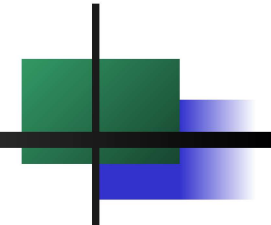


Massenspektrometrie (MS)

Michael Schrader (MS)



Lernziele/ -fragen

- Physikalisches Grundprinzip, m/z ?
- Ionisierung von Molekülen?
- Fragmentierung von Gasphasen-Ionen?
- Wie werden Biopolymere ionisiert?
- Massenanalysatoren und Ionen-Detektoren
- Welche weiteren Informationen in Spektren sind wichtig?

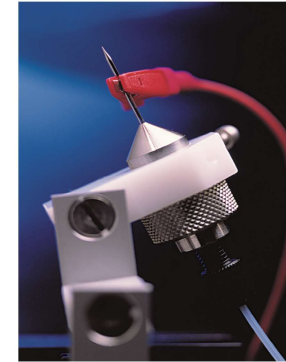
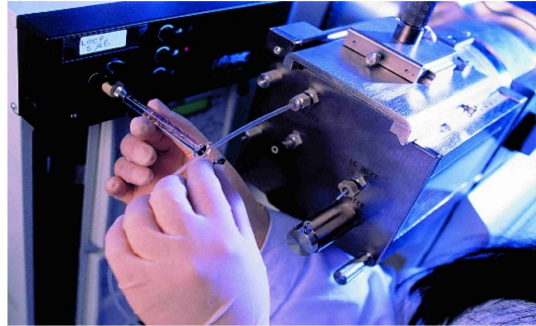
Inhalte (teilweise überlappend)

Teil I

- Einführung/physikalische Grundlagen
- EI-MS: Ionisierung und Spektren
- Fragmentierung kleiner Molekülonen

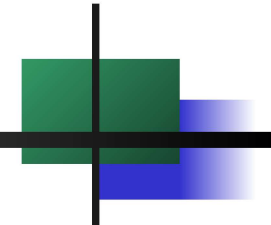
Teil II

- ESI und MALDI zur Ionisierung von Biopolymeren
- Typen von Massenanalysatoren und Ionen-Detektoren
- Weitere Spektreninformationen: Isotopen Auflösung, und S/N



Massenspektrometrie (MS)

Michael Schrader (MS)



Lernziele/ -fragen

- Physikalisches Grundprinzip, m/z ?
- Ionisierung von Molekülen?
- Fragmentierung von Gasphasen-Ionen?
- Wie werden Biopolymere ionisiert?
- Massenanalysatoren und Ionen-Detektoren
- Welche weiteren Informationen in Spektren sind wichtig?

Inhalte (teilweise überlappend)

Teil I

- Einführung/physikalische Grundlagen
- EI-MS: Ionisierung und Spektren
- Fragmentierung kleiner Molekülonen

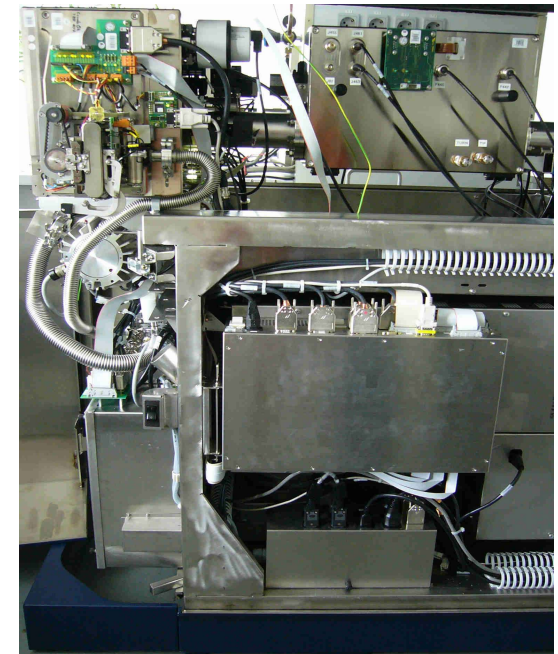
Teil II

- ESI und MALDI zur Ionisierung von Biopolymeren
- Typen von Massenanalysatoren und Ionen-Detektoren
- Weitere Spektreninformationen: Isotopen Auflösung, und S/N

Massenspektrometrie - Einführung

Historie

- Erstes Massenspektrometer um 1910 durch J.J. Thomson (UK, Nobelpreis 1906), nach Bestimmung von e/m_e (des Elektrons) 1897
- Elemente haben typische Atommassen und bekannte Isotope. Moleküle haben demnach ebenfalls definierte Molekülmassen.
- Einsatz in der organischen Chemie seit etwa 1934, erste kommerzielle Geräte ab 1948 (USA, UK, D-Bremen)
- GC/MS seit 1958
- LC/MS ab 1968, kommerziell ab 1979 (online-Kopplung)
- Fulminante Entwicklung in der Biotechnologie seit 1987

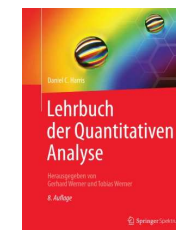
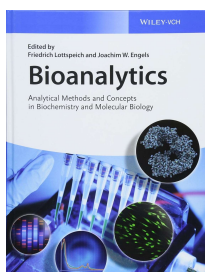
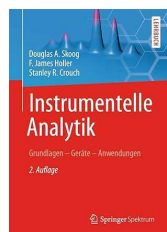


*I feel that there are many problems in chemistry which could be solved with far greater ease by this than any other method
(J.J.Thomson, from Jennings 2012 „A History of Europ. MS)*

Massenspektrometrie - Literatur

Solide Übersichten

- Kap. 20 (35 S.), Skoog/Holler/Crouch „Instrumentelle Analytik“, Springer, 6. Aufl. 2013
- Kapitel 15 (52 S.) in Lottspeich/Zorbass „Bioanalytics“, Wiley 2018, (altern. deutsch ab 1. Aufl. 1998, Spektrum)
- Kap. 5.6 (20 S.) in Cammann „Instrumentelle Analytische Chemie“ Spektrum 2001
- Kap. 21 (35 S.), Harris „Lehrbuch der Quantitativen Analyse“, Springer, 6. Aufl. 2014 (altern. englisch, Freeman)
- Kap. (40 Seiten) in Rouessac/Rouessac Wiley, 6th ed. 2004 (altern.franz. 8. Aufl. Dunod)
- Web-Seiten
 - <https://masspec.scripps.edu> (Scripps Center, CA,USA)
 - <https://dgms.eu/de/ueber-uns-dgms/das-ist-massenspektrometrie/> (DGMS: Deutsche Ges. für Massenspektrometrie)



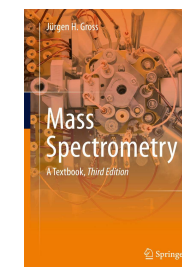
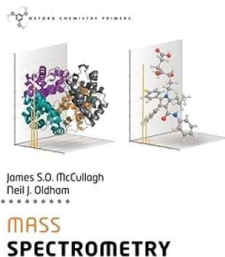
Vertiefte Übersichten (bis Master-Niveau)

- Gross „Massenspektrometrie : Spektroskopiekurs kompakt“, Springer 2019 (breit gestreute Anwendungen, nicht immer Bioanalytik)
- Budzikiewicz/Schäfer „Massenspektrometrie: Eine Einführung“, Wiley 2012 (238 S.) (eher chemische Anwendungen, weniger Bioanalytik)
- McCullagh/Oldham „Mass Spectrometry“, Oxford Univ. Press 2019 (181 S.) (mehr Bioanalytik)



Nachschlagewerke (für Praxis)

- de Hoffmann/Strobant „Mass Spectrometry“, Wiley, 3. Aufl. 2007 (489 S.)
- Gross „Mass Spectrometry“, Springer, 3rd ed 2017 (993 S.)
- Lehmann, „Massenspektrometrie in der Biochemie“, Spektrum 1996 (ca. 400 S.)



molekulare Masse

Der Gebildete treibt die Genauigkeit nicht weiter, als es der Natur der Sache entspricht.
Aristoteles

Einheiten

- Atommasseneinheit (SI):
 $1 \text{ u} = 1/12 m(^{12}\text{C-Atom}) = 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg}$
 $\approx 0,000000000000000000000000002 \text{ kg}$
- Biochemisch üblicher: $1 \text{ Da (Dalton)} = 1 \text{ u}$
- Rel. Molekülmasse: $M_r = M/1 \text{ u}$ (einheitenlos)
- $1 \text{ pg} = 1 \times 10^{-12} \text{ g}$ (s. Tab.) entspricht $6 \times 10^{11} \text{ u}$

Typische Molekülmassen

Kleine Moleküle

- Org. Lösungsmittel: Ca. 50-100 u
- Aminosäuren: um 130 u (Gly 75 bis ...)
- Zuckermoleküle: um 180 u (z.B. $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)
- komplexe org.-chem. Stoffe: 200-500 u

Biopolymere

- Pharmaproteine: etwa 6-150 ku (oder kDa)
- Polynucleotide: mehrere 10-1000 ku
- Polysaccharide: mehrere 100-1000 ku
- (Viren, Molekülverband: etwa 2000-3000 ku)

„Particle“ (source: wikip.)	approx. mass / pg	approx. mass / u
hair	10^8	6×10^{19}
<i>birch pollen</i>	10^4	6×10^{15}
<i>E. coli</i>	1	6×10^{11}
Influenza virus	6×10^{-4}	$3,6 \times 10^8$

Particle	symbol	approx. mass / u
photon, $E=mc^2$		7×10^{-9}
electron	e	0,00054
proton	p	1
carbon atom	C	12
glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180
cholesterol	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$	387
albumin (BSA)	$\text{C}_{2932}\text{H}_{4614}$ $\text{N}_{780}\text{O}_{898}\text{S}_{39}$	66433

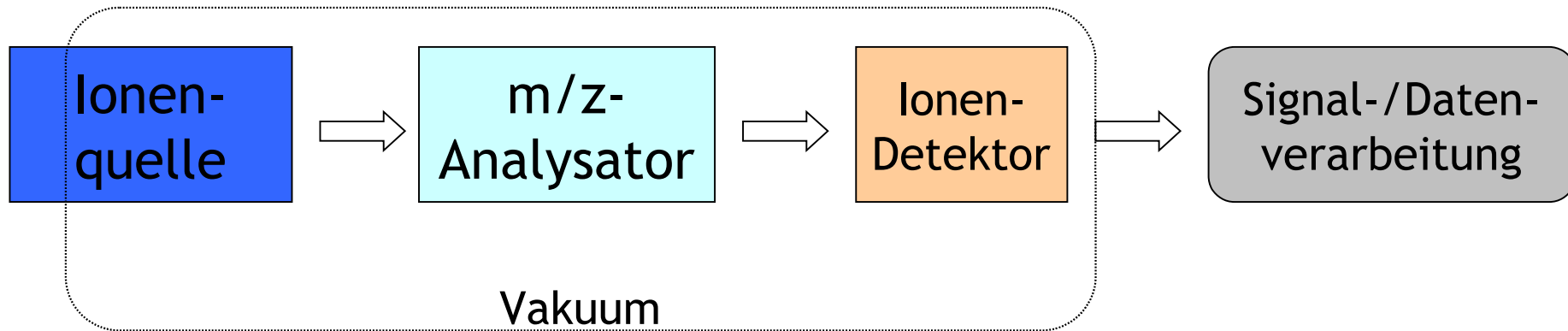
Mass spectrometry is no billard?

- Mass results in inertia, thus a definite force leads to definite acceleration

Newton's law: $F = m \cdot a \Rightarrow m = F/a$

- Needed: force acting on particles and measurement of acceleration
- Particles can easily be accelerated by electric or magnetic fields if they are charged
- Collisions have to be avoided to keep analysis simple





- Jedes zu analysierende Molekül muss mindestens eine Ladung tragen. Die Ionenerzeugung in der **Ionenquelle** ist elementar.
- Regelbare Wechselwirkung Kraft/Trägheit in **m/z-Analyse**.
- Ionen werden als Teilchen oder Feldwirkung **detektiert** und als **Spektren** gespeichert und visualisiert.
- Mit Ionen kann nur unter **Vakuumpumpe** länger experimentiert werden. (Typische Werte 10^{-5} bis 10^{-9} hPa, durch Kombination von Drehschieber- und Turbopumpen)

Stöße im Vakuum

- Häufigkeit von Stößen in der Gasphase wird beschrieben durch die mittlere freie Weglänge λ der Gasmoleküle, für gleiche Teilchen:

$$\lambda = kT / (p\sigma\sqrt{2}) = kT / (p \cdot \pi d^2 \sqrt{2})$$

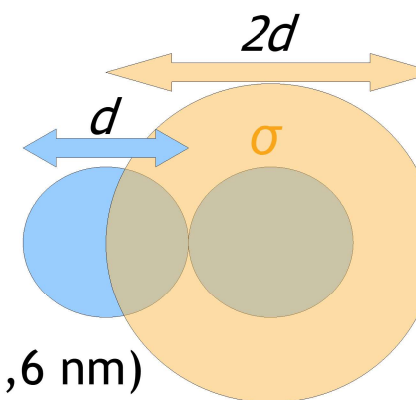
kT : mittl. thermische Energie,
(aus Boltzmann-Konst. k und Temperatur T)

p : Druck

σ : Stoßquerschnitt

d : Durchmesser der (kugelförmigen) Teilchen

*je größer p , desto mehr Stöße, desto kleiner λ
je größer σ , desto kleiner λ*



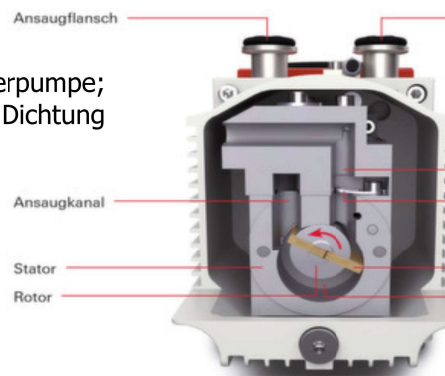
Vergl. Ausschlussvolumen bei van der Waals, hier Ausschlussfläche

- λ für 25° C, Stickstoff ($d \approx 0,3$ nm) und Insulin ($d \approx 1,6$ nm)

p /hPa	10^3	1	10^{-3}	10^{-6}
N_2	$0,1 \mu\text{m}$	$0,1 \text{ mm}$	10 cm	100 m
Insulin	4 nm	$4 \mu\text{m}$	4 mm	4 m

- Vakuum-pumpen:

Schnitt durch Drehschieberpumpe;
Betrieb mit Ölfüllung, zur Dichtung
(Bild: Pfeiffer Vacuum)



Turbo(molekular)pumpe
Quelle: wikipedia.de; User:Liquidat

Video: <https://www.pfeiffer-vacuum.com/de/produkte/vakuumerzeugung/turbopumpen/>

Thema: Massenspektrometrie (MS)

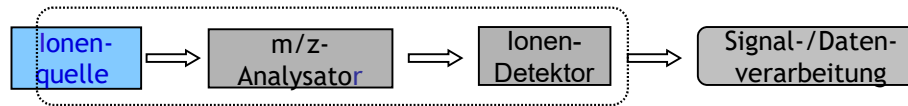
Klassische bzw. historische Ionisierungsverfahren

Kleine (org.chem.) Moleküle

- ◆ Elektronenstoß-Ionisierung (EI)
- ◆ Chemische Ionisierung (CI)
bzw. APCI: atmospheric pressure CI

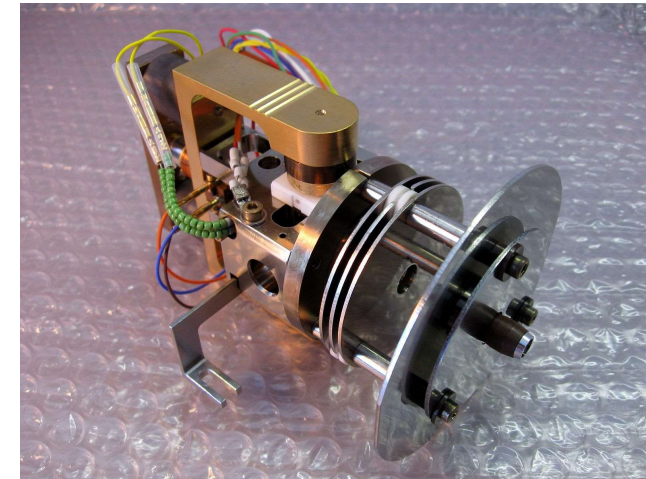
Biopolymere

- ◆ Field Desorption (FD, 1969)
 - Desorption von fester Oberfläche durch Erhitzen und elektr. Feld
- ◆ Fast Atom Bombardment (FAB)
 - Probe in flüssiger Matrix, Ionisierung durch Beschuss mit Atomen
 - kleinere Biomoleküle (z.B. Peptide) sind messbar
- ◆ Plasma Desorption (PD, 1976)
 - Probe auf Nylonfolie, Schockwellen von ^{252}Cf -Kernspaltungsprodukten
 - erstmals sind Moleküle >10 ku messbar (1981)
- ◆ Elektrospray-Ion. (ESI, 1987), Erl. später
- ◆ MALDI (1988), Erl. später

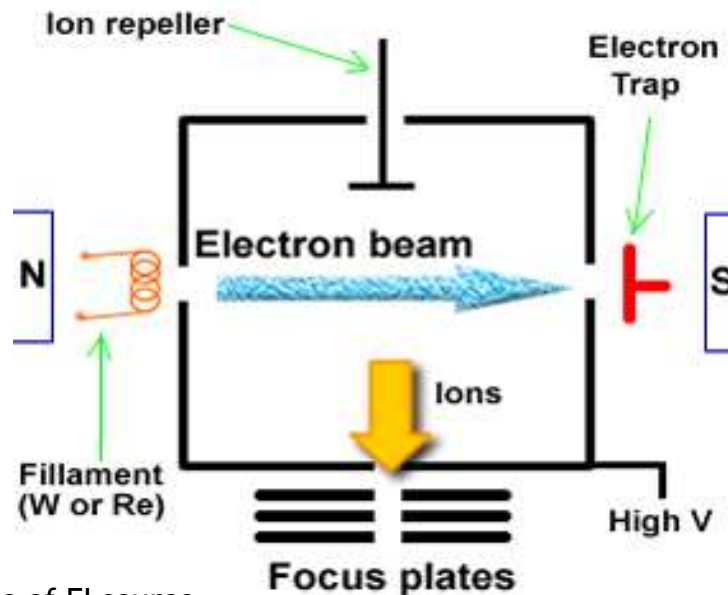


Electron impact (EI) ionisation

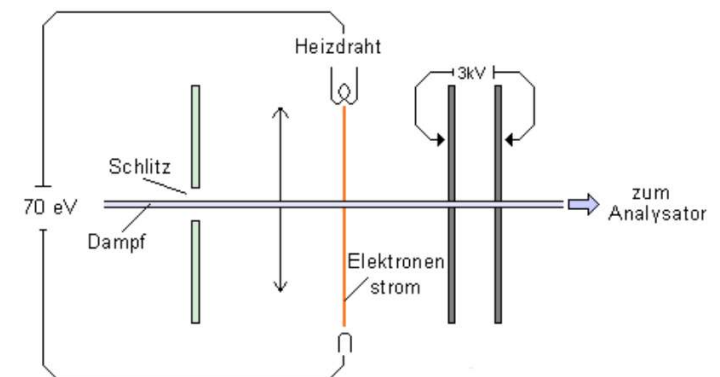
- Molecules are hit by an accelerated electron and one electron is eliminated from the molecule, leading to a molecular radical ion
 $M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2 e^-$
- Energy is quite high breaking chemical bonds, so-called in-source fragmentation



Ion source for EI and CI
 Source: Fulvio314, de.wikipedia.org (2020)



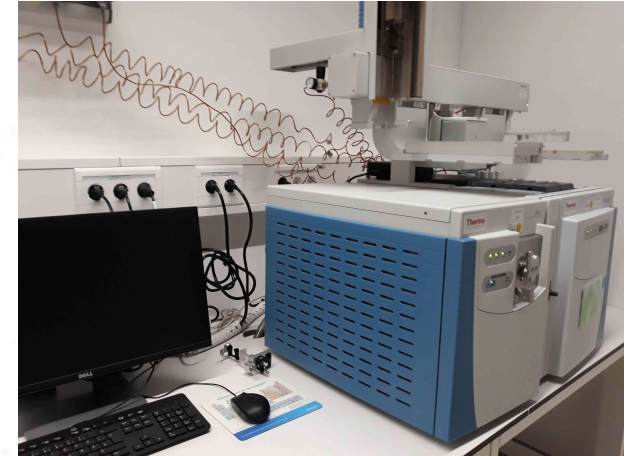
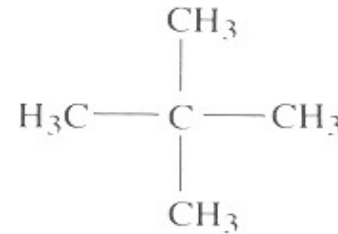
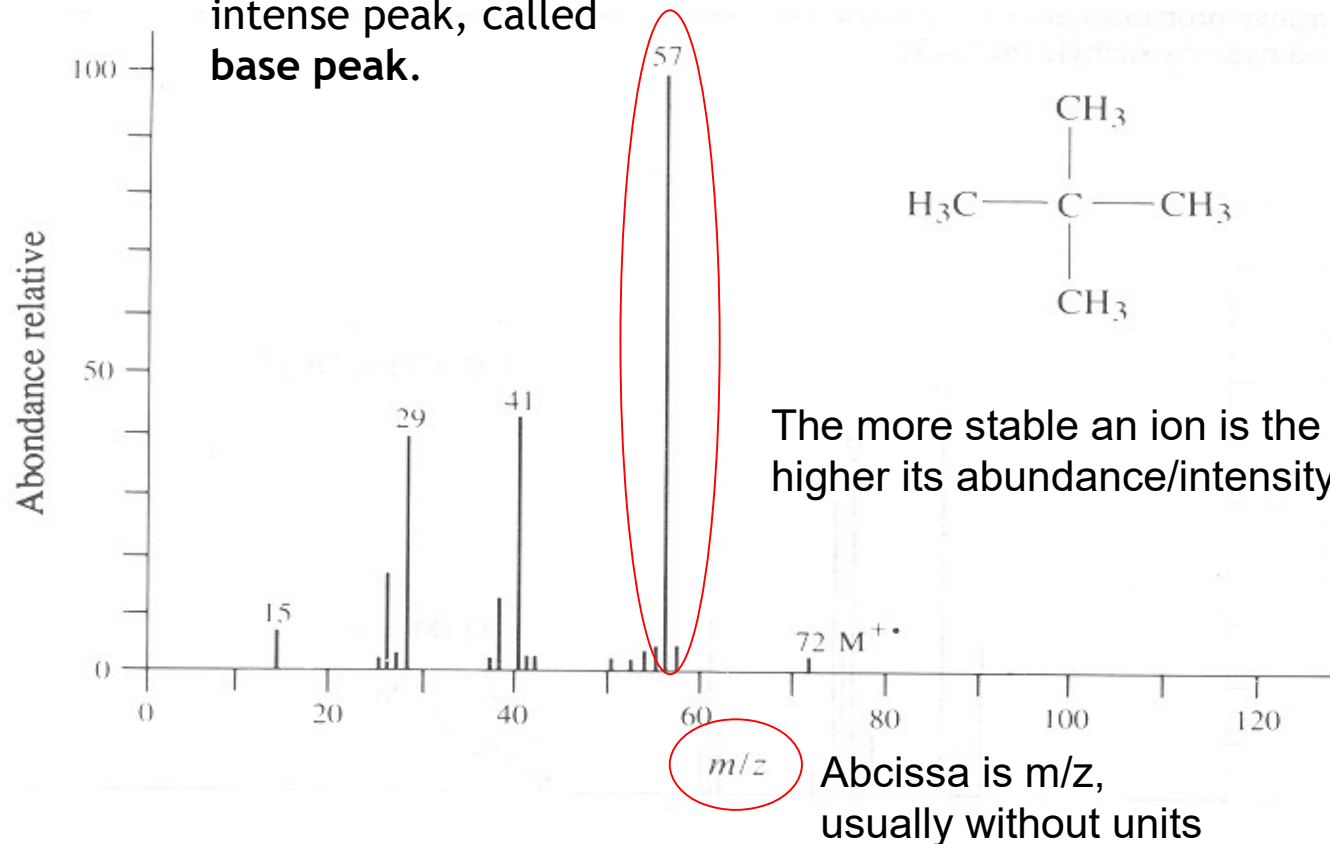
Principle of EI source
 Source: www.hull.ac.uk/chemistry/masspec3



Scheme of ion source for EI
 Source: www.vias.org/tmanalytik_germ (2020)

Typical EI mass spectrum of small molecules are shown as histograms containing fragments

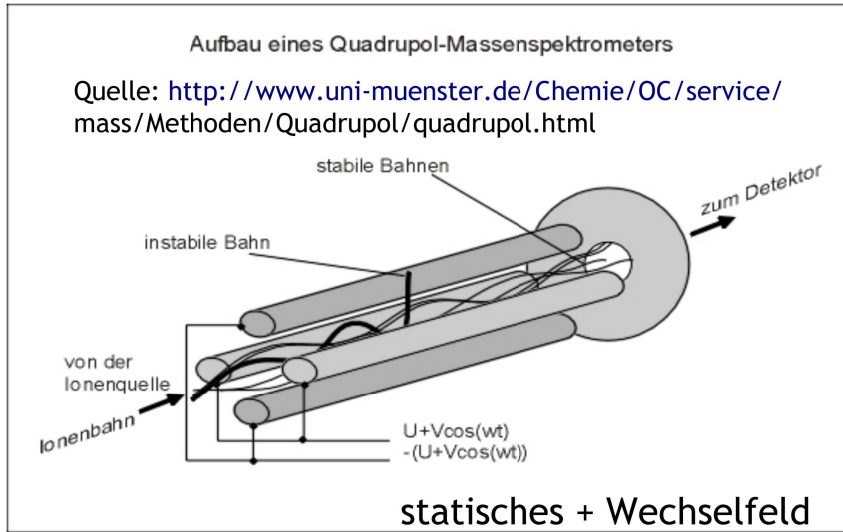
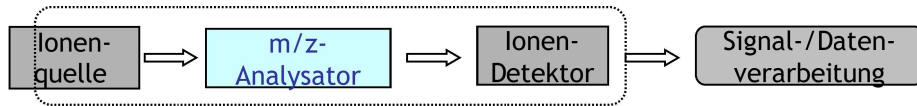
Intensities are given as percentage (%) of the most intense peak, called **base peak**.



GC-MS in routine lab
Source: own picture (2023)

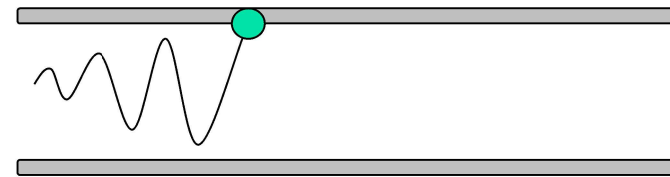
For small ions, the charge state is usually $z = 1$, thus the nominal mass of the molecular ion is directly measured

m/z-Analysator für Ionenströme mit elektr. Feldern: Quadrupol

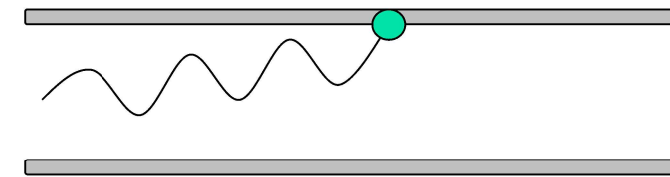


Seitenansicht

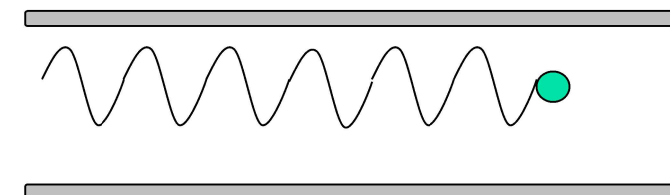
- Ion mit zu kleinem m/z im Wechselfeld
⇒ Auslenkungen werden verstärkt



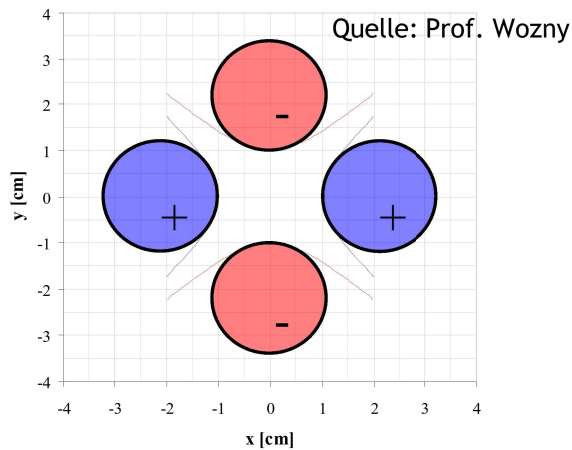
- Ion mit zu großem m/z im Gleichstromfeld
⇒ Drift lenkt aus der Bahn



- stabile Flugbahn durch periodische Flugbahn bei den angelegten Feldern

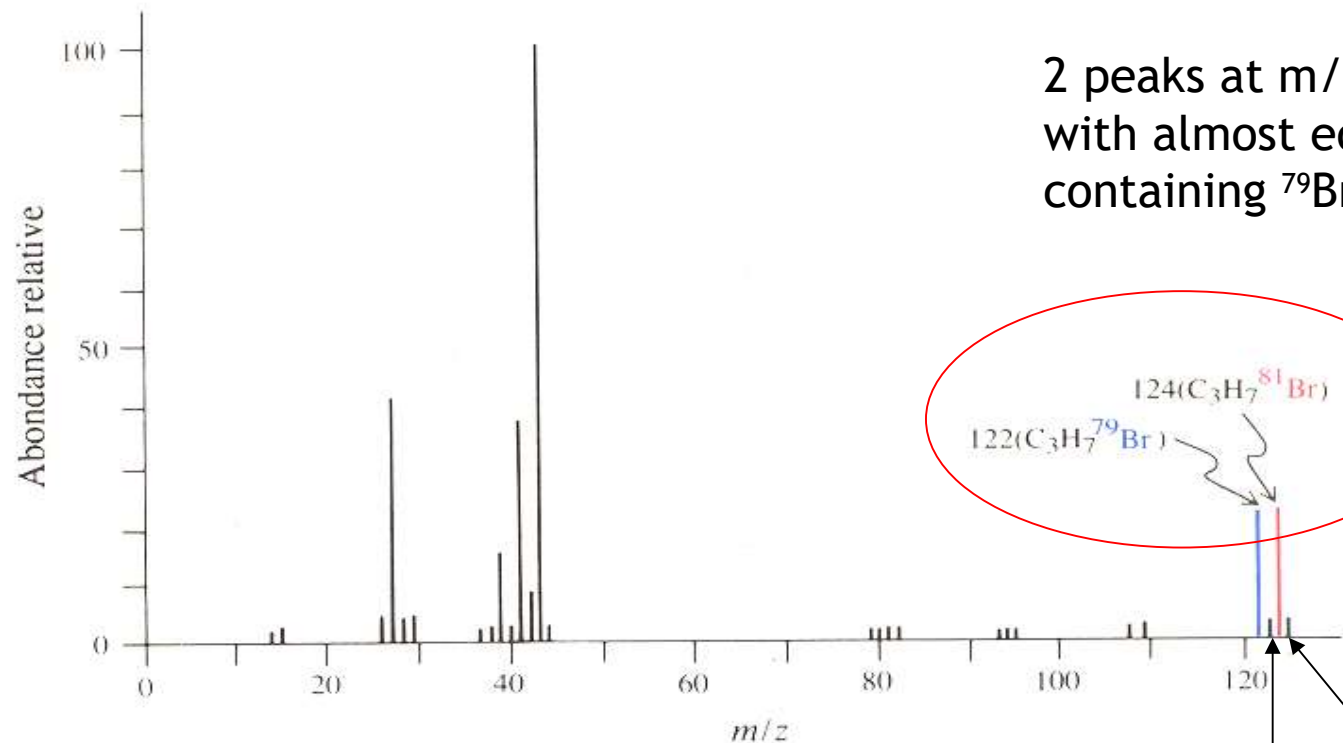
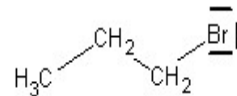


Querschnitt der Stäbe

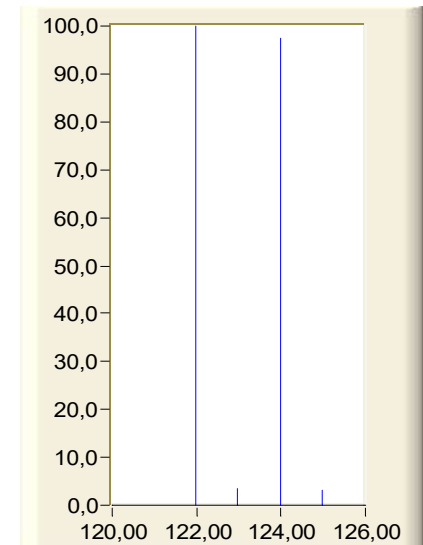
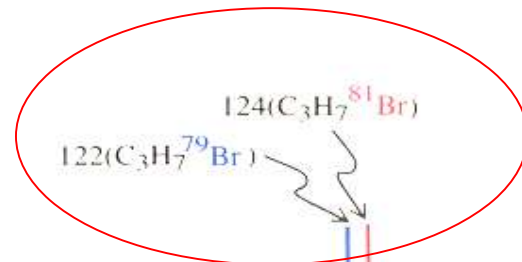


Intensities of isotopic peaks correspond to their natural abundance

Spectrum of 1-bromopropane.



2 peaks at $m/z = 122$ and 124 with almost equal intensities containing ^{79}Br and ^{81}Br

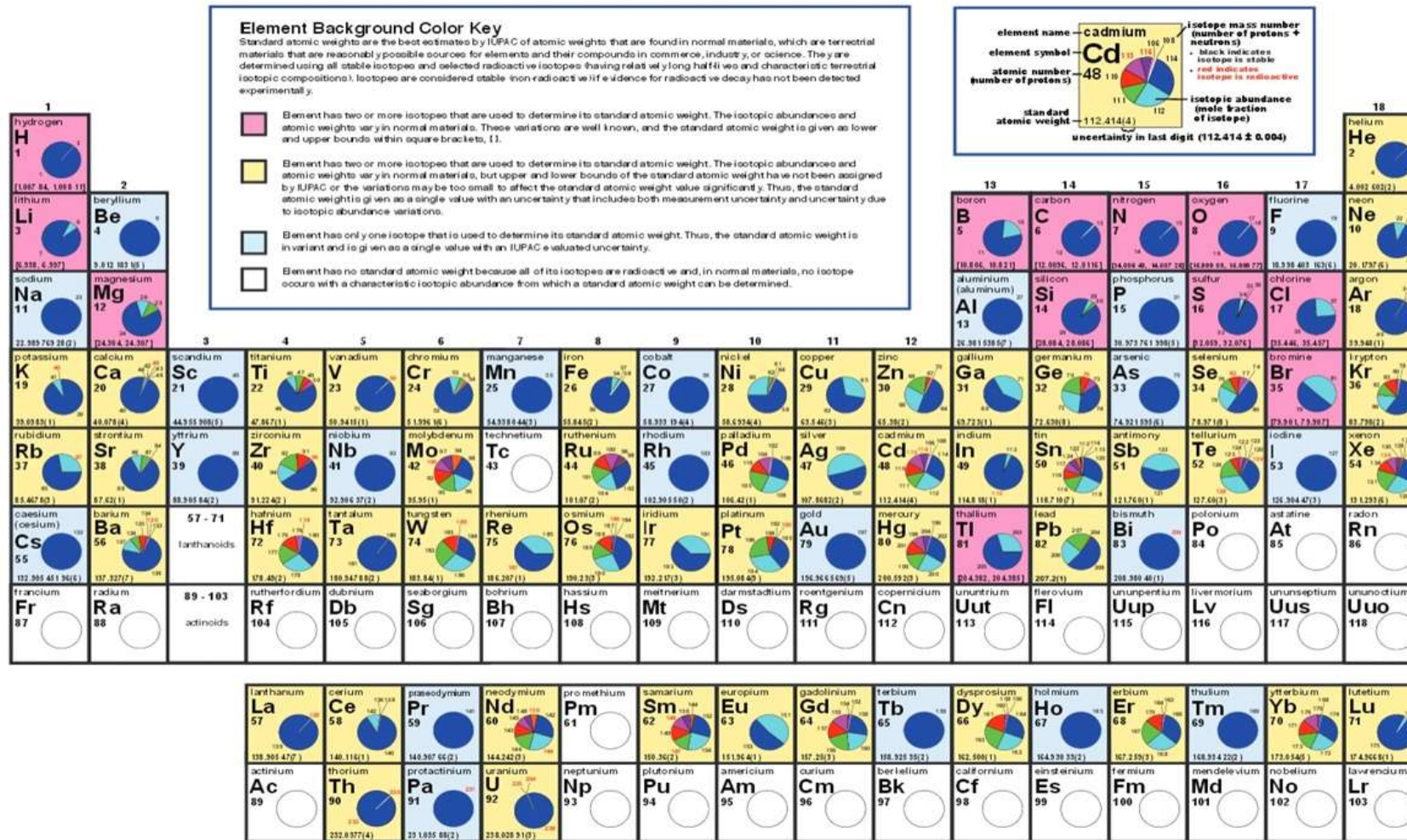


2 small peaks at 123 and 125 with 3,3 % each

Origin: ^{13}C

Isotope aller Elemente im PSE

IUPAC Periodic Table of the Isotopes



Etwa 3 Klassen:

1) isotopenrein, wie 19F, 23 Na, 31P

2) Hauptisotop, wie 1H, 12C, 14N

3) Verteilung, wie Br, Zn,

4) nur radioaktiv (weiß)

Quelle: http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM1902/IUPAC_PT2013.jpg

Isotopenmuster in Biomolekülen/org. Chemie

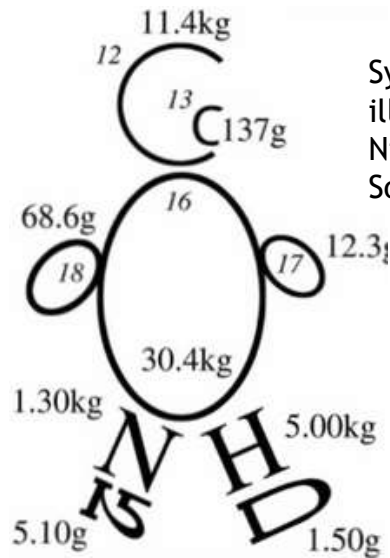
- Isotopenverteilungen der Atome erzeugen solche bei Molekülen (Isotopologe, mit verschiedenen Isotopen; Isotopomere, unterschiedl. verteilt).
- stabile Isotope der wichtigsten Atome in der Biochemie:

Atomsorte	Monoisotop	Isotop +1	Isotop +2
Kohlenstoff	98,9 % ^{12}C	1,10 % ^{13}C	radioaktiv
Stickstoff	99,6 % ^{14}N	0,37 % ^{15}N	-
Sauerstoff	99,8 % ^{16}O	0,04 % ^{17}O	0,20 % ^{18}O
Wasserstoff	99,985 % ^1H	0,015 % ^2H	radioaktiv
Phosphor	100 % ^{31}P	-	-
Schwefel	95,0 % ^{32}S	0,75 % ^{33}S	4,22 % ^{34}S

→ NICHT SEW

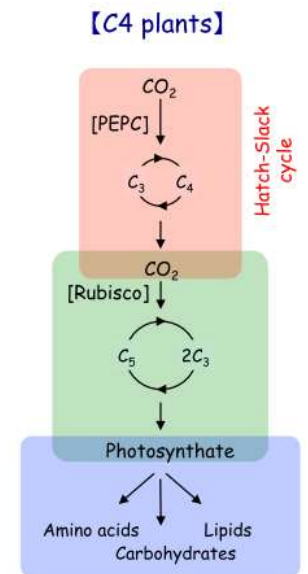
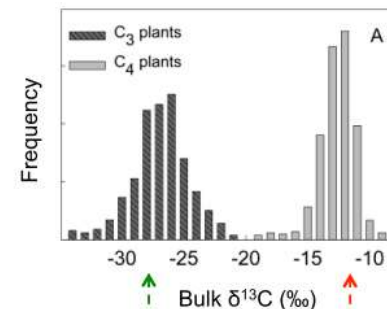
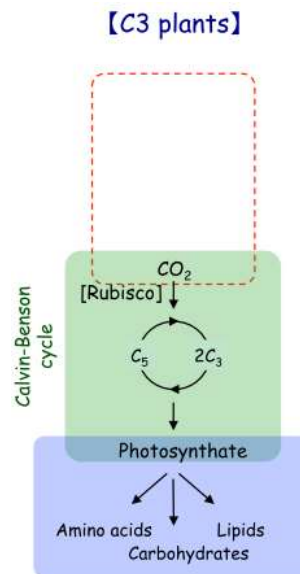
- praktisch alle selteneren Isotope sind schwerer (in organischer und der Biochemie, Ausnahme z.B. Se)
- Monoisotopischer Peak ist somit der erste und daher isotonenrein (daher der Name; seltene Ausnahmen, wie $^{10/11}\text{B}$ oder $^{76-82}\text{Se}$)
- monoisotopic mass (IUPAC): "Exact mass of an ion or molecule calculated using the mass of the most abundant isotope of each element."

Isotopenanalysen bei Lebensmitteln und in der Umwelt



Symbolized 'isotope man' illustrated by Prof. Eitaro Wada, from Wada E, Hattori A.1990. Nitrogen in the Sea; Forms, Abundance and Rate Processes. CRC Press Source (2024): <http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/pg39.html>

- Abweichung von mittlerer rel. Wahrscheinlichkeiten (in Promille) können Herkunft verraten
- C₃-Pflanzen liegen bei ¹³C/¹²C niedriger als C₄-Pflanzen

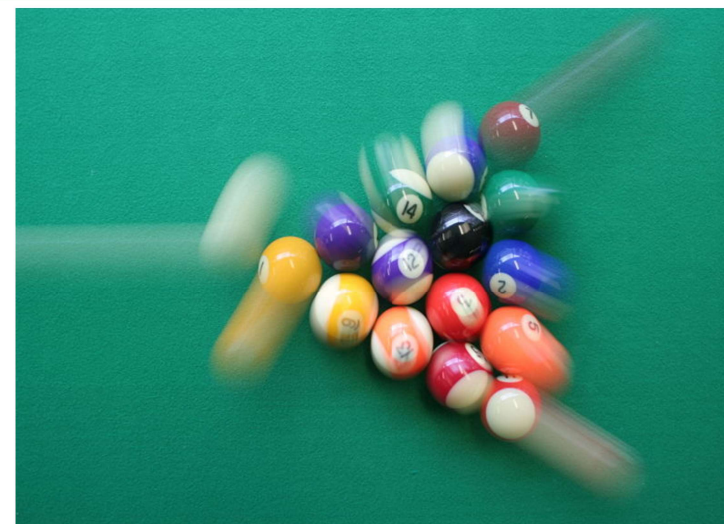
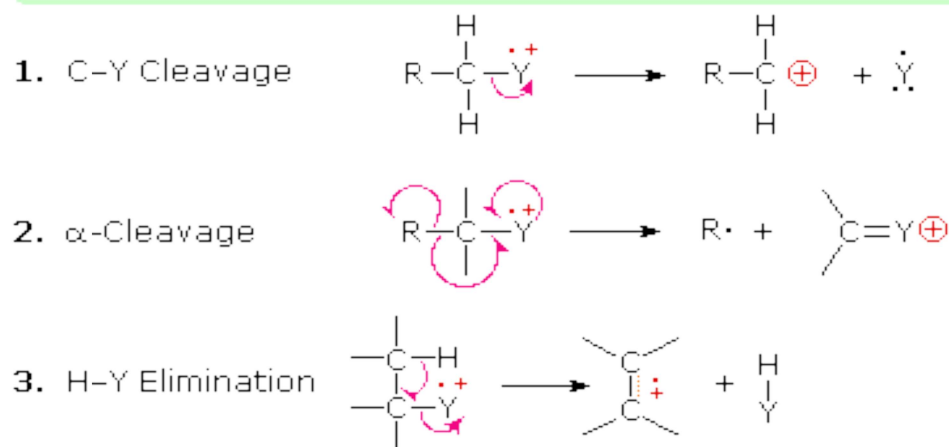


Different isotope distribution of ¹³C/¹²C in plants, from a poster by Prof. Chikaraishi

Source (2024): <http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/pg39.html>

Fragmentation mechanisms

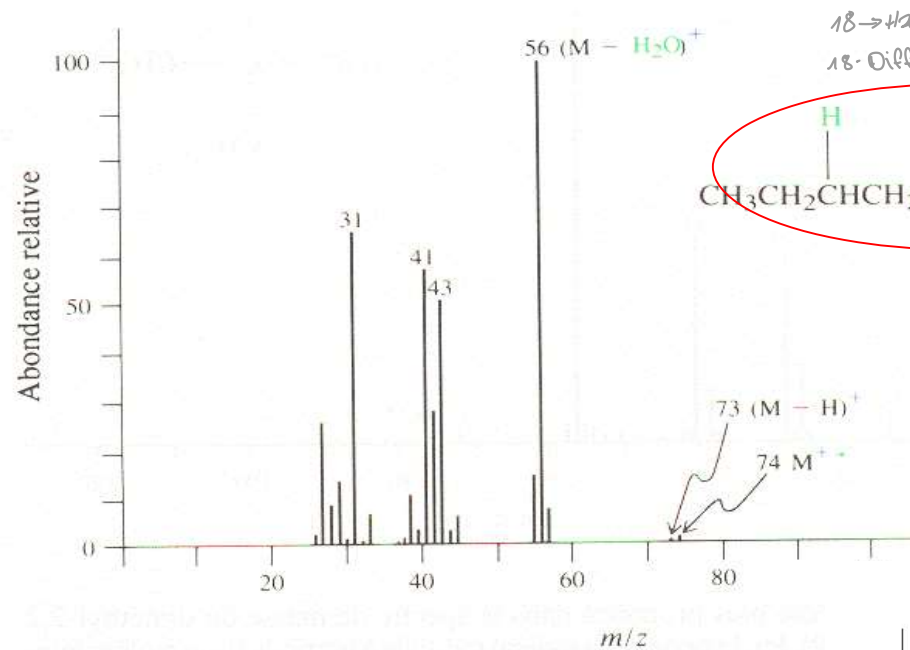
molecular ions $[M^+]$ \equiv $R-\overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{C}}^+$ or $R-\overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{O}}^+-R'$ or $R-\overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{N}}^+-R'_2$ or $R_2C=\overset{\cdot\cdot}{\underset{\cdot\cdot}{O}}^+$



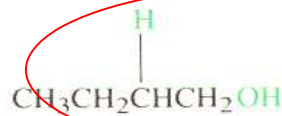
Source: wikimedia.de, author No-w-ay in collaboration with H. Caps

- Bonds tend to break because of high ionisation energies
- Probability of fragmentation increases with
 - weakness of bonds (often at heteroatoms)
 - stability of fragments (e.g. H_2O , NH_3 , CO)
- Fragments may be ions or neutrals (often also radicals); ions and mass differences may be analysed

(Understandable) fragmentation patterns of e.g. alcohols or other EI spectra in databases

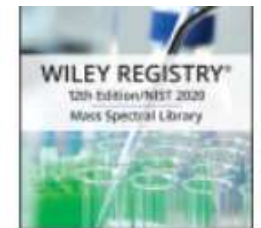


18 → H₂O
18-Differenz: OH-Gruppe



Further (hundreds of) free examples, see <https://sdb.s.aist.go.jp/>

Commercially available: <https://www.ms-wil.com/catalog/software/wiley-12th-edition-nist>



Spectral Database for Organic Compounds SDBS

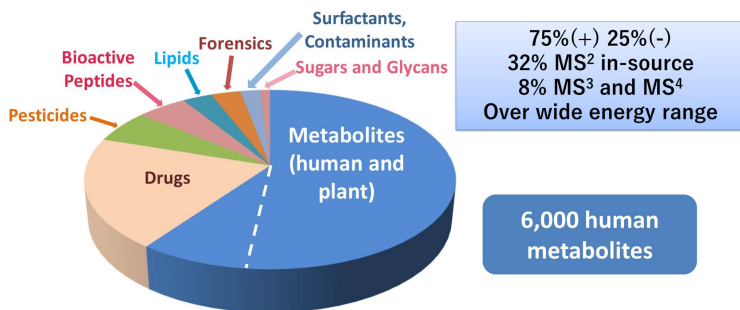
Japanese Introduction Disclaimer HELP

Welcome to Spectral Database for Orgo
This is a free site organized by National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

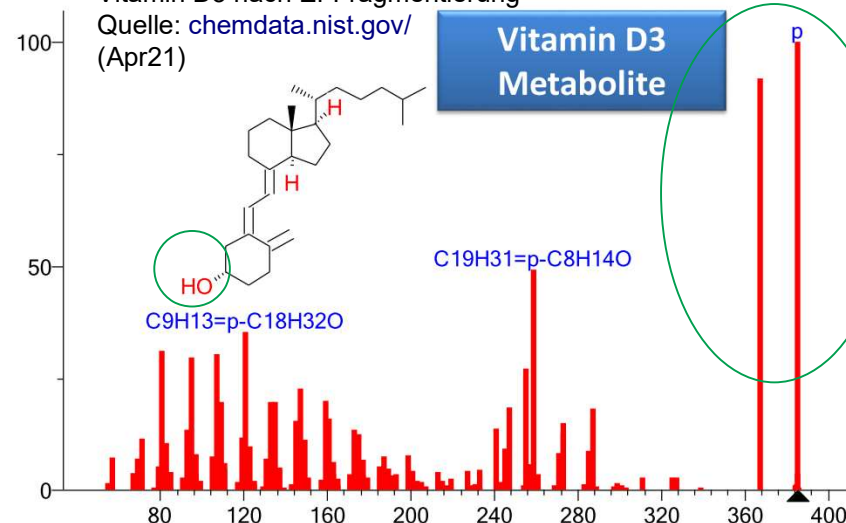
NMR: T.Saito, T.Yamaji, K.Hayamizu, M.Yanagisawa and O.Yamamoto
MS: S.Matsuyama and N.Wasada
ESR: K.Someno
IR: S.Matsuyama, S.Kinugasa, K.Tanabe and T.Tamura

> 1 million EI mass spectra
> 1 million chemical structures
> 840,000 unique compounds

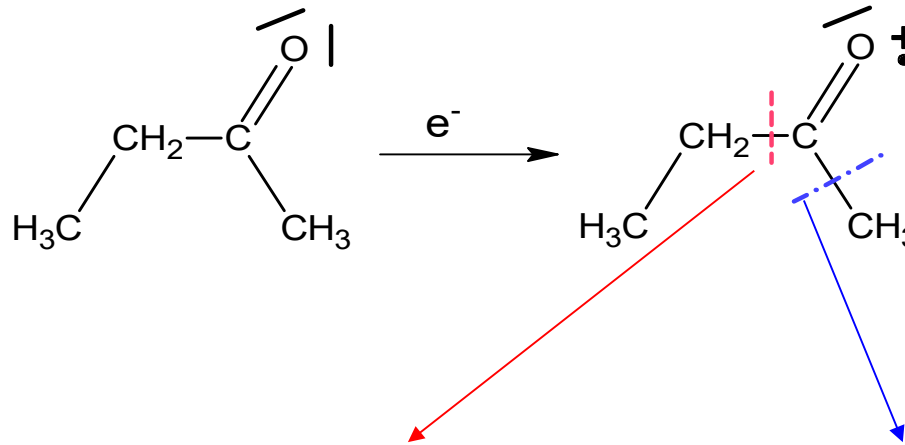
Humane Metabolite in NIST-Datenbank
Quelle: chemdata.nist.gov/ (Apr21)



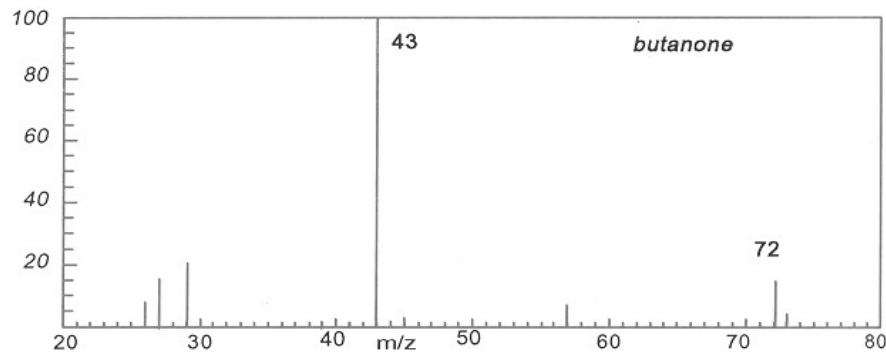
Vitamin D3 nach EI-Fragmentierung
Quelle: chemdata.nist.gov/ (Apr21)



Interpretation of mass spectrum of butan-2-one (α -carbonyl compound)



Homolytic cleavage
of the α C=O bond



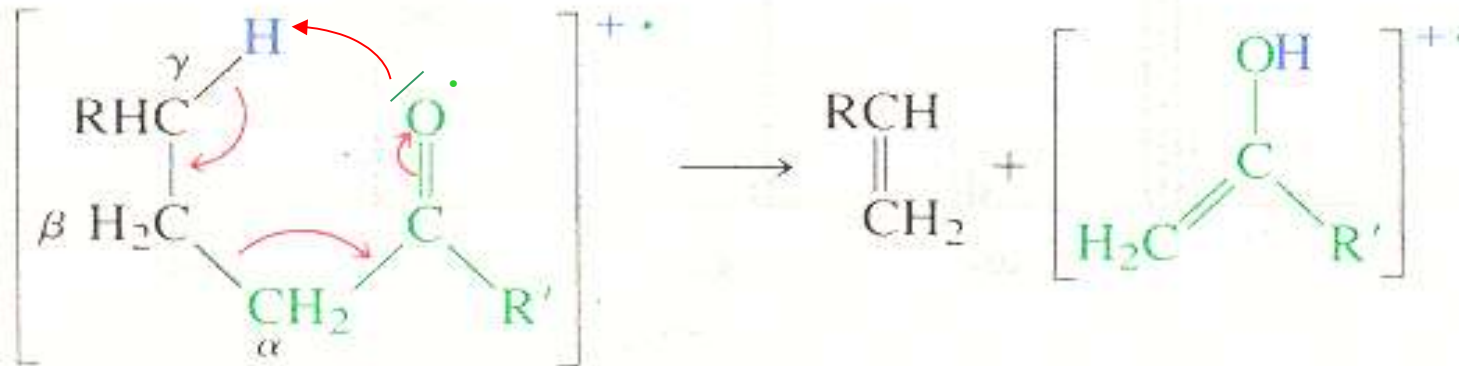
Fragmentations with rearrangements (experts only)

One atom or a functional group moves from a carbon atom to another place in the molecule forming a stable ion, important example : **Mc Lafferty rearrangement**

The molecule must possess:

- A double bonded group (carbonyl C=O or C=C)
- An alkyl group with a H atom in γ -position.

Concerted hydrogen transfer to the ionised site by an intermediate 6-ring system



Reactions between different molecules are relatively seldom because of low concentrations in vacuum

Conclusion, part I: mass spectrometry is no billard!

Characteristics of MS

- ◆ no queue
but charged power
- ◆ balls without colours
but different masses
- ◆ just one hole
but millions of hits
- ◆ collisions avoided
but easily possible
- ◆ balls may break into pieces
but these deliver structural
information
 - identification by pattern analysis
software (e.g. NIST library with
>800.000 compounds, 2023)
 - quantification on selected peaks
single ion monitoring (SIM / SIR)



Advantages of EI-MS

- ◆ Sensitive, if molecule is stable
while vaporised (e.g. by GC)
- ◆ Identification by fragmentation
patterns (up to several 100 Da)
- ◆ Highly reproducible, automated
matching with databases
- ◆ Huge spectral libraries

Das sollten Sie bis hierher können

Grundlagen und Geräte

- Einheiten und Definitionen zur molaren Masse kennen
- prinzipiellen Aufbau eines MS beschreiben
- Warum wird Vakuum benötigt, wieso in ganz unterschiedlicher Güte?
- wichtigste Komponenten einer EI-Quelle benennen und deren Zusammenspiel
- Wie wird in MS quantifiziert und warum kann sehr selektiv gearbeitet werden?

Instrumentelle Bioanalytik Teilgebiet Spektroskopie	HOCHSCHULE WEIHENSTEPHAN-TRIESDORF UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES 
Prüfung im Studiengang Biotechnologie (B.Sc.) Modulnummer 212086010	Fakultät Biotechnologie und Bioinformatik

Hilfsm.: 1 Bl. + TR (PSE verteilt)	Matrikel-Nr.:
Prüfer: Prof. Dr. Schrader	Name :
	Anzahl abgegebener Prüfungsbögen:

- Beschriebene Prüfungsbögen und die Aufgabenblätter sind mit der Matrikel-Nr. (oder Name) zu versehen und alles zusammen am Ende der Prüfung abzugeben.
- Teilschritte und Begründungen sind unbedingt anzugeben, um volle Punktzahl zu erreichen oder bei falschen Ergebnissen anteilige Punkte zu erhalten.
- Bei der Angabe von Zahlenwerten ist auf Einheiten und eine sinnvolle Anzahl von Stellen zu achten. Verwenden Sie die bereits vorgegebenen Symbole.

Aufgaben (Gesamtpunktzahl: 60)

Spektren

- einfache EI-Spektren beschreiben und einige wesentliche Elemente erklären
- Welche wesentlichen Regeln erklären Fragmentspektren, warum müssen nicht alle beherrscht werden, um Spektren zu interpretieren?
- Wie wirken sich typische Isotope in Spektren aus?

Teil II: Bio-MS

„Durchbrüche“ bei Ionisierung von Biopolymeren

- Dilemma: große Moleküle erfordern mehr Ionisierungsenergie
- Übergangslösungen: FAB oder PD-MS zu unempfindlich, zu lange Messzeiten, von Stunden
- Wie gelingt eine sanfte Desorption und Ionisierung?
 - Lösung 1: „ESI“, Elektrospray-Ionisierung (Fenn et al. 1989)
 - Lösung 2: „MALDI“ (Hillenkamp/Karas 1987 sowie Tanaka)
 - Nobelpreis 2002 (an Fenn und Tanaka)
 - ESI- und MALDI-MS etablierte Standard-Methoden; seit 1990er Jahre, bis heute kaum Alternativen

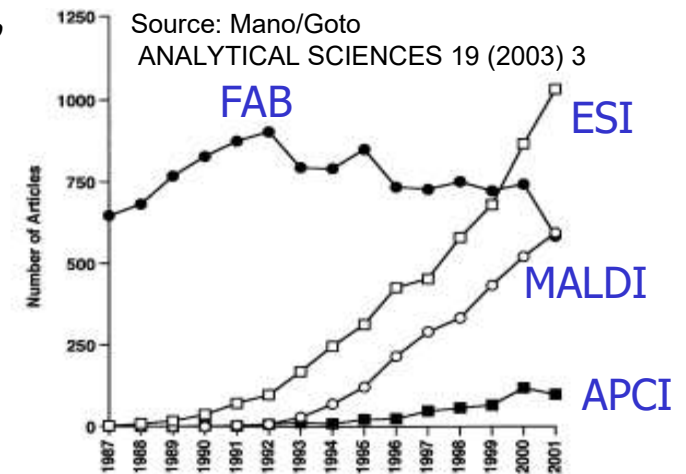
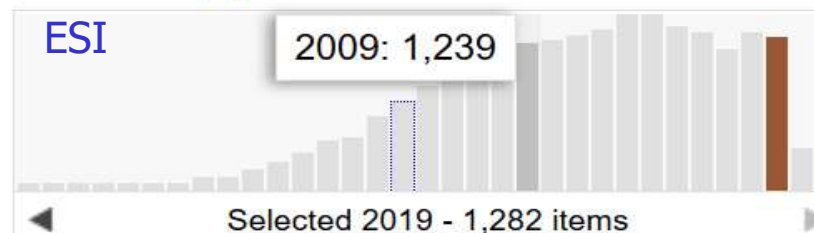


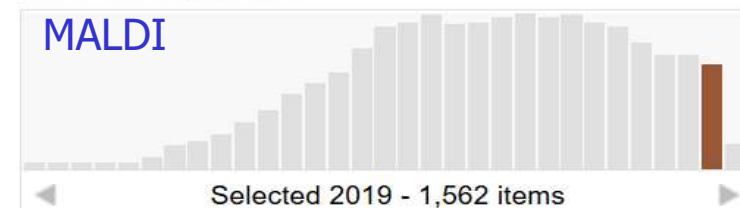
Fig. 1 Change in the article numbers for various soft ionization methods (data from MEDLINE database). Open square, ESI; open circle, MALDI; filled square, APCI; filled circle, FAB.

Results by year



PubMed: esi AND "mass spectrometry" (March 2020)

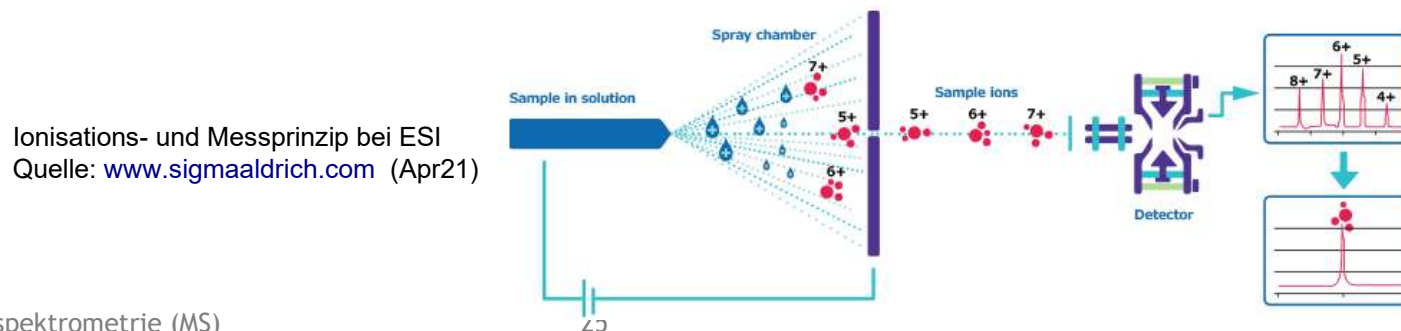
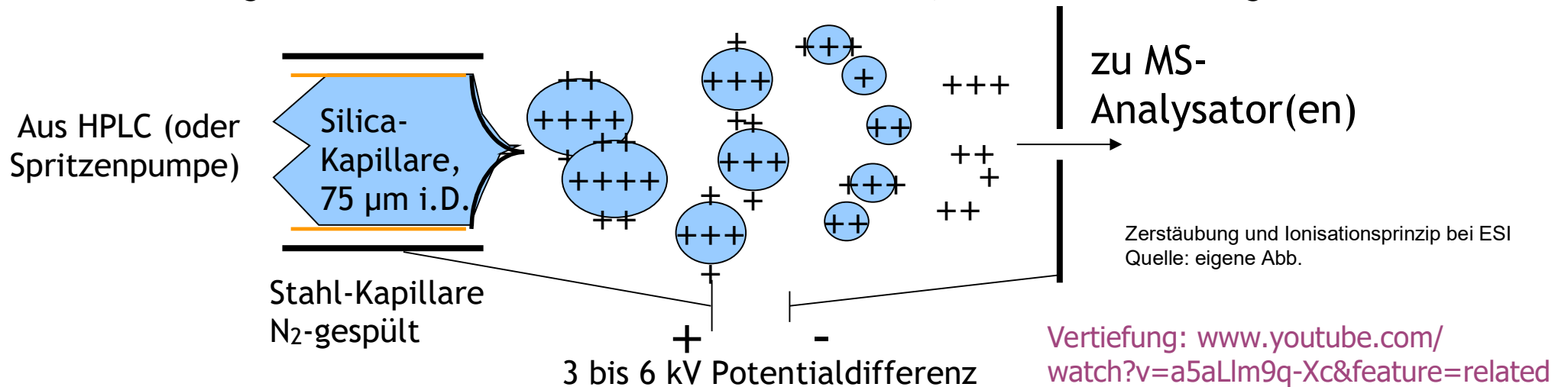
Results by year



PubMed: maldi AND "mass spectrometry" (March 2020)

Prinzip der Elektropray-Ionisierung (ESI)

- Sprühnebel durch Hochspannung an Kapillare
- weiteres Zerplatzen der Tröpfchen und Trocknung im Gasstrom (nano-Methode kommt ohne Gasstrom aus).
- Moleküle werden in Lösung ionisiert (Säure-, Baseverhalten nötig)
Ionisierung stark von Salzen und Tensiden verschlechtert, wie auch in Mischungen



Grundbegriffe Spektren (wie auch Chromatogramme)

Gehrenspitze, 2163 m

Vilser Kegel

Brentenjoch, 2001 m

Breitenberg, 1838 m

Ächsele



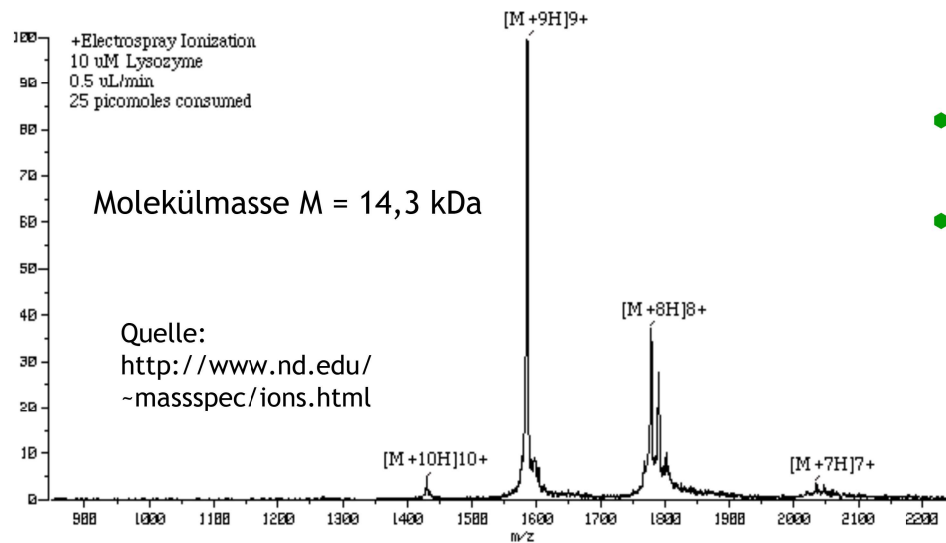
Quelle: Aconcagua
(Nordseite der Allgäuer Alpen, der Hopfensee im Vordergrund)



Vergleichen Sie mit analytischen Grundbegriffen

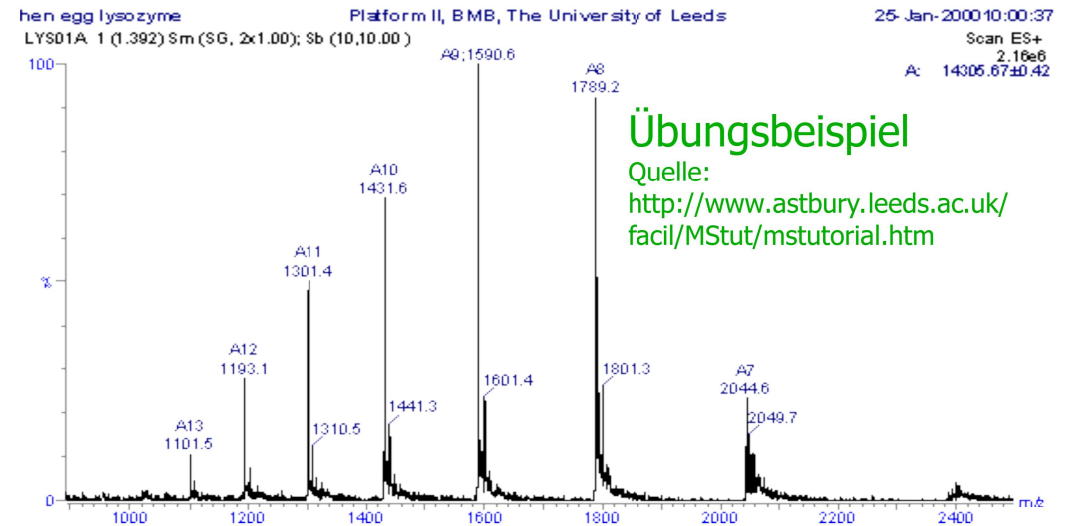
Grundlinie
Peakhöhe
Rauschen
Peakbreite
Auflösung

Beispiel für ESI-Spektrum, mehrfach geladene Ionen



- Generelle Molekülmassenberechnung:
 $M = z_i \cdot (m/z)_i - z_i \cdot m_p = z_i \cdot ((m/z)_i - m_p)$; $m_p = 1,0078$ u
- zwei benachbarte Peaks notwendig ($z_1 - z_2 = 1$)
 - Ansatz: $M = z_i \cdot ((m/z)_i - m_p) = z_{i+/-1} \cdot ((m/z)_{i+/-1} - m_p)$
 - $\Rightarrow (z_1 - 1) / z_1 = ((m/z)_1 - m_p) / ((m/z)_2 - m_p)$
 - $\Rightarrow z_1 = [1 - ((m/z)_1 - m_p) / ((m/z)_2 - m_p)]^{-1}$

- mehrere Peaks m/z pro Molekül mit $[M+zH]^z+$
- verteilte Intensitäten, abhängig von Messbedingungen
- erhöhte Genauigkeit
- (mehr messbare Fragmente)



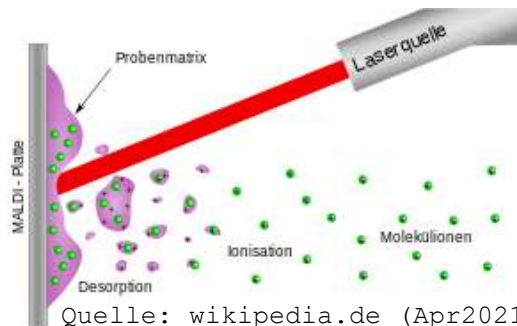
MALDI-TOF-MS

Erläuterung des Begriffes

- Matrix-
 - Assisted
 - Laser
 - Desorption/
 - Ionisation-
 - Time
 - Of
 - Flight
- Matrix-
 - unterstützte
 - Laser
 - Desorption/
 - Ionisation-
 - Flugzeit -

mass spectrometry

Massenspektrometrie



Quelle: wikipedia.de (Apr2021)
Autor: Mikayé; CC BY-SA 3.0

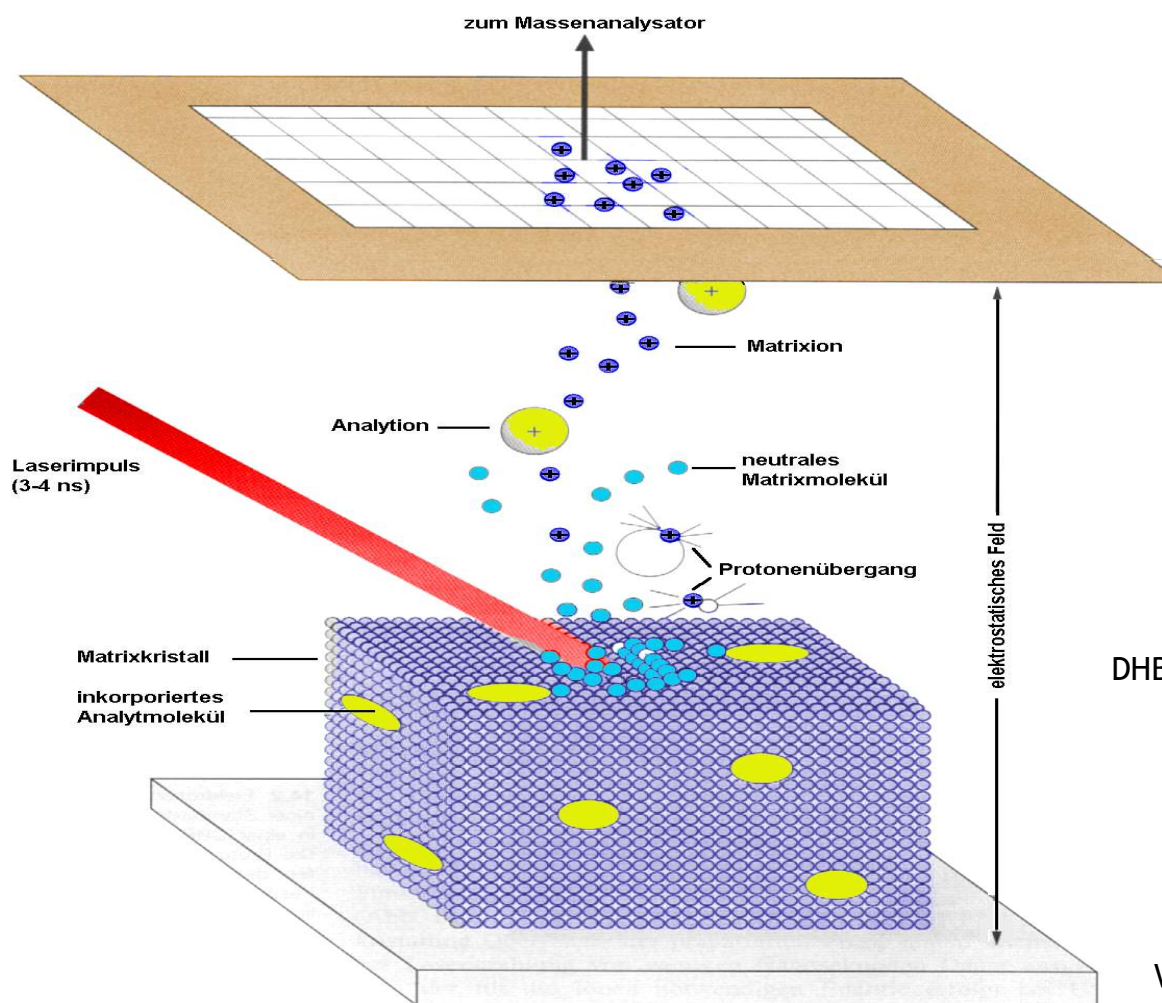


Franz Hillenkamp / Michael Karas, Universität
Münster, LAMMA-1000
Fresenius-Preis der GDCh 2003
für Entwicklung der MALDI-MS
idw-online.de



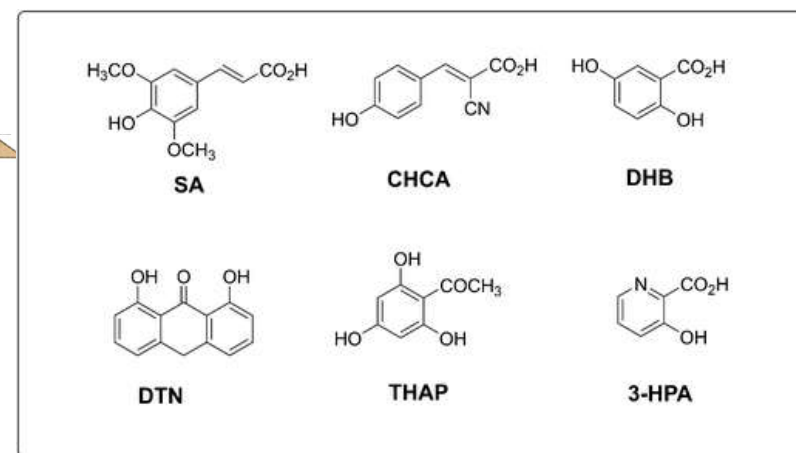
Koichi Tanaka
Shimadzu Corp.
Nobel Laureate in Chemistry 2002 for
discovering the soft laser desorption (SLD)
<https://s4-eu.ixquick-proxy.com>

Ionisierung und Matrices bei MALDI-MS



Quelle: BioVisioN 200x
Nach Lottspeich/Zorbas „Bioanalytik“ 1998

Einige bekannte Matrixsubstanzen

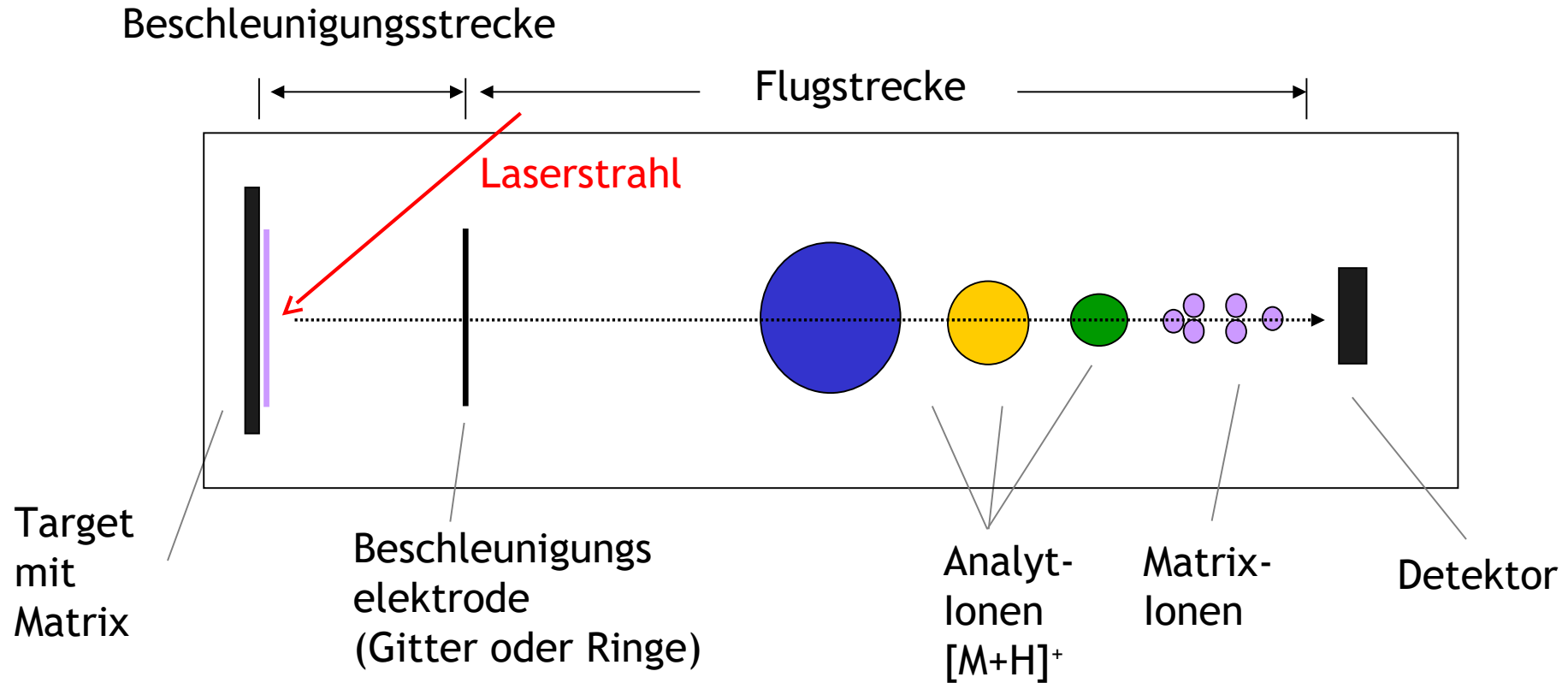


SA: Sinapinic acid; CHCA: Cyano,hydroxy-cinnamic acid;
DHB: Dihydroxy-benzoic acid; 3-HPA: 3-Hydroxypicolinic acid;
THAP:Trihydroxyacetophenone; DTN: Ditrahnol

Quelle: Calvano et al. (2018) Anal. Bioanal. Chem.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1014-x>
(mit umfassenden Lit.-Angaben zu Matrices)

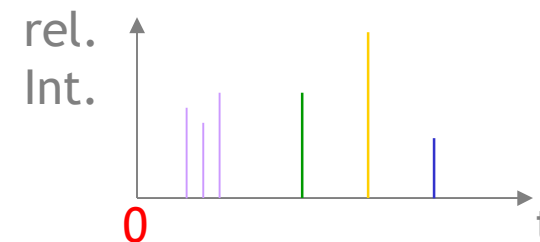
Die Polarität (positiv oder negativ) kann durch einfachen Wechsel der Polungen geändert werden. Idealerweise wird auch die Matrix angepasst, aber nicht zwingend.

Flugzeitanalyse (time of flight, TOF)



Videolinks:

- US-Uni: <http://webs.anokaramsey.edu/MALDIEducation/video-tutorials/>
- Bruker: <https://www.youtube.com/watch?v=0jeFpXHZ8W0>



Videolinks:

Molekülmassenbestimmung bei MALDI-TOF-MS

- Beschleunigung: $E_{\text{kin}} = z e U = \frac{1}{2} m v^2$

z: Ladungszahl des Ions (in der Regel = 1)

e: Elementarladung ($1,60 \times 10^{-19} \text{ C}$)

U: angelegte Hochspannung (10-30 kV)

m: Masse des Ions (etwa 23 bis 300.000 u)

v: Geschwindigkeit des Ions (etwa 10-1.000 km/s)

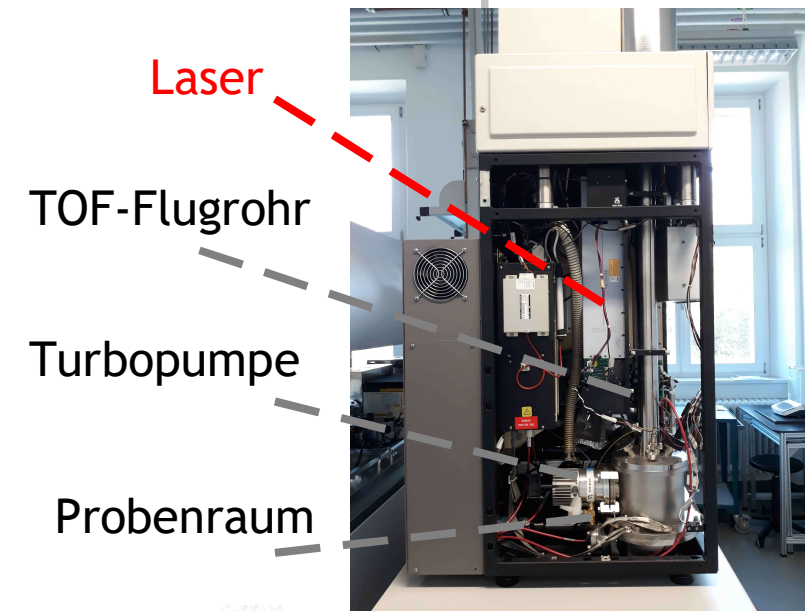
- Mit $v = L/t$

L: Länge der Flugstrecke (typisch 1-4 m)

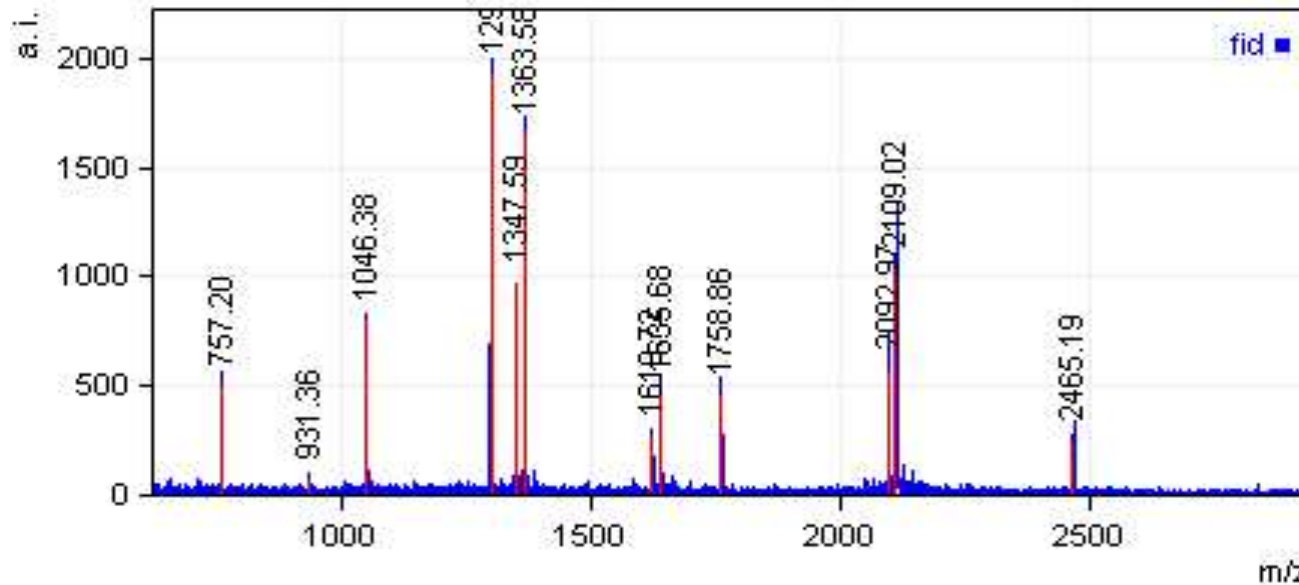
t: Flugzeit eines Ions (etwa 5-500 μs)

ergibt sich $E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} m (L/t)^2 = z e U$

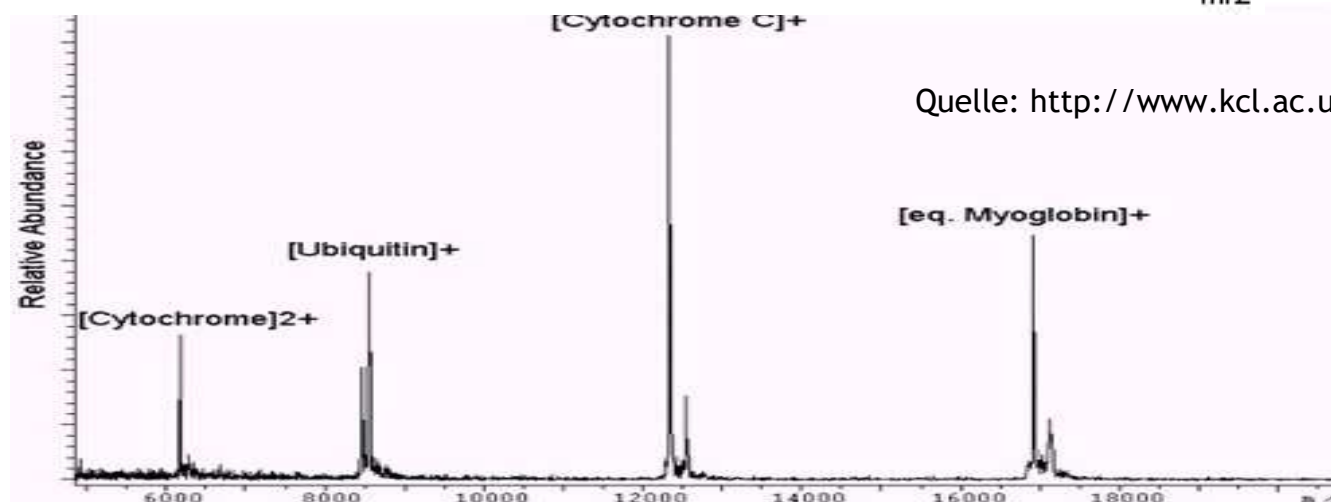
- Es folgt: $m/z = (2 e U / L^2) \cdot t^2$; also $m/z \sim t^2$,
bei konstanter Beschleunigungsspannung
- Die Konstante $(2 e U) / L^2$ wird durch Kalibrierung mit
mindestens zwei Referenzsubstanzen bestimmt



Einfache MALDI-Spektren auch für Mischungen (durch einfach protonierte Moleküle)



Peptid-Standard zur Kalibrierung,
Bruker Ultraflex I, linear mode
über mMass 2.4 (von M. Strohm)
eigene Daten, unveröffentlicht



Quelle: <http://www.kcl.ac.uk/ms-facility/maldi.html>

Beide Spektren zeigen
die Möglichkeit, mit MALDI-MS
Mischungen zu messen. Dies gelingt
sowohl für kleine Peptide als auch
für mittelgroße Proteine.

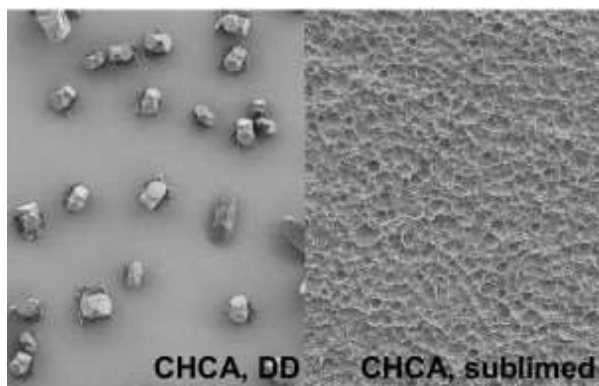
Die Spektren können aufgrund der
schmalen Peaks auch noch deutlich
komplexer werden

Limitationen von MALDI-MS

Moleküle müssen so beschaffen sein,
dass Dampfdruck gering ist, da aus Hochvakuum.

Matrix-Kristalle nicht homogen mikroskopisch verteilt.
Spektren sind ortsabhängig und sollten gemittelt werden
(sonst allerdings auch Trenneffekte möglich).

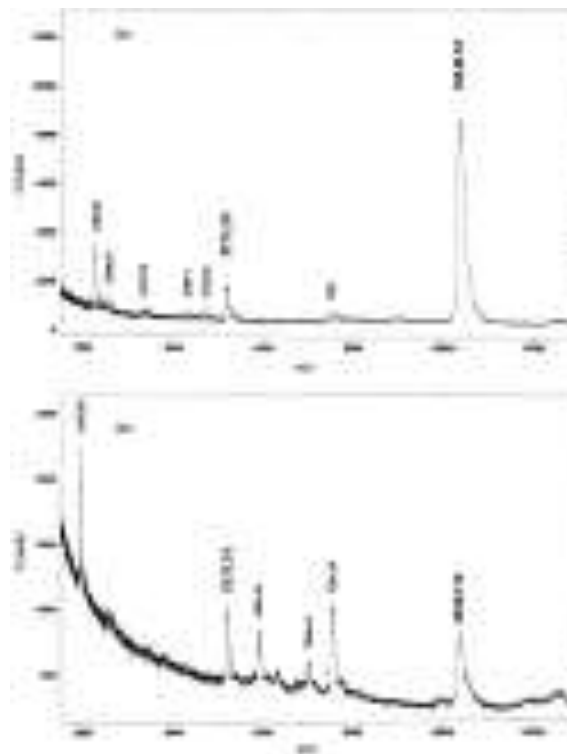
Matrix kristallisiert heterogen,
so entstehen Bereiche mit
unterschiedlich guter Signalqualität.



Quelle: Jaskolla et al. (2009) J. Am. Soc. MS
<https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.02.010>

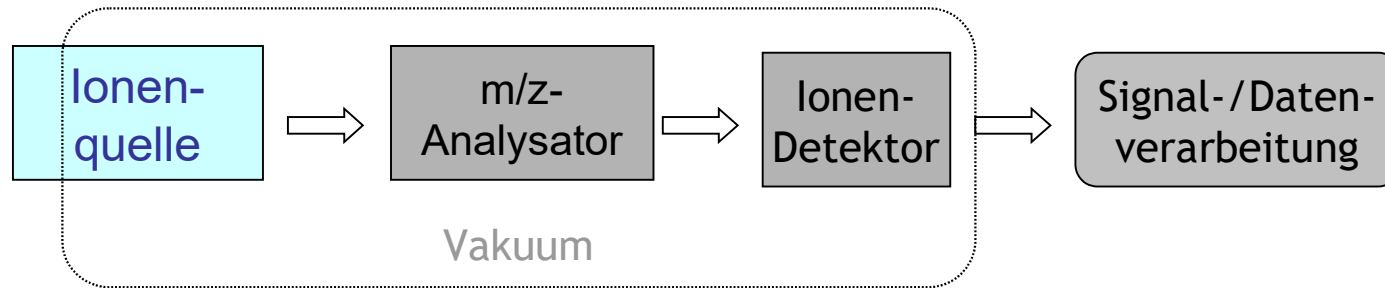
Thema: Massenspektrometrie (MS)

Matrix erzeugt Hintergrund
von geladenen Fragmenten,
Molekülionen und Addukten.
- typisch bis etwa 500-1000
- bei hoher Laserenergie auch
zu mehreren 1000 in m/z
Hier m/z 1500 - 13000 (beide)



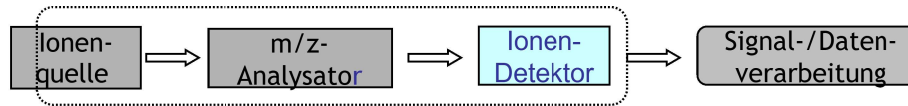
Quelle: Schrader et al. (1997) J. Chromatogr.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00169-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00169-6)

Vergleich ESI/MALDI

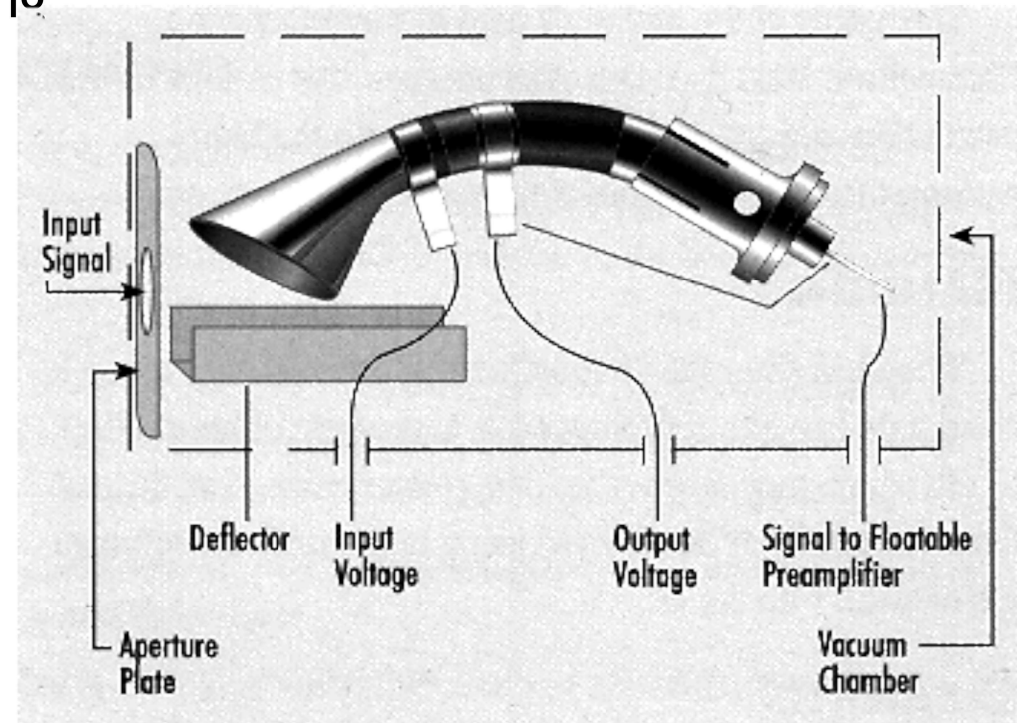
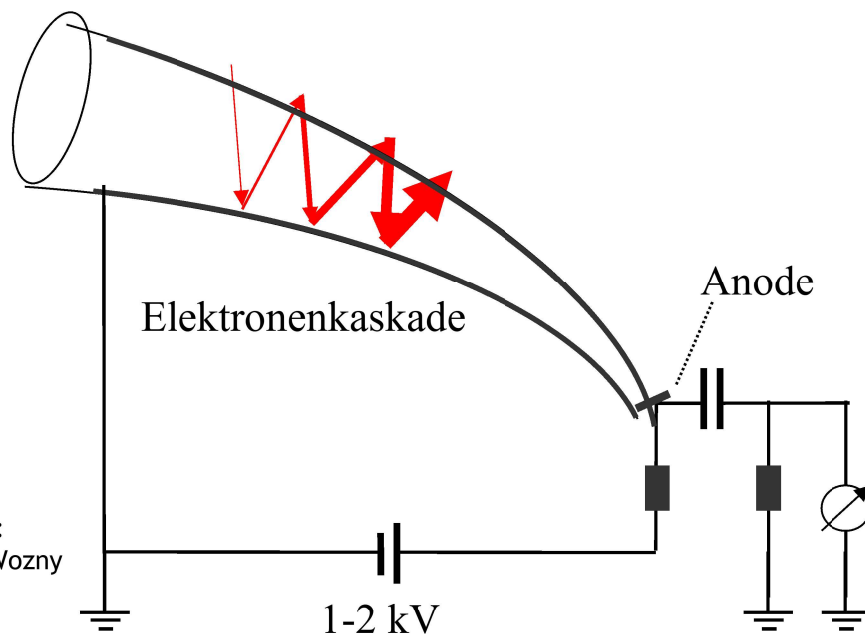


	ESI	MALDI
Ionisierung (pos./neg.)	geladen in Flüssigkeit	Unpolares ionisierbar
Massenbereich	0,0 bis etwa 300 ku	etwa 0,8 bis >300 ku
Probenbedarf (für Protein, größere mehr)	einige 100 amol bis einige pmol	etwa 50 amol bis einige pmol
Verschleppungen	in Kapillare	kaum möglich
Dynamik	3-4 Zehnerpotenzen	2-3 Zehnerpotenzen
Störung durch Salze	hoch bei Salzen;	niedrig bei Salzen;
Verschleppungen	Verschleppungen	kaum Verschleppung
Kopplungsmögl.	on-line mit LC	nur off-line möglich
schnelles Screening	schlecht geeignet	ideal geeignet

Detektoren - „Channeltron“, bei fokussierenden Analysatoren



- Signalverstärkung durch Sekundärelektronen-vervielfachung (10⁵-10⁸fach)
- „Micro channel plates“
- „Channeltron“ (Bilder)

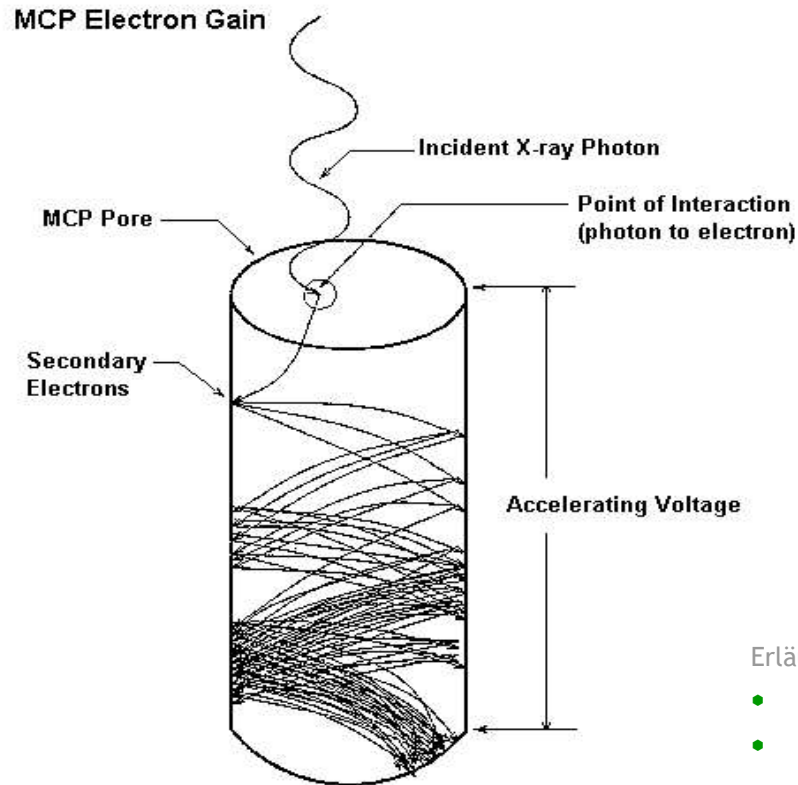
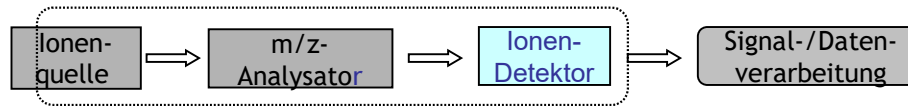


Input Voltage = Ground
Output Voltage = +3000 Volts
Signal = +3000 Volts

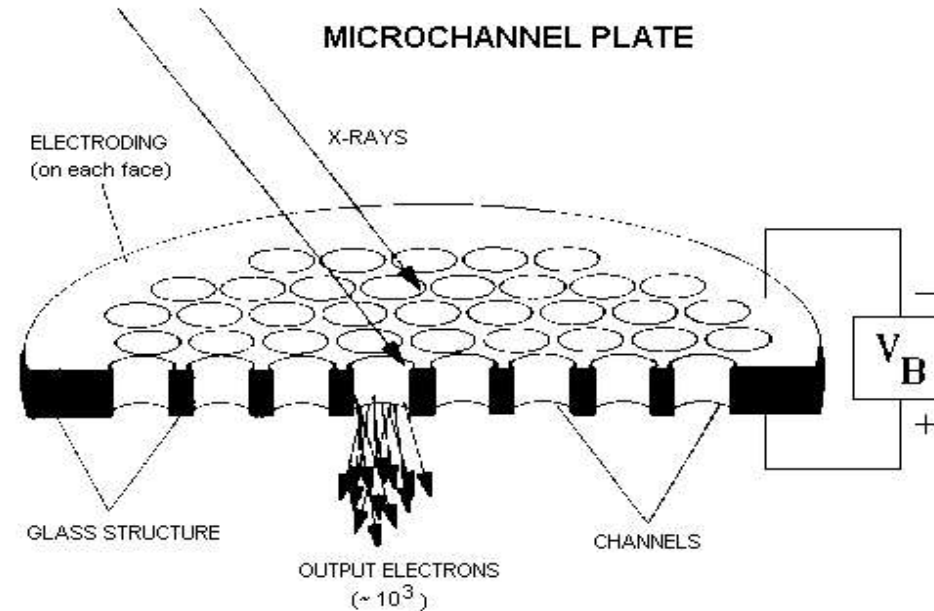
Aperture = Ground
Deflector = ± 400 Volts

Quelle: <http://www.optimacorp.co.jp/BurleEO/Channeltron.htm>

Detektoren - „Micro channel plates“ bei TOF-Analysatoren



Quelle: http://www.mssl.ucl.ac.uk/www_solar/soho/images/fchann.gif



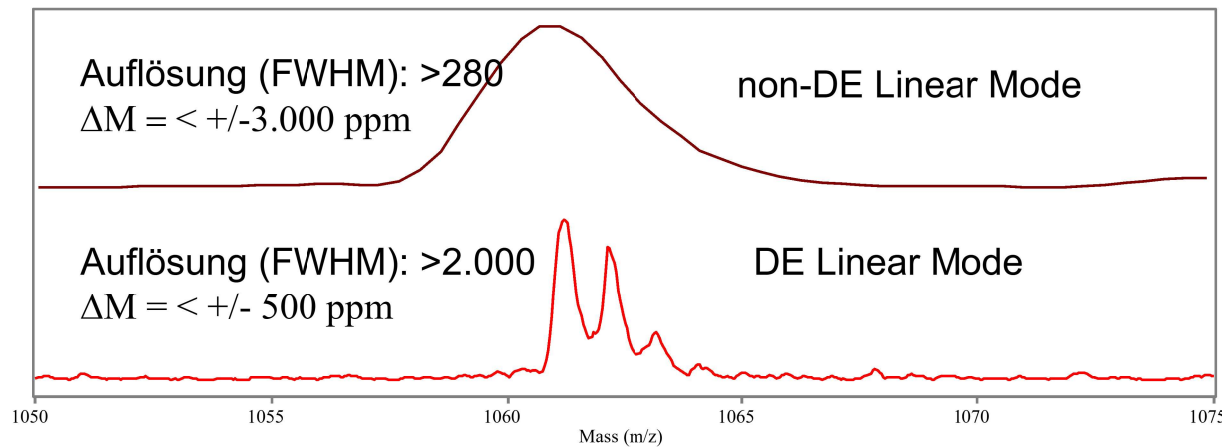
Quelle: <http://hea-www.harvard.edu/HRC/mcp/mcp.html>

Erläuternde Kommentare

- Detektortyp für Röntgenanalytik, aber auch für geladene Teilchen einsetzbar
- Prinzip wie Channeltron (vorheriger Seite), bei weniger fokussierten Teilchen (zB TOF-Analysator)
- Platte aus vielen Einzelkanälen zusammengesetzt, in denen aus der Oberfläche Elektronen freigesetzt werden können
- Elektronenkaskaden generieren Stromfluss

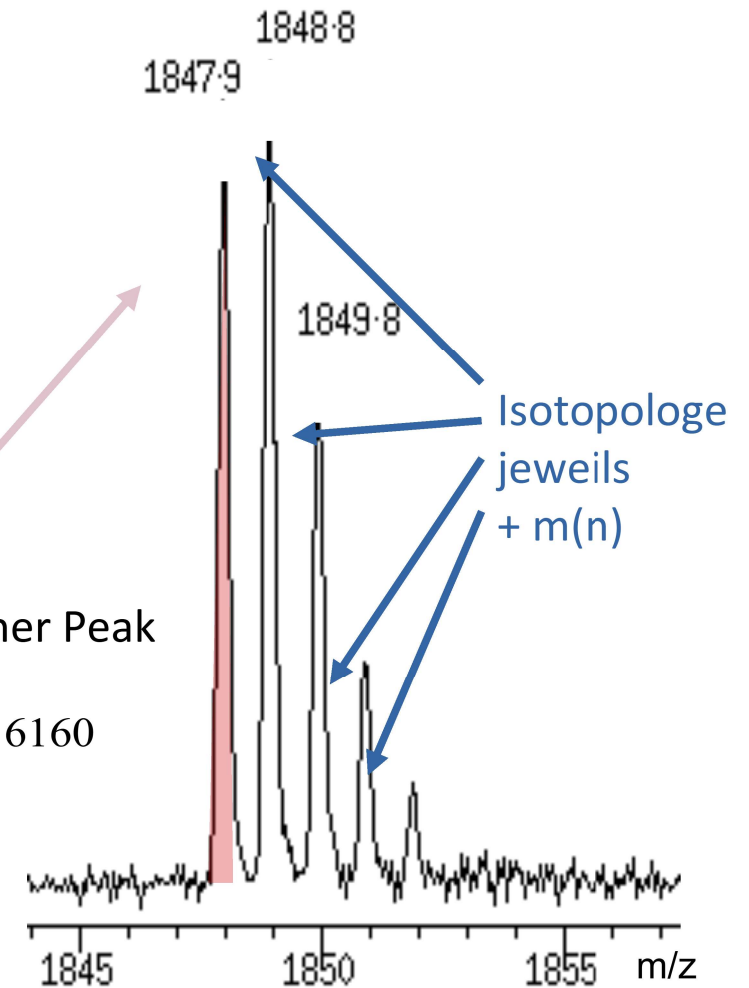
Auflösung: Isotopenaufgelöstes MALDI-Spektrum eines Peptids

Vergleich: niedrige und hohe Auflösung



— monoisotopischer Peak

$$\left. \begin{array}{l} m/z = 1847,9 \text{ amu} \\ \text{FWHM} = 0,3 \text{ amu} \end{array} \right\} \Rightarrow R_{\text{FWHM}} := \frac{m/z}{\text{FWHM}} = 6160$$



Quelle: <http://www.weddslist.com>

Monoisotopische Massen in Biomolekülen/org. Chemie

Wichtigste exakte Atommassen in der Biochemie:

Atomsorte	Monoisotop		häufigstes Isotop			Neutron (Differenz)	PSE
	Sym- bol	Häufig- keit in %	Masse in u	Häufig- keit in %	Masse in u	Masse in u	Masse in u
Wasserstoff	¹ H	99,985	1,0078	0,015	2,014	1,0062	1,0079
Kohlenstoff	¹² C	98,9	12,0000	1,112	13,0034	1,0034	12,011
Stickstoff	¹⁴ N	99,6	14,0031	0,37	15,0001	0,9970	14,0067
Sauerstoff	¹⁶ O	99,8	15,9949	0,20	17,9992	1,0022	15,9994
Natrium	²³ Na	100	22,9898	-	-	-	22,9898
Phosphor	³¹ P	100	30,9738	-	-	-	30,9738
Schwefel	³² S	95,0	31,9721	4,22	33,9679	0,9979	32,066
Chlor	³⁵ Cl	75,7	34,9689	24,2	36,9659	0,9985	35,453

Die Angaben werden gelegentlich überprüft und optimiert,
Quellen sind massenspektrometrische Literatur oder IUPAC
(hier de Hoffmann/Strobant 2007)

Elemental composition by high resolution

molecular composition	mass (in u)	probability of M+1 isotope (in %)
CH ₃	15,011	1,16
NH	15,023	0,39
CNO	41,998	1,52
C ₂ H ₂ O	42,011	2,29
C ₂ H ₂ N ₂	42,021	1,88
C ₂ H ₄ N	42,034	2,65
C ₃ H ₆	42,047	3,42

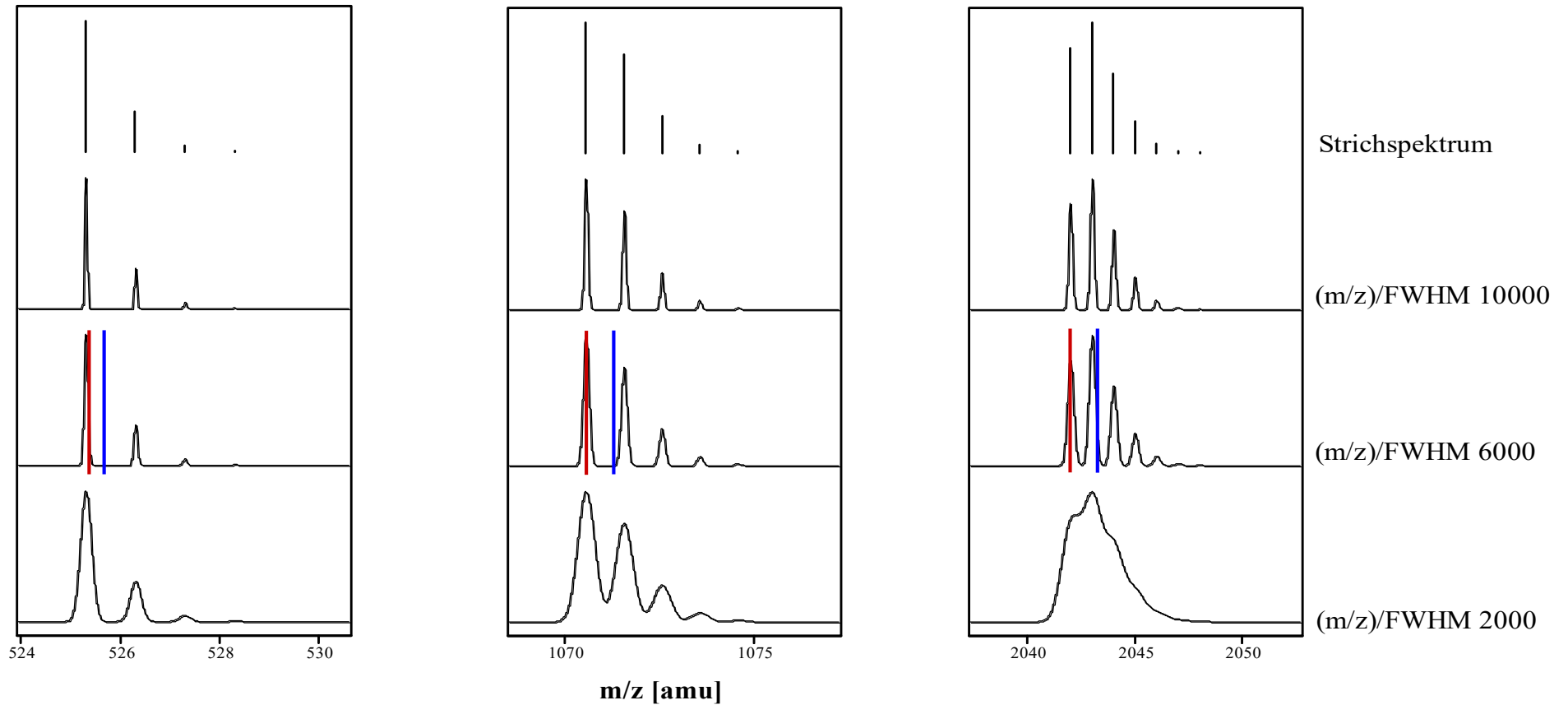
- Excellent mass accuracy (better 0,01 u equals 250 ppm), allows for discriminations.
- Imagine a balance accurately weighing 42,00 kg ± 10 g High-end mass spectrometry makes it easily possible

Einfluss der Isotopenverteilung und der Auflösung auf die Signalstruktur

— monoisotopische Masse
— isotopengemittelte Masse

Quelle: Prof. Wozny

Intensität

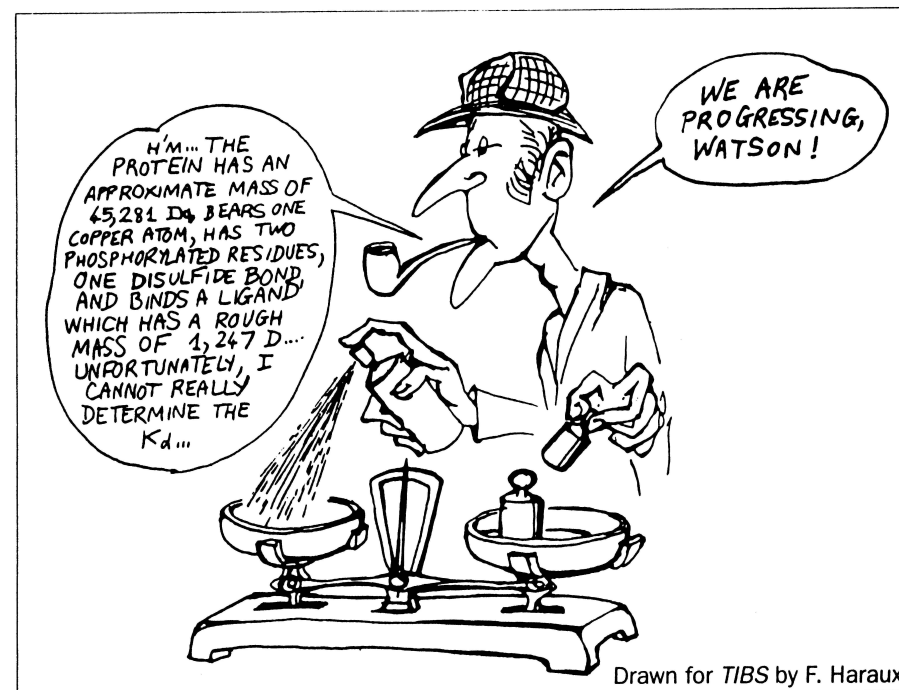


Continuous trend: High-end MS

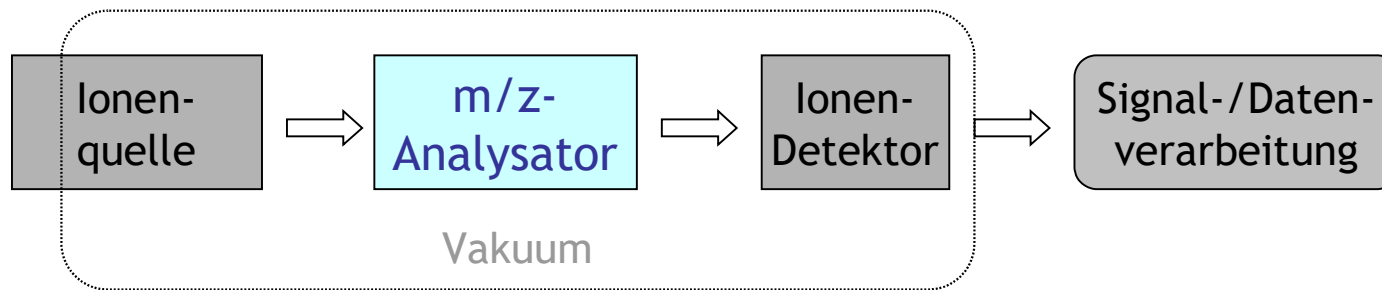
- **Mass range** 0 up to 300.000 u
- **Mass accuracy:** down to 1 ppm
- **Resolution:** several 1000
- **Sensitivity:** Minimal sample amount, even below 1 fmol (10^{-15} mol equals 10^9 molecules)
- **Sampling speed:** High repetition rates by electric switching
- **Compact instruments**

Constant development of mass analysers:

- e.g. reflectron, ion trap, orbitrap
- as well as combinations of mass analysers



Genutzte m/z-Analysatoren

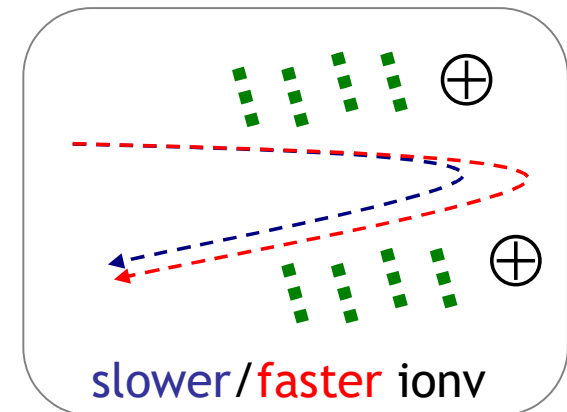
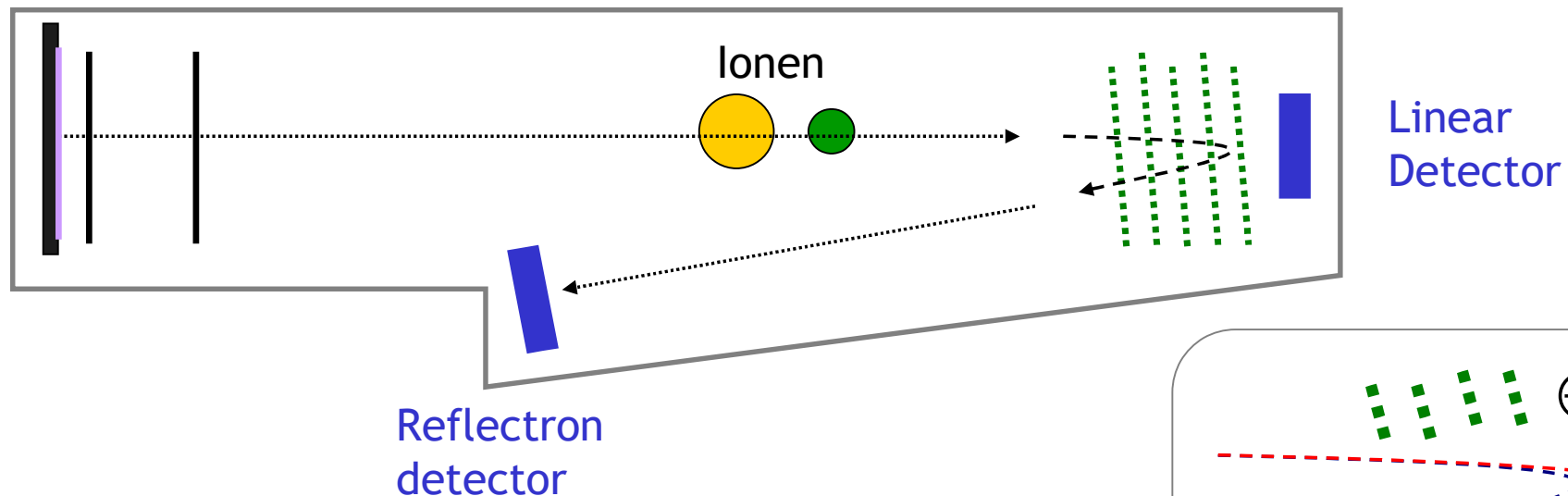


- **TOF** (time-of-flight)
 - einfaches TOF (kaum mehr im Einsatz, siehe MALDI-TOF)
 - Reflectron-TOF (Re-TOF; übliche Bauweise)
- **Quadrupol** (Grundbaustein, oft mit ESI kombiniert, s. oben)
 - Q-TOF (Kombination Quadrupol + Re-TOF)
 - Tripel-Quadrupol (3 Q in Serie; zur Fragmentierung)
- **Ionenfallenprinzip** (Weiterentwicklung Paul-Falle, Nobelpreis 1989)
 - Ion trap (Grundbaustein, oft mit ESI kombiniert)
 - Orbitrap (Moderne Falle, zunehmend verbreitet, nur Hersteller Thermo)
 - lineare Ionenfalle („parkt/verzögert“ Ionen, meist als Teilbaustein)
- kann nur unter Vakuum länger experimentiert werden. (Typische Werte 10^{-5} bis 10^{-9} hPa, durch Kombination von Drehschieber- und Turbopumpen)

Reflectron

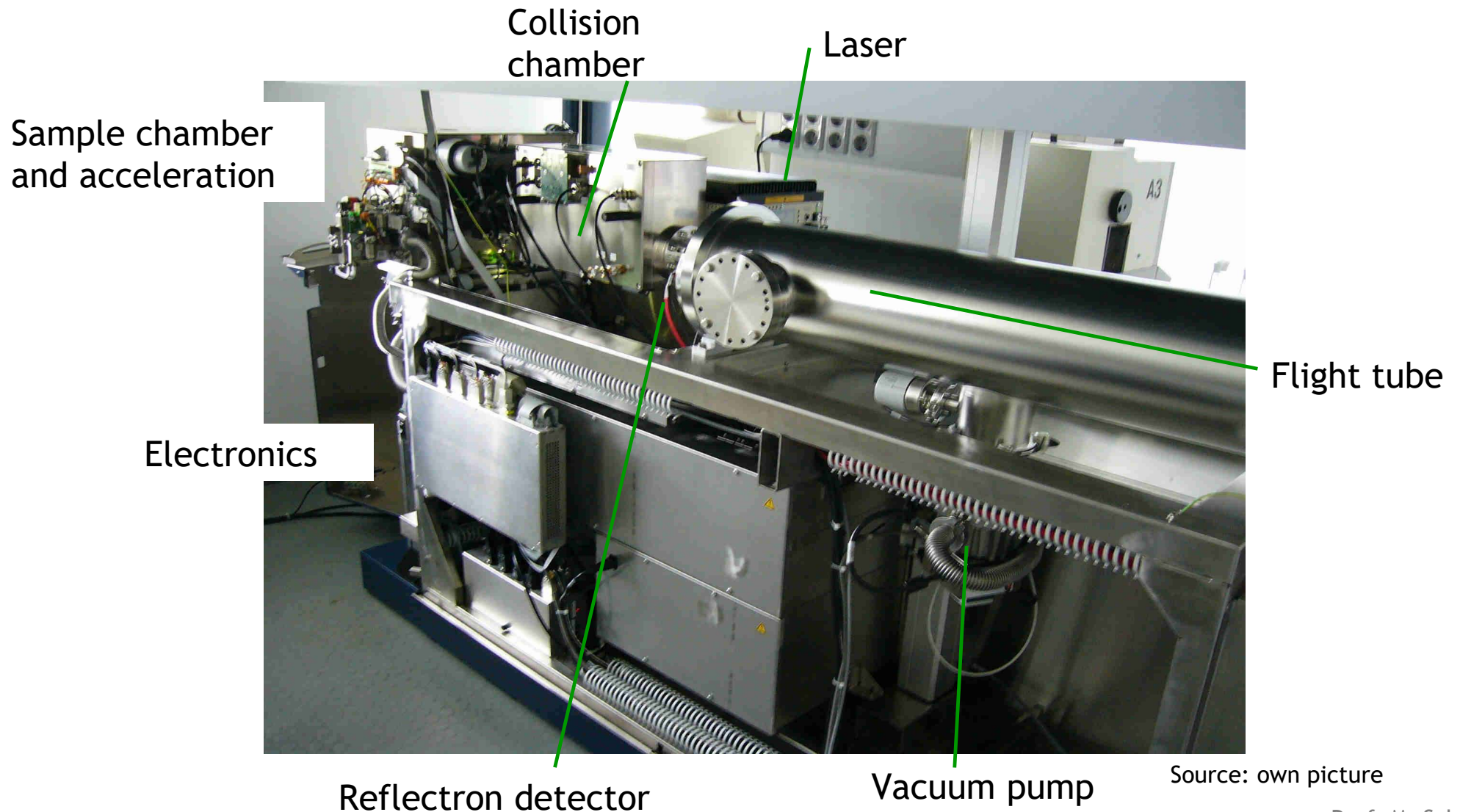
Higher resolution by electric ion mirror

MALDI and
Acceleration



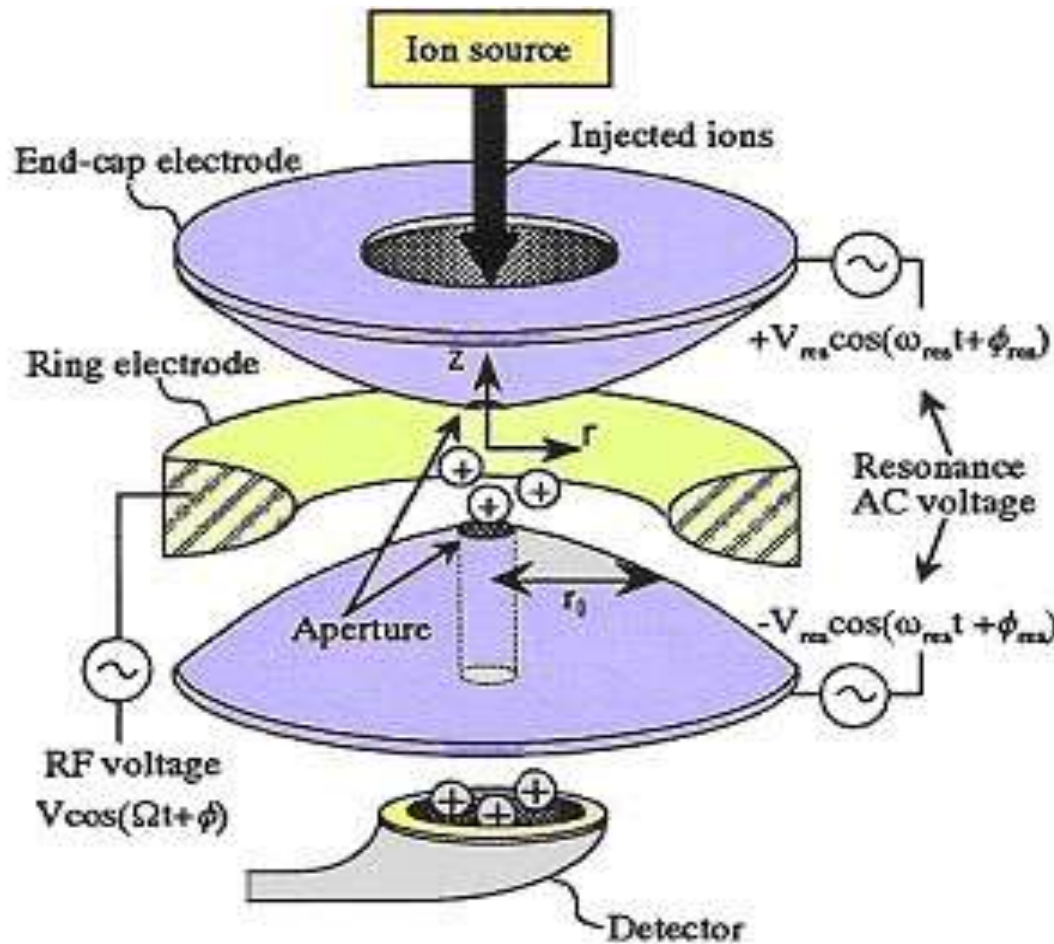
- Higher Resolution
 - Longer flight path
 - Additional focussing
- Two stage MS, fragment analysis possible
- Lower sensitivity and smaller mass range (up to 10 kDa)

MALDI-TOF/TOF at Weihenstephan



Source: own picture

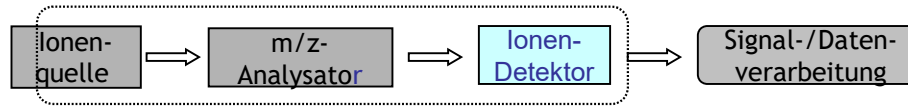
Ionenfalle Schneller und günstiger Massenanalysator



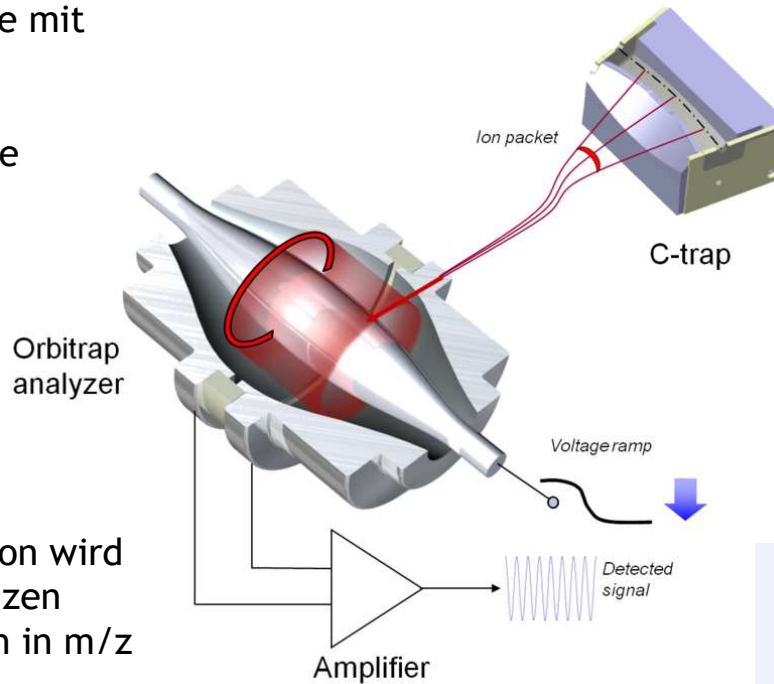
Quelle: <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/>

- Wechselfelder konzentrieren Ionen in der Mitte der Falle (W. Paul, Nobelpreis 1989)
- Durch Änderung der elektrischen Felder kann Falle gezielt entleert werden
- Ionen mit kleinerem m/z zuerst, aufgrund der geringeren Trägheit

Detektoren - FT-Analyse von Ringströmen (Orbitrap und ICR)



- Orbitrap: Ionenfalle mit neuer Geometrie (Thermo, Bremen) ⇒ deutlich höhere Massengenauigkeit und Auflösung
- Kein Magnet nötig
- Überführung der Ionen aus vorgeschalteten Ionenfallen
- Zeitliche Information wird über FT in Frequenzen umgerechnet, dann in m/z



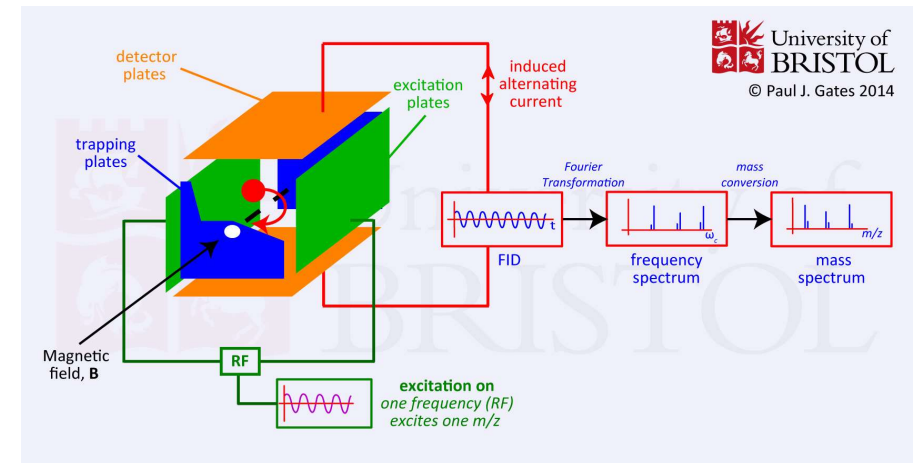
Quelle: en.wikipedia.org (Apr2021)
 Artwork by Thermo Fisher Scientific
 CC BY-SA 3.0

Erläuternde Kommentare

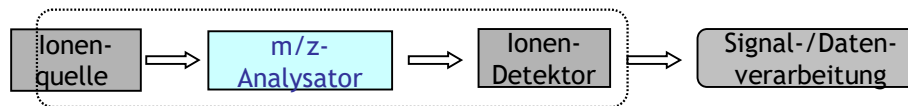
- Ringströme von geladenen Teilchen wirken als „Sender“
- Teilchen müssen nicht physikalisch auf den Detektor stoßen, es ist im Prinzip ein Radio-Empfänger
- Eine Fourier-Transformation überführt zeitliche Signale in die Frequenz-Form und daraus lassen sich m/z -Werte ermitteln (ohne merkliche Artefakte)



FT-ICR-MS, mit Magnet aus supraleitender Spule an der Uni Lisboa; Quelle: www.eu-fticr-ms.eu (Apr2021)



FT-ICR-Messprinzip, $FID(t) \rightarrow \text{signal}(v) \rightarrow \text{Int}(m/z)$
 Quelle: www.chm.bris.ac.uk/ms/fticrms.shtml (Apr2021)



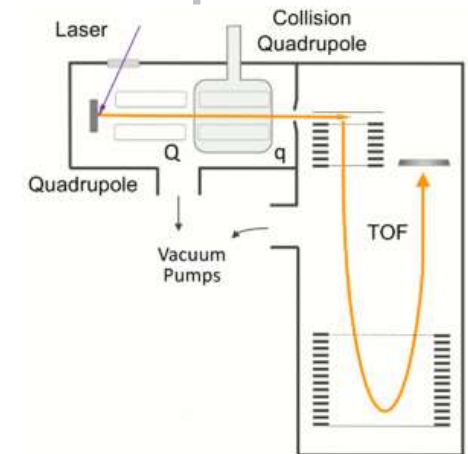
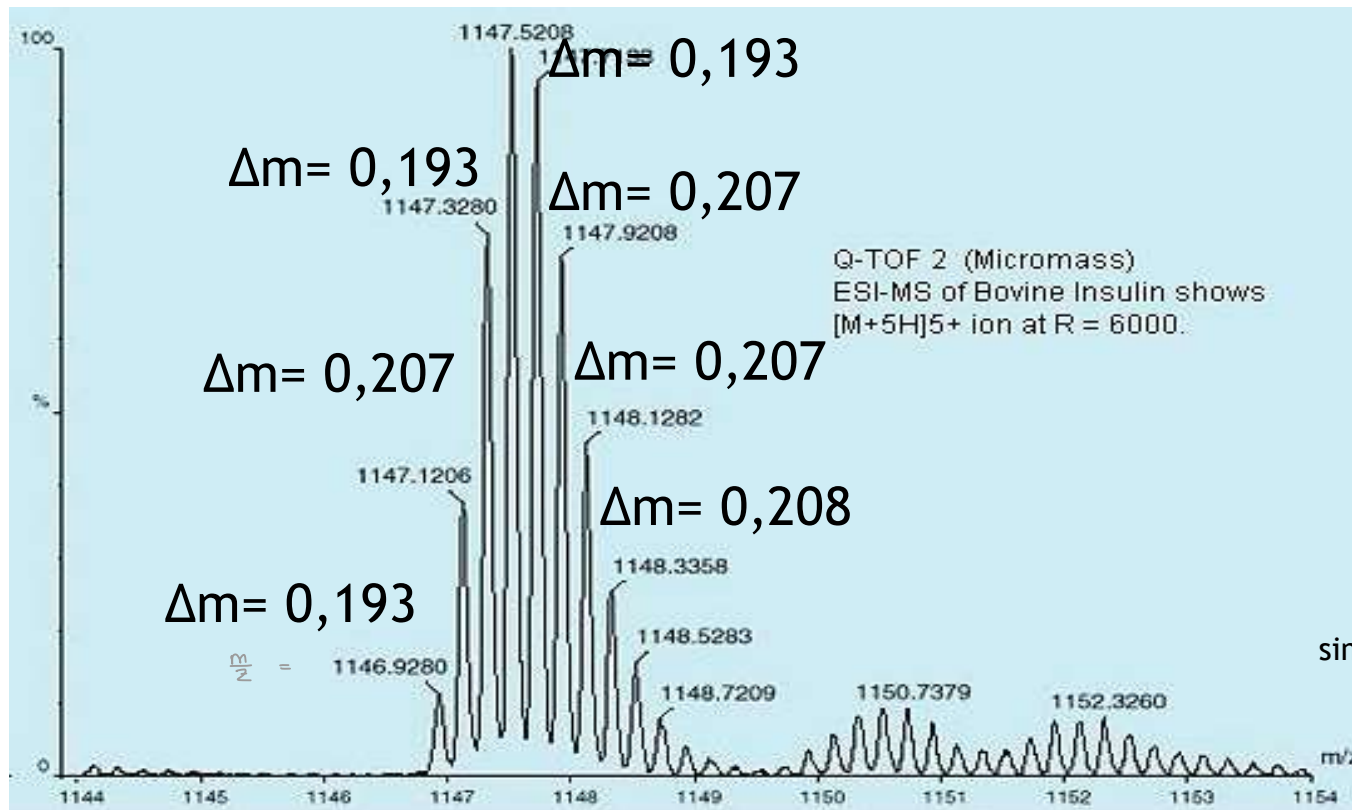
Fazit: Vergleich der m/z-Analysatoren

- Jeder Analysator hat spezifische Vor- und Nachteile, alle werden eingesetzt, ggf. auch kombiniert

Analysator	Vakuum (mbar)	max. m/z (Th)	Auflösung	genau (ppm)	Messgeschw.	rel.Preis/lfd. Kosten
Quadrupol	10 ⁻⁵	3000	2000	100	moderat	mittel/gering
TOF	10 ⁻⁶	1 000 000	5000	200	hoch	beide gering
Re-TOF	10 ⁻⁶	10 000	20000	10	hoch	mittel/gering
Ionenfalle	10 ⁻³	6 000	4 000	100	moderat	beide gering
FT-ICR	10 ⁻¹⁰	30 000	500 000	1	gering	hoch/hoch
Orbitrap	10 ⁻¹⁰	50 000	100 000	2	hoch	hoch/gering

- Hellgrün hinterlegt: Aktuelle Standard-Lösungen; gelb: besonders günstig, rot: limitierend
- Messprinzipien sind: Kontinuierlich (Quad.); gepulst ((Re)TOF), sammelnd (Ionenfalle), sammelnd mit Frequenzanalyse per FT (Orbitrap, ICR)
- Hochpreisige Ideal-Kombination: Orbitrap oder ReTOF, QTOF mit Quadrupol, neu: Tims-TOF
- Routine-Analysatoren: Quadrupol, (Re)TOF und Ionenfalle

Practical use of good resolution with ESI-Q-TOF: Calculation of $M_{\text{monoisotopic}}$ from a single peak



Hybrid MALDI-Quadrupole-TOF-MS
Source (Apr2021): en.wikipedia.org/wiki/Hybrid_mass_spectrometer

Author: K. K. Murray - Own work CC BY-SA 4.0
similar to <https://dx.doi.org/10.1021/ac990524l>



Hybrid ESI-Quadrupole-TOF-MS (Micromass/Waters)
Source (2020): www.krssltd.com

Prof. M. Schrader
HS Weihenstephan-Tr.

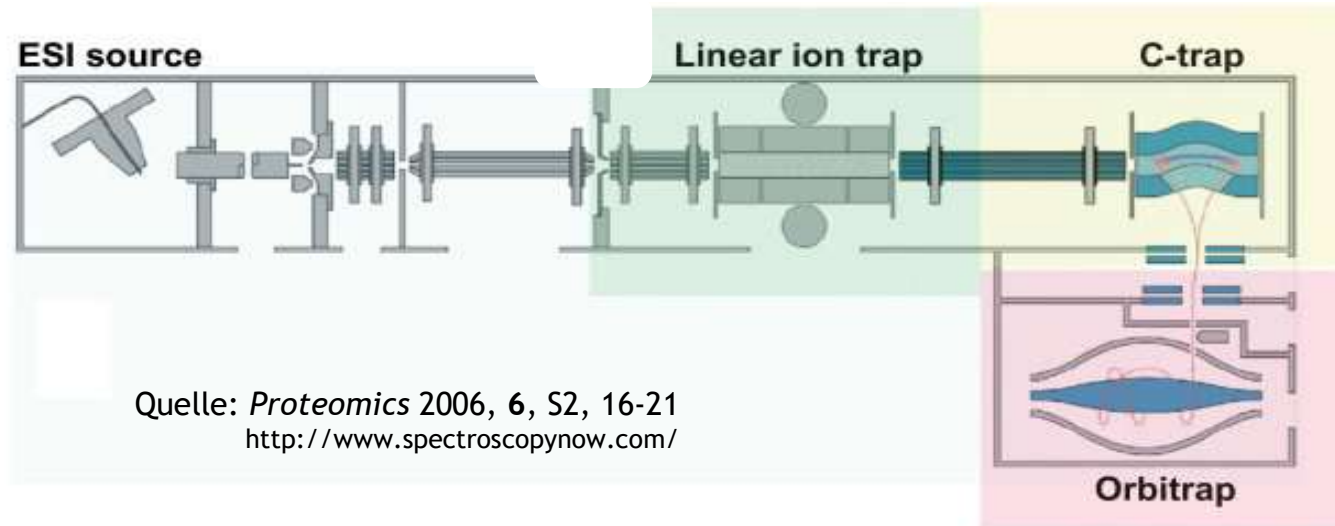
$\frac{\Delta m}{z} = \frac{1}{z}$ ^{Masse Proton}
 $\Delta m/z = 0,20 \Rightarrow z=5$ (within isotopic cluster: $\Delta m_n = 1$)

$\Rightarrow M_{\text{mono}} = (5 \cdot 1146,928) - (5 \cdot 1,0073) \text{ u} = 5729,60 \text{ u}$

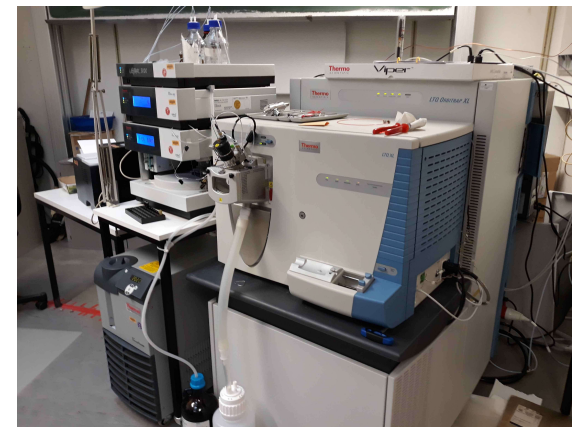
\Rightarrow **high resolution allows for determination of z and thus, monoisotopic mass of each cluster**

Derzeit beliebtestes High-End-MS: „Orbitrap“ in zahlreichen hybriden Ausführungen

■ **Figure 6.** A schematic of the LTQ Orbitrap. The front part is an LTQ linear ion trap mass spectrometer capable of detecting MS and MSⁿ spectra. In the C-trap, ions are accumulated, their energy dampened by residual nitrogen gas, and an internal calibrant can be added. Ions are then injected into the orbitrap and their signal detected.

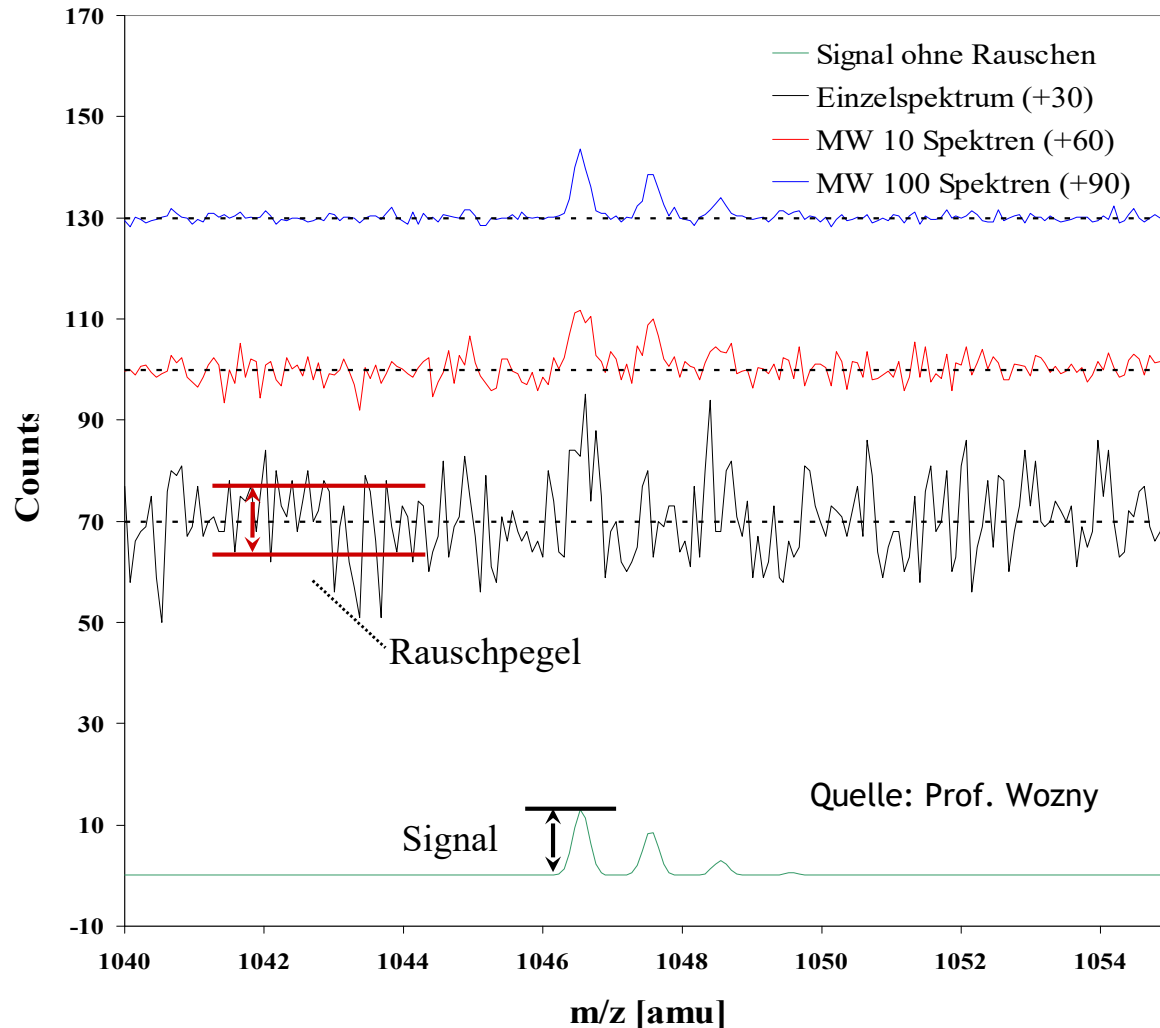


- Preis etwa 500 - 1000 T€ (Hersteller: Thermo, Bremen)
- Kombination von Ionenfallen mit erlaubt schnelle und empfindliche Messungen
- Massengenauigkeiten im ppm-Bereich (etwa $1000,000 \pm 0,005$)
- Kopplung an LC oder automatisierte nano-ESI



LTQ-MS mit LC (Uni Bonn, Chemie)
Foto: M. Schrader (2019)

Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses durch Addition von Spektren (Wurzelgesetz)



$$S/N \sim \sqrt{n}$$

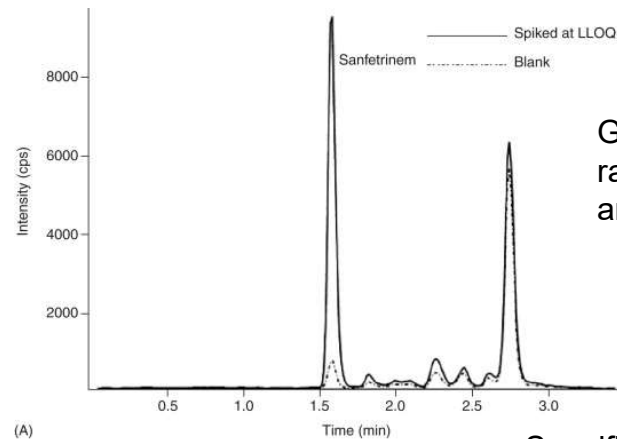
100 Spektren: $S/N=10$
(ab 10: quantifizierbar)

10 Spektren: $S/N=\sqrt{10}$
(ab 3: nachweisbar)

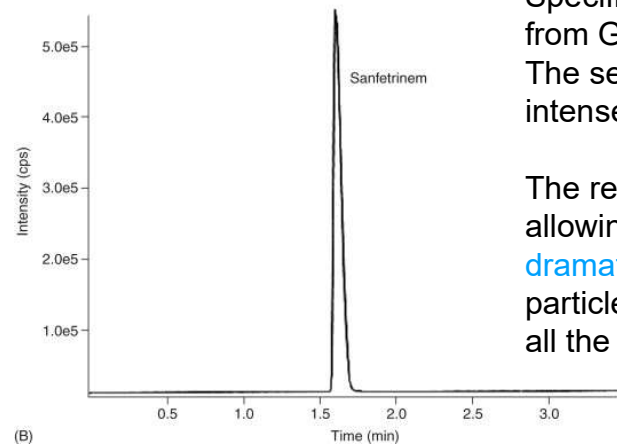
Einzelspektrum: $S/N=1$
(kein Nachweis möglich)

Signal ohne Rauschen
(Idealbild)

Quantification with MS - Selected Ion Monitoring (SIM) or internal standards

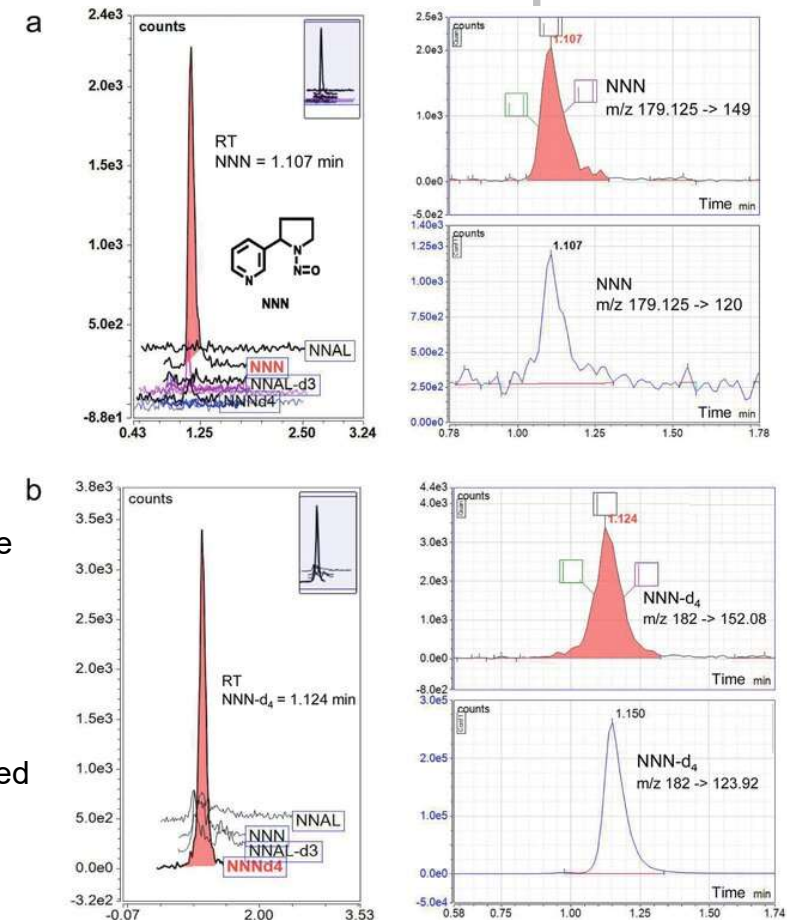


General principle: Signal areas raise with **ionization efficiency** and **concentration** of analyte.



Specific principle: **Isolation of peaks** from GC- or LC-MS-Chromatogram. The selected ion should be one of the intense signals/fragments.

The result is a decrease in noise allowing the signal to appear as a **dramatic increase in sensitivity** (all particles of that m/z are being detected all the time)



LC-MS/MS SIM to the determination of sanfetrinem in plasma:

(A) a **blank sample compared to spiked plasma**

(B) a representative chromatography of a **real patient sample**

(Source: R. Sleeman, J.F. Carter, in Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), 2005; citing Nardi et al., 2001 Journal of Chromatography B 767: 193–201)

N-nitrosornicotine (NNN) metabolite in 24-hour urine were measured by liquid chromatography-tandem MS

Source: Phikulkhao et al. (2022)

Cancer Screening and Prevention

DOI: 10.14218/CSP.2022.00019

Einsatzgebiete von MS

- Probenarten: vorwiegend Lösungen, nach teilweise ausgiebiger Probenvorbereitung
- Beispiele, meist sowohl qualitativ als auch quantitativ (**selbständig durchgehen** und **Beispiele finden**):
 - Strukturüberprüfung nach org.-chem. Synthese
 - Pharma: Produktüberprüfung von Proteinen
 - Umweltanalytik, z.B. Pestizidrückstände
 - klinische Forschung mit Körperflüssigkeiten
 - Lebensmittelanalytik
 - Drogen-, Dopinganalytik
- Geräte-Kosten: zwischen etwa 100.000 bis 1.000.000 €
- Hersteller, z.B.: Applied Biosystems (USA/CAN), Thermo (USA), Waters (UK/USA), Agilent (USA), Bruker Daltonics (D/USA), Shimadzu (JP)



LC-Triple-Quadrupole-MS
Source (Apr2021): www.shimadzu.de



Q-TOF MS
Source (Apr2021): [www.agilent.com/en/quadrupole-time-of-flight-lc-ms/6500-series-accurate-mass-quadrupole-time-of-flight-\(q-tof\)-lc-ms/6545vid](http://www.agilent.com/en/quadrupole-time-of-flight-lc-ms/6500-series-accurate-mass-quadrupole-time-of-flight-(q-tof)-lc-ms/6545vid)

Video: [https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/quadrupole-time-of-flight-lc-ms/6500-series-accurate-mass-quadrupole-time-of-flight-\(q-tof\)-lc-ms/6545vid](https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/quadrupole-time-of-flight-lc-ms/6500-series-accurate-mass-quadrupole-time-of-flight-(q-tof)-lc-ms/6545vid)

Conclusion, part II: Biomolecule MS is absolutely no billard!

Characteristics of Bio-MS

- ◆ collisions reduced and softer in ESI or MALDI
- ◆ multiple charges in ESI, but mostly one in MALDI
- ◆ charged power leads to TOF spectra (MALDI)
- ◆ just one detector collects millions of hits
- ◆ resolution above all
- ◆ seldom average mass, but isotopic masses
- ◆ variety of m/z -analysers
 - TOF, multipoles, ion trap, orbitrap, ICR
 - most often in combinations



Just one „detector“
Source (Apr2021): www.stabilo-fachmarkt.de

Advantages of Bio-MS

- ◆ sensitive (fmol)
- ◆ accurate (ppm)
- ◆ informative (isotopomers)
- ◆ fast (to better than noise)
- ◆ expensive (but versatile)
- ◆ quantitative (after calibration, not shown)

Das sollten Sie nun zusätzlich können

Grundlagen und Komponenten

- Prinzip von ESI und MALDI
- Benennung mehrerer m/z-Analysatoren, deren ungefähre Funktion und Vor-, Nachteile
- ...

Instrumentelle Bioanalytik Teilgebiet Spektroskopie Prüfung im Studiengang Biotechnologie (B.Sc.) Modulnummer 212086010	HOCHSCHULE WEIHENSTEPHAN-TRIESDORF UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES Fakultät Biotechnologie und Bioinformatik	
---	--	---

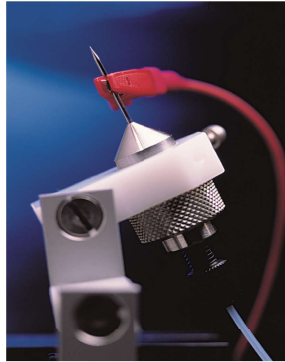
Hilfsm.: 1 Bl. + TR (PSE verteilt)	Matrikel-Nr.:
Prüfer: Prof. Dr. Schrader	Name :
	Anzahl abgegebener Prüfungsbögen:

- Beschriebene Prüfungsbögen und die Aufgabenblätter sind mit der Matrikel-Nr. (oder Name) zu versehen und alles zusammen am Ende der Prüfung abzugeben.
- Teilschritte und Begründungen sind unbedingt anzugeben, um volle Punktzahl zu erreichen oder bei falschen Ergebnissen anteilige Punkte zu erhalten.
- Bei der Angabe von Zahlenwerten ist auf Einheiten und eine sinnvolle Anzahl von Stellen zu achten. Verwenden Sie die bereits vorgegebenen Symbole.

Aufgaben (Gesamtpunktzahl: 60)

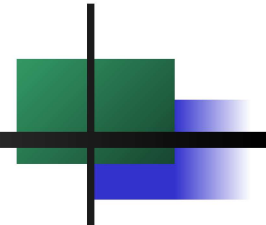
Spektren

- Bedeutung vom massenspektr. Auflösung
- Besonderheiten von Spektrem großer (Bio-) Moleküle
- Bedeutung S/N-Verhältnis und Optimierungsverhalten
- ...



Zur Wiederholung

Kleines Glossar zur Massenspektrometrie (MS)



Instrument und Messprinzip

- m/z-Analysator, Kernstück der physikalischen Massenbestimmung
 - Quadrupol
 - TOF-MS: Flugzeit-MS
 - Orbitrap
- Ionenquelle
 - EI
 - ESI
 - MALDI
- Detektoren
- SIM

Spektrale Information

Speziell zu MS

- u und Th als Einheiten
- Isotop: Atommassenvariante
Isotopolog: Molekülmassenvariante durch Isotope
Isotopomer: Anordnungsvariante von Isotopenarten
- Molekülion: ionisiertes Analytmolekül
Tochterion: Fragment-Ion
- monoisotopic vs. average mass

Allgemein in Spektroskopie

- Peak
- Auflösung
- S/N: Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Final conclusion: Mass spectrometry is no billard!

However, it's about
the same fun



*Le plus grand plaisir dans la vie est de faire des choses
que l'on ne réaliserait pas de l'avis des autres.
(Marcel Aymé)*