

URL: [http:// uni-leipzig.de/~bioanaly/sem6/Vorlesungen%20SS%202014/Vorlesung_MS_1.pdf](http://uni-leipzig.de/~bioanaly/sem6/Vorlesungen%20SS%202014/Vorlesung_MS_1.pdf)
pw:

1 Einführung

Massenspektrometrie ist kein spektroskopisches Verfahren („Massenspektroskopie“), da es nicht die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie nutzt.

Die meisten massenspektrometrischen Geräte arbeiten heute mit Stoffmengen im Atomolbereich und sind mit 10000 Molekülen bereits überfordert. Sie sind also sehr empfindlich. Sie finden Einsatz in Analytik, Bioanalytik und medizinischer Diagnostik. Massenspektrometrie ist universell einsetzbar und umspannt alle Bereiche von Forschung bis Anwendung. Es sind (fast) alle Moleküle analysierbar, wobei die Herausforderung meist darin liegt, die richtige Ionenquelle zu finden. Mit fünf Ionenquellen lässt sich der größte Bereich denkbarer Analytik erfassen, etwa zehn Arten von Ionenquellen werden heute kommerziell angeboten (Preis für ein Massenspektrometer im Bereich von etwa 100000 bis 1,5 Millionen Euro).

Messgröße der Massenspektrometrie ist das Verhältnis von Masse zu Ladung ($\frac{m}{z}$) eines detektierten Teilchens. Aus der Masse lässt sich die **Elementarzusammensetzung** bestimmen, aus den Informationen über die Massen und Häufigkeiten der Fragmente auch die Struktur.

Massenspektrometrie (wird in Kopplung mit UV/vis, IR und NMR) zur **Struktur-analytik** eingesetzt. Die Ergebnisse sind jedoch häufig nicht eindeutig und bedürfen deshalb immer einer Bestätigung durch Synthese.

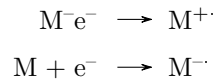
Für massenspektrometrische Untersuchungen werden Moleküle in die Gasphase überführt, ionisiert und im Hochvakuum (10^{-8} bar . . . 10^{-10} bar) getrennt und detektiert. In Extremfällen legen die Ionen Strecken von mehreren Kilometern zurück (innerhalb einiger Sekunden). Anders als NMR, IR und UV/vis arbeitet das Verfahren nicht zerstörungsfrei.

Ein Massenspektrometer besteht aus einer **Ionenquelle**, in dem die Probe ionisiert wird (kann im Vakuum sein, muss aber nicht, je nach Verfahren), einem **Analysator** und einem **Detektor**.

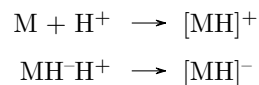
1.1 Ionisierung

Die Ionisierung kann erfolgen durch Abspaltung eines Elektrons, Aufnahme eines Elektrons oder Anlagerung eines geladenen Teilchens (etwa H^+).

Im Falle, dass nur die Anzahl der Elektronen sich ändert, entstehen radikalische Molekülionen:



Im letzteren Fall entstehen Quasi-Molekülionen:



Bei Anlagerung von H^+ wird von einem gasphasenbasischen Molekül gesprochen. Analog können auch Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ... angelagert werden.

1.2 Masse-zu-Ladungsverhältnis

Das $\frac{m}{z}$ -Verhältnis wird in der Regel in atomaren Einheiten (Masse in der atomaren Masseneinheit u , Ladung in Elementarladungen e).

Beispielsweise hat das I^+ eine exakte Masse von $\frac{m}{z} = 126,9044$ und eine nominelle Masse von $\frac{m}{z} = 127$ (eher historisch zu sehen aus Zeiten, in denen die Massenspektrometer nicht genauer waren und die Speicherkapazität begrenzt war).

1.3 Definition

Ein Massenspektrometer (MS) ist ein Instrument, welches das Masse-zu-Ladungsverhältnis ($\frac{m}{z}$, *mass to charge ratio*) von Ionen in der Gasphase (Vakuum) bestimmt, indem (meist bei einer bestimmten Geschwindigkeit) ihre Bewegung in einem elektrischen oder magnetischen Feld analysiert wird.

1.4 Peaks und Ionen

Ionen werden im Massenspektrometer (Ionenquelle) gebildet. Ionen haben Häufigkeiten (*abundance*).

Peaks (Signale) sind die elektronischen Signale des Massenspektrums. Sie haben Intensitäten (*intensity*). Wichtig ist, dass die Peakintensität nicht proportional zur Häufigkeit der Ionen (weder in der Probe noch im Analysator) ist.

Der Peak mit der höchsten Intensität im Spektrum wird als **Basispeak** bezeichnet. In der Regel bezieht man sich auf den Basispeak. So kann auch bei unterschiedlicher Probenmenge (meist mit guter Genauigkeit) sichergestellt werden, dass die Spektren der gleichen Probe bei gleicher Ionisationstechnik gleich aussehen.

2 Informationsgehalt von Massenspektren

2.1 Masse des Ions

Bei bekannter Ladung z des Ions kann aus dem gemessenen $\frac{m}{z}$ -Verhältnis die Masse des Ions bestimmt werden. Bei hoher Massenauflösung sind alle Isotope sichtbar.

Isotopenpeaks erscheinen mit ihrer Intensität in der Regel im Verhältnis der Häufigkeiten der Isotope, da sich die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Verbindungen mit unterschiedlichen Isotopen kaum unterscheiden (gleiche relative Ionenausbeute durch ähnliche Chemie, gleiche Detektorempfindlichkeit durch ähnliche Masse).

Je nach Anzahl der Isotope werden Elemente als A -Elemente (Phosphor, Fluor und Iod mit nur einem Isotop), $A + 1$ -Elemente (etwa Kohlenstoff und Wasserstoff mit zwei Isotopen), $A + 2$ -Elemente (etwa Sauerstoff mit drei Isotopen)...

Die monoisotopische Masse wird aus dem Isotop errechnet, das den höchsten natürlichen Anteil des jeweiligen Elements repräsentiert (^1H , ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S).

Beim Brom tauchen in der Natur ^{79}Br (50,5 %) und ^{81}Br (49,5 %) auf. Ein einziges Br-Atom in Abwesenheit nicht-monoisotopischer Elemente liefert ein Muster von zwei Signalen im Abstand von 2 u. Beim Chlor treten ^{35}Cl (75,8 %) und ^{37}Cl (24,2 %) auf.

Zu beachten ist, dass die Isotopenverhältnisse nicht konstant sind, sondern lokal und mit dem Alter der Probe schwanken können.

2.2 Signalintensität

Die Signalintensität ist vom Detektor abhängig und wird bei klassischen Massenspektrometern als Signale pro Zeit (*counts per second*, cps; digital) oder Spannung pro Zeit (analog) gemessen.

Die Ionisierung der verschiedenen Teilchen ist abhängig von ihrer Umgebung (Matrixeffekte), sodass ein direkter Zusammenhang zwischen Signalintensität und Stoffmenge nur bei Gasphasenionisation mit hinreichender Genauigkeit gegeben ist.

3 Definition

3.1 Auflösungsvermögen (resolving power)

Das Auflösungsvermögen ist das Vermögen eines **Instrumentes**, benachbarte Peaks zu trennen. Ein massenunabhängiges Auflösungsvermögen von $\Delta m = 1$ kann ein Molekül mit $\frac{m}{z} = 100$ von einem mit $\frac{m}{z} = 101$ und eines mit $\frac{m}{z} = 2000$ von einem mit $\frac{m}{z} = 2001$ trennen.

3.2 Massenauflösung (mass resolution)

Die Massenauflösung bezieht sich auf ein **Massenspektrum**. Sie liefert das Verhältnis des $\frac{m}{z}$ eines Peaks zum $\frac{m}{z}$ -Unterschied des nächsten noch getrennt erscheinenden Peaks:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{\frac{m}{z}}{\Delta \frac{m}{z}}$$

Die Massenauflösung benötigt eine Bezugsgröße. Üblich sind die Definition über die Höhe des Tals zwischen zwei gerade noch aufgelösten Peaks (10 %-Tal- oder 50 %-Tal-Definition) und die Definition über die Halbwertsbreite eines einzelnen Peaks.

Heutige kommerzielle Geräte erreichen R -Werte im Bereich von 4000. . . 100 000. Geräte, die auch bei normalschweren Molekülen noch bis zur Masse von Elektronen genau auflösen können, sind noch Gegenstand aktueller Forschung.

3.3 Massengenauigkeit

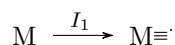
Die Massengenauigkeit $\frac{\Delta m}{m}$ besagt, wie weit die bestimmte Masse von der theoretischen Masse abweichen kann.

2014-04-15
Massenspektrometrie
Vorlesung
Prof. Dr. Ralf Hoffmann

4 Ionisierung

Im Rahmen der Vorlesung werden nur die vier wichtigsten Ionenquellen behandelt.

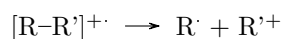
Um ein Molekül M zu ionisieren, wird die erste **Ionisierungsenergie** I_1 benötigt:



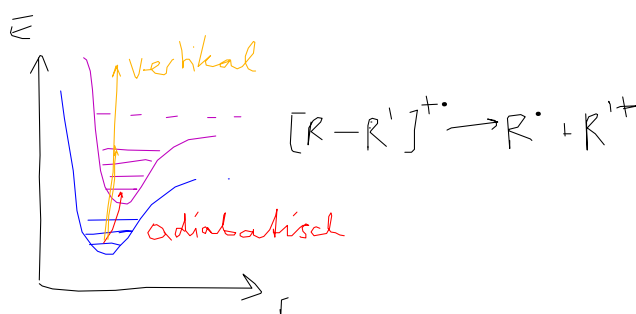
Die Ionisierungsenergie ist die mindestens notwendige Energie, um ein Elektron aus einem neutralen Teilchen (Atom, Molekül, Radikal), das sich im elektronischen Grundzustand und im Schwingungsgrundzustand befindet, zu entfernen und ein Ion im Schwingungsgrundzustand zu erhalten. Die SI-Einheit ist J, häufig wird die Ionisierungsenergie jedoch in eV angegeben.

Als **Ionenstrom** wird die in einer Zeiteinheit gebildete Menge an verschiedenen Ionen bezeichnet. Der Gesamtionenstrom ist die Summe aller Ionenströme. Die Ionisierungsenergie der meisten Elemente befindet sich im Bereich 5 eV...20 eV, die organischer Moleküle meist im Bereich 8 eV...13 eV.

Es muss zwischen der **adiabatischen Ionisierungsenergie** und der **vertikalen Ionisierungsenergie** unterschieden werden. Erstere tritt auf, wenn die Anregung zum Radikalkation langsam erfolgt (langsamer als 10^{-14} s), letztere bei schneller Anregung (bei MS in der Regel innerhalb 10^{-16} s). Durch die schnelle Anregung, die bei der Massenspektrometrie stattfindet, geht das Ion in der Regel in einen angeregten Schwingungszustand über. Zusammen mit der großen freien Weglänge (verhindert Stöße zur Abregung) führt dies häufig zur Fragmentierung der Radikalkationen (Neutralverlust):



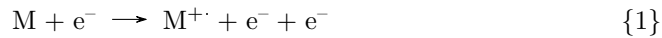
$[R-R']^{\cdot+}$ wird als Vorläuferion (*precursor*; veraltet Mutterion, *parent ion*), R'^{+} als Fragmentation (*fragment ion*; veraltet Tochterion, *daughter ion*) bezeichnet. Das Fragmentation hat ein $\frac{m'}{z}$, wobei $\frac{m'}{z} < \frac{m}{z}$.



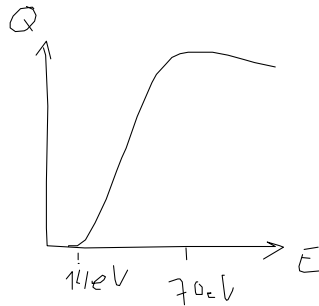
4.1 Elektronenstoßionisation (EI)

Bei der Elektronenstoßionisation (*electron ionization*, EI) werden die Molekülen mit schnellen Elektronen (hohe Energie, standardmäßig 70 eV) beschossen und ionisieren

diese:



Dabei wird ein Teil der Energie des initialen Elektrons auf das Molekül übertragen. Von den entstehenden Elektronen ist eines immer noch sehr schnell, das andere langsam (thermisches Elektron).

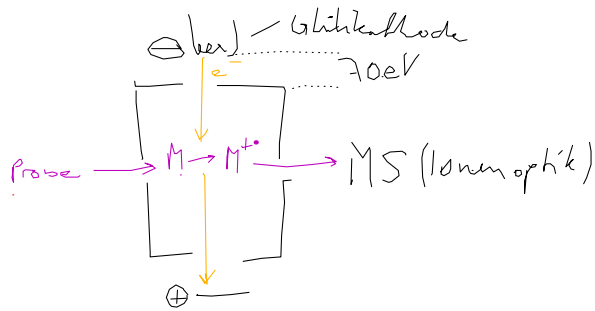


Die 70 eV befinden sich am Maximum der Ionisierungseffizienz Q . Dies hat den historischen Vorteil, dass auch eine starke Schwankung der Elektronenenergie keinen großen Einfluss auf die Ionisierungseffizienz hat. Andererseits haben die Elektronen eine hohe Überschussenergie, die Zerfall begünstigt. Heute hat dies den Vorteil, dass auch aus der Vergangenheit viele Vergleichsspektren vorliegen.

Je nach Überschussenergie kann in drei Klassen von Molekülen unterschieden werden: Stabile Ionen zerfallen auf dem Weg von der Ionenquelle zum Detektor nicht, instabile (und labile) Ionen zerfallen sehr schnell in der Ionenquelle, metastabile Ionen zerfallen irgendwann auf dem Weg von der Ionenquelle zum Detektor (Zerfall im Massenanalysator bedeutet, dass sich $\frac{m}{z}$ auf dem Weg verändert und somit die Trennung nicht zuverlässig ist).

Niedrige Energien sind sinnvoll, wenn es nur darum geht, die Masse des Teilchens zu bestimmen. Hohe Energien ermöglichen demgegenüber über die Massen der Fragmentationen und die Deutung dieser eine Strukturbestimmung.

Einlass:	gasförmig
Druck:	10^{-4} Pa
Mittlere freie Weglänge:	50 m
Maximale Masse:	$500 \text{ g mol}^{-1} \dots 1000 \text{ g mol}^{-1}$

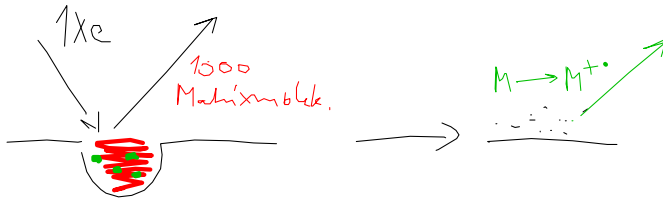


Die Probeneinführung kann auch über eine Sonde (*direct insertion probe*, DIP) erfolgen. Dort findet der Verdampfungsprozess in der Sonde im Hochvakuum (bei bis zu 300 °C) statt, was gegenüber gasförmigem Einlass den Vorteil hat, dass durch den verringerten Druck die Verdampfung bei niedrigerer Temperatur möglich ist.

Die Signalintensität korreliert relativ gut mit der Probenmenge in der Gasphase.

4.2 Fast Atom Bombardment (FAB)

Beim *fast atom bombardment* handelt es sich um eine Matrix-unterstützte Ionisierung. Hierzu wird die Probe zunächst in einer Matrixsubstanz gelöst. Die Matrix wird nun mit schnellen Atomen beschossen, wodurch die Matrix an der Oberfläche (bis in 15 nm Tiefe) verdampft, ionisiert und größtenteils zerstört wird. Die Analytmoleküle werden in Sekundärreaktionen von den Matrixmolekülen angeregt. Anschließend werden die Probenmoleküle desorbiert und ionisiert (Reihenfolge nicht bekannt/relevant).



Das FAB-Target besteht aus rostfreiem Stahl (mit Goldüberzug, oder Kupferspitze, ...) und kann flach wie auch tassenförmig sein. Als Matrix wird aufgrund des geringen Dampfdrucks und der hohen Temperatur häufig Glycerin (1 μL ... 3 μL) verwendet.

Die FAB-Ionenquelle besteht zunächst aus einer EI-Quelle, in der Xe ionisiert wird. Die entstehenden Xe^+ werden dann durch Xe-Gas geleitet, wodurch die meisten der Ionen (Gleichgewichtsreaktion!) wieder ein Elektron aufnehmen, ihre Geschwindigkeit und Richtung aber kaum verändern. Der Xe-Atomstrahl wird auf das Target geschossen.

FAB eignet sich, um Moleküle bis zu einigen 1000 g mol^{-1} nahezu zerstörungsfrei zu untersuchen.

4.3 Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (MALDI)

Auch MALDI ist eine Matrix-unterstützte Methode. Die Matrix ist jedoch nicht flüssig, sondern fest. Die Energie für Desorption und Ionisierung wird durch Bestrahlung mit einem 4 ns... 5 ns-Laser (meist UV, IR ist vielfach teurer) auf die Matrix übertragen. Als Matrixmaterialien werden dabei Stoffe verwendet, die hohe Extinktionskoeffizienten in Bereichen aufweisen, in denen die Probenmoleküle (in der Regel) nicht absorbieren, und eine Carbonsäurefunktion aufweisen, was die Abgabe von Protonen an die Probenmoleküle erleichtert.

MALDI ist eine Möglichkeit, um auch schwere Biopolymere (bis zu einigen 10^5 g mol^{-1}) zu messen. Auch hier werden Quasimolekütionen erzeugt.

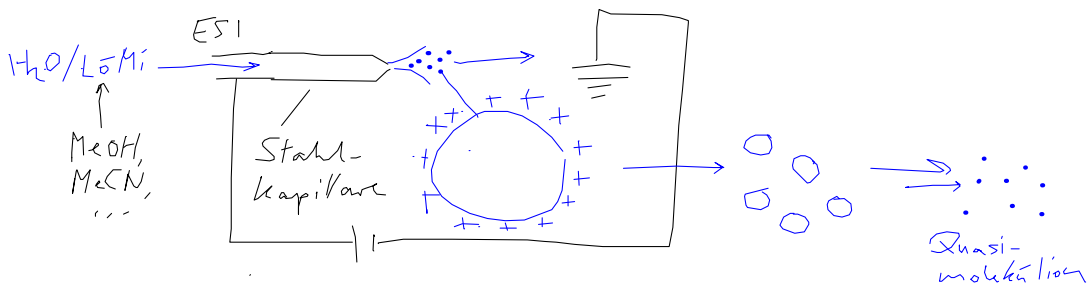
Drei MALDI-Matrixsubstanzen sollten gelernt werden.

2014-04-15
Massenspektrometrie
Vorlesung
Prof. Dr. Ralf Hoffmann

Anders als EI und FAB ist die MALDI-Ionenquelle diskontinuierlich.

4.4 ESI

Hier wird zunächst mithilfe eines elektrischen Feldes ($U \approx 800 \text{ V} \dots 5000 \text{ V}$, $E \approx 10^6 \text{ V m}^{-1}$) Tropfen, die aus einer Stahlkapillare austreten, ionisiert und zur Kathode beschleunigt. Da das Lösungsmittel einen hohen Dampfdruck hat, werden die Tropfen kleiner. Ist die Ladungsdichte am RAYLEIGH-Limit, so sind die Tropfen so instabil, dass sich in einer COULOMB-Explosion weiter zerteilen und schließlich über mehrere Stufen immer kleinere Tropfen und später Quasimolekütionen entstehen. Die Anzahl der Ladungen pro Molekül hängt vom Molekül und den Bedingungen ab und ist statistisch verteilt.



ESI-MS wird häufig mit der RP-HPLC gekoppelt. Das analytische Verfahren wird

dann kurz als RPC-MS (LC-MS) bezeichnet und ist (da MS orthogonal zu LC trennt) ein zweidimensionales Trennverfahren.

Die Kapillare kann direkt auf den Eingang des Analysators gerichtet sein, was jedoch den Nachteil hat, dass bei dieser Anordnung viele Verunreinigungen in das Massenspektrometer gelangen. Verbreitet ist deshalb die *off axis*-Anordnung, bei der Ionenquelle und Zugang zum Analysator versetzt ist.

Beispiel für die Analyse der Spektren: Für ein Molekül M mit der Masse 1500 g mol^{-1} wird der MH^+ -Peak bei $\frac{m}{z} = \frac{1500+1}{1} = 1501$, der MH_2^{2+} -Peak bei $\frac{m}{z} = \frac{1500+2}{2} = 751$, der MH_3^{3+} -Peak bei $\frac{m}{z} = \frac{1500+3}{3} = 501 \dots$ erwartet. Im Spektrum nimmt die Ladung nach links hin ab und die Abstände werden kleiner.

Bei Peptiden können die Ladungszustände aus dem Isotopenverhältnis bestimmt werden. Der monoisotopische Peak ist gegenüber dem nachfolgenden Peak genau um $\frac{1}{z}$ verschoben. Dieses Verfahren funktioniert besonders bei kleinen Peptiden gut, da dann die Masse noch gut aufgelöst wird. Bei größeren Proteinen kann die Masse durch Lösen eines Gleichungssystems der $\frac{m}{z}$ zweier benachbarter Peaks bestimmt werden:

$$\begin{aligned} \left(\frac{m}{z}\right)_1 &= \frac{M+n}{n} \\ \left(\frac{m}{z}\right)_2 &= \frac{M+n+1}{n+1} \end{aligned}$$

4.5 Überblick

Methode	Zufuhr	Ion	Molekülmasse
EI	gasförmig	$\text{M}^{+,*}$	< 500
FAB	flüssig	MH^+	3000
MALDI	fest	MH^{+1}	bis 10^6 und größer etwa IgM: 800kDa
ESI	flüssig	MH_n^{n+}	bis 10^6 und größer

Neben den vier behandelten Methoden spielen noch CI (*chemical ionization*), SIMS (*secondary ion MS*, ähnlich FAB, nur mit Cs^+ -Ionen statt Xe-Atomen), IRLD (*infrared laser desorption*, wie MALDI nur breiter einsetzbar, aber sehr teuer) und PI (*photoionization*, Ionisierung einiger Moleküle mit Licht, die dann die Analytmoleküle ionisieren) eine Rolle.

GC wird heute standardmäßig mit MS gekoppelt. HPLC wird ebenfalls häufig mit MS gekoppelt (aus Kostengründen aber noch nicht standardmäßig).

5 Analysatoren

Im Rahmen der Vorlesung werden Sektorfeld- (EI), Flugzeit- (MALDI, ESI) und Quadrupolanalysatoren (ESI) behandelt.

5.1 Sektorfeld

Der Sektorfeld-Analysator besteht aus einem evakuierten Flugrohr, das von der Ionenquelle mit Ionen versorgt wird. Ein Teil des Flugrohres ist kreisförmig und von einem Magnetfeld durchsetzt. Zu leichte und zu schwere Ionen kollidieren mit der Rohrwand und kommen nicht am Detektor an. Das Magnetfeld ist zeitlich veränderlich, sodass über die verschiedenen magnetischen Feldstärken der $\frac{m}{z}$ -Bereich gescannt wird. Je nach Schlitzbreite am Analysator-Detektor-Übergang können Empfindlichkeit und Auflösung eingestellt werden. Ein großer Schlitz sorgt für hohe Empfindlichkeit und geringere Scan-Zeit, aber auch geringere Auflösung.

Das Gerät muss regelmäßig kalibriert werden, um die Massengenauigkeit zu erhalten.

Im Sektor muss für eine Kreisbahn die LORENTZ-Kraft gleich der Zentripetalkraft sein:

$$F_L = F_Z$$
$$q \cdot v \cdot B = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

Die Geschwindigkeit v ist über den Energieerhaltungssatz aus der Beschleunigungsspannung zu berechnen

$$q \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

Die Ableitung der resultierenden Formel

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 \cdot r^2 \cdot e}{2 \cdot U}$$

ist zu lernen.

Problem ist, dass die aus der Ionenquelle kommenden Ionen eine Anfangsgeschwindigkeit haben, was die Auflösung herabsetzt. Eine Lösung für dieses Problem ist das doppelt-fokussierende Sektorfeld. Hier werden ein elektrisches und ein magnetisches Sektorfeld kombiniert. Durchgesetzt hat sich die BE-Konfiguration (erst B -, dann E -Feld).

Im elektrischen Feld gilt

$$\begin{aligned}
 F_E &= F_C \\
 q \cdot E &= \frac{m \cdot v^2}{r_e} \\
 r_e &= \frac{m \cdot v^2}{q \cdot E} \\
 &= \frac{m \cdot v^2}{z \cdot e \cdot E}
 \end{aligned}$$

mit $v = \sqrt{\frac{2z \cdot e \cdot U}{m_i}}$, sodass

$$r_e = \frac{2U}{E}$$

Die Auflösung erreicht 70 000 nach der 10 %-Tal-Definition.

Vorteile des Verfahrens sind die hohe Auflösung und die gute Empfindlichkeit sowie die fehlende Massendiskriminierung. Sind liegen im Auflösung-Empfindlichkeit-Tradeoff, den hohen Beschleunigungsspannungen, der aufwendigen Wartung (erfordert hochqualifiziertes Personal) und die mit dem $\frac{m}{z}$ -Wert fallende Massenauflösung (konstantes Auflösungsvermögen, *resolving power*).

5.2 Flugzeit (time of flight, TOF)

Im Flugzeit-Analysator werden Ionen nach ihrer Flugzeit (im μs -Bereich) getrennt:

$$\begin{aligned}
 E_e &= E_{kin} \\
 q \cdot U &= \frac{m \cdot v^2}{2}
 \end{aligned}$$

mit der Geschwindigkeit

$$v = \sqrt{\frac{2q \cdot U}{m}}$$

und damit

$$v = \sqrt{2e \cdot U \cdot \frac{z}{m}}$$

beziehungsweise der Flugzeit t

$$t = \sqrt{\frac{s^2}{2e \cdot U} \cdot \frac{m}{z}}$$

mit der zurückgelegten Strecke s . In der Praxis ist auch hier die Anfangsgeschwindigkeit nicht null. Außerdem kann die Desorption zu Beginn des Laserpulses (1 ns), zu Ende oder irgendwann dazwischen auftreten und die Ionisierung kann gegenüber

der Desorption verzögert sein, sodass die Ladung des Teilchens nicht sofort mit der Desorption auftreten. Letzterem Problem kann durch eine leicht verzögerte Beschleunigungsspannung entgegengewirkt werden, was auch die initiale Geschwindigkeit leicht kompensiert.

Vorteil des Flugzeit-Analysators ist die Tatsache, dass es keinen Ionenverlust gibt. Alle Ionen werden detektiert. Die Aufnahmezeiten sind sehr kurz und es gibt keine Grenze für die $\frac{m}{z}$ -Werte (höherer Durchsatz). Das Gerät braucht jedoch Hochvakuum und die Massenauflösung ist mit 1000...2000 relativ niedrig (Auflösungsvermögen von $\frac{m}{z}$ abhängig).

Flugzeit-Analysatoren lassen sich ideal mit MALDI-Quellen kombinieren. Auch ESI-TOF ist möglich, wenn die ESI-Quelle orthogonal zur Beschleunigungsspannung sprüht (Ionen gelangen so nur in den Analysator, wenn die Beschleunigungsspannung eingeschaltet ist).

2014-04-29

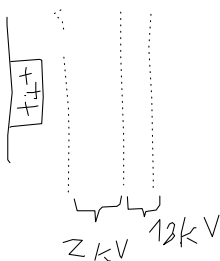
Massenspektrometrie

Vorlesung

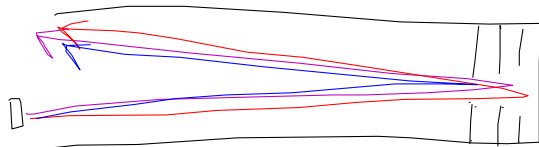
Prof. Dr. Ralf Hoffmann

Nachteil der klassischen TOF ist, dass die anfängliche Energiedispersion und die Möglichkeit der retardierten Ionisierung sich als Fehler bis zur Detektion fortpflanzt und damit dazu führt, dass der Peak verbreitert wird. Durch gegenüber dem Laserpuls verzögertes Anlegen der Beschleunigungsspannung (*delayed extraction*, DE) kann dieser Heterogenität leicht entgegengewirkt werden; Teilchen die eine höhere Anfangsgeschwindigkeit haben, werden im Feld weniger stark beschleunigt, da sie nur noch einen geringeren Teil des Feldes zurücklegen. *delayed extraction* ermöglicht damit auf einfachem Wege eine Verbesserung der Auflösung. Sie hat noch einen dritten positiven Effekt: Durch den Laserpuls bildet sich eine Plasmawolke, die das angelegte elektrische Feld ortsabhängig abschwächt und somit zu einer Heterogenität führt; bei *delayed extraction* hat die Plasmawolke mehr Zeit, sich auszudehnen und somit die Heterogenität zu verringern.

Delayedextraction



Eine weitere Verbesserung liefert die Reflektor-TOF (reTOF). Hier werden die Teilchen von der Ionenquelle zu einem Reflektor beschleunigt und von dort aus zum Detektor reflektiert. Teilchen, die schneller sind, fliegen weiter in den Reflektor hinein als solche, die langsamer sind. Ziel ist, dass alle Teilchen mit gleichem $\frac{m}{z}$ zur gleichen Zeit im Detektor ankommen. Auf diese Weise gleichen sich die Flugzeiten noch mehr der idealen Flugzeit für den $\frac{m}{z}$ -Wert des Teilchens an und der Peak wird noch einmal schmaler. Weiterer Vorteil ist, dass sich durch den Reflektor die Flugstrecke knapp verdoppelt und somit bei gleicher Genauigkeit der Flugzeitmessung die Massengenauigkeit erhöht.



Die Flugzeit eines Teilchens wächst mit der Molekülgröße. Größere Teilchen haben im Analysator mehr Zeit, zu zerfallen. Im linearen TOF spielt das keine Rolle, da sie trotzdem noch (etwa) zur gleichen Zeit im Detektor ankommen und dort detektiert werden. Zerfallen sie jedoch im reTOF vor Passieren des Reflektors, verhalten sie sich im Reflektor unberechenbar. Auf diese Weise verschwindet das Signal und der Hintergrund steigt an. Außerdem muss die freie Weglänge größer sein, sodass auch die Vakuumpumpe besser sein muss (höherer Preis). Trotzdem ist reTOF Standard.

Aber auch mit einer linearen TOF ist der Massenbereich limitiert. Die Intensität am Detektor ist nämlich impulsabhängig. Da der Impuls mit der Masse der Teilchen (Vervierfachung der Masse führt zu Halbierung der Intensität). Sehr schwere Moleküle können deshalb nicht mehr vom Untergrund unterschieden werden (anders als bei ESI, wo dieses Problem dadurch nicht auftritt, dass größere Moleküle höhere Ladungen haben, ähnliche $\frac{m}{z}$ -Werte haben und damit ähnlich stark beschleunigt werden).

5.3 Quadrupol-Analysator

Quadrupol-Analysatoren bestehen aus vier parallelen Stäben, bei denen jeweils die gegenüberliegenden Stäbe die gleiche Spannung aufweisen. Die angelegte Spannung besteht aus einer überlagerten Gleich- und einer Wechselspannung. Über Frequenz und die Spannungen kann der $\frac{m}{z}$ -Bereich eingestellt werden. So sind hochsensitive Scans mit geringer Auflösung und sensitive Scans mit hoher Auflösung möglich. Quadrupol-Analysatoren haben in der Praxis eine Länge von etwa 15 cm.

Soll nur eine Komponente gesucht werden, ist die Empfindlichkeit so hoch wie beim TOF. Je mehr jedoch gescannt wird, desto mehr Sensitivität geht verloren.

Quadrupol-Analysatoren können gut mit ESI gekoppelt werden (beide arbeiten in kontinuierlichem Betrieb).

Mit Quadrupol-Analysatoren können nur $\frac{m}{z}$ -Werte bis 2000 gemessen werden, was jedoch in der Praxis kaum eine bedeutende Limitierung ist, da EI/ESI ohnehin nicht über diese Werte hinauskommen.

5.3.1 Triple quadrupole MS (QqQ)

Erklärung zur QqQ-MS-Folie: Es gibt zwei mögliche Schaltungen

- $\frac{m}{z}$ -Bestimmung: Q0 (filtert Moleküle heraus), Q1 und Q2 lassen alle Ionen passieren und nur Q3 dient der Selektion.
- Tandem-Massenspektrum (MS/MS) zur Strukturbestimmung: Q0 lässt alle Ionen passieren, Q1 selektiert einen bestimmten $\frac{m}{z}$ -Bereich, Q2 enthält N_2/Ar als Stoßpartner (*collision-induced dissociation*, CID) und führt zu Fragmentierung der Ionen an den schwächsten Bindungen (Quadrupol nötig, um Effekt der kollisionsbedingten Ablenkung entgegenzuwirken; außerdem Beschleunigung entlang des Quadrupols nötig), Q3 selektiert diese Ionen dann nochmals und ermöglicht eine Analyse der Fragmentierung.

Da der dritte Quadrupol noch einmal die Empfindlichkeit herabsetzt, werden heute statt dieses Quadrupols häufig TOF-Analysatoren verwendet.

Mit anderen Techniken sind auch MS^3 , MS^4 ... möglich. Technisch möglich sind heute auch $MS^{12...25}$.

6 Detektoren

Detektoren funktionieren prinzipiell immer gleich: Die Ionen schlagen auf der Oberfläche des Analysators ein und lösen dort eine Elektronenkaskade aus. Probleme sind Überladungs- und Sättigungseffekte, die auftreten, wenn sehr viele Ionen zur gleichen Zeit auf den Detektor treffen. Dies ist beispielsweise bei der Bestimmung von Isotopenmustern von Bedeutung. Bei der Arbeit mit diesem Ziel muss darauf geachtet werden, dass die Zeitskala entsprechend so gewählt wird, dass diese Effekte das Isotopenmuster nicht beeinflussen.

2014-05-06

Massenspektrometrie

Vorlesung

Prof. Dr. Ralf Hoffmann

7 EI-Fragmentierung

7.1 Identifizierung des Molpeaks

Ein Molpeak muss folgende Kriterien erfüllen:

- Peak mit höchster Massenzahl (abgesehen von Isotopenpeaks)
- Massendifferenz zwischen Molpeak und dem ersten Fragmentpeak muss sinnvoll sein (nicht sinnvoll sind 4...14 und 21...25)
- Isotopenpeaks müssen sinnvolle Intensitätsverhältnisse ergeben (natürliche Häufigkeiten)

7.2 Identifizierung einzelner Elemente – Isotopenmuster

Aus dem Isotopenmuster lassen sich Hinweise auf $A + 2$ -Elemente (Cl, Br, S) finden. Ein 1:1-Isotopenverhältnis bei M und $M + 2$ deutet auf Br, kann aber auch mit Abspaltung von H_2 erklärt werden. Cl erzeugt ein 3:1-Verhältnis und Schwefel eines von 1:4,4%. F und I lassen sich nicht am Isotopenmuster erkennen (insbesondere bei F ein Problem!).

Das Verhältnis zwischen der Intensität des monoisotopischen Peaks $I(M)$ und $I(M + 1)$ ermöglicht eine Abschätzung der C-Atome. Da aber noch andere Elemente $A + 1$ -Elemente sind, sollte man sich auch ± 1 offenhalten.

Verbindungen, die nur C, H und O enthalten, hat die Verbindung eine gerade molare Masse. N ist dreibindig und erzeugt damit bei ungeradzahligem Anzahl an N-Atomen eine ungerade molare Masse (eine geradzahlige Anzahl N-Atome führt aber auch zu einer geraden molaren Masse). Ist das Molekül relativ leicht, so kann häufig N ausgeschlossen werden.

Die Doppelbindungseinheiten sagen etwas darüber aus, wie viele H-Atome gegenüber einer acyclischen gesättigten Verbindung mit gleicher Anzahl an C-, H-, O- und Hal-Atome fehlt. Eine Doppelbindungseinheit entspricht zwei fehlenden H-Atome, einer Doppelbindung oder einem Ringschluss. Eine Dreifachbindung entspricht zwei Doppelbindungseinheiten. Bei einfachen Molekülen $C_c H_h O_o Hal_x N_n S_s$ erfolgt die Anzahl der Doppelbindungseinheiten nach folgendem Schema

1. Streichen aller O- und S-Atome
2. Ersetzen von Hal durch H und N durch CH
3. Anzahl der Doppelbindungseinheiten aus $C_c H_h$ nach

$$N_{DBE} = \frac{(2c + 2) - h}{2}$$

Ist N_{DBE} eines Peaks geradzahlig, so handelt es sich um ein OE-Teilchen (*odd electron number*); es könnte sich um den Molpeak handeln. Ist N_{DBE} eines Peaks halbzahlig, kann es sich nicht um den monoisotopischen Peak handeln.

7.3

Bei der Ionisation wird ein Radikalkation gebildet. Dieses befindet sich zunächst in einem angeregten Zustand, das Elektron kann an jeder Stelle fehlen. Das Molekül wird jedoch schnell in den elektronischen Grundzustand übergehen. Dabei wird das Defektelektron in einem nichtbindenden (oder einem π -Orbital) lokalisiert, da diese energetisch am höchsten liegen.

Diese Stelle trägt das Defektelektron und ist damit radikalisch und kationisch; und deshalb für Folgereaktionen verantwortlich. Bei den Folgereaktionen kann diese Stelle H^* akzeptieren. Es können aber auch benachbarte Bindungen brechen, die durch den $-I$ -Effekt geschwächt werden. Die Fragmentationen können sowohl OE- als auch EE-Teilchen sein.

7.4 Typische Abspaltungen

- $M - 15$ CH_3
- $M - 15$ O aus N-Oxiden oder NO_2 -Gruppen
- $M - 17$ Hinweis auf OH aus Carbonsäuren, selten Alkohole oder Amine
- $M - 18$ Hinweis auf H_2O aus Alkoholen
- $M - 20$ Hinweis auf Fluor
- $M - 29$ C_2H_5
- $M - 43$ C_3H_7 (auch *iso*-Propyl)

Weitere sind in der Folie zu finden.

EE-Teilchen können (praktisch) nur Neutralteilchen abspalten, OE-Teilchen sowohl Radikale als auch Neutralteilchen.

In der Regel sind nur intensive Signale zu erklären. Schwächere Signale sollten dann hinzugezogen werden, wenn sie vom Molpeak ausgehen und unlogisch oder relativ eindeutig sind. Sie sind jedoch häufig nicht aufzuklären.

Insbesondere in der Naturstoffsynthese muss nach einer Analyse immer eine Totalsynthese zur Verifizierung der Aktivität des gefundenen Stoffes durchgeführt werden. Es kann immer sein, dass die Struktur falsch bestimmt wurde oder eine Verunreinigung und nicht die tatsächlich aktive Komponente gefunden wurde.

2014-05-13
Massenspektrometrie

Vorlesung
Prof. Dr. Ralf Hoffmann