



Superkritische Fluidchromatographie gekoppelt mit einem Orbitrap Exploris 120 Massenspektrometer – Quantitativer Blickpunkt

Stefan Bieber und Thomas Letzel

Analytisches Forschungsinstitut für Non-Target Screening GmbH

Abstrakt

Die achirale superkritische Fluidchromatographie (SFC) wurde in dieser Studie genutzt, um Moleküle in einem großen Polaritätsbereich zu trennen. Sie stellt eine sogenannte polaritätserweiterte chromatographische Trenntechnik dar. Des Weiteren wurde ein hochpräzises und hochauflösendes Orbitrap Exploris 120 Massenspektrometer (HRMS) auf seine Fähigkeit hin untersucht, Moleküle nach der SFC-Trennung sehr empfindlich und in einem universellen Screening-Modus nachzuweisen. Konsequenterweise wurde die bekannte SFC-Trennung der Moleküle über die Elektrospray-Ionisierung mit HRMS zu einer massenspektrometrischen Non-Target-Screening-Messung kombiniert.

Obwohl das massenspektrometrische Screening in einem Scanbereich von 70-1000 Da durchgeführt wurde, konnten insgesamt 167 organische Substanzen (in einem logP-Bereich von -4,5 bis +7,4) in sub- und unteren pmol-Mengen (injiziert auf die Säule) nachgewiesen werden. Dabei waren 88 Verbindungen (logP von -4,5 bis +6,2) nur im positiven Ionisierungsmodus nachweisbar, 30 (logP von -3,4 bis +7,4) nur im negativen Ionisierungsmodus, 27 (logP von -1,6 bis +4,4) sowohl im positiven als auch im negativen Detektionsmodus – bei ähnlicher Empfindlichkeit – und 22 (logP von -2,6 bis +4,3) sowohl im positiven als auch im negativen Detektionsmodus – bei unterschiedlichen, aber empfindlichen Nachweisgrenzen.

Abschließend zeigt die Studie, dass SFC-HRMS-Systeme der neuen Generation – wie die Orbitrap Exploris 120 – genau die Empfindlichkeit in der MS-Detektion erreichen, die man erwartet, d.h. etwas weniger empfindlich als die typische GC-MS-Scan-Analyse und etwas empfindlicher als die typische LC-MS-Scan-Analyse. Da diese Art der Detektion normalerweise im Non-Target-Screening ein-

gesetzt wird und die SFC einen breiten Polaritätsbereich abdeckt, kann diese instrumentelle Lösung sowohl bei allgemeinen Herausforderungen mit höheren Substanzkonzentrationen als auch bei der Analyse von organischen Verbindungen im Spurenbereich effektiv eingesetzt werden. Schließlich wird das CO₂-Chromatographie-Setup, welches deutlich umweltfreundlicher als das üblicherweise verwendete Acetonitril ist, in Kombination mit HRMS-Systemen dank seiner hervorragenden Empfindlichkeit verschiedene Anwendungen (wie z.B. das Non-Target-Screening) revolutionieren.

Einführung

Vor mehr als zehn Jahren wurde die neue Generation von SFC-Geräten eingeführt. In den folgenden Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um das Verständnis für die Eigenschaften dieser Trenntechnik zu verbessern. In den Jahren 2015 [1] und 2016 [2] begannen wir, über die superkritische Fluidchromatographie (SFC) Folgendes zu schreiben: „Diese ursprünglich als ‚superkritische Fluidchromatographie‘ (daher SFC) bezeichnete Technik wird heute eher als ‚Chromatographie mit Kohlendioxid‘ angesehen und weniger als ‚überkritische Fluidtrenntechnik‘. Das liegt vor allem daran, dass die mobile Phase nicht in jeder Trennsituation überkritisch ist und die sehr effizienten Trenneigenschaften unabhängig vom thermodynamischen Zustand der mobilen Phase sind. Die Trenntechnik weist Eigenschaften auf, die sich deutlich von der herkömmlichen Gas- oder Flüssigphasenchromatographie (GC oder LC) unterscheiden und kann daher leicht von GC und LC unterschieden werden“.

Aus diesem Grund wird der Begriff SFC heute überwiegend als Name der genutzten Technik verwendet und nicht als Erklärung der zugrundeliegenden Trennbedingungen.

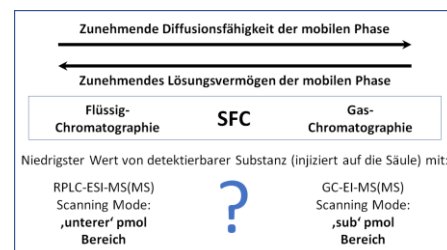


Abb. 1: Illustration der Charakteristika von Flüssigchromatographie (LC), der superkritischen Fluidchromatographie (SFC) und der Gaschromatographie (GC) in Bezug auf Diffusionsfähigkeit, Löslichkeit und Sensitivität (des genutzten massenspektrometrischen Screenings).

Abbildung 1 zeigt die Einordnung der SFC in Bezug auf die physikalisch-chemischen Parameter Diffusionsfähigkeit und Löslichkeit der mobilen Phasen bei GC und LC. Gleichzeitig kann die SFC seit vielen Jahren mit sehr robusten instrumentellen Systemen verschiedener Hersteller [3] eingesetzt werden, die sich in Aussehen und Handhabung nicht wesentlich von bekannten LC-Systemen unterscheiden. Dies macht die SFC für viele (neue) Anwender zu einer sehr interessanten Trenntechnik, insbesondere wenn eine umweltfreundliche chromatographische Trenntechnik benötigt wird.

In jüngsten Studien wurde für Non-Target-Screening-Strategien (NTS) eine universelle SFC-Screening-Methode (die polaritätserweiterte chromatographische Trennung widerspiegelt) in Kombination mit HRMS und vor Allem als robuste, ergänzende und orthogonale Charakterisierungsmethode in Kombination mit RPLC-HILIC eingesetzt [4,5]. Der große Polaritätsbereich der trennbaren Moleküle und die andersartigen Parameter machen die Technik mittlerweile zu einem Goldstandard im NTS [6]. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist aber auch eine hohe Empfindlichkeit in der massenspektrometrischen Detek-

tion. Wenn ein ähnlicher Empfindlichkeitsbereich der detektierten Verbindungen wie bei GC und LC beobachtet werden kann, wäre die SFC tatsächlich eine perfekte Ergänzung für polaritätserweiterte Anwendungen im Non-Target-Screening.

In dieser Studie wurden daher mehr als 150 Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen vermessen und mittels SFC-ESI-Orbitrap-MS in einer NTS-Screening-Strategie nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden verwendet, um die niedrigste nachweisbare Konzentration für jedes organische Molekül zu ermitteln. Die quantitativen Daten wurden auch erfolgreich zusammen mit unserer Kollegin Anneli Krueve von der Universität Stockholm in einem peer-reviewed Artikel über den semiquantitativen Umgang mit NTS-Daten genutzt [7].

Materialien und Methoden

Chemikalien und Lösungen

Acetonitril, Methanol und Isopropanol wurden von Honeywell (Seelze, Deutschland) und Kohlendioxid (CO₂) in 3.0 Qualität von Gößwein Gas GmbH (Osterhofen, Deutschland) bezogen.

Informationen über die verwendeten Standardverbindungen (im logD-Bereich (bei pH 7) von -7 bis +7) sind in einer früheren Veröffentlichung [4] enthalten und die logP-Werte sind zusätzlich im Anhang dieses Manuskripts aufgeführt. Diese Standards wurden von ACROS Organics (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgien), Alfa Aesar (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland), Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, U.S.A.), CHEMOS GmbH (Regenstauf, Deutschland), Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland), Supleco (Bellefonte, Pennsylvania, U.S.A.), und TCI (Eschborn, Deutschland) bestellt. Sie wurden in individuellen Stammlösungen zu je 1000 µmol/L hergestellt, in Acetonitril, Acetonitril/Wasser (50/50, v/v) oder Methanol aufgelöst und vor der Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Analysen wurden die Lösungen der Verbindungen in Mischungen kombiniert, wobei diese final in Konzentrationen von jeweils 12,2 bis 1750 nmol/L resultierten.

Instrumentelles Setup

SFC System

Das SFC-System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bestand aus einem Entgaser, einer binären Pumpe

mit Lösungsmittelauswahlventil, einem Probengeber mit 10 µL Injektionschleife, einem thermostatisch geregelten Säulenofen, einem Diodenarray-detektor und einer Rückdruckregel-einheit. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines CO₂ – 20 mM NH₄Ac in MeOH-Gradienten von 2 bis 60 % innerhalb von 6 Minuten (mit 1 min isokratischen 2 % B zu Beginn) und einem 4-minütigen isokratischen Halt bei 60 % B unter Verwendung einer Eurosphere II HILIC-Säule (150 x 3 mm, 3 µm) von KNAUER (Berlin, Deutschland). Die Flussrate betrug 1,5 mL/min, der Rückdruck war auf 130 bar eingestellt und die Säulentemperatur wurde konstant auf 40 °C gehalten. Vor dem Eintritt in die ESI-Quelle wurde dem SFC-Elutionsfluss ein konstanter Make-up-Fluss von 200 µl/min Wasser/Isopropanol 90 %/10 % zugesetzt.

10 µl der Kalibrierlösungen wurden dreifach injiziert und jeweils unter diesen Bedingungen getrennt. Die Kalibrierungslösungen wurden in Konzentrationen von 12,2 nmol/L bis 1750 nmol/L injiziert.

Orbitrap-Massenspektrometer

Das chromatographische System war an ein Orbitrap Exploris 120 Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Deutschland) angeschlossen, das wiederum mit einer Elektrospray Ionisationsquelle (H-ESI) ausgestattet war. Die Quelle wurde im positiv-negativ-Schaltmodus (d.h. pos-neg Switching) mit Spray Voltages von 3500 bzw. -2500 V im positiven bzw. negativen Modus betrieben. Sheath Gas, Auxiliary Gas und Sweep Gas wurden jeweils auf 50, 8 bzw. 0 (Arb.-units) eingestellt. Die Kapillartemperatur und die Nebulizer-Temperatur wurden jeweils auf 350 °C eingestellt. Um NTS-Daten zu erhalten, wurde ein Massenbereich von 67-1000 Da mit einer Auflösung von 60.000 (volle Breite beim halben Maximum bei m/z 200) gescannt. Das Gerät wurde vor Beginn der Sequenz vollständig kalibriert und vor jeder Injektion (mittels Ein-Punkt-Kalibrierung) überprüfend kalibriert. Somit konnte eine Massengenauigkeit von besser als 2 ppm erreicht und erwartet werden. MS²-Spektren wurden im datenabhängigen Aufnahmemodus mit einer Auflösung von 30.000 unter Verwendung von Kollisionsenergien von 15 und 45 V aufgenommen. Die vier intensivsten Vorläuferionen wurden ausgewählt um nach einem Scanzzyklus ein Fragmentierungsexperiment auszulö-

sen und wurden anschließend für 7 s ausgeschlossen.

Datenanalyse

Die Datenauswertung erfolgte in einem gezielten Ansatz mit TraceFinder 5.1 (Thermo Fisher Scientific GmbH; Dreieich, Deutschland) auf der Grundlage einer firmeneigenen Komponenten-datenbank, die die Summenformel aller analysierten Referenzverbindungen enthält.

Die beobachteten Retentionszeiten und Signalintensitäten (Peakflächen) wurden zusammen mit weiteren relevanten Daten über die Verbindungen in eine csv-Datei exportiert und anschließend im Excel-Datenanalyseformat verwendet. Darin wurde die niedrigste Nachweisgrenze in jeder Polarität beobachtet und in den niedrigsten nachweisbaren Werten von "pmol on column" (poc) markiert, die in dieser Studie verwendet wurden. Die Werte lagen in beiden Polaritäten bei 0,1-0,4 poc, 0,4-5,0 poc und 5,0-10,0 poc. Eine weitere Klassifizierung wurde anhand der Molekülionisierung in positiv, negativ oder beides vorgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

SFC-Orbitrap-Analysestrategie in NTS

Der derzeitige SFC-MS-Aufbau ermöglicht das Screening komplexer Proben nach sehr polaren bis unpolaren Verbindungen innerhalb von 15 Minuten (einschließlich Re-Äquilibration). Diese Methode wird seit nun 10 Jahren im Non-Target-Screening eingesetzt und kann mit der orthogonalen und komplementären polaritätserweiterten chromatographischen Technik der RPLC-HILIC [4,5] verglichen/kombiniert werden. Die chromatografische Kopplung RPLC-HILIC wurde kürzlich auf eine 35-minütige Laufzeit reduziert und optimiert, um den Anforderungen moderner Technik unter Verwendung von "Ultrahochdruck"-Pumpen und kleineren Partikeln als stationäre Phasen gerecht zu werden [8]. Zusammen mit der Leistung eines Exploris Orbitrap MS-Instruments bietet dies die Möglichkeit, solche Proben sogar umfassend im Hochdurchsatz zu screenen. Da das Exploris 120 MS in der Lage ist, parallel und sensitiv im positiven und negativen Ionisierungsmodus zu analysieren, kann die Analysezeit erheblich verkürzt werden. So ermöglicht z.B. das oben erwähnte RPLC-HILIC-Setup heute eine solche Analyse in weniger als 2,5 Stunden (Spül-Blank und drei Probenreplikate) anstelle der früheren 8 Stunden [8]. Zum Vergleich bei der SFC:

Von ursprünglich 2 Stunden mit QqToF-Systemen (1 Spül-Blank, drei Replikatanalysen der Probe im positiven Ionisierungsmodus, 1 Spül-Blank, drei Replikatanalysen der Probe im negativen Ionisierungsmodus, jeweils 15 Minuten lang) konnte die Zeit für die Analyse einer Probe auf etwa 1 Stunde reduziert werden (1 Spül-Blank, drei Replikatanalysen der Probe im positiven und negativen Ionisierungsmodus parallel, jeweils 15 Minuten). Dies ist folglich die Hälfte der vergleichbaren QqToF-Analysendauer, bei der die Ionisierungsmodi getrennt gemessen werden. Im Vergleich zu den 2,5 Stunden der RPLC-HILIC-pos/neg ESI-Orbitrap-Messungen ist die SFC-pos/neg ESI-Orbitrap-Messung mit etwa 1 Stunde pro Probe nochmals viel kürzer und zeitsparend für analytische NTS-Messungen.

Darüber hinaus können beide Techniken zusammen leicht als sich ergänzende Methoden eingesetzt werden, wobei weitere mechanistische Informationen aus der SFC die Polaritätsinformationen des RPLC-HILIC-Aufbaus ergänzen. Nicht zuletzt sind beide zusammen nun schneller als die ursprüngliche Messreihe mit ausschließlich RPLC-HILIC-ESI-QqToF-Systemen.

Alles in allem ein ‚perfekter Match‘ und eine perfekte Ergänzung für die Routineanalyse.

Empfindlichkeit des verwendeten SFC-ESI-MS

Gegenwärtig suchen Wissenschaftler in Spurenbereichen in unterschiedlichen Disziplinen und in vielen verschiedenen Matrices nach bekannten und unbekanntem Stoffen. Daher ist die Kombination aus einem breiten gescannten Massenbereich und der Notwendigkeit hoher Nachweisempfindlichkeit eine große Herausforderung bei der NTS-Analyse. Zunächst muss die Gesamtempfindlichkeit in so genannten "akademischen Lösungen", d.h. Verbindungen in reinen Lösungsmitteln, beobachtet und im Vergleich zu der Empfindlichkeit eingeordnet werden, die bei Verwendung anderer chromatographischer Strategien in Verbindung mit der Massenspektrometrie erhalten wird (siehe Schema in Abbildung 1).

Wie im letzten Kapitel erwähnt, werden die Moleküle im positiven und/oder negativen Ionisierungsmodus gemessen (im besten Fall durch pos/neg-Switching), um einen möglichst spezifischen und empfindlichen Nachweis der organischen Moleküle zu ermöglichen. Insgesamt

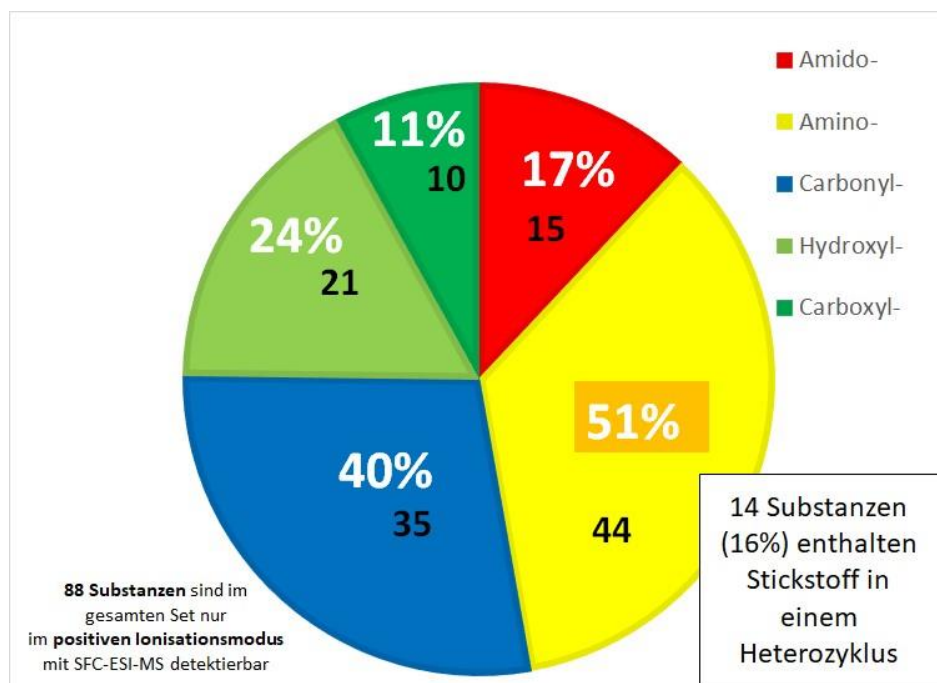


Abb. 2: Illustration von funktionellen Gruppen enthalten in Substanzen die ausschließlich im positiven Ionisationsmodus mit SFC-ESI-Orbitrap-MS detektierbar waren.

samt ist die Bewertung der Empfindlichkeit bisher bei Screening-Messungen mit der SFC-ESI-MS noch nicht durchgeführt worden (zumindest nicht für eine so breite Palette von Molekülen). In dieser Studie wurden insgesamt 165 organische Substanzen im Massenbereich von 67 Da bis 1000 Da und in einem logP-Bereich von -4,5 bis +7,4 untersucht. Alle konnten mit der angewandten Screening-Strategie in den verwendeten Kalibrierlösungen nachgewiesen werden und zwar alle mit Nachweisgrenzen im sub- bzw. unteren pmol-Bereich ‚on column‘ (d.h. injiziert auf die Säule).

In den folgenden Kapiteln werden die Verbindungen nach ihren Eigenschaften zur Ionisation gruppiert, d.h. sie werden (a) nur im Positiv-Ionen-Modus, (b) nur im Negativ-Ionen-Modus, (c) sowohl im Positiv- als auch im Negativ-Detektionsmodus – bei ähnlicher Empfindlichkeit – und (d) sowohl im Positiv- als auch im Negativ-Detektionsmodus – bei unterschiedlicher, aber hoher Empfindlichkeit – ionisiert.

Eine Beschreibung der vorhandenen funktionellen Gruppen und anderer Eigenschaften, wie sie in den folgenden Kreisdiagrammen gezeigt werden, geben einen weiteren molekularen Einblick, der die Anwendung von effizienter SFC-ESI-MS in verschiedenen Disziplinen ermöglicht:

a) Verbindungen, die nur im **positiven Ionenmodus** nachgewiesen werden

Abbildung 2 zeigt die Art (in Anzahl und Prozentsatz) der funktionellen Gruppen in den 88 Verbindungen, die nur im Positiv-Ionen-Modus nachgewiesen wurden. In etwa der Hälfte von ihnen sind Amino- und Carbonylgruppen vorhanden und in einem Viertel Hydroxylgruppen und in einem Viertel enthalten Stickstoff als Heteroatom in (aromatischen) Ringsystemen. Die Verbindungen in einem logP-Bereich von -4,5 bis +6,2 waren sehr empfindlich nachweisbar und ihre Identität ist in Tabelle S1 im Anhang aufgeführt. Dabei konnten 65 Verbindungen mit einem LOD unter 0,5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule), 20 Verbindungen mit einem LOD unter 5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) und 3 Verbindungen mit einem LOD unter 10 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) nachgewiesen werden.

b) Verbindungen, die nur im **negativen Ionenmodus** nachgewiesen werden

Abbildung 3 zeigt die Art (in Anzahl und Prozentsatz) der funktionellen Gruppen in den 30 Verbindungen, die nur im Negativ-Ionen-Modus nachgewiesen wurden. In etwa der Hälfte von ihnen sind Hydroxyl- und Carboxylgruppen und in einem Viertel Carbonyl- und Aminogruppen vorhanden. Die Verbindungen in einem logP-Bereich von -3,4 bis +7,4 waren sehr empfindlich nachweisbar und ihre Identität ist in Tabelle S2 im Anhang aufgeführt. Dabei konnten 21 Verbindungen mit einem LOD unter 0,5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) und 9 Verbindungen mit einem

LOD unter 5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) nachgewiesen werden.

c) Verbindungen, die sowohl im **positiven als auch im negativen Detektionsmodus - mit ähnlicher Empfindlichkeit** - nachgewiesen werden

Abbildung 4 zeigt die Art (in Anzahl und Prozentsatz) der funktionellen Gruppen in den 27 Verbindungen, die sowohl im positiven als auch im negativen Detektionsmodus – bei ähnlicher Empfindlichkeit – nachgewiesen wurden. In mehr als der Hälfte der Verbindungen sind Amino- und Carbonylgruppen vorhanden und in etwa einem Drittel der Verbindungen sind Amido-, Hydroxyl- und/oder Carboxylgruppen. 7 Verbindungen enthalten Stickstoff als Heteroatom in (aromatischen) Ringsystemen und 6 Verbindungen enthalten eine Harnstoff-Untergruppe. Die Verbindungen in einem logP-Bereich von -1,6 bis +4,4 waren sehr empfindlich nachweisbar und ihre Identität ist in Tabelle S3 im Anhang aufgeführt. Dabei konnten 24 Verbindungen mit einem LOD unter 0,5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) und 3 Verbindungen mit einem LOD unter 5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) nachgewiesen werden.

d) Verbindungen, die sowohl im **positiven als auch im negativen Detektionsmodus - mit unterschiedlicher, aber hoher Empfindlichkeit** - nachgewiesen werden

Abbildung 5 zeigt die Art (in Anzahl und Prozentsatz) der funktionellen Gruppen in den 22 Verbindungen, die sowohl im positiven als auch im negativen Detektionsmodus – mit unterschiedlicher, aber hoher Empfindlichkeit – nachgewiesen wurden. Wiederum sind in mehr als der Hälfte der Verbindungen Aminogruppen vorhanden, aber auch in etwa einem Drittel der Verbindungen Amido-, Carbonyl- und/oder Carboxylgruppen. 7 Verbindungen enthalten Stickstoff als Heteroatom in (aromatischen) Ringsystemen. Die Verbindungen in einem logP-Bereich von -2,6 bis +4,3 waren sehr empfindlich nachweisbar und ihre Identität ist in Tabelle S4 im Anhang aufgeführt. Dabei konnten 8 Verbindungen mit einem LOD unter 0,5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule), 12 Verbindungen mit einem LOD unter 5 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) und 2 Verbindungen mit einem LOD unter 10 pmol (Substanz injiziert auf die Säule) nachgewiesen werden.

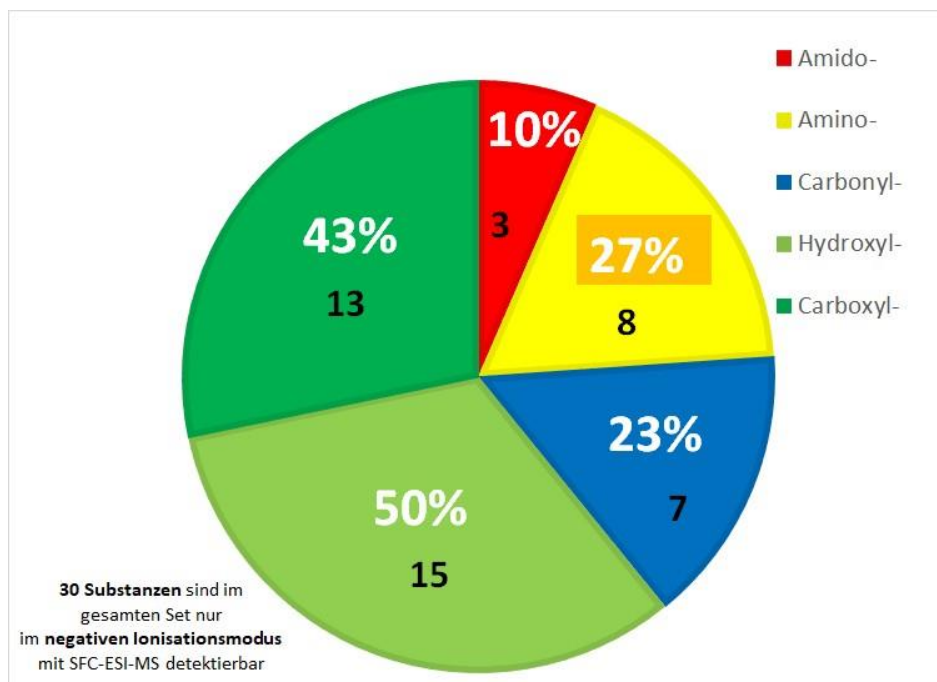


Abb. 3: Illustration von funktionellen Gruppen enthalten in Substanzen die ausschließlich im negativen Ionisationsmodus mit SFC-ESI-Orbitrap-MS detektierbar waren.

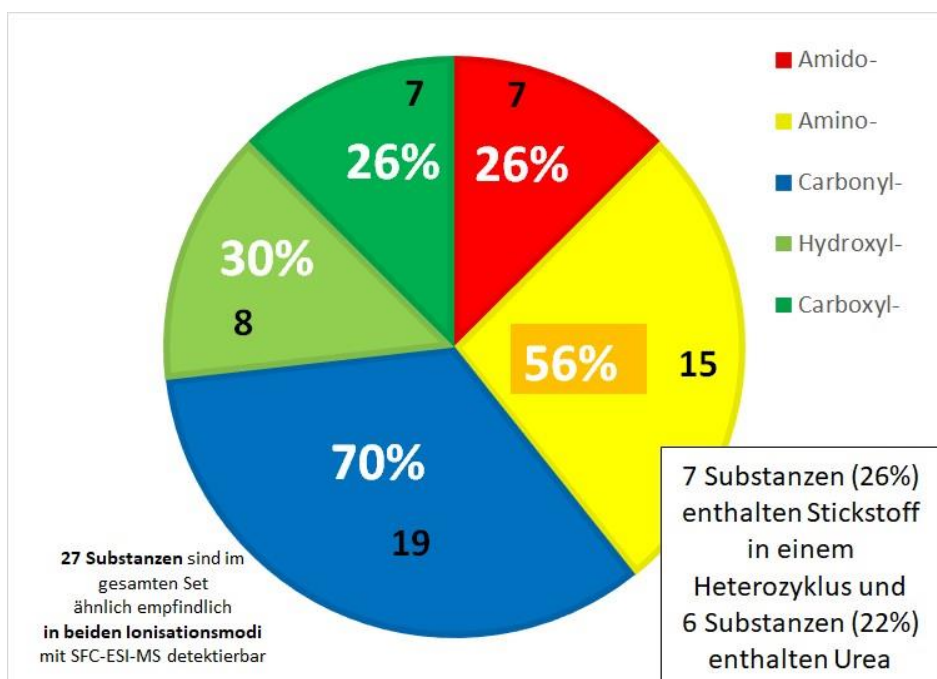


Abb. 4: Illustration von funktionellen Gruppen enthalten in Substanzen die gleich empfindlich in beiden Ionisationsmodi mit SFC-ESI-Orbitrap-MS detektierbar waren.

Standpunkt zum Screening

Organische Moleküle mit verschiedenen funktionellen Gruppen und unterschiedlichen Polaritäten können mit moderner SFC-ESI-MS im pos/neg-Switching Ansatz in einem weiten Feld von detektierten Ionenmassen sehr empfindlich gescreent werden.

Die im Positivmodus nachweisbaren Verbindungen enthalten überwiegend Amino- und Carbonylgruppen sowie

Stickstoff in einem Heterozyklus (und einige in Harnstoff). Die im positiven Ionisierungsmodus erfassten Moleküle enthalten oft auch Hydroxyl- und Amidogruppen.

Die im Negativmodus nachweisbaren Verbindungen enthalten überwiegend Carboxy- und Hydroxylgruppen. Die im negativen Ionisierungsmodus erfassten Moleküle enthalten häufig auch Amino- und Carbonylgruppen.

Zusammenfassung und Ausblick

Die komplementäre chromatographische Strategie 'SFC' mit ihren speziellen (polaritätserweiterten) Trennfähigkeiten und weitreichende NTS-Informationen sowie niedrigen Detektionsgrenzen sollte nun wirklich als neuer Goldstandard im Non-Target Screening be- und gehandelt werden [6].

Darüber hinaus dürften SFC-Anwendungen ermutigt sein, diese Option häufiger für wirklich anspruchsvolle chromatographische Trennungen (jetzt auch im Spurenbereich) in Betracht zu ziehen.

Danksagung

Wir danken Thermo Fisher Scientific für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die gefundenen Lösungen (insbesondere, da wir die SFC-Anlage eines anderen Anbieters verwendet haben). Besonderer Dank gilt dabei Sylvia Grosse, Claudia Halter, Albert Hermann, Reza Dabiri, Olaf Scheibner und Frank Steiner für technische Unterstützung und fruchtbare Diskussionen. Wir danken ferner dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung des Projekts RIKovery (Förderkennzeichen: 02WV1569E) im Rahmen der Fördermaßnahme "Wassertechnologien: Wiederverwendung" (WavE II).

Referenzen

- [1] S. Bieber und T. Letzel (2015) *SFC-Superkritische Fluid Chromatographie oder Science Fiction Chromatographie?*; Analytik News, 08.01.2015
- [2] S. Bieber, H.-G. Döteberg, G. Greco, S. Kromidas und T. Letzel (2016) *HPLC-Tipps Band 3: Gradient, HILIC, SFC und Trends in der HPLC* (Pirrot-Verlag; Editor: S. Kromidas), 22.11.2016) ISBN 978- 3-937436-58-6.
- [3] S. Bieber und T. Letzel (2015) *Potential der SFC: Von analytischer, präparativer, chiraler und achiraler Trennung*, Analytik News, 02.07.2015
- [4] S. Bieber, G. Greco, S. Grosse, and T. Letzel (2017) *RPLC-HILIC and SFC with mass spectrometry: Polarity-extended organic molecule screening in environmental (water) samples*; Analytical Chemistry, 89, 7907–7914.
- [5] S. Bieber and T. Letzel (2018) *Orthogonal separation techniques to analyze (very) polar molecules in water samples: Assessing SFC and*

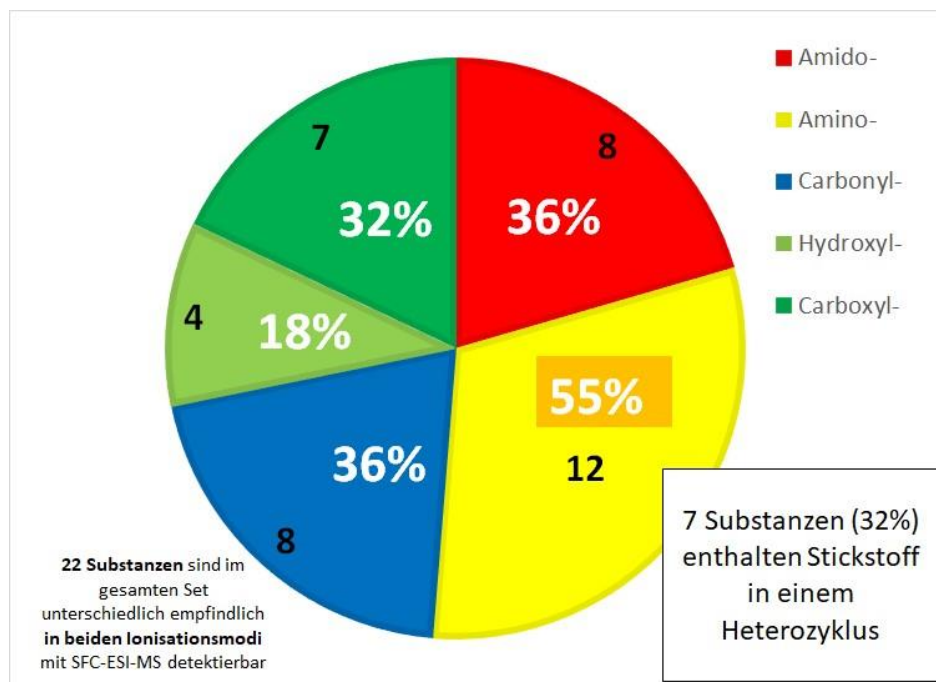


Abb. 5: Illustration von funktionellen Gruppen enthalten in Substanzen die unterschiedlich empfindlich in beiden Ionisationsmodi mit SFC-ESI-Orbitrap-MS detektierbar waren.

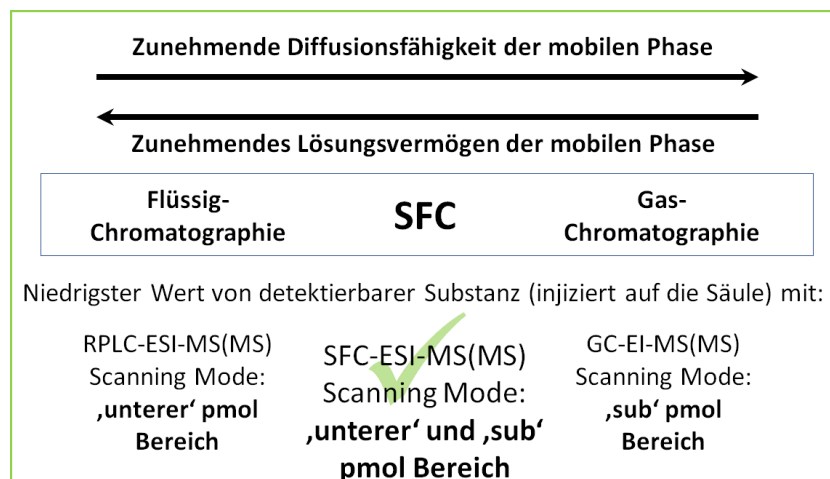


Abb. 6: Finale Illustration der Charakteristika von Flüssigchromatographie (LC), der superkritischen Fluidchromatographie (SFC) und der Gaschromatographie (GC) in Bezug auf Diffusionsfähigkeit und Löslichkeit (der genutzten mobilen Phasen sowie auf Sensitivität (des genutzten massenspektrometrischen Screenings).

Reversed-Phase LC-HILIC; LCGC Europe 31(11): 602-606.

- [6] S. Bieber and T. Letzel (2021) *Achiral SFC Separations - Gold Standard for the Next Generation of Non-Target Screening*; Analytical Science Advances, -10.
- [7] S. Bieber, T. Letzel, and A. Krueve (2023) *Electrospray Ionization Efficiency Predictions and analytical standard free quantification for SFC/ESI/HRMS*; Journal of the American Society for Mass Spectrometry 34(7), 1511–1518.
- [8] S. Bieber and T. Letzel (2022) *Technical Note – Serial RPLC-HILIC cou-*

pling hyphenated with Orbitrap mass spectrometric detection: Next generation in Non-Target Screening, AFIN-TS Forum, November (8): 1-10.

please cite as:

Bieber S. and Letzel T. (2023) *Technical Note – Superkritische Fluidchromatographie gekoppelt mit einem Orbitrap Exploris 120 Massenspektrometer - Quantitativer Blickpunkt*, AFIN-TS Forum; August (9) Deutsch: 1-14.



Anhang

Bieber S. and Letzel T. (2023) Technical Note – Superkritische Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Orbitrap Exploris 120 Massenspektrometer - Quantitativer Blickpunkt, AFIN-TS Forum; August (9) Deutsch: 1-14.

Tabelle S1: Substanzname, InChi Key und logP Wert der Substanzen die bei Nutzung von SFC-ESI-MS ausschließlich im **positiven Ionisationsmodus** detektierbar waren mit LODs a) unter 0.5 poc, b) unter 5 poc, und c) unter 10 poc.

Substanz	InChi Key	logP
a) LOD unter 0.5 poc		
Betaine	KWIUHFFTVRNATP-UHFFFAOYSA-O	-4,5
Acetylcholine	OIPILFWXSMYKGL-UHFFFAOYSA-N	-3,9
Chlormequate	JUZXDNPBRPUIOR-UHFFFAOYSA-N	-3,3
Methyl scopolamine	LZCOQTDXKCNBEE-JNUAFUKGSA-N	-3,3
[2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium	AIUAMYPUYUQVEM-UHFFFAOYSA-N	-3,2
Lisinopril	RLAWWYSOJDYHDC-BZSNMDCSA-N	-2,9
Tranexamic acid	GYDJEQRTZSCIOI-UHFFFAOYSA-N	-2,0
Butyl scopolamine	YBCNXCRZPWQOBR-FAQYLHNASA-N	-1,9
Triethanolamine	GSEJCLTVZPLZKY-UHFFFAOYSA-N	-1,9
Moroxydine	KJHOZAZQVVKILO-UHFFFAOYSA-N	-1,6
3-Methylamino-1,2-propanediol	WOMTYMDHLQTCHY-BYPYZUCNSA-O	-1,5
1-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-propanol	ZFECCLNALETDE-UHFFFAOYSA-N	-1,5
Melamine	JDSHMPZPIAZGSV-UHFFFAOYSA-N	-1,4
2,4-Diamino-6-(hydroxymethyl)pteridine	CYNARAWTVHQHDI-UHFFFAOYSA-N	-1,4
Tetraethylene glycol	UWHCKJMYHZGTIT-UHFFFAOYSA-N	-1,4
Metformin	XZWYZXLIPXDOLR-UHFFFAOYSA-N	-1,3
Gabapentin	UGJMXCAKCUNAIE-UHFFFAOYSA-N	-1,1
Ethephon	UDPGUMQDCGORJQ-UHFFFAOYSA-N	-1,0
Omethoate	PZXOQEXFMJCDPG-UHFFFAOYSA-N	-0,9
Triethylene glycol monomethyl ether	JLGLQAWTXXGVEM-UHFFFAOYSA-N	-0,7
1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone	CYSGHNMQYZMIA-UHFFFAOYSA-N	-0,6
Triisopropanolamine	SLINHMUFWFWMU-UHFFFAOYSA-N	-0,6
Caffeine	RYYVLZVUVIJVGH-UHFFFAOYSA-N	-0,6
Ethyl 2-oxo-1-pyrrolidineacetate	AQZWKPDVWVJWRY-UHFFFAOYSA-N	-0,4
4,4'-(Oxydi-2,1-ethanediyl)bismorpholine	ZMSQJMSLXVTKN-UHFFFAOYSA-N	-0,3
Minoxidil	ZIMGGGWCDYVHOY-UHFFFAOYSA-N	-0,3
2-Piperidineethanol	PTHDBHDZSMGHKF-ZETCQYMNSA-O	0,1
Atenolol	METKIMKYRPLGS-UHFFFAOYSA-N	0,2
Dimethoate	MCWXGJITAZMZEV-UHFFFAOYSA-N	0,3
Phenformin	ICFJFFQQTFMIBG-UHFFFAOYSA-N	0,3
2-Aminopyridine	ICSNLGPSRYBMBD-UHFFFAOYSA-N	0,5
N,N-Dimethylethylamine	DAZXVJBIRMWXJP-UHFFFAOYSA-N	0,6
Arecolin	HJJPJSXJAXAIPN-UHFFFAOYSA-N	0,7
2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol	VDVUCLWJZJHFAV-UHFFFAOYSA-N	0,9
Primidone	DQMZLTXERSFPNB-UHFFFAOYSA-N	0,9
Trimethoprim	IEDVJHCEMCRBQM-UHFFFAOYSA-N	0,9
Dapson	MQJKPEGWNLWLTK-UHFFFAOYSA-N	1,0
Tris(2-chloroethyl) phosphate	HQUQLFOMPYWACS-UHFFFAOYSA-N	1,3

Substanz	InChi Key	logP
1,2,2,6,6-Pentamethyl-4-piperidinol	NWHNXXMYEICZAT-UHFFFAOYSA-N	1,4
Azamethiphos	VNKBWQZTQIWDV-UHFFFAOYSA-N	1,5
Oxadixyl	UWVQIROCRJWDKL-UHFFFAOYSA-N	1,8
Pipamperone	AXKPF0AXAHJUAG-UHFFFAOYSA-N	1,9
2,6-Dichlorbenzamid	JHSPCUHPSIUQRB-UHFFFAOYSA-N	2,0
Carbofuran	DUEPRVBVGDRKAG-UHFFFAOYSA-N	2,3
2-Aminoheptane	VSRBKQNFZQRBM-UHFFFAOYSA-N	2,3
TCPP	KVMPUXDNESXNOH-UHFFFAOYSA-N	2,6
Diphenamid	QAHF0PILNICLA-UHFFFAOYSA-N	2,9
Metazachlor	STEPQTYSZVCJPV-UHFFFAOYSA-N	3,0
Dimethylsebacate	ALOUNLDAKADEEB-UHFFFAOYSA-N	3,0
Chlorfenvinphos	FSAVDKDHPDSCSTO-UHFFFAOYSA-N	3,1
Metolachlor	WVQBLGZPHOPPFO-UHFFFAOYSA-N	3,1
Nonanoic acid	FBUKVWPVBMHYJY-UHFFFAOYSA-N	3,1
Molinate	DEDOGXGGQYYMW-UHFFFAOYSA-N	3,2
Diphenhydramine	ZZVUWRFHKOJYTH-UHFFFAOYSA-N	3,3
Testosteron	MUMGG0ZAMZWBJJ-DYKIIIFRCSA-N	3,3
Picoxystrobin	IBSNKSODLGJUMQ-UHFFFAOYSA-N	3,6
Diazinon	FHIVAFMUCKRCQO-UHFFFAOYSA-N	3,8
17-Alpha-Ethinylestradiol	BFPYWDHMRZLRN-SLHNCBLASA-N	3,9
Fluoxetine	RTHCYVBBDHJXIQUHFFFAOYSA-N	4,2
Fenoxycarb	HJUFTIJOISQSKQ-UHFFFAOYSA-N	4,3
Pyraclostrobin	HZRSNVGNWUDEFX-UHFFFAOYSA-N	4,7
Amitriptyline	KRMDCWKBEZIMAB-UHFFFAOYSA-N	4,8
Quinoxyfen	WRPIRSINYZBGPK-UHFFFAOYSA-N	5,0
Bis(2-ethylhexyl)amine	SAIKULLUBZKPPA-UHFFFAOYSA-N	5,9
b) LOD unter 5 poc		
L-Tyrosine	OUYCCASQSFEME-QMMMGP0BSA-N	-2,3
pipemic acid	JOHZPMXAZQZXHR-UHFFFAOYSA-N	-2,1
Guanylurea	SQSPRWMERUQXNE-UHFFFAOYSA-N	-1,9
L-Hydroxyprolin	PMMYEEVYMWASQN-UHFFFAOYSA-N	-1,9
Cytosine	OPTASPLRGRRNAP-UHFFFAOYSA-N	-1,7
Dacarbazine	OMJKFYKNWZZKTK-UXBLZVDNSA-N	-1,7
Ethylendiamine-N,N,N',N'-tetraacetonitrile	FDWRKVKXYZRYOD-UHFFFAOYSA-N	-1,7
L-Phenylalanin	COLNVLDHVKWLRT-UHFFFAOYSA-N	-1,5
Dexrazoxane	BMKDZUISNHGIBY-UHFFFAOYSA-N	-1,4
N,N'-Ethylenebisacetamide	WNYIBZHOMJZDKN-UHFFFAOYSA-N	-1,1
Oxypurinol	HXNFUBHNUDHIGC-UHFFFAOYSA-N	-0,9
Lenalidomid	GOTYRUGSSMKFNF-UHFFFAOYSA-N	-0,7
2-Pyrrolidinone	HNJBEVLQSNELDL-UHFFFAOYSA-N	-0,6
Methylisothiazolinone	BEGLCMHJXHJLR-UHFFFAOYSA-N	0,0
2-Benzylimidazoline	JIVZKJJOZQXQB-UHFFFAOYSA-N	1,2
2-Ethyl-1-hexylamine	LTHNHFOGQMKPOV-UHFFFAOYSA-N	2,4
DEET	MMOXZBCLCQITDF-UHFFFAOYSA-N	2,5
Butylated hydroxyanisole	MRBKEAMVRSLOPH-UHFFFAOYSA-N	3,2
Methyl cedryl ketone	YBUIAJZFOGJLJ-UHFFFAOYSA-N	4,0
Di(benzothiazol-2-yl)disulphide	AFZSMODLJCVPP-UHFFFAOYSA-N	6,2

Substanz	InChi Key	logP
c) LOD unter 10 poc		
1-(3-Aminopropyl)imidazole	KDHWOCLBMVSZPG-UHFFFAOYSA-N	-0,6
Ciprofloxacin	MYSWGUAQZAJOSK-UHFFFAOYSA-N	-0,8
Clavulanic acid	HZZVJAQRINQKSD-PBFISZAISA-N	-1,5

Tabelle S2: Substanzname, InChi Key und logP Wert der Substanzen die bei Nutzung von SFC-ESI-MS ausschließlich im **negativen** Ionisationsmodus detektierbar waren mit LODs a) unter 0.5 poc, und b) unter 5 poc.

Substanz	InChi Key	logP
a) LOD unter 0.5 poc		
Nε-Acetyl-L-lysine	DTERQYGMUDWYAZ-UHFFFAOYSA-N	-2,8
Cyanuric acid	ZFSLODLOARGLH-UHFFFAOYSA-N	-1,0
Methanesulfonic acid	AFVFQIVMOAPDHO-UHFFFAOYSA-N	-0,9
Hydrochlorothiazide	JZUFKLXOESDKRF-UHFFFAOYSA-N	-0,6
Sucralose	BAQAVOSOZGMPRM-QBMZZYIRSA-N	-0,5
Hexyl-β-D-glucoside	JVAZJLFFSJARQM-OZRWLHRGSA-N	0,1
4-Hydroxybenzenesulfonic acid	FEPBITJSIHRMRT-UHFFFAOYSA-N	0,9
Syringic acid	JMSVCTWVEWCHDZ-UHFFFAOYSA-N	1,0
Vanillic acid	WKOLLVMJNQIZCI-UHFFFAOYSA-N	1,4
Ferulic acid	KSEBMYQBYZTDHS-UHFFFAOYSA-N	1,5
Pentafluoropropionic acid	LRMSQVBRUNSOJL-UHFFFAOYSA-N	1,6
Picaridin	QLHULAHOXSSASE-UHFFFAOYSA-N	1,6
Methylparaben	LXCFILQKQLGQFO-UHFFFAOYSA-N	1,7
Chlorpropham	CWJSHJYOPWUGX-UHFFFAOYSA-N	3,2
Aciflourofen	NUFNQYOELLVIPL-UHFFFAOYSA-N	4,6
Triclosan	XEFQLINVKFYRCS-UHFFFAOYSA-N	4,7
Triclocarban	ICUTUKXCWQYESQ-UHFFFAOYSA-N	4,9
Myristic acid	TUNFSRHOTWDNC-UHFFFAOYSA-N	5,4
Linoleic acid	OYHQOLUKZRVRQ-HZJYTRNSA-N	6,4
Stearic acid	QIQXTHQIDYTFRH-UHFFFAOYSA-N	7,2
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	HXIQYSLFEXIOAV-UHFFFAOYSA-N	7,4
b) LOD unter 5 poc		
Maltose	GUBGYTABKSRVRQ-QUYVBRFLSA-N	-3,4
Glutamate	WHUUTDBJXRKMK-UHFFFAOYSA-N	-3,2
D(-) Ribose	SRBFZHDQGSBBOR-SOOFDHNKSA-N	-2,5
Allantoin	POJWUDADGALRAB-UHFFFAOYSA-N	-2,2
Iopromide	DGAIEPBNLOQYER-UHFFFAOYSA-N	-2,1
Sulfamic acid	IICRCGMVDHOTQ-UHFFFAOYSA-N	-1,4
Hexanoic acid	FUZZWVXGSPDMH-UHFFFAOYSA-N	1,8
Estrone	DNXHEGUUPJUMQT-UHFFFAOYSA-N	3,1
Bisphenol A	IISBAFLAFKSPIT-UHFFFAOYSA-N	3,3

Tabelle S3: Substanzname, InChi Key und logP Wert der Substanzen die bei Nutzung von SFC-ESI-MS sowohl im **positiven als auch im negativen Detektionsmodus - mit ähnlicher Empfindlichkeit** -detektiertbar waren mit LODs a) unter 0.5 poc, und b) unter 5 poc.

Substanz	InChi Key	logP
a) LOD unter 0.5 poc		
N,N'-Trimethyleurea	NQPJDJVGBDHCAD-UHFFFAOYSA-N	-1,3
Adenosine	OIRDTQYFTABQOQ-UHFFFAOYSA-N	-1,1
Panthenol	SNPLKNRPJHDVJA-ZETCQYMHSA-N	-0,9
Sotalol	ZBMZVLHSJCTVON-UHFFFAOYSA-N	-0,4
Asulam	VGPYEHKOIGNJKV-UHFFFAOYSA-N	-0,3
1-(3-Carboxypropyl)-3,7-dimethyl-xanthin	WKASGTGXOGALBG-UHFFFAOYSA-N	-0,2
Cimetidine	AQIXAKUUQRKLND-UHFFFAOYSA-N	-0,1
Enalapril	GBXSMTUPTTWBMN-XIRDDKMYSA-N	-0,1
Sulfamethoxazole	JLKIGFTWXXRPMT-UHFFFAOYSA-N	0,9
Acetaminophen	RZVAJINKPMORJF-UHFFFAOYSA-N	0,9
Chloridazon	WYKYKTKDBLFHCY-UHFFFAOYSA-N	1,1
Benzisothiazolinone	DMSMPAJRVJJAGA-UHFFFAOYSA-N	1,3
Carbetamid	AMRQXHFZNZFDCH-VIFPVBQESA-N	1,7
4-Methylumbelliferone	HSHNITRMYYLLCV-UHFFFAOYSA-N	1,8
Monuron	BMLIZLVNXYGCK-UHFFFAOYSA-N	1,9
Chlorsulfuron	VJYIFXVZLXQVHO-UHFFFAOYSA-N	2,3
Chlortoluron	JXCGFZXSOMJFOA-UHFFFAOYSA-N	2,4
Budesonid	VOVIALXJUBGFJZ-VXKMTNQYSA-N	2,5
Chlorbromuron	NLYNUTMZTCLNOO-UHFFFAOYSA-N	3,1
Linuron	XKJMBINCVNINCA-UHFFFAOYSA-N	3,2
Oxybenzone	DXGLGDHPHMLXJC-UHFFFAOYSA-N	3,6
Valsartan	ACWBQPMHZXGDFX-UHFFFAOYSA-N	3,7
TDCPP	ASLWPAWFJZFCKF-UHFFFAOYSA-N	4,3
Candesartan	HTQMVQVXFRQIKW-UHFFFAOYSA-N	4,4
b) LOD unter 5 poc		
Trans-1-acetyl-4-hydroxy-L-prolin	BAPRUDZDYCKSOQ-WDSKDSINSA-N	-1,6
Pregabalin	AYXYPKUFHZROOJ-ZETCQYMHSA-N	-1,4
Naproxen	CMWTZPSULFXXJA-UHFFFAOYSA-N	3,3

Tabelle S4: Substanzname, InChi Key und logP Wert der Substanzen die bei Nutzung von SFC-ESI-MS sowohl im positiven als auch im negativen Detektionsmodus - mit unterschiedlicher aber hoher Empfindlichkeit -detektierbar waren mit LODs a) beide Modi unter 0.5 poc, und b) ein Modus unter 0.5 poc und ein Modus unter 5 poc und c) beide Modi unter 5poc.

Substanz	InChi Key	logP
a) LOD beide Polaritäten unter 0.5 poc		
Ritalinic acid	INGSNVSERUZOAK-UHFFFAOYSA-N	-2,4
Dicyandiamide	QGBSISYHAICWAH-UHFFFAOYSA-N	-1,2
Bisoprolol-M3	WONQRVASZHJNFS-UHFFFAOYSA-N	-1,0
Dorzolamide	IAVUPMFITXYVAF-XPUUQCRSA-N	-0,2
1H-Benzotriazol	QRUDEWIWKLJBPS-UHFFFAOYSA-N	1,0
Metobromuron	WLFQDEVORAMCIM-UHFFFAOYSA-N	2,4
Indomethacin	CGIGDMFJXJATDK-UHFFFAOYSA-N	3,5
Metconazol	XWPZUHJBOLQNMN-UHFFFAOYSA-N	3,7
b) LOD Eine unter 0.5 poc und die andere unter 5 poc		
Miglitol	IBAQFPQHRJAVAV-ULAWRXDQSA-N	-2,6
Famotidin	XUFQPHANEAPMJ-UHFFFAOYSA-N	-2,0
Acamprosate	AFCGFAGUEYAMAO-UHFFFAOYSA-N	-1,2
4-Pyrimidinol	YBUMDUBHIJZ-UHFFFAOYSA-N	-1,1
N-Hydroxyethyl acrylamide	CNCOEDDPFOAUMB-UHFFFAOYSA-N	-0,6
6-Amino-1,3dimethyl-5-(formylamino)uracil	ZNDGAXCBZGSJGU-UHFFFAOYSA-N	-0,6
Adenin	GFFGJBXGBJISGV-UHFFFAOYSA-N	-0,1
Metribuzin	FOXFZRUHNHCZPX-UHFFFAOYSA-N	1,7
Carboxin	GYSSRZJIHXQEHQ-UHFFFAOYSA-N	2,1
Atrazine	MXWJVTOOROXGIU-UHFFFAOYSA-N	2,6
Haloxypop	GOCUAIYOYBLQRH-UHFFFAOYSA-N	4,2
Diclofenac	DCOPUUMXTXDBNB-UHFFFAOYSA-N	4,3
a) LOD beide Polaritäten unter 5 poc		
2-Phenyl-5-benzimidazole	UVCJGUGAGLDPAA-UHFFFAOYSA-N	-0,1
Riboflavin	AUNGANRZJHBGPY-UHFFFAOYSA-N	-1,5