

Der HPLC-Tipp im April

Liebe Leserinnen, liebe Leser,

die LC/MS-Kopplung hält immer schneller Einzug in viele Labors; in einer kleinen Serie mit drei LC/MS-Tipps geht Klaus Illig auf tägliche Probleme ein und zeigt Lösungen auf. Ich wünsche Ihnen viel Spaß beim Lesen!

Ihr

Stavros Kromidas

„Horch, was kommt von draußen rein?“ I

LC/MS-Kontaminationen – heute: DMSO aus der Transfer-Kapillare

von Klaus Illig, Weil am Rhein

Der Fall

Die eigentlich gutmütige und ausgesprochene robuste HRAM-LC/MS-Kombination wurde mal etwas „dreckigeren“ Proben ausgesetzt, konkret biologische Matrix (von Ratten-Fäzes bis Menschen-Blut und Leber-Extrakten war alles dabei). Nachdem die Messungen der Studie abgeschlossen waren, wurde der Einlassbereich des MS vorsorglich sorgfältig gereinigt. Erste Tests mit der üblichen Kalibrierlösung zeigten keine Auffälligkeiten und das Gerät wurde für die weitere Nutzung als tauglich eingestuft. Bei der nächsten Studie mit einer höheren Flussrate, zeigte sich aber ein sehr deutliches Hintergrundsignal mit m/z 157 über die gesamte Laufzeit des positiv-ESI-LC/MS-Chromatogramms.

Interpretation der Daten

Bild 1: Simuliertes (+)-ESI-Massenspektrum *

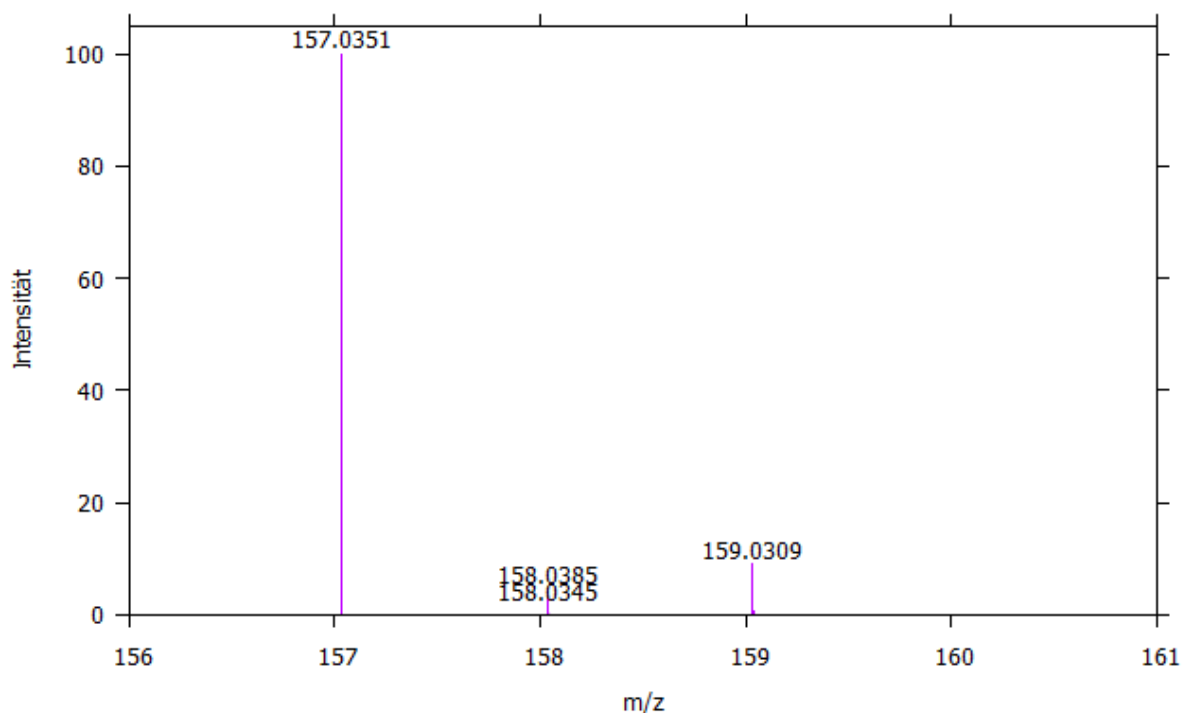


Bild 2: Zoom +1-Isotope

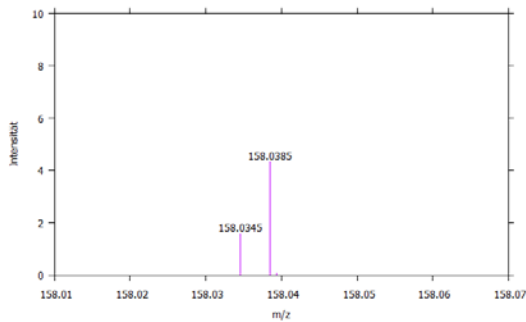
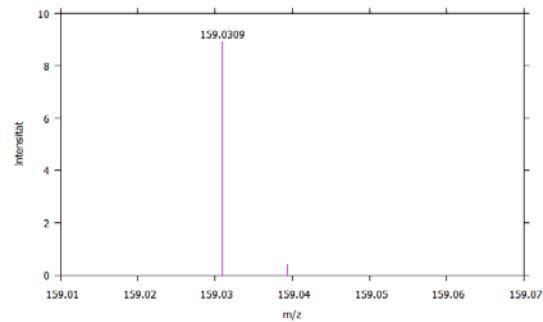


Bild 3: Zoom +2-Isotope



Zunächst fällt hier das (im Vergleich zu einer reinen Kohlenwasserstoff-Verbindung) erhöhte Massendefizit von etwa -0,16 Da auf. Ein Blick auf das ^{13}C -Signal der +1-Isotopenfeinstruktur mit etwa 4 % Intensität lässt uns auf 4 C-Atome im Molekül schließen. Das Signal links davon sowie das ausgeprägte Signal bei den +2-Isotopen deuten auf 2 Atome Schwefel im Molekül hin. Die zwei kleinen anderen Signale könnten für 2 Atome Sauerstoff sprechen. Damit hätten wir ja fast schon die Summenformel. Also lassen wir mal die Software aus dem gemessenen akkuraten m/z-Wert die Summenformel berechnen. Das sollte ja bei so einer geringen Masse recht eindeutig ausfallen. Die Software in Default-Einstellung präsentiert für das Ion als beste Summenformel $\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_3\text{N}_4$. Akkurate Masse passt mit 0,5 mDa Abweichung ganz gut, aber wir waren uns doch recht sicher, dass 2 Schwefel-Atome enthalten sind, oder? In der Tat sind die Default-Werte der Software für den Ring-/Doppelbindungsequivalent-Filter für dieses Molekül zu klein gesetzt. Die Mindestgrenze wird herabgesetzt und schon sehen wir die richtige Summenformel: $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{O}_2\text{S}_2$. Wir haben es hier also höchstwahrscheinlich mit dem $[2\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion von DMSO zu tun. Zur Absicherung scannen wir auch den Bereich kleiner m/z 100 und sehen einen entsprechenden $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signal des Übeltäters. Woher kommt nun die Kontamination?

Die Lösung

Die Kontamination wurde jetzt höchstwahrscheinlich identifiziert, leider haben wir noch immer nicht die Quelle herausgefunden. Das ist ein guter Zeitpunkt um die Historie der Laufmittel und Proben näher zu ergründen und auch das Gewissen der Kollegen zu erforschen. Aber nein, DMSO wurde schon längere Zeit nicht verwendet. Auf „Gut Glück“ probiert man schnell seine einfach zu überprüfenden üblichen Verdächtige aus. Ein bisschen Fließmittel von der vorherigen Studie war noch vorhanden, zeigte aber jetzt ebenso das gleiche Problem (Vorsicht: Nur geringfügige Intensitäts-Änderungen bei Kontaminations-Problemen können sehr leicht in die Irre führen). Am Fließmittel lag es also nicht und auch eine neue Säule brachte keine nennenswerte Besserung. Also sieht man sich systematisch an, was inzwischen geändert wurde: Der Sprayer wurde ordentlich gespült, das Inlet-Gehäuse gereinigt und die Ion-Transfer-Kapillare gegen eine brandneue getauscht. Gemäß dem LC/MS-Grundsatz, bei merkwürdigen Phänomenen erstmal zu reinigen, wurden der Sprüher und das Gehäuse erneut gesäubert, aber das Kontaminations-Signal war noch immer ohne signifikante Veränderung zu beobachten.

Viel bleibt jetzt nicht mehr übrig, als nächstes hat man die anscheinend blitzblanke neue Transfer-Kapillare (die ja sehr sorgfältig aus der Originalverpackung entnommen wurde) gegen die vorherige ausgetauscht: Das DMSO-Signal war weg! Nach Reinigung der neuen

Kapillare nach Herstellervorschrift war auch hier die Kontamination nicht mehr zu beobachten.

Das Fazit

Man darf auch dem Hersteller nicht blind vertrauen, weder bei Software noch bei Hardware. Sich selbst sollte man aber noch weniger vertrauen und ein ordentliches Geräteloggbuch führen – auch mit Informationen die aus GxP-Gründen nicht unbedingt zwingend sind (eine Transferkapillare hat keine Seriennummer...).

Ein schneller Test mit Kalibrierlösung bei 3 – 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ sagt nicht alles aus, auch wenn Service-Techniker damit gerne die gute Performance des Gerätes demonstrieren. Prüfen Sie regelmäßig ihr Gesamt-System unter realen Bedingungen, spätestens vor Reparaturen oder Wartungsarbeiten sollte man noch wenn irgendwie möglich sinnvolle Vergleichs-Messungen machen.

Manchmal ist es wirklich sehr hilfreich auf ein älteres Fließmittel oder eine ältere Probe zurückgreifen zu können um mögliche Fehlerquellen auszuschließen. Leider kann es hier oft zu einem Konflikt mit geltenden Vorschriften kommen.

***Anmerkung:** Die Massenspektren wurden mit der Software Gnuplot simuliert, Akkurate Massen und Isotopenverhältnisse wurden einer aktuellen Zusammenfassung des NIST entnommen.