



Massenspektrometrie I

Grundlagen

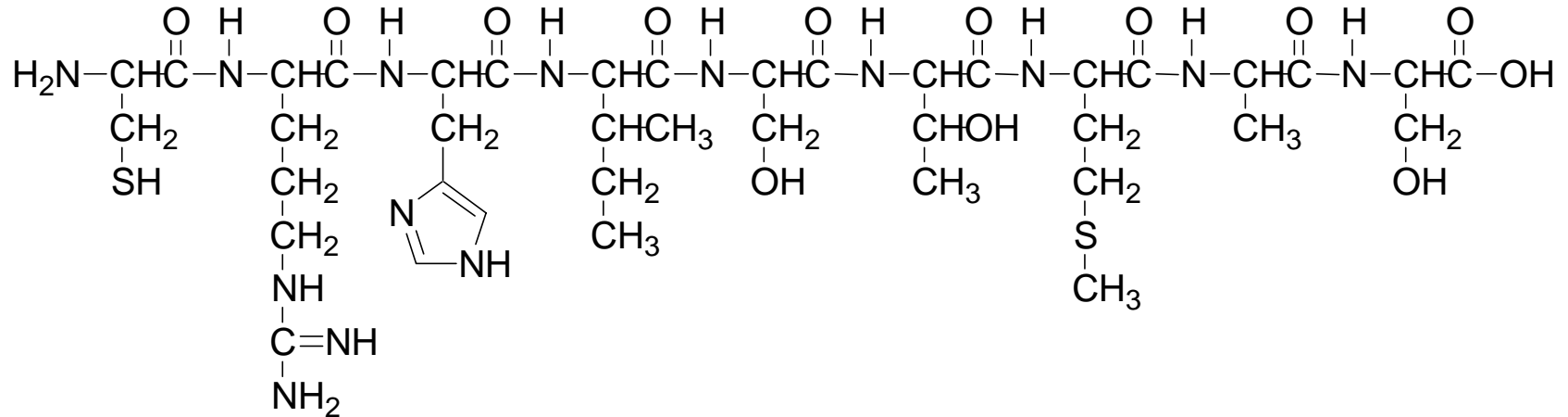
Geräteaufbau

ESI TOF MS

LCMS

Anwendungsbeispiele

Analytische Fragestellung I



Summenformel: $C_{39}H_{67}N_{14}O_{13}S_2$

=> Molare Masse: 1004,18 g/mol

Massenspektrum:

- Summenformel über Massenpeak
- Primärstruktur über Fragmentierungsmuster
- Schnelle Erkenntnis
- Keine Infos über Sekundär und Tertiärstruktur

Prinzip der Massenspektrometrie

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV_s$$

E_k = kinet. Energie

m = Masse

v = Geschwindigkeit

q = Ladung

V_s = Beschleunigungspotential



Erzielbare analytische Information

- Analyse der Molmasse
- Untersuchung von Molekülfragmenten
- Bestimmung von Isotopenzusammensetzungen
- Beitrag zur Aufklärung der Primärstruktur von Substanzen

Vorteile:

- Schnell
- Hohe Nachweisempfindlichkeit
- Quantifizierbar
- Kombinationsmöglichkeit mit anderen analytischen Methoden

Nachteile:

- Teure Hardware
- Probe wird zerstört
- Möglichkeit komplexer Spektren (aufwendig Auswertung)
- Probe muss sauber sein

Molmasse

Beispiel: CCl_4

$$\begin{aligned} M &= 12,011 + 4 \times 35,453 \text{ g/mol} \\ &= 153,823 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

C: 98,90 % ^{12}C + 1,10 % ^{13}C

Cl: 75,77 % ^{35}Cl + 24,23 % ^{37}Cl

$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_4$: M = 151,875 g/mol

$^{13}\text{C}^{35}\text{Cl}_4$: M = 152,879 g/mol

$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}$: M = 153,872 g/mol

$^{13}\text{C}^{35}\text{Cl}_3^{37}\text{Cl}$: M = 154,876 g/mol

$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl}_2$: M = 155,870 g/mol

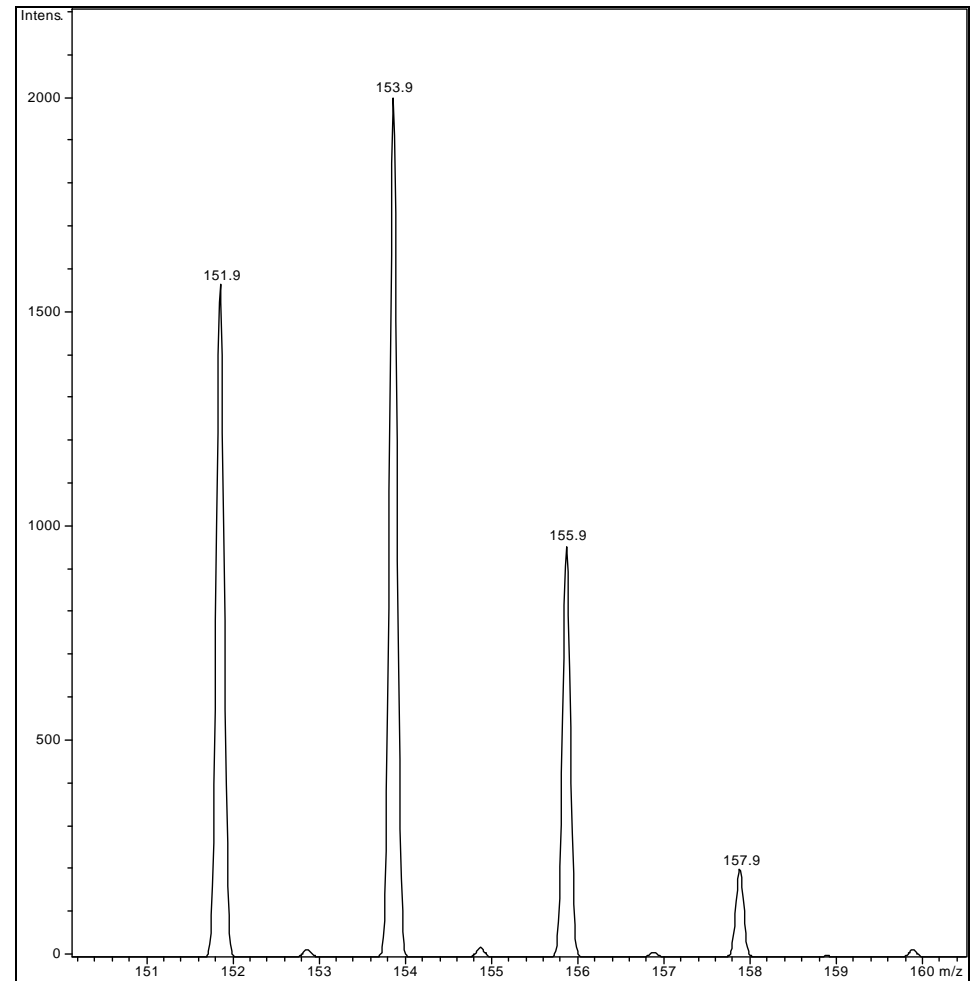
$^{13}\text{C}^{35}\text{Cl}_2^{37}\text{Cl}_2$: M = 156,873 g/mol

$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}_3$: M = 157,867 g/mol

$^{13}\text{C}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}_3$: M = 158,870 g/mol

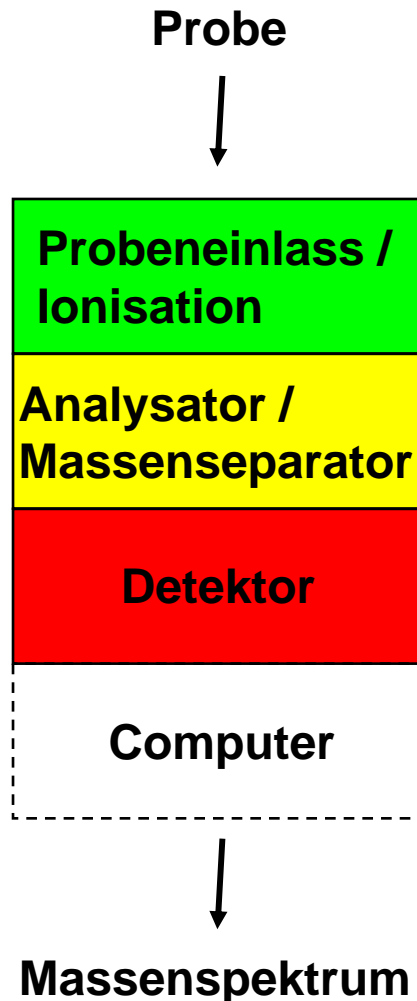
$^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}_4$: M = 159,864 g/mol

$^{13}\text{C}^{37}\text{Cl}_4$: M = 160,867 g/mol



Simuliertes Massenspektrum von CCl_4

Schematischer Aufbau Massenspektrometer

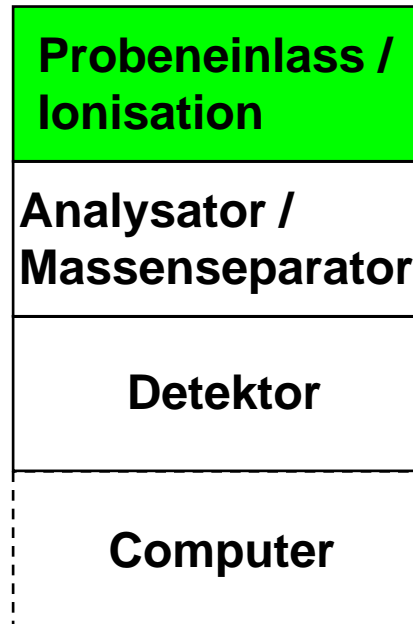


Sehr gutes Vakuum erforderlich, da Stöße mit anderen Molekülen Energie und damit Masseinfo verfälschen.
Mittlere freie Weglänge ergibt sich aus:

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2} p \sigma} \approx \frac{0,66}{p[\text{Pa}]} \text{cm}$$

Probeneinlass / Ionisation

Aufgaben:



Biomoleküle liegen üblicherweise nicht als geladene Teilchen in der Gasphase vor. Daher müssen sie in diese überführt und ionisiert werden.

Den ionisierten Teilchen muss eine definierte kinetische Energie zu geführt werden, daher werden sie in einem Spannungsfeld beschleunigt.

Bei und nach der Beschleunigung dürfen die Ionen nicht mit anderer Materie in Berührung kommen, sonst werden sie abgebremst. Um dies zu erreichen, wird Vakuum benötigt.

Die Sensitivität des Massenspektrometers hängt von der Effizienz der Ionenquelle ab.

Elektronenionisation:

- Probe muss gasförmig vorliegen. Daher nur für flüchtige Substanzen.
- Relativ harsche Methode, daher entstehen viele Fragmente.
- Möglicherweise keine Molekülionen
- Für GC MS geeignet

Chemische Ionisation:

- Probe muss gasförmig vorliegen. Daher nur für flüchtige Substanzen.
- Mildere Methode, abhängig vom Ionisationsgas geringere Fragmentierung.
- Für GC MS geeignet.

Fast Atom Bombardement:

- Probe liegt in nicht flüchtiger flüssiger Matrix (Glyzerin) vor.
- Durch die Anregung entstehen fast keine Ionen, es werden lediglich in Lösung befindliche Ionen in die Gasphase überführt.
- Auch für große Moleküle geeignet.
- Problem: Matrixmoleküle werden ebenfalls beschleunigt und erzeugen Untergrund.

Felddesorption:

- Geeignet für schwere nicht polare Substanzen.
- Schwierige Handhabung.
- Wird heute meist durch andere Desorptionsmethoden ersetzt.

MALDI (Matrix unterstützte Laser Desorptionsionisation):

- Kommt beim nächsten Mal dran.
- Sehr gut für sehr schwere Moleküle.

Thermosprayionisation:

- Die Probe liegt in einer Salz enthaltenden Lösung vor.
- Geeignet für die Kombination mit Flüssigchromatographie.

ESI (Elektronen Spray Ionisation)

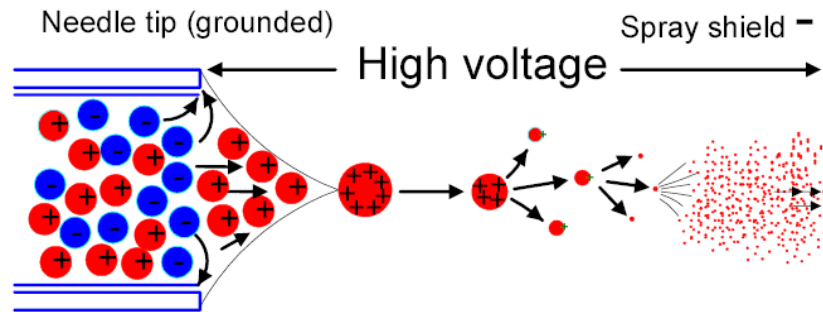


Abb. mit Genehmigung von Bruker Daltronics

Positiv:

- Sehr empfindlich
- Durch Mehrfachladung können sehr schwere Moleküle auch mit Geräten mit einem kleineren Massenmessbereich erfasst werden.
- Es können sowohl positive, als auch negative Molekülionen erzeugt werden.
- Fragmentierungen möglich und durch die Bedingungen eingeschränkt steuerbar.
- Für LCMS Kopplung geeignet.

Problematisch:

- Die Probe wird unter Atmosphärendruck ionisiert. Daher sehr hohe Anforderungen an die Vakuumanlage.

Schematischer Aufbau ESI Quelle

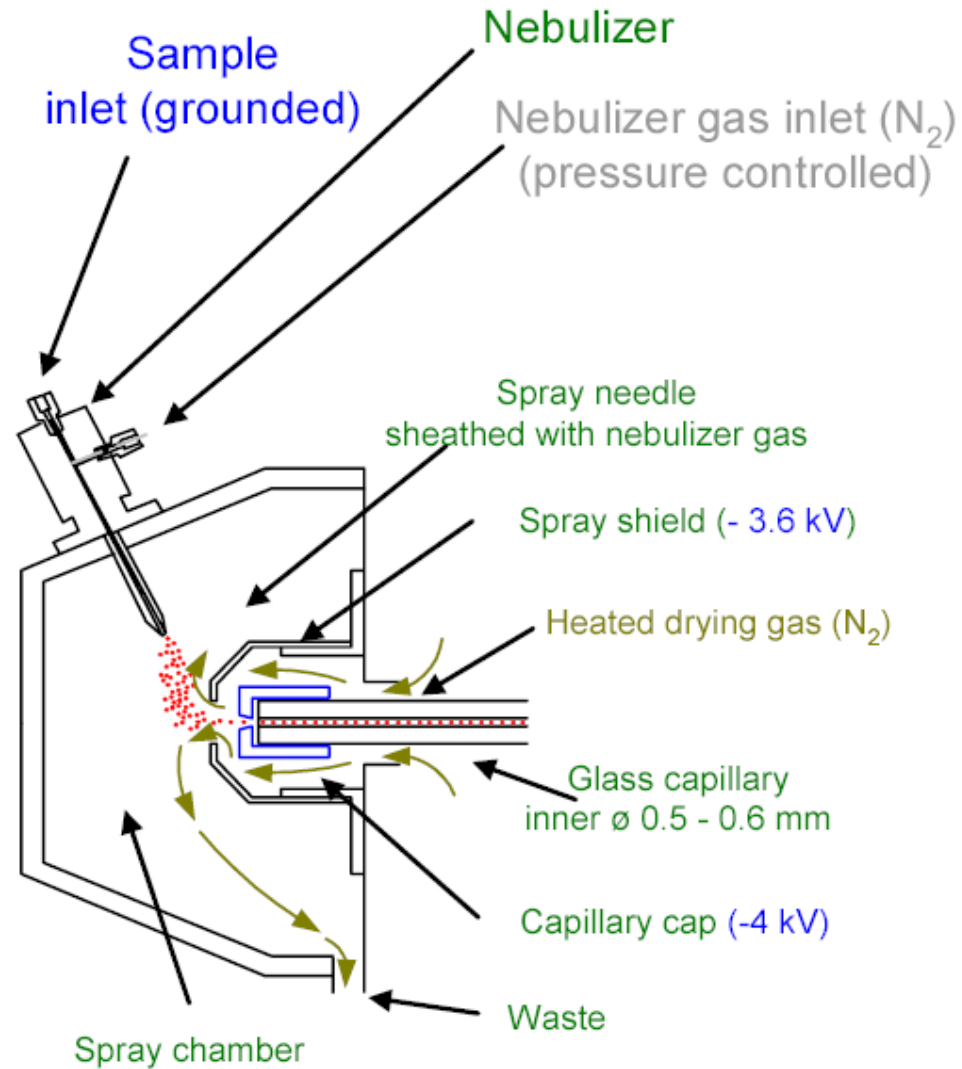


Abb. mit Genehmigung von Bruker Daltronics

APCI (Atmosphärendruck Chemische Ionisation)

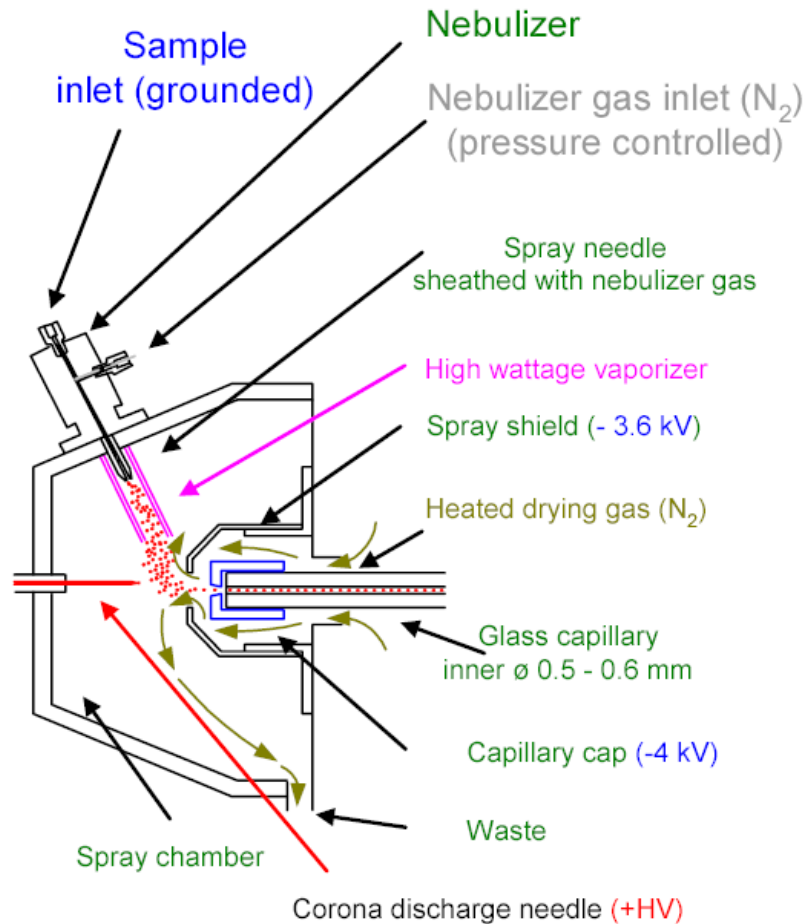
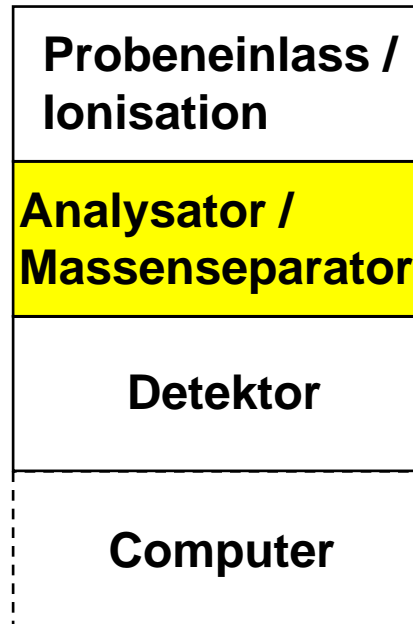


Abb. mit Genehmigung von Bruker Daltronics

- Positiv:
- Sehr empfindlich
- Im Gegensatz zu ESI werden nur einfach geladene Ionen erzeugt.
- Fast keine Fragmentierung, sehr mild.
- Für LCMS Kopplung geeignet.

- Problematisch:
- Die Probe wird unter Atmosphärendruck ionisiert. Daher sehr hohe Anforderungen an die Vakuumanlage.
- Nur für kleine Peptide geeignet.

Analysator / Massenseparator



Aufgaben:

Die gebildeten Ionen werden in diesem Bereich abhängig von ihrer Masse getrennt.

Das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers hängt von der Leistungsfähigkeit des Analysators ab.

Häufig werden mehrere Analysatoren (auch unterschiedlichen Typs) miteinander kombiniert und hintereinander geschaltet.

Das ist zum Beispiel für MS/MS Experimente erforderlich.

Ablenkmagnete

Es gilt:
$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV_s$$

Ein senkrecht darauf wirkendes Magnetfeld der Stärke B erzeugt eine Kraft F_M nach:

$$F_M = qvB$$

Diese Kraft bewirkt eine Ablenkung des Ions auf einem Kreisbahnsegment mit dem Radius r .

$$F_M = qvB = \frac{mv^2}{r} \Leftrightarrow qBr = mv$$

Bei konstantem Feld und vorgegebener Spannung folgen daher die Ionen einen bestimmten Radius abhängig von ihrer Masse:

$$r = \sqrt{\frac{2mV_s}{q}} B$$

Siehe 1. S. 101
Abb. 2.39

Einschränkungen der Auflösung

Leider werden die Ionen nicht exakt auf die gleiche Energie beschleunigt. Daher treffen sie mit leicht unterschiedlichem Radius auf.

Kleine Inhomogenitäten im Magnetfeld führen ebenfalls zur Verteilung und damit Verschlechterung der Signalschärfe.

Der Probeneinlass führt noch zu einer räumlichen Verteilung.

Siehe 1. S. 102
Abb. 2.40

Scan- und Detektionsvarianten

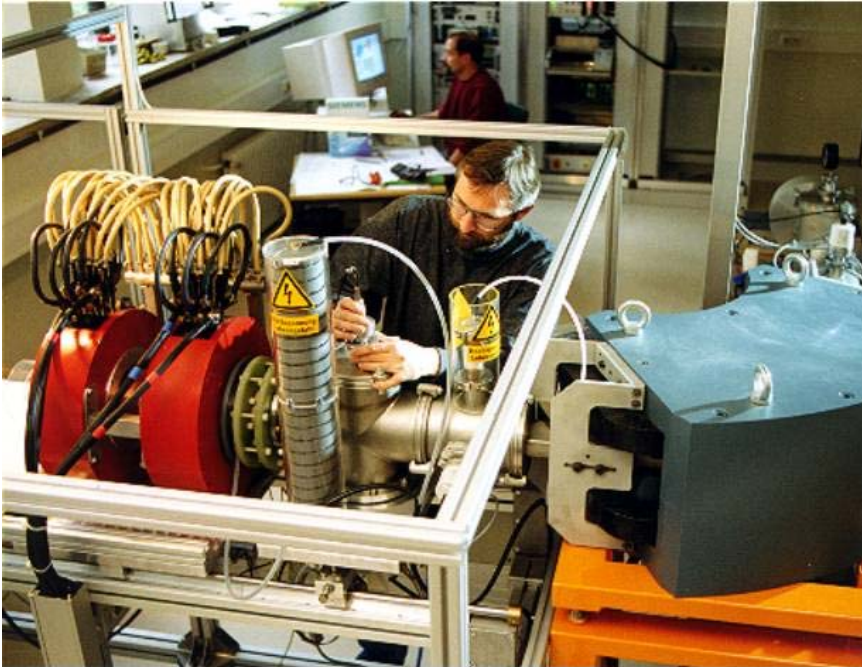
Siehe 1. S. 105
Abb. 2.45 2

Siehe 1. S. 105
Abb. 2.45 3

Hier wird nur eine Masse zur Zeit bestimmt. Durch Variation der Beschleunigungsspannung kann die zu untersuchende Masse variiert werden.

Es kann simultan ein ganzer Massenbereich gescannt werden.

Zusammenfassung Ablenkmagnete



- Älteste Analyserortechnik
- Geräte sind groß bis gigantisch
- Aufgrund der Größe extreme Anforderungen an die Vakuumanlage
- Kontinuierlicher Ionenstrom
- Auflösung und Ionenstrom sind nicht konstant sondern Funktion der Masse
- Verbesserung der Auflösung kann durch höheres Magnetfeld oder größeren Magnetradius erreicht werden.

Quadrupolmassenspektrometer

Siehe 1. S. 66
Abb. 2.4

Für Genießer:

$$\phi_{(x,y)} = \phi_0(x^2 - y^2)/r_0^2 = (x^2 - y^2)(U - V \cos \omega t)/r_0^2$$

U : Grundpotential

V : HF Wechselspannung

- Die Ionen durchfliegen einen Quadrupol, dessen Feld durch hochfrequente Wechselspannungen erzeugt wird.
- Dabei wird aus der geradlinigen eine schraubenförmige Bewegung induziert, die nur zum Detektor führt, wenn die angelegten Potentiale der gewünschten Masse entsprechen.
- Durch Variation von Grundpotential und HF Wechselspannung wird der Quadrupol für eine bestimmte Masse durchgängig.

Zusammenfassung Quadrupolgeräte

- Geräte können relativ klein und kompakt ausgelegt werden.
- Limitiert in der höchsten erkennbaren Masse bei ca. 4000 m/z (hier kann ES bzw. ESI weiterhelfen).
- Massenauflösung bestenfalls 3000 m/z.
- Kontinuierlicher Ionenstrom, aber es wird jeweils nur eine Masse zur Zeit gemessen.
- Komplettes Spektrum wird innerhalb von minimal 10^{-3} s erhalten.
- Daher für Kopplung sehr gut geeignet und Standardgerät.

Sonderfall Quadrupolionenfallen

Siehe 1. S. 73, 74
Abb. 2.11, 2.12

- In sich geknoteter Quadrupol, der Ionen aller zu untersuchenden Massen auf eine Achterbahn schickt.
- Durch anlegen eines variablen Hochfrequenzfeldes zwischen ein und Ausgang lassen sich nun selektiv Ionen herausfischen und detektieren.
- MS/MS/MS/MS... Experimente sind möglich.
- Bescheidene Vakuumanforderungen.

Flugzeitanalysatoren (TOF)

Siehe 1. S. 91
Abb. 2.30

Es gilt (wie immer):

$$E_k = \frac{mv^2}{2} = qV_s = zeV_s$$

Die benötigte Zeit um d zurückzulegen ergibt sich zu:

$$t = \frac{d}{v} \quad t^2 = \frac{m}{z} \left(\frac{d^2}{2V_s e} \right)$$

- Bei Flugzeitanalysatoren lässt sich aus den gemessenen t^2 direkt das m/z Verhältnis bestimmen.
- Je leichter ein Ion ist, desto schneller fliegt es.
- Extrem empfindlich
- Für die Bestimmung hoher Massen geeignet
- Gute Massenauflösung nur mit hohem technischen Aufwand zu erreichen.
- Meist mit MADLI gekoppelt und für Biomoleküle eingesetzt.
- Keine kontinuierliche Datenaufnahme möglich.

Zyklotronresonanz Massenspektrometrie

Siehe 1. S. 116
Abb. 2.50

Die Ionen werden entlang eines starken Magnetfeldes in eine Messkammer geschickt.

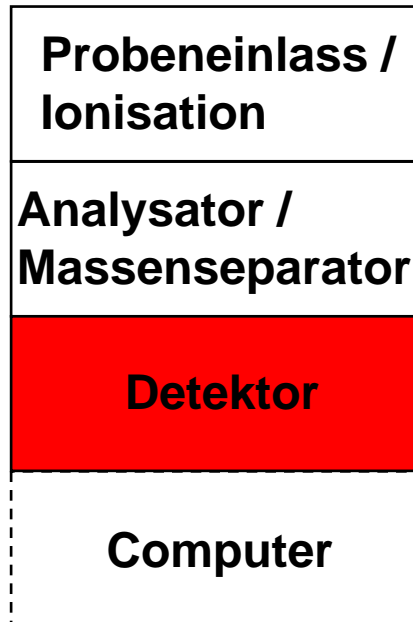
Durch ein angelegtes Hochfrequenzfeld werden Ionen einer bestimmten Masse so von der z-Achse abgelenkt, dass sie den Empfänger treffen.

Entweder Frequenzscan oder breitbandiger Impuls und FT Analyse.

$$\omega_c = 2\pi\nu = \frac{v}{r} = \frac{q}{m} B$$

- Geräte erfordern sehr starke Magneten (Tesla Bereich und höher)
- Sender muss Frequenzbereich vom kHz bis MHz Bereich abdecken
- Für FT Messungen muss das Vakuum hervorragend sein, da sonst das Signal zu schnell abklingt
- Eingeschränkte Dynamik
- Extrem hohe Empfindlichkeit
- Für extrem hohe Massen geeignet
- Langsam (ca. 1 Spektrum / s)

Detektoren



Fotoplatte: Traditionsmodell

Faradaykufig: Ladung wird aufgefangen, elektrisches Signal weitergegeben.

Sekundärelektronenvervielfacher:

Ladung wird ggf. in negative Ladung umgewandelt. Die hochenergetischen Elektronen lösen eine Kaskade von Sekundärelektronen aus undverstarken so das Signal.

Photonenvervielfacher: Ladung wird ggf. in negative Ladung umgewandelt.

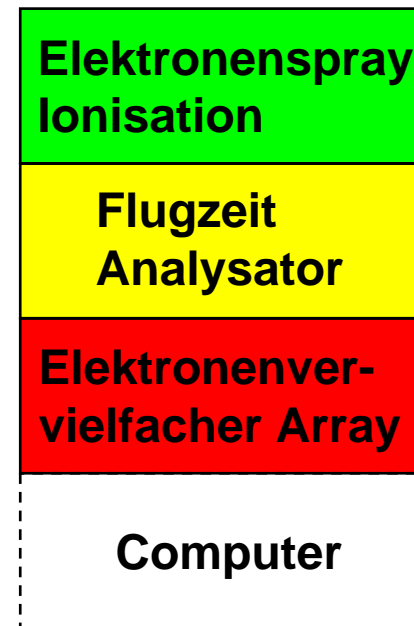
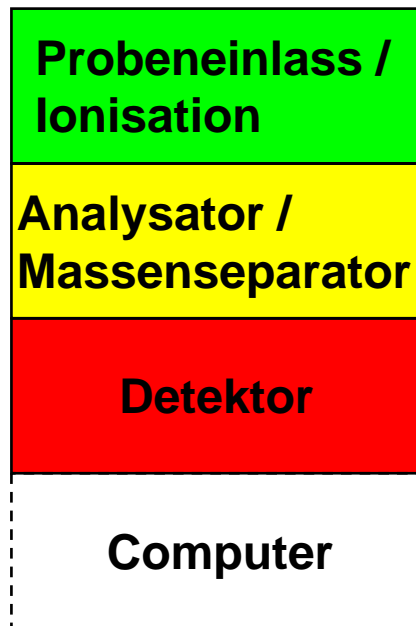
Elektronen bringen

Phosphoreszenzflache zum Leuchten.

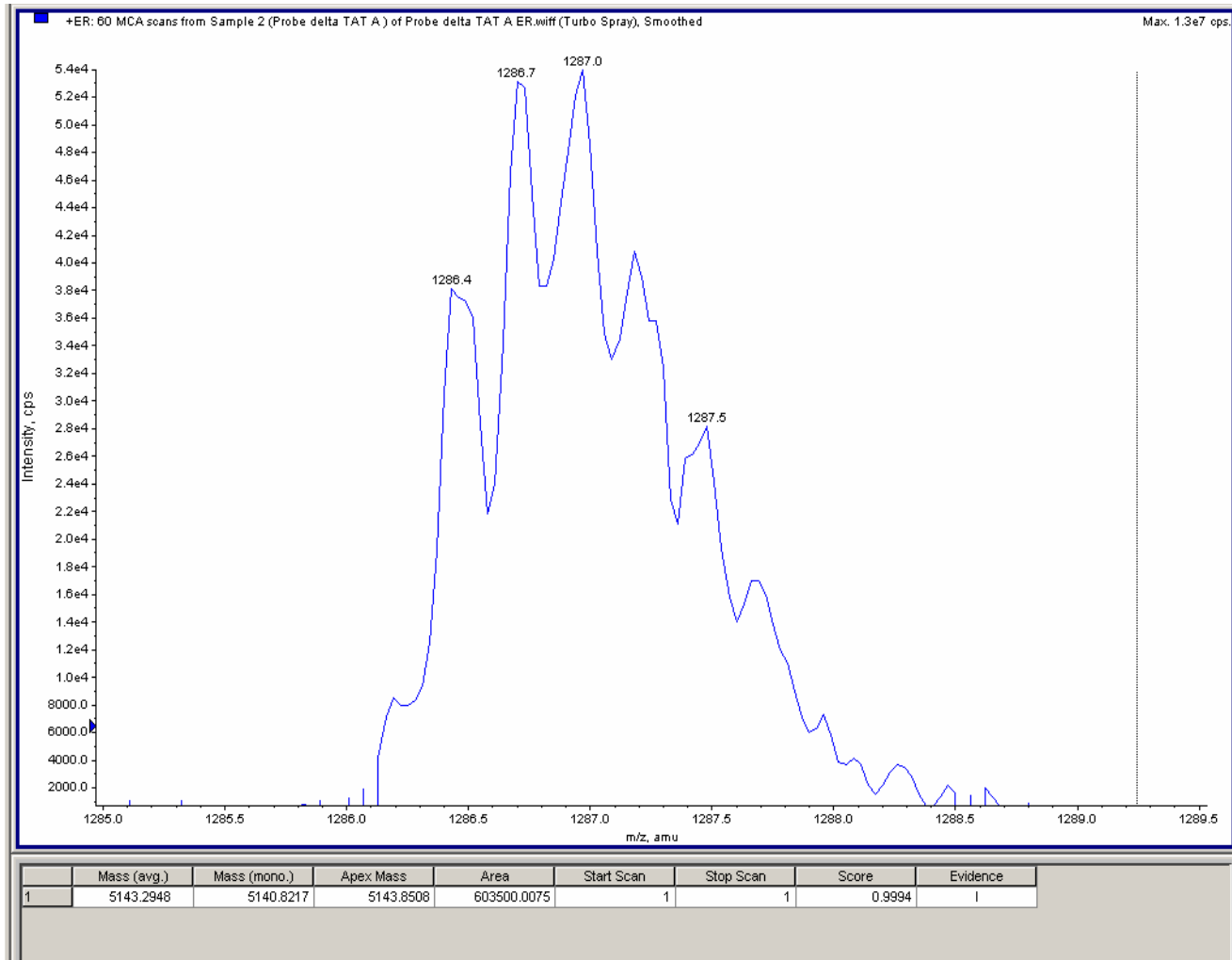
Als Verstärker dient ein

Photonenvervielfacher, der zum Schluss wieder ein elektrisches Signal abgibt.

Wir basteln uns LCMS für Peptide und Proteine

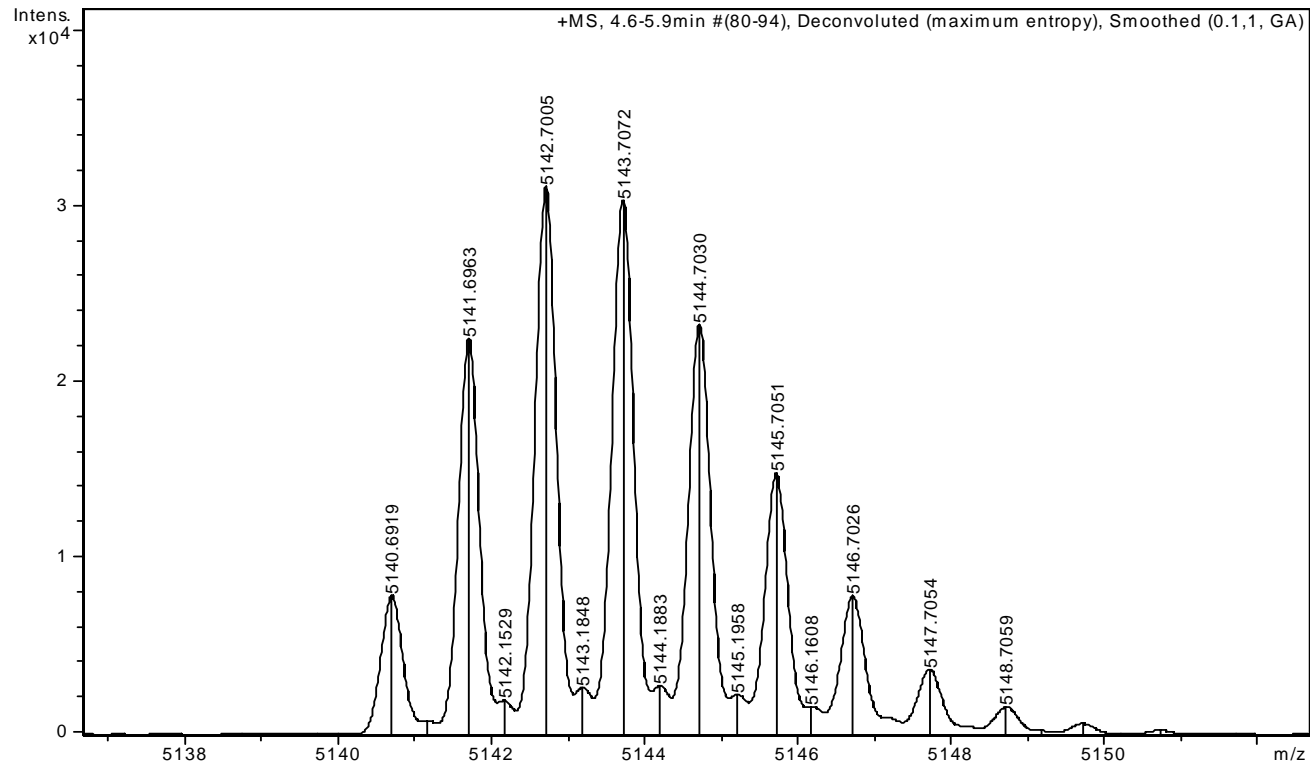


Quadrupol vs. TOF (Auflösung Quadrupol)



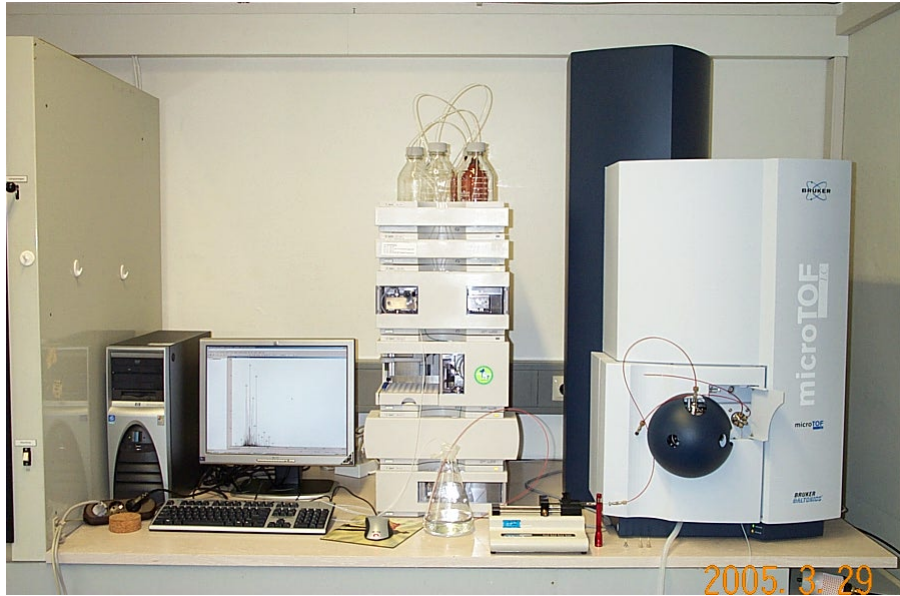
Probe: Delta TAT A

Quadrupol vs. TOF (Auflösung TOF)



Probe: Delta TAT A

LC-ESI-TOF Kombination



Stärken:

- Aufreinigung durch HPLC
- Für große Biomoleküle geeignet
- Auch mit ACPI Quelle betreibbar
- Auch mit negativen Ionen betreibbar

• Technische Daten:

- Messbereich: 50-3000 m/z
(50-20000 m/z)
- Auflösung: >10000 m/z
(>15000 m/z)
- Genauigkeit: 3 ppm mit int. Std.
5 ppm mit ext. Std.
- Geschwindigkeit: 20 Spektren/s

Schwächen:

- Keine MSMS Experimente
- Kann nicht den gesamten Messbereich mit einer Kalibrierung abdecken
- Schwächelt bei Massen < 300
- Probenmenge

Aufbau des Geräts

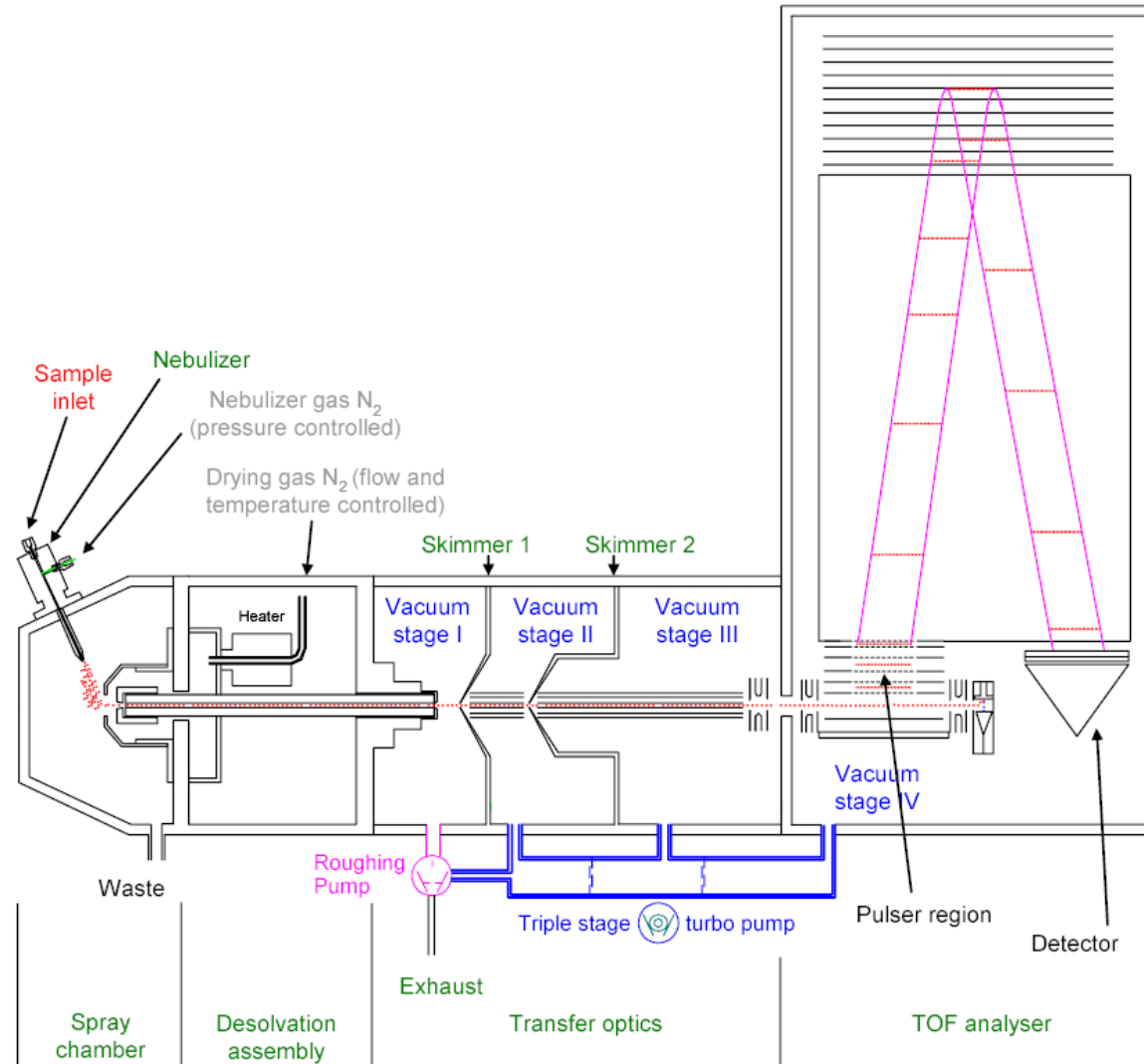


Abb. mit Genehmigung von Bruker Daltronics

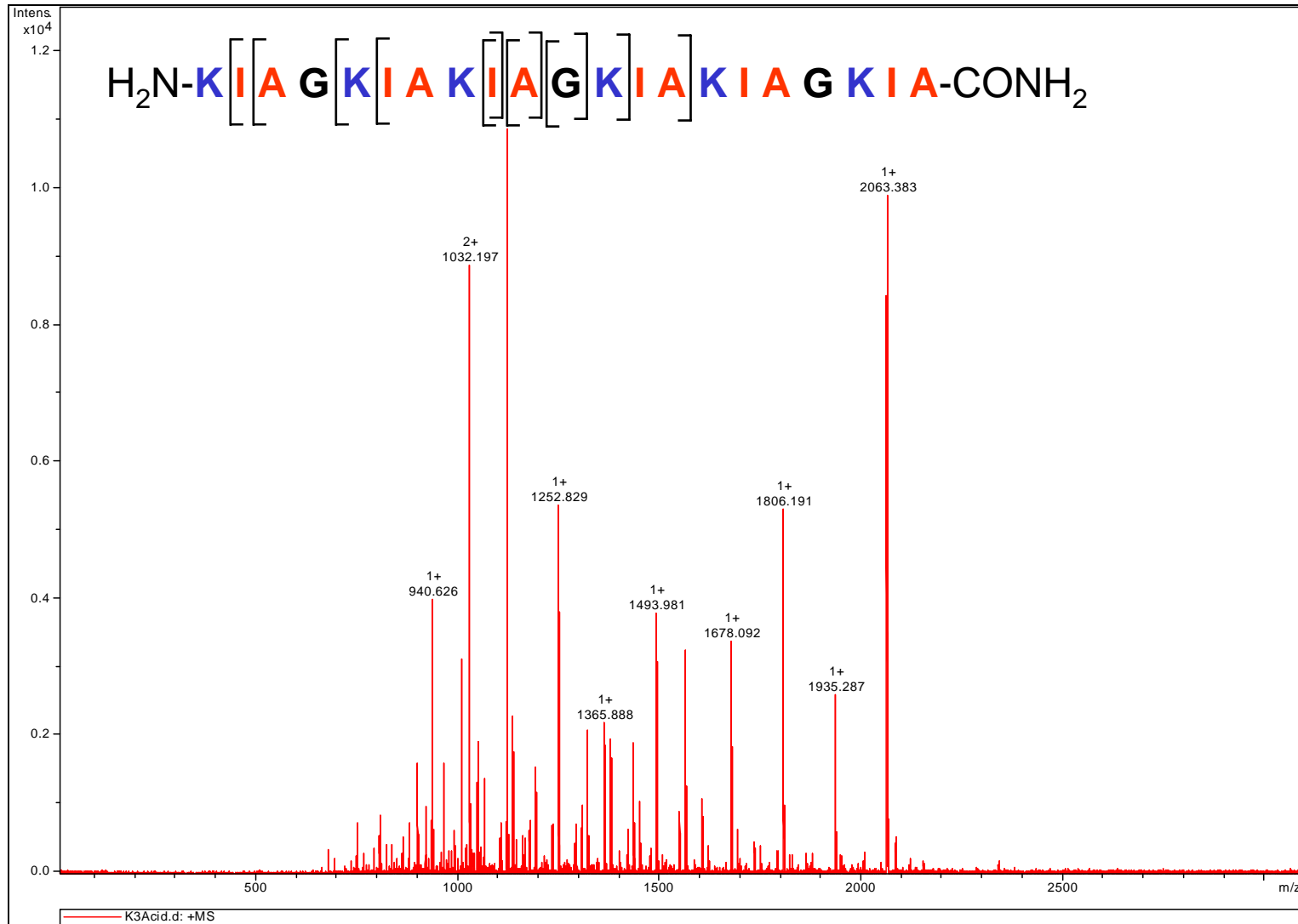
Beispiel Direktmessung von K3

Rohpeptid nach Abspaltung vom Harz

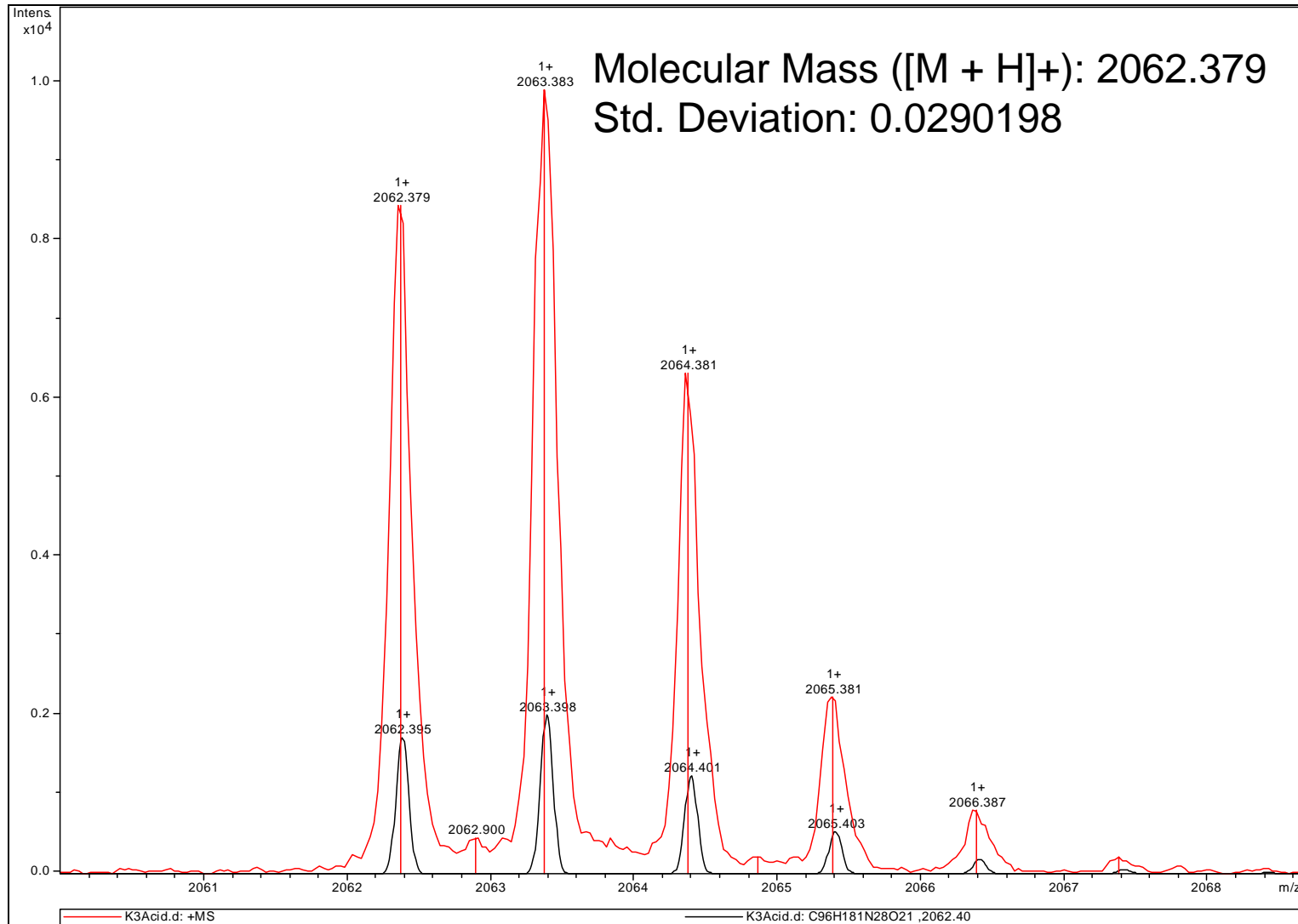
Sequenz: H₂N-KIAGKIAKIAGKIAKIAGKIA-CONH₂

Molmasse: 2061,39 (monoisotopisch)

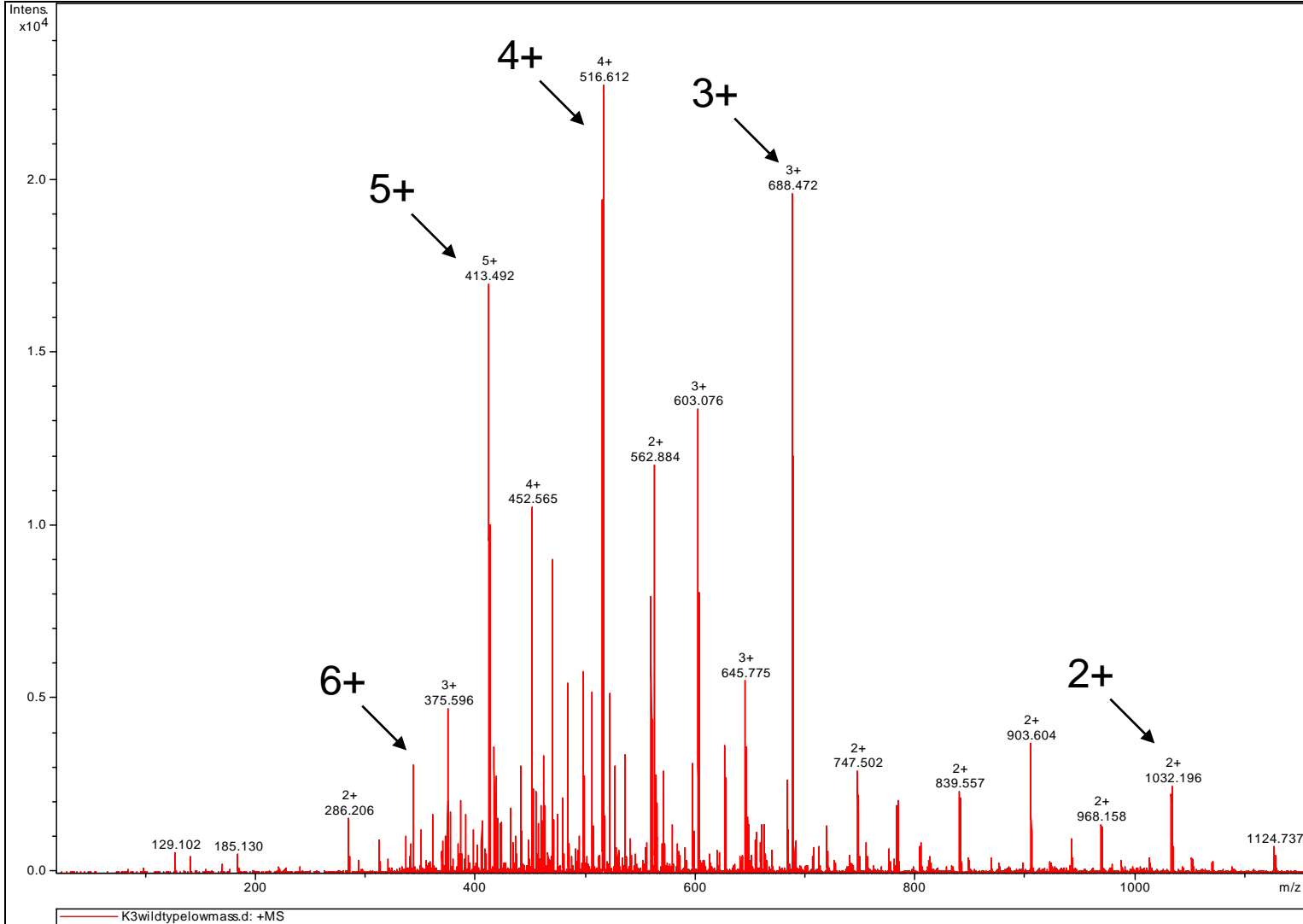
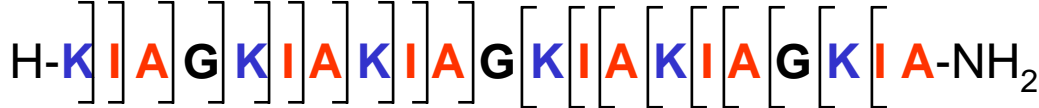
Mittlerer Massenbereich (ca. 500 – 2000 m/z) Gefundene Fragmente



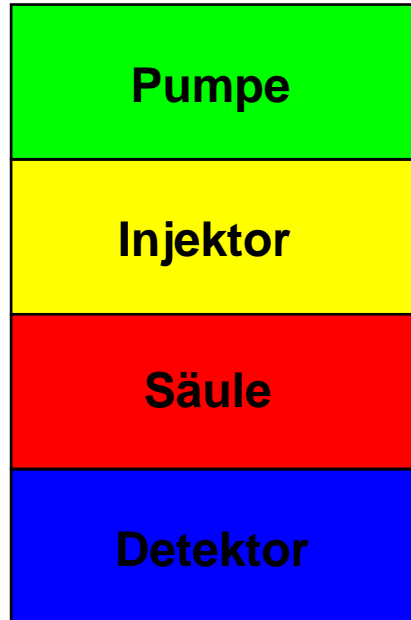
m⁺ Signal und Dekonvolutionsinformation



Niederer Massenbereich Molekülonen und gefundene Fragmente



Komponenten (HP)LC



Die Probe wird mit einem Laufmittel über eine Trennsäule gespült, die unterschiedliche Verbindungen zeitlich versetzt eluiert.

Als analytische Information wird zunächst ein Diagramm „Stoffmenge“ pro Zeit erhalten.

Je nach Trennproblem gibt es eine Unzahl unterschiedlicher Trennsäulen und Laufmittel.

Je nach Trennproblem gibt es verschiedene Detektormöglichkeiten. Für Peptide ist der Standarddetektor der UV Detektor (misst die UV Absorption der Probelösung).

Das Massenspektrometer ist ein weiterer Detektor (extrem teuer und pflegebedürftig), der eine Fülle zusätzlicher Informationen bereitstellen kann.

Agilent HPLC Anlage



Technische Daten:

Fluss: 0,1 – 5 ml / min

Druck: 0 – 400 bar

Detektoren:

UV/VIS Detektor mit variabler
Wellenlänge

TOF MS

Verfügbare Säulen (zur Zeit):

Vydac C4 250x2,1 mm

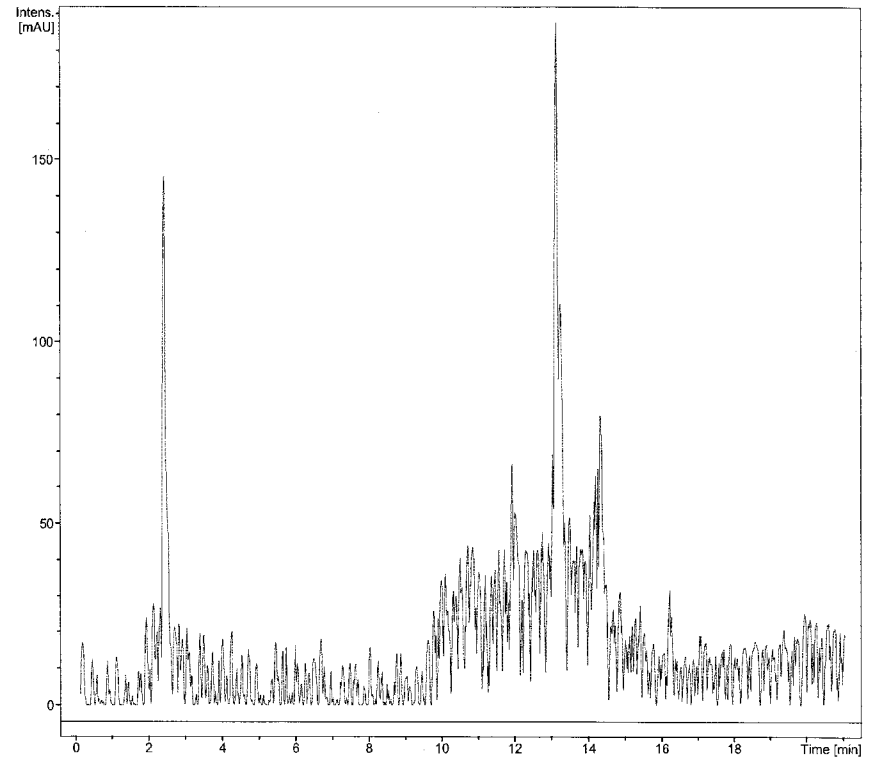
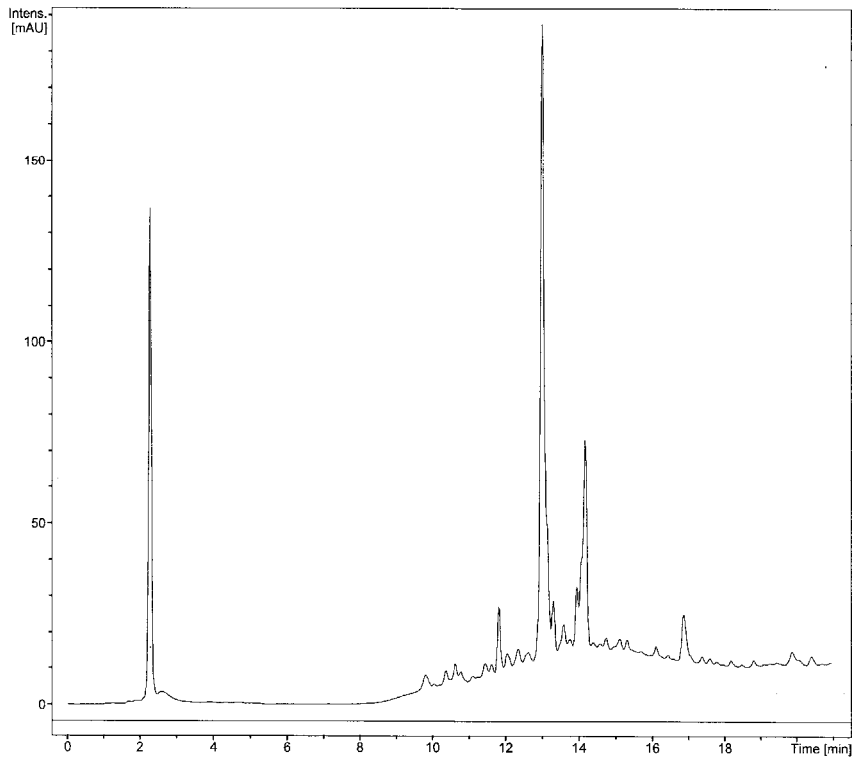
Vydac C8 250x2,1 mm

Vydac C18 250x2,1 mm

Laufmittel:

Acetonitril/Wasser/Ionenpaarreagenz

LC-Chromatogramm K3



Trennparameter:

Säule: Vydac 218TP52 (C-18)

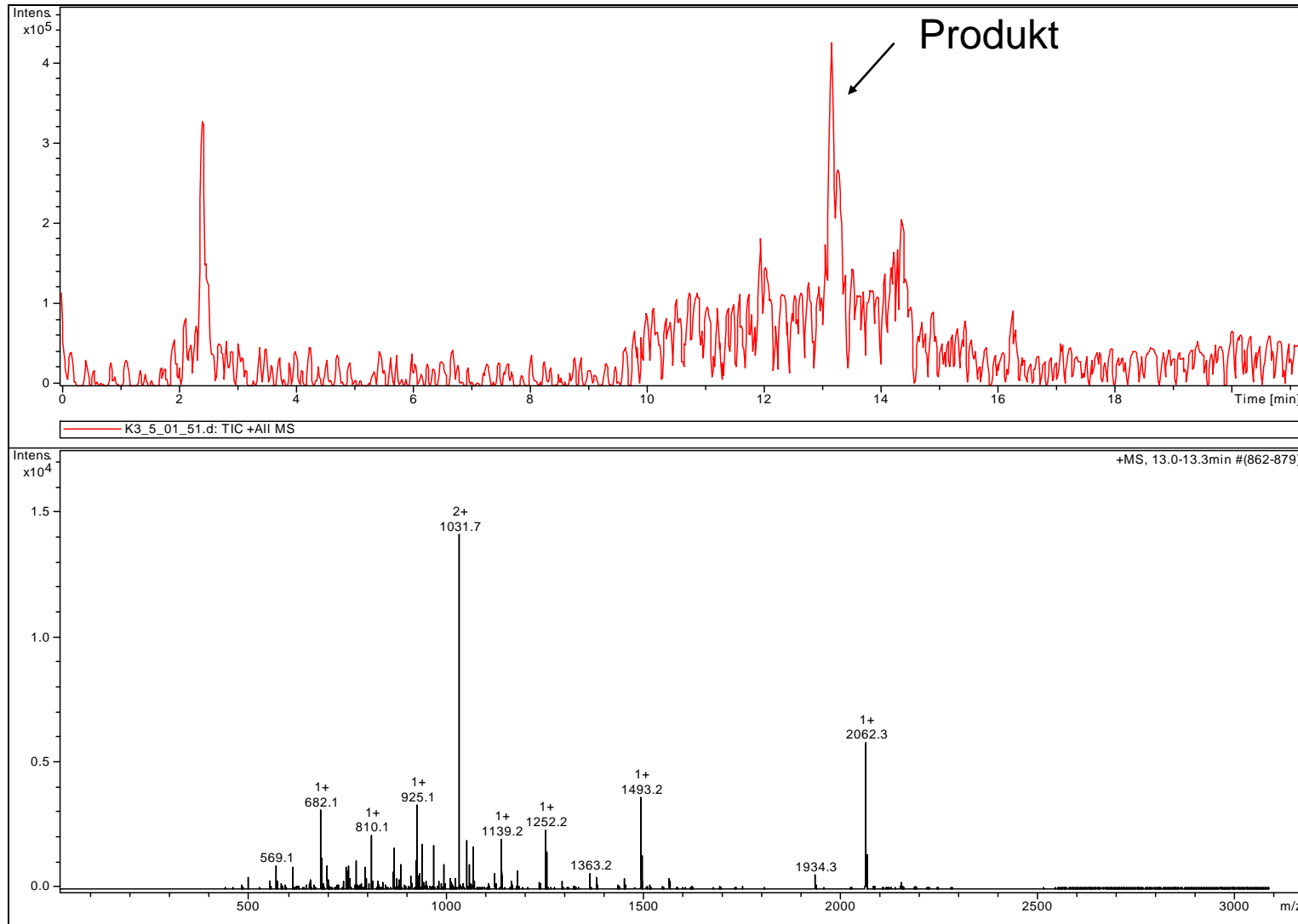
Lösungsmittel A: (90 % H₂O / 10 % MeCN) 5 mmol HCl

Lösungsmittel B: (90 % H₂O / 10 % MeCN) 5 mmol HCl

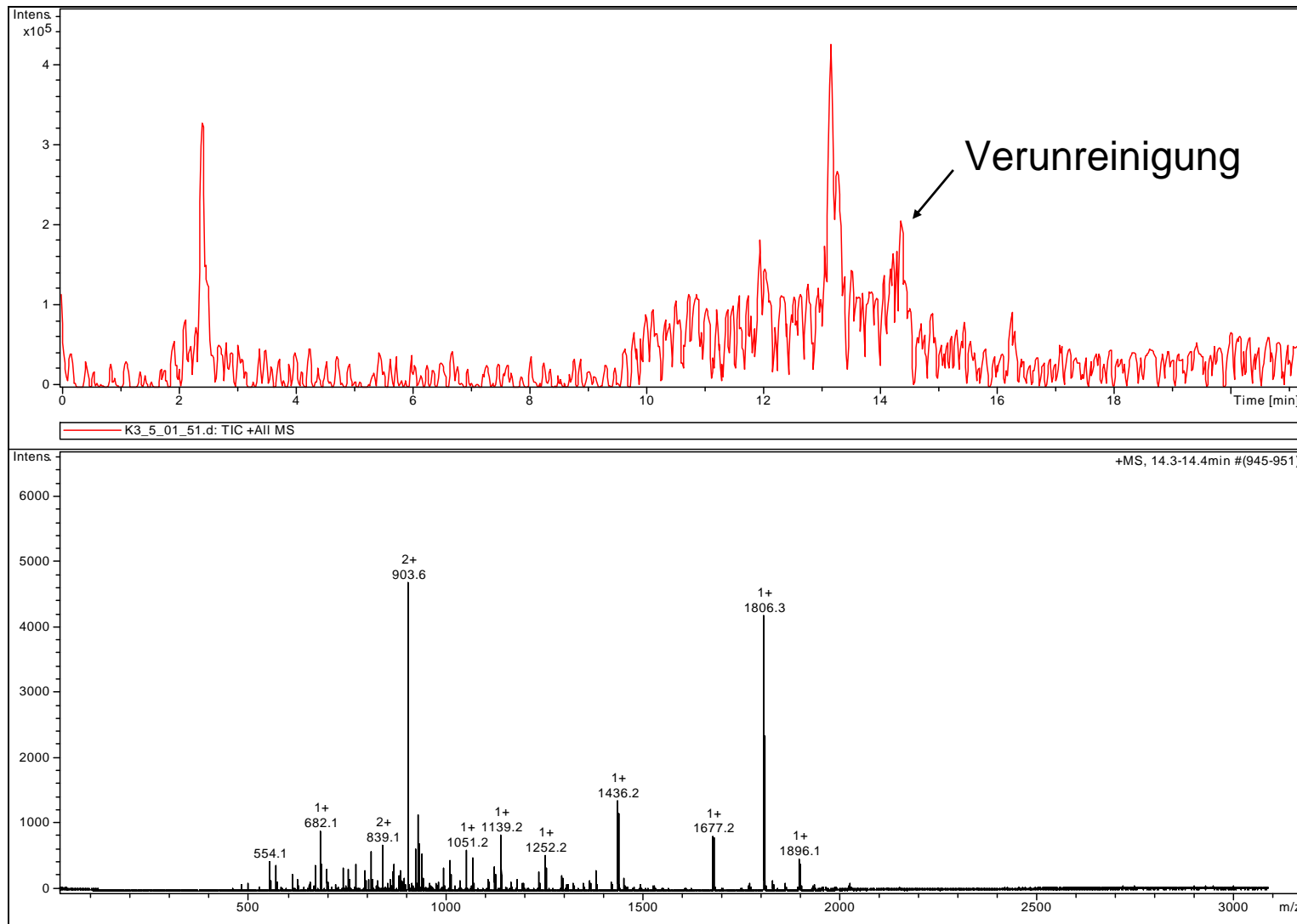
Gradient: 3 min 100 % A -> 25 min 5 % A 95 % B @ 35 ° C

Flussrate: 0,31 ml/min

Spektren aus LC Chromatogramm



Spektren aus LC Chromatogramm



Zusammenfassung LCMS

Vorteile:

- Schnelle Möglichkeit, sich einen Überblick über die Qualität und Zusammensetzung eines Rohprodukts zu verschaffen
- Sofortiger Beweis der korrekten Summenformel auch großer Biomoleküle
- Methodenoptimierung unter ständiger Kontrolle des Produktpeaks
- Übertragbarkeit auf präparative Trennungen und Gegenprüfung

Nachteile:

- Laufmittel muss mit ESI Ionisation kompatibel sein
- Es werden nur die Komponenten gesehen, die wieder aus der Säule eluiert werden
- Datenmengen
- Zeitaufwendig wenn man eine vollständige Analyse des Chromatogramms durchführen will
- Beweis der Primärstruktur nicht in allen Fällen möglich

Zusammenfassung

- Entfällt, da Teil 2 mit MALDI und MS/MS Experimenten folgt.

Literaturvorschläge

- E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry – Principles and Applications, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Chichester (2002).
- B. Ardrey, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction, John Wiley & Sons, Chichester (2002).