

Grundlagen: LC-MS und LC-MS/MS

Dr. rer.nat. Thomas Grobosch

Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben (BBGes)
Institute of Toxicology
Clinical Toxicology and Poison Control Center Berlin
Oranienburger Str. 285
13437 Berlin
Germany

Was bedeutet LC-MS ?

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Trennt Substanzen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften
(polar, unpolar, Säure, Base, ...).

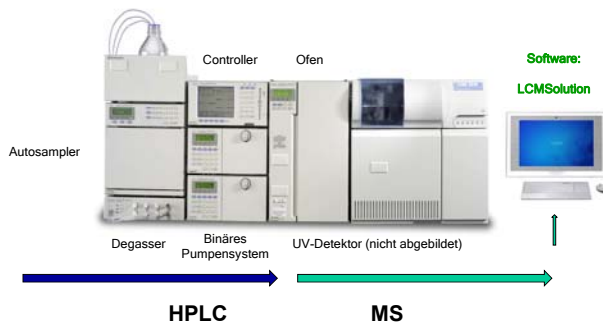
“-“ der Übergang (Interface)

Ein Prozess, bei dem das Lösemittel entfernt und der Analyt geladen wird.

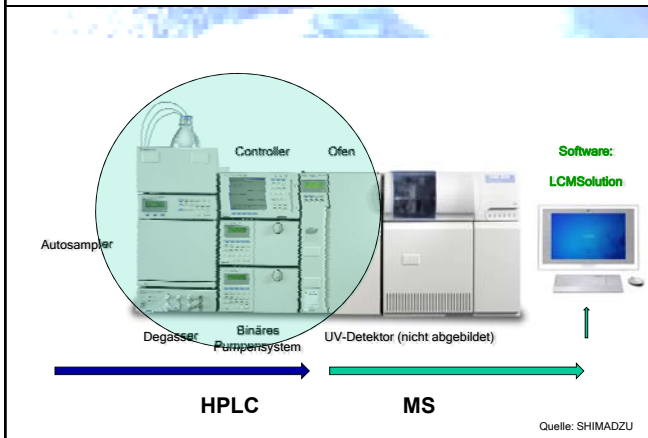
MS (Massenspektrometrie)

Ein Prozess bei dem Ionen generiert und
aufgrund ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) detektiert werden.

LC-MS




(HP)LC



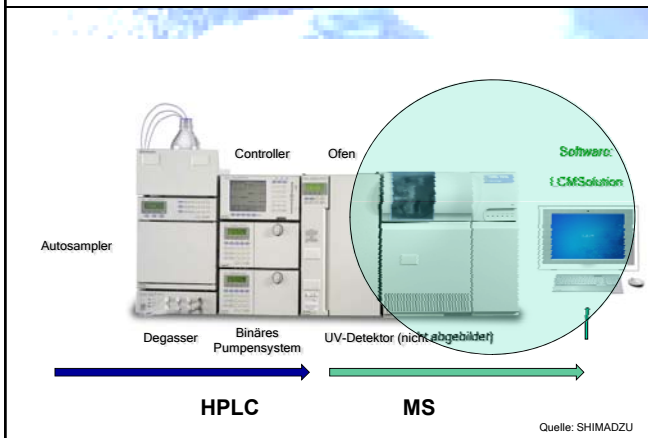
HPLC - Chromatographie - Parameter

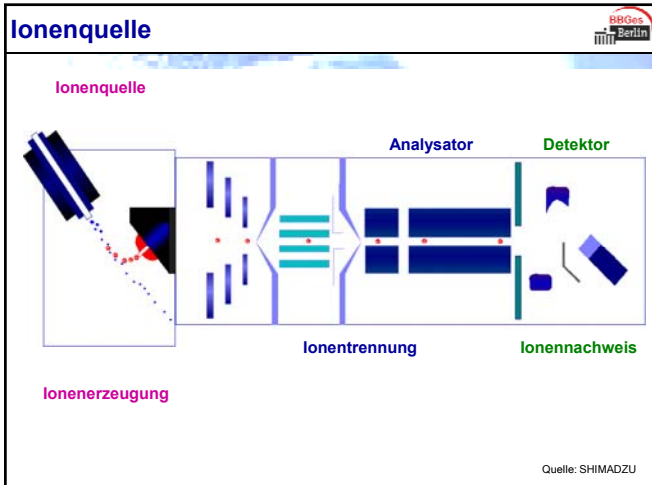


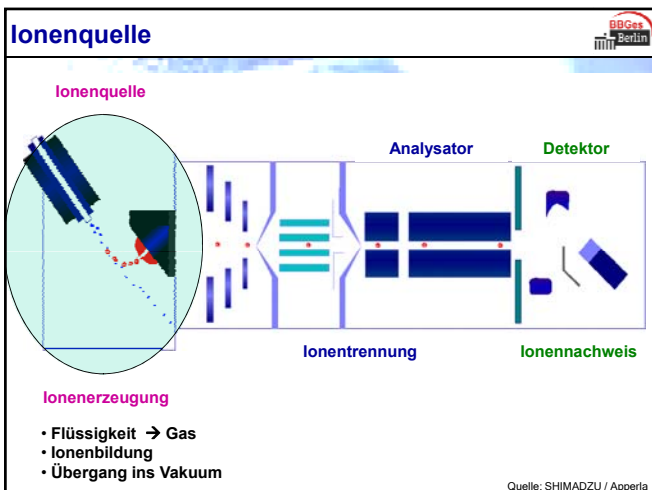
- **Eluenten**
(Wasser, MeOH, ACN, flüchtige Salze, Säuren)
- **Flussrate** ($\mu\text{L}/\text{min}$... mL/min)
- **Säulenwahl** (PFP, ..., C8, C18)
- **Partikelgröße des Säulenmaterials**
($25\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m}$, $2.1\ \mu\text{m}$, $1.8\ \mu\text{m}$...
Drücke steigen überproportional bei kleinerer Partikelgröße)
- **Ofen-Temperatur**
(höhere Temperatur, geringerer Druck, bis 60°C)



Massenanalytoren (MS)









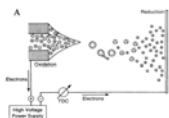
Ionenquelle



In der Ionenquelle wird der Analyt ionisiert

ESI (Elektrospray-Ionization):

Die Lösung des Analyten wird versprüht, ionisiert, die Tröpfchen getrocknet, so dass Ionen des Analyten zurückbleiben. Eher für polare Analyte geeignet.



APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization):

Die Lösung des Analyten wird vor der Ionisation verdampft. Die Lösemittelmoleküle werden an einer spitzen Elektrode bei Atmosphärendruck ionisiert. Auch für weniger polare Analyten geeignet.

APPI (Atmospheric Pressure Photoionisation):

Der Eluent wird zunächst verdampft und anschließend durch Photonen ionisiert -> unpolare Analyte.

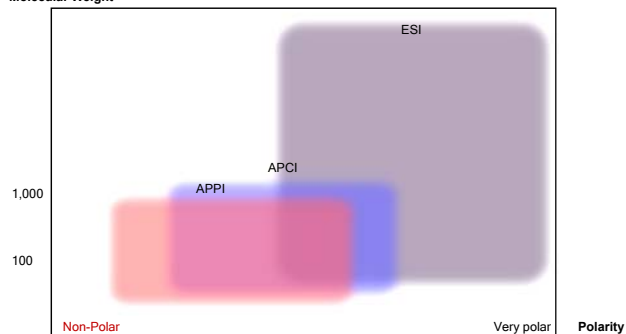
MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization):

Hier ein von einem Feststoff der Analyt mit gepulstem Laserlicht abgedampft und ionisiert werden -> Proteomics.

Wahl der Ionenquelle



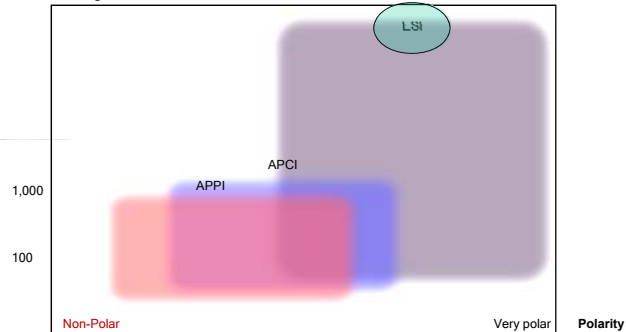
Molecular Weight



Wahl der Ionenquelle



Molecular Weight



Interface (Ionenquelle) - ESI



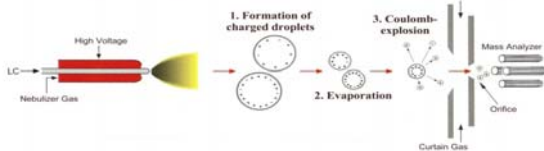
ESI Probe



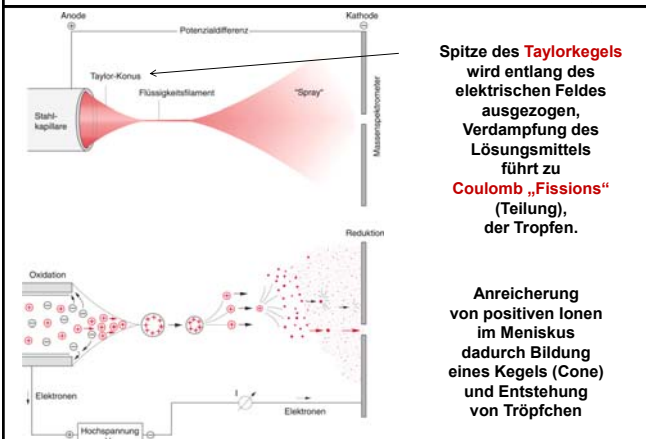
Ionisation erfolgt beim Passieren eines elektrischen Potentials (3-5kV). Es entsteht ein Aerosol mit kleinsten geladenen Tröpfchen.

Durch Verdampfung des Lösungsmittels und Konzentration der Ladung auf den kleiner werdenden Tröpfchen kommt es zur Bildung gasförmiger Ionen.

ATMOSPHERIC PRESSURE



Ionenbildung



Spitze des Taylorkegels wird entlang des elektrischen Feldes ausgezogen, Verdampfung des Lösungsmittels führt zu Coulomb „Fissions“ (Teilung), der Tropfen.

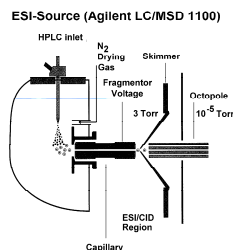
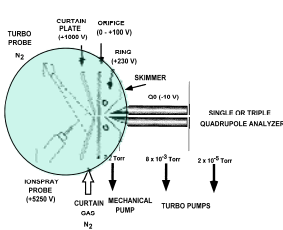
Anreicherung von positiven Ionen im Meniskus dadurch Bildung eines Kegels (Cone) und Entstehung von Tröpfchen

Ionenquellen (Anordnung)



Off-axis Spray

Orthogonal Spray

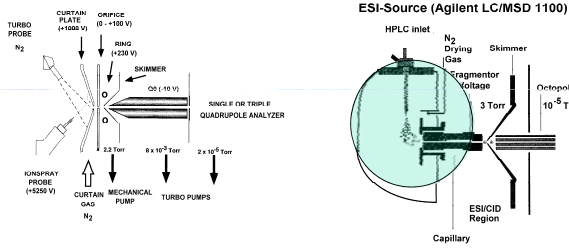


Ionenquellendesign



Off-axis Ionspray

Orthogonal Spray



Ionenquelle - Orthogonal Spray

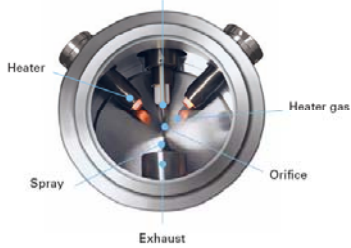


APCI or TurbolonSpray® Probe

Turbo V Spray

schnellere Verdampfung (750°C)

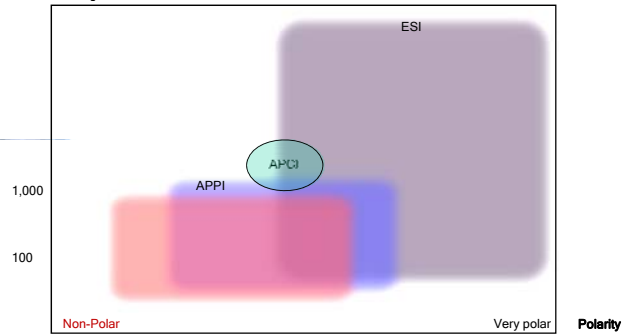
Von hohen Flüssigkeiten bis 3 mL/min



Wahl der Ionenquellen



Molecular Weight



Interface (Ionenquelle) - APCI

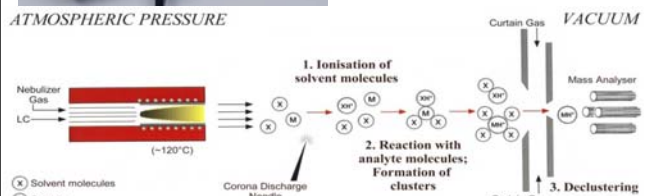


APCI Probe



Probe wird auf 400°C - 500°C erhitzt Und versprüht.

ATMOSPHERIC PRESSURE



Einflußgrößen auf die Ionisierung



ESI

- Ionenspray Polarität (positiv / negativ)
- Spannung der Kapillare (bis +/- 5500 V)
- Gasdruck des Vernebelungssprays und des Heizgases
- Heizgas-Temperatur

APCI

- Polarität der Nadel (positiv / negativ)
- Spannung der Nadel (V)
- Gasdruck des Vernebelungssprays und des Heizgases
- Heizgas-Temperatur

Aduktbildung



Welche Ionen entstehen bei ESI oder APCI ?

Positive Ionisation $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$

- Ammonium-Addukte z.B. bei Sirolimus, Digoxin
- Alkali-Addukte oft bei Carbonsäuren oder Sulfonsäuren

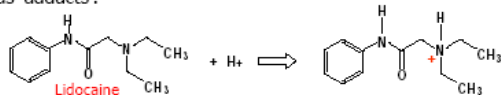
Negative Ionisation $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$

- Chlorid-Addukte: z.B. bei Zugabe von Dichlormethan

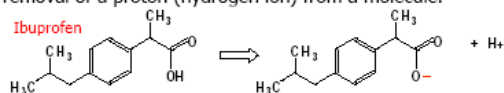
Aduktbildung



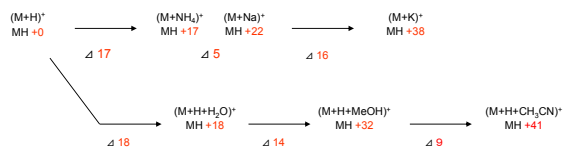
Positive Electrospray Ions are produced by the addition to a molecule of a positively ion (e.g. H⁺, NH₄⁺, Na⁺). These positively charged ions that are added are often referred to as 'adducts'.



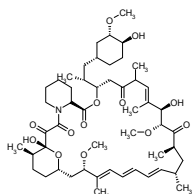
Negative Electrospray Ions are most often produced by the removal of a proton (hydrogen ion) from a molecule.



Adduktbildung (komplex)



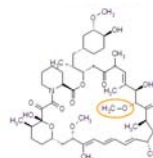
Sirolimus =
makrozyklisches
Immunsuppressivum



Beispiel Natrium-Addukte (LC-MS)

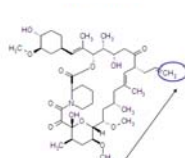


Sirolimus (SRL)

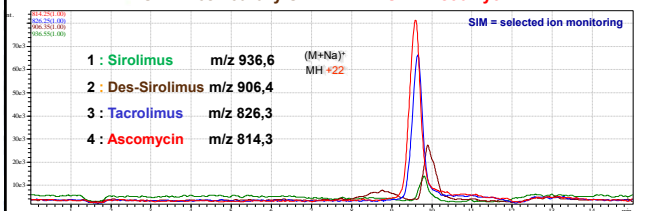


IS 1 = Desmethoxy-SRL

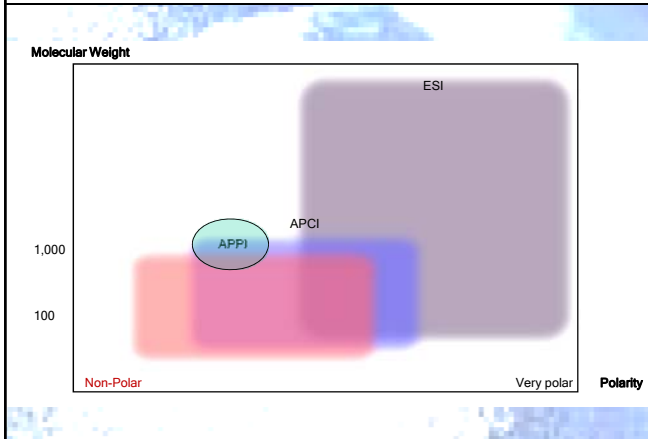
Tacrolimus



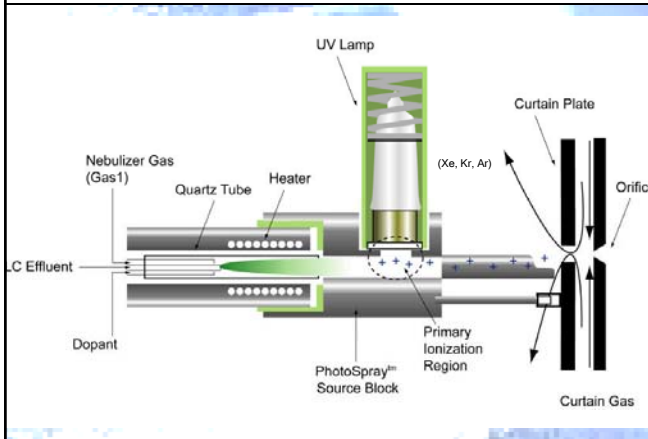
IS 2 = Ascomycin



Wahl der Ionenquelle



APPI – Atmospheric Pressure Photoionisation



APPI – Atmospheric Pressure Photoionisation



APPI - Anwendungen



PAHs

Fettsäureester

Trielaidin CC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O

EPA CCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O

Steroide

APPI - Prinzip (Direkt APPI)



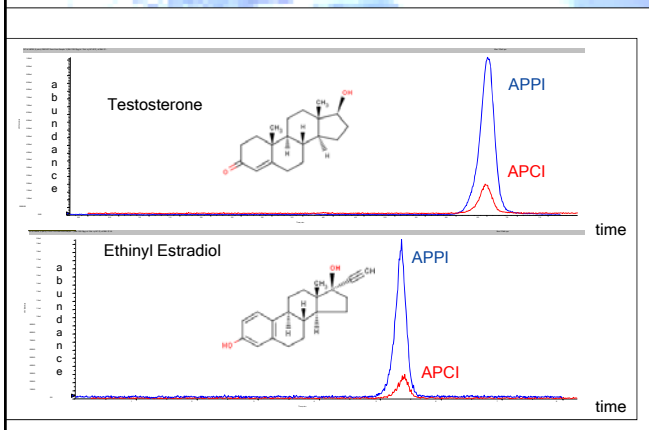
Direct APPI

● Protic solvent
● Analyte

$M + h\nu \rightarrow M^+ + e^-$ Analyte molecule M is ionized to a molecular radical ion M^+ . (If analyte ionization potential is below photon energy)

$M^+ + S \rightarrow MH^+ + S[-H]$ In the presence of protic solvents, M^+ may abstract a hydrogen atom to form MH^+ .

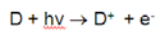
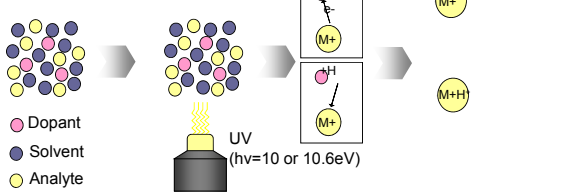
APPI - Beispiel



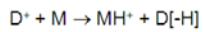
APPI – Prinzip (Dopant APPI)



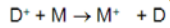
Dopant APPI



A photoionizable dopant is delivered in large concentration to yield many D^+ ions.



D^+ ionizes analyte M by proton or electron transfer.



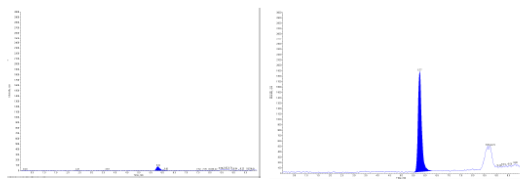
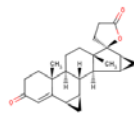
Dopant (z.B.): Aceton, Anisol, Ethylacetat, Toluol, ...

APPI – mit und ohne Dopant



LC-MS/MS: APPI - SENSITIVITY

test solution drospirenone (1 ng/ml)



APPI / no dopant

APPI / toluene

APPI – mit und ohne Dopant



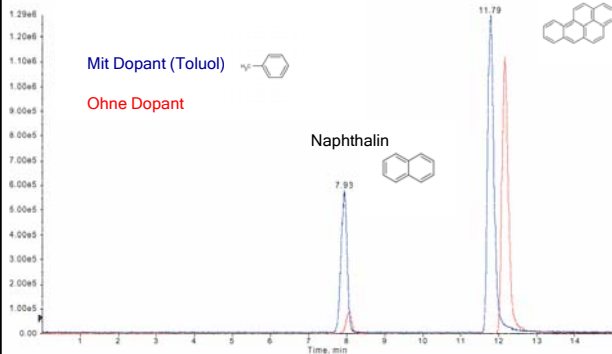
Vergleich zweier PAHs:

Benzo(a)pyrene

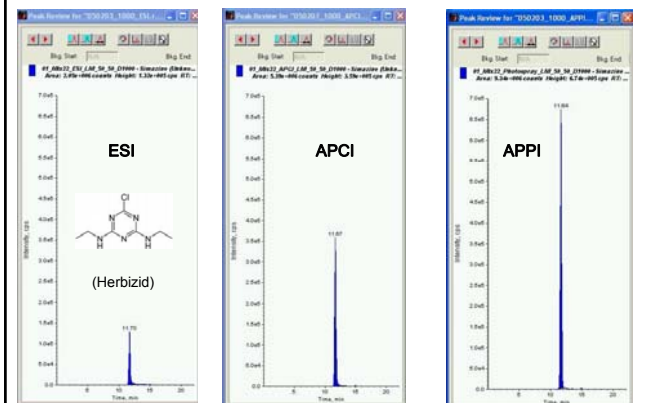
Mit Dopant (Toluol)

Ohne Dopant

Naphthalin



Vergleich Simazin: ESI – APCI - APPI



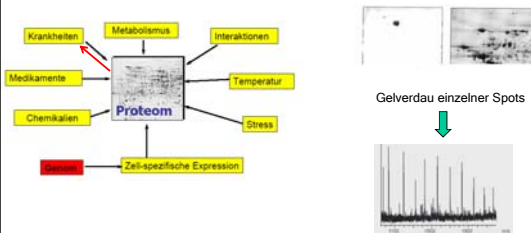
Weitere Ionenquellen (MALDI)



Proteomics



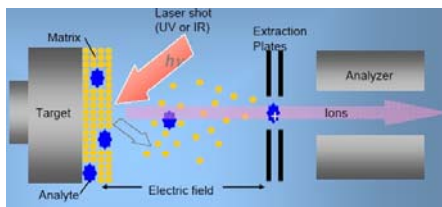
identisches Genom – aber unterschiedliches Proteom



MALDI-MS



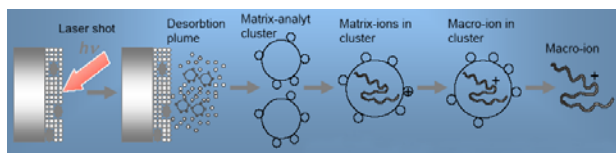
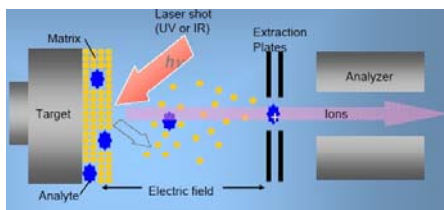
MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation



MALDI-MS



MALDI = Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation



Matrixsubstanzen für die MALDI-MS



Die Matrixsubstanz **absorbiert** die eingestrahlte Laserenergie und schützt aufgrund des **Überschusses** (ca. $10^3 : 1$) die Analytmoleküle vor Zersetzung.

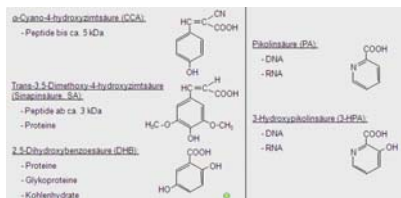
Die Matrixsubstanzen werden durch die Absorption der Laserenergie selbst elektronisch angeregt und stellen die zur **Desorption der Analytmoleküle** notwendige Energie zur Verfügung.

Die Matrix wirkt als Brönstedt Säure oder Base d.h. sie liefert Protonen oder abstrahiert diese zur Ionisation des Analyten.

Die Matrixsubstanz **unterbindet Wechselwirkungen** zwischen Analyt und Probenträger.

Matrixsubstanzen sind z.B.:

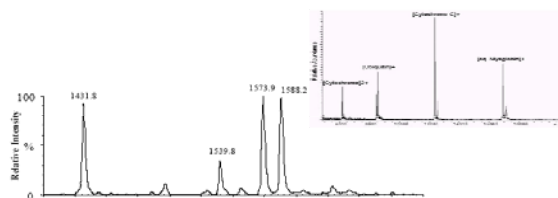
Glycerin, Bernsteinsäure, ...



Beispiel: MALDI



Proteinbestimmung mittels MALDI-MS (keine Fragmentierung)



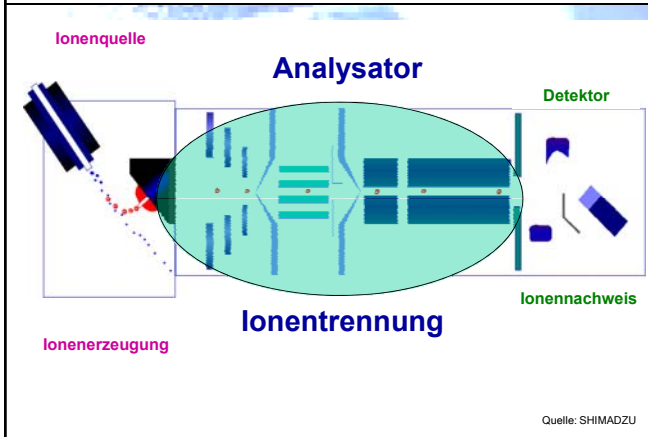
Identifikation **bekannter** Proteine anhand ihrer Masse.
Massenbestimmung ist eindeutig.
für Proteine < 10^6 Da geeignet.
Größere Proteine, oder wenn mehr Information gewünscht wird,
müssen zuvor mit einer Protease (meist Trypsin) in kleinere Peptide
zerlegt werden.

Analysator / Ionentrennung

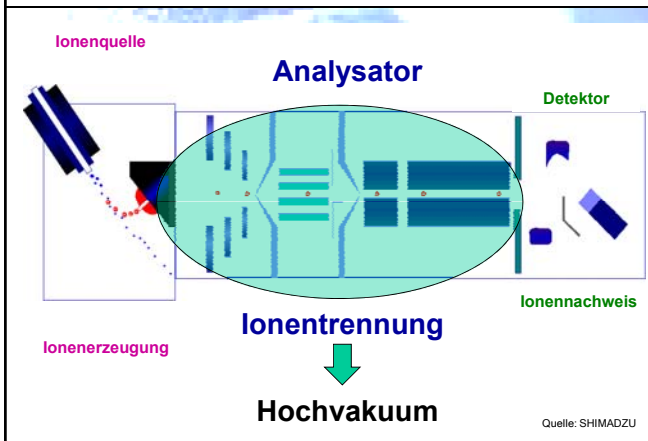


Analysatoren – Prinzip - Ionentrennung

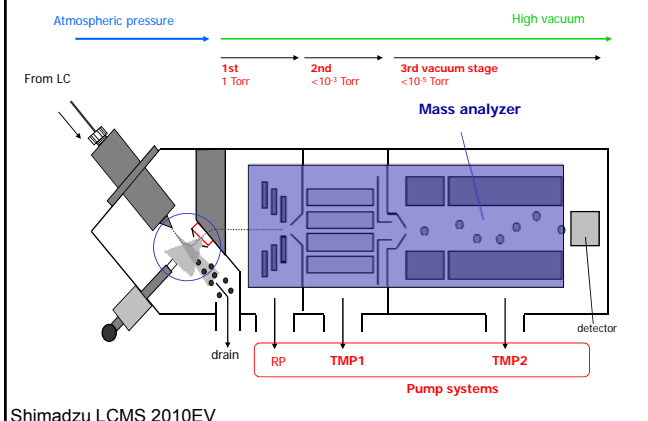
Analysator / Ionentrennung



Analysator / Ionentrennung



Analysator - Vakuum



Shimadzu LCMS 2010EV

Hochvakuum



Kinetische Gastheorie \Rightarrow mittlere freie Weglänge L :

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2}p\sigma}$$

mit k = Boltzmann-Konstante [JK^{-1}], T = Temperatur [K],
 p = Druck [Pa] und σ = Stoßquerschnitt [m^2]

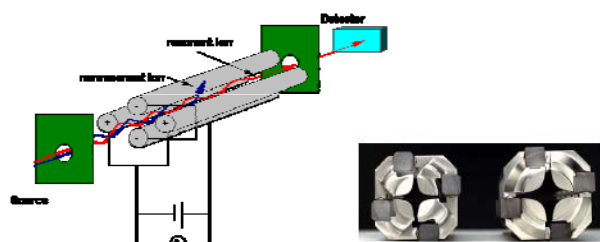
\Rightarrow die notwendige mittlere freie Weglänge hängt unter anderem vom eingesetzten Massenspektrometer ab, sollte aber üblicherweise 1 m betragen \Rightarrow notwendiges Vakuum :

Pressure (Torr)	Gas number density (molecules/ cm^3)	Mean free path
760	2.7×10^{19}	1 μm
1	3.5×10^{15}	0.05 mm
0.1	3.5×10^{14}	0.5 mm
0.01	3.5×10^{13}	0.5 cm
0.001	3.5×10^{12}	5 cm
1×10^{-4}	3.5×10^{11}	50 cm
1×10^{-6}	3.5×10^9	50 m
1×10^{-8}	3.5×10^7	5 km

Analysatoren / Ionentrennung



Die erzeugten Ionen werden durch ein statisches, elektrisches Feld beschleunigt und durchfliegen zentral **vier parallel liegende Stabelektroden**, deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden (**Quadrupol**).



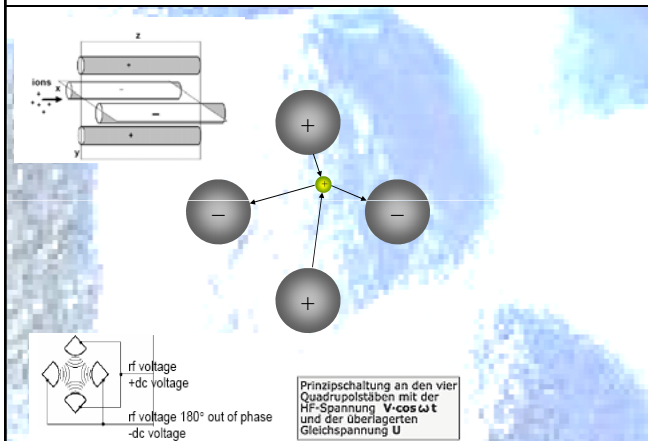
Im Wechselfeld zwischen den Quadrupol-Stäben findet eine **m/q (z)-Selektierung** statt.

Massenanalysatoren

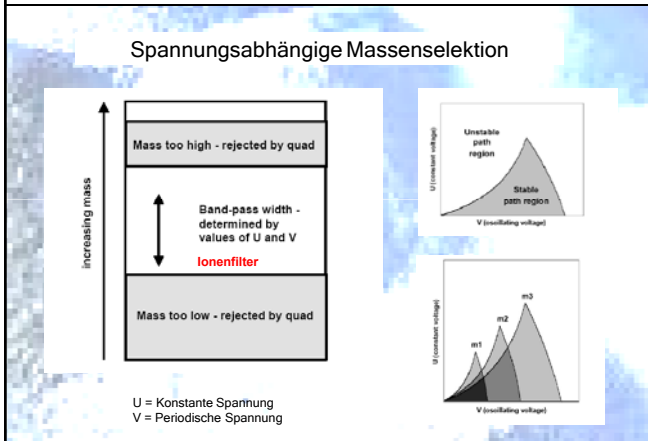


Ion im elektrischen Feld

Ion im elektrischen Feld



Ion im elektrischen Feld

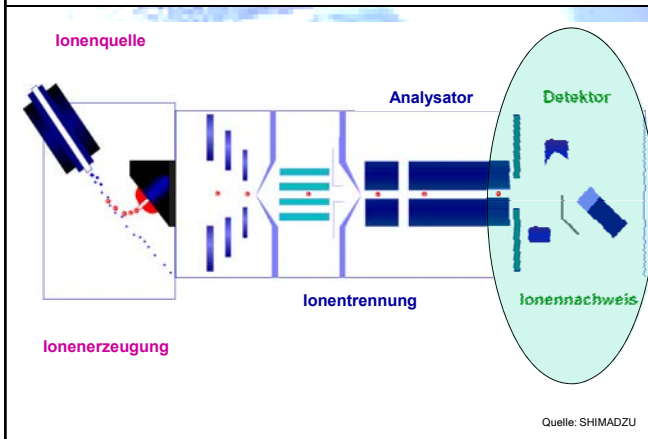


Überblick



Detektoren

Detektor



Detektoren



- **Faraday Cup:** Good Linearity, Operates at atmospheric Pressure, Produces no Gain or signal amplification.
- **Discrete Dynode Multipliers:** Large, Bulky, Become Noisy when operated above 10^{-6} Torr
- **Single Channel Electron Multipliers:** Channeltrons®, Spiraitrons™ and MAGNUM® - Compact, High Gain, Low noise Electron Multipliers, operate well at pressures extending into the 10^{-4} Torr range.
- **Microchannel Plate (MCP) Detectors:** Miniature and subminiature designs produce high gain and low noise, and have demonstrated operation at 3×10^{-2} Torr.


Sekundärionen Vervielfacher (SEV)

Channel Electron Multipliers (CEM)

Überblick 



Massenanalysatoren

Überblick: Massenanalysatoren 

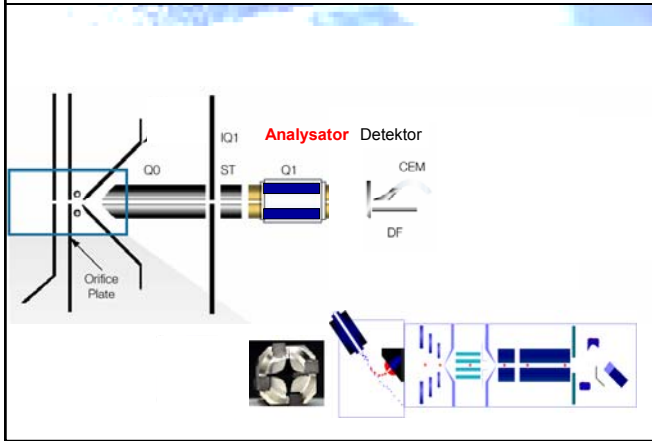
Single-Quadrupol (MS)	MS	100k€	↓
Triple-Quadrupol (MS/MS)	Ion-Trap, MS, MS/MS, MS ⁿ	200k€	
Q-Trap (QTrap)	MS/MS, MS ²	250-350k€	
TOF	TOF	high mass resolution and accuracy (HMRMS)	
	Q-TOF	MS/MS + HMRMS/MS	
	IT-TOF	MS/MS + HMRMS/MS	
	TOF-TOF	MS/MS + HMRMS/MS	500 k€
Orbitrap	MS/MS, MS ⁿ	HMRMS/MS Gasphasenreaktionen	600 k€
FT-ICR	(- 12 Tesla)	(Ultra)high Mass Resolution	>1000k€

Massenanalysatoren 



Single Quadrupole (LC-MS)

Massenanalysatoren (Single Quad / LC-MS)

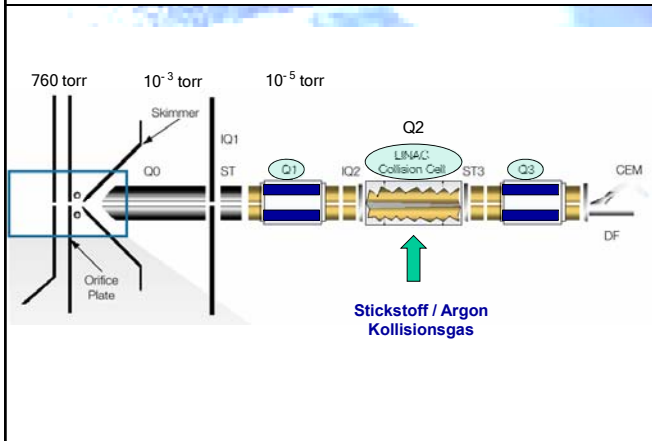


Massenanalysatoren

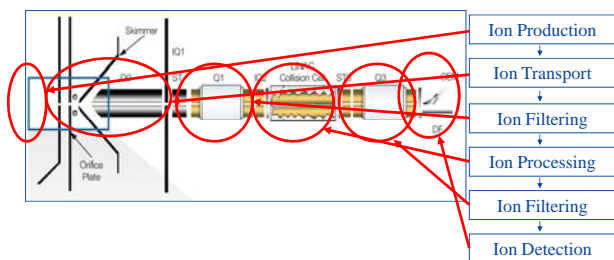


Triple Quadrupole (LC-MS/MS)

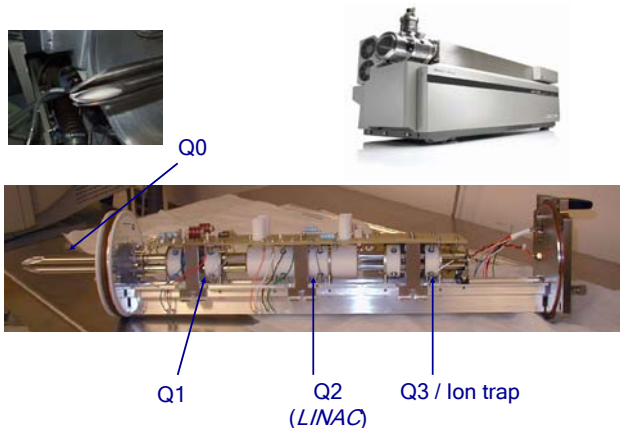
Massenanalysatoren (Triple Quad / LC-MS/MS)



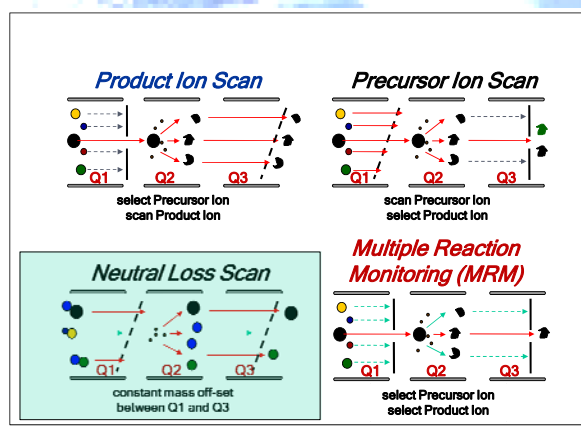
Massenanalysatoren (Triple Quad)



Massenanalysatoren (Triple Quad)



Massenanalysatoren (Triple Quad)

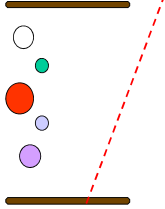


Scan Modes (Triple Quad)



Precursor Ion Scan (Vorläufer Ionen Suche)

Q1



Bereich abfahren

Precursor Ion Scan

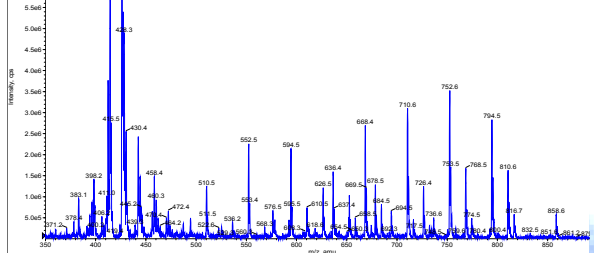


Sample Name: TuneSampleID Acq. Date: Saturday, December 02, Acq. Time: 12:1

*Q1: 0.301 to 0.568 min from Sample 1 (1 run/Sample(s) of Scan Extract 90-1000.will (Turbo Spray) Max: 7200

Precursor Ion Scan eines Extrakts (Veratrum album – weißer Germer)

m/z: 350 - 900



Project: VERATRIN-ALKALOIDE Results Name: N/A Page 1 of 1

Precursor Ion Scan

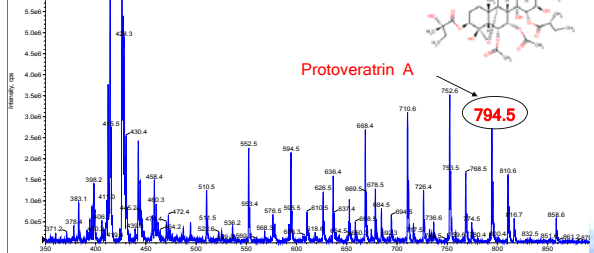


Sample Name: TuneSampleID Acq. Date: Saturday, December 02, Acq. Time: 12:1

*Q1: 0.301 to 0.568 min from Sample 1 (1 run/Sample(s) of Scan Extract 90-1000.will (Turbo Spray) Max: 7200

Precursor Ion Scan eines Extrakts (Veratrum album – weißer Germer)

m/z: 350 - 900

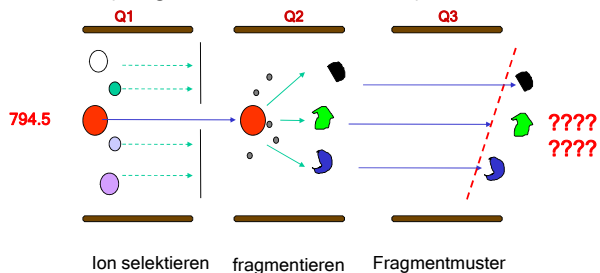


Project: VERATRIN-ALKALOIDE Results Name: N/A Page 1 of 1

Scan Modes (Triple Quad)

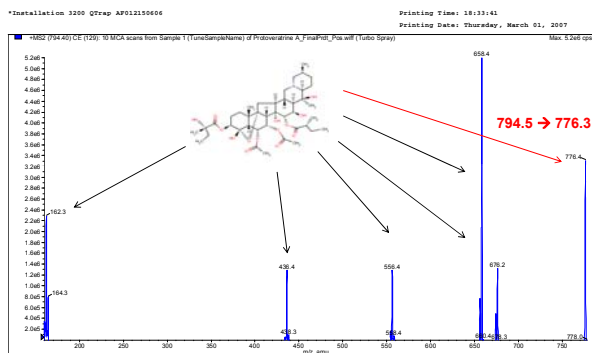


Product Ion Scan (Fragmentmuster erkennen)

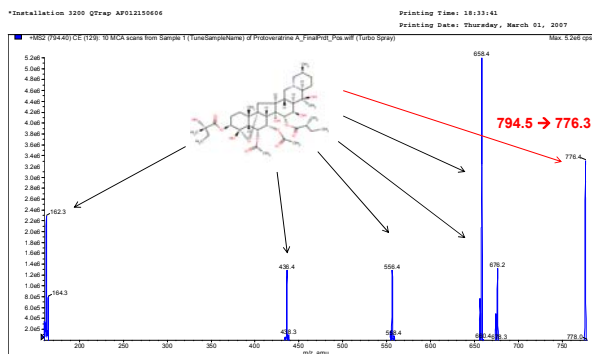


Ion selektieren fragmentieren Fragmentmuster

Fragmentierung von 794.5 m/z



Fragmentierung von Protoveratrin A (Standard)



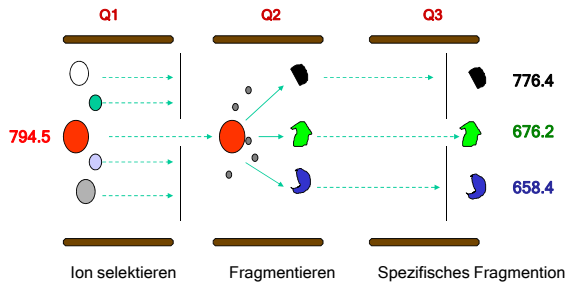
Identische Fragmentierung wie der Standard (Protoveratrin A)

Scan Modes (Triple Quad)



Multiple Reaction Monitoring (MRM)

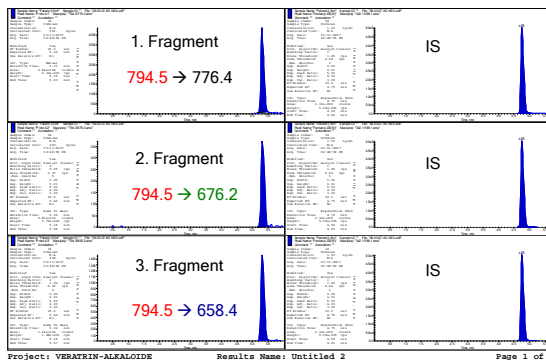
Quantifizierung



Protoveratrin A / Serum



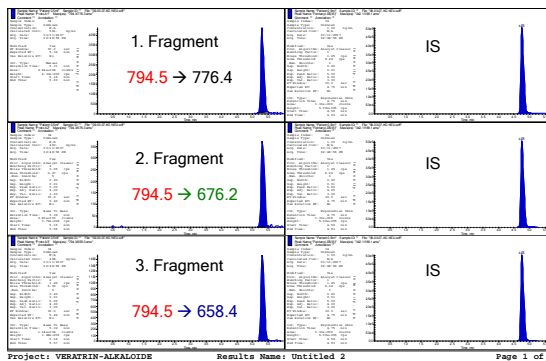
Sample Name: Patient 0, Sm1 Acq. Date: 2007/03/09, ... Acq. Time: 02:00:04 PM, ...



Protoveratrin A / Serum



Sample Name: Patient 0, Sm1 Acq. Date: 2007/03/09, ... Acq. Time: 02:00:04 PM, ...

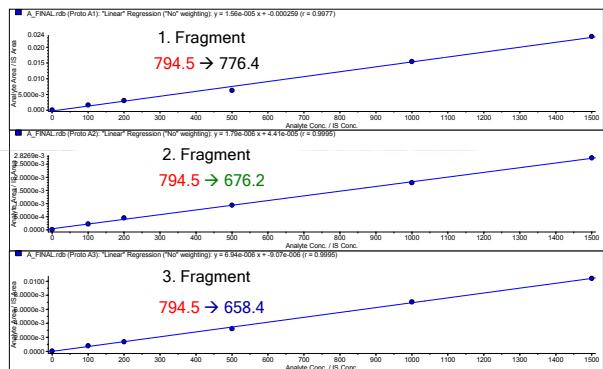


Kalibrierung / Auswertung

Protoveratrin A / Serum



Kalibrierung (pg/mL bzw. ng/L)



Realer Fall

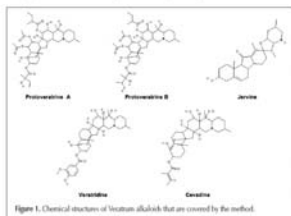


Journal of Analytical Toxicology, Vol. 32, November/December 2008

Accidental Intoxication with *Veratrum album*

T. Grobocsh^{1,*}, T. Binscheck¹, F. Martens², and D. Lampe¹

¹Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben (BBGes), Institute of Toxicology and Poison Information Centre Berlin, Okenburger Str. 285, 13437 Berlin, Germany and ²Charité, University Medical School, Department Nephrology/Intensive Care, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany



Massenanalysatoren

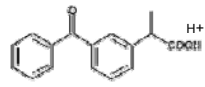
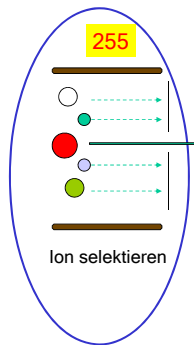


Unterschiede: LC-MS und LC-MS/MS

LC-MS (SIM)



Ketoprofen im Serum

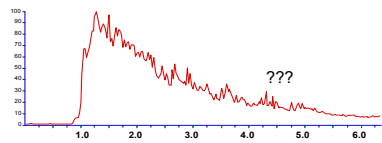
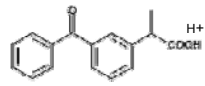


$$m/z = 254.3 + H^+ = 255$$

LC-MS (SIM)



Ketoprofen im Serum

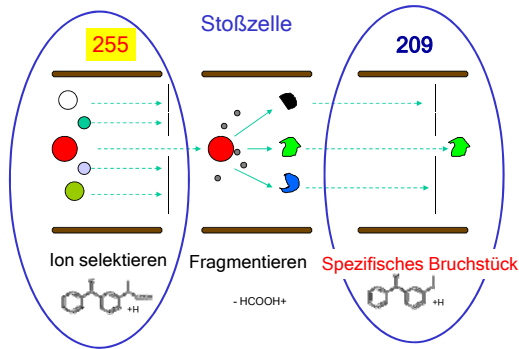


LC-MS
SIM-Modus:
255

LC-MS/MS (MRM)



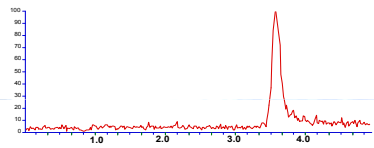
Ketoprofen im Serum



LC-MS/MS (MRM)



Ketoprofen im Serum

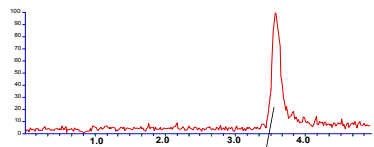


LC-MS/MS
MRM Modus:
255 → 209

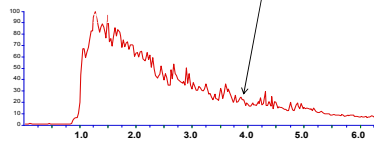
LC-MS – LC-MS/MS



Ketoprofen im Serum



LC-MS/MS
MRM Modus:
255 → 209

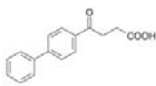


LC-MS
SIM-Modus:
255

LC-MS – LC-MS/MS

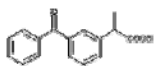


Fenbufen



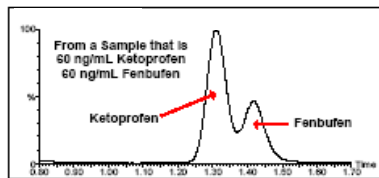
m/z = 255

Ketoprofen



LC-MS

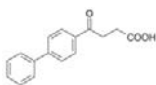
Ion Chromatograms from SIR's of m/z=255



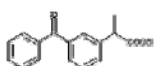
LC-MS – LC-MS/MS



Fenbufen

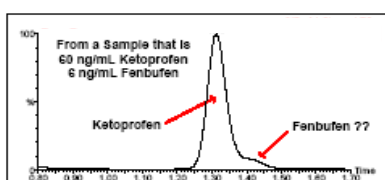
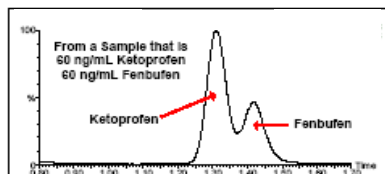


Ketoprofen



LC-MS

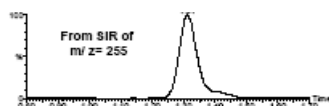
Ion Chromatograms from SIR's of m/z=255



Quantifizierung LC-MS/MS



LC-MS/MS

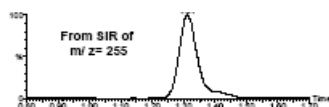


Ion Chromatograms from SIR and MRM Analyses of a Sample that is 60 ng/mL Ketoprofen 6 ng/mL Fenbufen

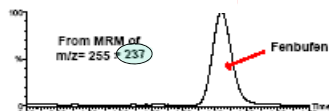
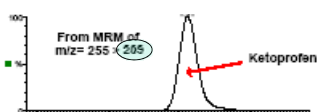
Quantifizierung LC-MS/MS



LC-MS/MS



Ion Chromatograms from SIR and MRM Analyses of a Sample that is 60 ng/mL Ketoprofen 6 ng/mL Fenbufen

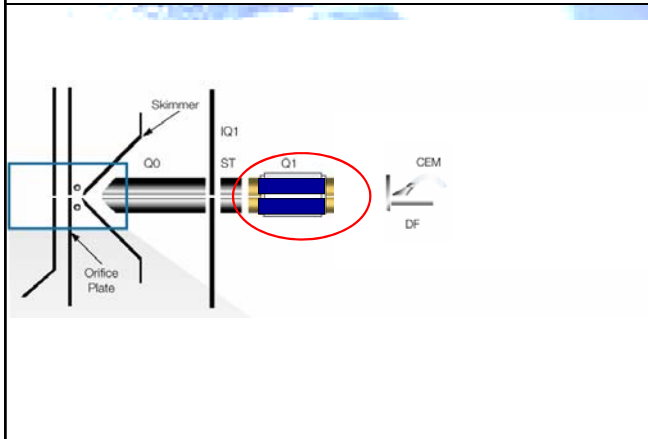


Massenanalysatoren

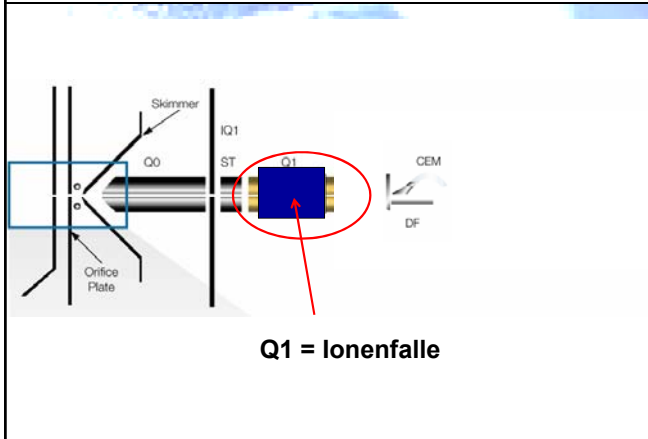


Ionenfalle

Weitere Massenanalysatoren

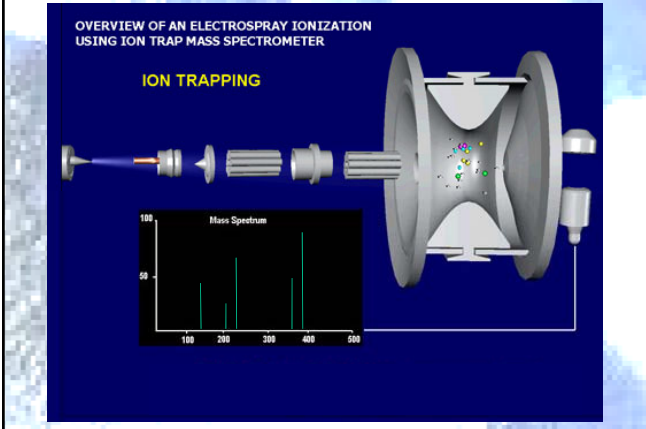


Weitere Massenanalysatoren

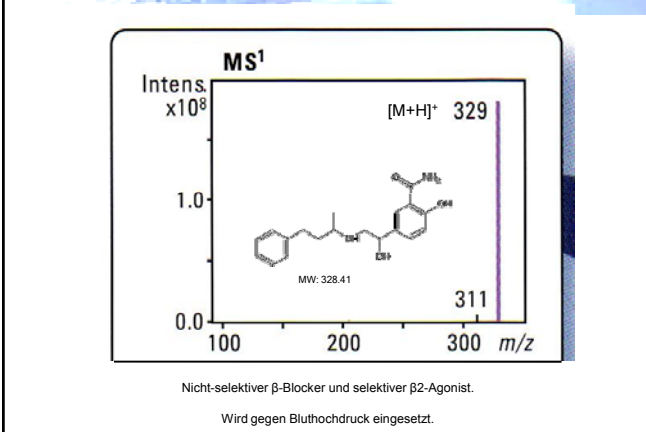


Q1 = Ionenfalle

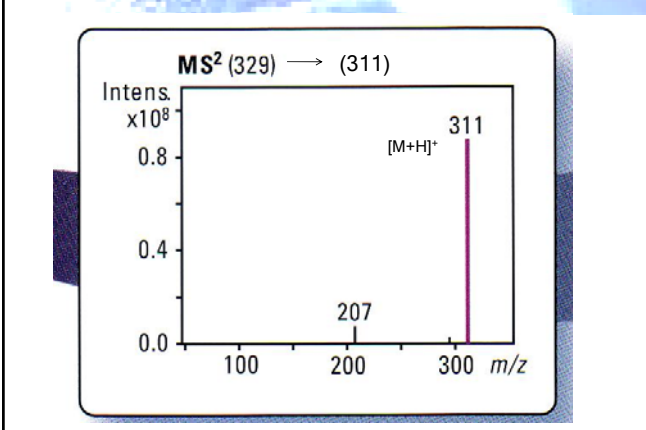
Massenanalysatoren - Ionenfalle



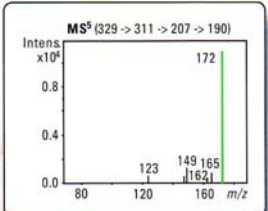
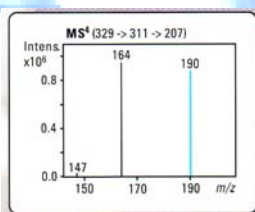
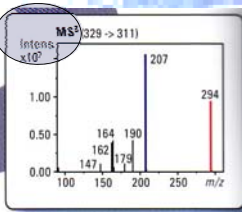
Labetalol: MSⁿ



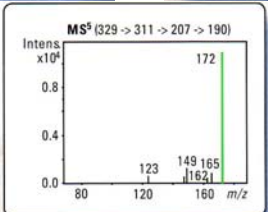
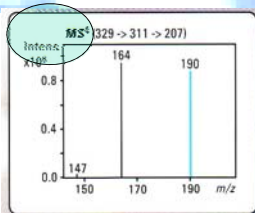
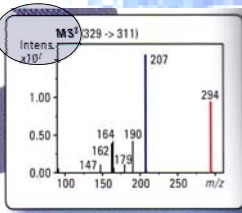
Labetalol: MSⁿ



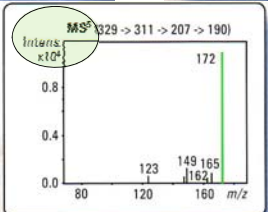
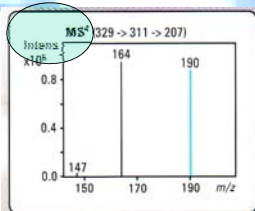
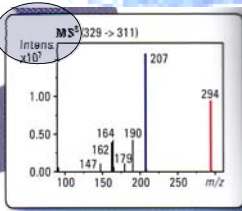
Labetalol: MSⁿ



Labetalol: MSⁿ



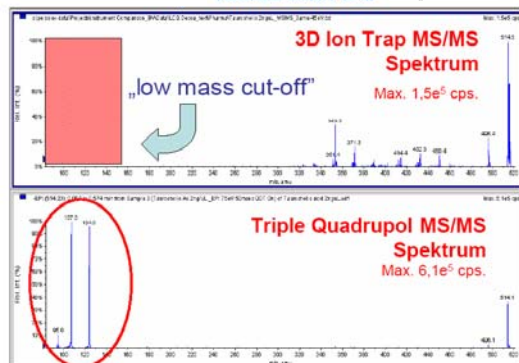
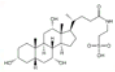
Labetalol: MSⁿ



Fragmentierungseffizienz



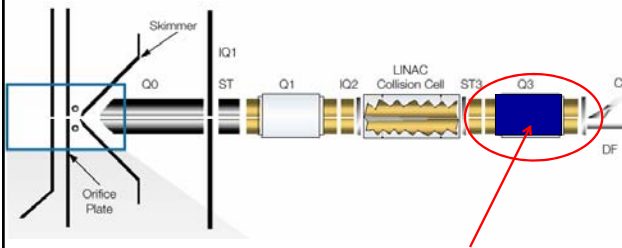
Gallensäure / Taurocholic Acid



Massenanalytoren – Lineare Ionenfalle

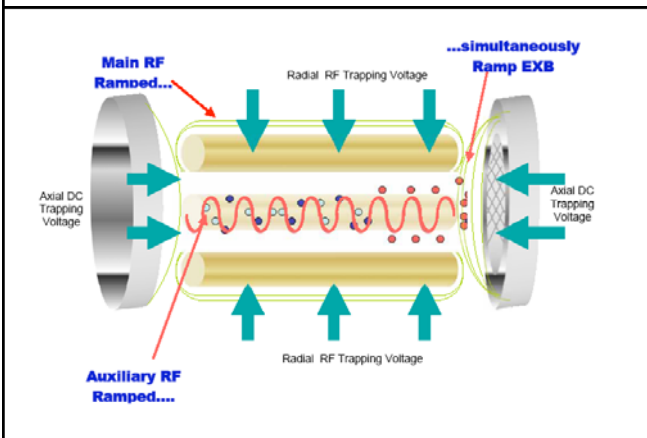


Linear Ion Trap (LIT) Technology

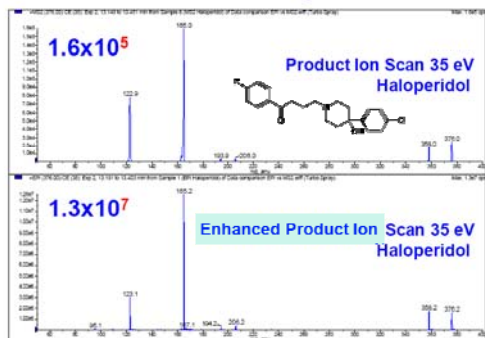


Q3 = Linear Ion Trap
= QTRAP

Massenanalytoren – Lineare Ionenfalle



Enhanced Produkt Ionen Scan (EPI)

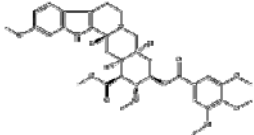
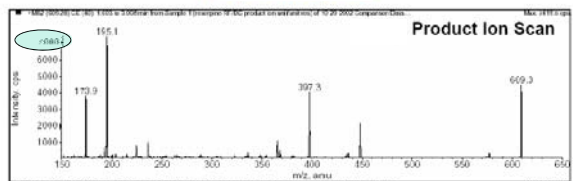


80 x empfindlicher in EPI

Beispiele



Reserpin



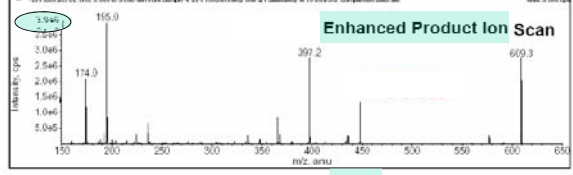
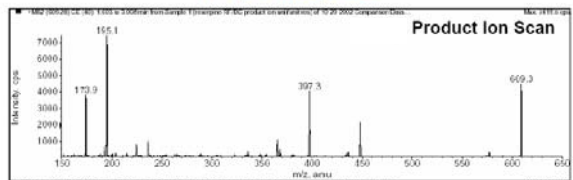
Reserpin = Indolalkaloid einiger Hundsgiftgewächse der Gattung Rauwolfia (Mittel gegen Bluthochdruck)

Indische Schlangenzwurz (Wahnsinnkraut) (Java-Teufelspfeffer)

Beispiele



Reserpin



> 500 x empfindlicher in EPI

BBGes
Berlin

Screening mittels QTRAP (EPI)

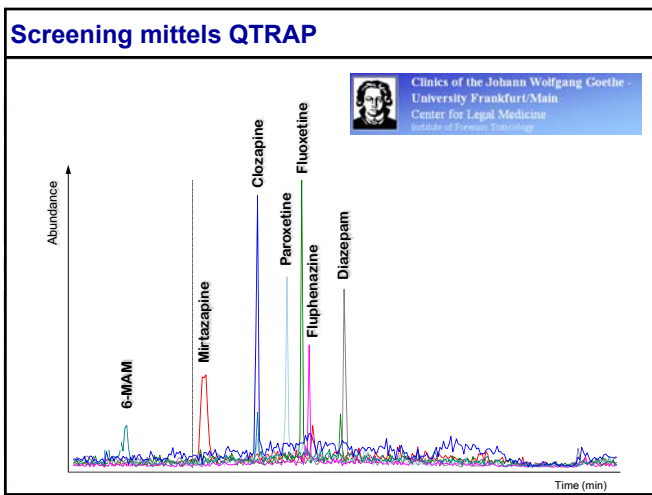
Screening mittels QTRAP

W. Weinmann
Freiburg

QTRAP

300 MRMs in 3 sec

empfindlicher Product Ion Scan
Identifizierung mit Bibliothekssuche



Screening mittels QTRAP



ELSEVIER Journal of Chromatography B, 789 (2001) 9–14 www.elsevier.com/locate/jchromb

Literatur:

Comparison of a preliminary procedure for the general unknown screening of drugs and toxic compounds using a quadrupole-linear ion-trap mass spectrometer with a liquid chromatography–mass spectrometry reference technique

P. Marquet^{a,*}, F. Saint-Marcoux^a, T.N. Gamble^b, J.C.Y. LeBlanc^b

^aDepartment of Pharmacology and Toxicology, Université Hospital, Limoges, France
^bApplied Bioscience/MSD, St. Catharines, Ontario, Canada

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY
Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15, 1332–1336
 Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/rcm.1194

RCM

Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching

C. A. Mueller^{1,4*}, W. Weinmann¹, S. Dresen¹, A. Schreiber² and M. Gergov³

¹Institute of Legal Medicine, University Hospital, Freiburg, Germany
²Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
³University of Helsinki, Department of Forensic Medicine, Finland
⁴Institute of Legal Medicine, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

Received 19 January 2005; Revised 18 March 2005; Accepted 20 March 2005

Massenanalytoren




TOF
 (Time-of-Flight / Flugzeit-Massenspektrometer)

Massenanalytoren - TOF



Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS)

Im Flugzeit-Massenspektrometer wird ausgenutzt, dass die Ionen beim Eintritt in den Analysator alle die gleiche Energie haben und **leichte Ionen** deshalb **schneller** sind als schwere.

$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{L^2}$$

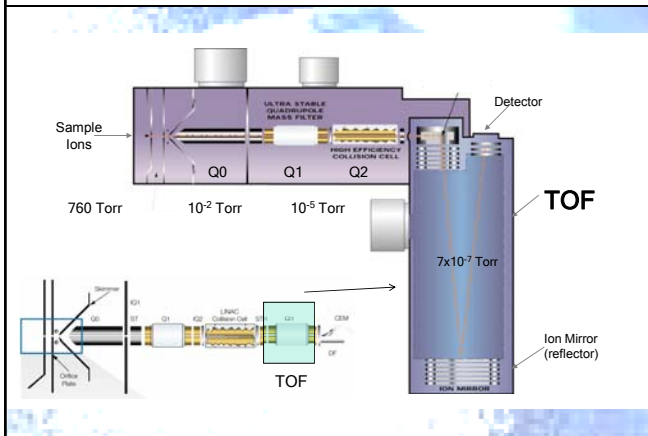
Daher erreichen leichte Ionen den Detektor eher als schwere Ionen.

*m = mass of ion L = drift tube length
 z = charge of ion t = time of travel
 V = voltage*

In der Praxis haben sich **Geräte mit Ionenspiegeln** bewährt, bei denen die Flugstrecke durch ein zusätzliches elektrisches Feld am Ende der ursprünglichen Flugrichtung verdoppelt wird.

Zusätzlich erreicht man durch diese Technik **eine weitere Fokussierung**, die die Varianz in der Geschwindigkeit der Ionen minimiert.

Massenanalysatoren - TOF



Relative, Exakte und Nominelle Masse



Beispiel: $C_{33}H_{40}N_2O_9$ (Reserpin)

Relative Molekülmasse

Mittelwert der exakten Massen der natürlich auftretenden Isotope gewichtet nach ihrem prozentualen Anteil: z.B.: C = 12,0107, ... : **608,687 Da**

$$\text{Atomgewicht (C)} = 0,9889 \times ({}^{12}\text{C}: 12,0000) + 0,0111 \times ({}^{13}\text{C}: 13,0033) = 12,01070$$

Exakte Molekülmasse

Exakte Masse eines Moleküls (entsprechend der Zusammensetzung) bezogen auf die Massen der häufigsten Isotope der im Molekül vorhandenen Elemente d.h. isotoopenrein (C = 12,00000, H = 1,00783, O = 15,99492 : **608,272 Da**

Die Nominelle Molekülmasse

Wird aus der gerundeten Masse der Nukleonen (Massenzahl) berechnet (z.B.: C = 12, H = 1, O = 16): **608 Da**

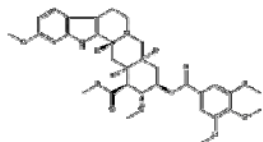
Welche Masse wird in praxi verwendet ?

Das hängt von der Auflösung der MS und der Masse des Moleküls ab – Meistens wird für kleine Moleküle die **Exakte Masse** verwendet.

Massenberechnung



Berechnung der Molmasse von Reserpin, $C_{33}H_{40}N_2O_9$



Relative Masse:

$$\text{C: } 33 \times 12,0107 = 396,363$$

$$\text{H: } 40 \times 1,00794 = 40,316$$

$$\text{N: } 2 \times 14,00670 = 28,013$$

$$\text{O: } 9 \times 15,99940 = 143,995$$

608.687

Exakte Masse:

$$\text{C: } 33 \times 12,0000 = 396,000$$

$$\text{H: } 40 \times 1,0078 = 40,312$$

$$\text{N: } 2 \times 14,00310 = 28,006$$

$$\text{O: } 9 \times 15,99492 = 143,954$$

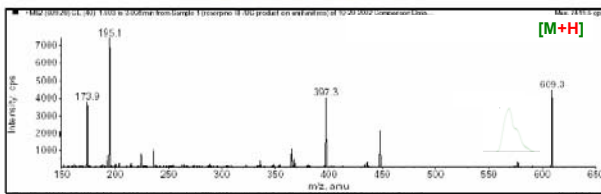
608.272

<http://www.daniel-pfeilsticker.de/chemie/massen/index-isotope.html>

Beispiel



Reserpin (LC-MS/MS: Q1)

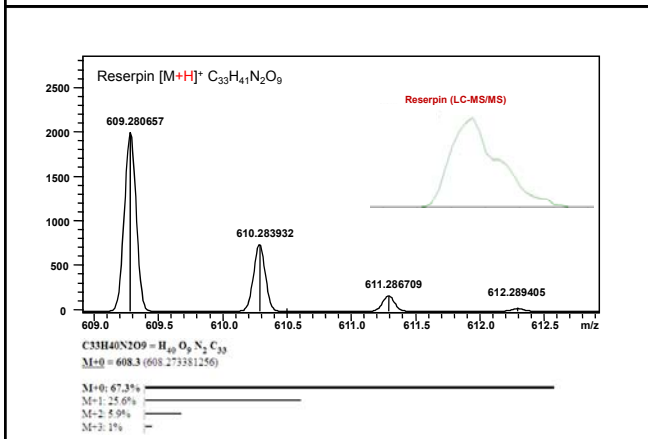


Exakte Masse

Die exakte Masse ist die Masse eines Moleküls, das nur aus den häufigsten Isotopen zusammengesetzt ist.

Das resultierende Signal wird auch monoisotopischer Peak genannt.

Simuliertes Spektrum von Reserpin



Auflösung



Die Fähigkeit eines MS-Gerätes zwischen zwei m/z Werten zu unterscheiden.

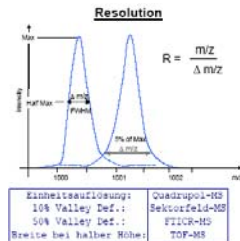
$$A = m/\Delta m \quad (\text{engl.: } R = \text{Resolution})$$

Δm ist hierbei die Massendifferenz zwischen zwei benachbarten Peaks, die aufgelöst sind

m ist die Masse des ersten Peaks (oder die mittlere Masse zweier Peaks)

Beispiel: $A = 5000$

Separierung möglich:	m/z 50.000 und m/z 50.010 m/z 100.000 und m/z 100.020 m/z 5000.000 und m/z 5001
Einheitsauflösung:	m/z 50 und m/z 51 m/z 100 und m/z 101 m/z 1000 und m/z 1001



Relative Abweichung bzw. Fehler der Messung
 $\text{ppm} = 1 \cdot 10^6 (\text{gemessene Masse} - \text{exakte Masse}) / \text{exakte Masse}$

High Resolution Mass Spectral Database



MassBank.jp
High Resolution Mass Spectral Database
Contact | Copyright | Use Restrictions | Documents | Download | Home

Total number of spectra: 13,636

Contributor	Analysis Method	Machine Vendor/Type	Number of Spectra	Number of Compounds
IAB, Keio Univ.	ESI-QqTOF-MS	Applied Biosystems QSTAR XL	4510	695
	ESI-QqQ-MS	Applied Biosystems API3000	4275	
	ESI-IT-MS	Agilent Technologies LC/MSD Trap XCT	516	
RIKEN PSIC	GC-EI-TOF-MS	Leico Pegasus III TOF-MS system	241	341
	LC-ESI-TOF-MS	Waters UPLC Q-ToF Premier	65	
	LC-ESI-QqQ-MS	Waters Quattro Ultima P1 micro mass	97	
	CE-ESI-TOF-MS	Agilent CE-system connected to 6210 Time-of-Flight MS	20	
	LC-ESI-QTOF-MS	Waters UPLC Q-ToF Premier	251	
Nihon Waters K.K.	LC-ESI-Q-MS	Waters ZQ	2741	577
	ESI-QqQ-MS	Waters QuattroPremier XE	273	
Kyoto Univ.	FAB-MS/MS	JEDL JMS-ACUKA T10A	106	106
Univ. of Tokyo	ESI-QqT-MS	Applied Biosystems 4000Q TRAP	378	42
Kanasa DNA Inst.	GC-EI-TOF-MS	Leico Pegasus III TOF-MS system	91	90
Falton Univ.	GC-EI-MS	Hitachi type M-80B double focusing mass spectrometer	35	35
University of Toyama	LC-ESI-IT-TOF-MS	Shimadzu LC204IT-TOFMS	37	21
Leibniz IPB			to appear soon	
Tsukuba Univ.			to appear soon	
Fukushima Univ.			to appear soon	



High Resolution Mass Spectral Database



MassBank.jp
High Resolution Mass Spectral Database
Contact | Copyright | Use Restrictions | Documents | Download | Home

Quick Search Page

[Home](#) | [Search](#) | [Browse](#) | [Peak](#) | [Quick](#) | [Substructure](#) | [Browse](#) | [Batch](#) | [Record List](#) | MassBank Record No:

Search by Keyword Search by Peak

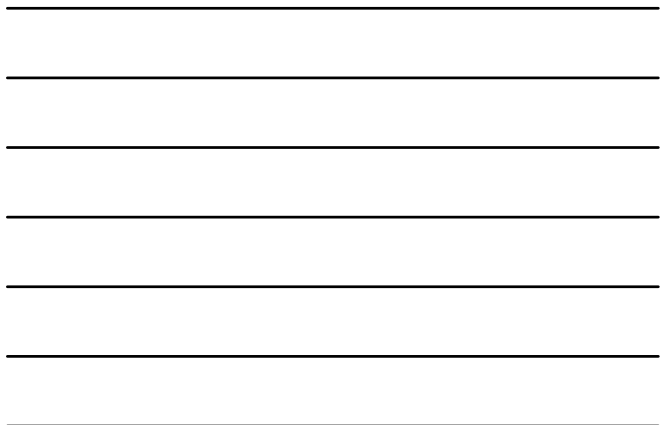
Compound Name:

Exact Mass of Compound: Tolerance of Exact Mass (unit):

Formula (e.g. C8H7N5, C5H11N5, C5⁺):

Instrument Type
 All CE-ESI-TOF-MS EI-MS
 ESI-IT-MS ESI-QqT-MS ESI-QqQ-MS
 ESI-QqTOF-MS FAB-MS/MS GC-EI-TOF-MS
 LC-ESI-IT-TOF-MS LC-ESI-Q-MS LC-ESI-QTOF-MS
 LC-ESI-QqQ-MS LC-ESI-TOF-MS

Ionization Mode Both Positive Negative



High Resolution Mass Spectral Database



MassBank.jp
High Resolution Mass Spectral Database
Contact | Copyright | Use Restrictions | Documents | Download | Home

Quick Search Results

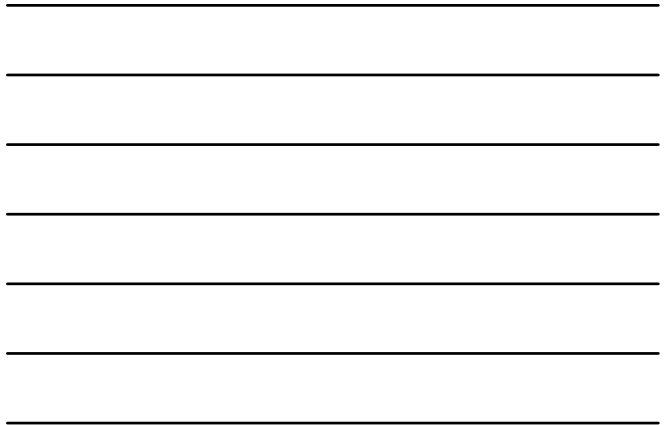
[Home](#) | [Search](#) | [Browse](#) | [Peak](#) | [Quick](#) | [Substructure](#) | [Browse](#) | [Batch](#) | [Record List](#) | MassBank Record No:

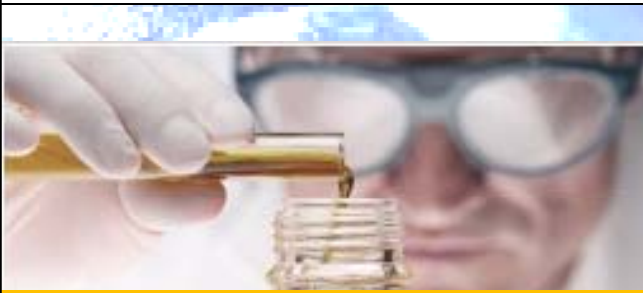
Search Parameters:
 Exact Mass of Compound: **149.07015** (Tolerance: 0.3)
 Instrument Type: All
 Ionization Mode: Both [Parameter Resetting](#)

Results: 102 Hit. (1 - 102 displayed)

First Prev f Next Last (Total 1 Page) [Results End](#)

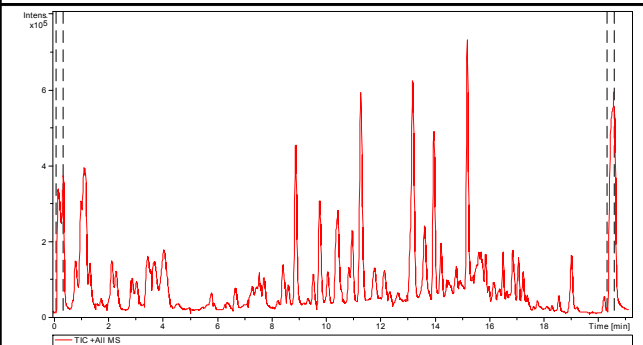
<input type="checkbox"/>	Name	Formula / Structure	ExactMass	ID
<input type="checkbox"/>	1-Methyladenine	C8H7N5 [SMILES]	149.07015	
<input type="checkbox"/>	2,6-Diethylamine	C10H15N [SMILES]	149.12045	
<input type="checkbox"/>	3-Methyladenine	C8H7N5 [SMILES]	149.07015	
<input type="checkbox"/>	4-Methylaminopurine	C8H7N5 [SMILES]	149.07015	
<input type="checkbox"/>	D-(+)-Penicillamine	C8H11NO2S [SMILES]	149.05105	
<input type="checkbox"/>	L-Methionine	C8H11NO2S [SMILES]	149.05100	
<input type="checkbox"/>	Met	C8H11NO2S [SMILES]	149.05105	
<input type="checkbox"/>	Methamphetamine	C10H15N [SMILES]	149.12045	
<input type="checkbox"/>	Triethanolamine	C8H19NO3 [SMILES]	149.10519	
<input type="checkbox"/>	threo-β-Hydroxyaspartate	C4H7NO5 [SMILES]	149.03242	





Urinscreening mittels LC-MS TOF

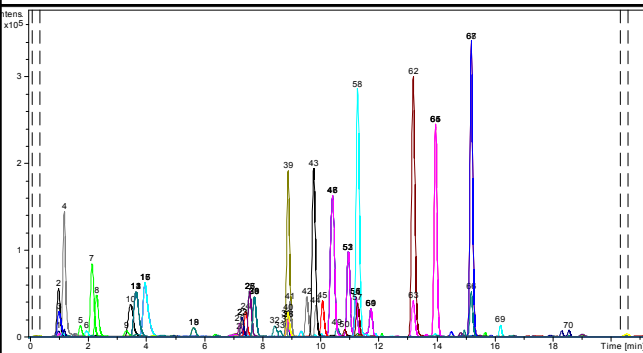
Total Ionenchromatogramm (TIC)



Urine Probe Nr.: 994/2007

Anna Pelander, University of Helsinki

Extrahiertes Ionenchromatogramm



Urine Probe Nr.: 994/2007

Anna Pelander, University of Helsinki

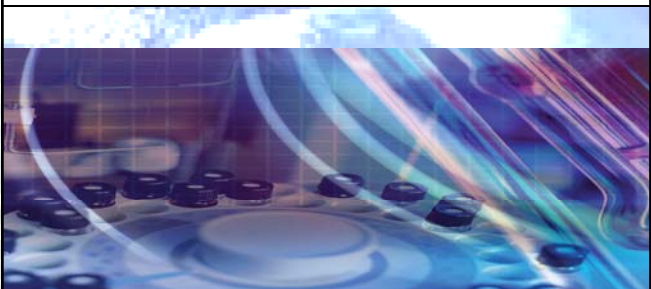
Ergebnisse

H:\Johanna\300307\044 vi_12_01_3875.d\TargetScreeningDetect.MF Results

Found	Compound Name	Reg.No.	Mol Formula	Publ	d RT (min)	Err (ppm)	Err (µg/L)
3	OXAZEPAM	195	C16H17ClN2O2	[MHT+]	0.00	1.6	0.5
3	TEMAZEPAM	1343	C16H17ClN2O2	[MHT+]	0.00	2.4	0.7
3	CARBAMAZEPINE	1541	C15H12N2O1	[MHT+]	0.00	2.9	0.7
1	CARBAMAZEPINE-10-11-EPOXIDE	1542	C15H12N2O2	[MHT+]	-6.90	0.8	0.2
1	CARBAMAZEPINE-10-11-EPOXIDE	1542	C15H12N2O2	[MHT+]	-10.40	2.3	0.6
1	CARBAMAZEPINE-10-11-EPOXIDE	1542	C15H12N2O2	[MHT+]	-10.90	1.4	0.4
1	CARBAMAZEPINE-10-11-EPOXIDE	1542	C15H12N2O2	[MHT+]	-11.70	0.7	-0.2
1	10-11-DIHYDROXYCARBAMAZEPINE	1543	C15H14N2O3	[MHT+]	-6.90	1.3	0.4
1	IMINOSTILBENE	1544	C14H11N1	[MHT+]	-7.30	1.1	0.2
2	CLOBAZAM	3831	C16H13ClN2O2	[MHT+]	0.00	2.4	0.7
1	NORCLOBAZAM	3832	C15H11ClN2O2	[MHT+]	-13.90	1.9	0.5
2	COTININE	4932	C10H12N2O1	[MHT+]	0.10	2.2	-0.4
1	HYDROXYCOTININE	4933	C10H12N2O2	[MHT+]	-1.00	2.1	-0.4
3	PARACETAMOL	5022	C8H9N1O2	[MHT+]	0.00	4.7	-0.9
1	PHENYLETHYLAMMONIUM	5742	C11H14N2O2	[MHT+]	-2.00	1.4	-0.3
1	4-HYDROXYALPRENOLOL	7632	C15H23N1O3	[MHT+]	-5.60	0.6	0.2
1	NORALPRENOLOL	7633	C14H21N1O2	[MHT+]	-4.00	0.6	0.2
3	TRAMONTRAZEPAM	7852	C16H19N3O1	[MHT+]	0.00	0.3	-0.1
1	7-ACETAMIDONITRAZEPAM	7853	C17H19N3O2	[MHT+]	-7.40	0.3	0.1
3	TRAMADOL	8861	C16H25N1O2	[MHT+]	0.00	0.5	0.1
3	O-DESMETHYLTRAMADOL	8862	C15H23N1O2	[MHT+]	0.00	0.3	0.1
3	NORTRAMADOL	8863	C15H23N1O2	[MHT+]	0.00	0.2	0.1
3	O-DESMETHYLNORTRAMADOL	8864	C14H21N1O2	[MHT+]	0.00	0.6	0.2
1	NORMEPAZEPAM	9466	C15H13ClN2	[MHT+]	-10.60	0.6	0.1
1	DINORVENLAFAXINE	9644	C15H23N1O2	[MHT+]	-3.70	0.3	0.1
1	DINORVENLAFAXINE	9644	C15H23N1O2	[MHT+]	-7.70	0.2	0.1
3	WARFARIN	11121	C19H16O4	[MHT+]	0.00	0.9	0.3
2	OXCARBAZEPINE	15321	C15H12N2O2	[MHT+]	-0.20	0.7	-0.2
3	LEVETIRACETAM	16321	C8H14N2O2	[MHT+]	0.00	2.5	-0.4
3	DIBENZEPIN	99999	C18H21N3O1	[MHT+]	0.00	0.9	0.3
3	BISOPROLOL	99999	C18H31N1O4	[MHT+]	0.00	2.9	0.9

Results report for sample 904/2007 - Anna Palander, University of Helsinki

Massenanalysatoren

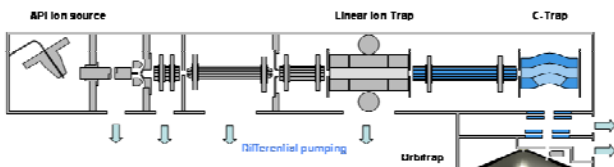


TOF (Orbitrap)

Orbitrap Funktionsprinzip

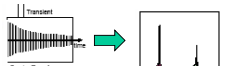


1. Ionen werden in der linearen Falle gespeichert
2. werden axial ausgeworfen
3. werden in der C-trap gespeichert
4. werden komprimiert und in die Orbitrap transferiert



Diese oszillierenden Ionen induzieren in den zwei Schalen der Falle einen Strom, der mit Hilfe eines Verstärkers aufgezeichnet werden kann

Ionen einer Masse erzeugen ein sinusförmiges Signal

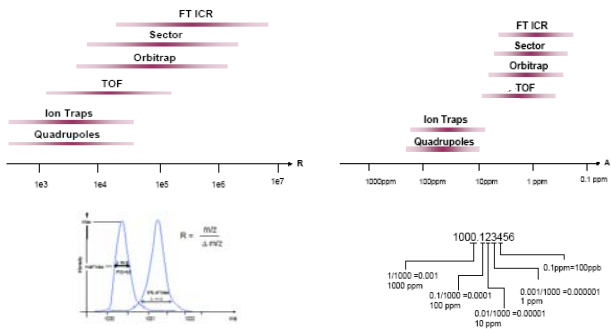


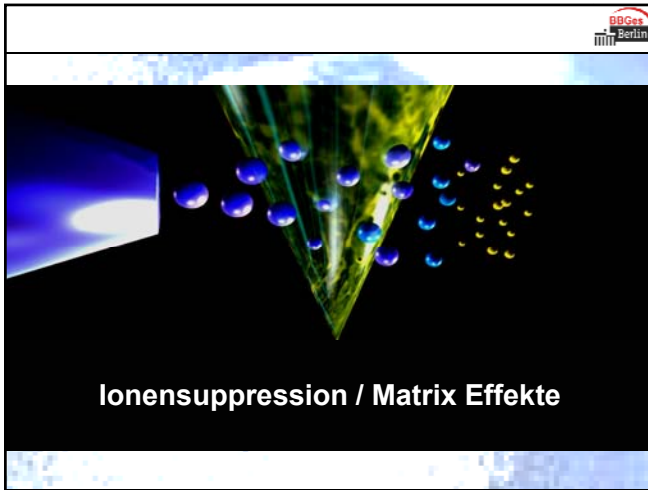
Auflösung / Genauigkeit



Auflösung (A)

Relative Abweichung bzw. Fehler der Messung





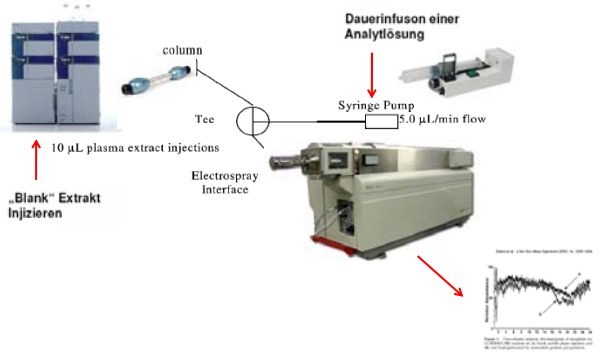
Ionensuppression / Matrix Effekte



Ionensuppression



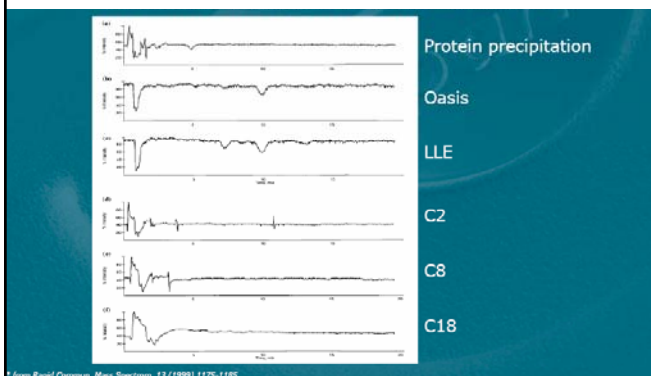
Post-column Infusion



Ionensuppression



Chromatogramme / Post Infusion Experimente / Plasma*



* from Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 1175-1185

Einsatzgebiete der MS im TDM



C (Analyt) mg/L	Massenanalysator	Beispiele
1 – 100	Single Quad (LC-MS)	Antiepileptika- Gabapentin, Vigabatrin, ... Virustatika- Aciclovir, Ganciclovir Antidiabetikum- Metformin
0,01 – 1	Single Quad (LC-MS) Triple Quad (LC-MS-MS)	Neuroleptika- Clozapin, Perazin, ... Antidepressiva- Amitriptylin, Doxepin, ... Antibiotika- Rifampicin
< 0,01 – 0,1	Triple Quad (LC-MS-MS)	Immunsuppressiva Sirolimus (SRL), TAC, EVE, Ciclosporin Neuroleptika- Fluphenazin

Einsatzgebiete der MS in der Toxikologie



Massenanalysator	Beispiele
Single Quad (LC-MS)	Antidiabetikum Metformin
Triple Quad (LC-MS-MS)	Ampfetamine Ampfetamin, Metamfetamin, MDMA, ... Antidiabetika Glibenclamid, Glipizid, ..., Metformin
	HTD- Analytik Fentanyl, Flunitrazepam, ... Halluzinogene- LSD Opioide Tiudin, ... Pflanzengifte Colchicin, Atropin, Scopolamin, Veratrum-Alkaloide (Pro A, B) Vitamin-K Antagonisten (inkl. Rattengifte) Cumatepralyl, Brodifacoum, ...

Vorteile der LC-MS und MS/MS in der Toxikologie



Vorteile	Nachteile
Etablierte Analysemethode	Anschaffungspreis (> 100 000 Euro)
Wenig Probevolumen nötig	Kompressor / Stickstoffgenerator
Keine Derivatisierung	Lärm durch Generatoren / MS - Vakuumpumpe
Für temperaturlabile Substanzen	
Schnelle Methodenentwicklung	
Multikomponentenanalyse	
Schnelle Analysen (< 5 - 10 min)	Ionensuppression
Empfindlich, selektiv	Tageskalibration erforderlich
Strukturaufklärung möglich	
Qualitatives Screening mittels LC-MS/MS (Blut / Urin: Multitarget Screening > 300 Substanzen)	Quantitatives Screening
Qualitatives Screening mittels LC-TOF (Blut in Arbeit / Urin)	Quantitatives Screening

Quellen



- Applied Biosystems
- Shimadzu
- ThermoFisher Scientific
- Varian
- Waters
- W. Weinmann (Freiburg)
- ... Internet
