die met HPLC-UV bepaald kan worden, is geschikt voor HPLC-ESI-MS analyse. Het is afhankelijk van de moleculaire eigenschappen van een verbinding of HPLC-ESI-MS een doeltreffende analysetechniek is. PAK's worden door hun apolaire karakter niet door ESI-MS gedetecteerd. Slechts indien er polaire groepen in de molekulen van PAK's voorkomen, zouden er ionen gevormd kunnen worden.

In eerste instantie werd de massaspectrometer zodanig ingesteld dat er positieve ionen gevormd en gedetecteerd werden. Om de kans op ionisatie te vergroten, werd na de HPLC-kolom een mengsel van water, methanol en azijnzuur toegevoegd aan de mobiele fase. Azijnzuur zorgt voor een toename van de lading van de druppeltjes in de electrospray hetgeen de vorming van ionen uit niet-basische, polaire verbindingen, bevordert.

Het ESI-massaspectrum van de naftaleen metaboliet (figuur 20, pag. 65) wijst op een molekuulmassa van 144. Door de toevoeging van azijnzuur is de overmaat aan positieve lading in de druppeltjes voornamelijk in de vorm van H_3O^+ -ionen aanwezig. Onder deze omstandigheden worden er geprotoneerde molekuulionen gevormd en vrijwel geen adductionen. De piek bij m/z 145 is dus waarschijnlijk afkomstig van een MH^+ -ion. Als er vanuit gegaan wordt dat de naftaleen ringstructuur intact is gebleven, dan is het niet mogelijk een structuur te bedenken die voldoet aan een molekuulmassa van 144 met uitzondering van 1 of 2-naftol. Op basis van retentietijd kan echter de conclusie worden getrokken dat de onbekende verbinding niet 1 of 2-naftol kan zijn.

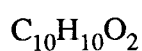
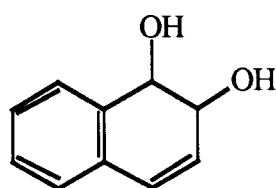
Om meer informatie te krijgen over de structuur van de metaboliet werd een tweede HPLC-ESI-MS analyse uitgevoerd met toepassing van CID. Het CID-ESI-massaspectrum is weergegeven in figuur 21 (pag. 65). Er ontstonden fragmentionen bij m/z 117 en 127. Als de piek bij m/z 145 het MH^+ -ion vertegenwoordigt, kunnen de fragmentionen hieruit ontstaan zijn door verlies van H_2O en CO hetgeen erop wijst dat het molekuul een hydroxygroep bevat.

Aangezien het vermoeden bestond dat de onbekende metaboliet tot de groep der hydroxy-PAK's behoorde, hetgeen zwak zure verbindingen zijn, en ook niet uit te sluiten was dat het een glucuronide- of sulfaatconjugaat was, werd besloten om analyses onder negatieve ionen ESI-condities uit te voeren. In het monster konden met behulp van negatieve ionen electrospray ionisatie twee verbindingen worden gedetecteerd. Eén van deze verbindingen was 1-naftol. Het ESI-massaspectrum van de tweede verbinding, waarvan de retentietijd overeenkwam met de retentietijd van de piek van de onbekende metaboliet in het UV-chromatogram, wordt getoond in figuur 22 (pag. 66). In het spectrum komen slechts twee pieken voor: bij m/z 197 en 199. Uit de intensiteitsverhouding van deze pieken blijkt dat de ionen één chlooratoom bevatten. Matig tot sterke zuren vormen onder ESI-condities negatieve ionen door een proton af te splitsen: er ontstaan gedeprotoneerde molekuulionen ($[M-H]^-$ -ionen). Bij zwak zure verbindingen is het afhankelijk van de samenstelling van het HPLC-eluens welke ionen er gevormd worden. Als het eluens geen anionen bevat worden er $[M-H]^-$ -ionen gevormd. Bevat het eluens daarentegen anionen zoals Cl^- en CH_3COO^- , dan worden er veelal adductionen gevormd waarbij het anion niet-covalent aan het analytmolekuul is gebonden. Er ontstaan $[M+Cl]^-$ en $[M+CH_3COO]^-$ -ionen. Ook in het geval van de onbekende metaboliet worden er waarschijnlijk adductionen gevormd, namelijk $[M+Cl]^-$ -ionen. De molekuulmassa van de verbinding zou dan gelijk moeten zijn aan 162. De bron van de Cl^- -ionen is het zoutzuur dat aan de monsters was toegevoegd.

Om te controleren of de veronderstelling over de vorming van chlooradductionen juist was, werd er een tweede analyse van het monster uitgevoerd met een gewijzigd HPLC gradiëntprogramma. Door de kolom gedurende 15 minuten na de injectie van het monster met water/methanol (9:1 v/v) te spoelen en pas daarna de gradiënt te starten, werd getracht de concentratie chloorionen in het eluens op het moment waarop de onbekende verbinding van de kolom elueert, te verlagen. Het resultaat van deze analyse wordt in figuur 23 (pag. 66) getoond. Het ESI-massaspectrum bevat nog steeds de chlooradductionen (m/z 197 en 199) maar bevat tevens pieken bij 207 en 221. Als er vanuit wordt gegaan dat de molekuulmassa van de onbekende metaboliet 162 is, dan kunnen deze pieken worden toegeschreven aan formaatadducten ($[M+HCOO]^-$) en acetaatadducten ($[M+CH_3COO]^-$). Door aanpassing van het gradiëntprogramma is de concentratie van de chloorionen in het eluens gedaald. Hierdoor

neemt de vorming van chlooradducten af terwijl tegelijkertijd de kans op de vorming van andere ionen toeneemt.

Als volgende stap in het onderzoek werd het monster bij 80 °C gehydrolyseerd. Na hydrolyse bleek de piek van de onbekende metaboliet zowel uit het UV-chromatogram als uit het LC-MS chromatogram verdwenen te zijn. Daarnaast bleek de concentratie 1-naftol toe te nemen en werd er 2-naftol in het monster aangetoond. De onbekende metaboliet wordt dus door hydrolyse omgezet in 1 en 2-naftol. Het ESI-massaspectrum van het in het gehydrolyseerde monster aanwezige 1-naftol is weergegeven in figuur 24 (pag. 67). In het spectrum komen de volgende ionen voor: $[M-H]^-$ (m/z 143), $[M+Cl]^-$ (m/z 179 en 181), $[M+HCOO]^-$ (m/z 189) en $[M+CH_3COO]^-$ (m/z 203). Om de invloed van de samenstelling van het HPLC-eluens op de ESI-massaspectra van hydroxy-PAK's te onderzoeken, werd er een standaardoplossing van 1-naftol geanalyseerd. Figuur 25 (pag. 67) toont het resultaat: in het massaspectrum komen $[M-H]^-$ (m/z 143), $[M+OCH_3]^-$ (m/z 175), $[M+HCOO]^-$ (m/z 189) en $[M+CH_3COO]^-$ (m/z 203) ionen voor. Omdat in de standaardoplossing geen chloor aanwezig was, komen in dit spectrum, in tegenstelling tot het in figuur 24 getoonde spectrum, geen chlooradducten voor. De invloed van de eluenssamenstelling op de ESI-massaspectra is hiermee aangetoond. Combinatie van de diverse analyseresultaten leidde tot een conclusie over de identiteit van de onbekende metaboliet. De volgende structuur werd voorgesteld:



Figuur 26. Mogelijke structuurformule van de naftaleen metaboliet.

De positie van de hydroxylgroepen aan de ring, kan op basis van de ESI-massaspectra niet bepaald worden. Uit het feit dat uit de metaboliet door hydrolyse 1 en 2-naftol gevormd wordt, kan echter geconcludeerd worden dat de posities 1 en 2 de meest waarschijnlijke zijn. Synthese van de voorgestelde verbinding, analyse van het syntheseproduct en vergelijking

voor de bepaling van tylosine in rundvlees [20]. Bij deze methode werd gebruik gemaakt van een particle beam LC-MS interface.

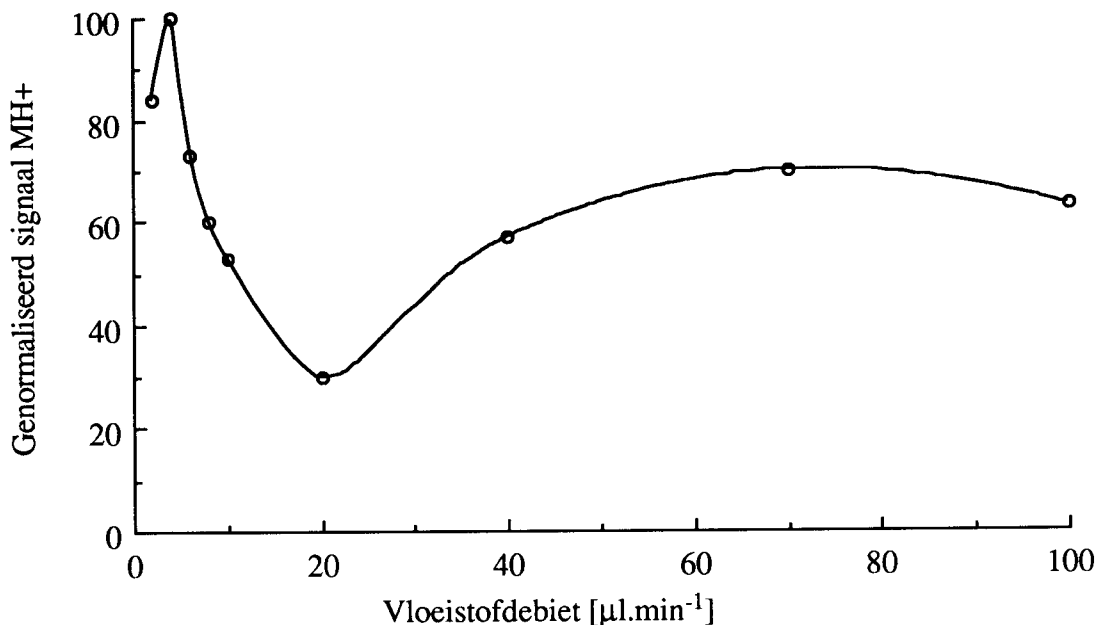
Gezien het basische karakter ($pK_a \sim 9$) is tylosine een geschikte verbinding voor ESI. In figuur 28 (pag. 68) is het ESI-massaspectrum van tylosine weergegeven. Het massaspectrum bevat een piek bij m/z 916 die afkomstig is van het MH^+ -ion van tylosine. Daarnaast komt er een piek bij m/z 772 voor die waarschijnlijk afkomstig is van een thermisch ontledingsproduct dat is ontstaan in het verwarmde capillair van de electrospray ionenbron (structuur: zie figuur 34, pag. 53).

Het basische karakter van tylosine zorgt voor een goede ESI-MS respons maar tegelijkertijd voor problemen in de HPLC-kolom. Reversed-phase HPLC maakt vrijwel altijd gebruik van kolommen die gepakt zijn met een aan een silica drager gebonden stationaire fase. Basische verbindingen vertonen een interactie met silanolgroepen van het dragermateriaal in de HPLC-kolom. Dit veroorzaakt asymmetrische pieken in de chromatogrammen en soms irreversibele adsorptie van analyten in de kolom. Interactie tussen analyten en silanolgroepen wordt vaak tegengegaan door toevoeging van amines (zoals triëthylamine) aan de mobiele fase. Ook amines binden aan de silanolgroepen waardoor deze niet meer beschikbaar zijn voor interactie met de analyten. Toevoeging van amines aan de mobiele fase is echter geen optie als ESI-MS als detectiemethode wordt gebruikt (zie theorie). Het gebruik van relatief geconcentreerde buffers als mobiele fase is ook een mogelijkheid om de adsorptie van basische verbindingen aan de silica drager tegen te gaan maar is in combinatie met ESI niet mogelijk. Er zijn een aantal HPLC-methoden ontwikkeld voor de bepaling van macrolide antibiotica waarbij kolommen gebruikt werden die gepakt waren met polymeren. Het voordeel van deze kolommen is het ontbreken van silica en de stabiliteit van het pakkingsmateriaal bij een pH van 1 tot 14. Basische verbindingen zijn in de regel beter van elkaar te scheiden als de pH van de mobiele fase groter is dan 7. Silica dragermateriaal is echter niet stabiel boven pH 7. Het nadeel van kolommen met polymeren als pakkingsmateriaal is het lagere schotelgetal in vergelijking met kolommen gevuld met silica. Bovendien zorgt een basische mobiele fase voor een afname van de gevoeligheid van ESI-MS voor basische verbindingen.

In samenwerking met ARO is gezocht naar een HPLC-kolom met een aan silica dragermateriaal gebonden stationaire fase waar tylosine als symmetrische piek vanaf elueert

in een mobiele fase die geen amines, ionpaar reagentia of geconcentreerde buffers bevat. De door de firma Waters gemaakte HPLC-kolommen gevuld met Symmetry C₁₈ pakkingsmateriaal zijn hierbij als beste uit de bus gekomen. Bij de fabricage van deze kolommen wordt uitgegaan van zeer zuiver silica dat bovendien, nadat de C₁₈-fase eraan is gebonden, zeer zorgvuldig wordt gedeactiveerd. De stationaire fase bevat hierdoor nog nauwelijks vrije silanolgroepen en is dan ook zeer geschikt voor basische analyten. De Waters Symmetry C₁₈ kolommen zijn verkrijgbaar in de interne diameters 3,9 en 2,1 mm. Het optimale debiet voor deze kolommen is ongeveer 0,7 en 0,2 ml.min⁻¹. Het gehele eluens zou naar de massaspectrometer geleid kunnen worden maar dit heeft verscheidene nadelen. Zoals reeds eerder vermeld is ESI een concentratiegevoelig proces. Door het eluens na de HPLC-kolom te splitsen zodat slechts een deel naar de massaspectrometer gaat, wordt de concentratie van een bepaalde analyt in het eluens niet beïnvloed. Toch zal de detectorrespons die een analyt veroorzaakt, veranderen als de splitverhouding verandert, ondanks dat de analytconcentratie hierdoor niet wijzigt. Dit wordt veroorzaakt doordat de gevoeligheid van ESI-MS voor een bepaalde analyt afhankelijk is van het debiet van de in de electrospray ionenbron te vernevelen vloeistof. Het verband tussen ESI-MS gevoeligheid en vloeistofdebiet werd onderzocht voor tylosine. Er werd een oplossing van tylosine in water/acetonitril (1:1 v/v) met een concentratie van 1 µg.ml⁻¹ gemaakt. Met behulp van een syringepomp werd deze oplossing in de ionenbron van de massaspectrometer gebracht. Het van het MH⁺-ion van tylosine (m/z 916) afkomstige signaal werd bij een vloeistofdebiet van 2 tot 100 µl.min⁻¹ gemeten. Het verband tussen het debiet en de ESI-MS gevoeligheid is weergegeven in figuur 29 (pag. 50). Bij een debiet van 2 tot 10 µl.min⁻¹ werd geen gebruik gemaakt van het sheath gas. Bij een debiet vanaf 20 µl.min⁻¹ bleek het niet mogelijk te zijn om uitsluitend door middel van een elektrisch veld een stabiele spray te vormen en was het gebruik van sheath gas (stikstof) noodzakelijk. De gevoeligheid bereikt z'n maximum bij een debiet van rond de 4 µl.min⁻¹. De afname in gevoeligheid bij hogere debieten is ongeveer 40%. De dip in de gevoeligheid bij een debiet van 20 µl.min⁻¹ is te verklaren. Het debiet is hier te groot voor een goede vloeistofverstuiving uitsluitend door middel van een elektrisch veld maar te klein voor een goede pneumatische verstuiving. Het gevonden verband is waarschijnlijk typerend voor analyten die éénwaardig geladen ionen vormen. Naar

verwachting zal de gevoeligheid van ESI-MS voor verbindingen die meervoudig geladen ionen vormen, veel sterker afnemen bij een toenemend vloeistofdebiet. De gevoeligheid bij debieten van meer dan $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ is niet gemeten. Uit de literatuur [5] is echter bekend dat de gevoeligheid afneemt bij toenemend debiet.



Figuur 29. Het signaal van het MH^+ -ion van tylosine als functie van het vloeistofdebiet.

Ondanks dat het gehele HPLC-eluens naar de massaspectrometer geleid kan worden, heeft het uit oogpunt van gevoeligheid en vervuiling van de massaspectrometer voordelen dit niet te doen en de vloeistofstroom na de kolom te splitsen. Er werd voor gekozen om van het eluens, zowel bij gebruik van de 3,9 als de 2,1 mm kolom, $40 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ naar de massaspectrometer te leiden. Welliswaar is de gevoeligheid bij dit debiet niet maximaal maar doordat er gebruik gemaakt kan worden van sheath gas wordt de stabiliteit van de electrospray veel minder beïnvloed door veranderingen in het HPLC-eluens dan indien de spray uitsluitend door een elektrisch veld gecreëerd wordt. De robuustheid van een LC-ESI-MS methode is met gebruik van sheath gas duidelijk beter dan zonder gebruik van sheath gas. In figuur 30 (pag. 68) is het resultaat weergegeven van de HPLC-ESI-MS analyse van een tylosinestandaard. Het signaal van het MH^+ -ion van tylosine is hier als functie van de analysetijd weergegeven. De tylosineconcentratie in de oplossing bedroeg $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en er

werd 20 ng op de HPLC-kolom gebracht. De diameter van de kolom was 3,9 mm. Het was noodzakelijk om ammoniumacetaat aan de mobiele fase toe te voegen. Zonder ammoniumacetaat varieerde de retentietijd van tylosine en was de piekvorm enigszins asymmetrisch. Een ammonium-acetaatconcentratie van 1 mmol.L⁻¹ was voldoende om deze effecten teniet te doen. Zoals verwacht nam de gevoeligheid af door de toevoeging van ammoniumacetaat aan de mobiele fase. Deze afname bedroeg ongeveer een factor drie.

Aangezien er door de Europese Gemeenschap een maximaal toegestane concentratie voor tylosine in vlees en organen is vastgesteld, volstaat de ontwikkeling van een kwalitatieve analysemethode niet. Uitgangspunt is de ontwikkeling van een kwantitatieve HPLC-ESI-MS methode. Om een indruk over de herhaalbaarheid van de methode te krijgen, werd er een tylosineoplossing met een concentratie van 1 µg.ml⁻¹ verspreid over twee dagen acht keer geanalyseerd. Het oppervlak van de tylosinepiek in het chromatogram werd na iedere analyse bepaald. De relatieve standaardafwijking van de acht verkregen waarden voor het piekoppervlak was 11%. Bij HPLC-ESI-MS wordt de variatie in het piekoppervlak vrijwel volledig bepaald door signaalfluctuaties ten gevolge van het ionisatieproces. Zeer snelle signaalfluctuaties zijn inherent aan het ESI-proces. Een verbetering van de herhaalbaarheid zal slechts bereikt kunnen worden door gebruik te maken van een isotoop gelabelde interne standaard. In dat geval kan de verhouding van de piekoppervlakken van analyt en interne standaard gebruikt worden voor kwantificeringsdoeleinden.

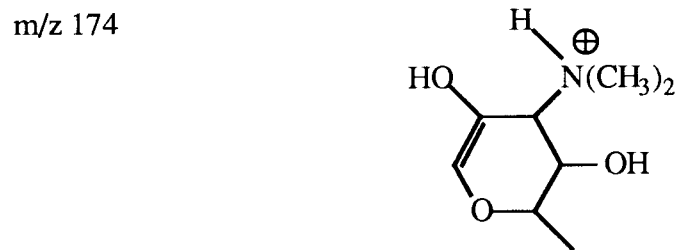
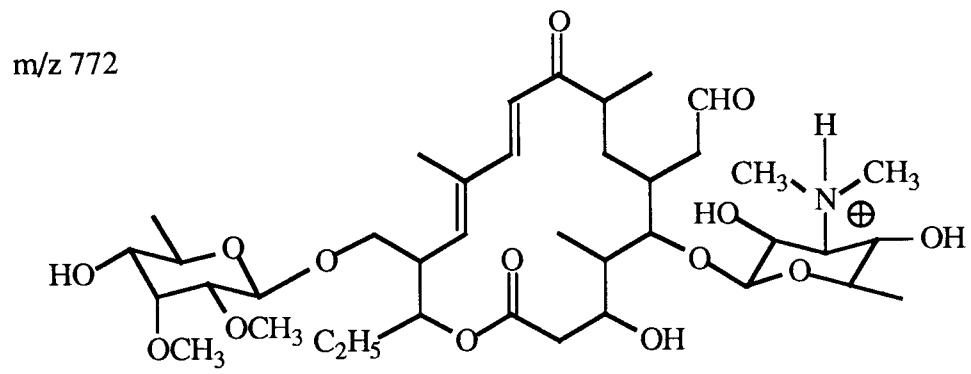
Om een indruk te krijgen over de detectiegrens van de methode, werd een standaardoplossing van tylosine met een concentratie van 0,1 µg.ml⁻¹ geanalyseerd. Er werd 20 µl van deze oplossing geïnjecteerd. Figuur 31 (pag. 69) toont het resultaat. De detectiegrens, hetgeen de hoeveelheid tylosine is die geïnjecteerd moet worden om een signaal te verkrijgen van drie maal de standaardafwijking van de ruis, bedraagt ongeveer 200 pg. De detectiegrens die is bepaald door analyse van standaarden is echter vaak een optimistische schatting van de detectiegrens die voor monsters behaald zal worden. De gevoeligheid van ESI-MS is behalve van de eigenschappen van de analyt ook sterk afhankelijk van de matrix waarin de analyt zich bevindt. Gelijktijdig met de analyt van de HPLC-kolom eluerende verbindingen kunnen het analytsignaal sterk onderdrukken. De detectiegrens zal dan ook bepaald moeten worden door aan een blanco monster tylosine toe te voegen en dit monster vervolgens te analyseren.

Doordat ESI-MS een concentratiegevoelige detectietechniek is, zal een verkleining van de inwendige diameter van de HPLC-kolom tot gevoeligheidswinst leiden. Het resultaat van een analyse van een tylosineoplossing met een concentratie van $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ waarbij een HPLC-kolom met een diameter van 2,1 mm werd gebruikt, is weergegeven in figuur 32 (pag. 69). De hoogte van de tylosinepiek is met een factor 3,5 toegenomen ten opzichte van het resultaat met de 3,9 mm kolom (figuur 30). Dit is iets minder dan de verwachte toename van 4,7 (de verhouding tussen de gebruikte debieten: 0,7/0,15).

Als een analyse onder 'normale' omstandigheden wordt uitgevoerd is een uitspraak over aanwezigheid of afwezigheid van tylosine in een monster slechts gebaseerd op het al of niet voorkomen van een piek in het MH^+ -ionchromatogram (m/z 916) bij de retentietijd van tylosine. Om meer zekerheid over de juistheid van een identificatie te verkrijgen kan een analyse ook onder CID-condities uitgevoerd worden. Het CID-ESI-massaspectrum (figuur 33, pag. 70) van tylosine bevat naast de piek van het MH^+ -ion, twee pieken die afkomstig zijn van fragmentionen. De structuur van deze fragmentionen is weergegeven in figuur 34 (pag. 53). De relatieve intensiteit van de pieken is afhankelijk van de botsingsenergie die naar believen veranderd kan worden.

Figuur 35 (pag. 70) geeft het resultaat weer van een onder CID-omstandigheden uitgevoerde HPLC-ESI-MS analyse van een standaardoplossing van tylosine met een concentratie van $4.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. De gevoeligheid is ten gevolge van het CID-proces met ongeveer een factor tien afgenomen.

Tot noch toe zijn uitsluitend analyses van standaarden uitgevoerd. Het vervolg van het onderzoek zal bestaan uit de analyse van monsters ter bepaling van de nauwkeurigheid, reproduceerbaarheid en detectiegrens van de methode.

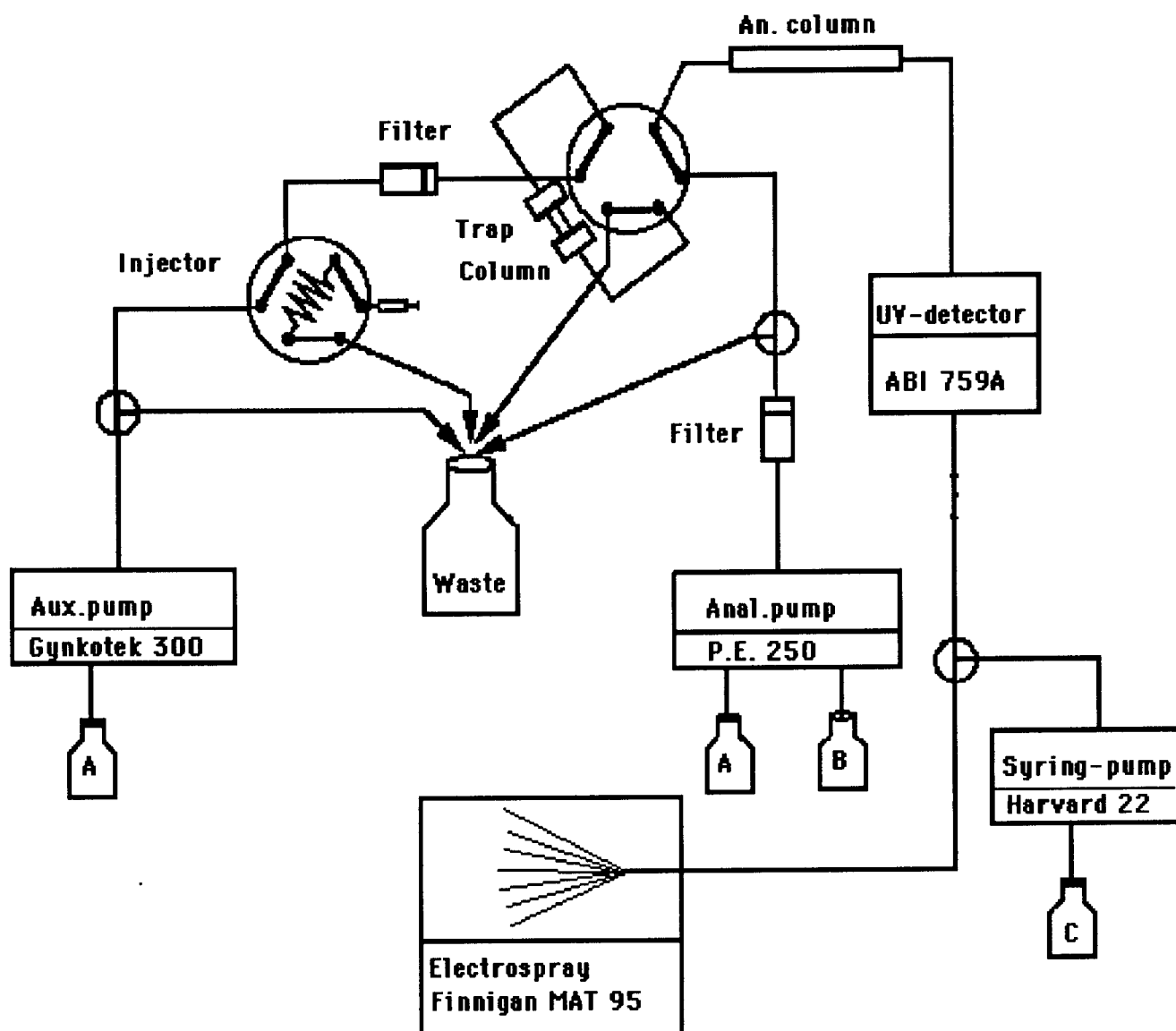


Figuur 34. Fragmentionen van tylosine gevormd onder CID-ESI-condities.

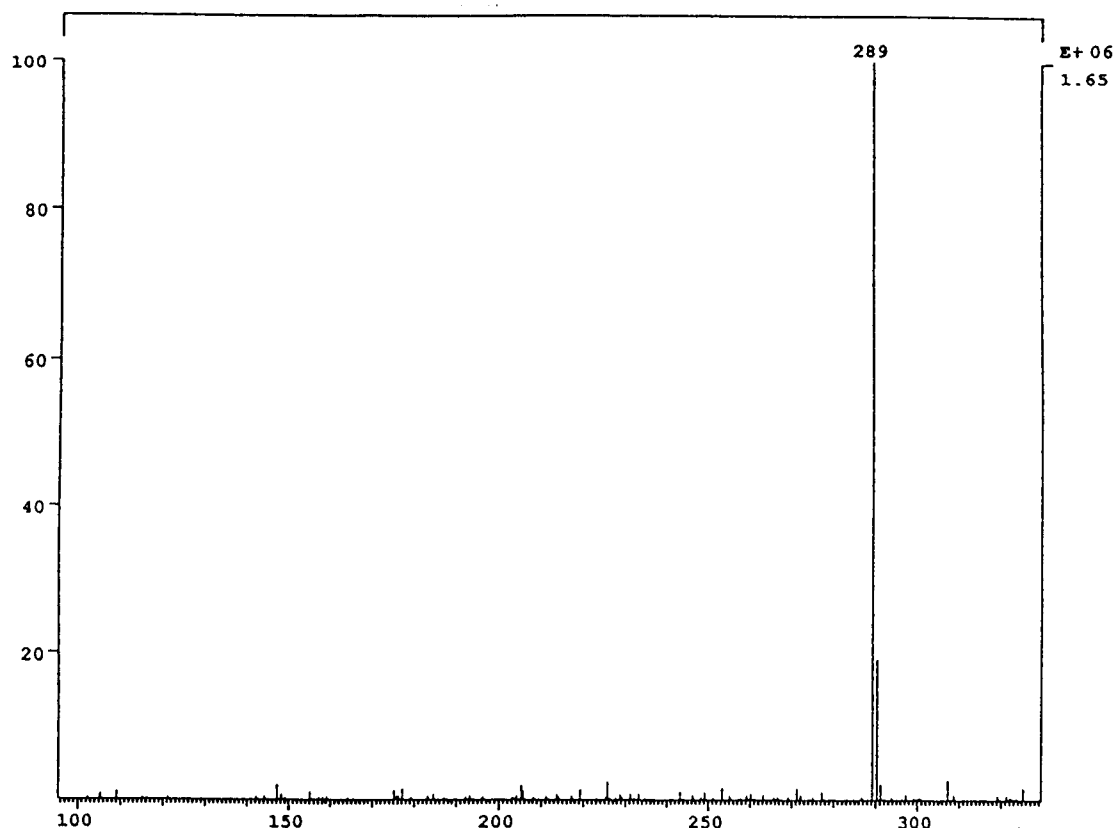
5. LITERATUUR

1. Yamashita, M., Fenn, J.B.
J. Phys. Chem. 1984, 88, 4451-4459.
2. Aleksandrov, M.L., Gall, L.N., Krasnov, V.N., Nikolaev, V.I., Pavlenko, V.A., Shkurov, V.A. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 1984; 277: 379-383.
3. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M.
Science 1989; 246: 64-70.
4. Smith, R.D., Loo, J.A., Ogorzalek, R.R., Busman, M., Udseth, H.R.
Mass Spectrom. Rev. 1991; 10: 359-451.
5. Kebarle, P., Tang, L.
Anal. Chem. 1993; 65: 972A-986A.
6. Iribarne, J.V., Thomson, B.A.
J. Chem. Phys. 1976; 64: 2287-2294.
7. Chowdhury, S.K., Katta, V., Chait, B.T.
J. Am. Chem. Soc. 1990; 112: 9013-9015.
8. Hayati, I., Bailey, A.I., Tadros, T.F.
J. Colloid Interface Sci. 1987; 117: 205-221.
9. Tang, L., Kebarle, P.
Anal. Chem. 1991; 63: 2709-2715.
10. Apffel, A., Fischer, S., Goldberg, G., Kuhlmann, F.
Proc. 42nd ASMS Conf. Mass Spectrom. 1994; pp. 772.
11. Bruins, A.P.J.
Chim. Phys. 1993; 90: 1335-1344.
12. Tang, L., Kebarle, P.
Anal. Chem. 1993; 65: 3654-3668.
13. Niessen, W.M.A., Greef, J. van der
Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: Principles and Applications, 1992,
Marcel Dekker, Inc, New York, USA, pp.22.

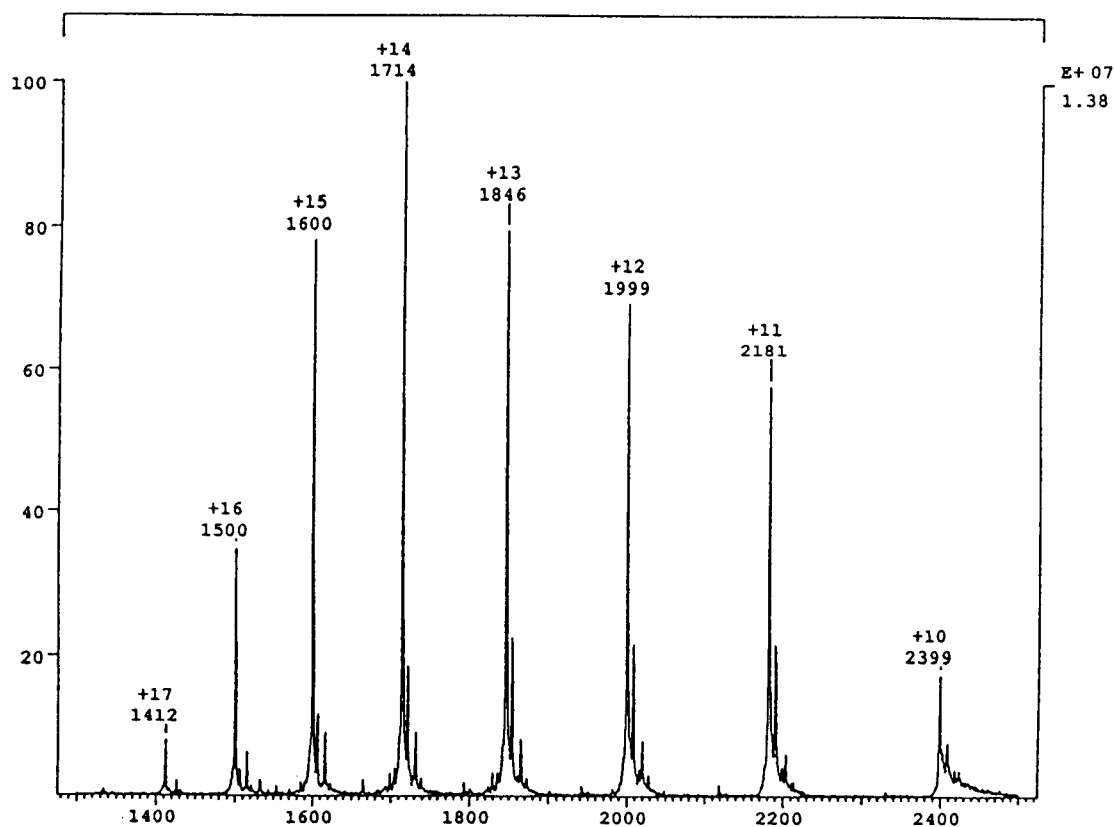
14. Pacual, J.A., Hove, G.J. ten, Visser, T., Jong, A.P.J.M. de
aangeboden voor publikatie in J. Microcol. Sept. 1996.
15. Mann, M., Meng, C.K., Fenn, J.B.
Anal. Chem. 1989; 61: 1702-1708.
16. Heeft, E. van der; Jong, A.P.J.M. de
RIVM-rapport nr. 502501011, oktober 1993.
17. Fenn, J.B.
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1993; 4: 524-535.
18. Chowdhury, S.K., Katta, V., Beavis, R.C., Chait, B.T.
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1990; 1:382-388.
19. Feng, R., Konishi, Y., Bell, A.W.
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1991; 2: 387-401.
20. Delepine, B., Sanders, P.
Analyst 1994, 194: 2717-2721.



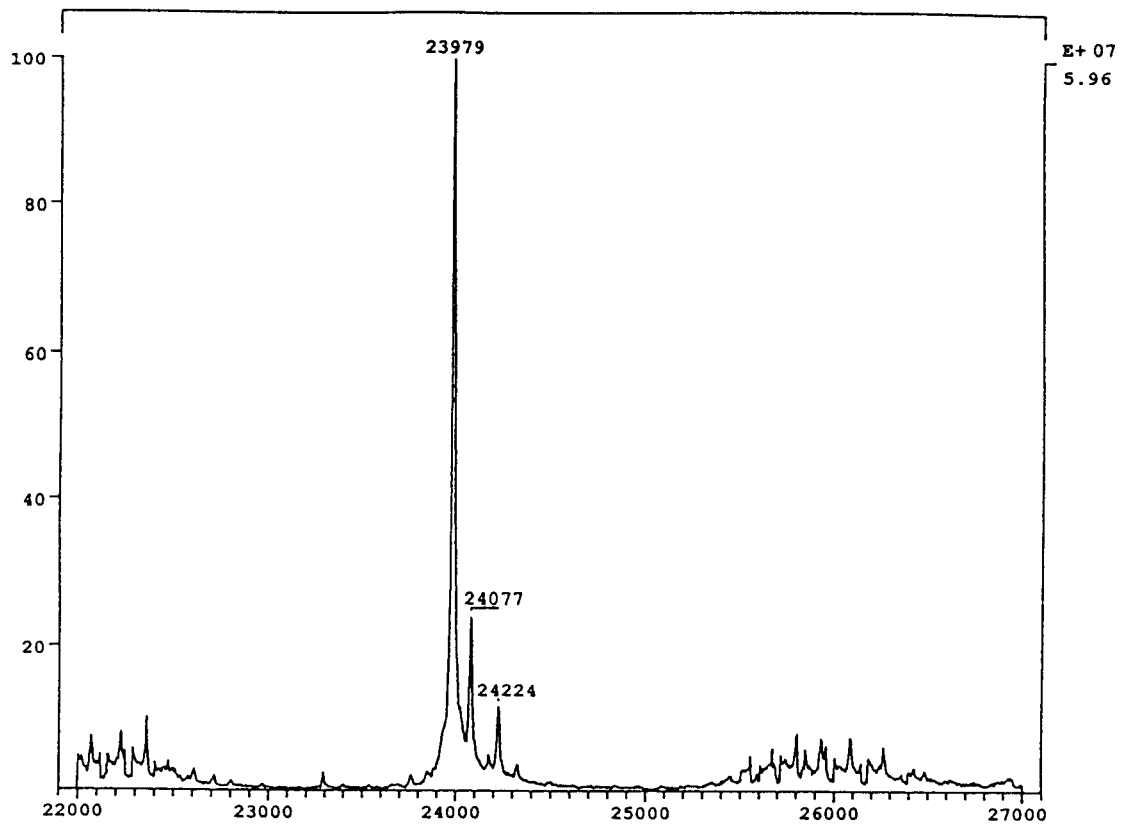
Figuur 3. Schematische weergave van het kolomschakelsysteem.



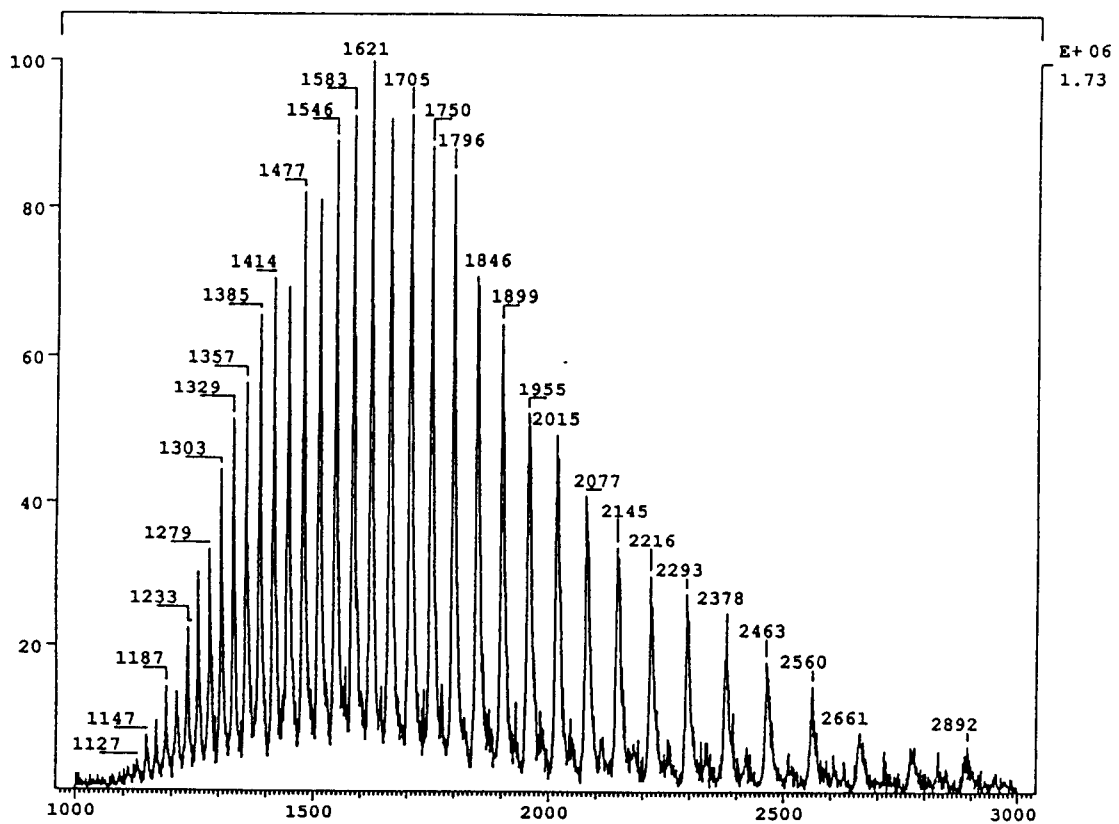
Figuur 2. ESI-massaspectrum van testosteron. Oplosmiddel: water/acetonitril (1:1 v/v).
Molekuulmassa testosteron: 288.



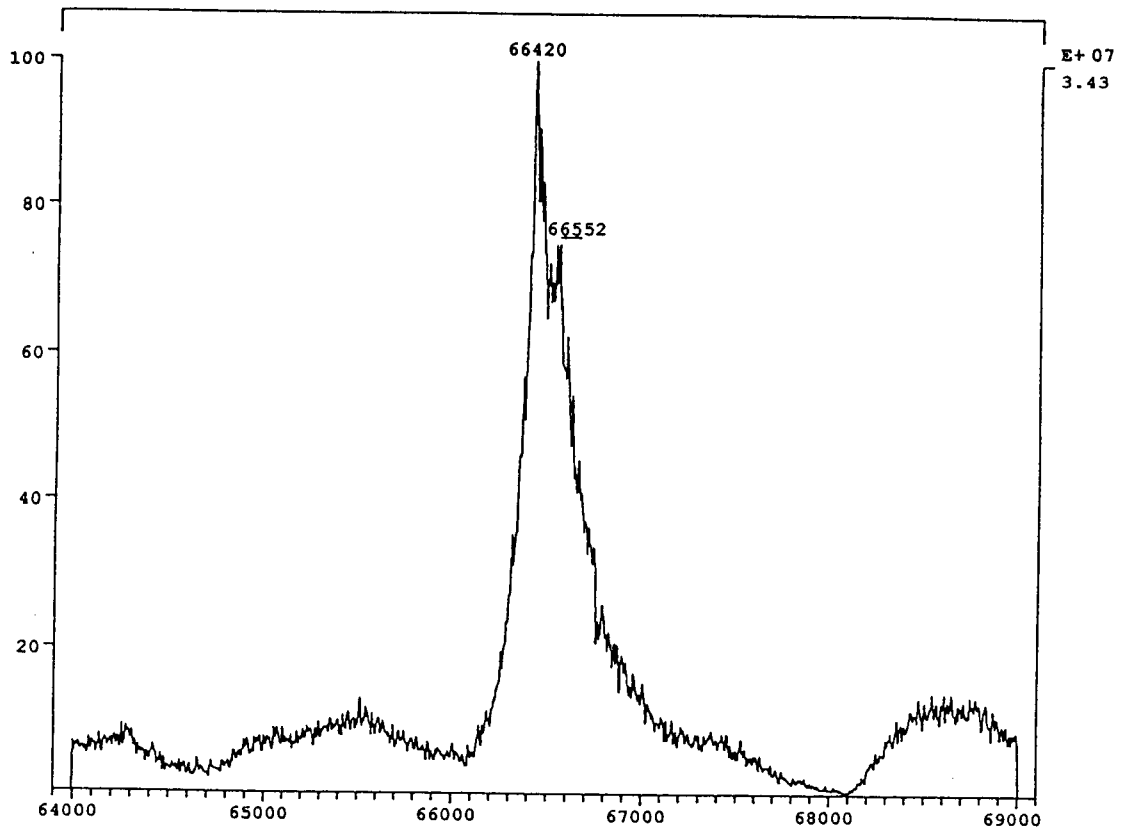
Figuur 4. ESI-massaspectrum (som van 18 spectra) van 2,5 pmol trypsinogeen.
Massa/ladingsverhouding en lading van de ionen is boven de pieken aangegeven.



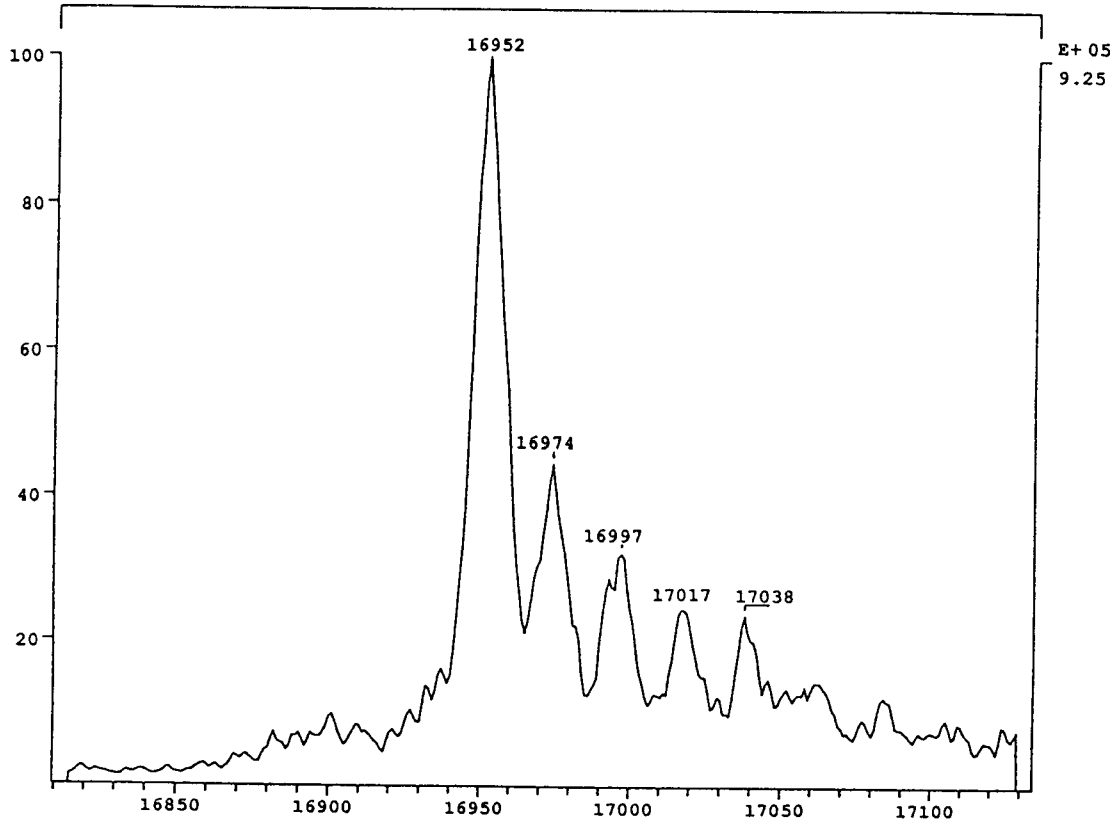
Figuur 5. Getransformeerd ESI-spectrum van 2,5 pmol trypsinogeen.



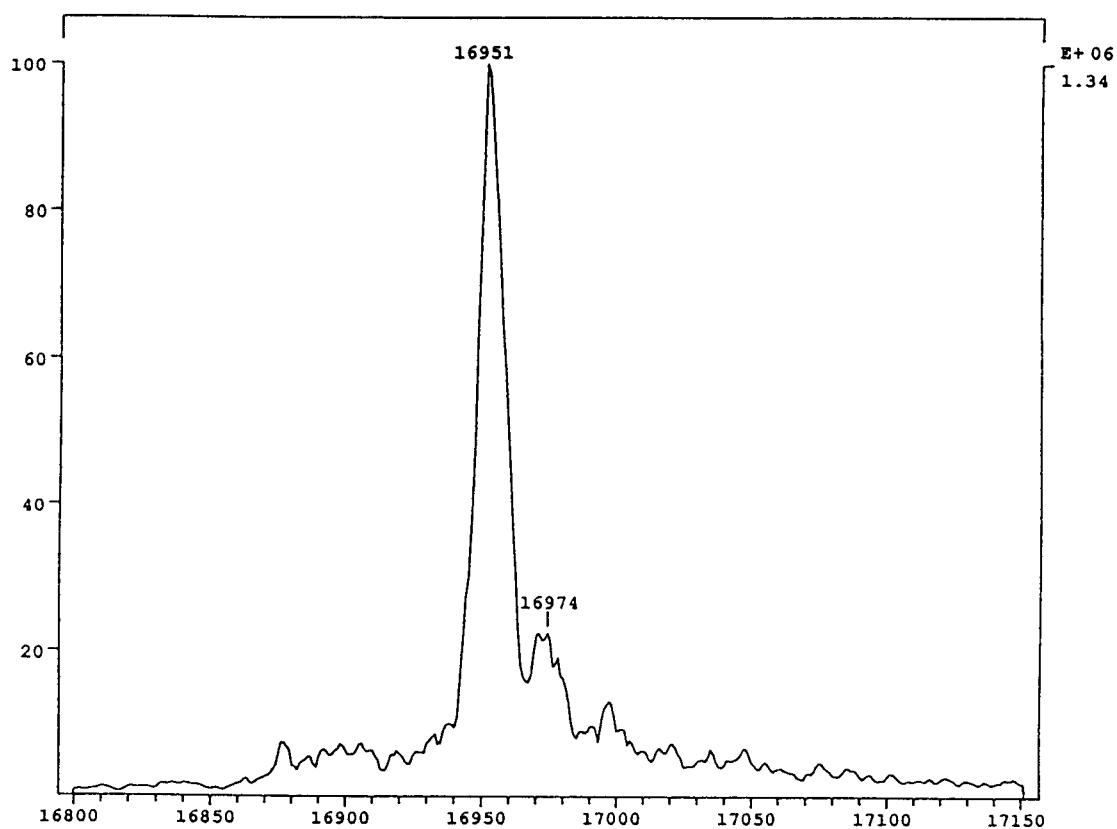
Figuur 6. ESI-massaspectrum (som van 11 spectra) van 9,5 pmol albumine.



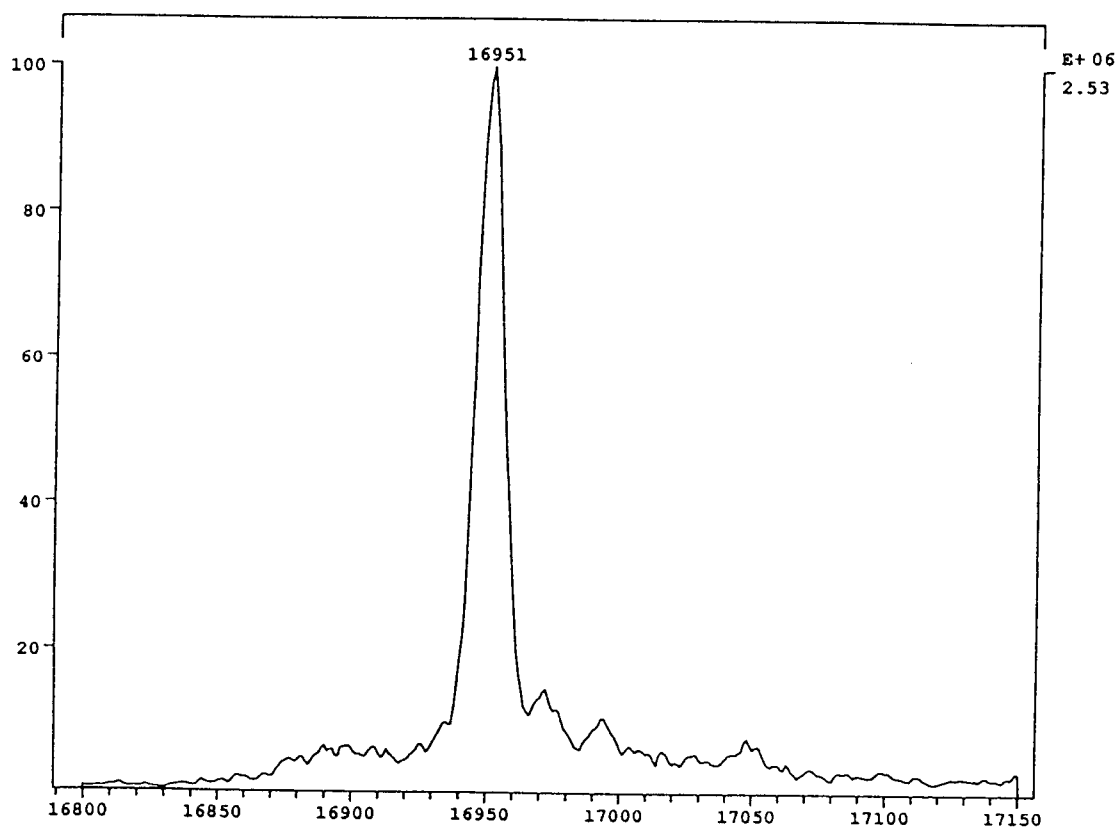
Figuur 7. Getransformeerd ESI-spectrum van 9,5 pmol albumine.



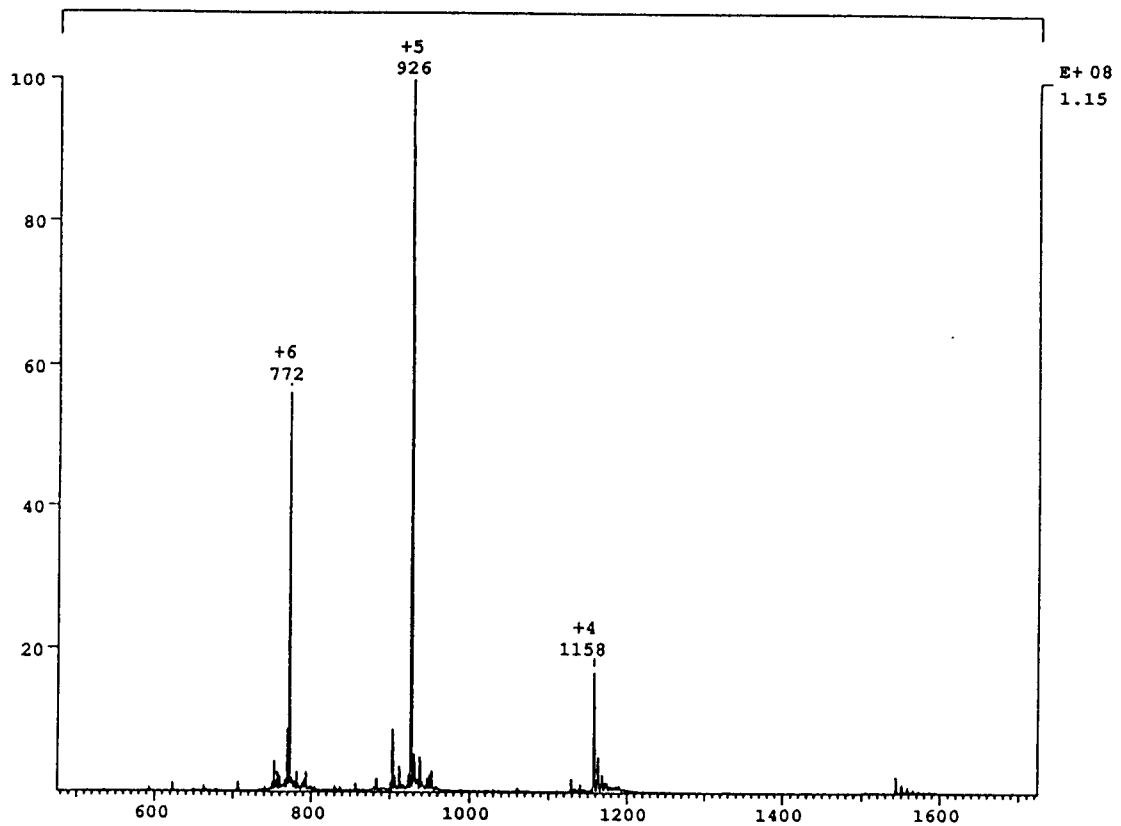
Figuur 8. Getransformeerd ESI-spectrum van 13 pmol myoglobine. In de eiwitoplossing was NaCl aanwezig op een concentratieniveau van 1 mmol.L⁻¹.



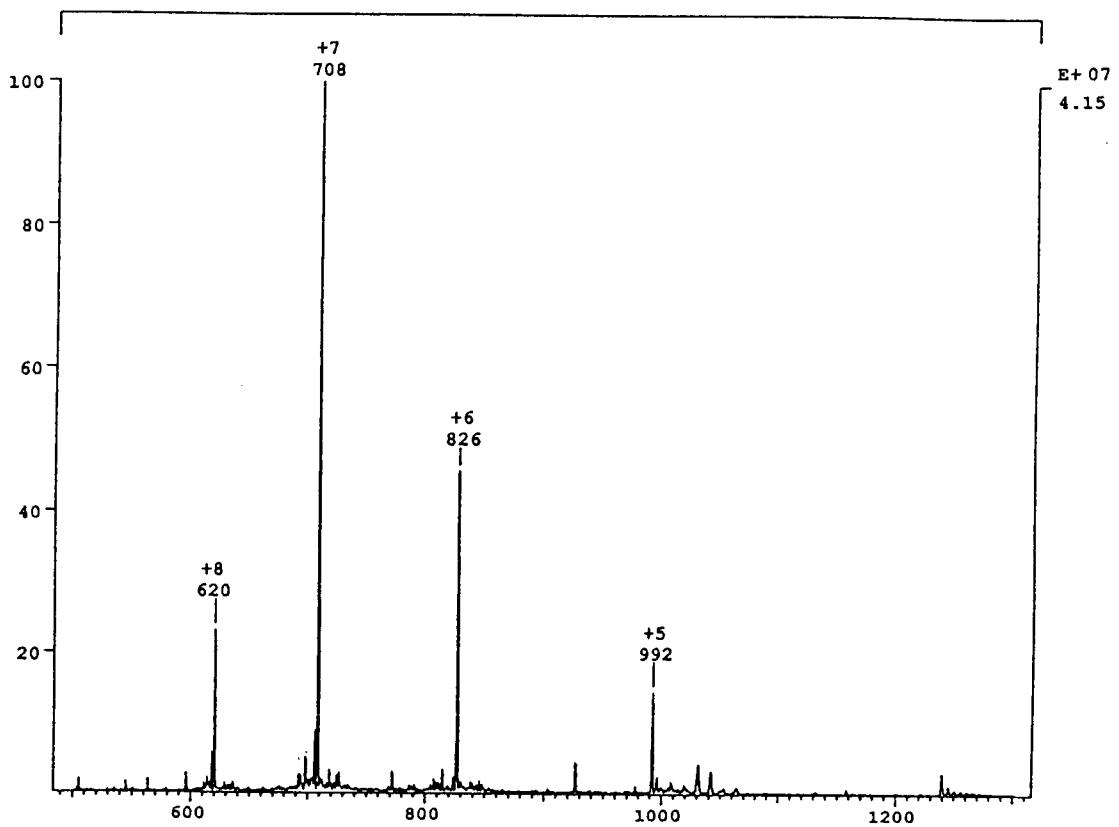
Figuur 9. Getransformeerd ESI-spectrum van 14 pmol myoglobine verkregen na éénmaal ontzouten van een oplossing met 0,1 M NaCl.



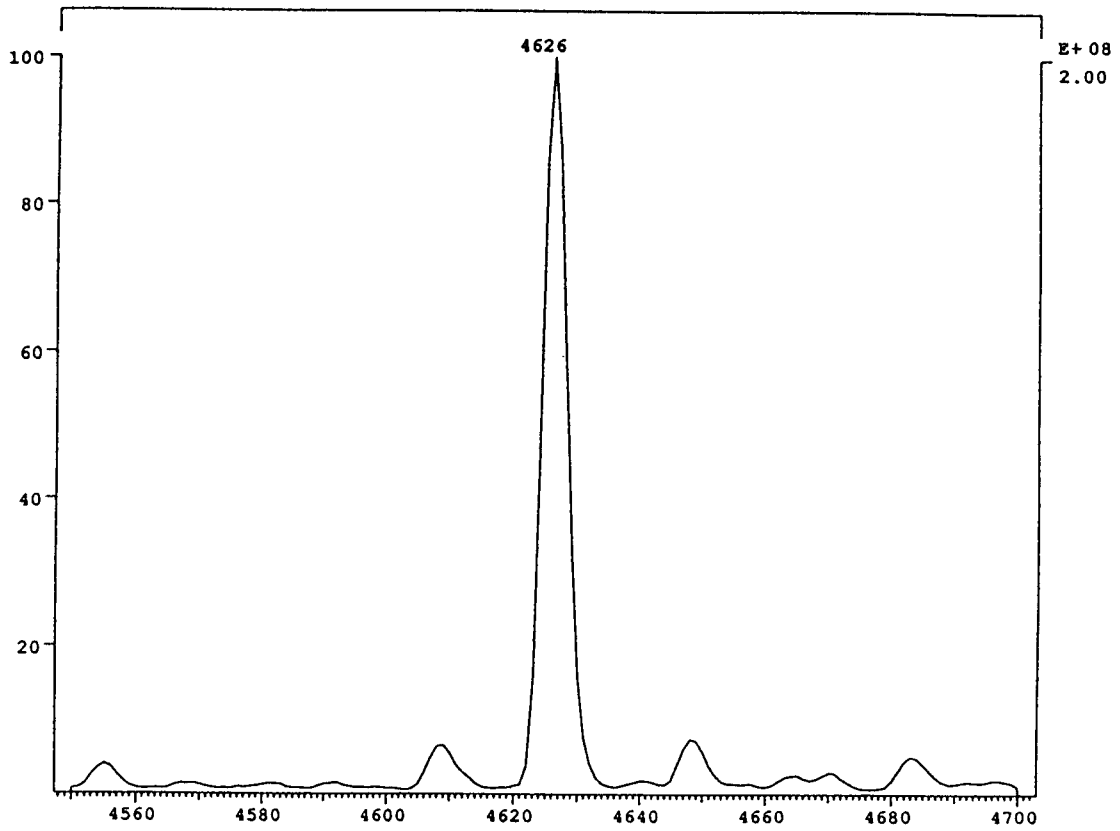
Figuur 10. Getransformeerd ESI-spectrum van 10 pmol myoglobine verkregen na tweemaal ontzouten van een oplossing met 0,1 M NaCl.



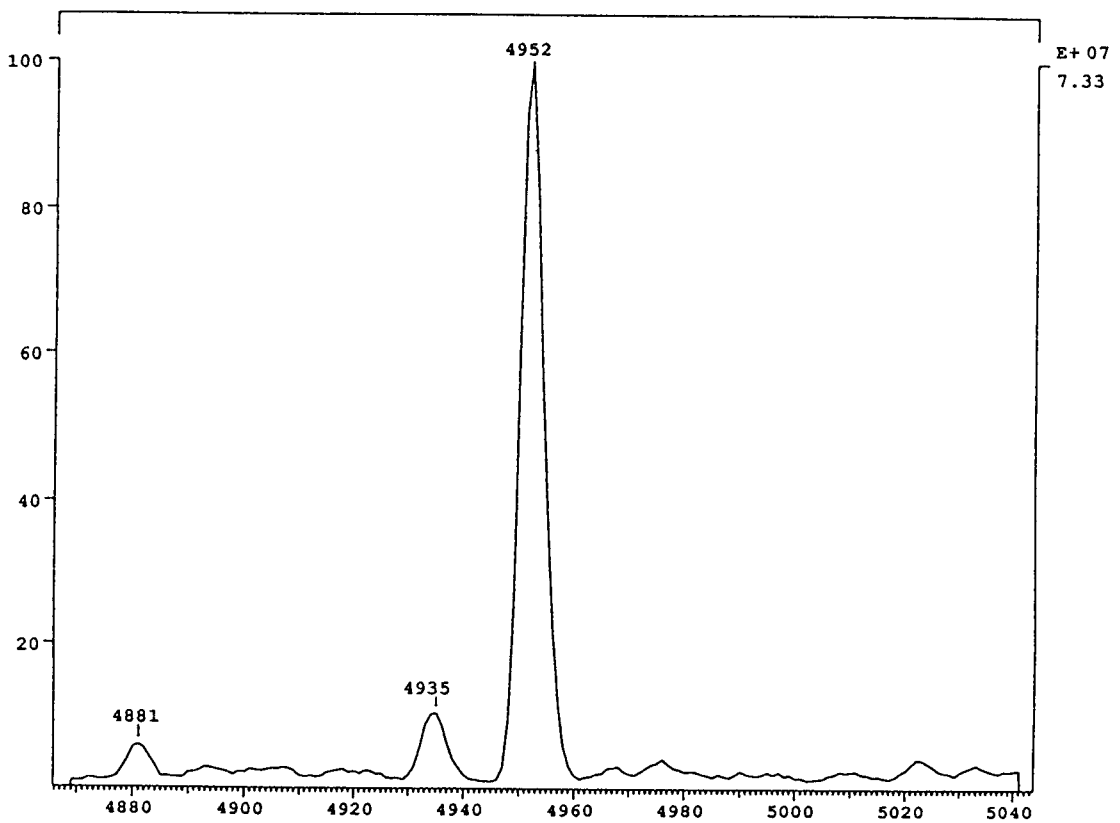
Figuur 11. ESI-massaspectrum (som van 9 spectra) van een synthetisch peptide met een molekuulmassa van 4626 dalton.



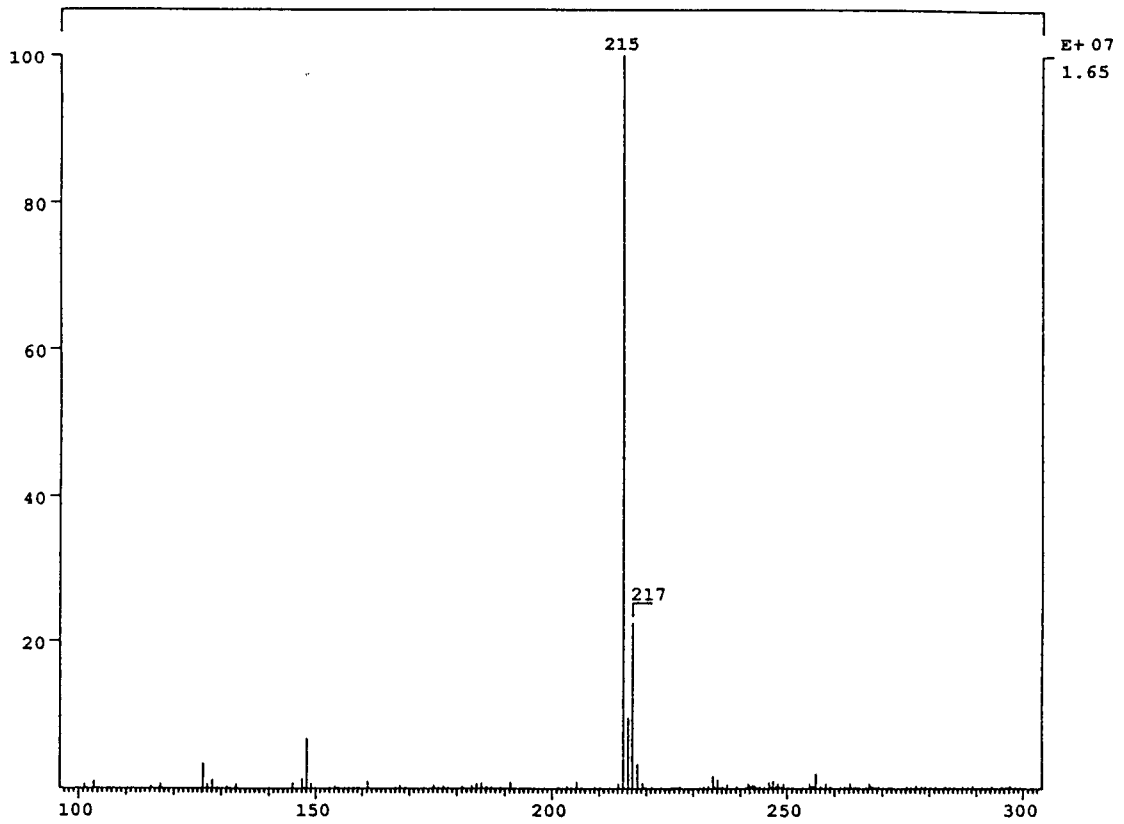
Figuur 12. ESI-massaspectrum (som van 10 spectra) van een synthetisch peptide met een molekuulmassa van 4953 dalton.



Figuur 13. Getransformeerd ESI-spectrum van een synthetisch peptide met een molekuul-massa van 4626 dalton.

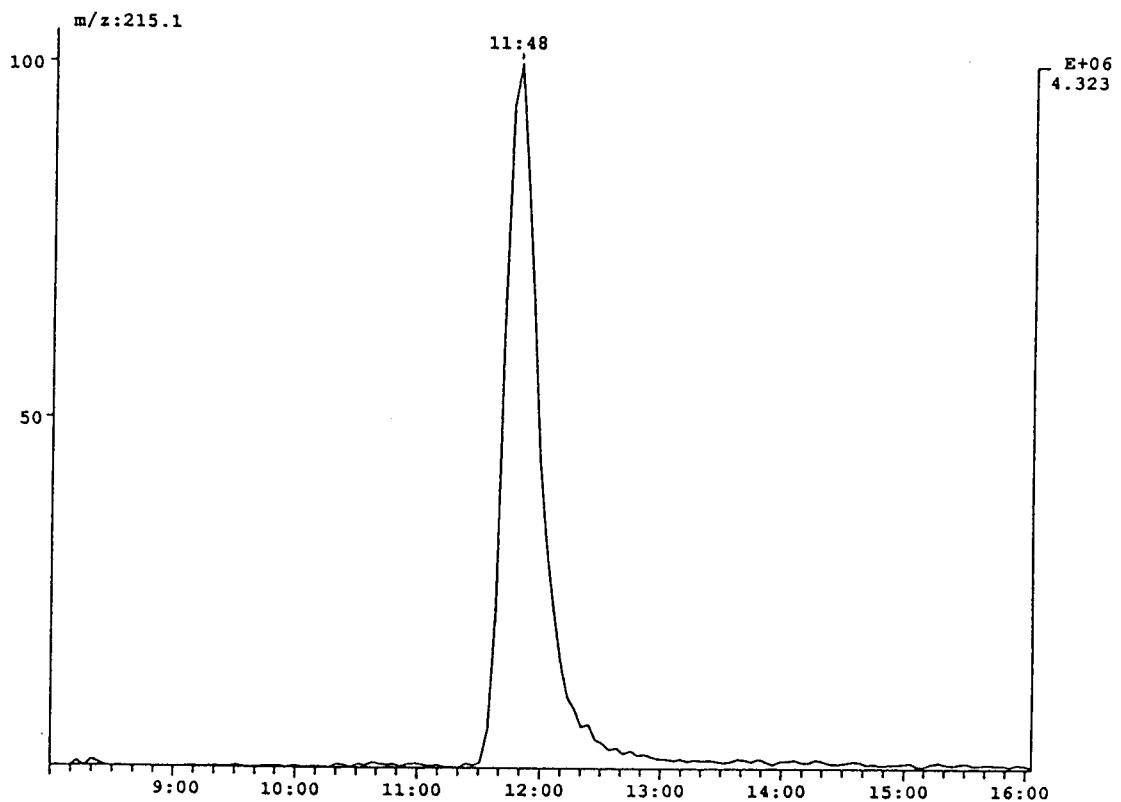


Figuur 14. Getransformeerd ESI-spectrum van een synthetisch peptide met een molekuul-massa van 4953 dalton.

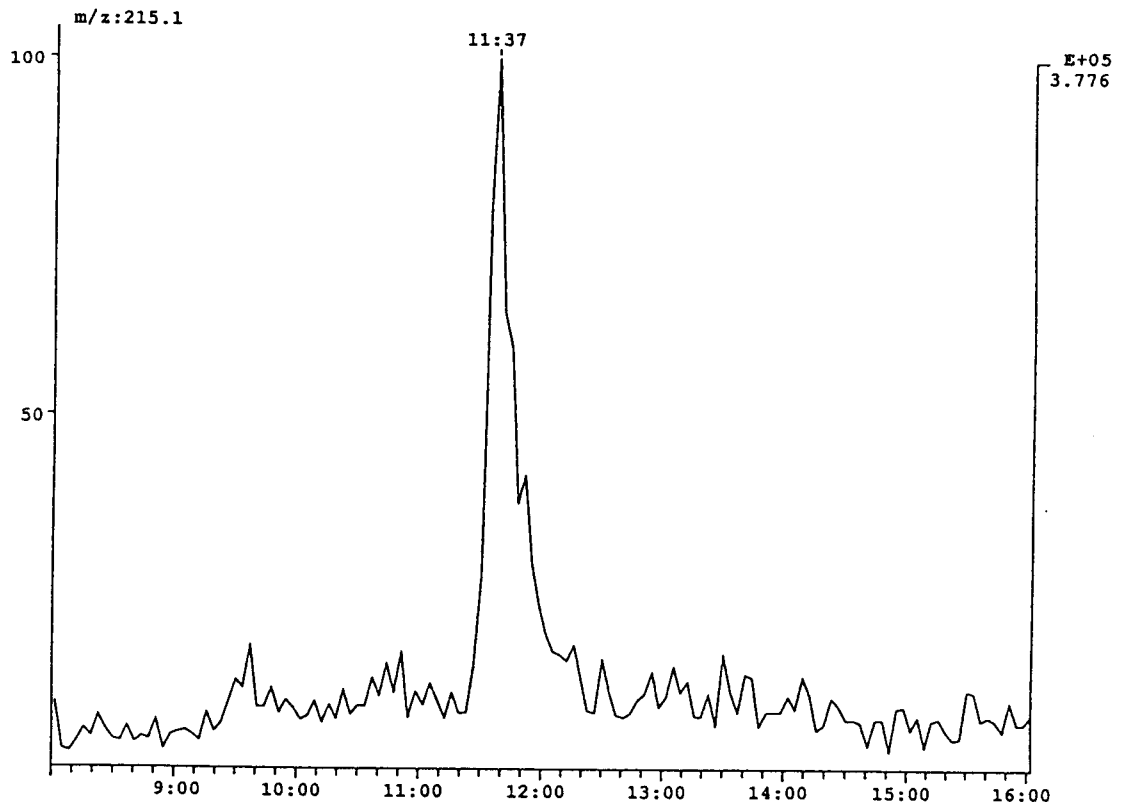


Figuur 16. ESI-masspectrum van monolinuron. Oplosmiddel: water/acetonitril (50:50 v/v).

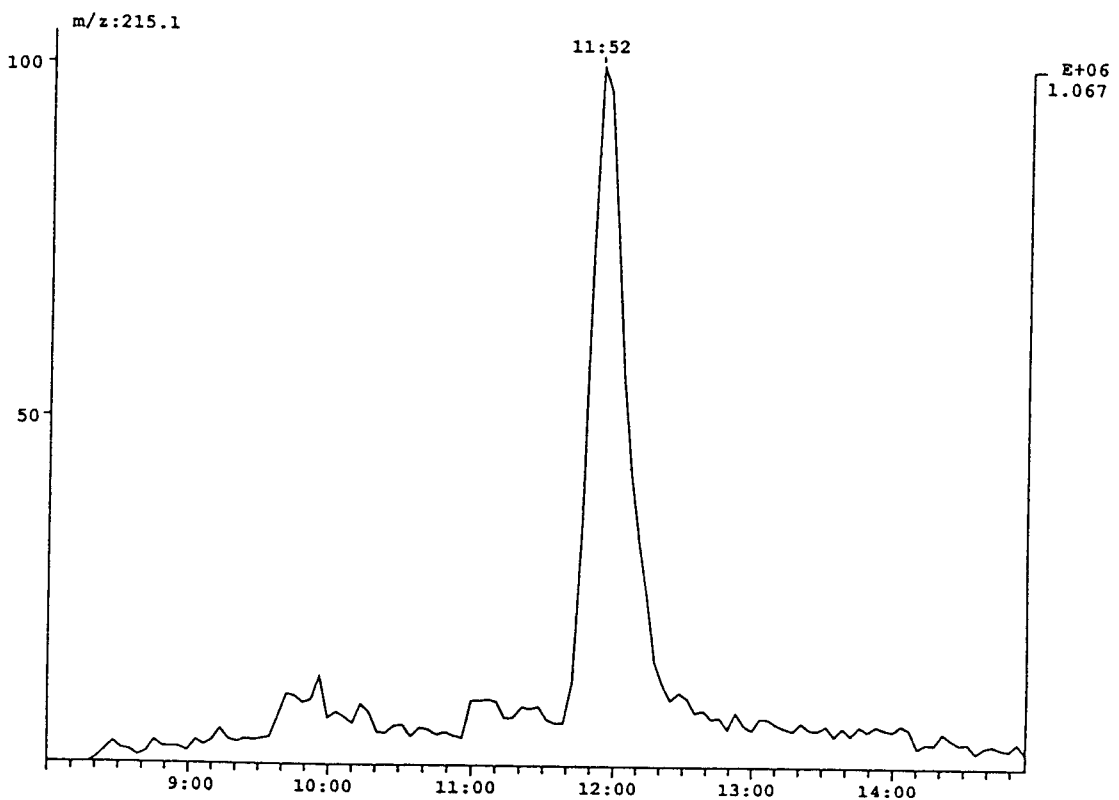
Molekuulmassa monolinuron: 214.



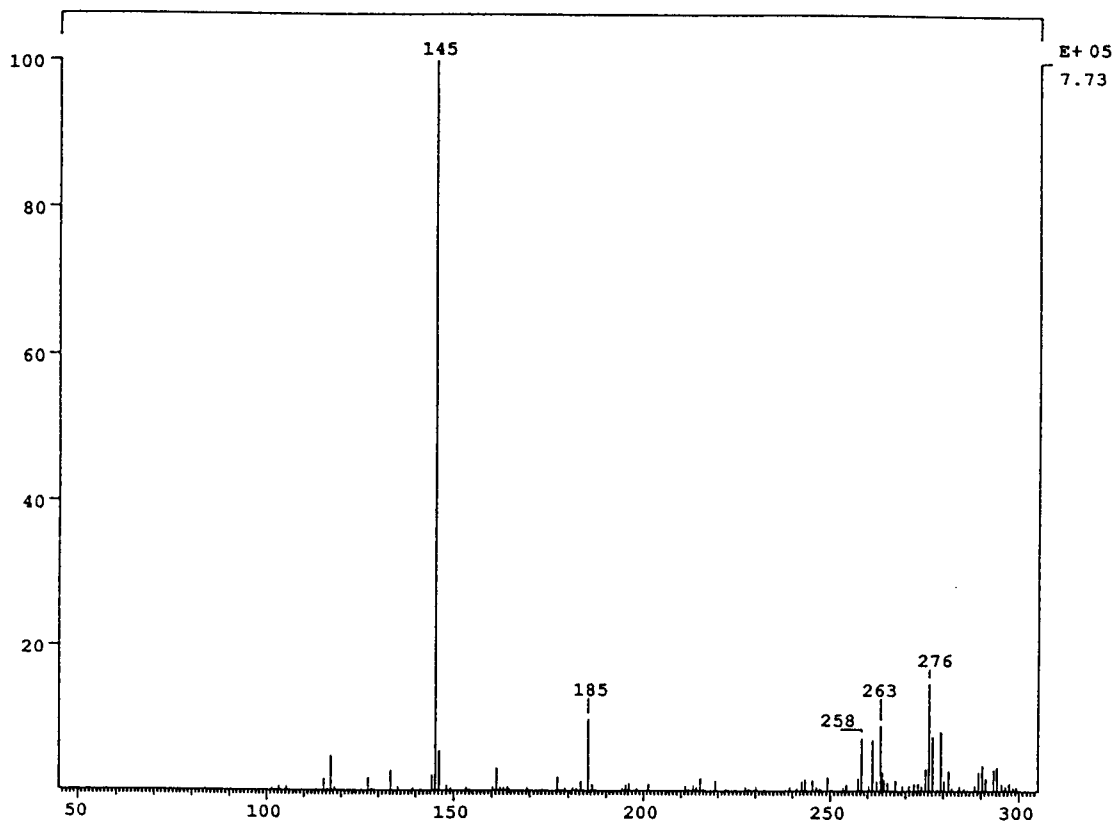
Figuur 17. HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 215) van een monolinuron standaard (concentratie: 50 µg.L⁻¹).



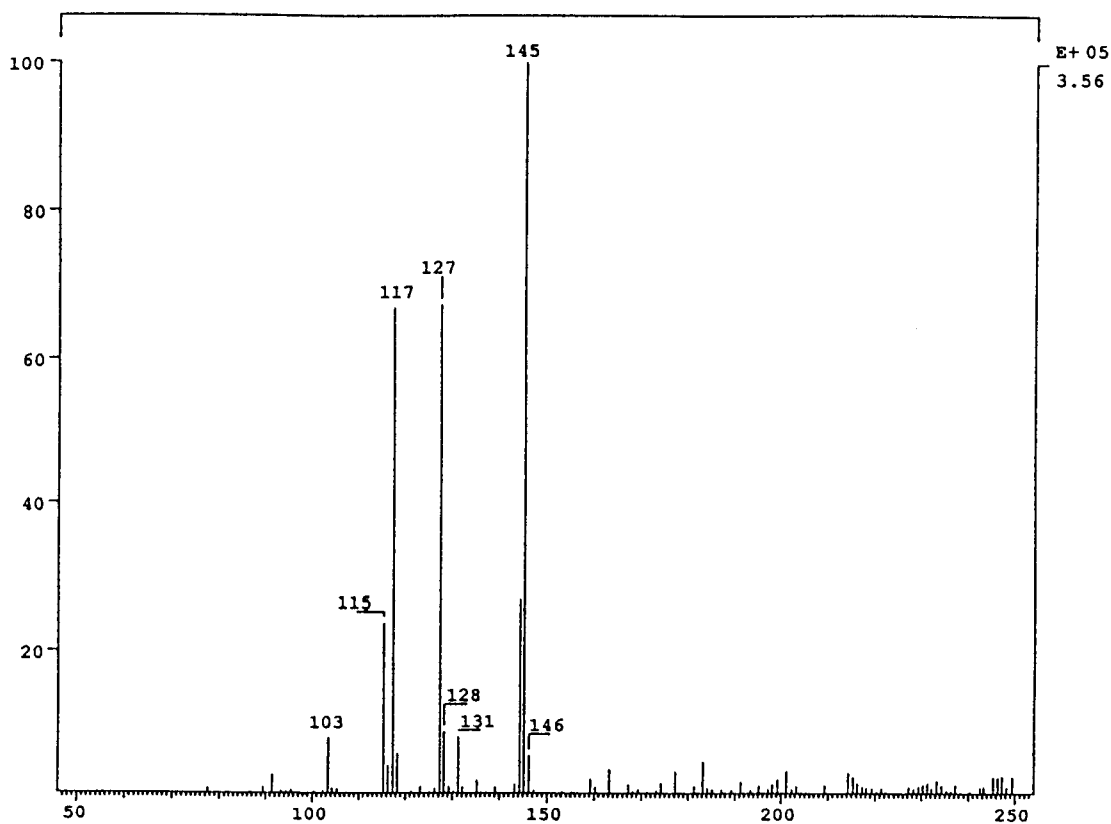
Figuur 18. HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 215) van leidingwater waaraan monolinuron was toegevoegd op een concentratieniveau van 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$.



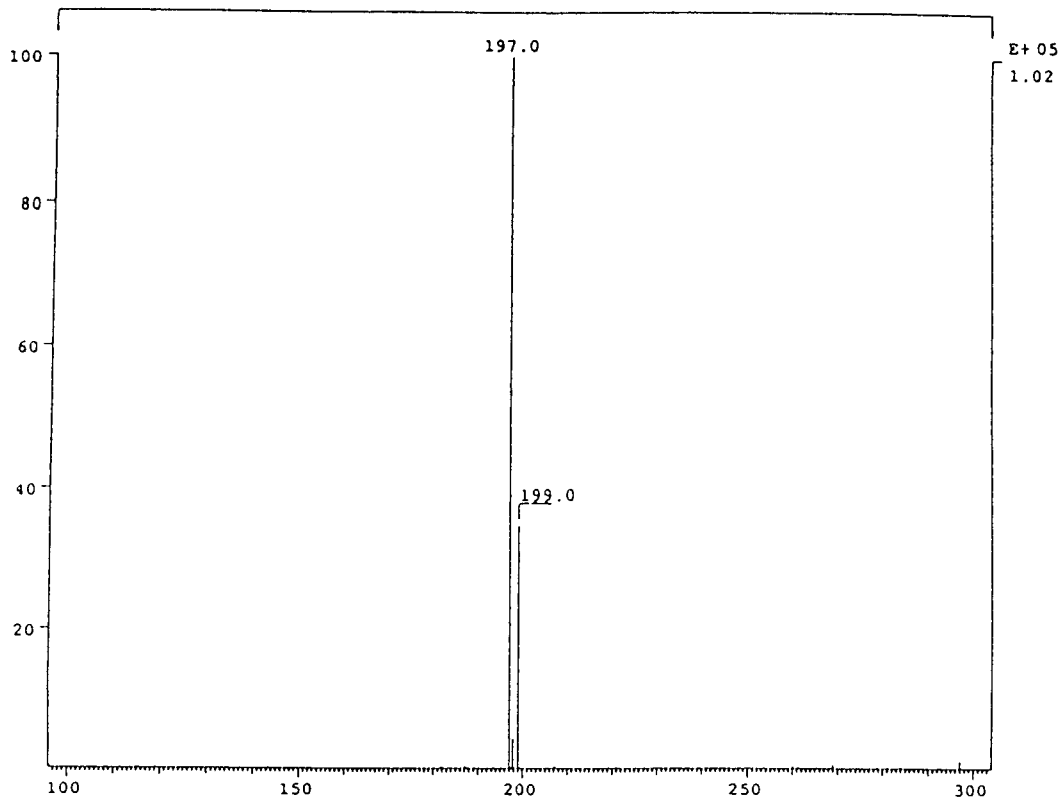
Figuur 19. HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 215) van gezuiverd oppervlaktewater waaraan monolinuron was toegevoegd.



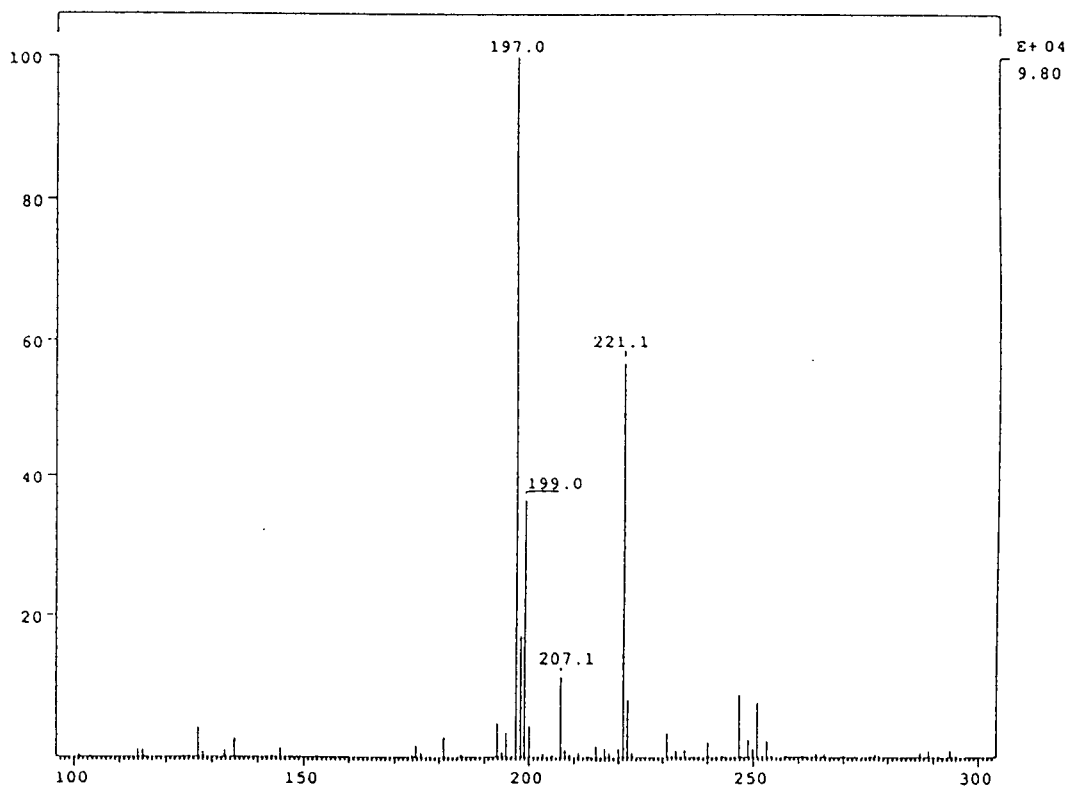
Figuur 20. ESI-massaspectrum van de naftaleenmetaboliet.



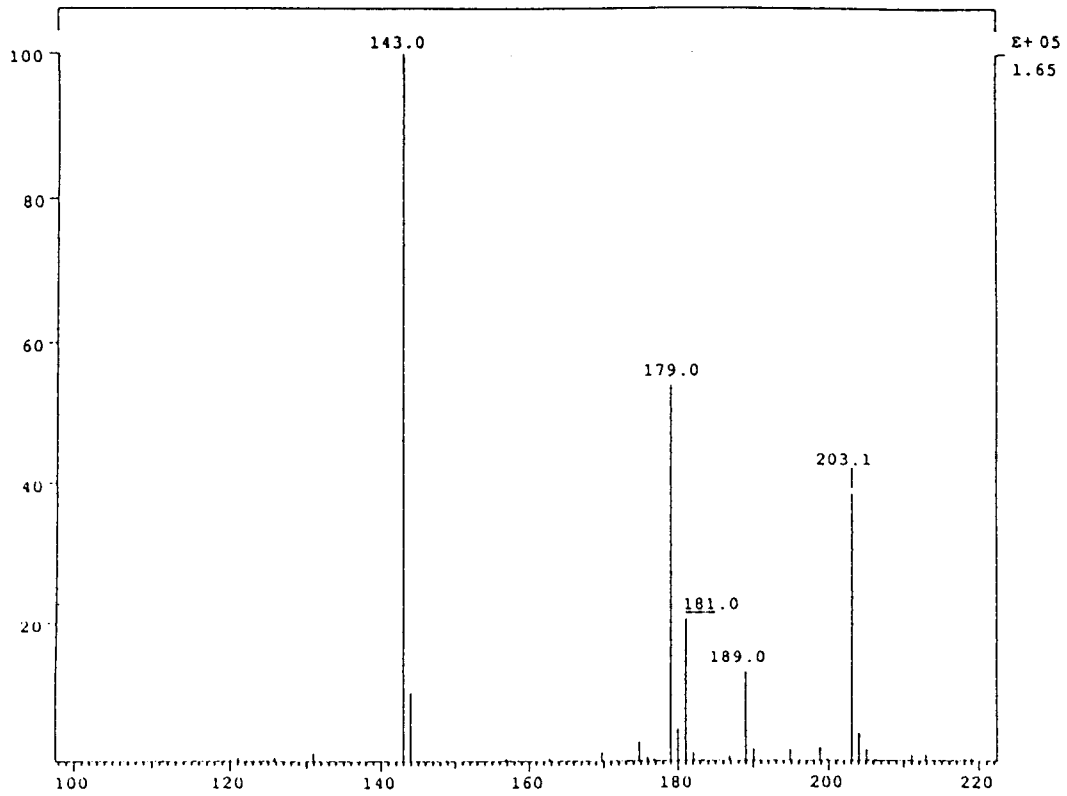
Figuur 21. CID-ESI-massaspectrum van de naftaleenmetaboliet.



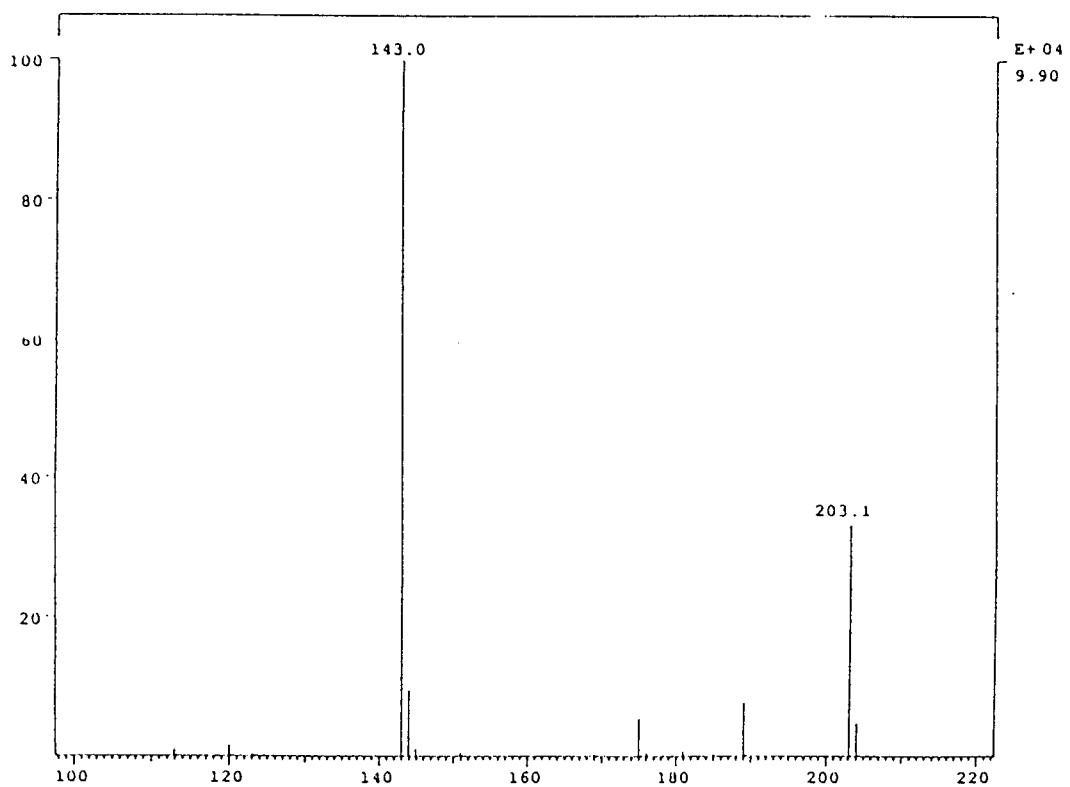
Figuur 22. Negatieve ionen ESI-massaspectrum van de naftaleenmetabooliet.



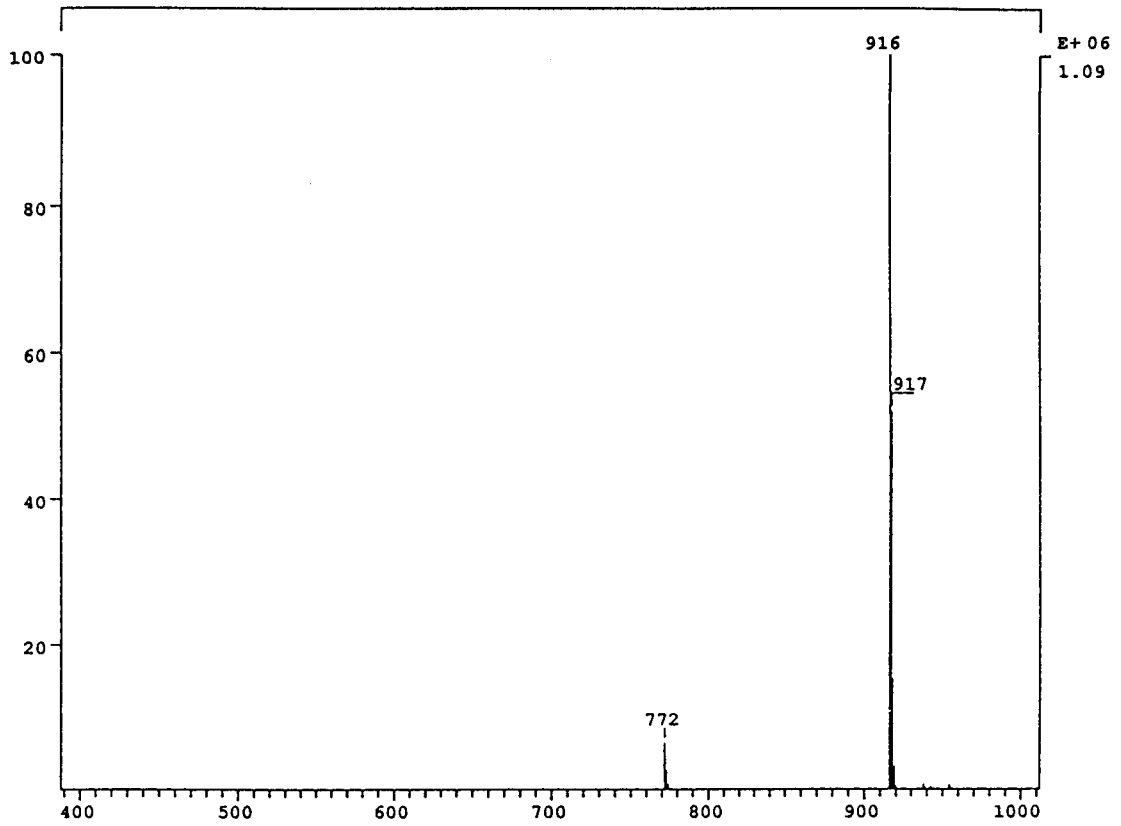
Figuur 23. Negatieve ionen ESI-massaspectrum van de naftaleenmetabooliet na verandering van het HPLC gradiëntprogramma.



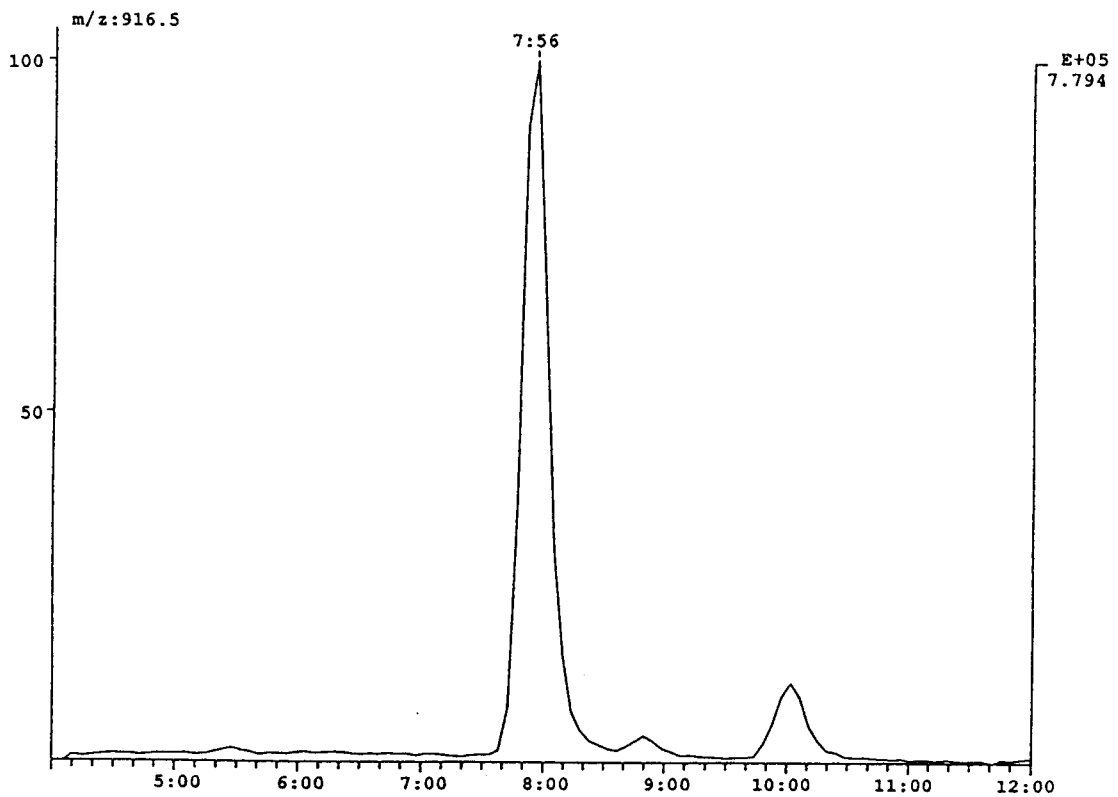
Figuur 24. Negatieve ionen ESI-massaspectrum van 1-naftol, verkregen door analyse van gehydrolyseerd monstermateriaal.



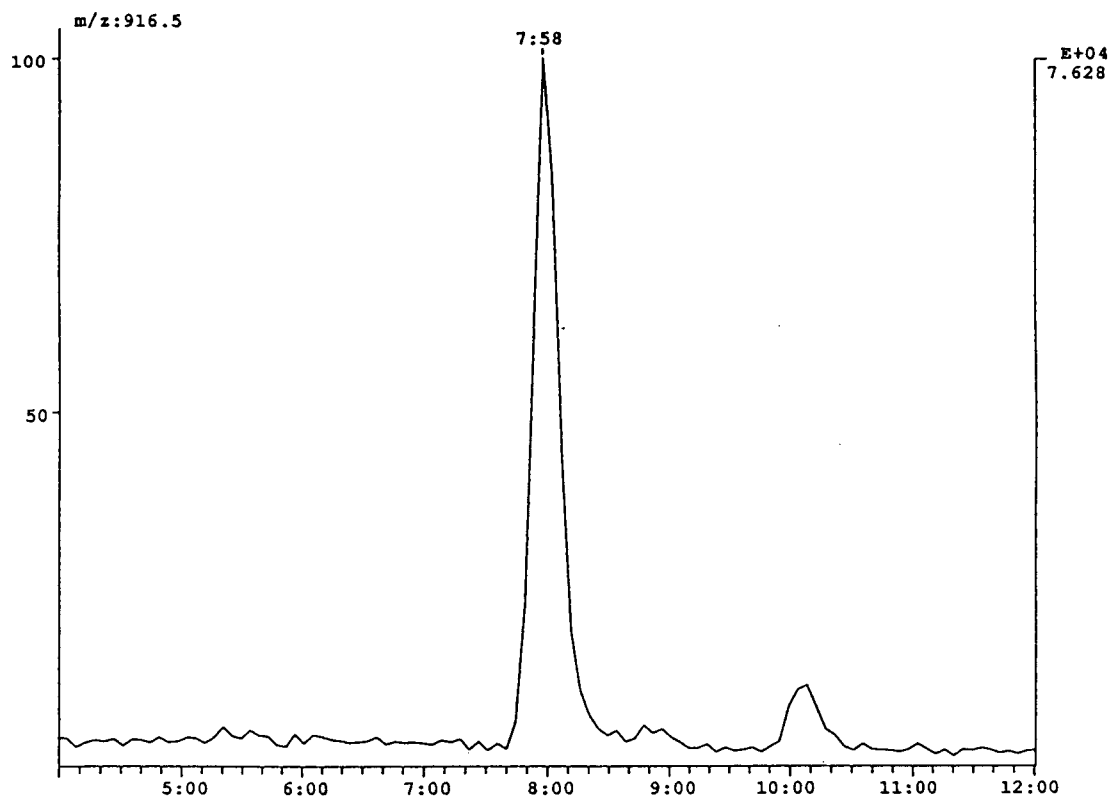
Figuur 25. Negatieve ionen ESI-massaspectrum van 1-naftol, verkregen door analyse van een standaardoplossing.



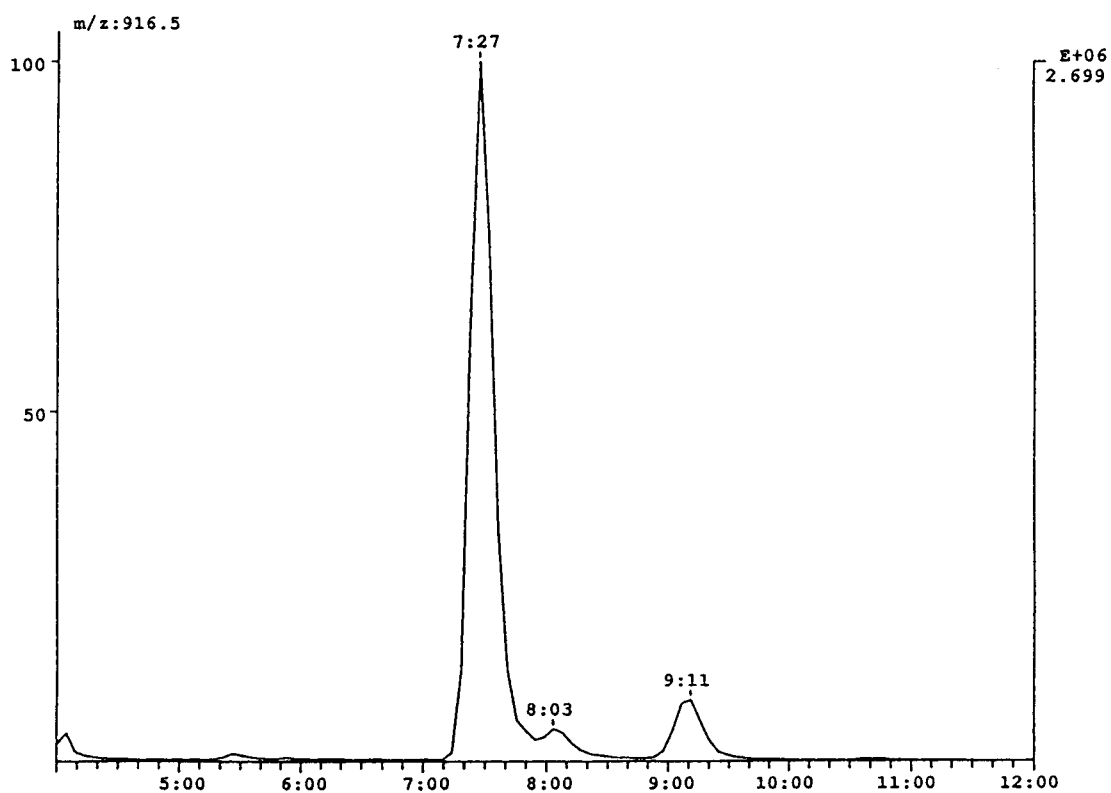
Figuur 28. ESI-massaspectrum van tylosine.



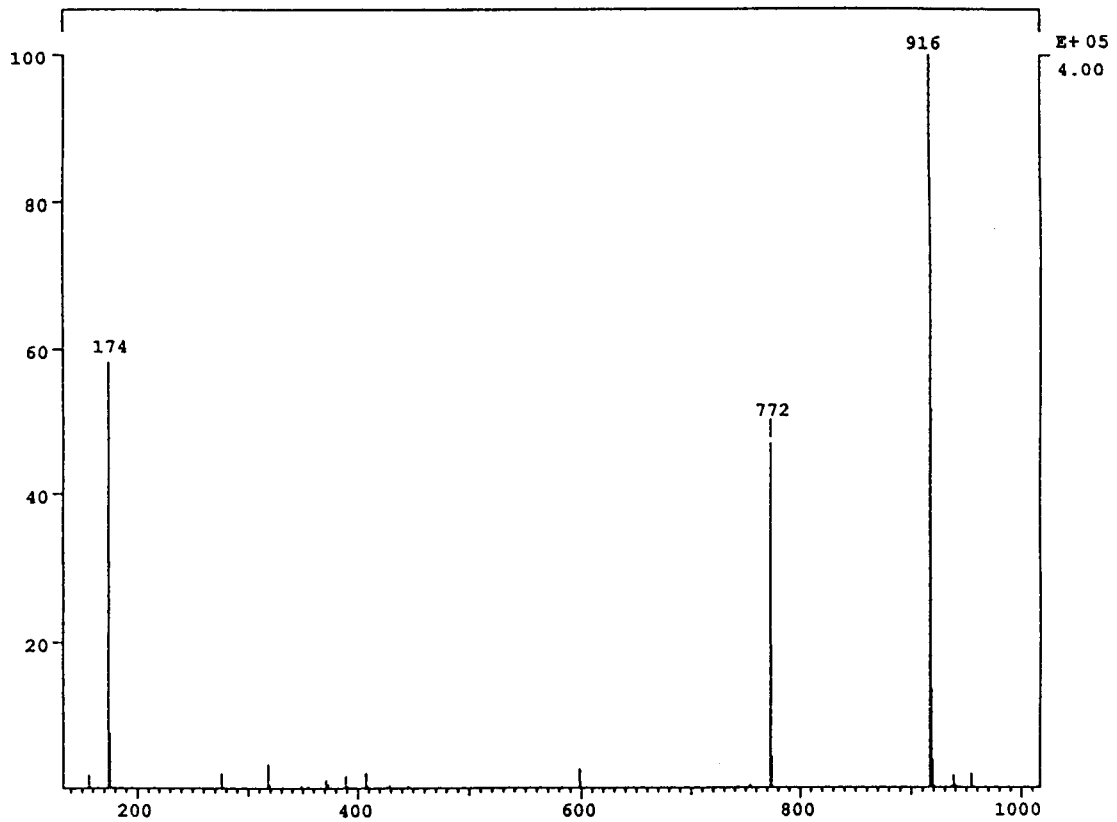
Figuur 30. HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



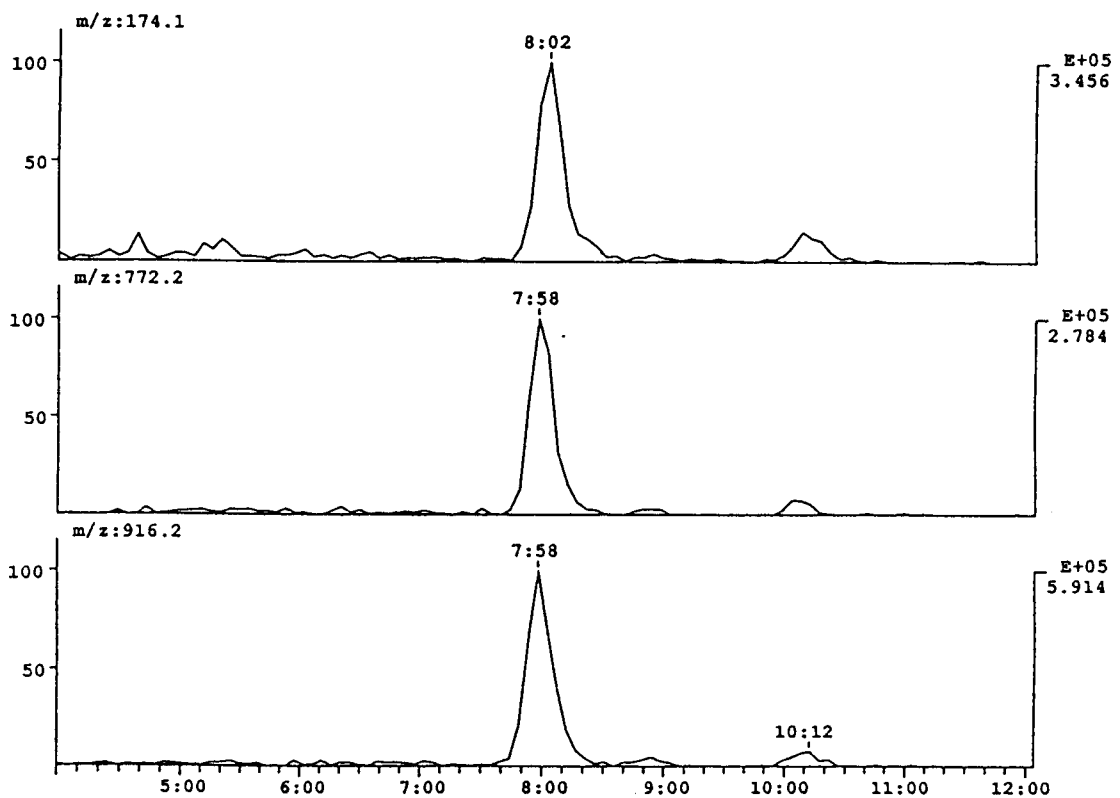
Figuur 31. HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Figuur 32. HPLC-ESI-MS ionchromatogram (m/z 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Inwendige diameter HPLC kolom: 2,1 mm.



Figuur 33. CID-ESI-massaspectrum van tylosine.



Figuur 35. HPLC-ESI-MS ionchromatogrammen (m/z 174, 772 en 916) van een tylosineoplossing met een concentratie van $4,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. De analyse werd onder CID-condities uitgevoerd.