

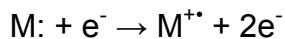
Fragenkatalog – AC III

MS – Teil 2 (Allmaier)

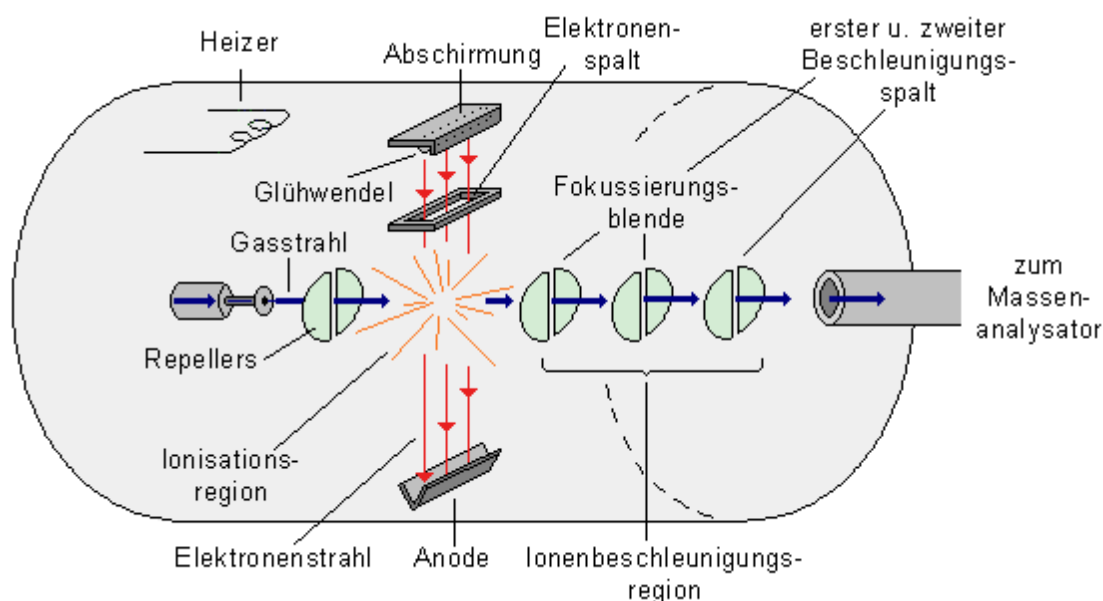
1) Erklären Sie detailliert das Konzept und die Realisierung von ESI, DESI, MALDI, EI sowie CI (Zeichnungen und Beschreibungen). Erklären Sie den Aufbau einer Elektronenstoßionisationsquelle, einer CI Ionenquelle und einer MALDI Ionenquelle. Erläutern Sie je zwei Anwendungen der beiden Desorption/Ionisationstechniken. Wie unterscheiden sich EI Massenspektren der gleichen Verbindung bei 15, 50 und 70 eV? Wie unterscheiden sich MALDI Massenspektren der gleichen Verbindung bei unterschiedlichen Laserleistungsdichten? Führen Sie die Unterschiede zwischen einem EI (70 eV) und einem CI Massenspektrum an.

In der Ionenquelle wird die über das Einlass-System in das Massenspektrometer überführte Probe ionisiert. Die Wahl der Ionenquelle ist abhängig vom physikalischen Zustand der Probe, deren Flüchtigkeit und thermischen Stabilität.

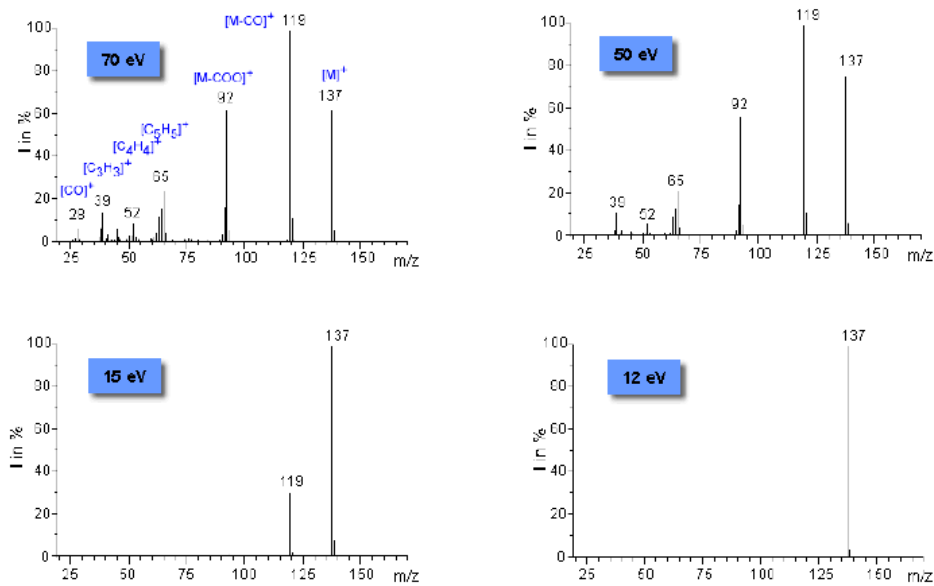
EI (electron impact=Elektronenstoßionisation): Ein geheizter Wolfram- oder Rheniumdraht sendet Elektronen aus, die durch ein angelegtes Potential von etwa 70 eV beschleunigt werden. Der Elektronenstrahl wird im rechten Winkel durch die im Hochvakuum verdampfte Probe geschickt wodurch es zu Zusammenstößen und damit Ionisation kommt.



Das gebildete Radikalkation zerfällt durch die überschüssige Energie in weitere Fragmentationen. Die gebildeten positiven Ionen werden mithilfe einer kleinen Potentialdifferenz zwischen den Ionenreflektoren (=Repellers) und dem ersten Beschleunigungsspalt zum Analysator gelenkt.



Mithilfe der EI können eine Vielzahl organischer Moleküle ionisiert werden,



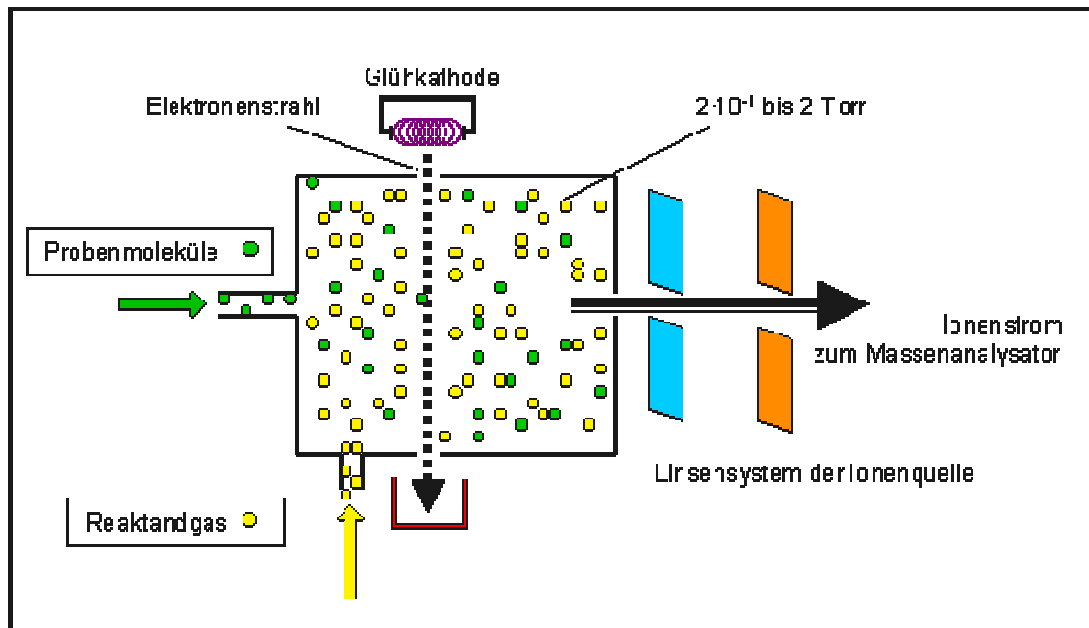
vorausgesetzt sie haben mindestens einen Dampfdruck von 10^{-6} Torr, d.h. sie liegen im Hochvakuum in der Gasphase vor. Das kann auch mithilfe von Erwärmung geschehen, was jedoch wiederum thermisch instabile Proben ausschließt.

Das Spektrum ändert sich entsprechend der Spannung. Wird die Energie des Ionenstrahls erhöht, kommt es zu stärkeren Fragmentierungen (ein Fragment wird zum Basispeak) und zu einer höheren Intensität der Peaks.

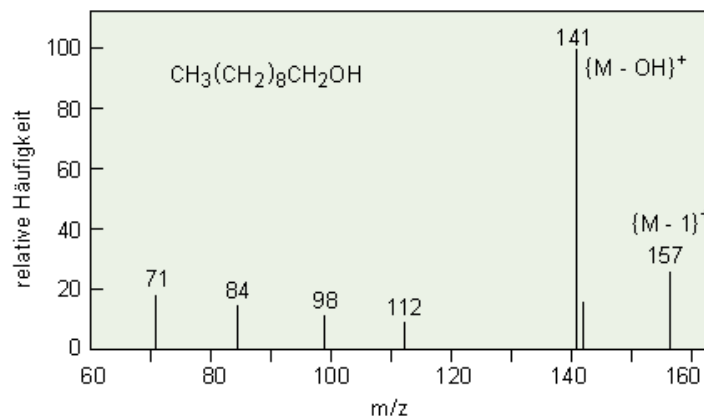
Die Standard-Spannung von 70eV liefert eine gute Ausbeute und Intensität, außerdem wurde durch die Vereinheitlichung der Spektren der Aufbau einer großen Datenbank mit Vergleichsmöglichkeiten möglich.

CI (chemical ionisation=Chemische Ionisation): In die Ionisationskammer wird eine große Menge an so genanntem Reaktandgas (Methan, Isobutan, Ammoniak) eingebracht, welches durch Elektronenbeschuss ionisiert wird (das Konzentrationsverhältnis Probe zu Reagens beträgt ca $1:10^4$, sodass der Elektronenstrahl fast nur mit dem Reaktandgas wechselwirkt. Durch Kollision der gasförmigen Probenmoleküle mit dem Reaktandgas finden Hydridabstraktionen, $[M-1]^+$ von dem Molekül (Masse des Ions um 1 geringer) und Protonenanlagerung $[M+1]^+$ an das Molekül (Masse des Ions um 1 größer) statt; es entstehen Quasi-Molekülonen. Da bei der CI die Überschussenergie deutlich geringer als bei der EI ist, finden weniger Fragmentierungen statt.

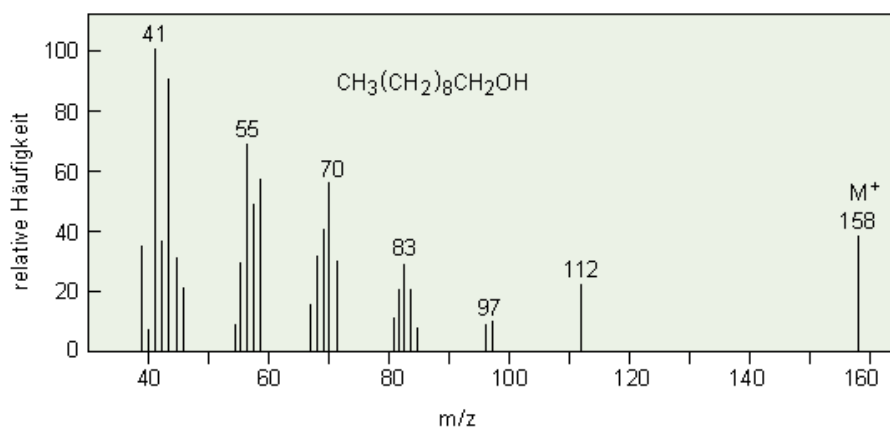
Der Aufbau der Ionisationskammer ist grundsätzlich gleich wie bei der EI mit einem zusätzlichen Einlass für das Reaktandgas. Die meisten MS sind auch so konstruiert, dass sie wahlweise mit EI oder CI betrieben werden können.



Vergleich der Massenspektren von 1-Decanol:
 a) Chemische Ionisation mit Isobutan als Reaktantgas



b) 70 eV-Elektronenstoß-Ionisation



Bei der CI sieht man nur einen Quasi-Molekülion-Peak, mit einer um 1 geringeren Masse. Auffallend sind auch die vielen Fragmentationen bei der EI, der härteren Ionisationsmethode.

ESI (Electrospray ionisation): Die gelöste Probe gelangt durch eine Kapillare (meist das Ende eines LC) an deren Spitze eine Spannung angelegt ist in den Ionisationsraum. Durch die Spannung kommt es zur Ausbildung eines elektrischen Feldes zwischen Kapillare und einer Gegenelektrode, welches die Probenmoleküle ionisiert (Ladung abhängig von der Spannung) und das Lösungsmittel verdampfen lässt. Dabei sammeln sich an der Spitze der Kapillare mehrere gleichartig geladene Ionen, die sich gegenseitig abstoßen; es bildet sich ein sogenannter Taylor-Konus (stabil von 2,9 bis 3,6 kV, abhängig von den Eigenschaften der Probe) der die Probe als feines Aerosol versprüht. Um den Effekt der Vernebelung zu unterstützen wird oft ein neutrales Trägergas (z.B. N₂) beigemischt. Im Unterschied zur EI können auch mehrfach geladene Ionen gebildet werden. Dadurch lassen sich auch sehr große Molekülionen gut detektieren, da das m/z-Verhältnis in einen Bereich verschoben wird, der sich auch mit gängigen Analysatoren erfassen lässt.

Flußraten:

ESI: 200-1000 µL/min

µESI: 0,2-20 µL/min

nESI: 3-20 nL/min

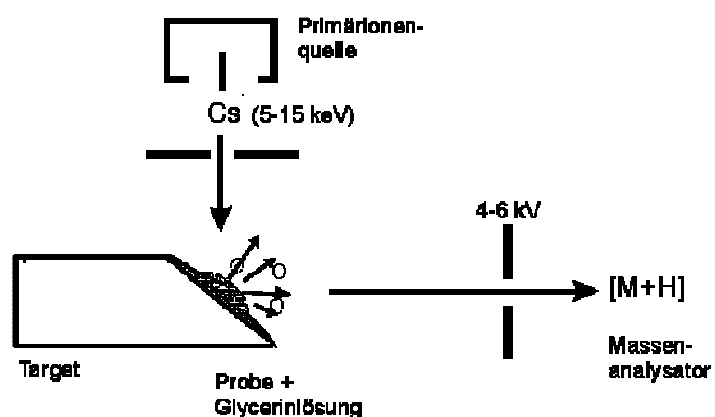
Anwendung als Desorptions/Ionisations-Methode: Kopplung mit LC.

DESI (Desorption Electrospray Ionisation):

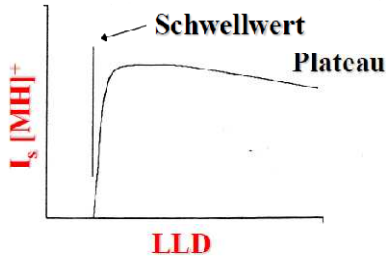
Durch ESI wird ein Strahl an Nano-Teilchen erzeugt, der in einem gewissen Winkel auf die Probe aufschlägt und diese abträgt (Desorption, aber sehr schmutzig). Die gelösten Analyt-Moleküle gelangen in einem gewissen Winkel in das MS und können analysiert werden.

MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization): Die Probenmoleküle werden mittels Laserbeschuss aus einer niedermolekularen Matrix heraus unzerstört verdampft. Dazu wird die Probenlösung mit einer konzentrierten Matrixlösung gemischt (eventuell noch Zusatz von Salzen zur Verbesserung der Ionisation) und auf einen Probenträger aufgebracht. Die Matrix muss eine Substanz mit einem Chromophor, der die Laserenergie absorbiert, enthalten. Die durch die Matrix absorbierte Laserenergie bildet ein Plasma, in dem die Probe relativ unfragmentiert ionisiert wird. Das Signal-

Rausch-Verhältnis kann durch mehrmaliges Beschießen der Probe mit einem Laserpuls verbessert werden. Es werden Laser im UV- (Anregung des aromatischen π-Elektronen-Systems) und im IR-Bereich (Anregung der OH-Bindungen



von flüssigen oder gefrorenen Matrices) eingesetzt. Da die Ionisation schlagartig und gepulst erfolgt, muss mit ebenfalls gepulst arbeitenden Analysatoren (z.B. TOF) gearbeitet werden. Es muss außerdem eine Mindestenergie (Schwellwert) eingestrahlt werden, sonst kommt es zu keiner Ionisierung. Danach bleibt die Intensität der Molekülionen relativ konstant.



Anwendung: hochmolekulare Verbindungen: synthetische und biologische Polymere
Oberflächen, Proteine und Peptide

2) Führen Sie aus, was die Hauptunterschiede zw. Gasphasenionisationstechniken und Desorptions/Ionisationstechniken in der Massenspektrometrie sind (Beispiele und Beschreibungen). In welchem Teil des Massenspektrometers ist ein Hochvakuum unabdingbar und warum? Zeichnen und beschreiben Sie die Grundbausteine eines Massenspektrometers. Beschreiben Sie den Aufbau und die Funktion einer Turbomolekular-, einer Öldiffusions- sowie einer Öldrehschieberpumpe.

Unterschiede:

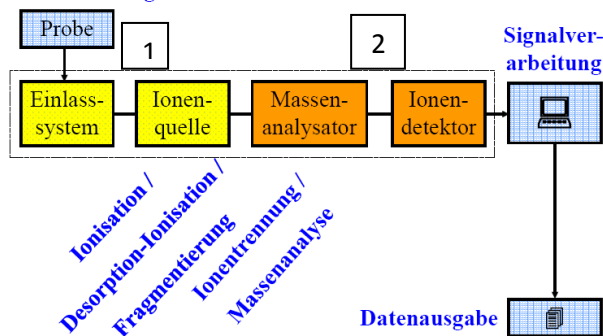
Gasphasenionisations- und Desorptionstechniken unterscheiden sich wesentlich in ihren Prinzipien:

Zu den Gasphasenionisationstechniken zählen CI und EI, welche auch als „harte Techniken“ bekannt sind. Bei der EI werden Elektronen herausgeschlagen und es kommt wegen der Überschussenergie zu einer hohen Fragmentierung. Bei der CI wird ein Reaktandgas durch EI ionisiert und überträgt Ladungen an Analytmoleküle. Die Ionen und Fragmentionen können dann in einem Analysator getrennt und detektiert werden.

Bei den Desorptions/Ionisationstechniken (SIMS basierend: SIMS, MALDI, DESI; spraybasierend: ESI, nESI) geschieht die Desorption und Ionisation in einem Schritt. Die Methoden sind für die Analytmoleküle sehr schonend, es tritt kaum Fragmentierung auf.

Aufbau eines MS.

Probeneinführung



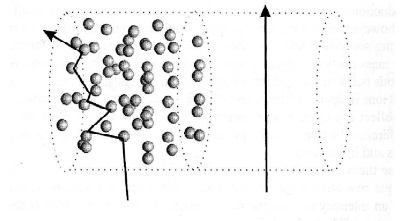
1. Kann im Hochvakuum passieren
2. Muss im Hochvakuum passieren

Warum ist Hochvakuum im Massenanalysator und in Ionendetektor unbedingt notwendig?

Beim Massenanalysator muss das Ion eine gewisse Wegstrecke zurücklegen. Da in der Atmosphäre Teilchen (N₂, O₂, H₂O,...) vorhanden sind, würde es beim Durchqueren von den Teilchen stark abgelenkt werden und somit nicht den Detektor erreichen. Molekül könnte auch zerfallen oder reagieren.

→ Verfälschung.

Im Vakuum kommt es zu weniger Kollisionen.



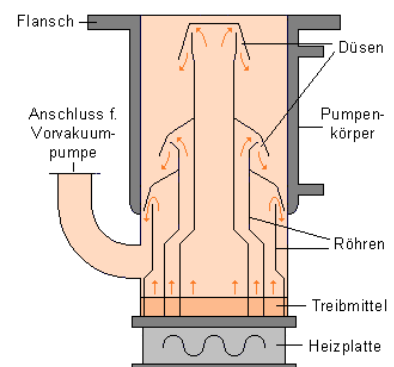
Warum wird ein Hochvakuum in der MS benötigt?

- Ermöglichung der Generierung von freien Ionen und Elektronen in der Gasphase
- Verhinderung von Zusammenstößen zwischen den Ionen und von Ionen mit anderen Teilchen (diese Reaktionen würden zu einem komplizierten Massenspektrum führen)
- Erhöhung der Empfindlichkeit (Stickstoff- und Sauerstoff-Ionen aus der Luft würden den Detektor übersättigen und dies würde die Gesamtempfindlichkeit des Detektors herabsenken)
- Erhöhung der Lebensdauer der bei EI- und CI-Messungen eingesetzten Glühkathode
- Verhinderung der Verschmutzung von Oberflächen durch Kondensation von Probenkomponenten und Schutz der inneren Oberflächen des Gerätes vor Korrosion

Öldiffusionspumpe

Ein Treibmittel (meist Öl oder Quecksilber) wird erhitzt und verdampft. Der Dampf steigt auf und tritt aus den Düsen als Dampfstrahl mit hoher Geschwindigkeit aus und erzeugt einen schirmartigen Treibmittelfluss, der die von oben eindiffundierenden Gasmoleküle mitreißt. Der Dampf kondensiert schließlich an der gekühlten Außenwand.

Diffusionspumpen sind mehrstufig gebaut. Das

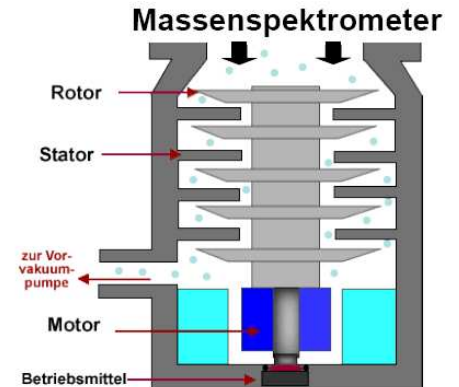


Saugvermögen von Diffusionspumpen ist von der Art des abzupumpenden Gases abhängig. Gase mit niedrigem Molekulargewicht werden schneller abgepumpt als Gase mit hohem Molekulargewicht.

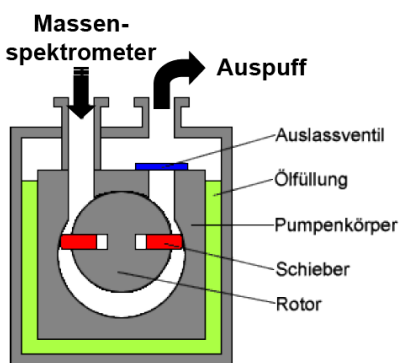
Um das Treibmittel nicht in den Rezipienten gelangen zu lassen, wird oft eine Kühlfalle zwischen Pumpe und Rezipienten geschaltet. Bei entsprechendem Aufbau kann ein Enddruck von bis zu 10^{-7} mbar erreicht werden.

Turbomolekularpumpe

Sind für den Hochvakuumbereich geeignet und haben einen Arbeitsbereich von 10^{-1} mbar bis ca. 10^{-9} mbar. Das Prinzip der Turbomolekularpumpe besteht darin, Gasteilchen durch schnell bewegte, rotierende Oberflächen in die gewünschte Richtung zu bewegen. Wenn die Gasmoleküle mit der Oberfläche des Rotors zusammenstoßen, werden sie beschleunigt und zum Ansaugstutzen der Vorvakuumpumpe befördert. Turbopumpen sind mehrstufig aufgebaut, wobei moderne Designs wie Axialkompressoren arbeiten.



Öldrehschieberpumpe



Für die Erzeugung des Vor- oder Grobvakuaums, das man benötigt um die Hochvakuum-pumpen betreiben zu können, verwendet man meist eine in Öl gelagerte Drehschieberpumpe (engl. oil sealed pump). Diese besteht aus einem metallischen Hohlzylinder in dem sich ein exzentrisch gelagerter Vollzylinder dreht. Zwei Schieber, die durch eine Feder auseinandergedrückt werden, gleiten entlang der Wand. Dabei schieben sie die am Saugstutzen eintretende Luft vor sich her und geben sie schließlich über das ölüberlagerte Ventil nach außen ab. Das erreichbare Endvakuum beträgt etwa 1 mbar. Normalerweise schaltet

man zwei oder drei dieser Pumpen nacheinander (integriert in ein gemeinsames Gehäuse als mehrstufige Pumpe), um ein Endvakuum von 10^{-2} bis 10^{-4} mbar zu erreichen.

3) Definieren Sie folgende Massenspektrometrie-relevanten Begriffe: Molekülion ($[M]^+$), $[M-H]^+$, protoniertes Molekülion ($[M+H]^+$), Fragmentation, $[M+nH]^{n+}$, R_{FWHM} , $R_{50\% Tal}$, $R_{10\% Tal}$, m/z , Basispeak, TIC, relative Intensität, monoisotopes, nominelles und durchschnittliches Molekulargewicht. Nennen Sie mindestens 5 Kriterien zur Beurteilung eines Massenspektrometers.

Molekülion ($[M]^+$): $M + e^- \rightarrow M^{++} + 2e^-$

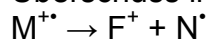
EI: Durch WW der Stoßelektronen mit dem Probenmolekül M entsteht ein Molekülion M^{++} (Radikalkation), dass die gleiche Molekularmasse wie das Molekül hat.

Protoniertes Molekülion ($[M+H]^+$): CI: Durch Kollision der Probenmoleküle mit dem durch einen Elektronenstrahl ionisierten Reaktandgas erfolgt eine Anlagerung eines Proton an das Molekülion.

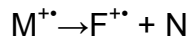
Quasi-Molekülion: CI: Es können nicht nur Protonen angelagert werden, sondern auch andere Kationen, wie etwa Na^+ , die immer vorhanden sind.

$[M-H]^+$: CI: Es können auch Protonen vom neutralen Analyt-Molekül auf das kationische Reaktandgas-Molekül übertragen werden. Am Beispiel Methan:
 $CH_5^+ + M \rightarrow [M-H]^+ + CH_4 + H_2$

Fragmentation: Wenn die zugeführte Energie die zur Ionisation des Moleküls notwendige Energie übersteigt, zerfällt das gebildete Radikalkation durch den Überschuss in Fragmentionen.



Radikalkation zerfällt durch homolytische Bindungsspaltung in ein detektierbares Kation und ein radikalisches Neutralteilchen.



Radikalkation spaltet ein kleines, stabiles Neutralteilchen durch heterolytische Bindungsspaltung ab, zurück bleibt wieder ein detektierbares Radikalkation.

Vor der Bindungsspaltung oder Abspaltung eines Neutralteilchens kann es auch innerhalb des Molekülions zu einer Umlagerung kommen, falls der dafür benötigte Energiebedarf geringer als für die Fragmentierung selbst ist.

$[M+nH]^{n+}$: mehrfach protonierte Molekülionen entstehen vor allem bei der Elektronensprayionisation großer Moleküle, die mehrere positive Ladungen an ihrer Oberfläche stabilisieren können.

m/z : Masse-zu-Ladung-Verhältnis, wird in einem Massenspektrum auf der x-Achse gegen die Intensität aufgetragen.

Auflösung (resolution) allgemein: $R = \frac{m}{\Delta m}$: beschreibt das Vermögen eine MS, Ionen mit unterschiedlichem m/z -Verhältnis zu trennen. Der Wert von Δm kann auf zwei unterschiedliche Arten bestimmt werden. Bei Angabe einer Auflösung ist daher wichtig, auch anzugeben, auf welches m/z sich der Wert bezieht und mit welcher Methode Δm ermittelt wurde.

$R_{10\% \text{ Tal}}$: Bei dieser Methode betrachtet man 2 Peaks, die sich so überlappen, dass das Tal zwischen den beiden Peaks 10% der Intensität des kleineren Peaks aufweist. Δm wird dann als $m_2 - m_1$ ermittelt, wobei $m_2 > m_1$ ist.

$R_{50\% \text{ Tal}}$: Wie $R_{10\% \text{ Tal}}$ nur muss das Tal 50% der Intensität ausmachen. Diese Methode wird besonders bei niederauflösenden Massenanalysatoren verwendet.

R_{FWHM} : FWHM (Full Width at Half Maximum) ist die Halbwertsbreite des Peaks, d.h. die Breite des Peaks bei 50% der Gesamthöhe. Δm ist eben diese Halbwertsbreite.

Basispeak: Das intensivste Signal im Spektrum, dem willkürlich eine Intensität von 100% zugeordnet wird.

TIC (Total ion current = Gesamionenstrom): Alle Ionen eines bestimmten m/z-Bereichs werden detektiert und angezeigt. Im Gegensatz dazu werden beim SI (selected ion) nur ein bestimmter m/z-Wert dargestellt.

Relative Intensität: die Intensitäten der Peaks werden relativ zu dem willkürlich auf 100% gesetzten Basispeak aufgetragen.

Monoisotopes MG: wird durch Addition der exakten Atommasse der am häufigsten vorkommenden Isotope berechnet.

Durchschnittliches MG: wird durch Addition der durchschnittlichen Atommasse aller Isotope berechnet.

Nominales MG: wird durch Addition der auf ganzzahlige Werte gerundeten Atommasse der häufigsten Isotope berechnet.

Kriterien zur Beurteilung eines MS:

- Auflösung $R = m/\Delta m$
- Transmission (gibt an, wie viele Ionen zum Detektor gelangen (in Prozent))
- Massengenauigkeit (setzt sich aus 2 Punkten zusammen: Massenrichtigkeit (wie richtig der gefundene Wert zum theoretischen Wert passt) Massenpräzision (wie präzise die Messung ist))
- Massenbereich
- Empfindlichkeit (LOD = Limit of Detection)
- Linearität (LOQ = Limit of Quantification) (in welchem Bereich ist der Response direkt proportional zur Menge des Analyten?)
- Scangeschwindigkeit
- Tandem MS bzw. Mehrstufen MS Fähigkeit

4) Wie werden Ionen in einem Massenspektrometer detektiert? Erklären Sie das Konzept, das Funktionsprinzip der Ionentrennung (für m/z 35, 37 und 5500) und die Realisierung einer Ionenfalle, eines linearen und Reflektor TOF Analysators und eines Quadrupolanalysators.

Die Detektion von Ionen in einem Massenspektrometer kann grob in zwei Arten unterteilt werden:

- Ortsabhängige Detektion
 - Fotoplatten
 - Array-Detektoren (Jeder Pixel der Fotoplatte wird durch einen eigenen Detektor ersetzt. Effizient aber Teuer => seltener)
 - Mehrere Detektoren für eine begrenzte Anzahl zu registrierender Ionensorten
- Zeitabhängige Detektion
 - Faraday-Auffänger
 - Szintillationsdetektor
 - Sekundärelektronen-vervielfacher (kontinuierlich oder diskontinuierlich) (am häufigsten verwendet)

Die Detektion der Ionen in einem Massenspektrometer erfolgt meist über die Umwandlung der Ionen in Elektronen und anschließender Vervielfachung und Zählung der Elektronen. Alternativ dazu (allerdings mit geringerer Empfindlichkeit) können die Fragmentionen aber auch direkt gemessen werden, z.B. mit Faraday-Bechern oder Photoplatten.

Channeltron

Ein Channeltron ist eine horn-förmige Dynoden-Struktur die im Inneren mit einer Elektronen-emittierenden Schicht überzogen ist. Das erste Elektron wird durch den Aufschlag eines Ions auf eine Konversionsdynode. Durch einen Lawineneffekt werden Sekundärelektronen vervielfacht.

Sekundärelektronenvervielfacher (SEV)

SEVs (engl. electron multiplier tube, EMT) sind ähnlich konstruiert wie Photomultiplier. Sie bestehen aus einer Kaskade von Dynoden, die durch einen Lawineneffekt der Sekundärelektronen die eintreffende Ladung der Ionen verstärken. Das erste Elektron entsteht wiederum an einer Konversionsdynode.

Faraday-Becher

Der Faraday-Becher wird zum direkten Auffangen der Ionen verwendet. Ein angeschlossenes Elektrometer misst damit direkt die Ladung der einfliegenden Ionen. Mit dem Faraday-Becher können keine Einzelimpulse registriert werden, da er um einige Größenordnungen unempfindlicher als z.B. ein SEV ist.

Daly-Detektor

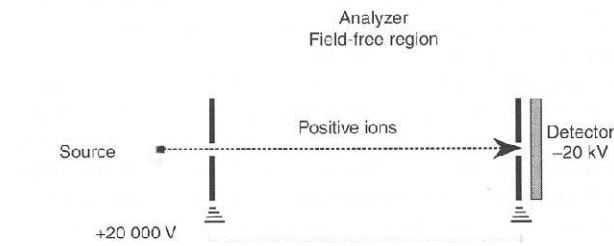
Der Daly-Detektor besteht aus einem Metallknopf der durch Einschlag von Ionen Sekundärelektronen emittiert. Die emittierten Elektronen werden in einem Szintillator durch einen Photomultiplier gezählt. Der Vorteil dieser Anordnung besteht im Schutz des Photomultipliers vor dem Geschehen im Massenspektrometer. Dadurch kann - bei gleicher Empfindlichkeit - eine Lebensdauer des Photomultipliers von 5 Jahren erreicht werden (Channeltrons müssen je nach Betrieb etwa alle 6 Monate getauscht werden).

Channelplate

Ein Channelplate besteht aus einer Matrix aus Glaskapillaren (ca. 20 µm Innendurchmesser), die innen mit einer Elektronenemittierenden Schicht beschichtet sind. An die Kapillaren wird eine hohe Spannung angelegt, sodass die Sekundärelektronen beschleunigt und vervielfacht werden.

Detektortyp	Vorteil	Nachteil
Faradayzylinder	Transmissionstest und Detektionsempfindlichkeit	Geringe Verstärkung
SEV / MCP	Hohe Verstärkung, schnell	Lebensdauer
Dalydetektor	Hohe Verstärkung, robust, lange Lebensdauer	Lichtsensitiv
Arraydetektor	Schnell und sensitiv	Niedere Auflösung, teuer
Orbitrap	Integraler Teil des Analysators	Nur bei Orbitrap möglich
FT ICR MS	Integraler Teil des Analysators	Nur bei FT ICR MS möglich

Prinzip eines linearen Flugzeitanalysators (TOF)



$$q \cdot V = \frac{m \cdot v^2}{2} = \frac{m \cdot L^2}{2 \cdot t^2} \quad \text{und daraus}$$

$$m = \frac{2 \cdot t^2 \cdot V \cdot q}{L^2}$$

m	Masse des Teilchens
v	Geschwindigkeit des Teilchens
V	Feldspannung
q	Ladung des Teilchens
t	Flugzeit
L	Länge der Flugbahn

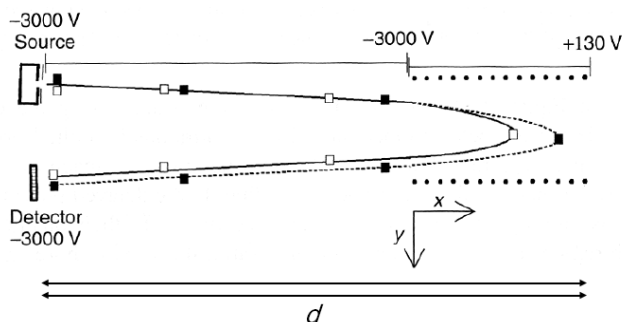
Ein Flugzeitmassenspektrometer (engl. time of flight - TOF) basiert auf der Tatsache, dass Teilchen gleicher kinetischer Energie mit unterschiedlicher Geschwindigkeit fliegen, wenn sie unterschiedliche Masse aufweisen. Beschleunigt man Ionen in einem elektrischen Feld mit der Spannung V so

haben die Ionen beim Verlassen des Feldes die kinetische Energie qV (q ist die Ladung eines Ions), die gleich $\frac{1}{2}mv^2$ sein muss:

Wenn nun die Ionen unterschiedliche Masse aufweisen, müssen Sie entsprechend unterschiedliche Geschwindigkeiten haben, da ja alle anderen Größen in der Gleichung konstant sind. Damit lässt sich aus der Flugzeit der Ionen über eine bestimmte Strecke die Masse dieser Ionen bestimmen.

Das Funktionsprinzip der Ionentrennung bei TOF und RTOF beruht aus den unterschiedlichen kinetischen Energien und der damit zusammenhängenden Geschwindigkeit der Ionen im Analysator. Somit haben Ionen mit einem kleinen m/z Wert eine sehr große Geschwindigkeit und passieren die Wegstrecke in kürzerer Zeit als Ionen mit großen m/z Wert. Daher erreicht das Ione mit m/z 35, dann das Ion mit m/z 37 und etwas verspätet das Ion mit m/z 5500 den Detektor.

Prinzip eines klassischen Reflektors (Ionenspiegel, RTOF)



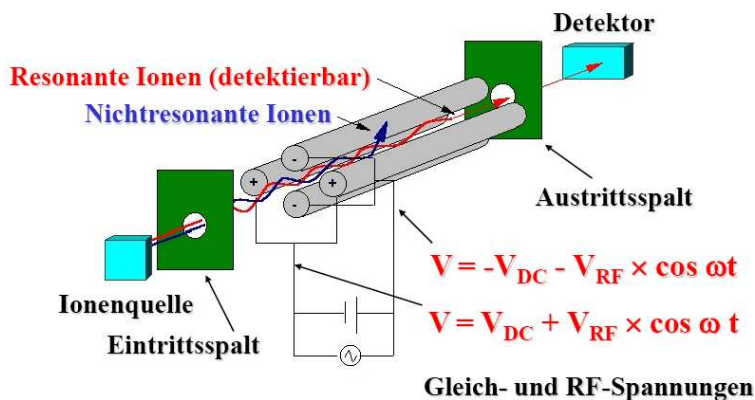
Durch eine Verlängerung der Flugstrecke wird eine bessere Trennung erreicht.

Beim Eintritt der Ionen in die feldfreie Zone weisen die Ionen eine leicht unterschiedliche kinetische

Energie auf, die man durch Ionenspiegel aber vereinheitlichen

kann, wodurch eine bessere Energieschärfe erzielt wird. Dabei wird der Ionenstrahl auf ein Linsensystem geführt, das so konstruiert ist, dass die Ionen "gespiegelt" werden und dabei die Energieunsicherheit verkleinert und somit die Auflösung erhöht wird. Zwischen den Linsen wird Spannung angelegt. Ionen werden zuerst beschleunigt, trennen sich, werden anschließend gebremst bis sie keine Geschwindigkeit mehr haben, werden zurückbeschleunigt und landen auf einen Detektor. So wird die Flugstrecke verdoppelt ohne den Analysator zu verlängern.

Prinzip eines Quatrupolanalysators/filters

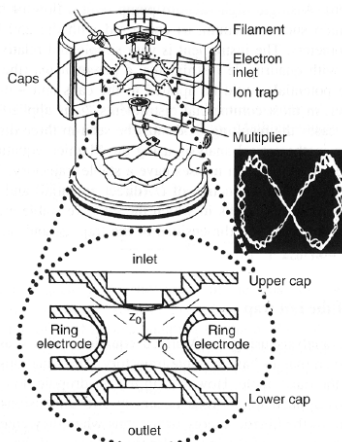


Ein weiteres Prinzip zur Auftrennung von Massen besteht - neben der Trennung im Magnetfeld und der Trennung über die Flugzeit, in der Trennung in hochfrequenten elektrischen Feldern. Die Felder regen die Ionen zu oszillierenden Flugbahnen an, die nur für einen bestimmten Massenbereich stabil sind und

nur diesen Ionen erlaubt, das Massenfilter zu passieren.

Quadrupolmassenspektrometer sind der häufigste Massenspektrometer-Typ, da die Geräte kompakt und kostengünstig gebaut werden können. Quadrupole sind außerdem schnell genug, um mit der Gaschromatographie gekoppelt zu werden. Ein Quadrupol-MS besteht im Wesentlichen aus vier hyperbolischen Metallstäben, die paarweise als Elektroden dienen. An die jeweils gegenüberliegenden Stäbe wird eine positive bzw. negative Gleichspannung angelegt, die mit einer Wechselfspannung überlagert ist. Hierdurch ergibt sich im Inneren dieser vier Stäbe nur für ein bestimmtes Masse/Ladungs-Verhältnis eine stabile Flugbahn, alle anderen Ionen werden ausgeblendet (sie prallen auf die Stäbe und werden entladen). Durch Variation der angelegten Spannungen kann man den gesamten Massenbereich scannen.

Das Prinzip der Quadrupolionenfalle



3D Quadrupolionenfalle: „Iontrap“ / „Paulfalle“

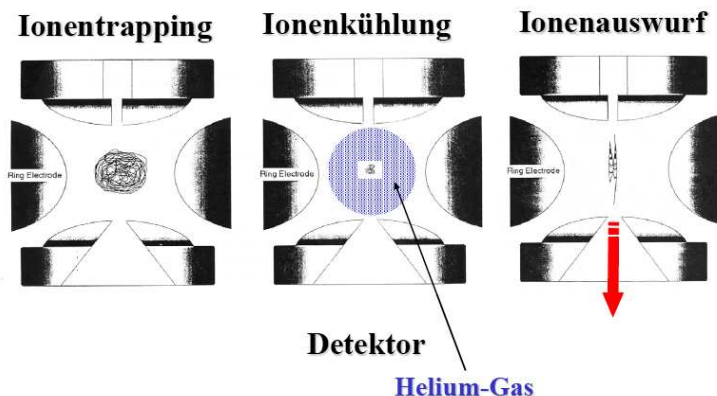
Das Prinzip einer Ionenfalle (engl. ion trap) beruht darauf, Ionen in einem Quadrupolfeld "gefangen" zu halten. Je nach Art der einwirkenden Felder kann man entweder nur Ionen einer bestimmten Masse gefangen halten, oder aber sämtliche Ionen in der Falle vorrätig halten und durch geeignete Veränderung der Felder Ionen mit einer bestimmten Masse dazu zu bringen, den Iontrap zu verlassen. Dadurch ist es möglich, gezielt den Vorrat der Ionen Massen aufgetrennt zu scannen. Die Ionenfalle besteht aus drei Elektroden, einer torusförmigen Elektrode und zwei hyperbolischen Deckkappen. Die Deckkappen haben jeweils ein Loch

für den Eintritt und den Austritt der Ionen. Zwischen der Ring-/Einlass-/und Auslasselektrode wird eine Wechselfspannung und Gleichspannung angelegt, welches ein quadrupoles Feld generieren. Dieses Feld führt dazu, dass sich die Ionen in komplexen Bahnen bewegen (Lissajou Figuren - Im schwarzen Bild)

Vorteile des Ion-Traps liegen in der Möglichkeit Mehrfach-Stoßexperimente durchzuführen und im besseren Signal-Rauschverhältnis der Messung.

Erweiterungen:

1. Octapolfilter werden vorgeschaltet die in der Lage sind einen Ionenstrahl mit großer Parallelität zu generieren.
2. In die Ionenfalle leitet man He-Gas ein. Jedes Ion besitzt eine gewisse kinetische Energie. Ist diese Energie hoch, kann das Feld im Inneren der Ionenfalle nur schwer die Ionen in eine Kreisbahn lenken. Leitet man Heliumgas ein, welches als eine Art „Bremsgas“ wirkt, kann man die kinetische Energie senken und die Ionen gefangen halten



Da die Ionen mit He Atomen kollidieren und die eingebrachte Ionen Energie verlieren, werden sie langsamer und es kommt zu einer „Ionenkühlung“ (Sie verdichten sich im Zentrum der Ionenfalle). Durch das Erhöhen des Quadrupolfelds fangen die Ionen an zu oszillieren wodurch

zuerst die kleinen Ionen dann die größeren Ionen die Ionenfalle verlassen und zum Detektor gelangen. Bei der Quadrupolionenfalle erfolgt die Trennung der Ionen erst im zweiten Schritt. Zuerst werden alle Ionen jeglicher m/z Werte eingefangen und in bestimmte Bahnen im Analysator gelenkt.

5) Berechnen Sie das Isotopenmuster (m/z -Werte und die dazugehörigen resultierenden Intensitäten) von Cl_3 , von Cl_2 , von BrCl bzw. von Br_2 ($^{79}\text{Br} : ^{81}\text{Br} = 1:1$; $^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl} = 3:1$).

Für Verbindungen mit nur einer Atomsorte kann die Formel $(a + b)^n$ angewendet werden. Für a und b werden die Häufigkeitsanteile eingesetzt.

Cl_2 : $a = 3, b = 1$

$a^2 : 2ab : b^2 \rightarrow$ Isotopenmuster: 9:6:1

Cl_3

$a^3 : 3a^2b : 3ab^2 : b^3 \rightarrow$ Isotopenmuster: 27:27:9:1 also ca. 3:3:1

Br_2 : $a = b = 1$

$a^2 : 2ab : b^2 \rightarrow$ Isotopenmuster: 1:2:1

Bei verschiedenen Atomsorten verwendet man: $(a + b)^n(c + d)^m$

BrCl : $a = b = 1, c = 3, d = 1$

$ac : bc + ad : bd \rightarrow$ Isotopenmuster: 3:4:1

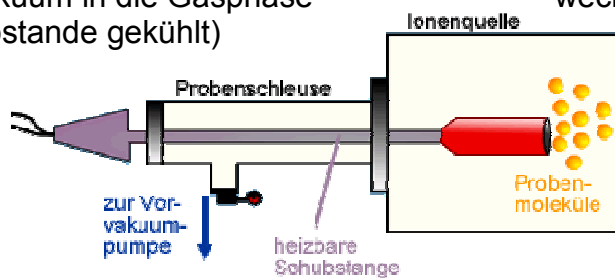
Alternativ kann man auch alle möglichen Kombinationen aufschreiben und deren Häufigkeit bestimmen.

6) Welche Einlasssysteme für gasförmige, flüssige und feste Proben in einer EI-Quelle gibt es? Erklären Sie das Konzept und die Realisierung der wichtigsten zwei Kopplungen GC-EI-MS und LC-ESI-MS sowie welche Möglichkeiten diese Analysetechniken eröffnen. Wie verändern sich die Massenspektren im Laufe der Elution eines gaschromatographischen Peaks? Was versteht man unter dem Begriff Tandem-Massenspektrometrie und welche Information kann man mit einer derartigen Messanordnung erhalten?

Einlasssysteme:

a) Direkter Einlass – für feste und flüssige Proben

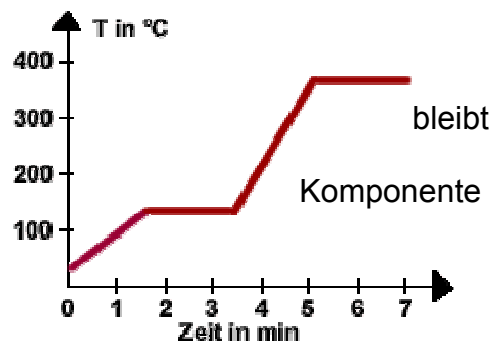
Die Probe wird mit Hilfe einer speziellen beheiz- und kühlbaren Schubstange in die Ionenquelle eingebracht. Die Probe wird zuerst in eine Probenschleuse vor der Ionenquelle eingeführt, die mittels Vorvakuum-pumpe evakuiert ist. Erst danach wird der Verschlussdeckel zum Hochvakuum-system der Ionenquelle geöffnet und der Träger eingeschoben. Aufgrund des geringen Drucks gehen leichter flüchtige Proben von selbst in die Gasphase über, oder der Träger wird elektrisch aufgeheizt bis die Probe verdampft. (Für sehr leicht flüchtige Substanzen, die schon im Vorvakuum in die Gasphase wechseln würden, wird die Schubstange gekühlt)



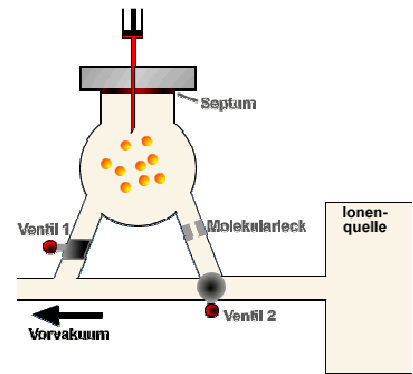
Die Heizung wird über ein spezielles Temperaturprogramm gesteuert:

i) kontinuierliche Aufheizung = linearer Temperaturgradient (alle Komponenten einer unbekannt Probe, d.h mit unbekanntem Siedepunkt sollen in die Gasphase übergehen)

ii) diskontinuierliche Aufheizung = Stufentemperaturgradienten (langsames Verdampfen einer Komponente deren Siedepunkt bekannt ist, d.h die Temperatur über längere Zeit konstant auf der Siedetemperatur bevor zur nächsten Stufe der mit dem höheren Siedepunkt aufgeheizt wird)



b) Indirekter Einlass (flüssige und gasförmige Proben)
 An der Ionenquelle befindet sich ein heizbares Vorratsgefäß mit einem Volumen von etwa 1 cm³. Dieses Gefäß wird durch Öffnen von Ventil 1 mit Hilfe einer Vorvakuumpumpe evakuiert. Nach dem Schließen des Ventils wird die flüssige oder gasförmige Probe durch ein Septum mit einer Spritze eingebracht. Die Temperatur des Vorratsgefäßes wird im Bereich von 20°C bis 250°C so eingestellt, dass der Dampfdruck der Substanz etwa 0,1 Pa beträgt. Dann wird die Probe durch Öffnen des Ventils 2 in den Hochvakuumbereich der Ionenquelle überführt. Der Substanzstrom bleibt über längere Zeit (einige Stunden) konstant, wenn das Vorratsgefäß genügend groß ist. Nach Beendigung der Messung wird das Ventil 2 geschlossen und das Vorratsgefäß durch Öffnen von Ventil 1 erneut unter Vorvakuum gesetzt. Dabei werden die restlichen Probenmoleküle abgepumpt.



- c) direkte Kopplung mit GC – Gasphasenionisation (EI, CI)
 direkte Kopplung mit LC – ESI; LC: HPLC, CZE, IC

Kopplungstechniken:

GC-EI-MS:

Bei der Kopplung von GC mit einem MS, dient der vorgeschaltete Gaschromatograph zu Auftrennung des Substanzgemisches und das Massenspektrometer zu Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten.

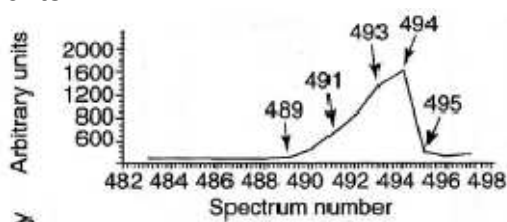
Kapillarsäulen: Die Fließgeschwindigkeit der Eluenten ist in der Regel gering genug um den Säulenausgang des GC direkt über eine geheizte Transferleitung mit der Ionisierungskammer des MS zu verbinden. Das leichte Trägergas kann dort abgesaugt werden.

Gepackte Säulen: Da gepackte Säulen einen höheren Gasdruck benötigen ist die austretende Gasmenge zu groß um direkt in die Ionenquelle geleitet zu werden. Es muss ein Separator vorgeschaltet werden um einen Großteil des Trägergases von dem Analyten abzutrennen.

Für jeden Peak des GC und somit für jede Substanz kann ein Spektrum erstellt werden, das im Rechner gespeichert und später verarbeitet wird.

GC-EI-MS-Geräte werden vor allem zur Identifizierung komplexerer Verbindungen in komplizierten Matrices verwendet, die in natürlichen oder biologischen Systemen vorkommen. Der Einsatz erfolgt in der Lebensmitteltechnologie, Umweltforschung und medizinischen Diagnosen.

Bei genügend schneller Scanrate können mehrere Scans pro eluierter Substanz durchgeführt werden. Die Intensitäten der m/z Peaks steigen dabei stetig und fallen dann wieder ab. Durch eine gewisse Verzögerung verzerren sich die GC-Peaks nach rechts:



LC-ESI-MS:

80% der organischen Verbindungen können nicht zerstörungsfrei in die Gasphase gebracht werden und müssen daher mittel HPLS getrennt werden. Weitere Trenntechniken in flüssiger Phase sind die Kapillar-Zonen-Elektrophorese und die Ionenchromatographie. Die gelösten Analyt-Molekülen eignen sich zur Ionisierung mittels ESI. Nach Anpassen der Flussrate können unterschiedlich dicke Kapillaren verwendet werden. Die Ionisierung kann zusätzlich durch eine unterstützende Flüssigkeit (sheath liquid) oder Gas (nebulizing gas) gefördert werden. Zusätzlich kann die Ionisierung durch Ultraschall verbessert werden. Diese Kopplungstechniken erhöhen den Informationsgehalt über die Analyten. Ein MS liefert klarerweise mehr Informationen als ein simpler UV-Detektor. Noch mehr Möglichkeiten ergeben sich mit Mehrstufen-MS.

Tandem-MS = MS-MS-Kopplung:

Um die Selektivität bei Proben mit komplexer Matrix drastisch zu erhöhen, kann man zwei Massenspektrometer hintereinander schalten. Dabei können im ersten Spektrometer Ionen einer bestimmten Masse ausgewählt werden, die dann im zweiten Spektrometer zu weiterem Zerfall angeregt werden. Es können somit jeweils ein Massenspektrum pro Molekülion aus dem ersten MS erhalten werden. Das erste MS übernimmt sozusagen die Funktion des GC.

Die zu bestimmende Probe wird im ersten Massenspektrometer mit Hilfe weicher Ionisation überwiegend in Molekülionen und protonierte Molekülionen überführt. Dabei entsteht eine sehr große Anzahl verschiedener Ionen, von denen jene Masse im ersten Massenspektrometer (manchmal auch Massenfilter genannt) ausgewählt wird, die die substanzspezifischen Ionen enthält. Die ausgewählten Ionen werden dann in eine feldfreie Stoßkammer (=Ionisationskammer des zweiten MS) geleitet, wo sie mit einem neutralen Gas (Helium, Argon) zusammenstoßen und weiter zerfallen. Die Spektren dieser Zerfallsprodukte werden im nachgeschalteten zweiten Spektrometer aufgezeichnet.

Man erzeugt also ein vollständiges Spektrum der vom ersten Massenfilter ausgewählten Ionen. Dieses Spektrum wird auch CID-Spektrum (engl. collision induced dissociation) genannt und ist für die betreffenden Ionen genauso charakteristisch wie ein normales Massenspektrum für neutrale Moleküle. MS/MS lässt sich kostengünstig in so genannten "Triple-stage Quadrupolgeräten" verwirklichen. Dabei sind drei Quadrupol-Massenfilter unmittelbar hintereinander geschaltet. Das mittlere wird als Stoßzelle benützt.

Unterschiedliche Möglichkeiten der Kopplung:

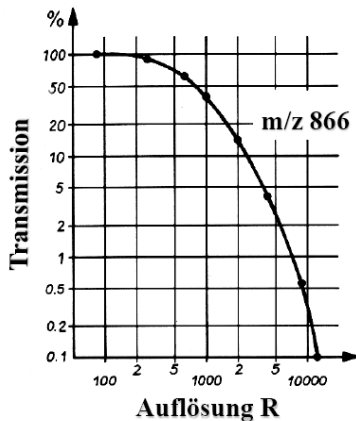
Tochterionen MS-MS: Das erste MS ist fix auf eine Masse eingestellt und filtert das zu dieser Masse gehörende Mutterion heraus, das zweite MS scannt die Tochterionen, d.h. die in der Stoßkammer erhaltenen Fragmente.

Mutterionen MS-MS: Das erste MS scannt einen Spektralbereich ab, während das zweite MS fix auf die Masse eines der Tochterionen eingestellt ist. Dadurch werden alle für ein bestimmtes Tochterion in Frage kommenden Mutterionen registriert. Nahe verwandte Verbindungen ergeben normalerweise mehrere Tochterionen des gleichen Typs, daher eignet sich dieses Verfahren zur Feststellung der Identität und Konzentration einer Klasse eng verwandter Verbindungen.

7) Was kann man aus dem Isotopenmuster eines Moleküllions/Spektrums mit niedriger Auflösung (RFWHM ca. 3000) und was aus dem Muster mit hoher massenspektrometrischer Auflösung (RFWHM > 30.000) an chemischer Information gewinnen?

Beziehung zwischen Ionentransmission und Auflösung R

Es gibt eine strenge Beziehung zwischen Ionentransmission und Auflösung (wie viele



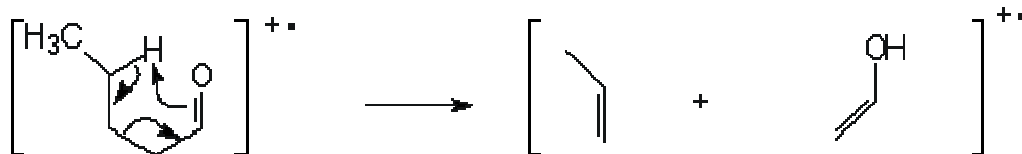
Ionen schick ich rein / wie viele kann ich detektieren).

Bild: Wenn man die Auflösung erhöht wird die Transmission schlechter und umgekehrt.

Bei einer Auflösung von z.B. 1000 hat man eine Transmissionsrate von 35 %. Viele Ionen gehen verloren. Konsequenz: Empfindlichkeit geht ebenfalls verloren. Man kann die Auflösung nicht verbessern ohne auch Verluste bei Empfindlichkeit hinzunehmen. Man kann versuchen ein Mittelmaß zu finden.

Bei hoher Auflösung wird das Isotopenmuster deutlich dargestellt. Aus dem Muster kann man auf eventuell vorhandenen Heteroatome (Cl, Br, ...) schließen, als auch auf den ungefähren C-Gehalt (M+1 Peak relativ zu M Peak in Prozent umrechnen und durch 1,1 dividieren). Bei schlechterer Auflösung überlagern sich die Peaks und die eigentlichen Isotopenpeaks werden von einer Umhüllenden umgeben, es geht Information verloren.

8) Erklären Sie die McLafferty-Umlagerung. Was besagt die Stickstoffregel?



Die McLafferty Umlagerung ist eine H-Umlagerung, die bei vielen Carbonyl-Verbindungen auftritt. Dabei wandert das γ -Wasserstoffatom auf den Sauerstoff der Carbonylverbindung und gleichzeitig wird die Bindung zwischen α und β -Atom gespalten. Das Radikalkation zerfällt in ein Neutralteilchen (meist ein Alken) und in ein Radikalkation. Allgemein sind für eine McLafferty-Umlagerung eine Doppelbindung und ein H am γ -C notwendig, die noch dazu einen 6-gliedrigen Übergangszustand eingehen können.

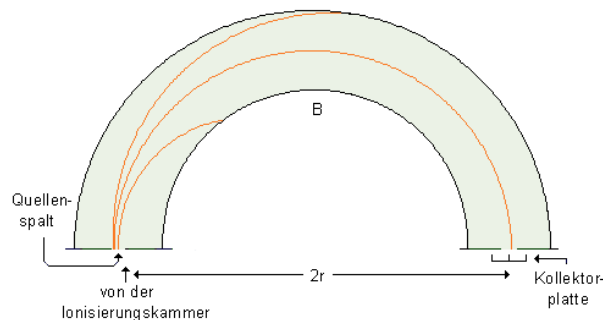
Da in organischen Verbindungen N das einzige Element mit ungerader Bindigkeit und gerader Massenzahl ist, gilt die Stickstoffregel:

Eine ungerade Massenzahl des Moleküllions weist auf eine ungerade Zahl von N-Atomen im Molekül hin, bei einer geraden Massenzahl enthält das Molekül entweder gar keinen Stickstoff oder eine gerade Zahl von N-Atomen.

9) Welche drei physikalischen Prinzipien werden heute zur Trennung von Ionen in einem Massenspektrometer verwendet? Führen Sie die drei Konversionsvorgänge an, die die Analyten durchlaufen müssen, um massenspektrometrisch analysierbar zu sein.

Die von der Ionenquelle erzeugten und beschleunigten Ionen werden im Massenanalysator getrennt. Je nach Massenanalysator erfolgt die Auftrennung der Ionen nach unterschiedlichen Prinzipien, bei allen wird jedoch das m/z -Verhältnis detektiert.

a) Ablenkung der Ionenstrahlen im magnetischen oder elektrischen Feld
 Sektorfeldgeräte: Bei Sektor-Analysatoren wird ein Permanent- oder Elektromagnet verwendet um den Strahl der Ionenquelle auf einen Kreisbogen von 180° , 90° oder 60° zu führen. Das passiert in einem gebogenen Metallrohr, das unter Hochvakuum steht.

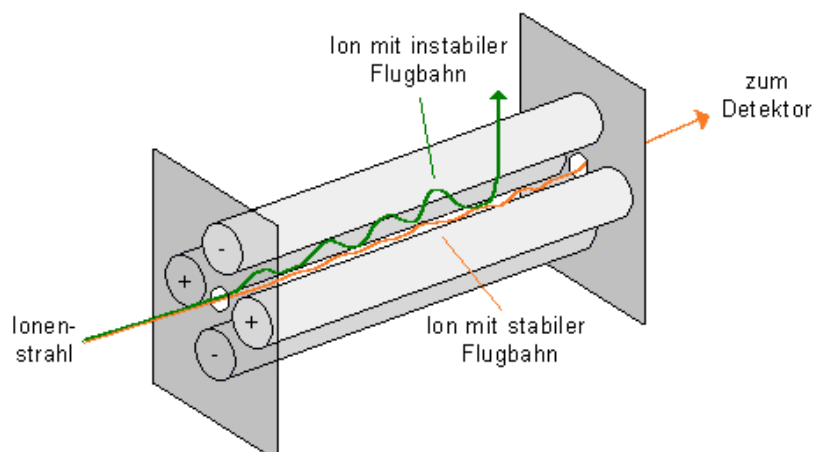


Ionen mit unterschiedlichem m/z -Verhältnis fliegen im Magnetfeld auf Kreisbahnen mit unterschiedlichen Radien, welche neben der Masse auch noch von der magnetischen Feldstärke und von der Beschleunigungsspannung abhängen. Variiert man diese nun kann man genau einen Typ von Ionen mit einem bestimmten Masse/Ladungsverhältnis auf den Ionendetektor bringen.

b) Filterung der Ionen in elektrischen Wechselfeldern.

Quadrupol: Ein Quadrupol besteht im Wesentlichen aus vier hyperbolischen Metallstäben, die paarweise als Elektroden dienen. An die jeweils gegenüberliegenden Stäbe wird eine positive bzw. negative Gleichspannung angelegt, die mit einer Wechselspannung überlagert ist. Je nach Stärke der anliegenden Felder bewegen sich Ionen mit bestimmten m/z -Verhältnissen auf stabilen oder instabilen Flugbahnen.

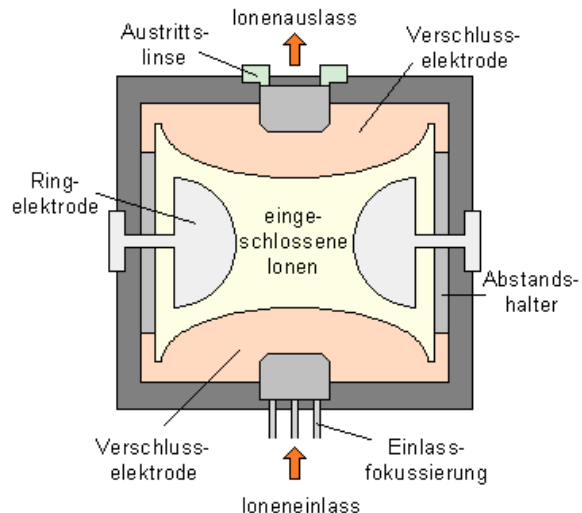
Durch Variation dieser Parameter werden Ionen verschiedener Masse nacheinander auf stabile Flugbahnen gebracht und damit durch den Quadrupol gelassen. Sie werden also gefiltert - man spricht von Massenfiltern. Ein Quadrupol-MS gehört



heutzutage zu den am meisten eingesetzten MS, da der Quadrupolanalysator robust und preiswert ist und schnell genug arbeitet, um mit einem GC gekoppelt zu werden. Die Empfindlichkeit nimmt jedoch mit steigender Masse ab und die Auflösung ist begrenzt.

Ionenfalle: In einer Ionenfalle werden die Ionen in einem Quadrupolfeld festgehalten. Je nach Art der Felder kann man Ionen mit einer bestimmten Masse festhalten oder alle Ionen auf Vorrat zu halten und mit gezielten Veränderungen der Felder Ionen mit einer bestimmten Masse freilassen.

Eine Verbesserung dieses Analysators wird durch das Einleiten von Helium Gas in die Falle erreicht. Reicht nämlich das Feld im Inneren der Ionenfalle nicht aus um Ionen mit hoher kinetischer Energie in eine Kreisbahn zu lenken, wird durch die bremsenden Stoßprozesse mit den Helium Atomen eine Verdichtung der Ionen im Zentrum der Falle herbeigeführt (Ionenkühlung). Vorteile der Ionenfalle liegen in der Möglichkeit Mehrfach-Stoßexperimente durchzuführen und im besseren Signal-Rauschverhältnis der Messung.

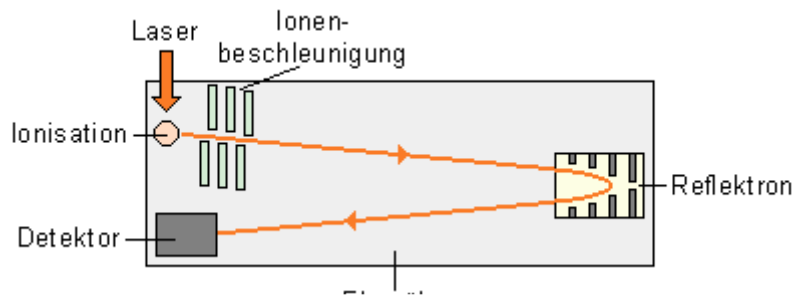


c) Trennung aufgrund unterschiedlicher Flugzeit im feldfreien Raum

Flugzeitanalysatoren (TOF=time of flight):

Die in der Ionenquelle (bevorzugter Einsatz von MALDI, da auch das TOF-Gerät im gepulsten Modus arbeitet) erzeugten Protonen werden durch einen elektrisches Impuls mit 10^3 bis 10^4 Volt (und gleicher Frequenz wie der Ionisationsimpuls) beschleunigt und treten in das feldfreie Driftrohr (1m langes Stahlrohr mit Hochvakuum) ein. Weil alle Ionen beim Eintritt in das Rohr die gleiche kinetische Energie besitzen, variieren ihre Geschwindigkeiten umgekehrt proportional zu ihrer Masse, d.h. die leichteren Ionen erreichen den Detektor vor den schwereren Ionen. Die Flugzeiten liegen im Mikrosekunden-Bereich, deshalb muss die digitale Datenaufzeichnung sehr schnell erfolgen.

Durch Verlängerung der Flugzeit kann man auch eine bessere Auftrennung der Ionen erreichen. Um dies ohne Verlängerung des Driftrohres zu realisieren, werden Reflektoren (=Ionenpiegel) eingesetzt.



Am Ende des Rohres wird ein elektrisches Feld angelegt, das der Beschleunigungsrichtung entgegengesetzt ist und so die Ionen zuerst abbremst und dann in die entgegengesetzt Richtung beschleunigt. Die Ionen besitzen nicht die exakt gleiche kinetische Energie, das kann aber im Reflektro ausgeglichen werden, wodurch eine bessere Energieschärfe erreicht wird.

3 Konversionsvorgänge:

Aggregatzustand: fest/flüssig → Verdampfung/Desorption → Gasphase

Druck: Atmosphärendruck → Druckreduktion → (Hoch-)Vakuum

Ladungszustand: neutral → Ionisation → ionisch