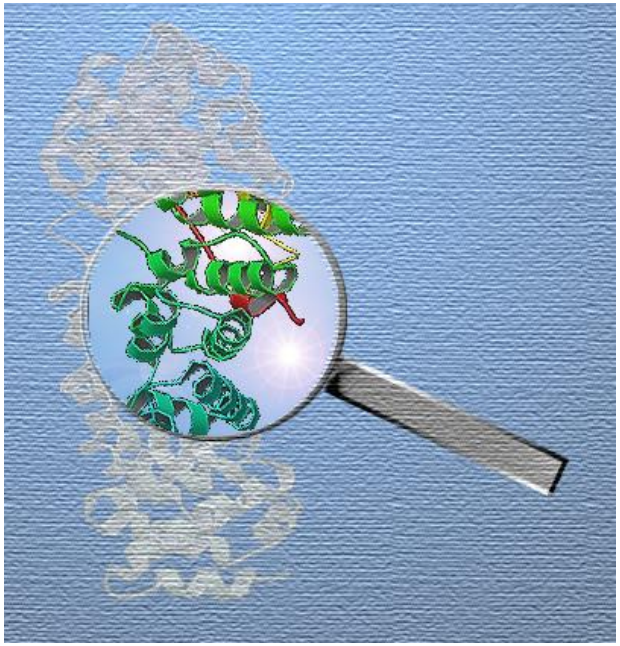
Massenspektrometrie II

Arnd Ingendoh

Teil 3 – Analysatoren: Quadrupole und Ionenfallen

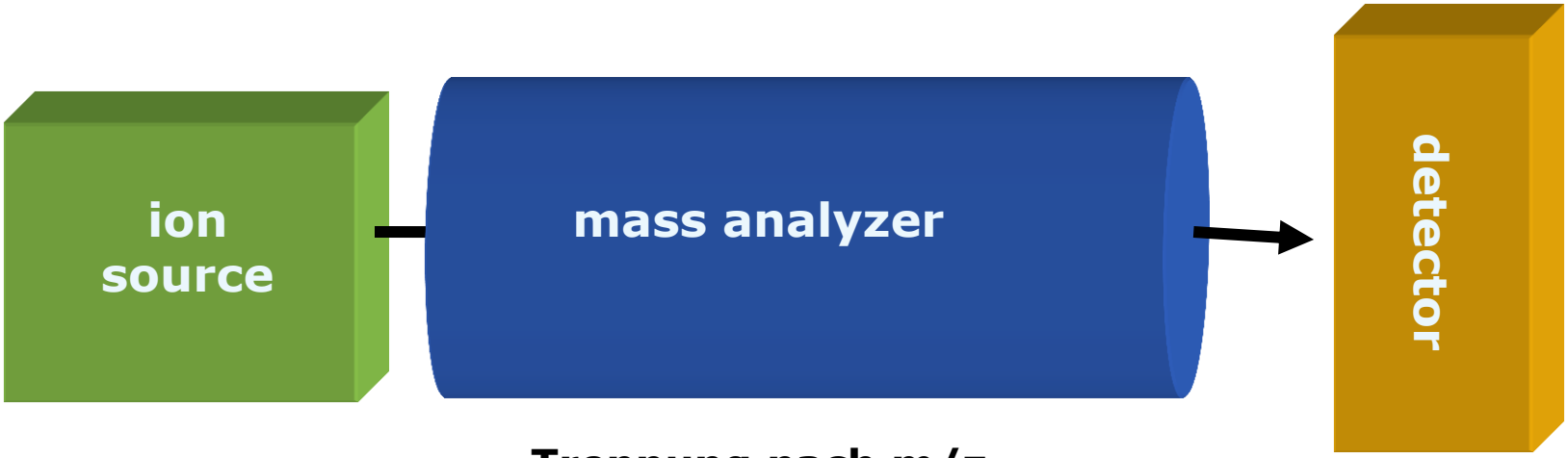


Analysatoren

- Übersicht
- **Quadrupole und Ionenfallen**
- Flugzeitanalysatoren und QTOF Hybride
- Ion Mobility Spectrometry

- Hochauflösende MS: Orbitrap und FTMS
- Abgrenzung der Verfahren

Grundschema eines Massenspektrometers



Moleküle werden ionisiert, um sie analysieren zu können

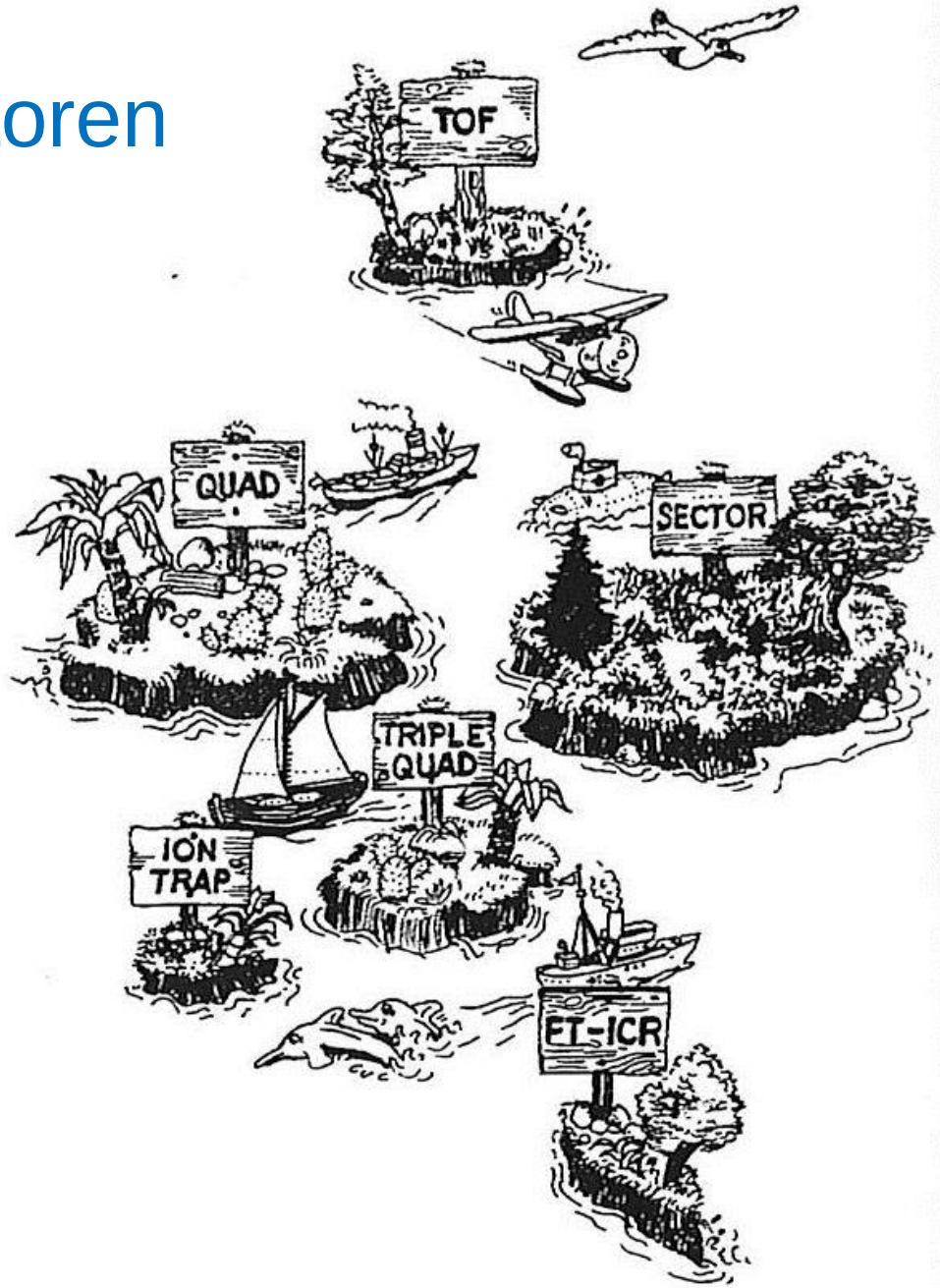
Trennung nach m/z Verhältnis

- Quadrupol
- Time-of-flight (TOF)
- ion trap
- Orbitrap
- Fourier transformation ion cyclotron resonance (FTMS)

Nachweis der Ionen

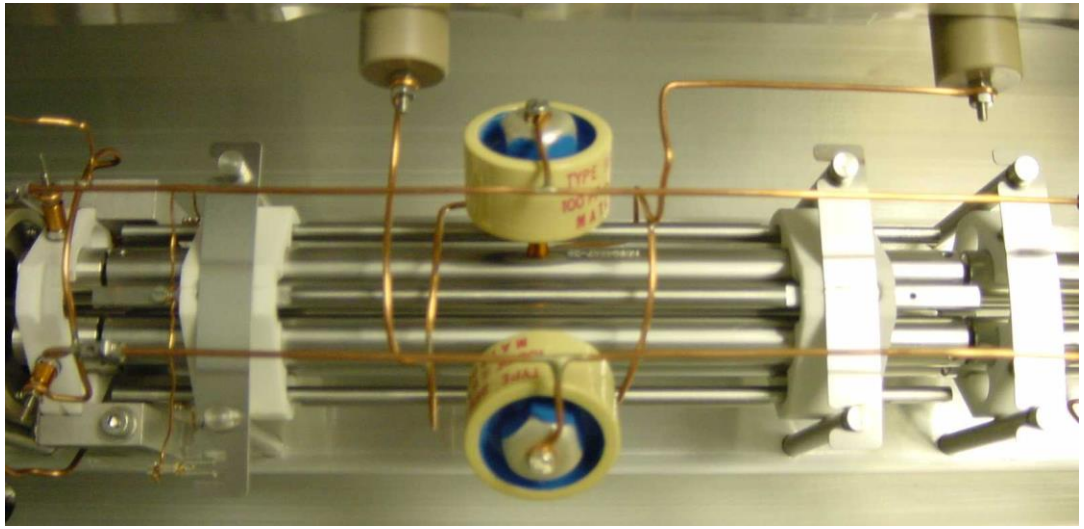
- multichannel plate
- conversion dynode/ electron multiplier

MS-Analysatoren



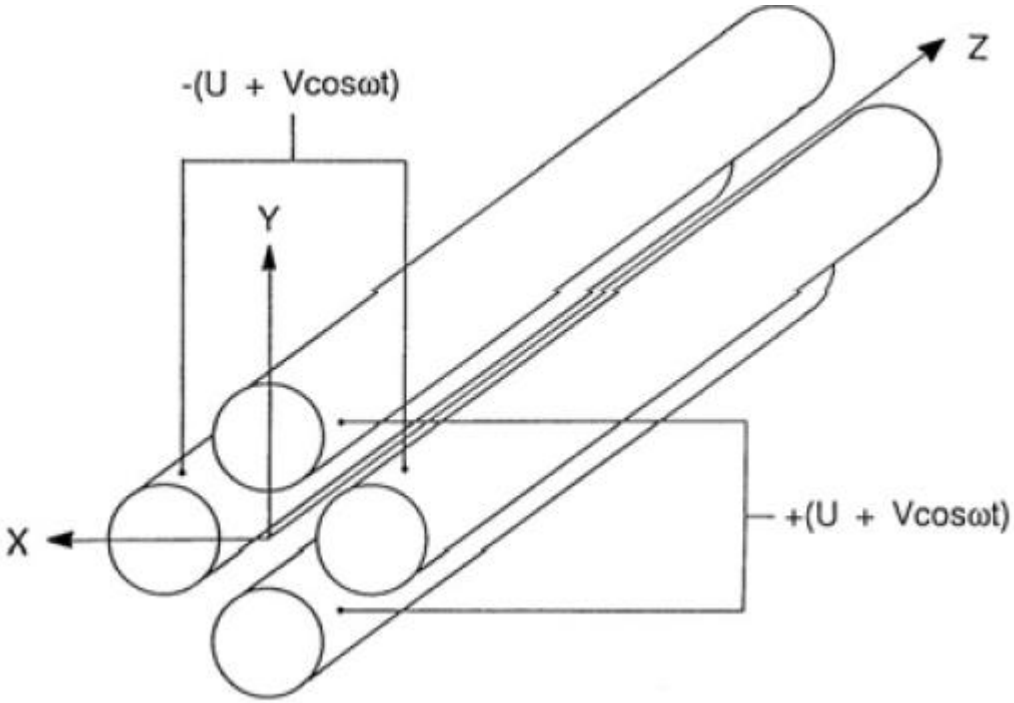
Quelle: Curt Brunnee, Finnigan MAT, 1985

3a. Quadrupol Massenanalysator



- **First described by Wolfgang Paul and Hans-Georg Steinwedel (1953)**
- **Nobel prize in physics 1989 (Paul trap)**

Theorie des Quadrupol-Massenseparators

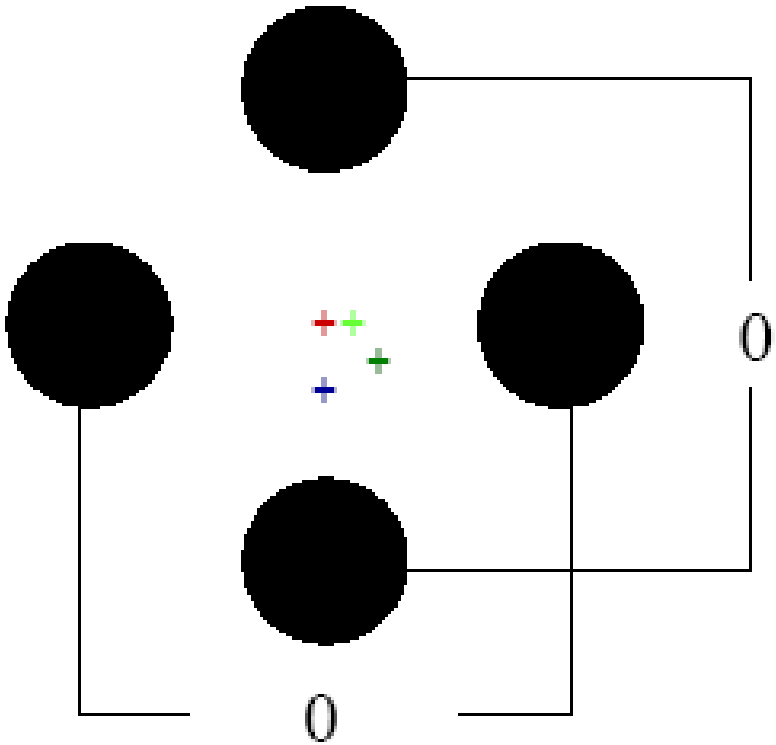


- **Vier hyperbolische oder zylindrische Elektroden, zu Stäben ausgezogen**
- **Die jeweils sich gegenüberliegenden Stäbe werden auf demselben elektrischen Potential gehalten (mit einem Gleich- (U) und einem Wechselspannungsanteil V)**

J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

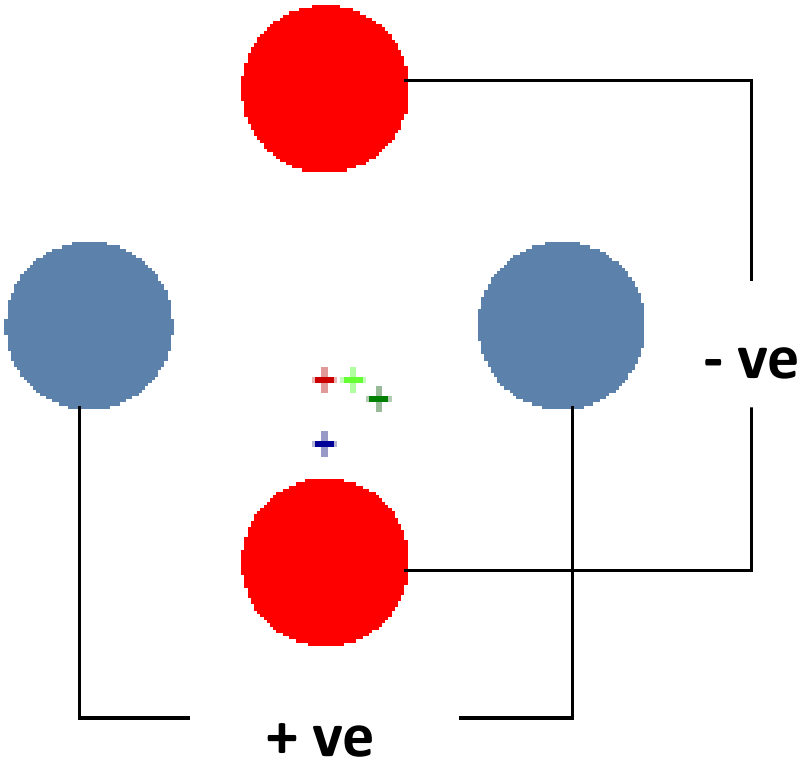
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



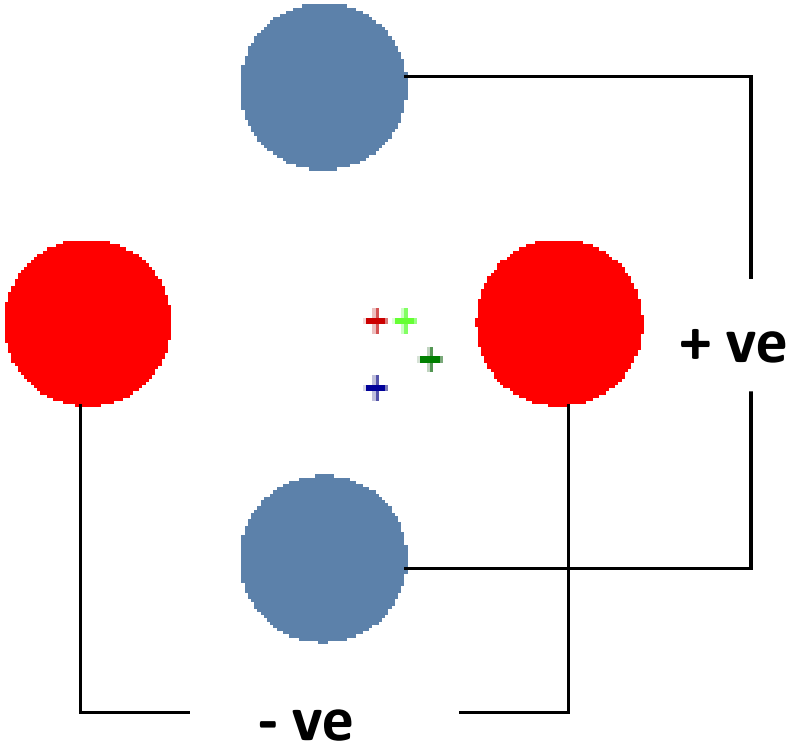
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



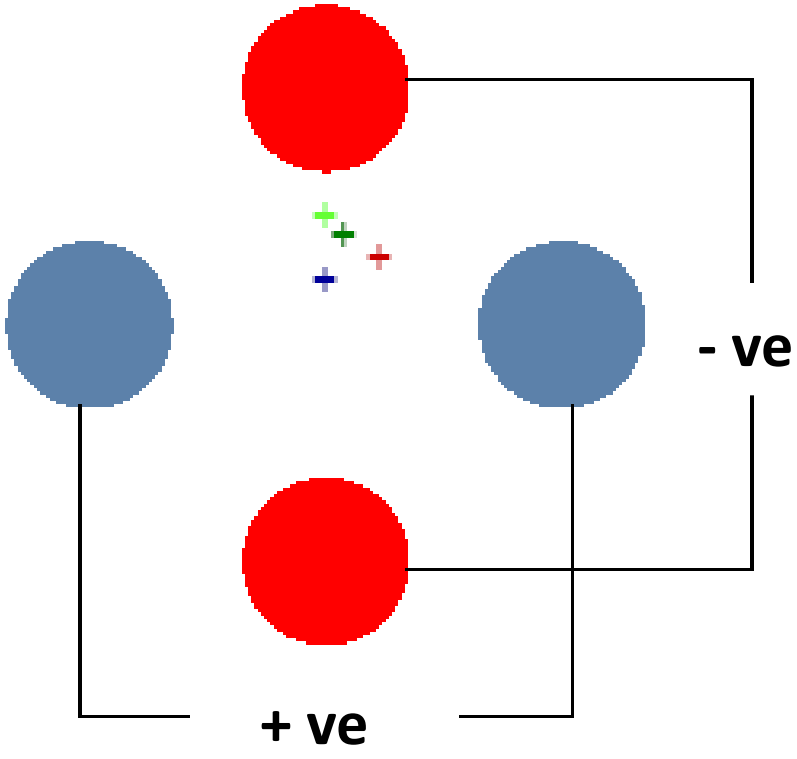
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



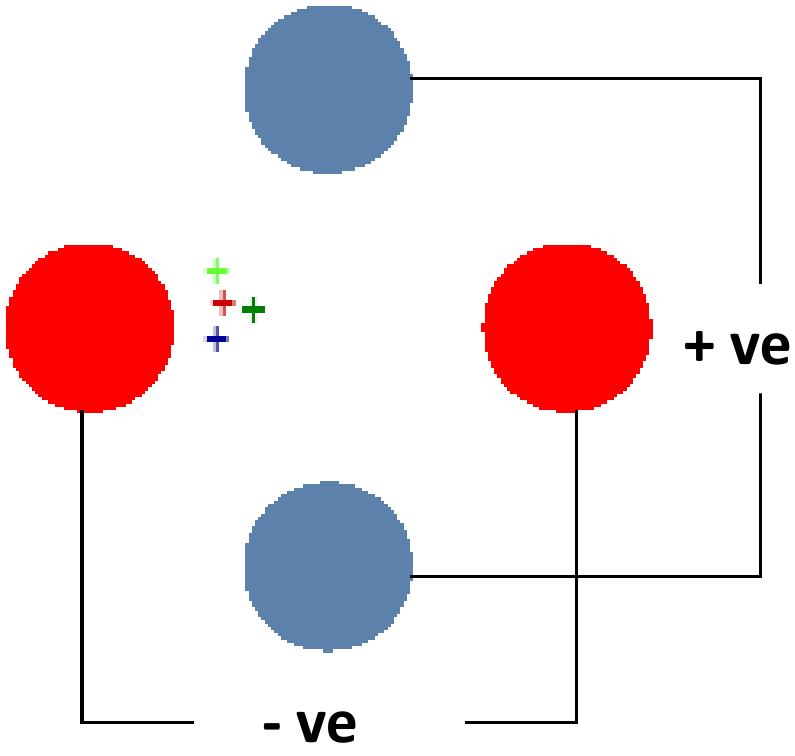
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



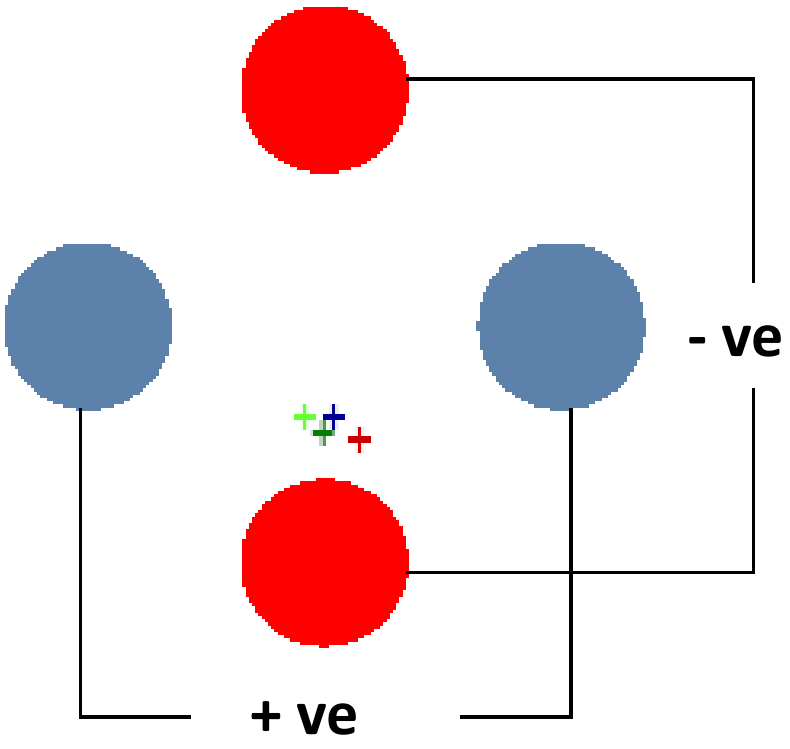
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



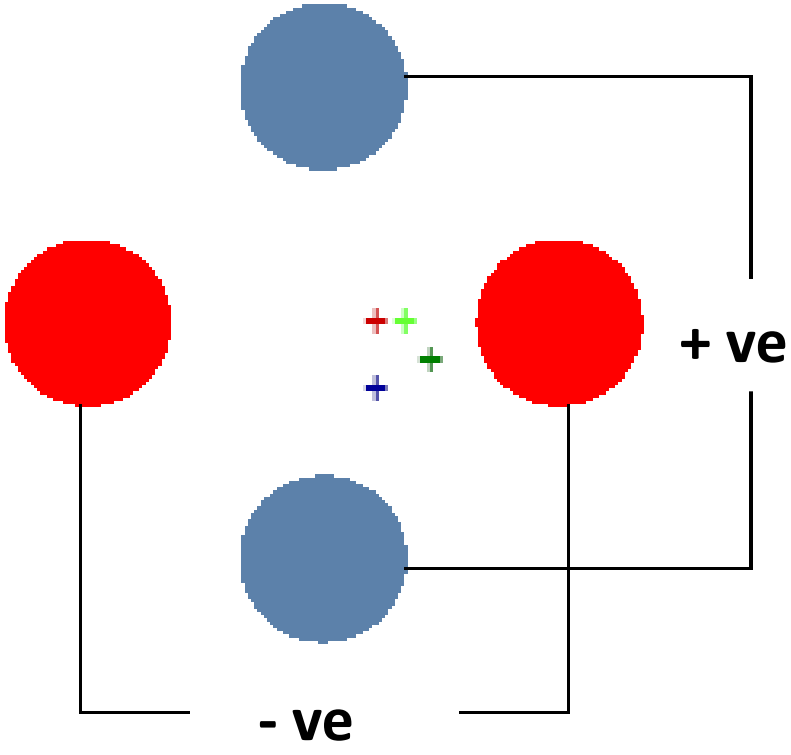
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



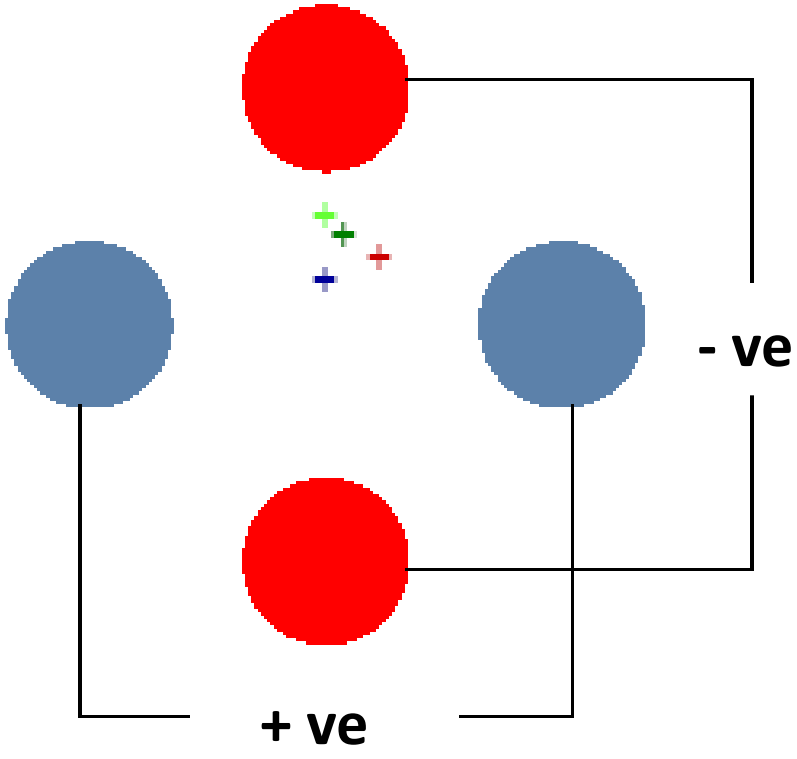
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



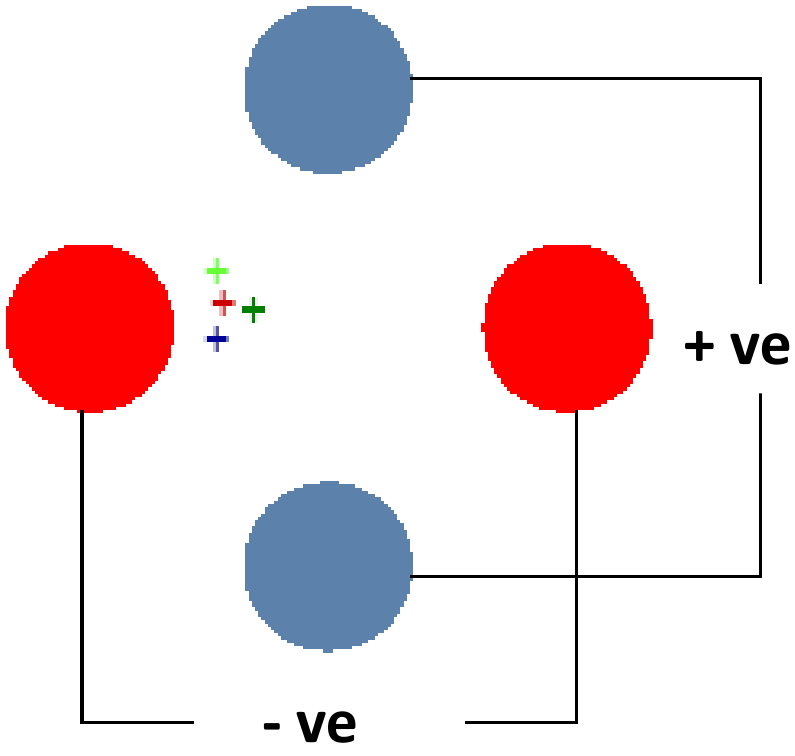
Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



Theorie des Quadrupol-Massenseparators

Das „Quadrupol"-Feld



Beschreibung der Ionenbewegung durch die Matthieu Differentialgleichung

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)\, u = 0$$

mit:

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{8zeU}{m\omega^2 r_0^2}$$

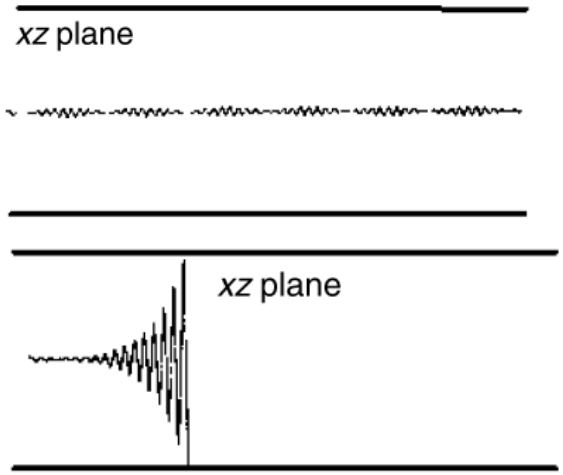
$$q_u = q_x = -q_y = \frac{4zeV}{m\omega^2 r_0^2}$$

- **u steht für die x- oder y-Richtung**
- **a und q beschreiben die Relation zwischen dem m/z Wert des Ions und den Eigenschaften des Quadrupols (r_o, U, V, ω)**
- **a ist proportional zur Gleichspannung U, q ist proportional zur Wechsel-spannungsamplitude V**

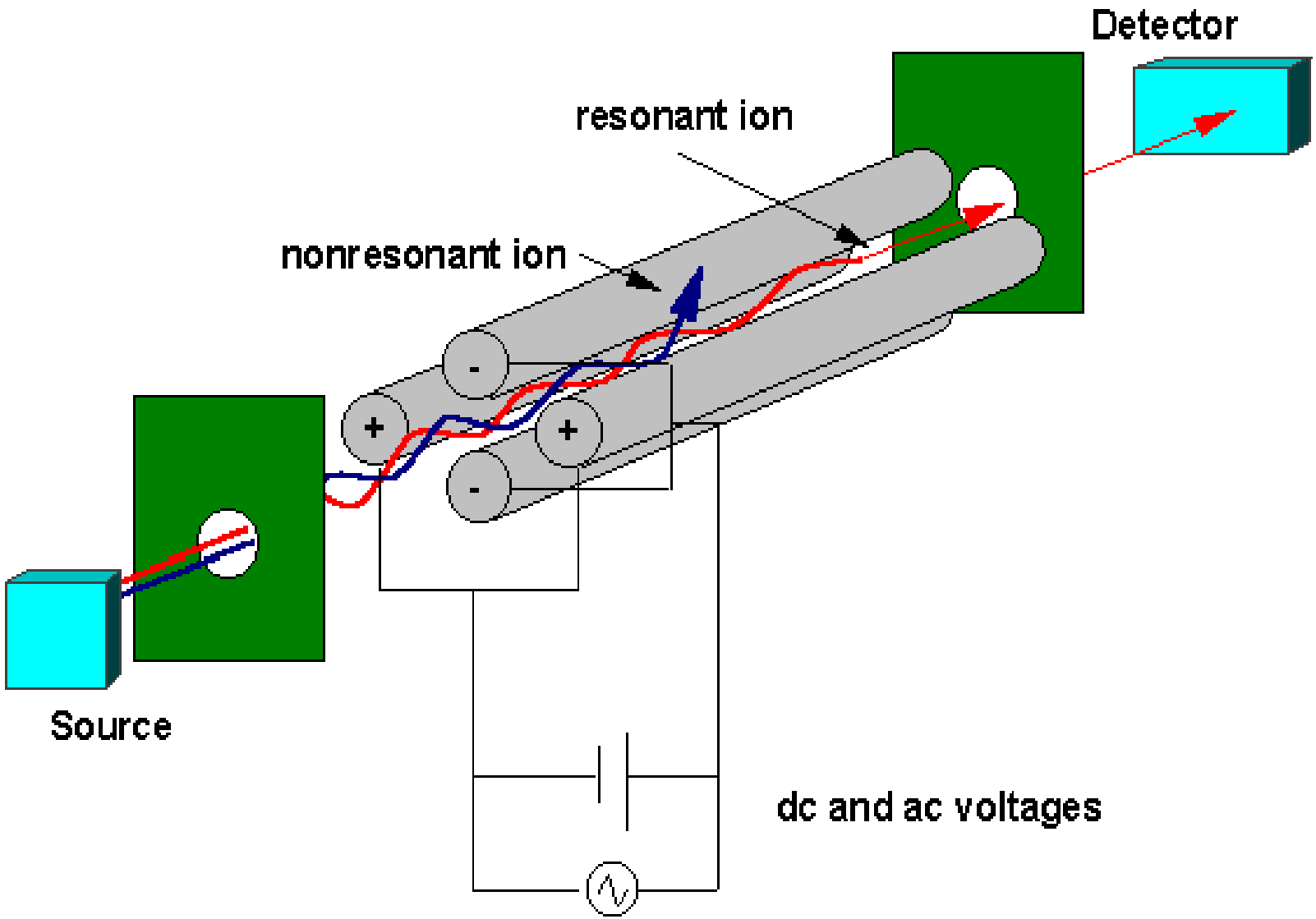
Es gibt 2 Lösungen der Gleichung:

I. Endliche Bewegungsamplitude → stabile Oszillation

II. II. Exponentielle Steigung der Bewegungsamplitude → Eliminierung des Ions



Beschreibung der Ionenbewegung durch die Matthieu Differentialgleichung

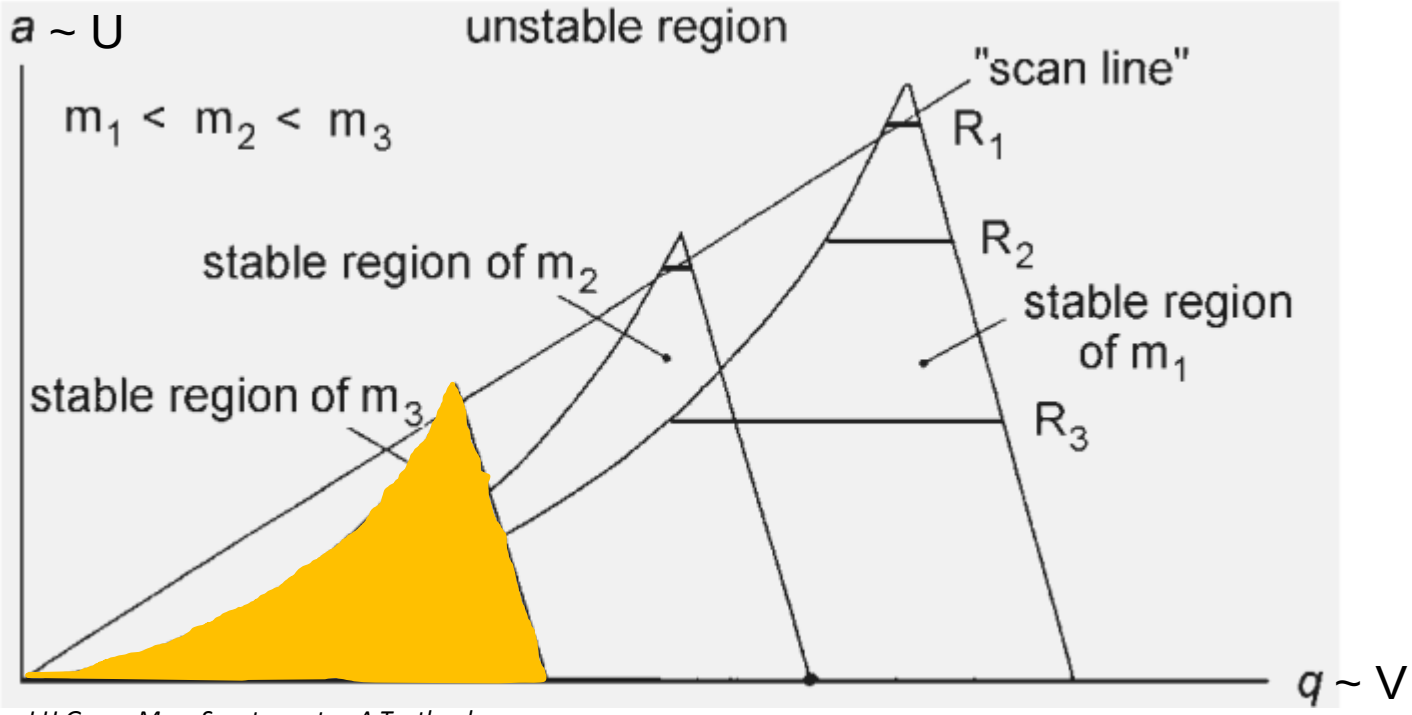


http://www.mun.ca/pharmacy/undergrad/Tandem_MS_for_Drug_Analysis_lecture.ppt

Beschreibung der Ionenbewegung durch die Matthieu Differentialgleichung

U, V sind variabel und werden im Quadrupol gleichmässig über die Zeit t erhöht („scannen“)

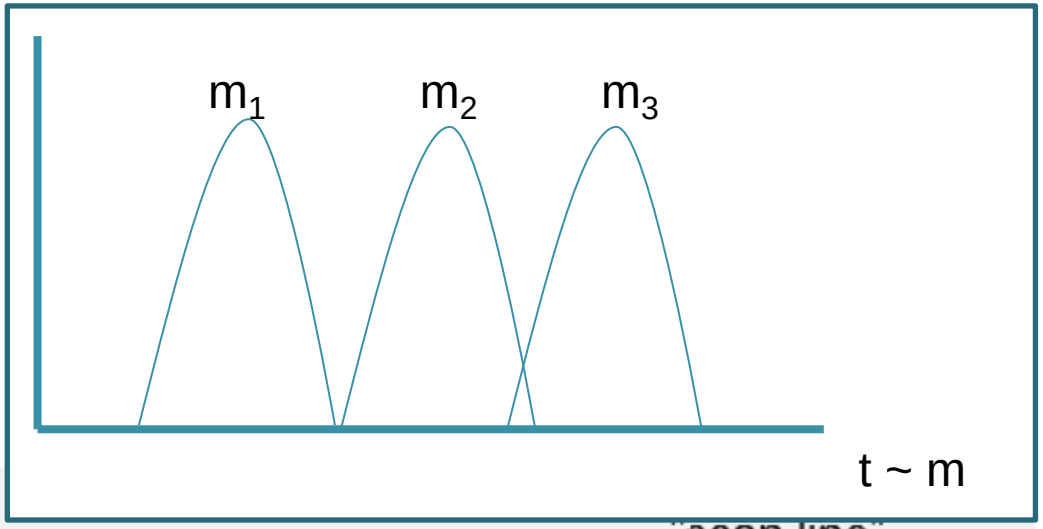
Die Bereiche der stabilen Oszillation für jede Masse m_n können im Diagramm der Verhältnisse von a_u and q_V dargestellt werden

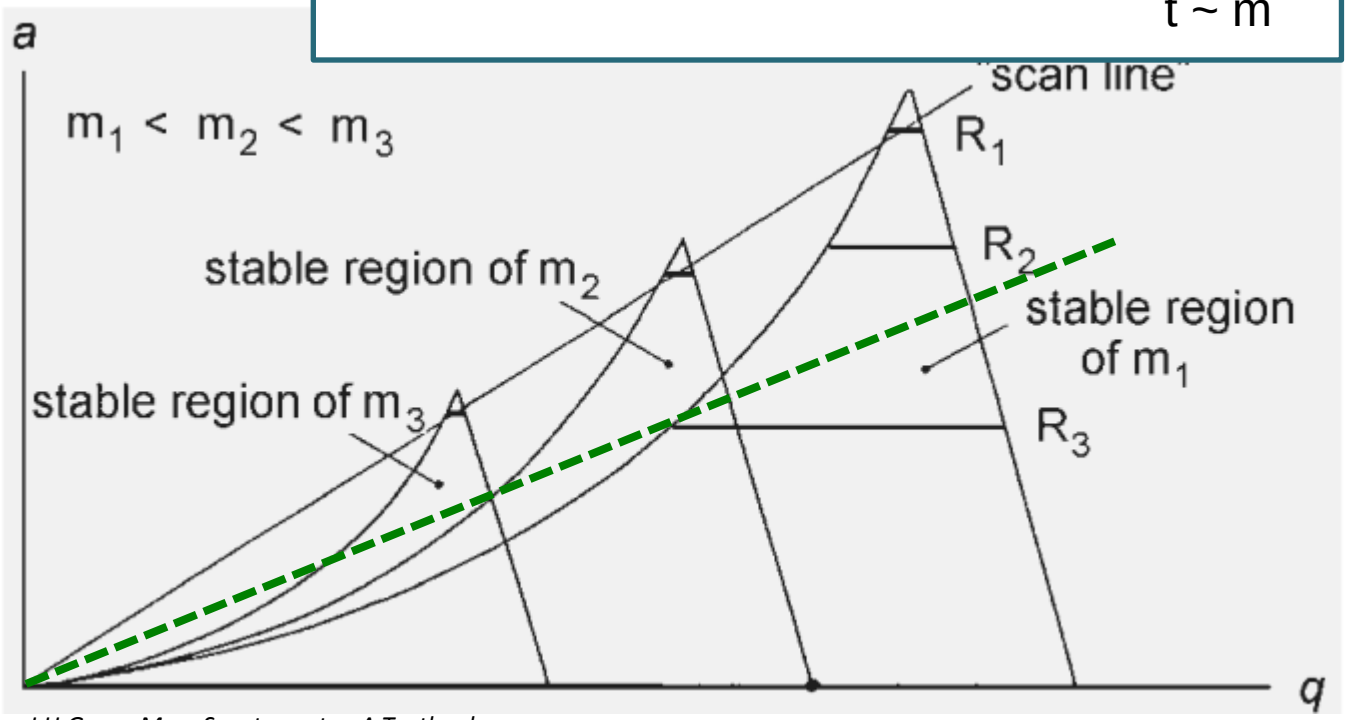


J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

Scannen durch die stabilen Bereiche der Ionen mit ansteigender Masse m_n

$$a/q = \frac{\overset{2}{\cancel{8}}\cancel{z}eU}{\cancel{m\omega^2 r_0^2}} \cdot \frac{\cancel{m\omega^2 r_0^2}}{\cancel{4z}eV} = 2\,\frac{U}{V}$$

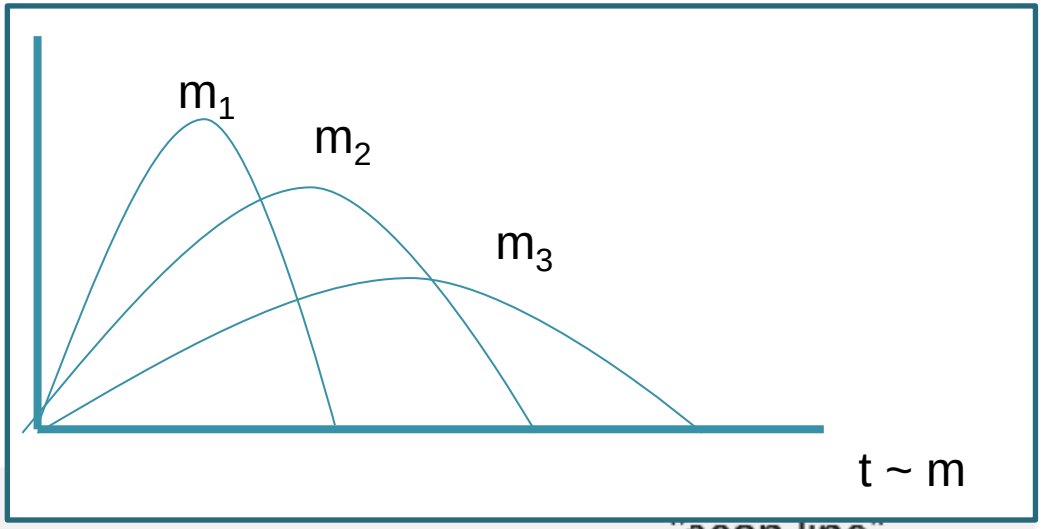


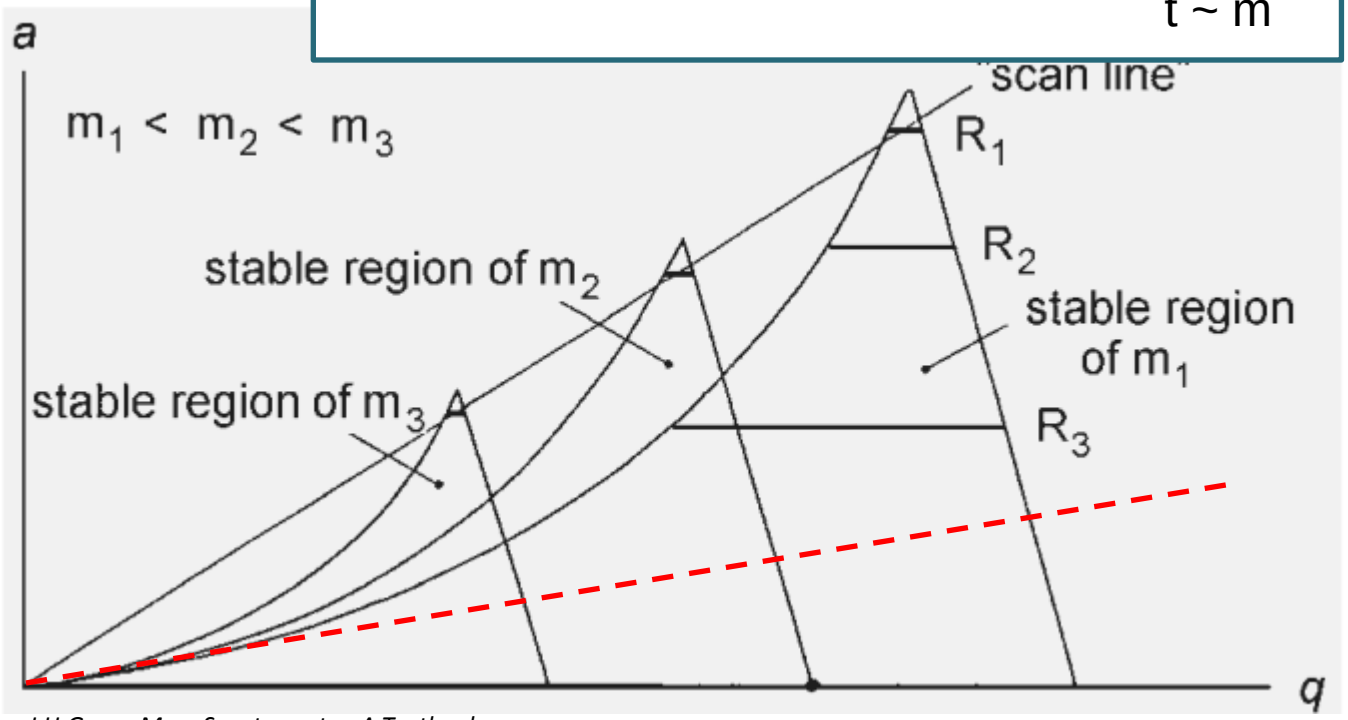


J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

Scannen durch die stabilen Bereiche der Ionen mit ansteigender Masse m_n

$$a/q = \frac{\overset{2}{\cancel{8}}\cancel{z}eU}{\cancel{m\omega^2 r_0^2}} \cdot \frac{\cancel{m\omega^2 r_0^2}}{\cancel{4z}eV} = 2\,\frac{U}{V}$$

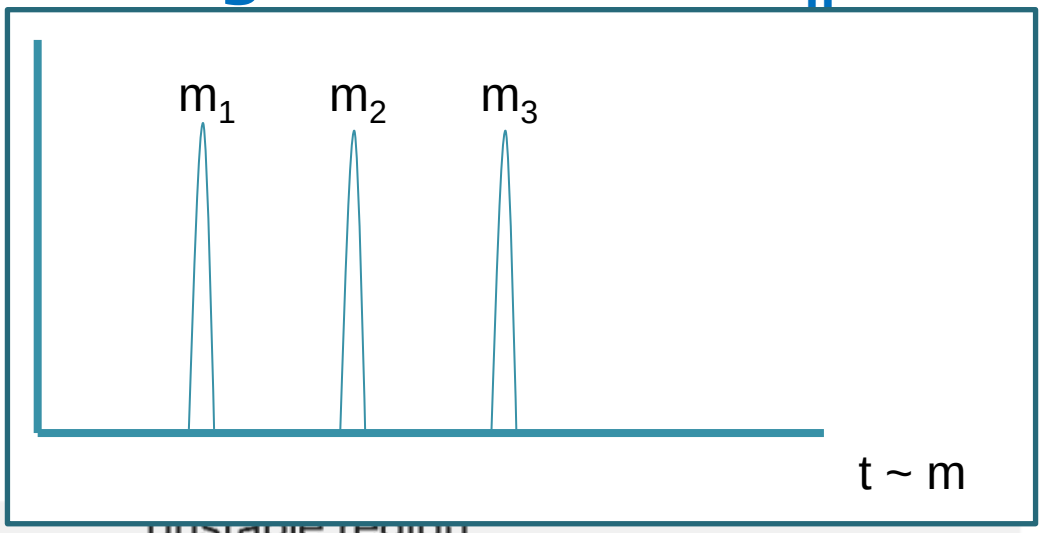


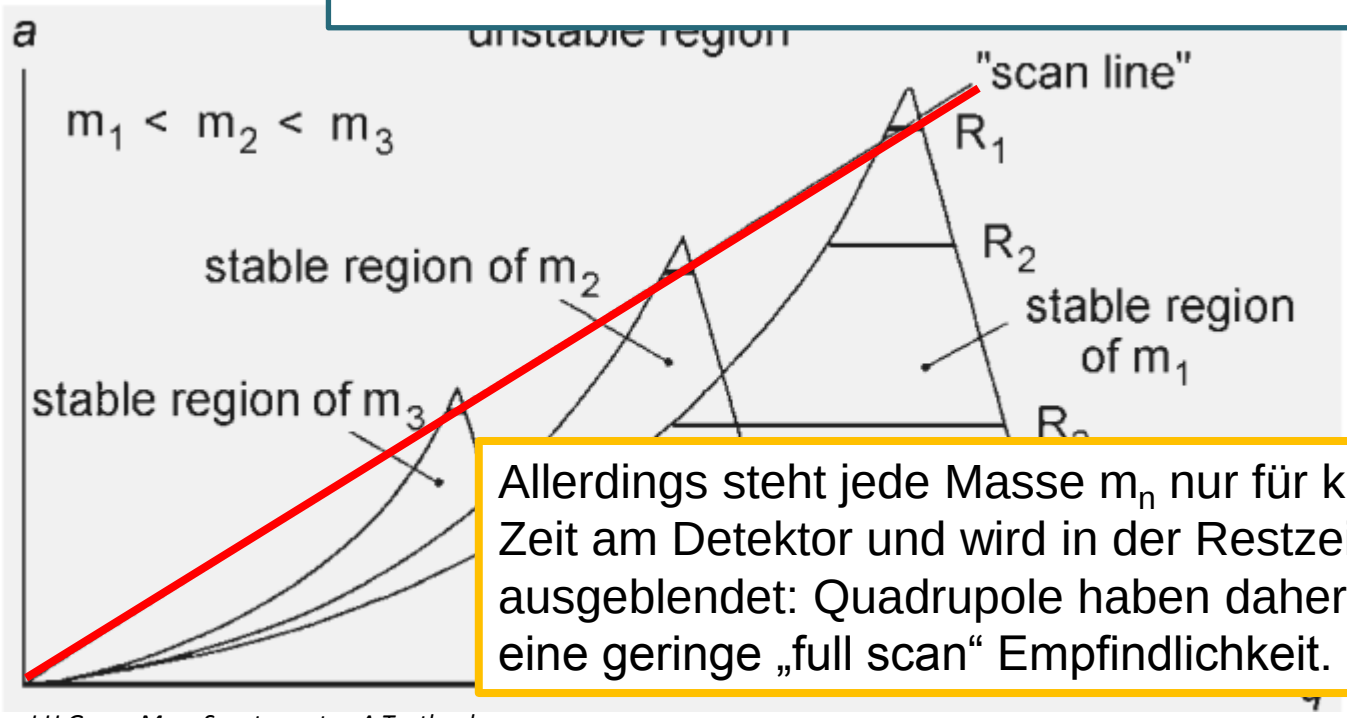


J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

Scannen durch die stabilen Bereiche der Ionen mit ansteigender Masse m_n

$$a/q = \frac{\overset{2}{\cancel{8}}\cancel{z}eU}{\cancel{m\omega^2 r_0^2}} \; \frac{\cancel{m\omega^2 r_0^2}}{\cancel{4z}eV} = 2\,\frac{U}{V}$$





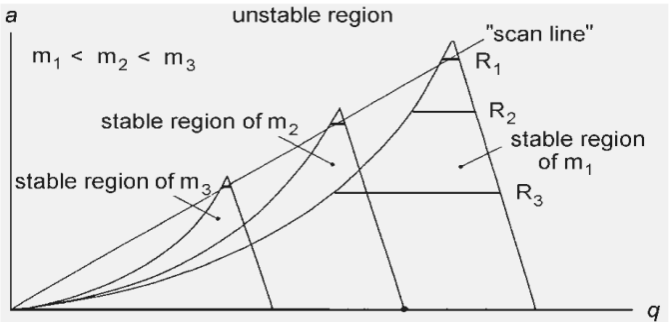
Allerdings steht jede Masse m_n nur für kurze Zeit am Detektor und wird in der Restzeit ausgeblendet: Quadrupole haben daher eine geringe „full scan“ Empfindlichkeit.

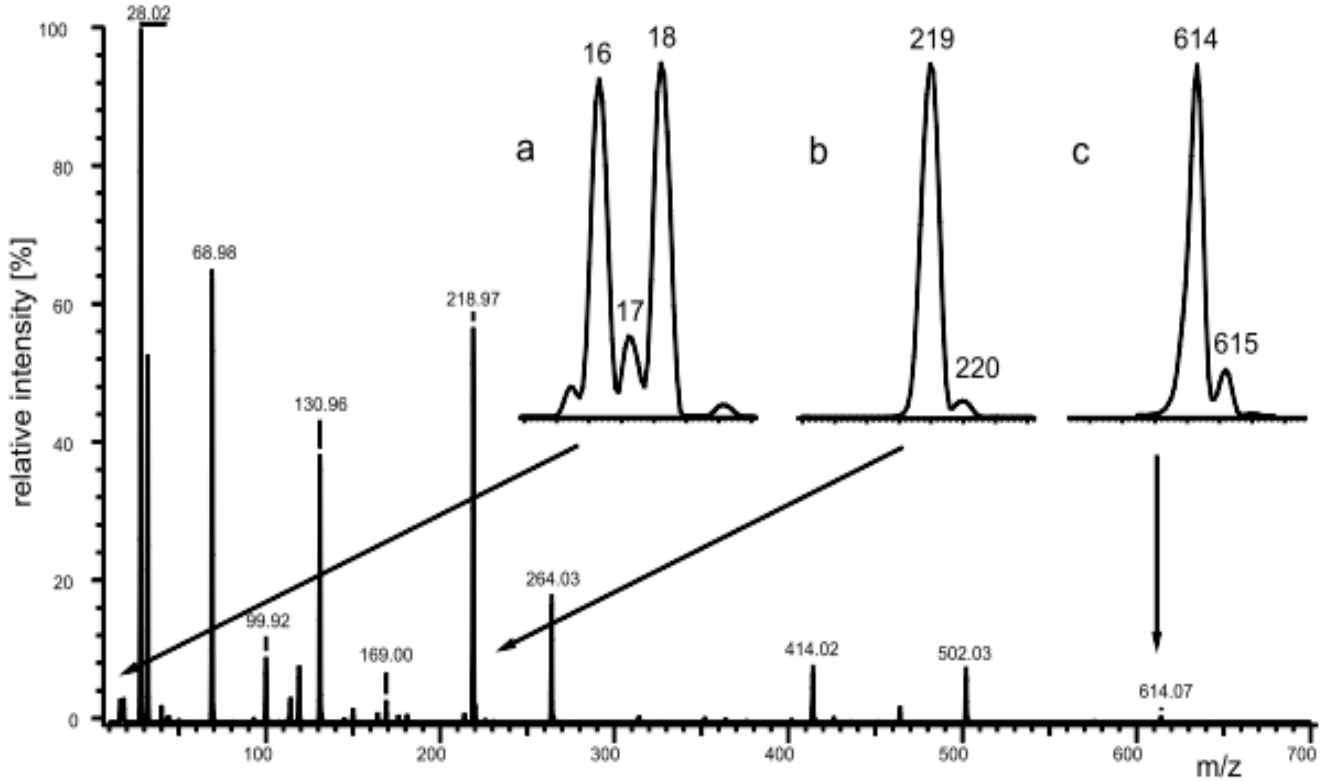
J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

Massenauflösung steigt im Quadrupol mit m/z

Konstante Peakbreite im Spektrum („unit mass resolution“): $\delta m=1$

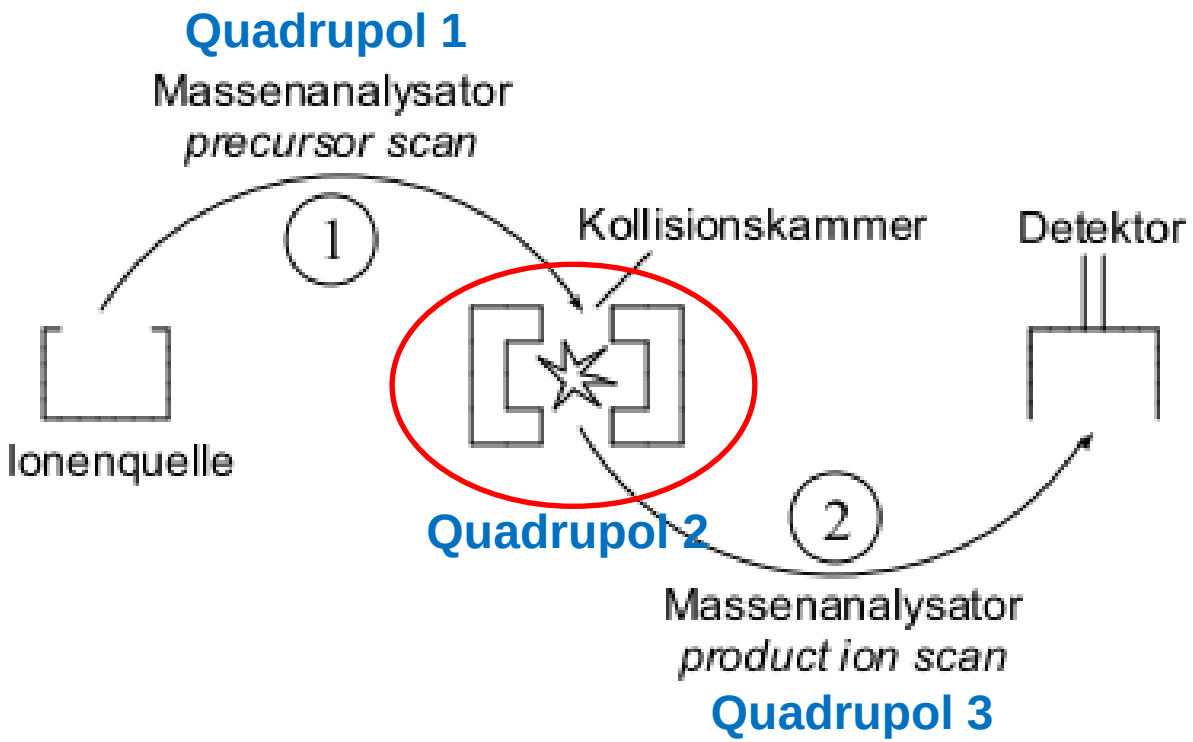
- **@ m/z 20 → R = 20**
- **@ m/z 200 → R = 200**
- **@ m/z 2000 → R = 2000**





J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

Triple Quadrupol: Kollisionszelle zur Fragmentierung (MS/MS)

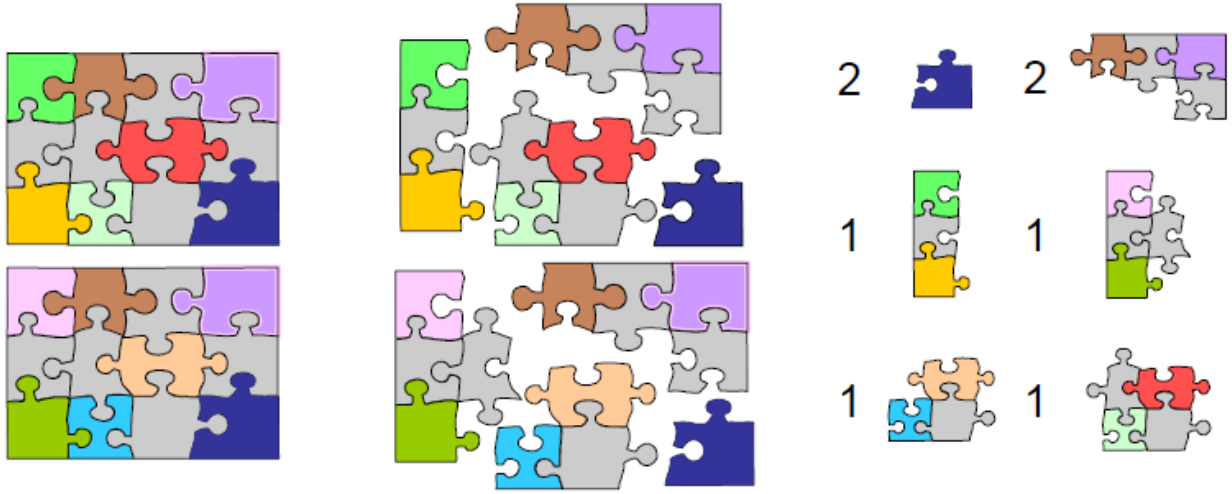


- **Im Quadrupol 1 wird das Ion selektiert, das fragmentiert werden soll**
- **Im Quadrupol 2 befindet sich ein geeeignetes Stoßgas (N_2, He, Ar, Xe) bei erhöhtem Druck. Das Analytion wird durch Stöße vibratorisch angeregt und zerfällt (u.U. auch mehrfach hintereinander beim Durchgas durch Q2)**
- **Im Quadrupol 3 werden die Fragmentionen nach ihrer Masse getrennt („scanned“) und detektiert.**

W.D.Lehmann, Massenspektrometrie in der Biochemie

Fragmentierung von Molekülen
Verifizierung der Identität

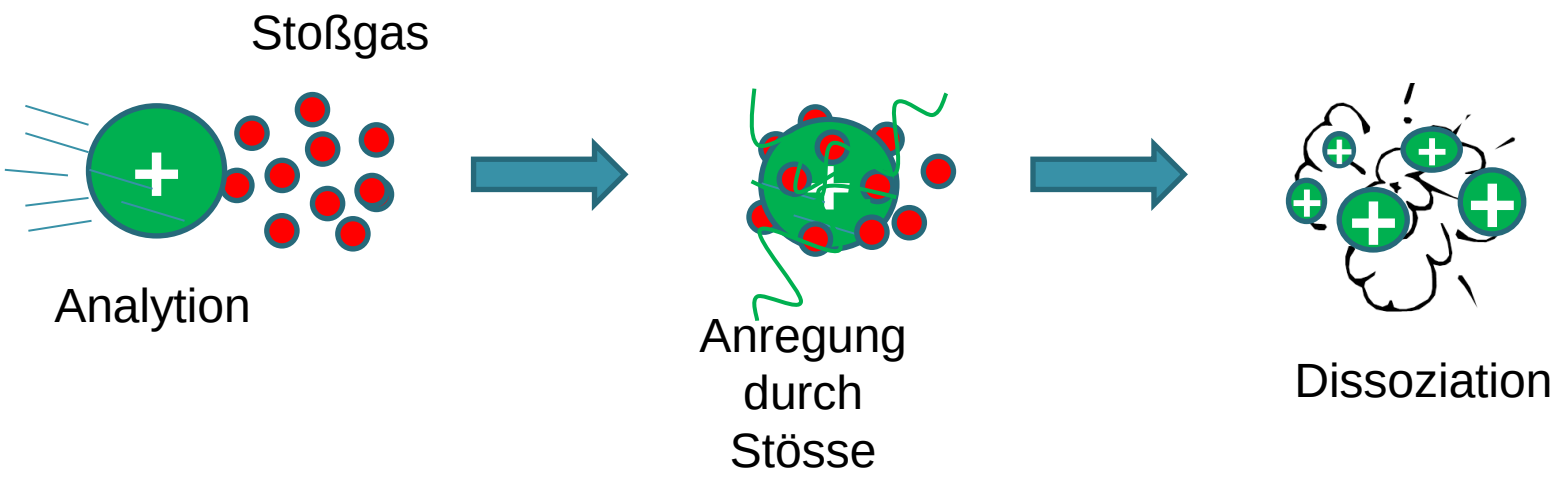
MS #1	Fragmentation Chamber	MS #2
Sorting molecules	*Breaking molecules*	*Sorting Pieces*



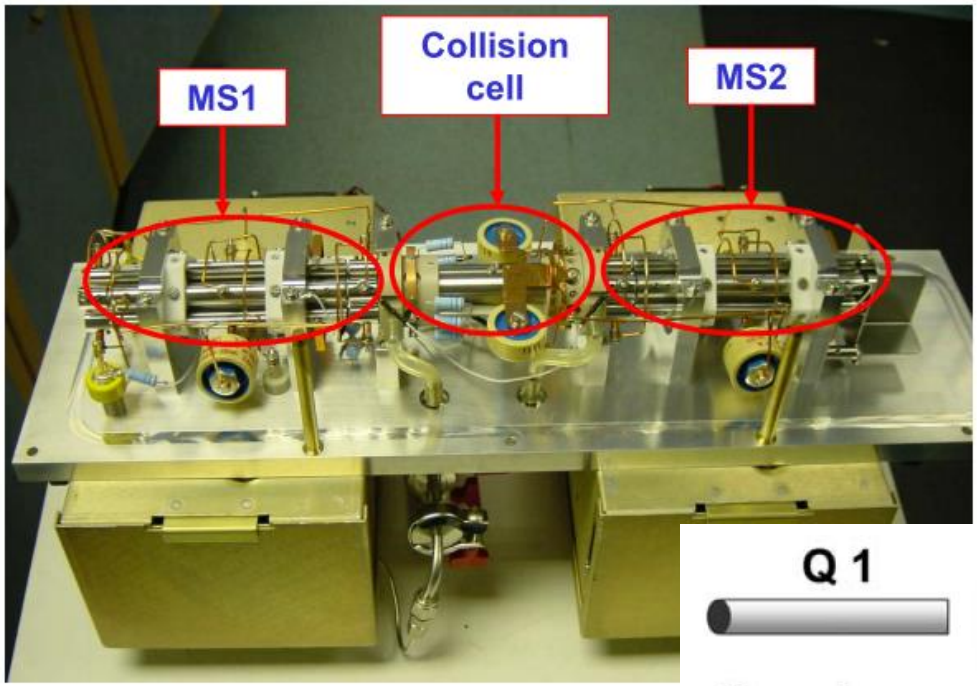
1. **Passen die einzelnen Puzzleteile? Wenn ja: Verifizierung des vermuteten Moleküls**
2. **Strukturbestätigung oder -ermittlung**
3. **Datenbanksuche (Spektrenbibliothek, Sequenzdatenbank, ...)**

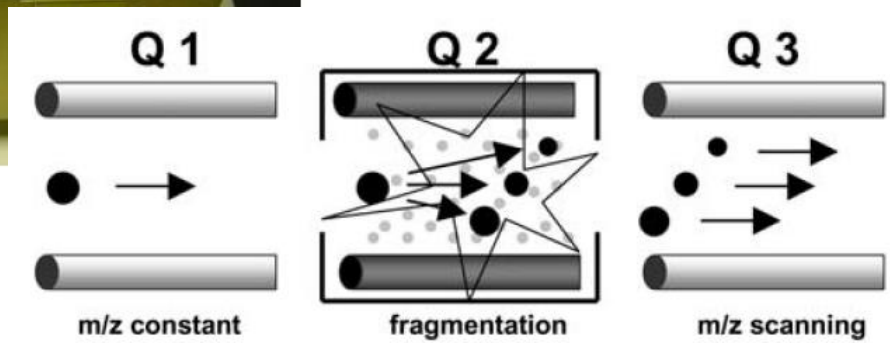
CID (Collision Induced Dissociation)

- Die Ionen werden in eine Wolke von Stoßgas geschossen.
- Durch Stöße mit den umgebenden Gasmolekülen werden die Ionen vibratorisch angeregt (aufgeheizt)
- Ist die Vibrationsenergie hoch genug, zerbrechen die Moleküle



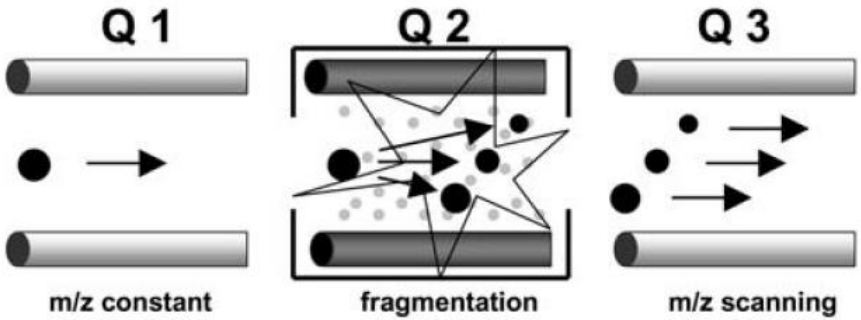
Triple Quadrupol:
Kollisionszelle zur Fragmentierung (MS/MS)



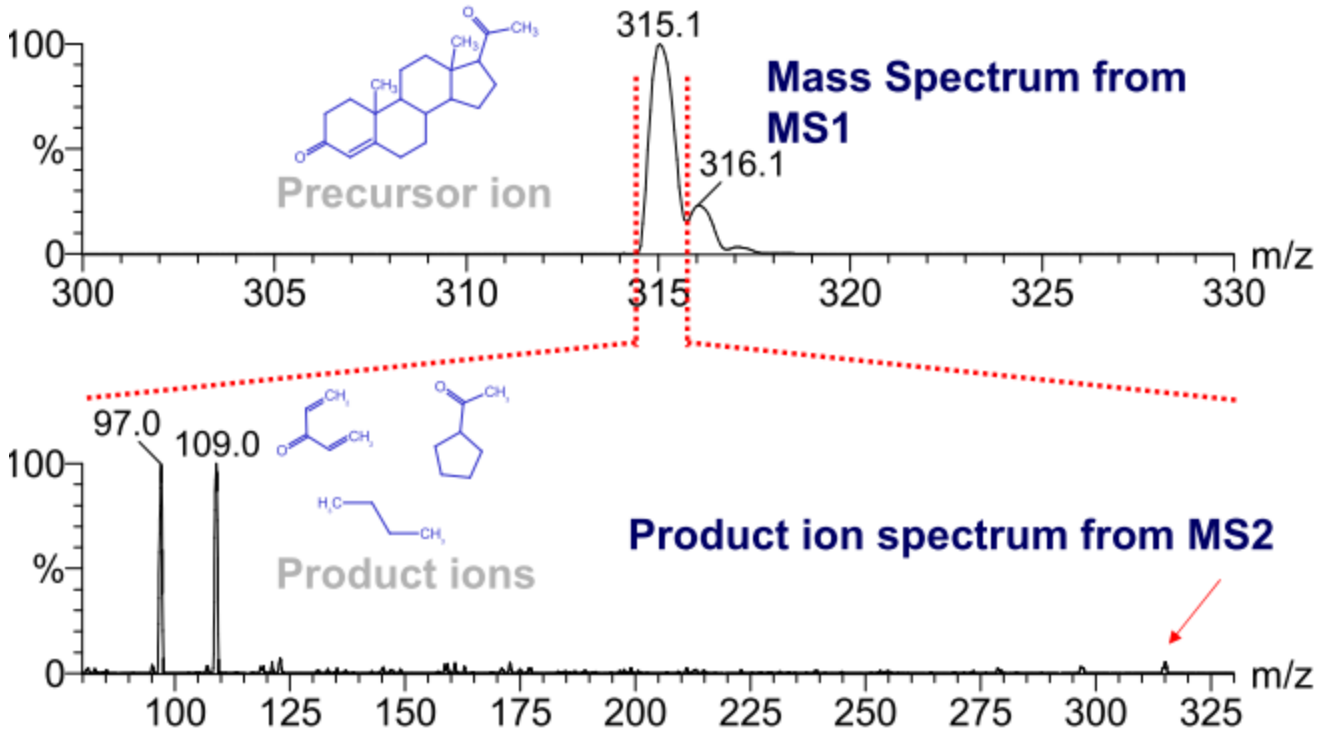


J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

Tandem MS (MS/MS) im „Triple Quadrupol" QqQ

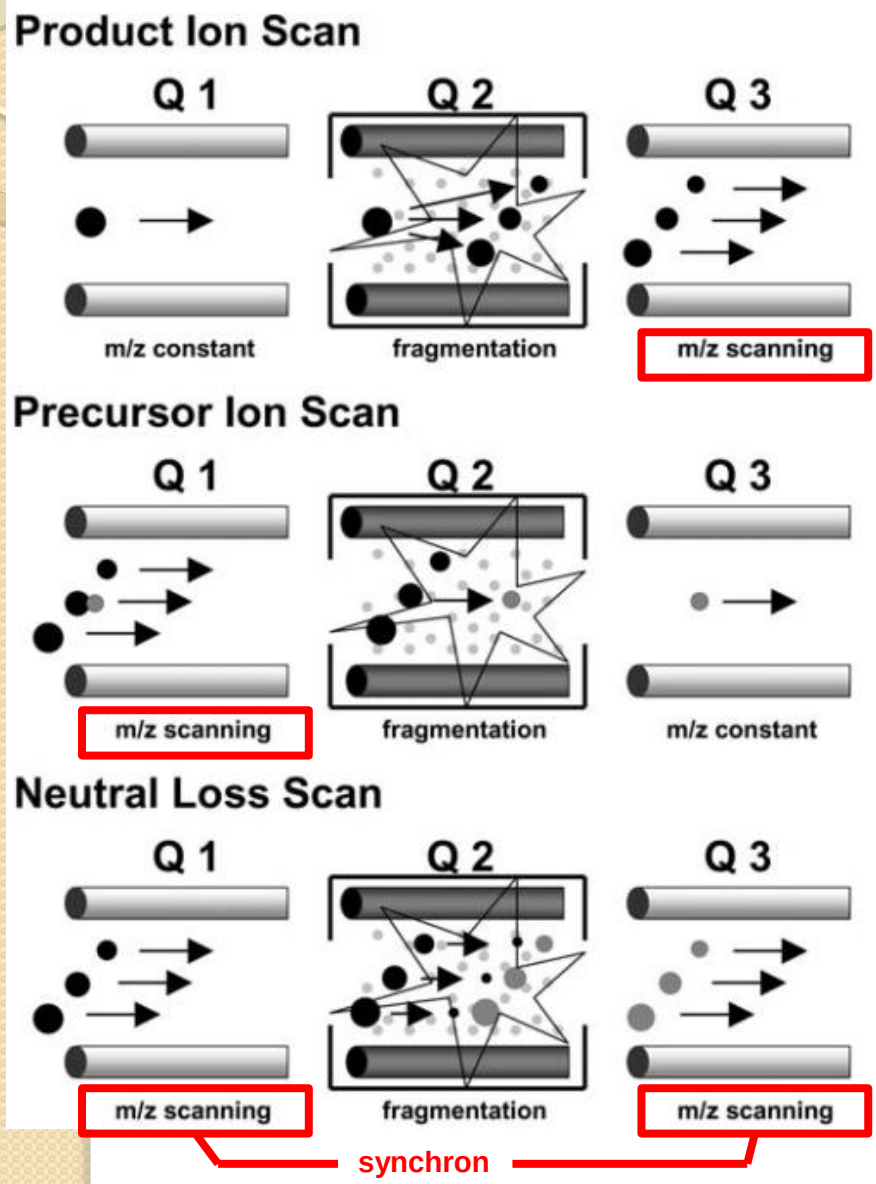


J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook



Movie „TQ-GC/MS“
0:42 – 1:50 min

Q1 oder Q3 können für unterschiedliche Zwecke getrennt gescannt werden



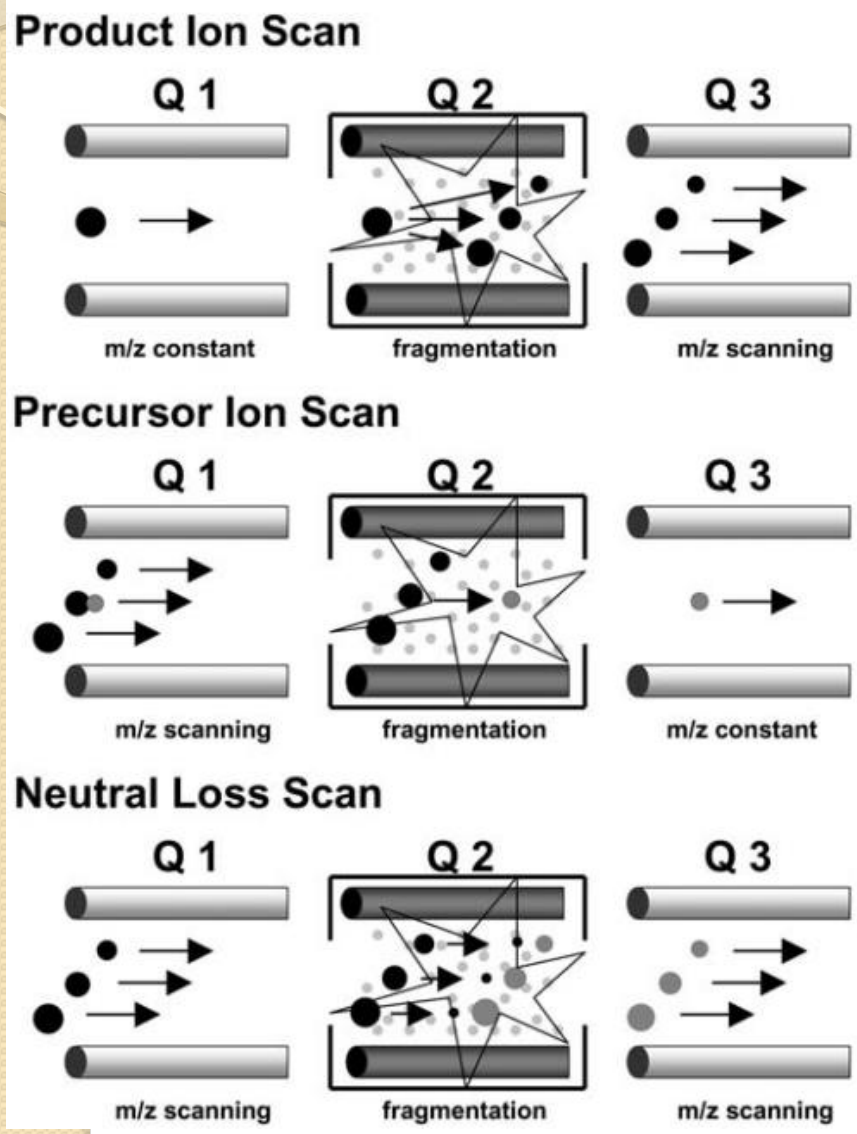
Welche Fragmente gibt es für ein ausgewähltes Molekül ?

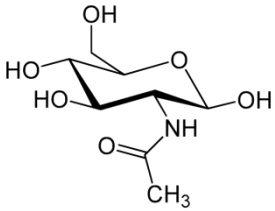
Welche besondere Seitenkette gehört zu welchen Molekülen ? → Gruppen gleichartiger Moleküle werden gefiltert.

Welche Fragmente bleiben übrig, wenn eine bestimmte Seitenkette abgespalten wird?

J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

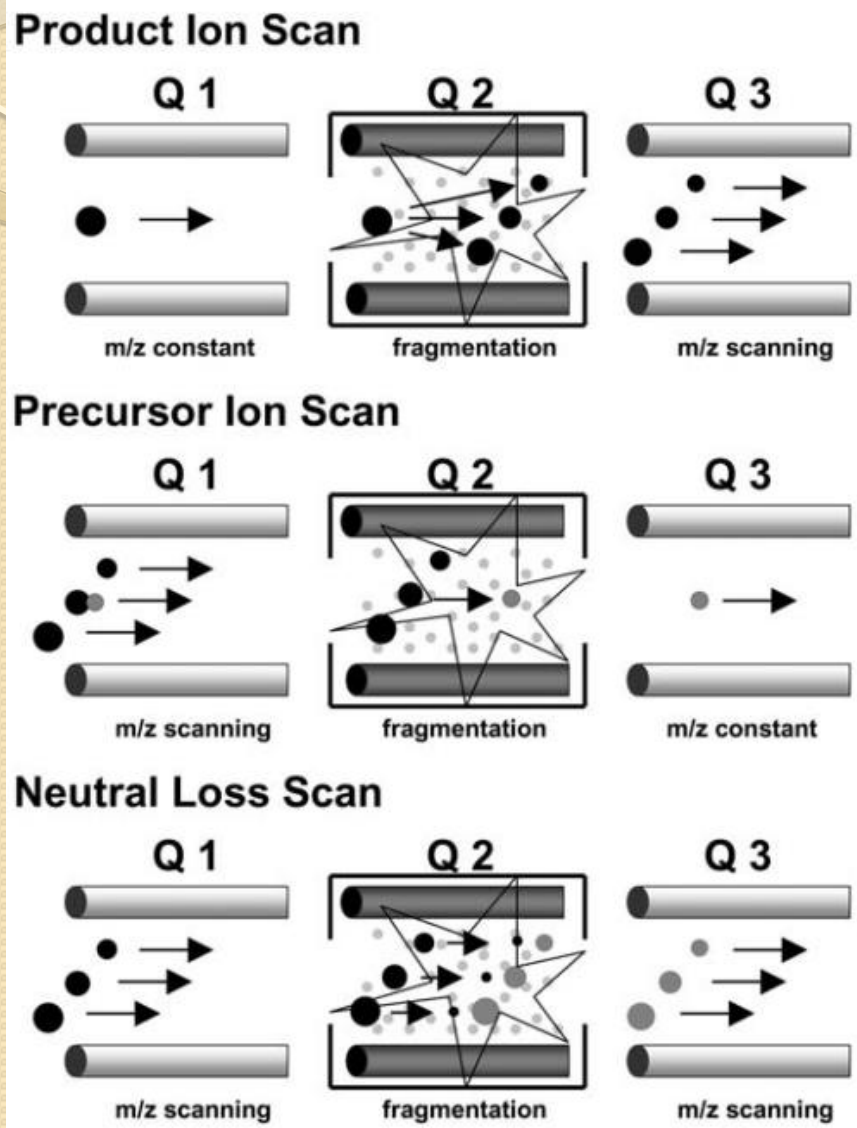
Q1 oder Q2 können für unterschiedliche Zwecke getrennt gescannt werden

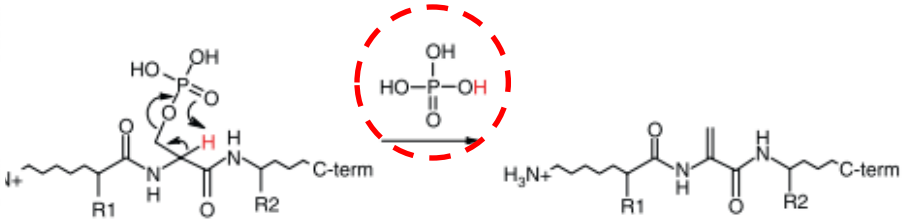




m/z 204,1
Selektion von
n-glycosylierten Peptiden

Q1 oder Q2 können für unterschiedliche Zwecke getrennt gescannt werden

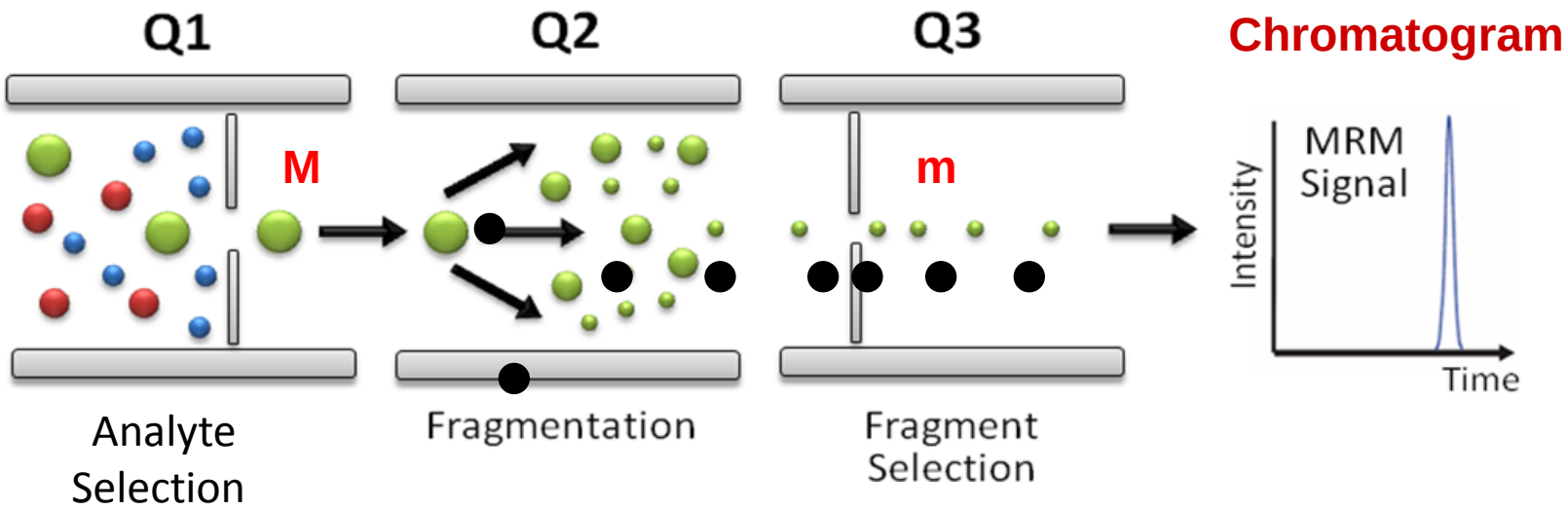




Identifizierung Phosphorylierter Peptide

Am wichtigsten! SRM / MRM zur Quantifizierung

SRM: Selected Reaction Monitoring
(MRM: Multiple Reaction Monitoring)



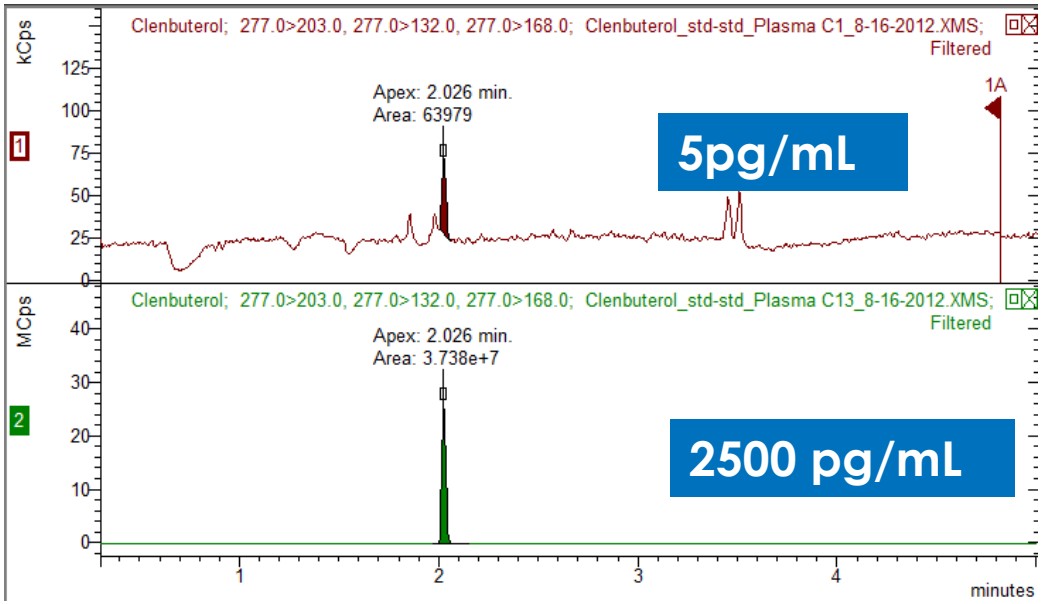
„Übergang“ von Analytmasse M zu Fragmentmasse m wird beoachtet

Vorteil: **maximale Empfindlichkeit für das beobachtete Ion**

- ~ 100% „duty cycle“ für das selektierte Ion. Alles, was in der Quelle erzeugt wird, läuft durch bis zum Detektor: maximale Transmission
- Alle anderen Ionen, auch Rauschsignale, werden abgetrennt: maximale Selektion mit größtmöglichem S/N
- Eindeutige Identifizierung der Komponente durch Masse und Fragmente
- Die Intensität des Fragments wird für die Quantifizierung verwendet

David Campbell, Institute for Systems Biology, Seattle. Modified.

Quantifizierung von Clenbuterol in Pferdeplasma



Verbotenes Stimulanz in Pferderennen

Kalibriersubstanz: deuteriertes Clenbuterol (gleiche Ionisationseffizienz und Retentionszeit, aber geringfügig höheres MW)

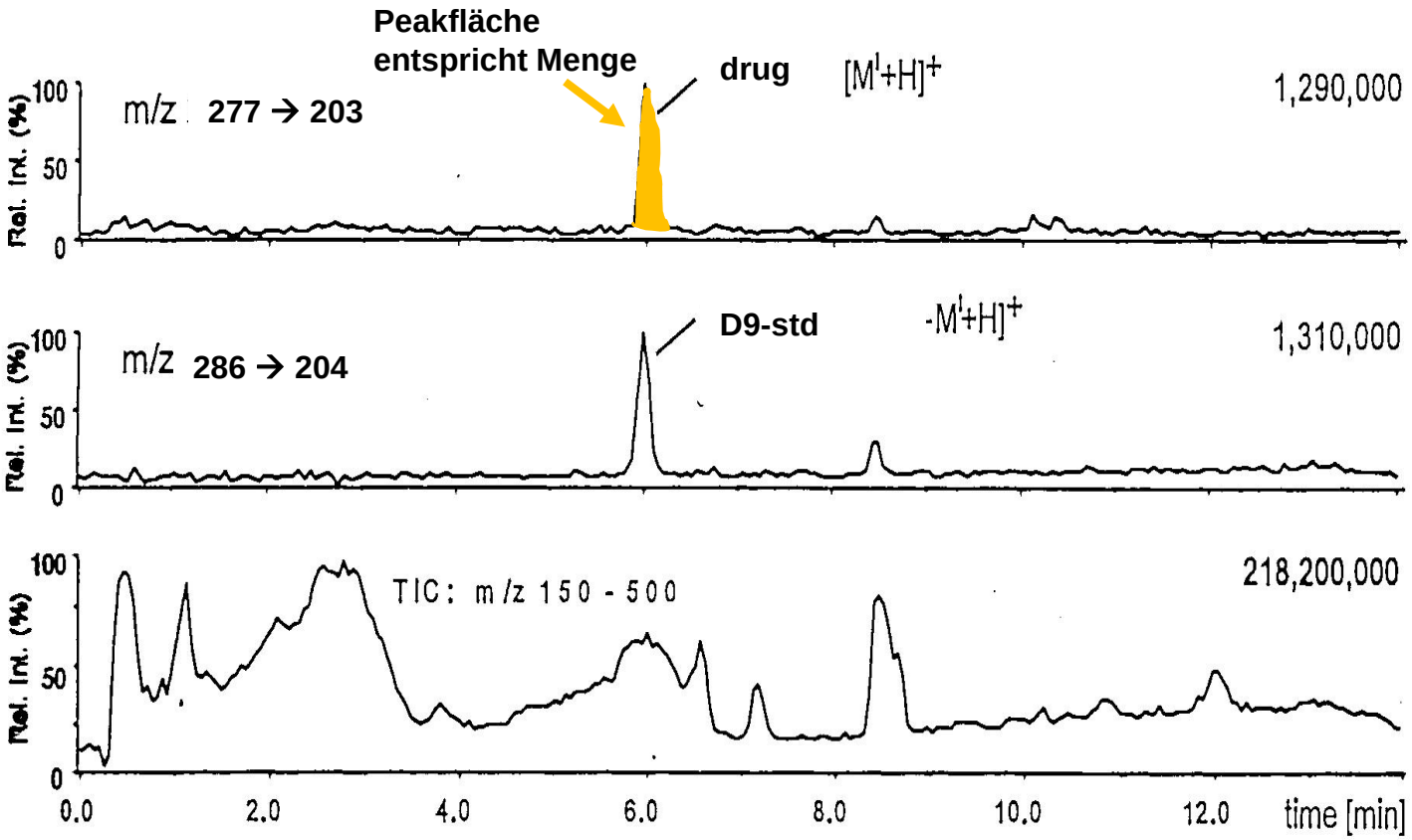
Analyt	MW m/z	Quant m/z	Qualifier m/z
Clenbuterol	277	203	168, 132
D9- Clenb	286	204	168

Zwei weitere Fragmente werden zur eindeutigen Identifizierung verwendet

MRM: Q1 wird wechselweise auf Masse 277 und 286 geschaltet.
Q3 wird synchron wechselweise auf Masse 203 und 204 (Quant) bzw. 168 und 132 (ID) geschaltet.

Peakintensität des Fragments der Masse 203 Da wird zur Quantifizierung verwendet

Quantifizierung von Clenbuterol in Pferdeplasma

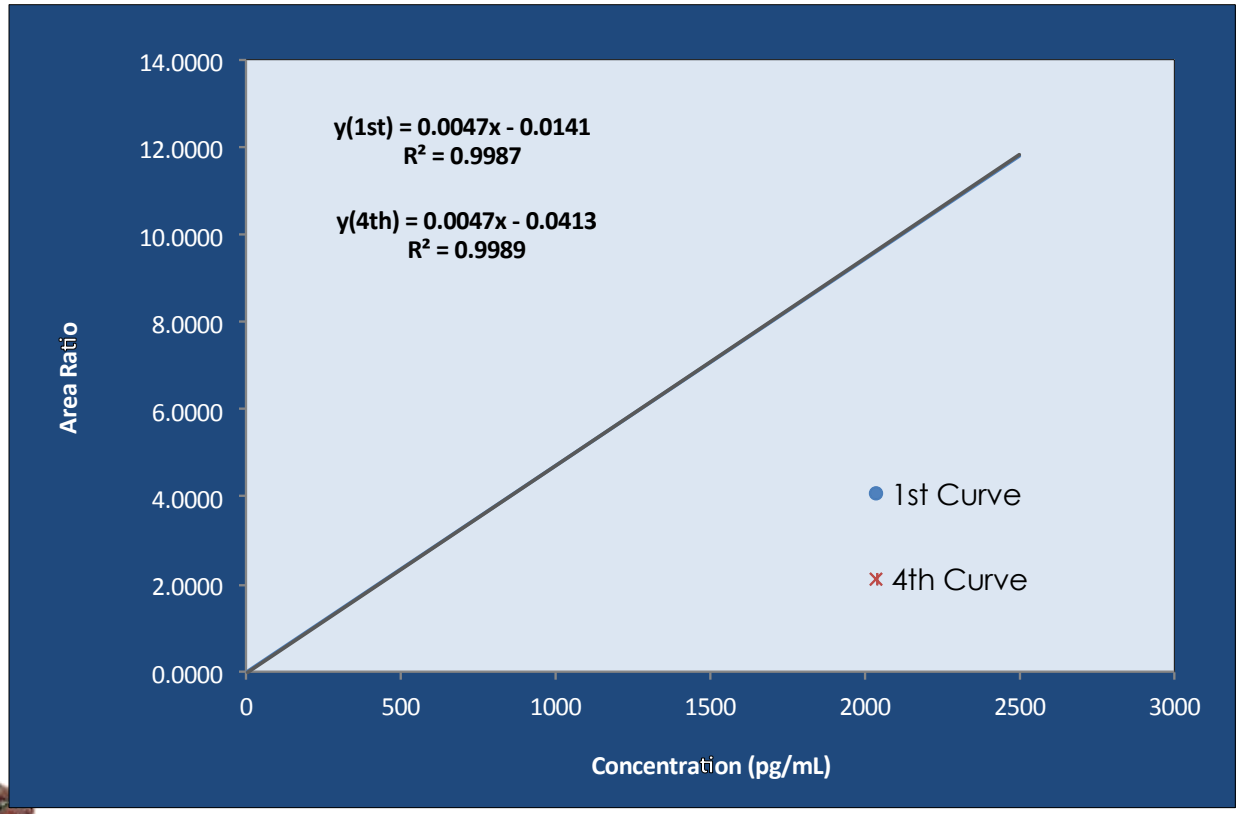


MRM Sequenz:

Q1		Q3
277	→	203
	→	168
	→	132
286	→	204
	→	168

Fester Zyklus: Keine anderen Komponenten sind währenddessen sichtbar!

Quantifizierung von Clenbuterol in Pferdeplasma



QC Sample	Mean Conc. pg/mL	%RSD (n=6)	Max % Difference
QC1	30	0.96	4.57
QC2	200	1.01	-3.13
QC3	1,800	1.36	10.2

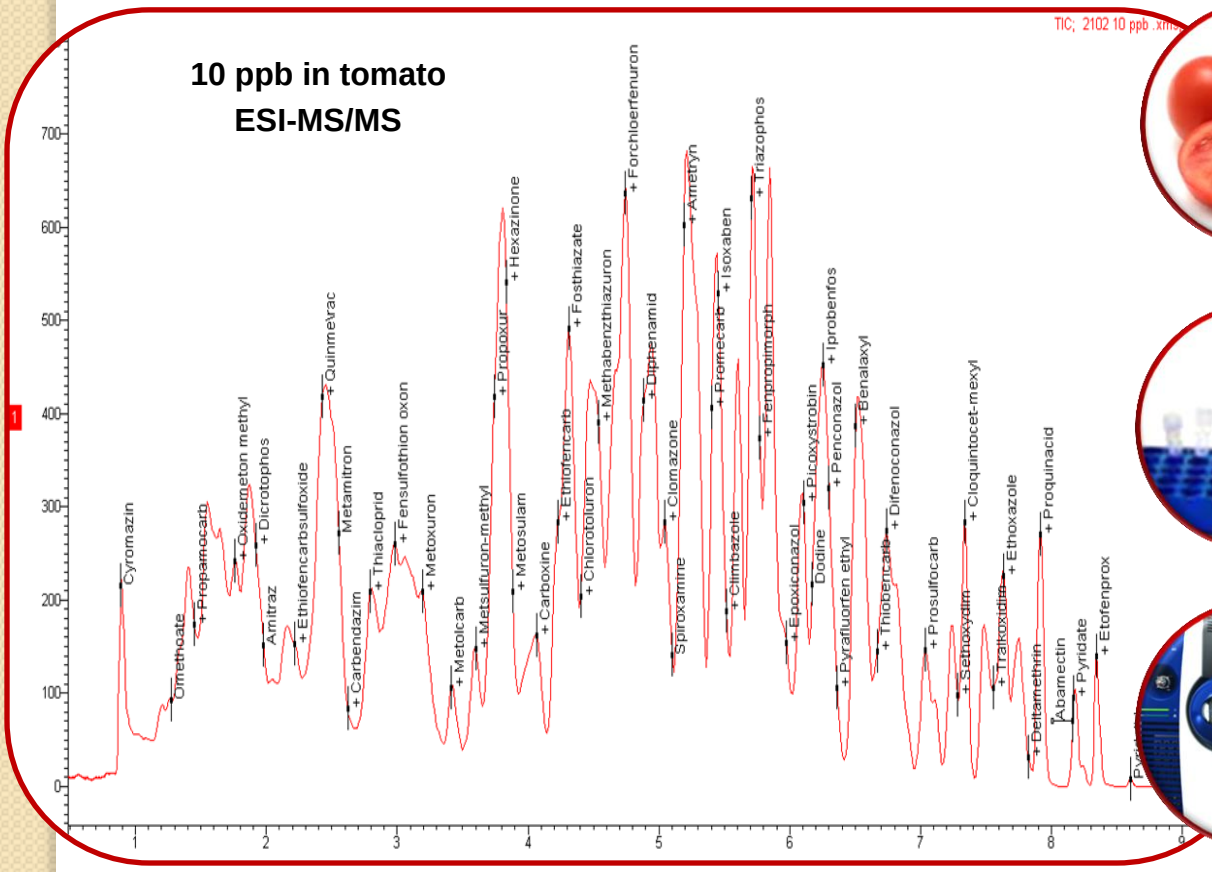
Typische Anwendungsbereiche von QqQ

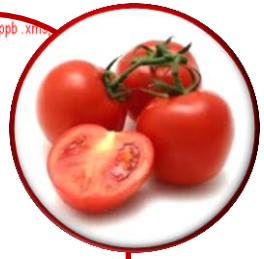
Quantifizierung !!!! In allen Applikationen wie

- Pharma DMPK (drug and metabolite pharmacokinetics)
- Lebensmittelkontrolle (Pestizide, Vitamine, etc.)
- Dopingkontrolle
- Forensik (Drogen, Sprengstoffe, etc.)
- Umweltanalytik
- Klinische Diagnostik von Patienten
- Targeted Proteomics
- ……

Pestizide in Gemüse

Test von 325 Pestizide in Tomate





Tomato

QuEChERS

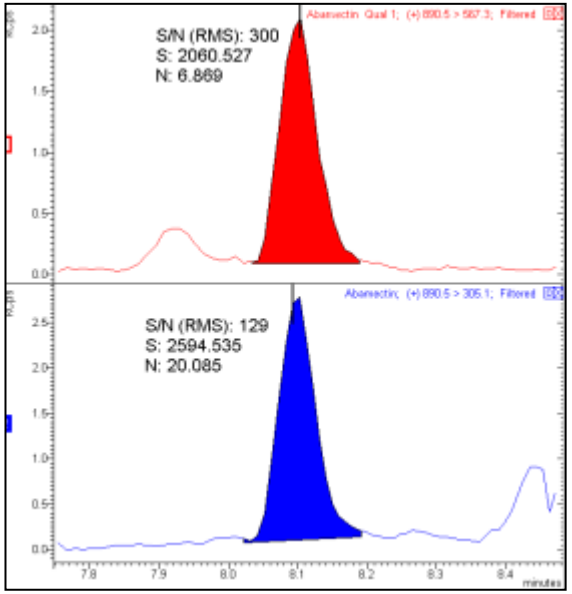
EVOQ Elite

- **325 pesticides**
- **Total run time: 13 min.**
- **Only one injection**
- **LOQ = femtograms**

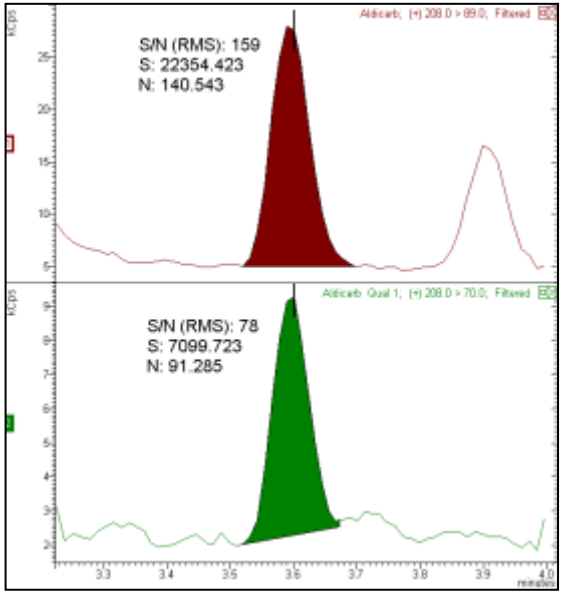
Pestizide in Gemüse

Test von 325 Pestizide in Tomate

Abamectine



Aldicarb

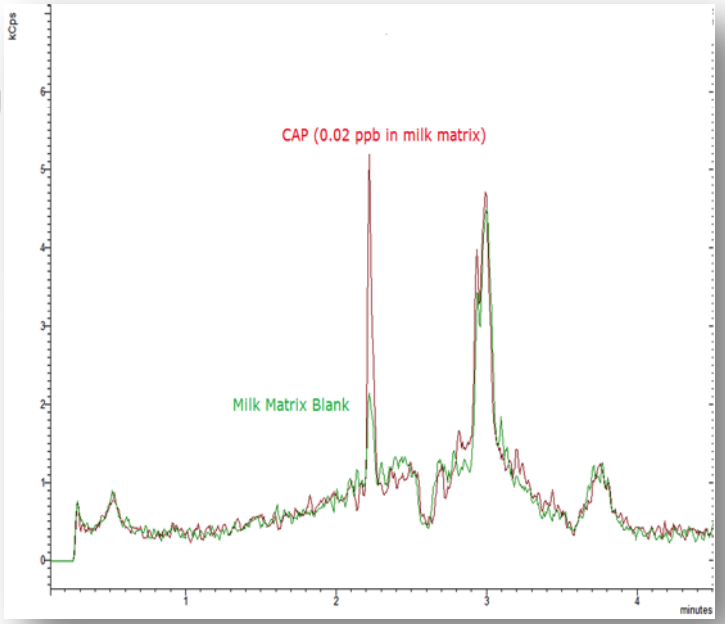


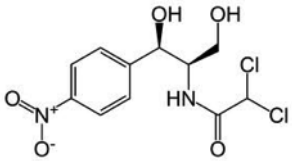
Nachweis von 0.5 ppb in Tomate

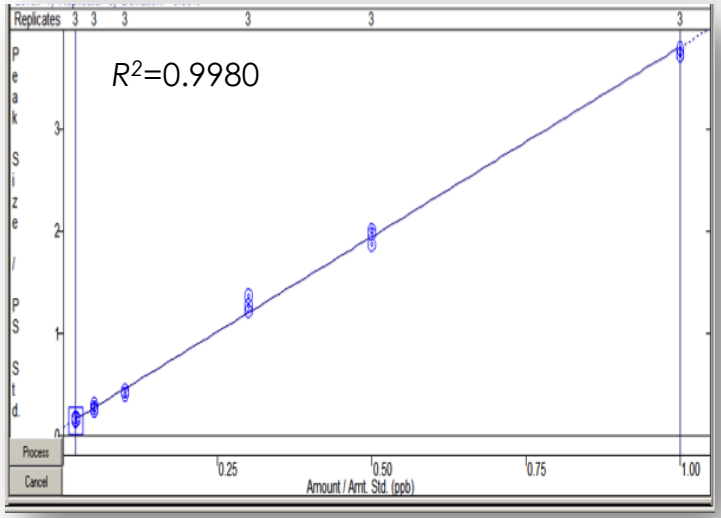
Chloramphenicol in Milch

- European Union has established a 0.3ug/kg (**0.3ppb**) Minimum Required Performance Level (MRPL) in food matrix, as stated in the Commission Decision 2002/657/EC[2]

- 6-level matrix matched calibration from **0.020-1.0 ppb** was performed with each level analyzed in triplicates. .

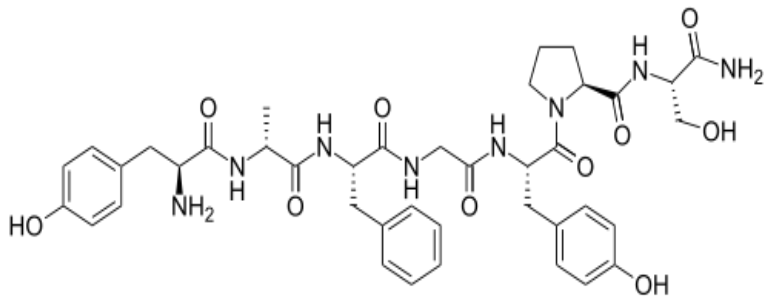






Quantifizierung von Dermorphin

- Naturally ocurring hepta-peptide from skin of South American tree frog
- 40x more potent than morphine
- Used as an analgesic and anesthetic
- Class-I prohibited compound in horse racing



Don‘t kiss that frog....

Quantifizierung von Dermorphin

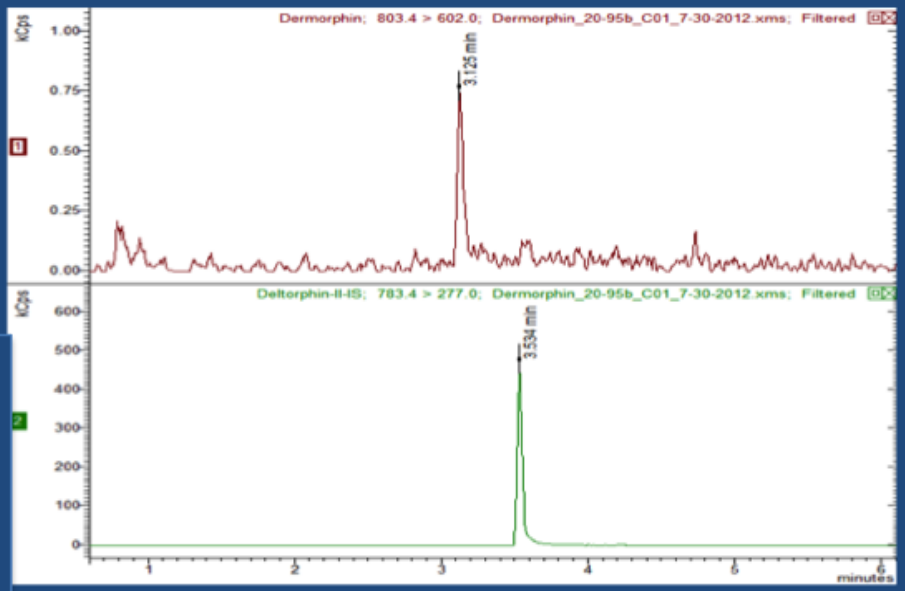


Fig. 1. Shows the LLOQ of 0.5ng/mL of dermorphin in equine urine.

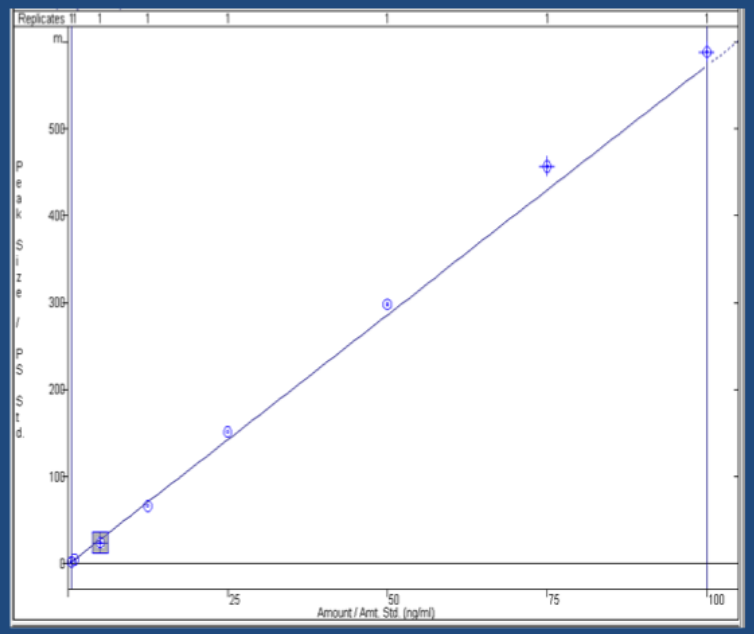


Fig. 2. Calibration curve in the range 0.1-100ng/mL of dermorphin in equine urine.

Column: C18, 3µ, 2.1x100 mm
Injection volume: 40µL
Flow rate: 0.4 mL/min
Mobile phase A: Water with 0.2% Formic acid
Mobile phase B: Acetonitrile with 0.2% Formic acid
Gradient conditions:

0.00 min	95% A
0.20 min	95% A
8.00 min	5% A
8.50 min	5% A
8.51min	95% A

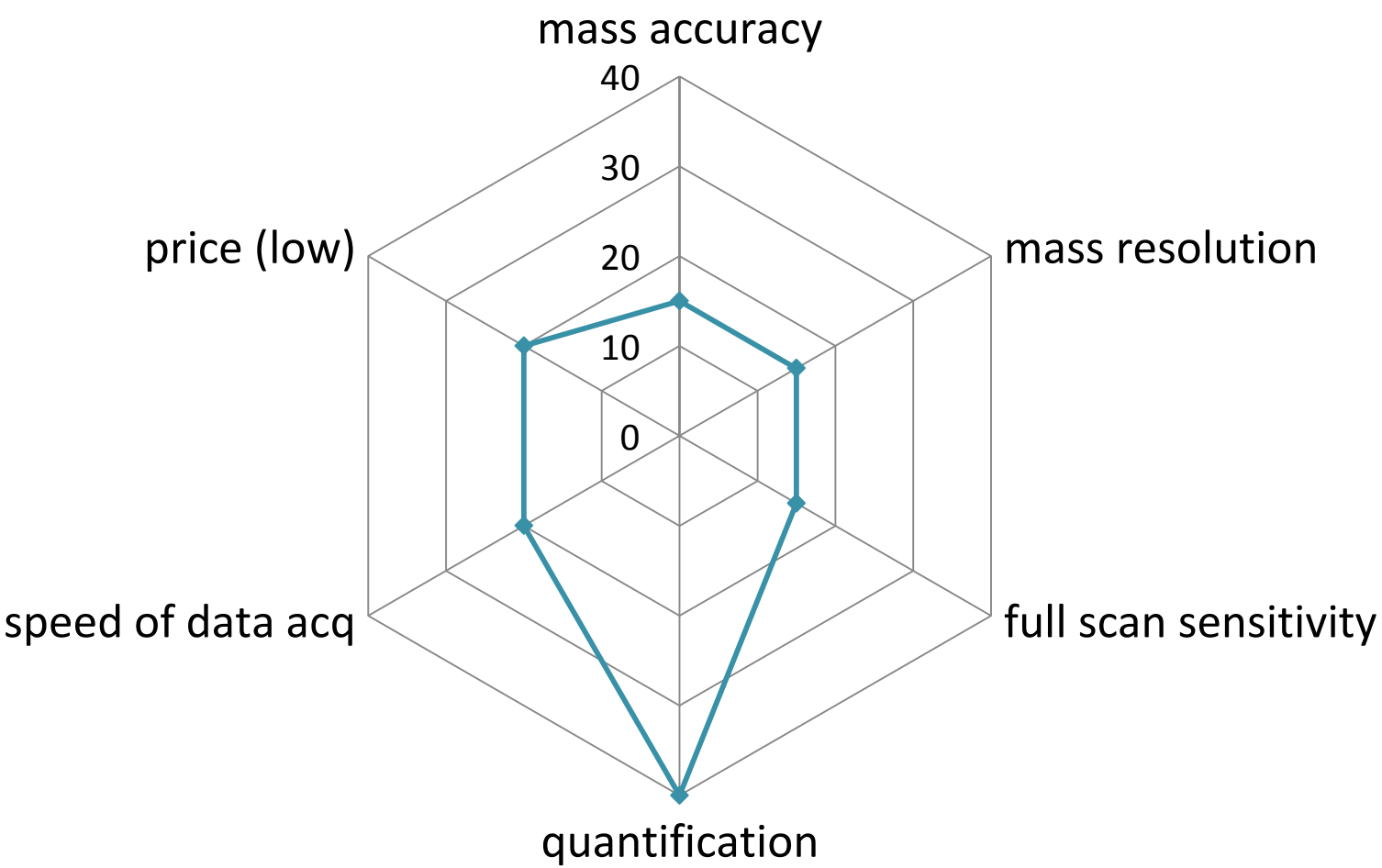
Vorteile der QqQ Technologie

- Praktisch 100% duty cycle bei SIM oder MRM Methoden, daher unübertroffene Empfindlichkeit für Quantifizierung oder Targetanalyse
- Verschiedene Selektionsmodi über MS/MS durchführbar (product ion, precursor, neutral loss scans)
- hoher Automatisierungsgrad, da viele Methoden vorhanden

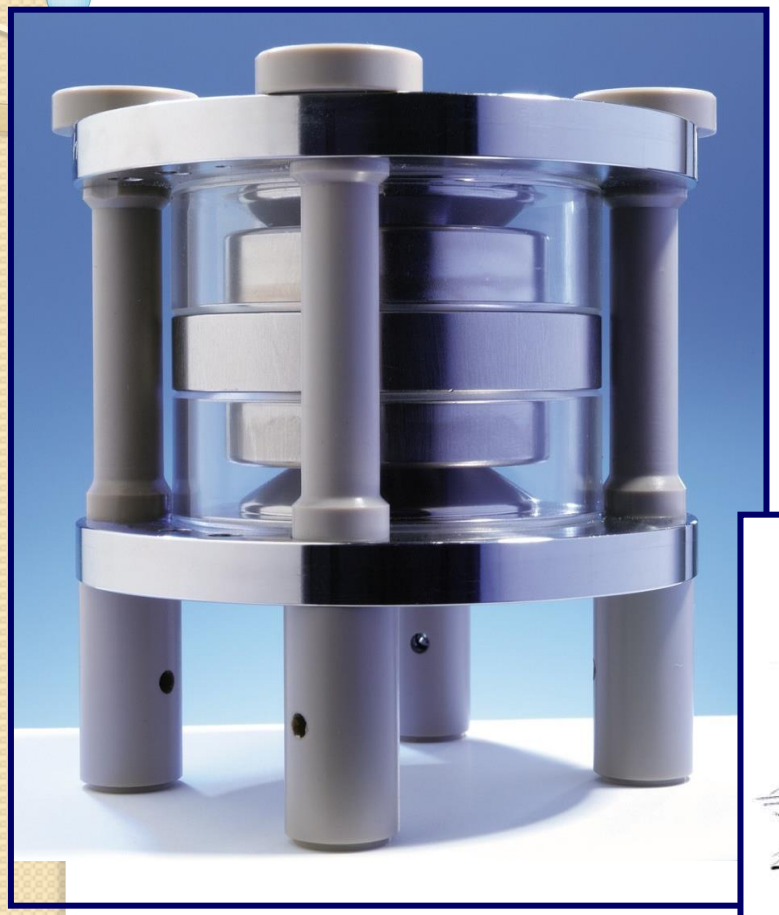
Nachteile der QqQ Technologie

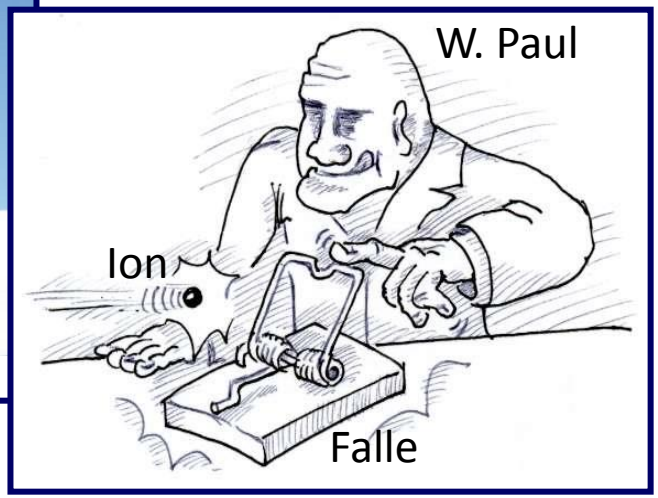
- Scan nötig, daher geringe full scan Empfindlichkeit
- Begrenzte Anzahl von Komponenten im MRM messbar (Zeit für jedes MS/MS ist begrenzt)
- Begrenzte Massengenauigkeit und begrenzte Massenauflösung

QqQ: Spinnenetz der Eigenschaften



3b. Ionenfallen



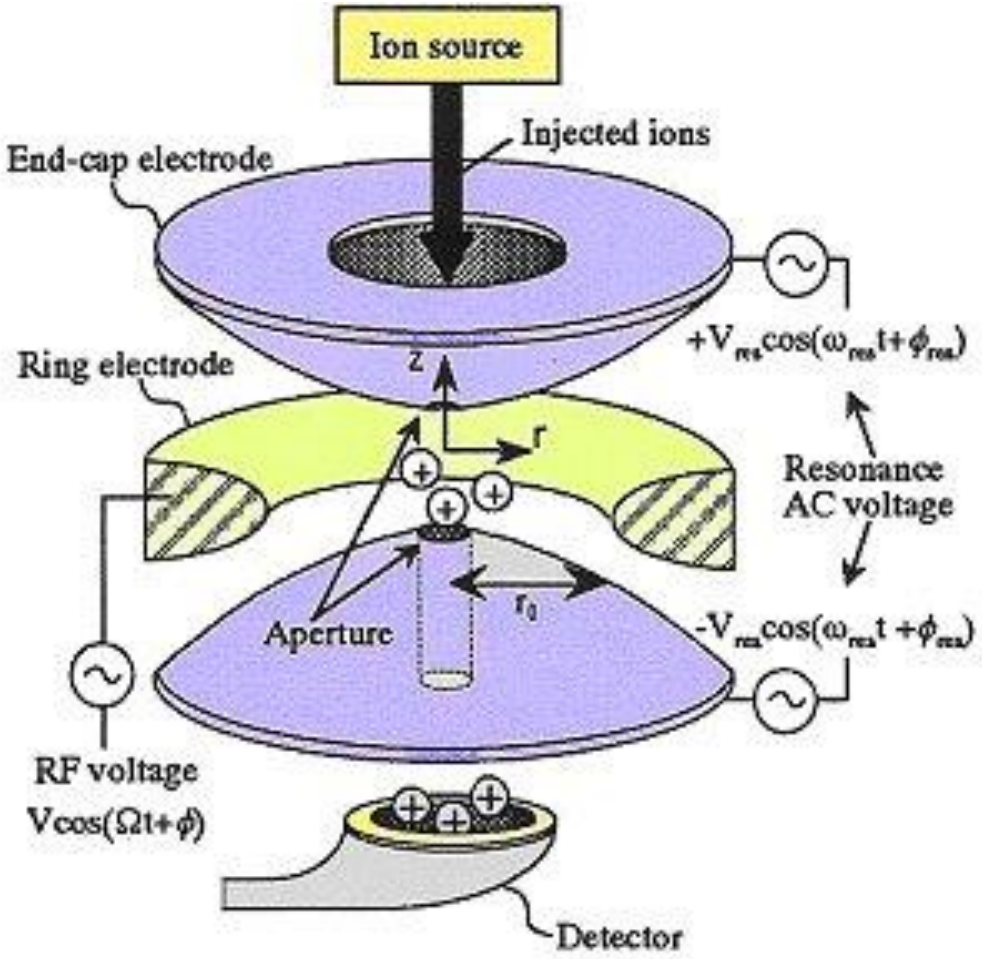


LC-ESI Ion Trap MS - Short History

1952:	Invention of the first ion trap by Wolfgang Paul
1953/4:	German and US patents were granted
1970s:	First attempts of HPLC-MS coupling
1980s:	Electrospray ionisation was developed by John Fenn and co-workers
1985s:	First GC ion traps by Bruker and Thermo
1989:	Nobel Prize in Physics awarded to Wolfgang Paul & Hans-Georg Dehmelt
1995:	First ESI traps by Thermo and Bruker

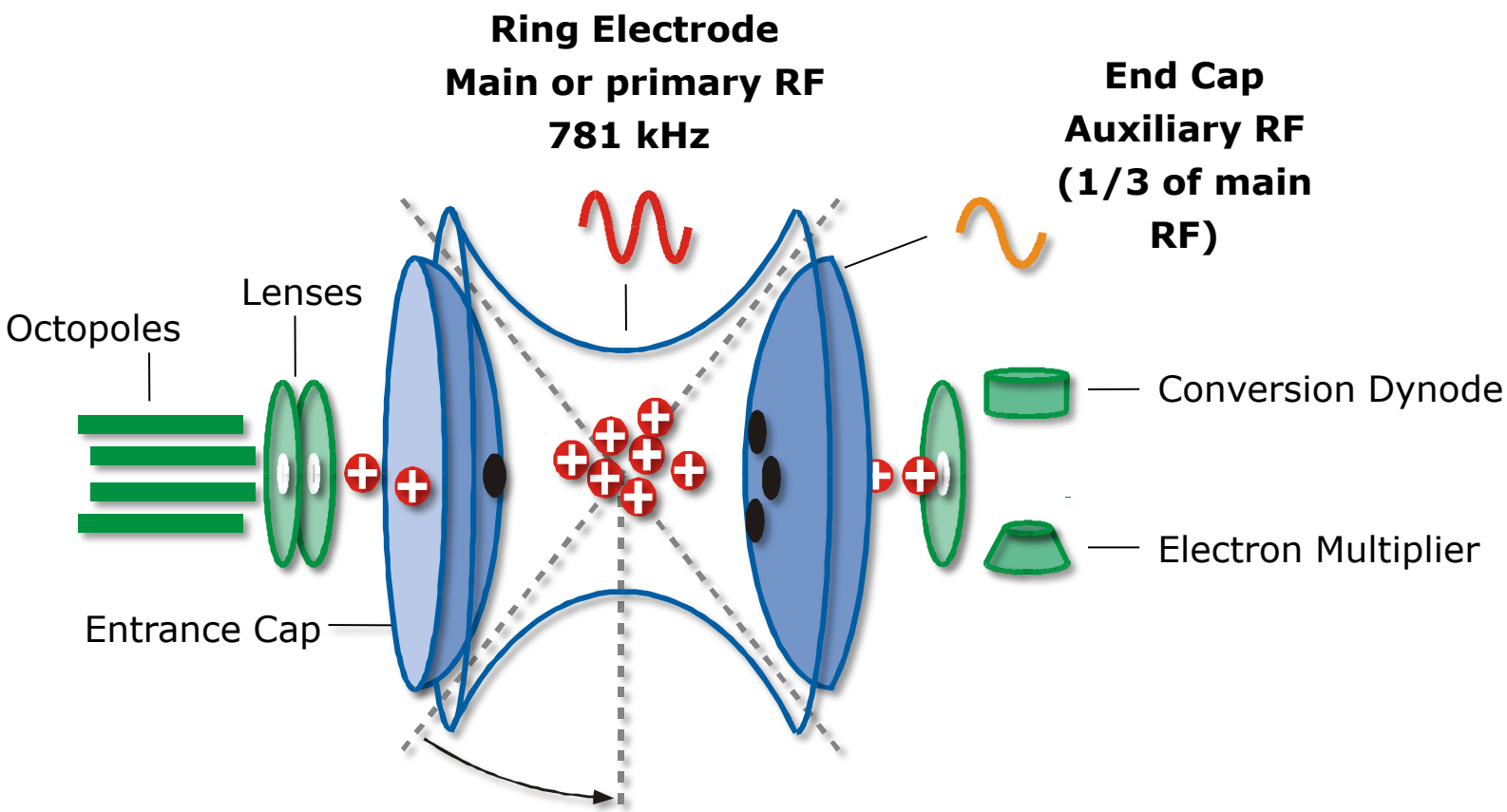
Wolfgang Paul
1913-1993

Aufbau der Ionenfalle



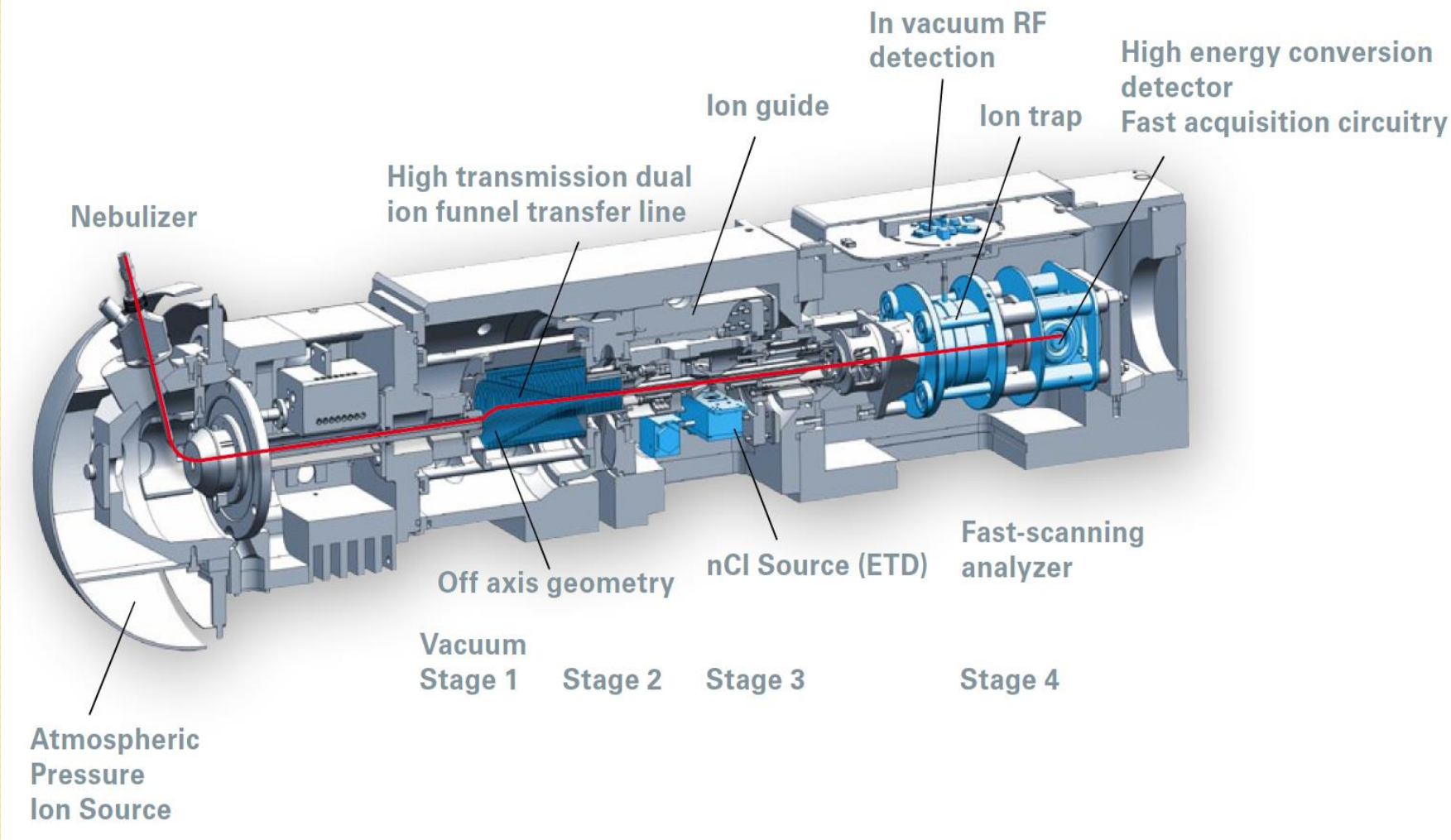
J.H.Gross: Mass Spectrometry. A Textbook

Aufbau der Ionenfalle

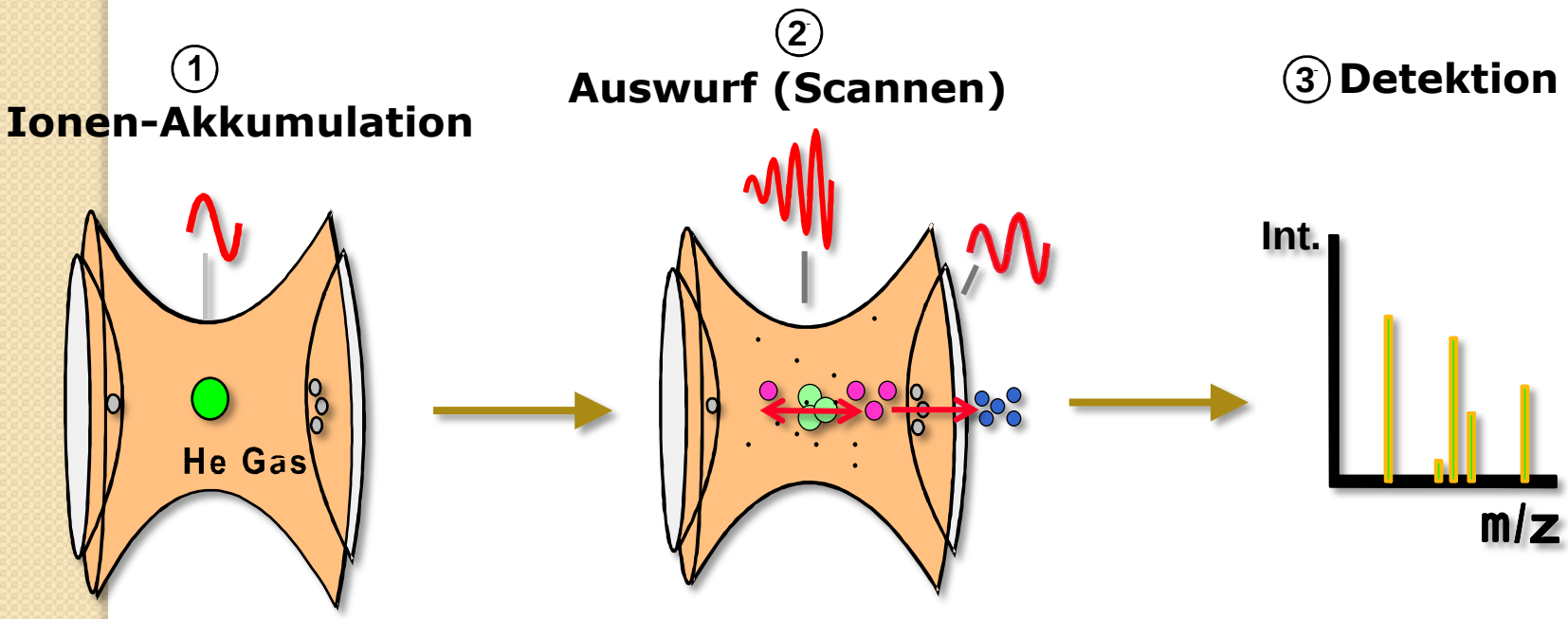


Ion trap operations are controlled by voltages (amplitudes) of primary and auxiliary RF

Aufriss eines Ionenfallen-Massenspektrometers



Erzeugung eines Massenspektrums

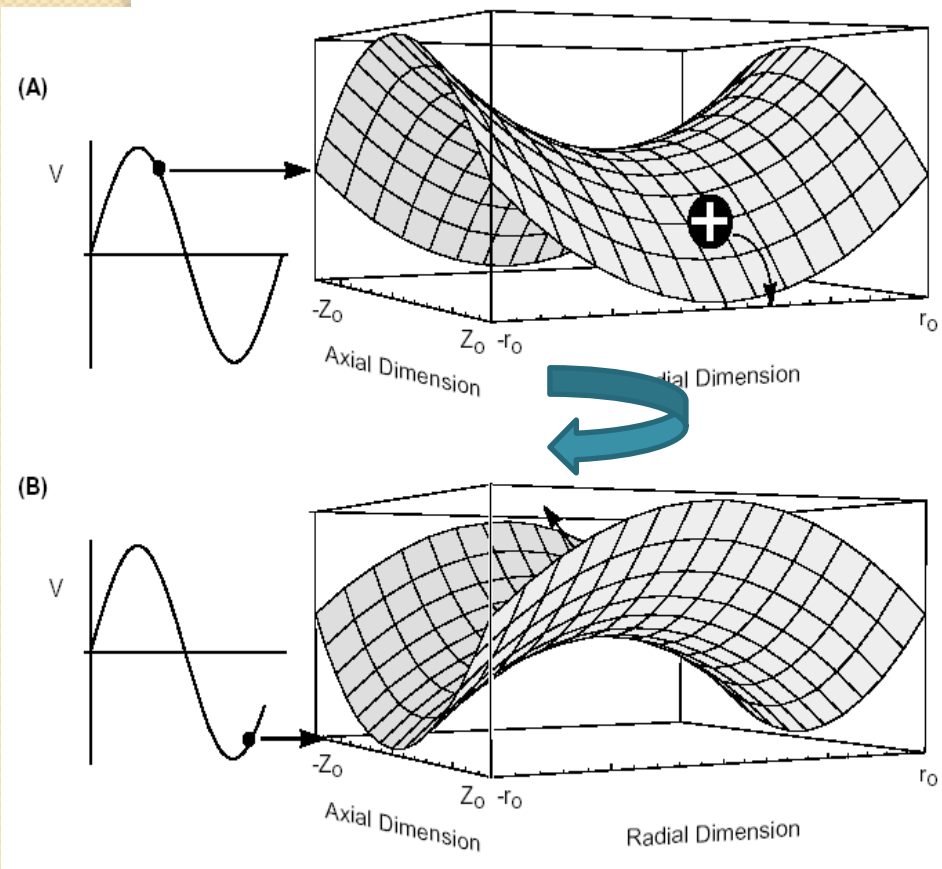


Trapping of the ions in a 3-dimensional multipolar field.

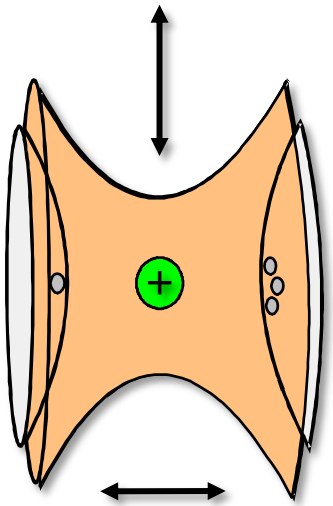
Scanning the ions out of the trap by increasing RF amplitudes and measure the response at the detector.

1. Akkumulation und Speicherung von Ionen in der Paul Falle

Application of an RF potential to the ring electrode generates a 3-dimensional trapping field.



trapping in **radial** direction

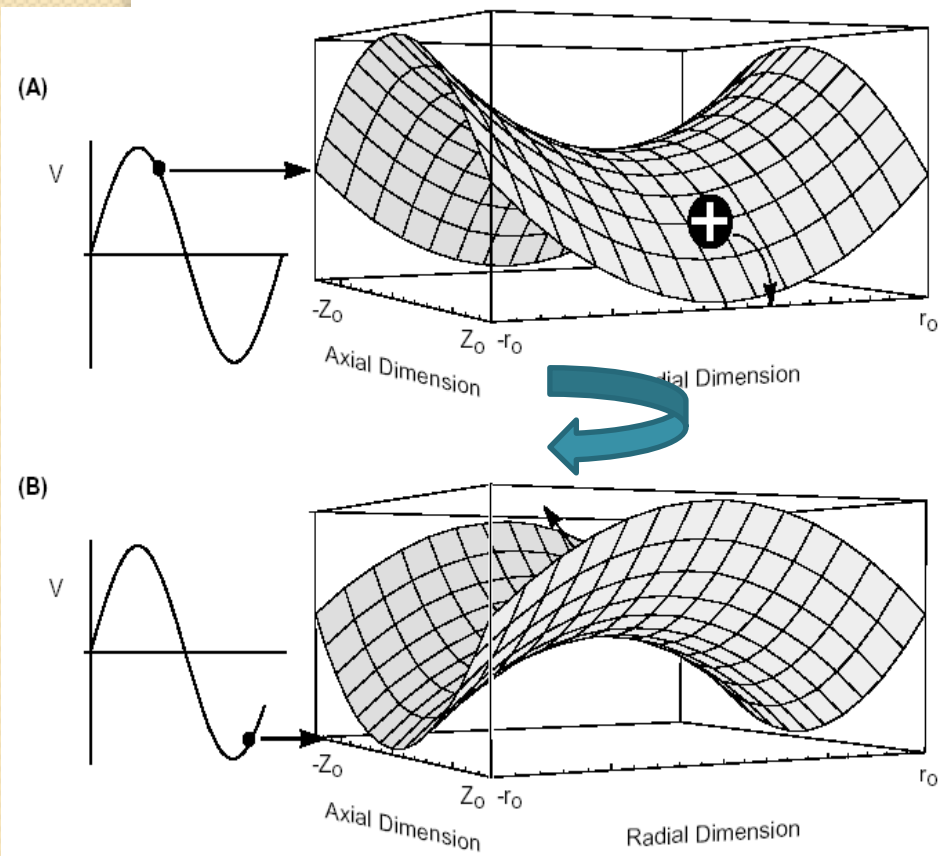


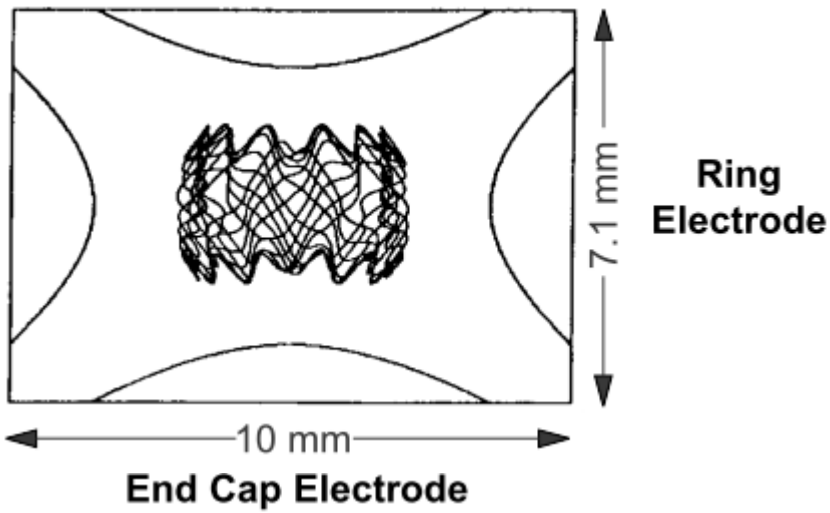
trapping in **axial** direction

Wong and Cooks: Ion Trap Mass Spectrometry

1. Akkumulation und Speicherung von Ionen in der Paul Falle

Application of an RF potential to the ring electrode generates a 3-dimensional trapping field.

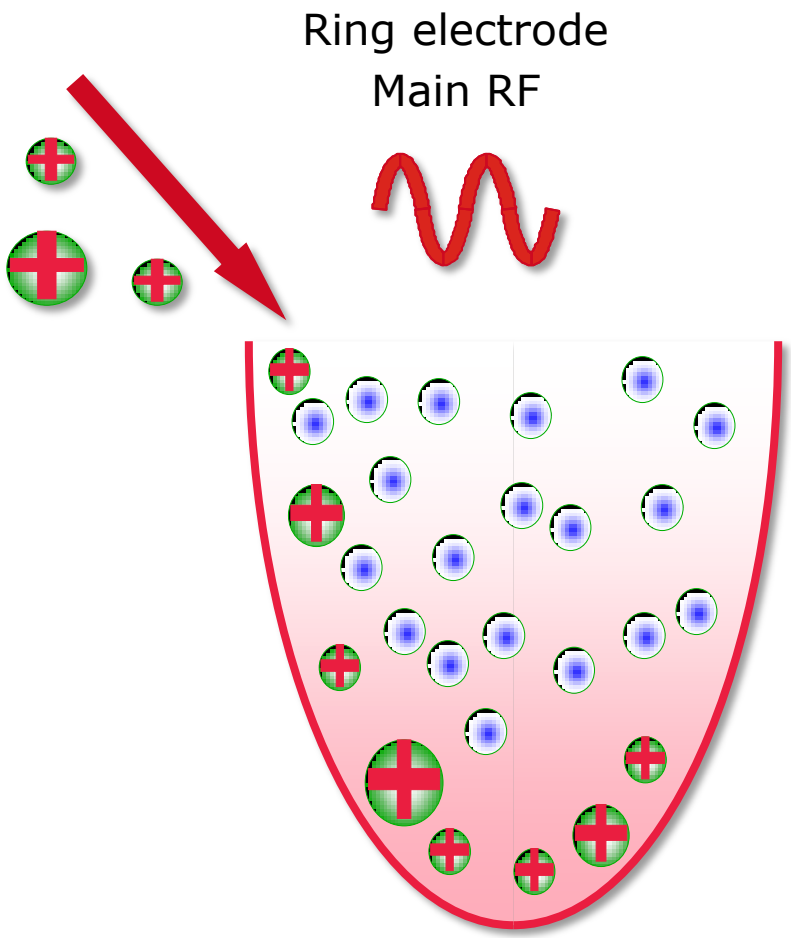




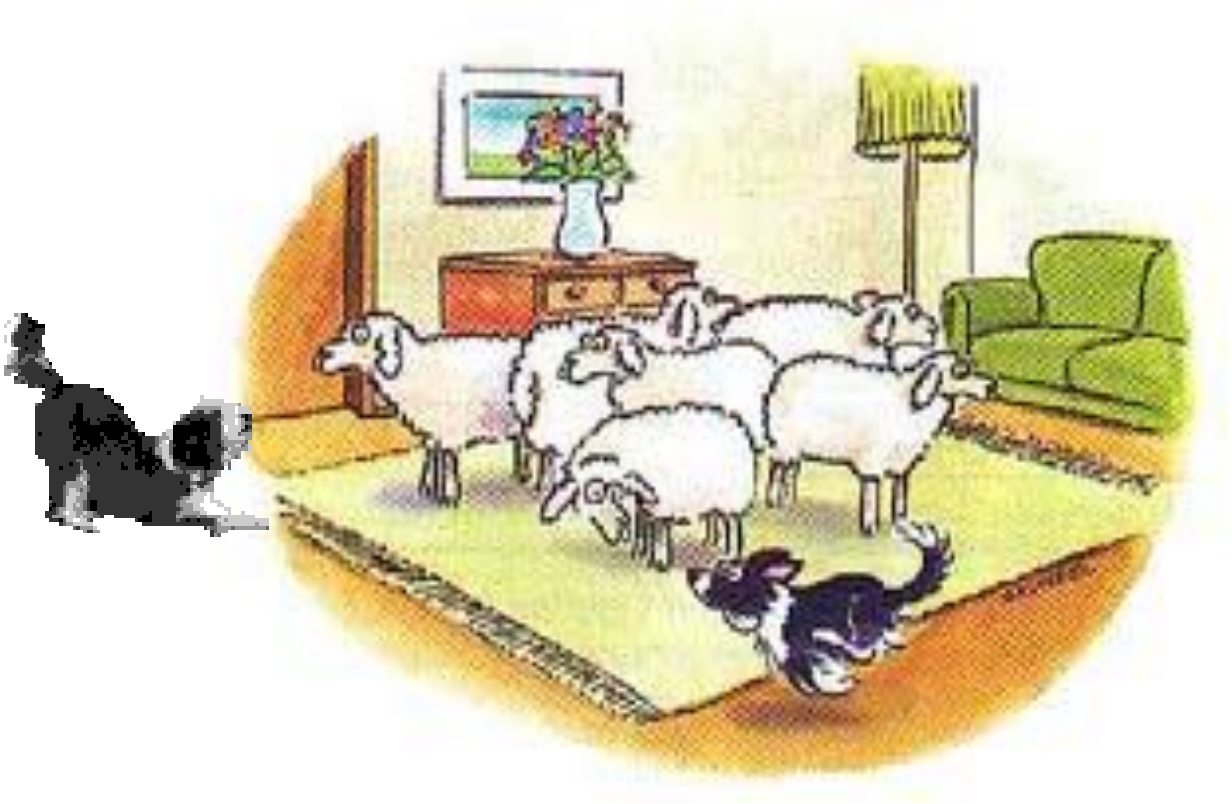
Wong and Cooks: Ion Trap Mass Spectrometry

1. Akkumulation und Speicherung von Ionen in der Paul Falle

- The main RF applied to the ring electrode forms a `trapping pseudo-potential well´ that enables ion storage;
  so one can think of the ions rolling downhill and getting trapped in the well.
- A **repelling potential** applied to the end cap enhances trapping efficiency.
- **Damping** of the ions: Due to collisions with helium the ions loose kinetic energy and are focused in the centre of the trap.
- The ions oscillate in the center of the trap. The ion cloud is typically 2 mm in diameter.



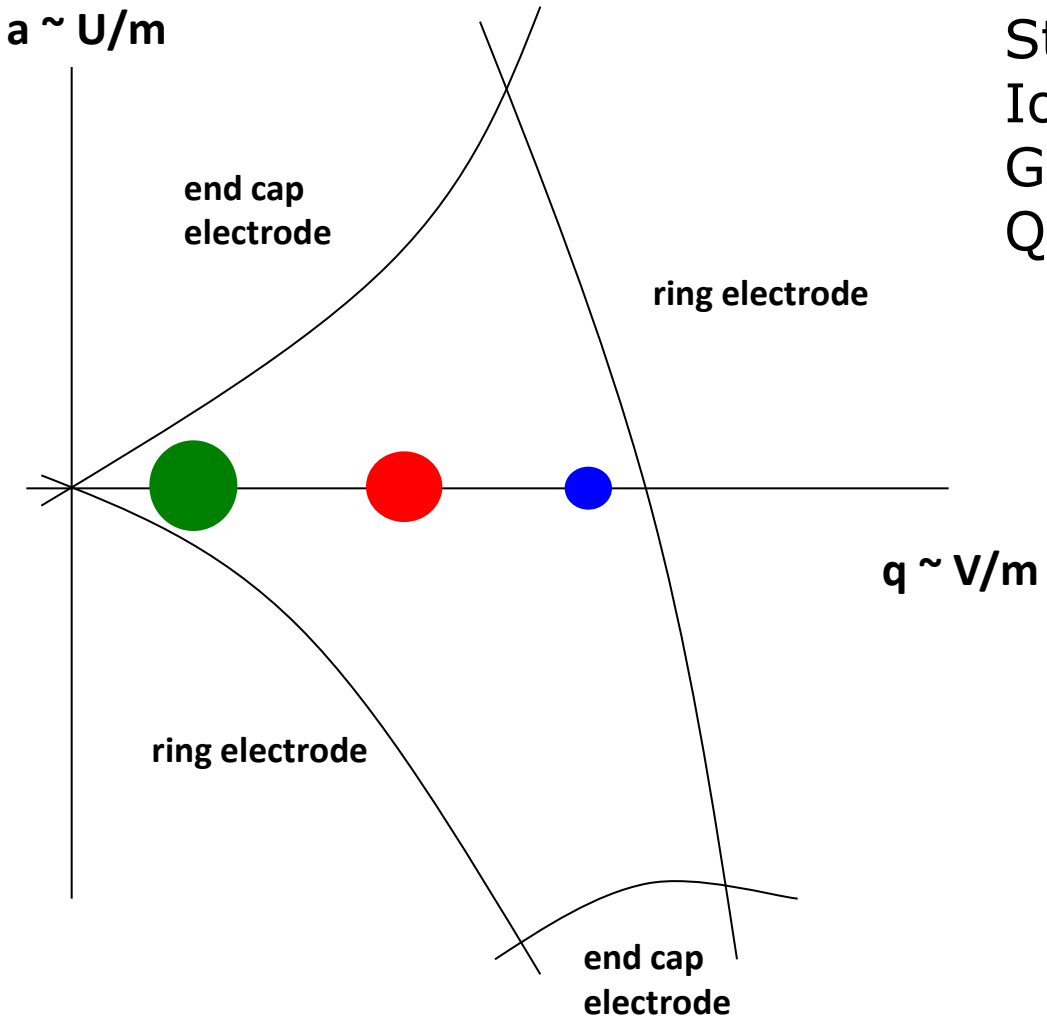
1. Akkumulation und Speicherung von Ionen in der Paul Falle



Ions are focused in the centre of the trap by collisions with helium.

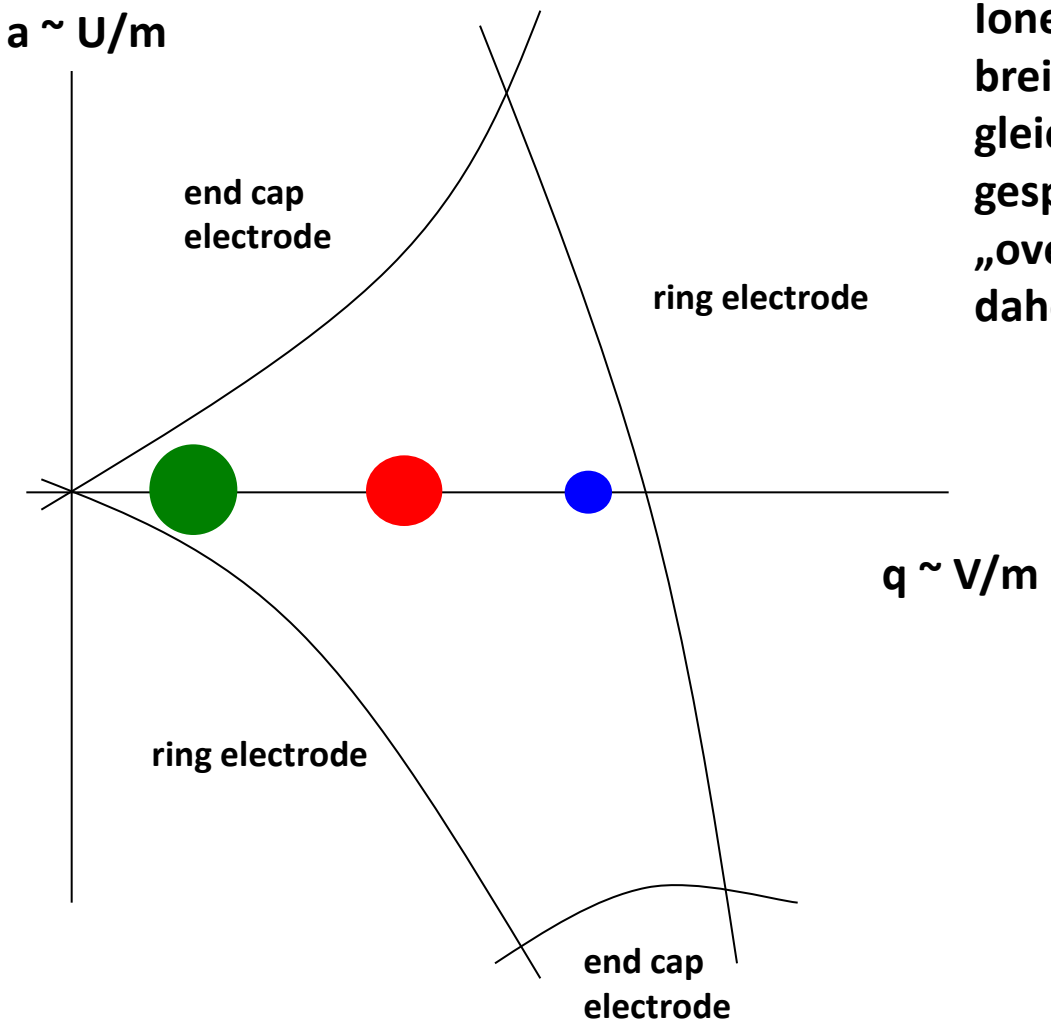
This focusing process is comparable to a flock of sheep which is herded together by sheepdogs.

1. Akkumulation und Speicherung von Ionen in der Paul Falle



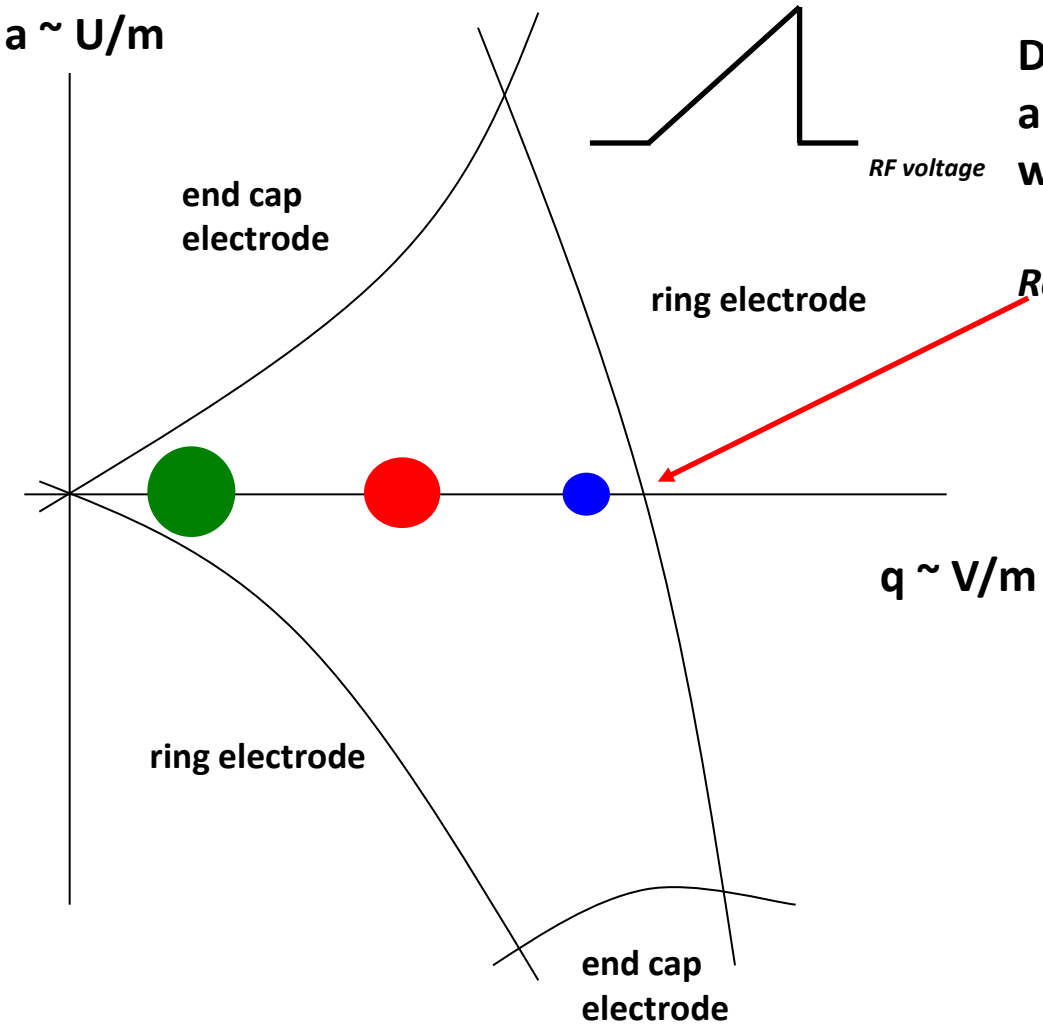
Stabiler Bereich für Ionen (Mathieu Gleichung wie im QqQ, aber mit $U_{=} = 0$)

1. Akkumulation und Speicherung von Ionen in der Paul Falle



Ionen über einen möglichst breiten m/z Bereich sollen gleichzeitig in der Falle gespeichert werden (vgl. „overlapping area“ im QqQ, daher auch $U_{=}$ =0)

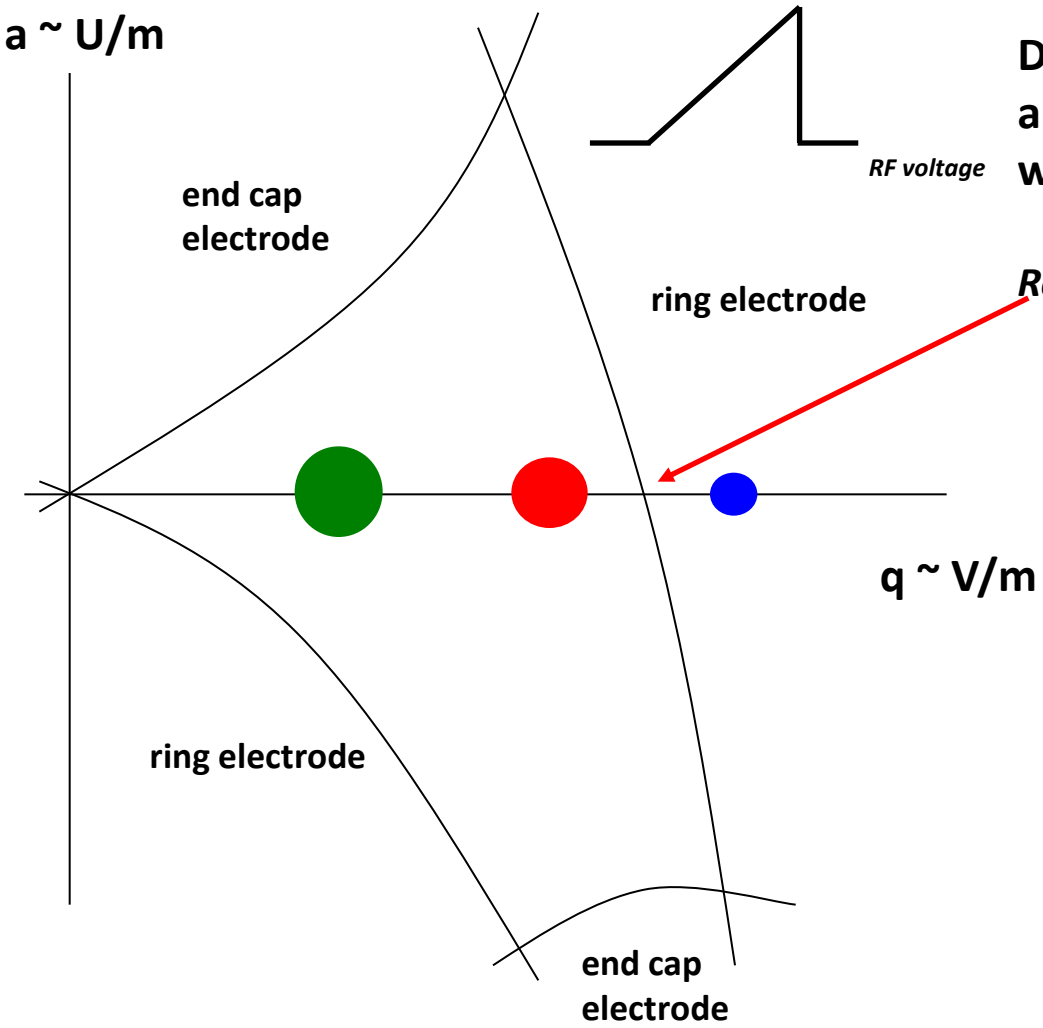
2. Auswurf (Scannen) der Ionen aus der Falle heraus



Die Wechselspannungs-amplitude $V_{\sim}$ der Ringelektrode wird nun erhöht

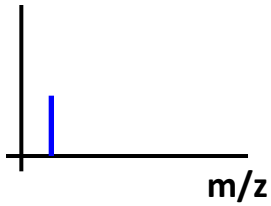
Resonanter axialer Auswurf

2. Auswurf (Scannen) der Ionen aus der Falle heraus

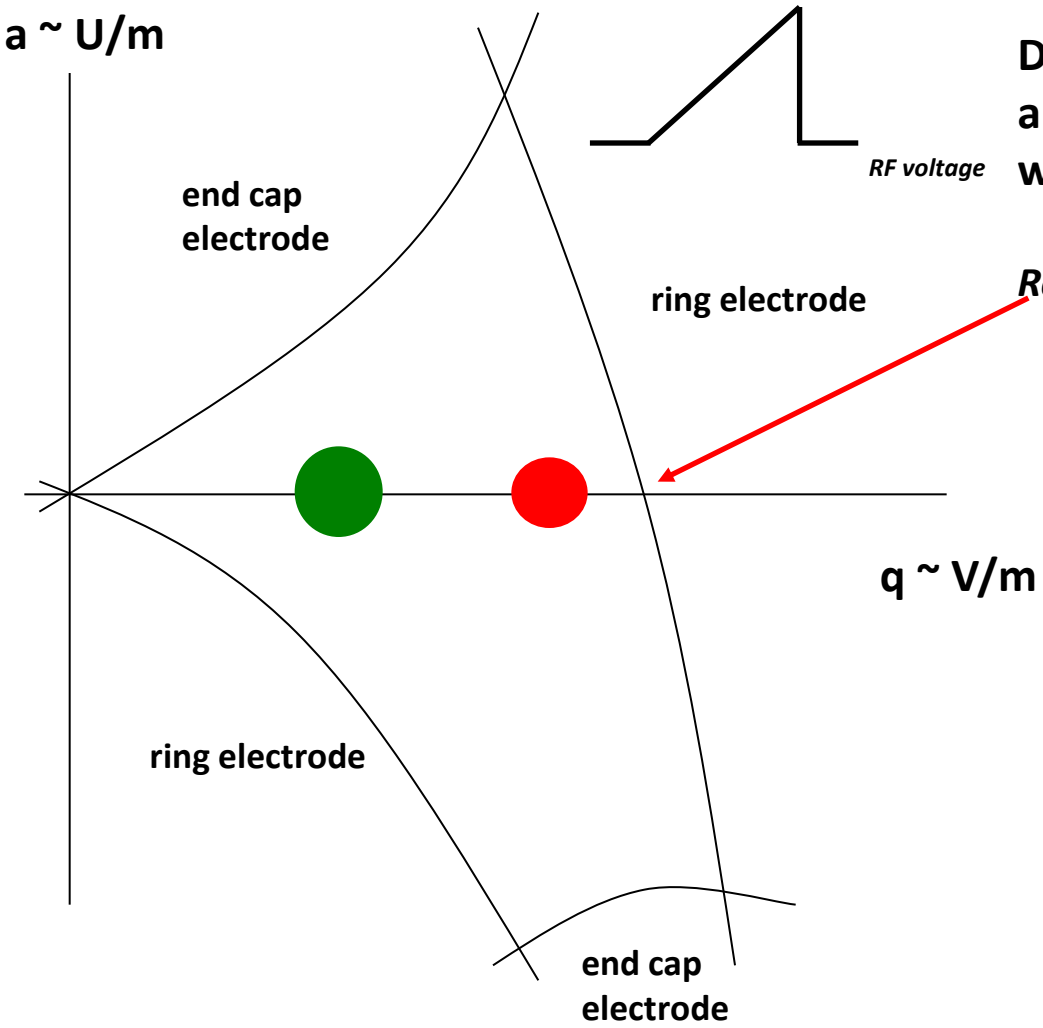


Die Wechselspannungs-amplitude $V_{\sim}$ der Ringelektrode wird nun erhöht

Resonanter axialer Auswurf

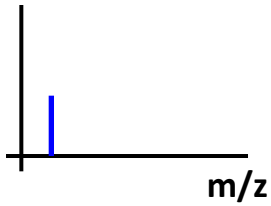


2. Auswurf (Scannen) der Ionen aus der Falle heraus

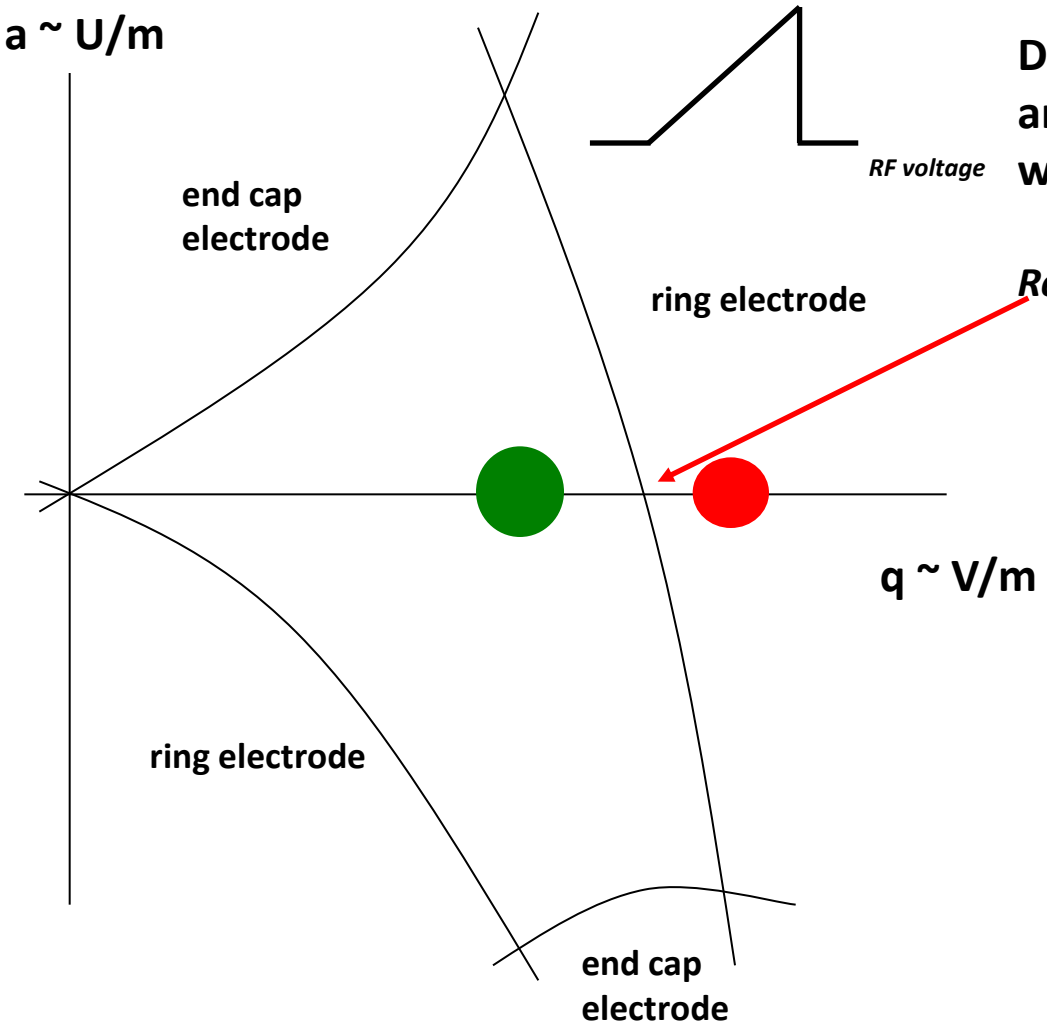


Die Wechselspannungs-amplitude $V_{\sim}$ der Ringelektrode wird nun erhöht

Resonanter axialer Auswurf

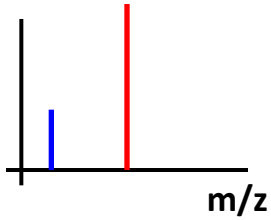


2. Auswurf (Scannen) der Ionen aus der Falle heraus

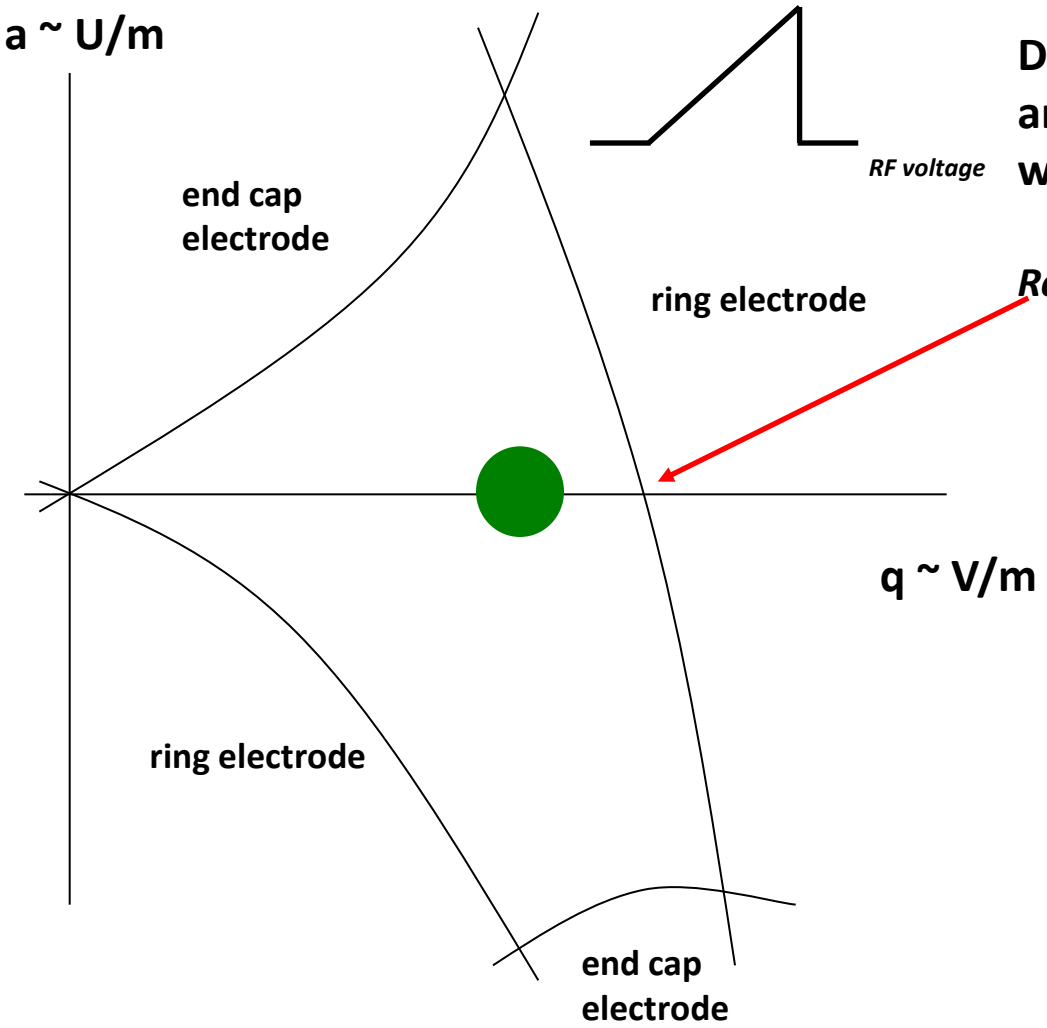


Die Wechselspannungs-amplitude V der Ringelektrode wird nun erhöht

Resonanter axialer Auswurf

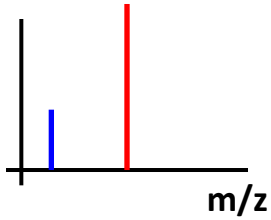


2. Auswurf (Scannen) der Ionen aus der Falle heraus

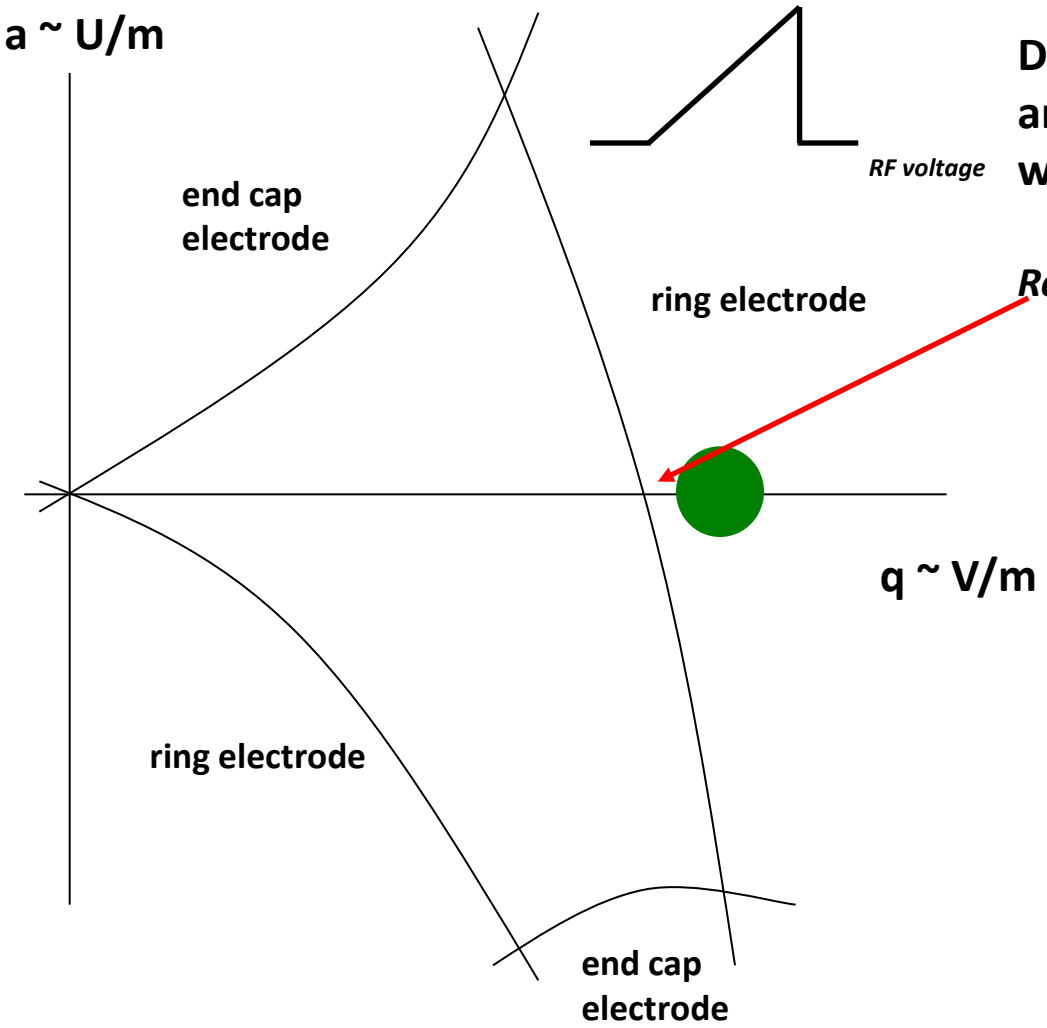


Die Wechselspannungs-amplitude V der Ringelektrode wird nun erhöht

Resonanter axialer Auswurf

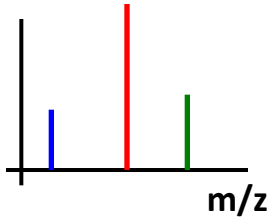


2. Auswurf (Scannen) der Ionen aus der Falle heraus

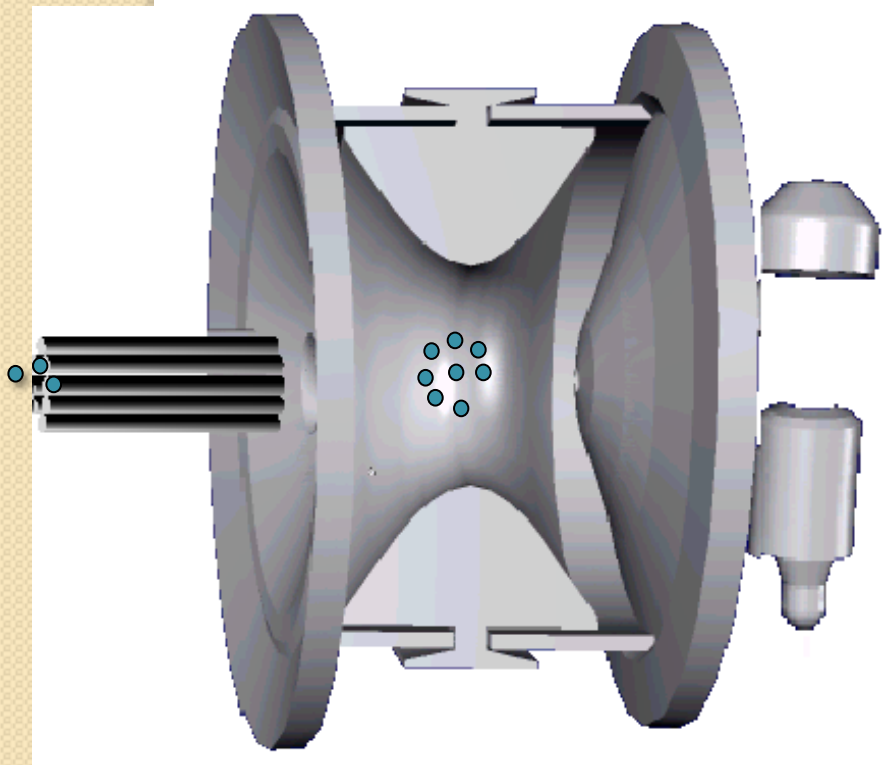


Die Wechselspannungs-amplitude V der Ringelektrode wird nun erhöht

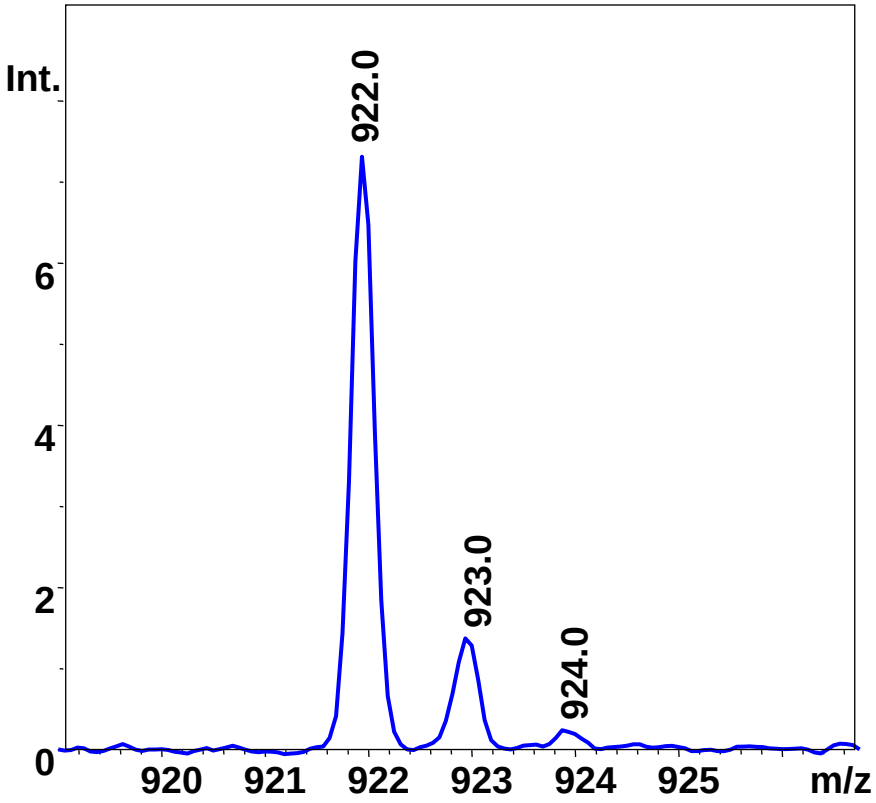
Resonanter axialer Auswurf



Wichtig: die Anzahl der gespeicherten Ionen muss kontrolliert und begrenzt werden

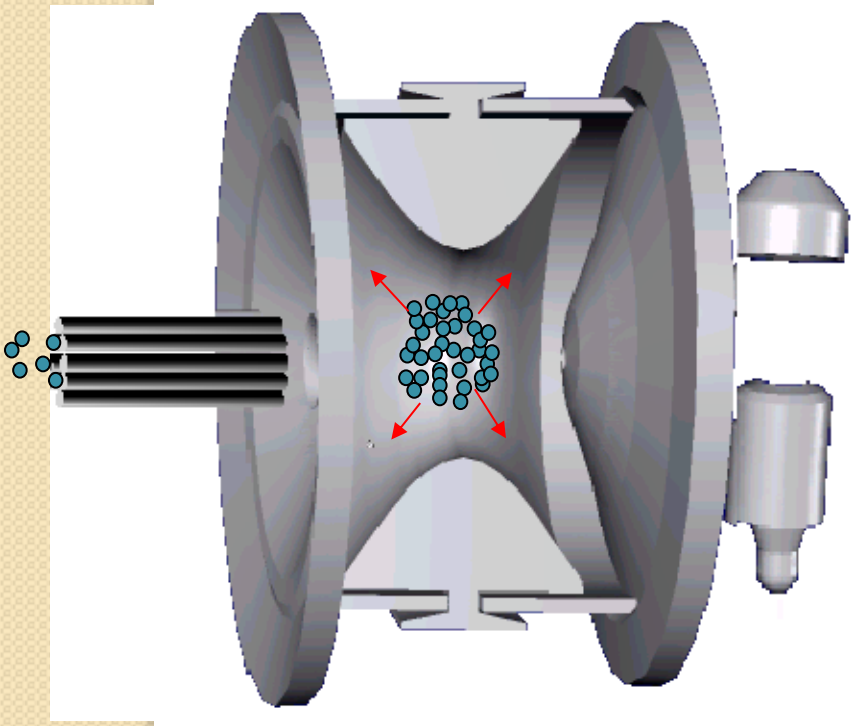


Calibrant with theoretical m/z = 922.01

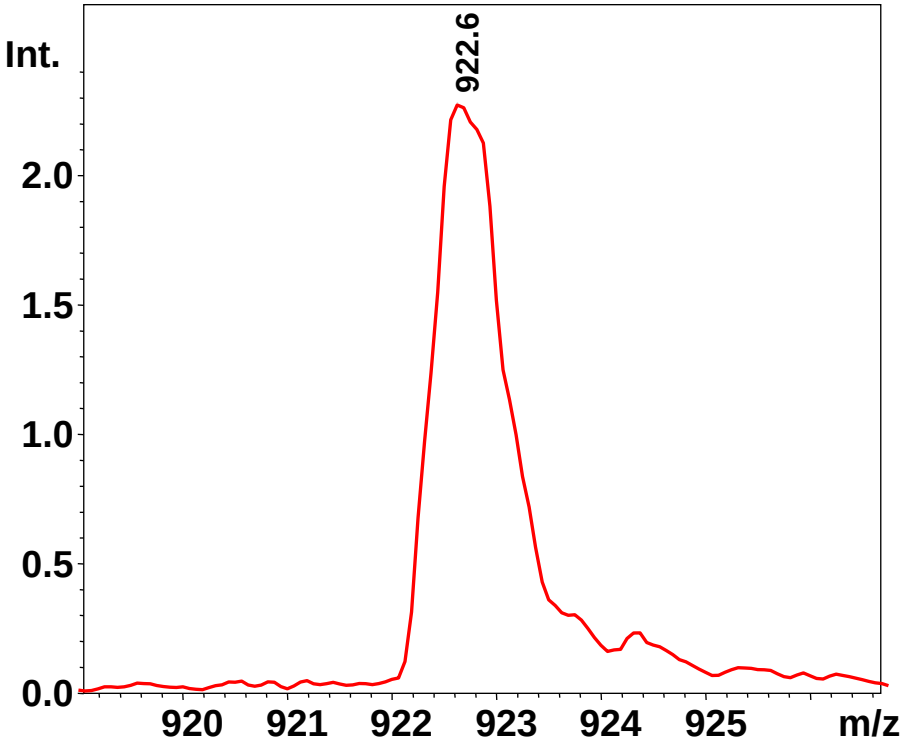


Geeignete Beladung der Falle resultiert in guter Massenauflösung

Wichtig: die Anzahl der gespeicherten Ionen muss kontrolliert und begrenzt werden



Calibrant with theoretical m/z = 922.01



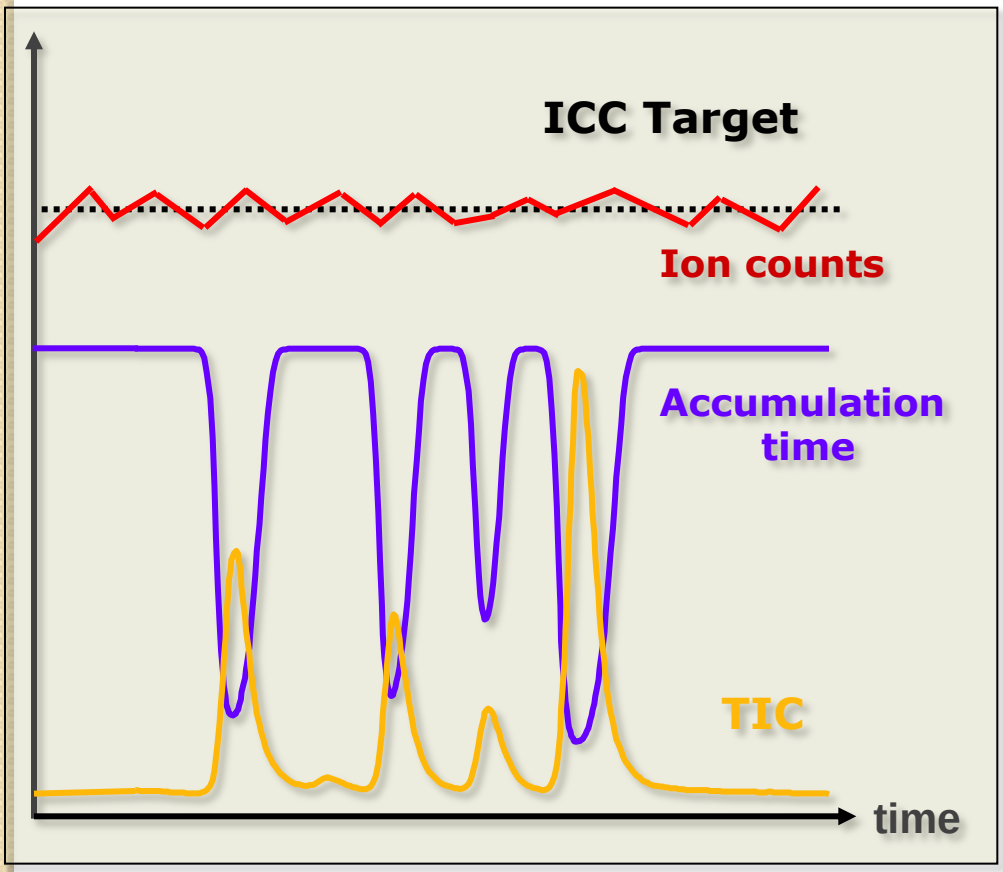
Zu viele Ionen: **Überladung** !

Ein zusätzliches Feld wird durch die hohe Beladung erzeugt, die den Auswurf der Ionen beeinflusst

→

- schlechte Massenauflösung
- schlechte Massengenauigkeit

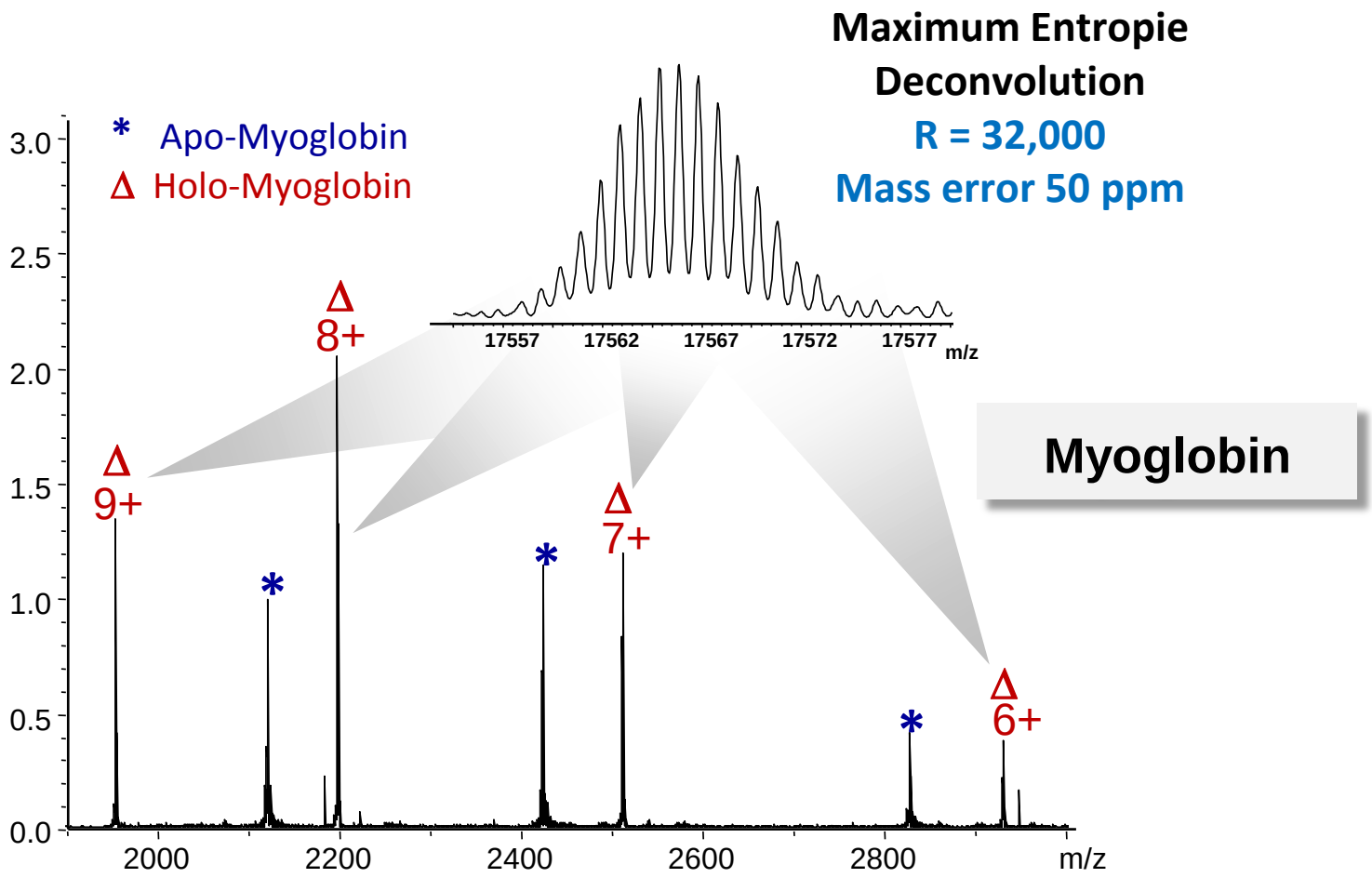
ICC = Ion Charge Control



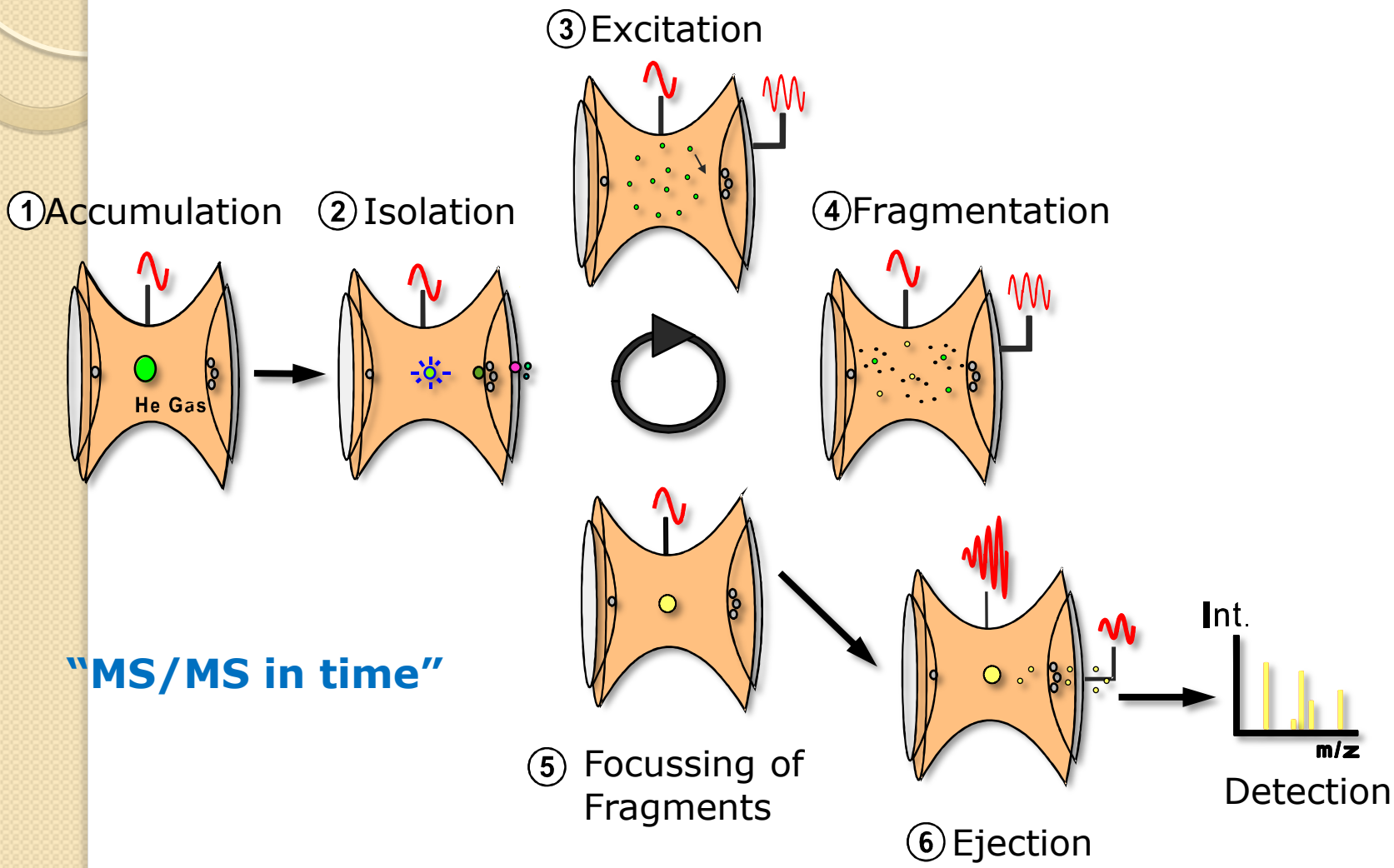
"Ion Charge Control" (ICC)

- Die Akkumulationszeit wird automatisch eingeregelt, indem der Intensitätsverlauf der vorangehenden Spektren extrapoliert wird.
- Es wird eine konstante Anzahl von Ionen in jedem Scan gespeichtert
- Der HPLC-Peak wird aus der Division der Anzahl der Ionen mit der Akkumulationszeit rekonstruiert.

Ionenfallen: hohe Massenauflösung, aber limitierte Massengenauigkeit

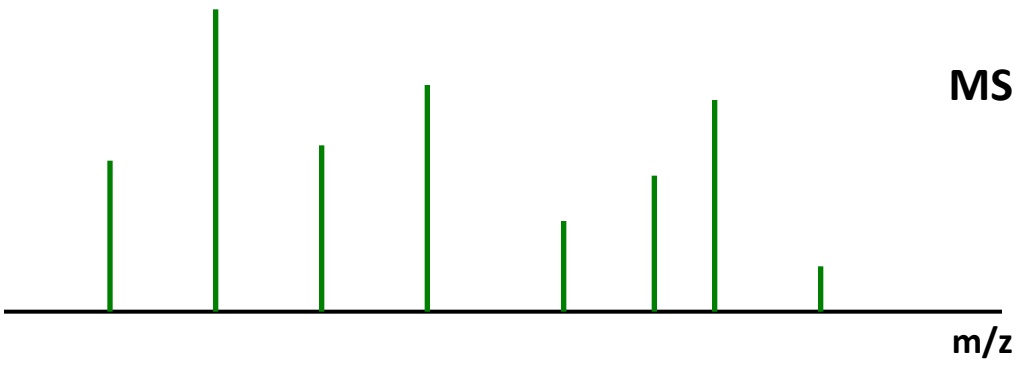


Erzeugung eines MS^n Spektrums

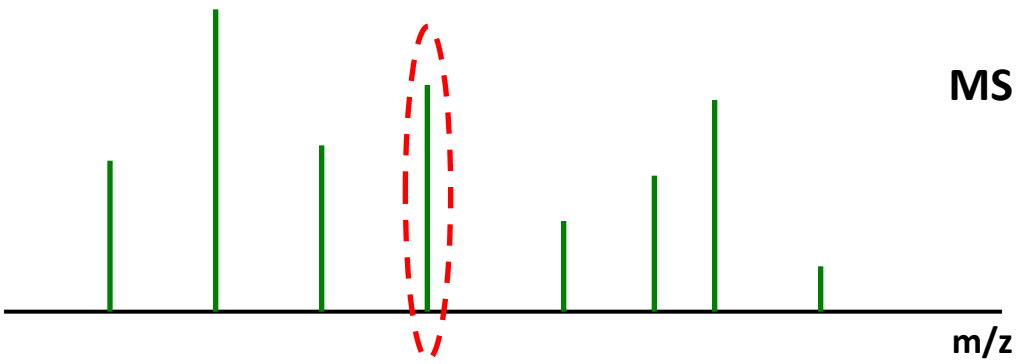


"MS/MS in time"

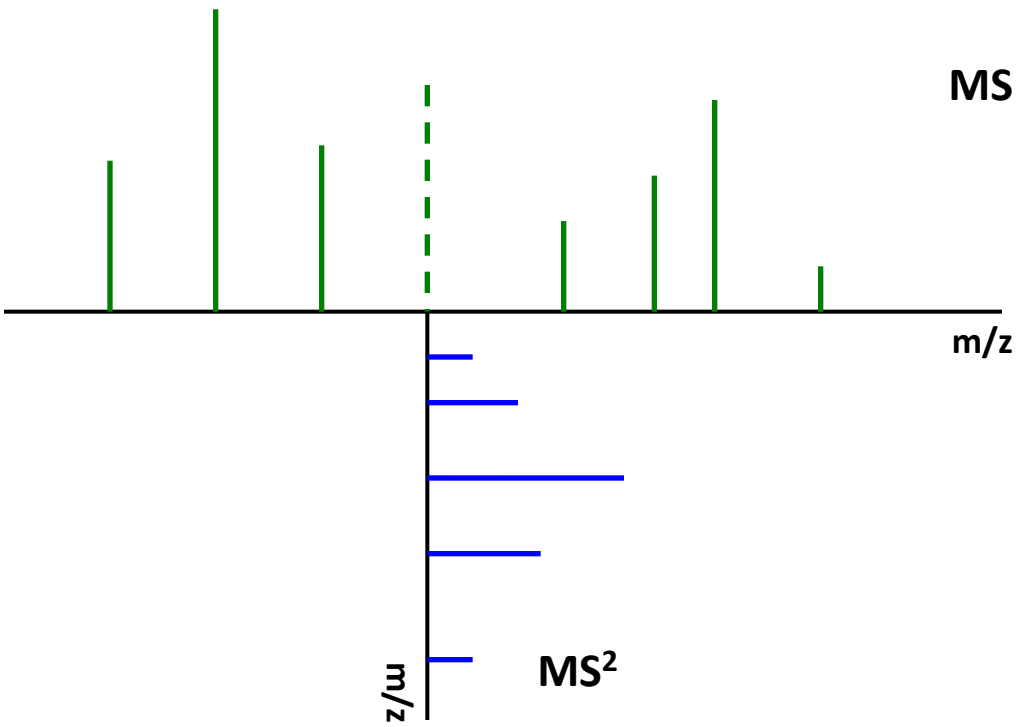
Erzeugung eines MS^n Spektrums



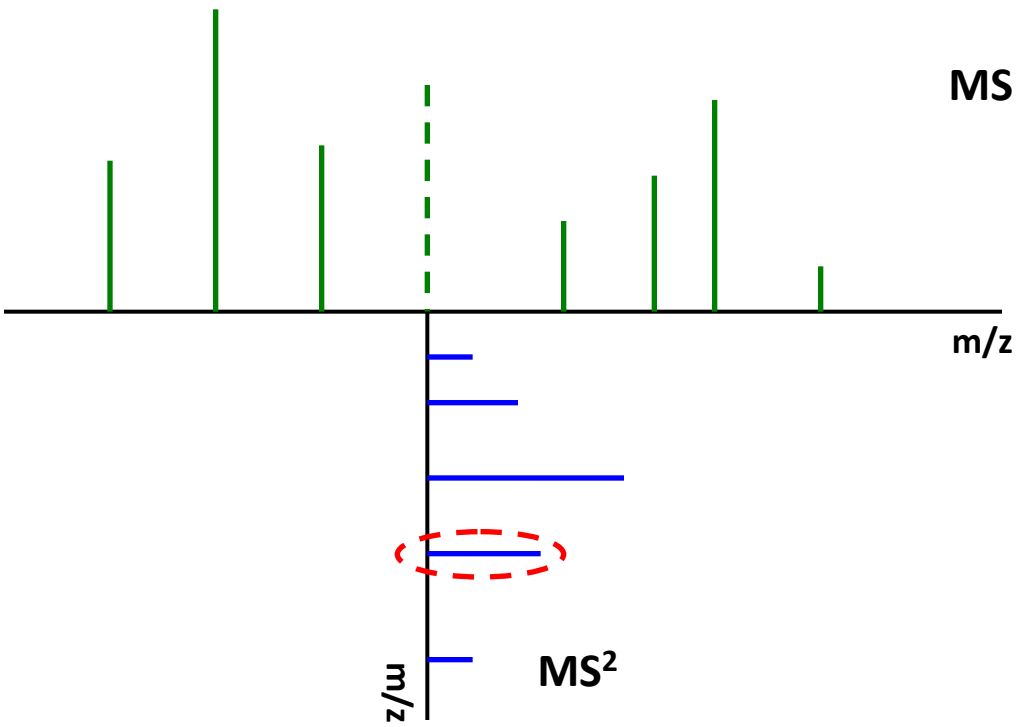
Erzeugung eines MS^n Spektrums



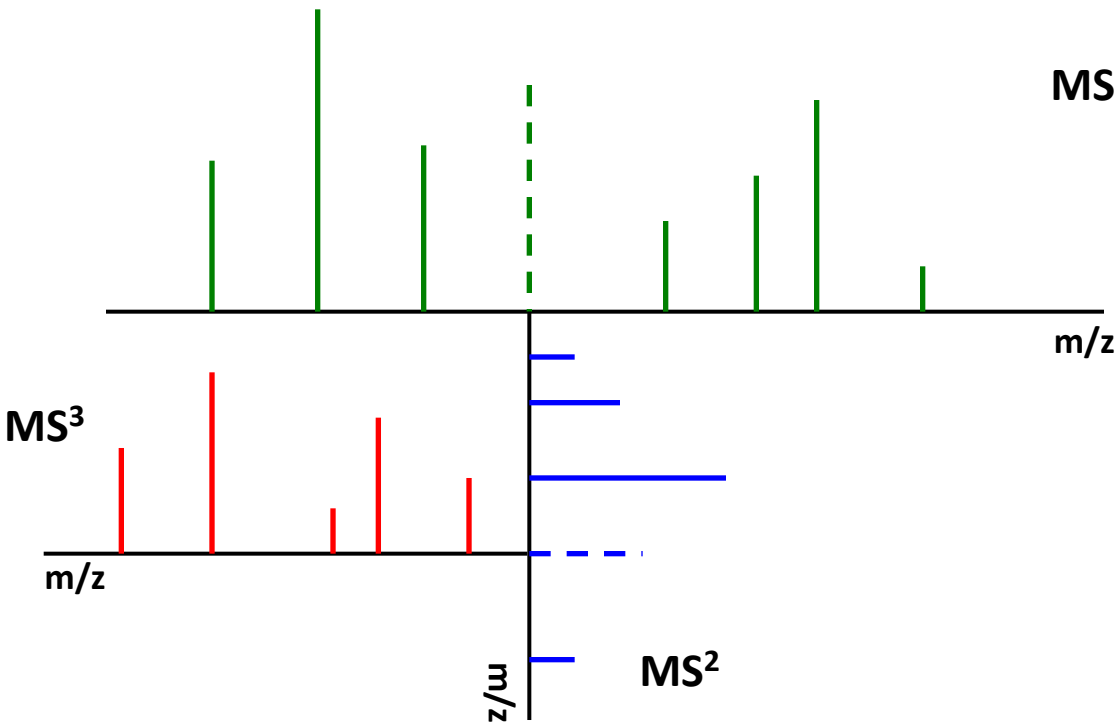
Erzeugung eines MS^n Spektrums



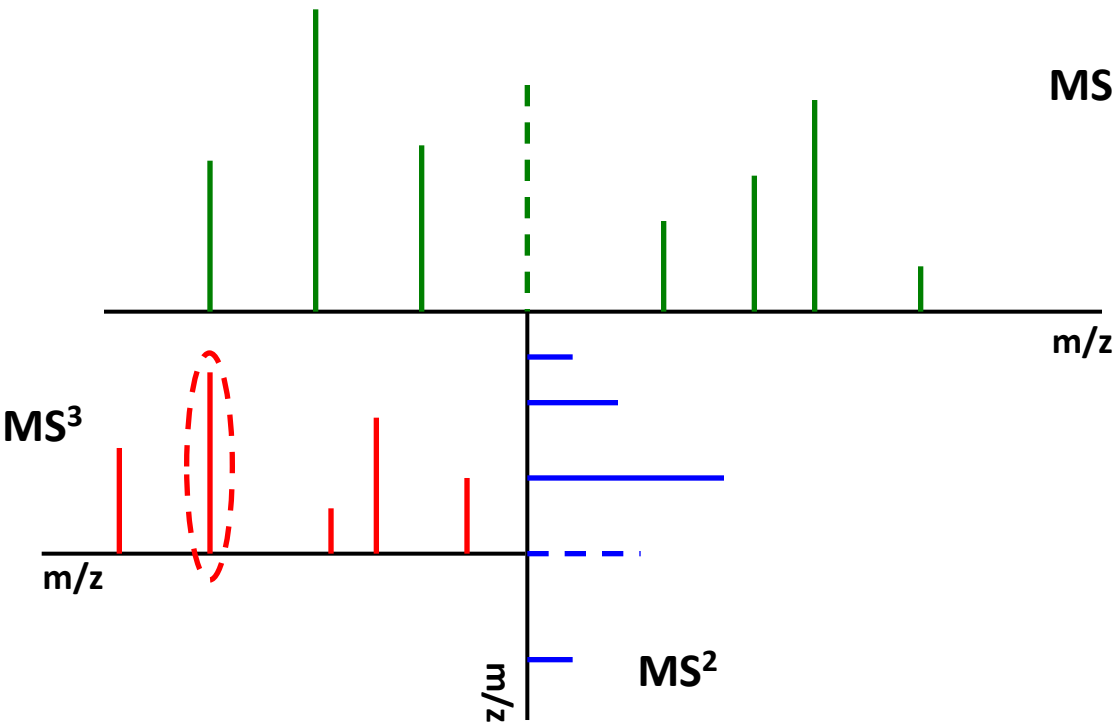
Erzeugung eines MS^n Spektrums



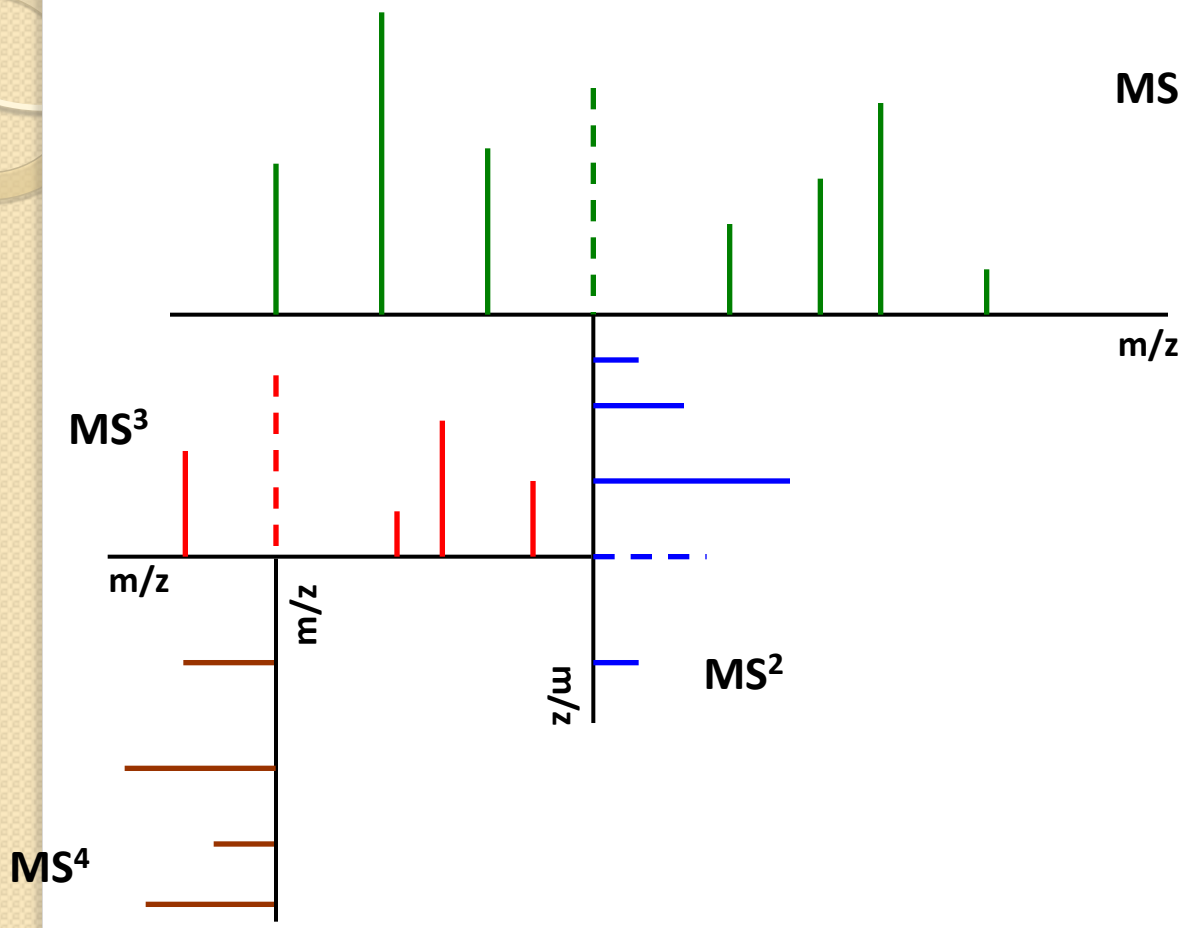
Erzeugung eines MS^n Spektrums



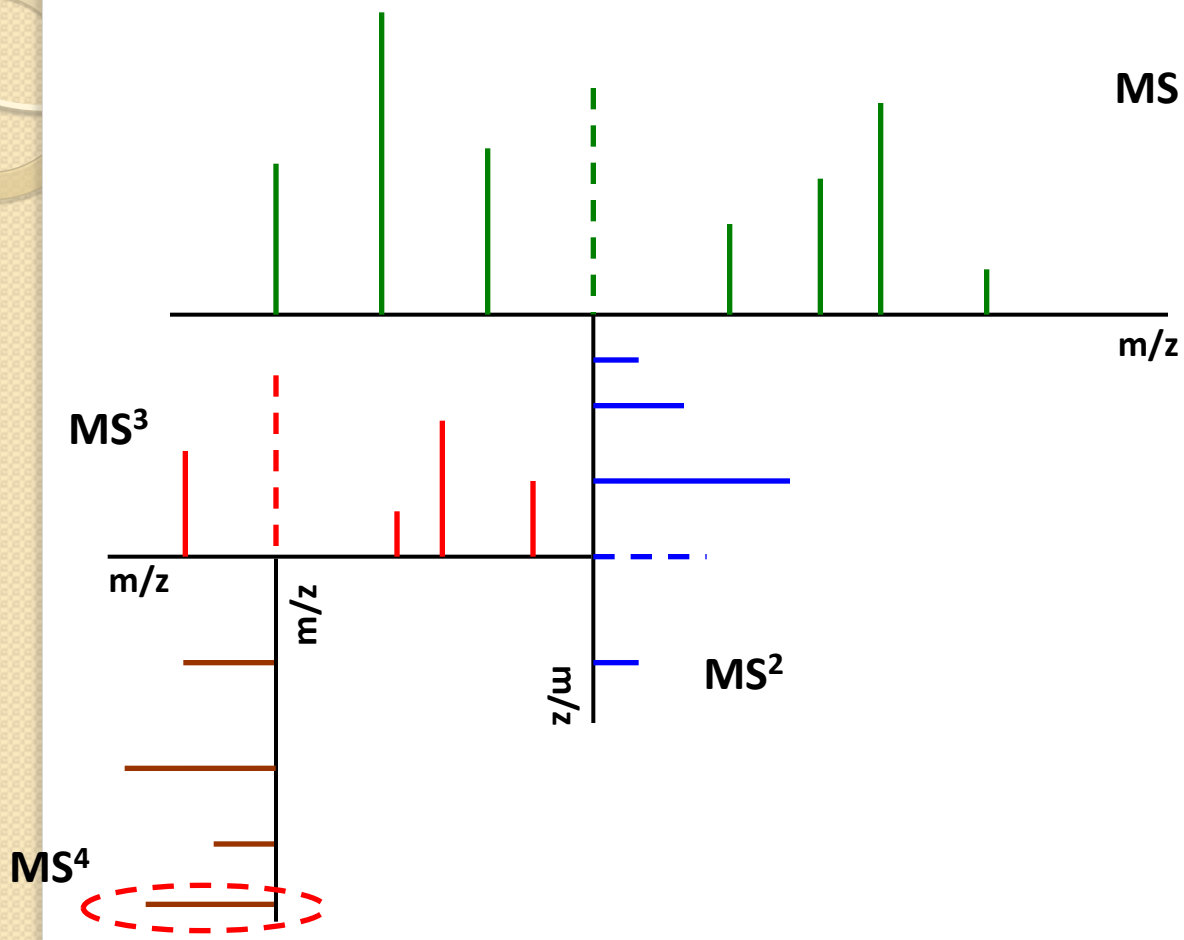
Erzeugung eines MS^n Spektrums



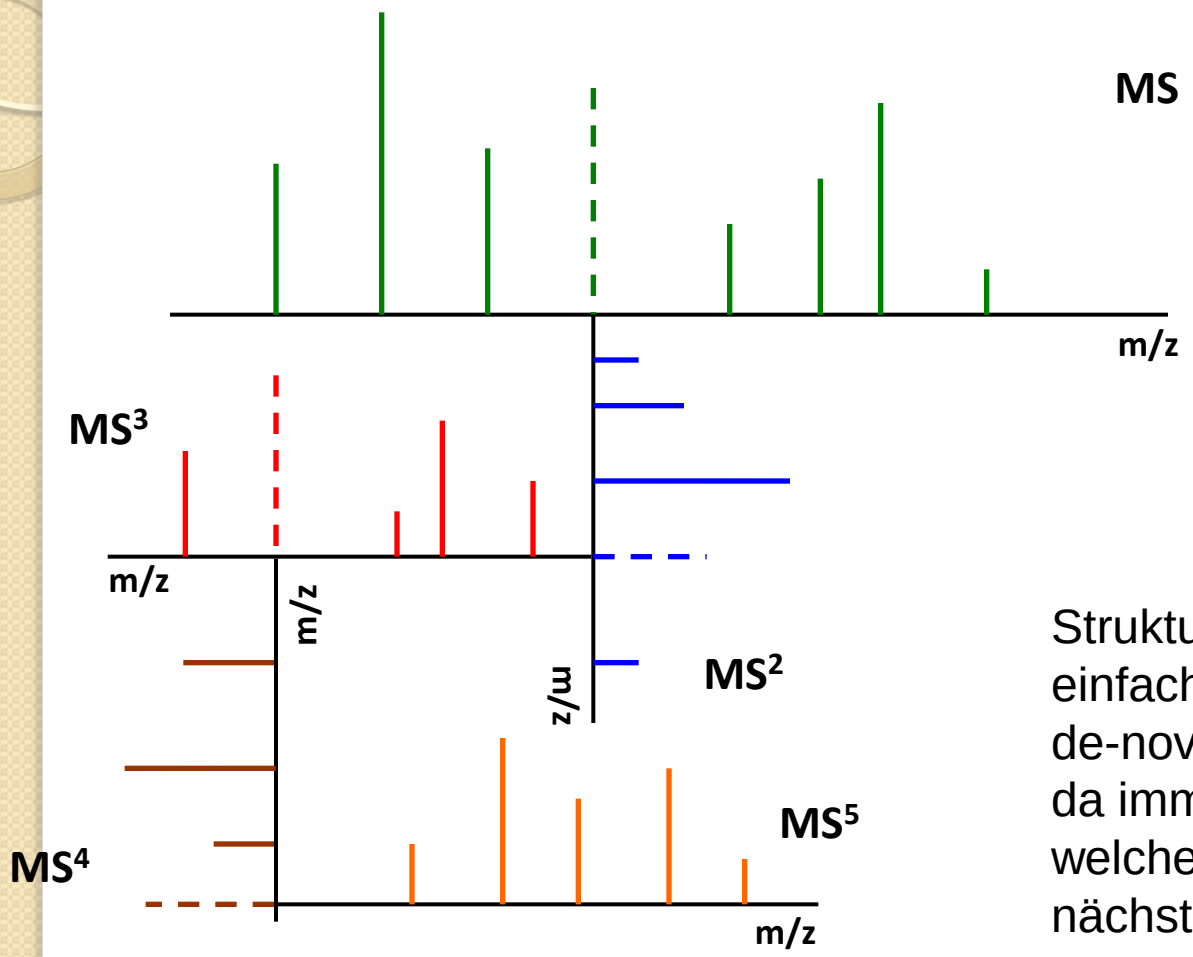
Erzeugung eines MS^n Spektrums



Erzeugung eines MS^n Spektrums

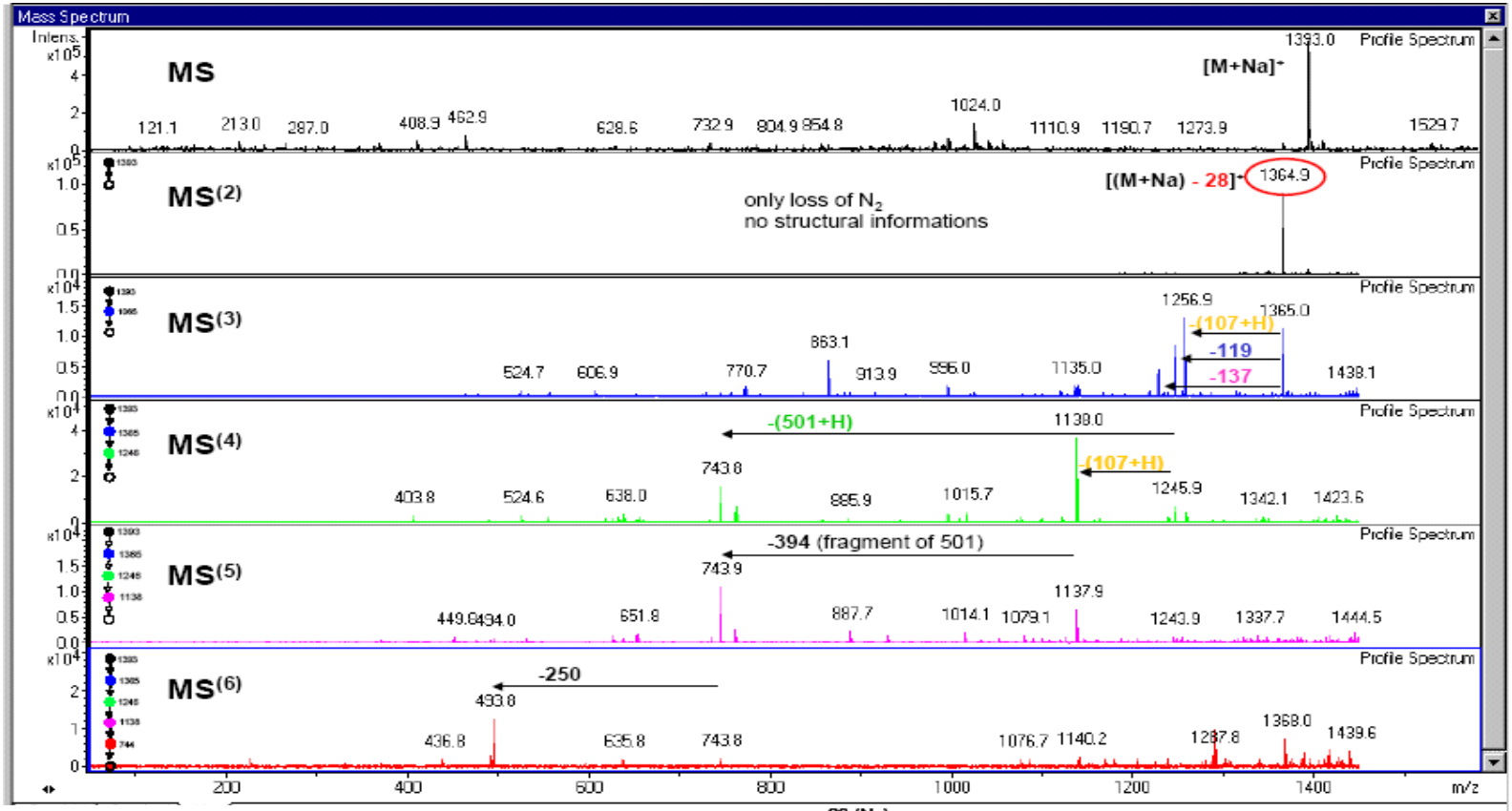


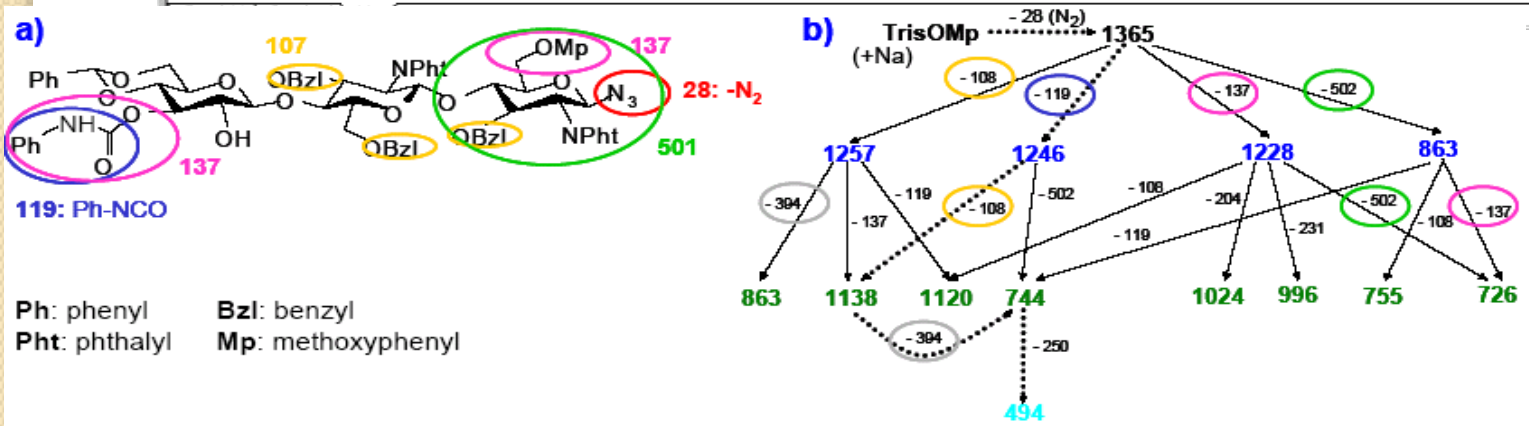
Erzeugung eines MS^n Spektrums



Strukturen können relativ einfach verifiziert oder sogar de-novo abgeleitet werden, da immer klar ist, von welchem Vorläufer das nächste Fragment stammt.

Erzeugung eines MS^n Spektrums



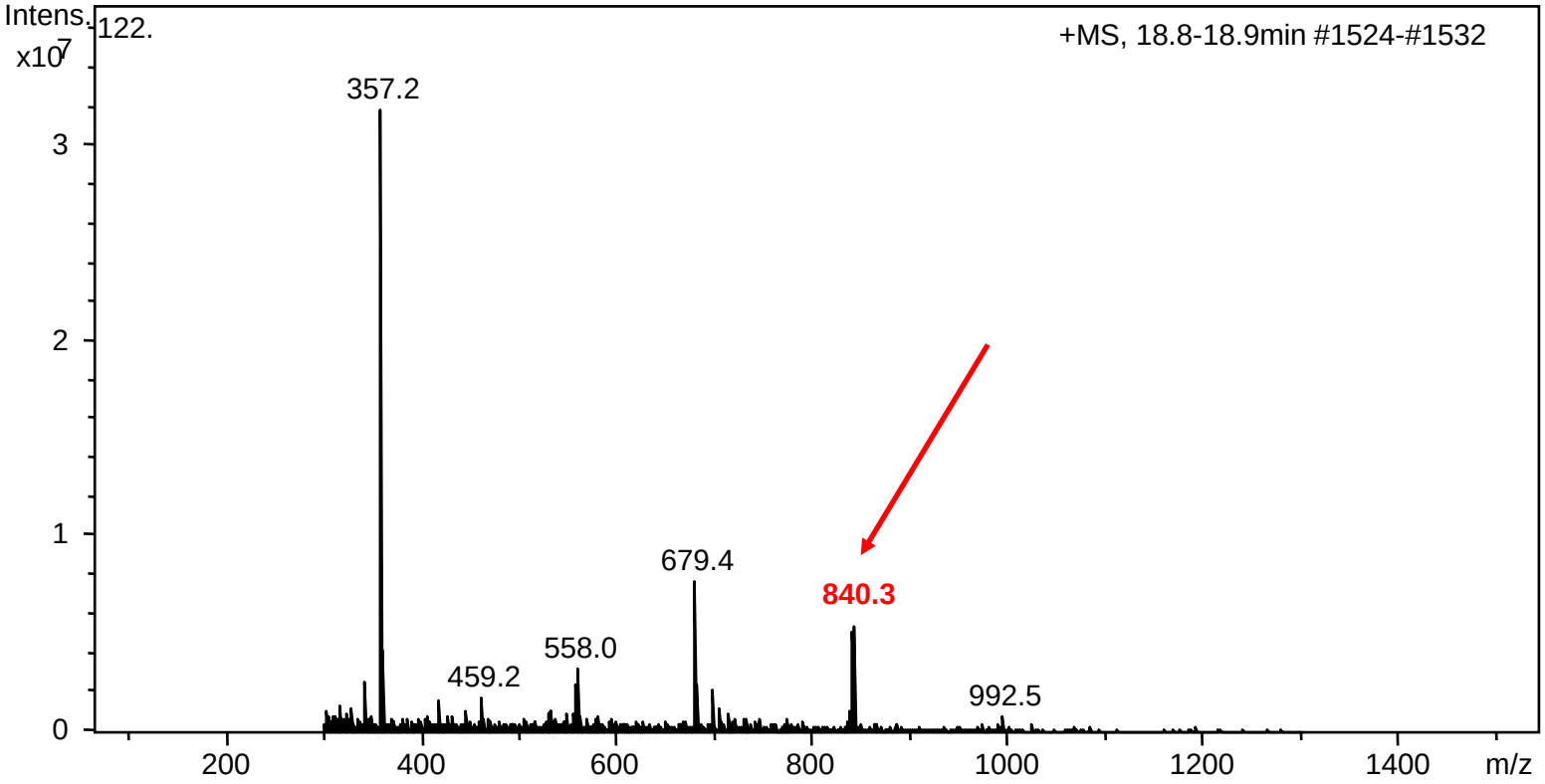


Problem bei MS/MS: 1/3 Regel

1/3 Regel:
Das minimale Verhältnis zwischen Fragmentmasse und Analytmasse ist ~ 33%,
d.h. von einem Analyten der Masse m/z 900 kann kein Fragment < m/z 300 detektiert werden.

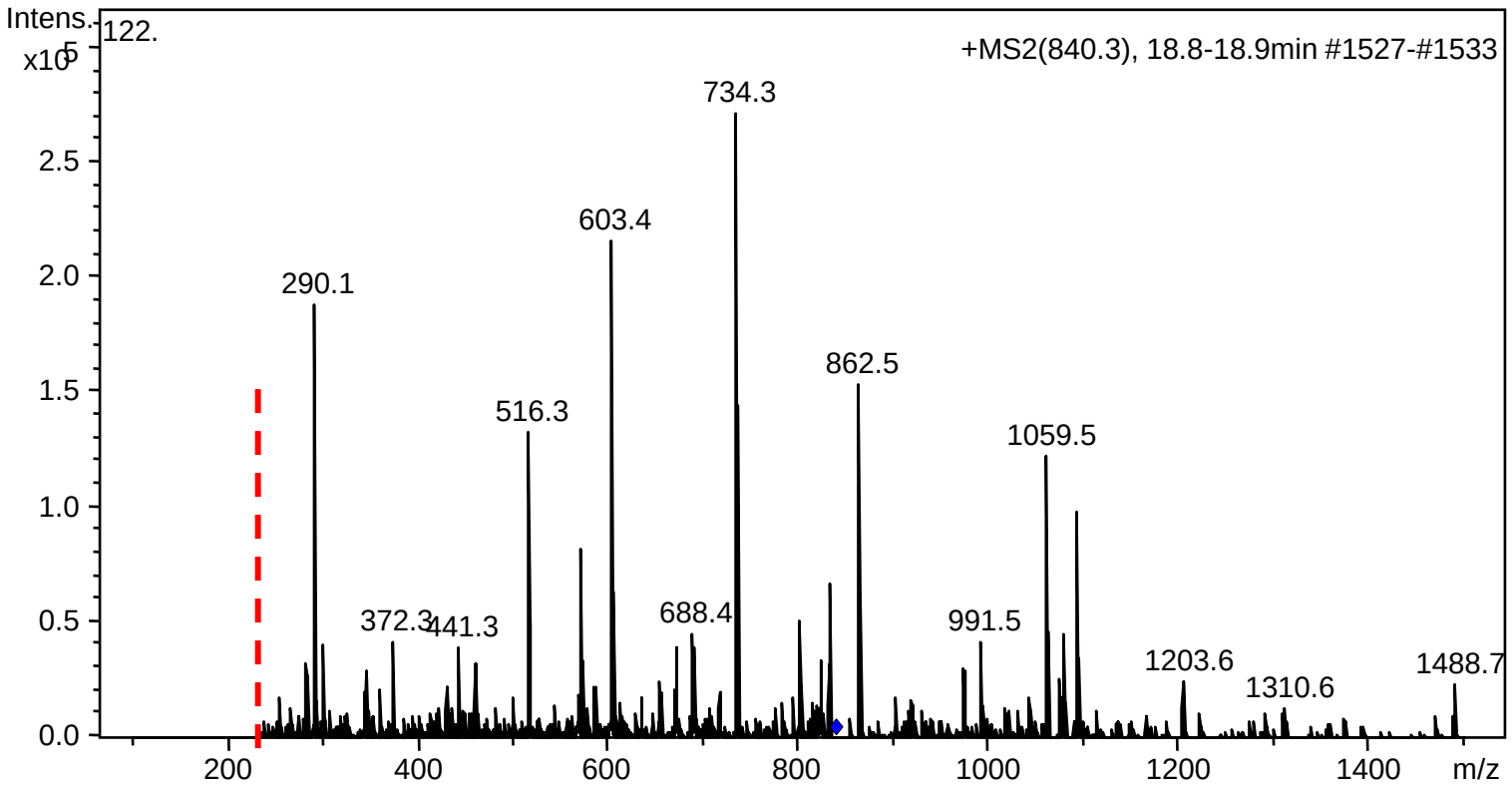
Grund:
Bei der Anregung der Analytionen zu den Stössen wird eine bestimmte Anregungsamplitude benötigt. Diese ist bereits so hoch, dass kleine Fragmentionen nicht mehr stabil in der Falle bleiben, sondern bereits unkontrolliert ausgeworfen werden.

Problem bei MS/MS: 1/3 Regel



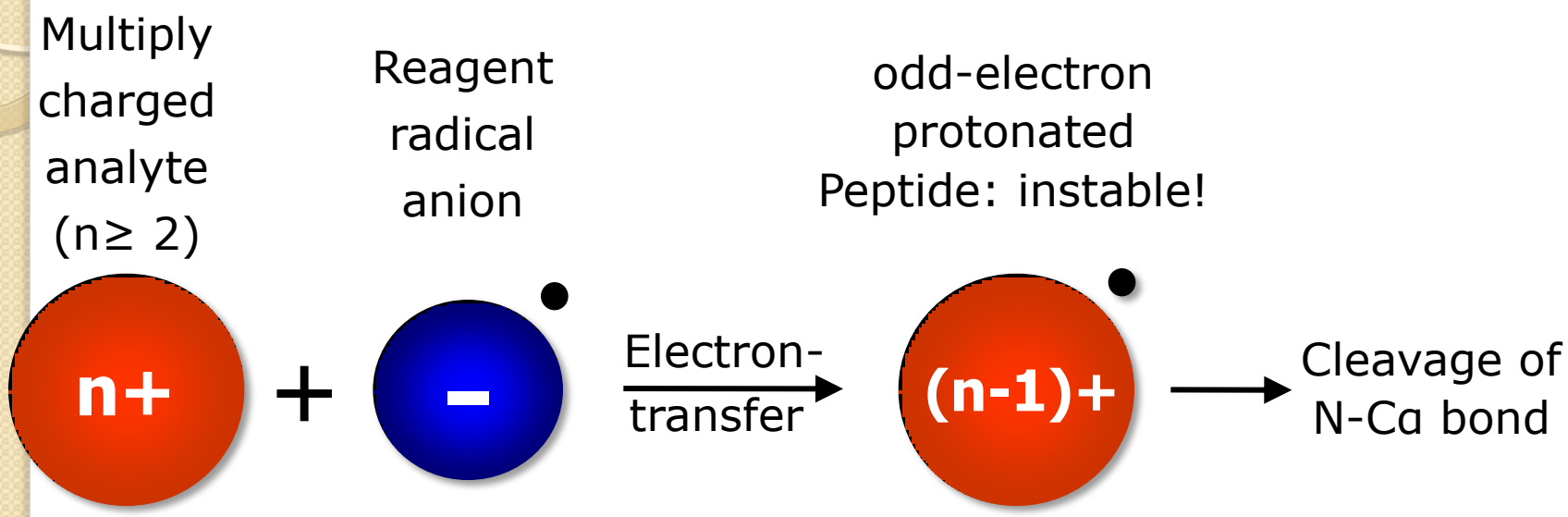
Analytion der Masse 840 soll fragmentiert werden.

Problem bei MS/MS: 1/3 Regel



Fragmente unterhalb von 275 Da sind nicht sichtbar

Zusätzliche Fragmentierung in der Ionenfalle: ETD (Electron Transfer Dissociation)

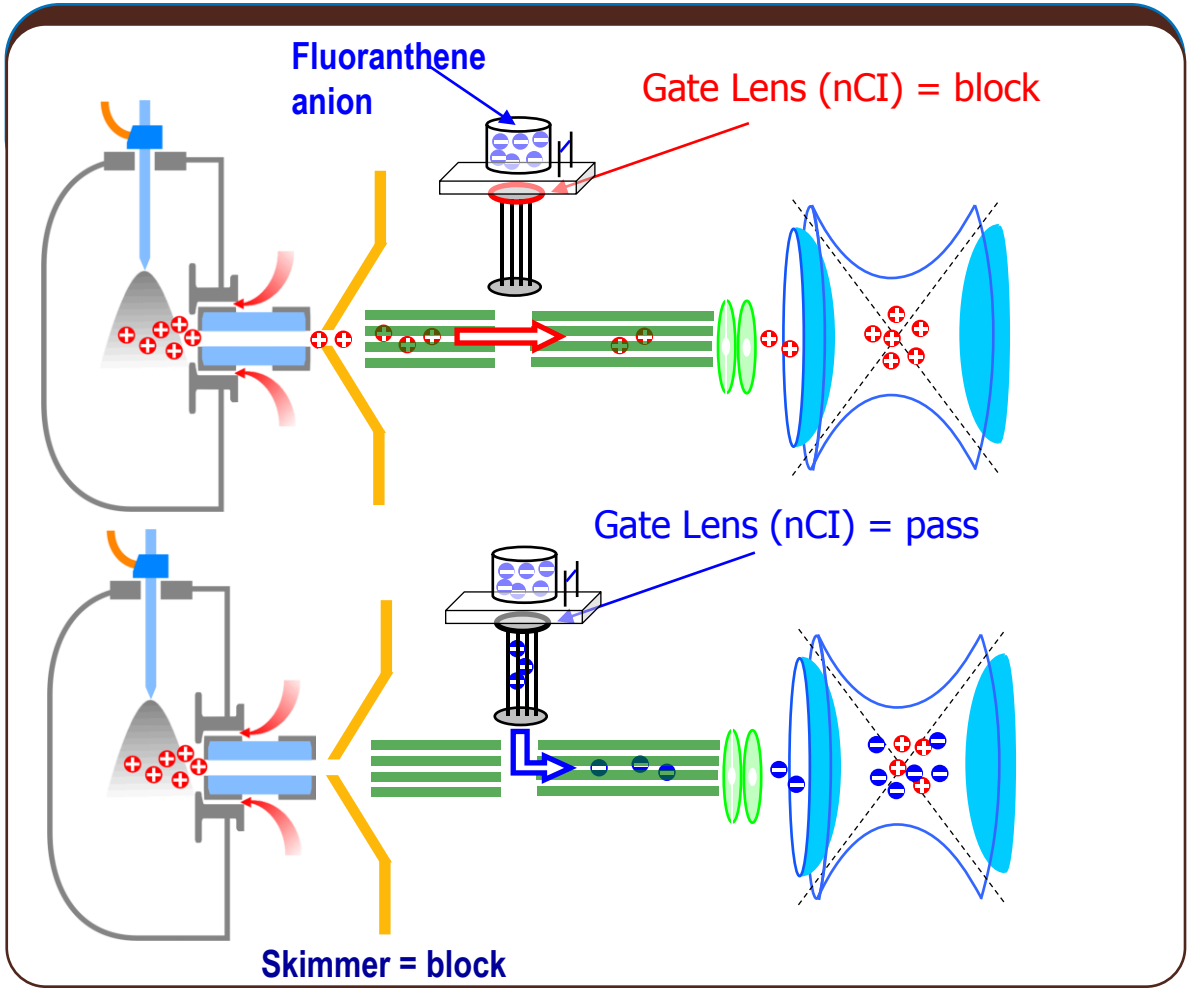


- Bedingung sind mehrfach geladenen Ionen (n ≥ 2) aufgrund der Ladungsreduzierung
- Prompte Fragmentierung an der Amidbindung, d.h. Modifikationen (Phospho, Glyco) bleiben am Fragment erhalten
- Grosse Peptide oder kleine Proteine können fragmentiert werden

Syka et al. 9528–9533 PNAS
June 29, 2004 vol. 101 no. 26

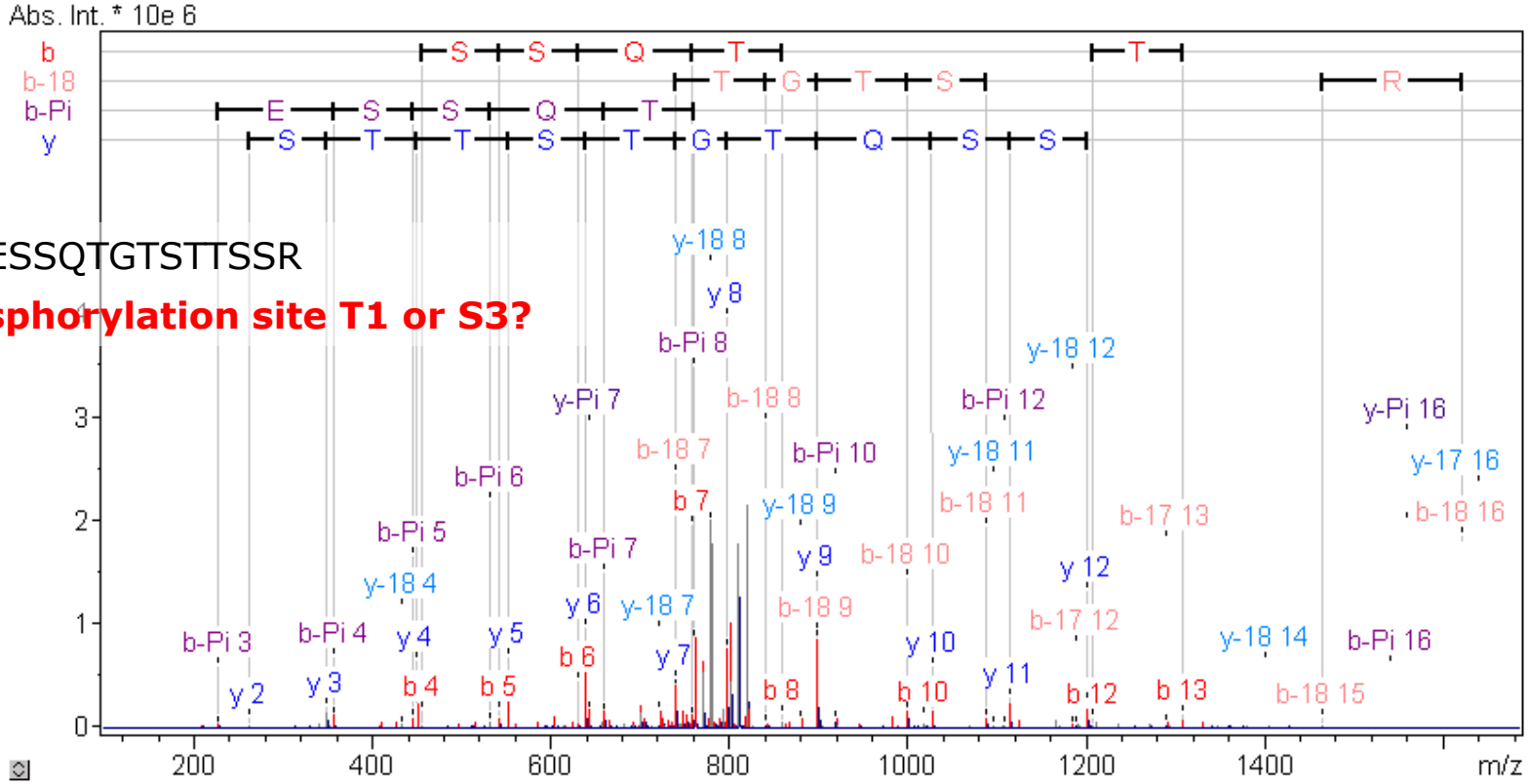
Zusätzliche Fragmentierung in der Ionenfalle: ETD (Electron Transfer Dissociation)

1. Electrospray ion accumulation
2. Precursor ion isolation
3. Reactant anion accumulation (nCI source)
4. ETD fragmentation
5. Scan



ETD zur Ortsbestimmung der Phosphorylierung

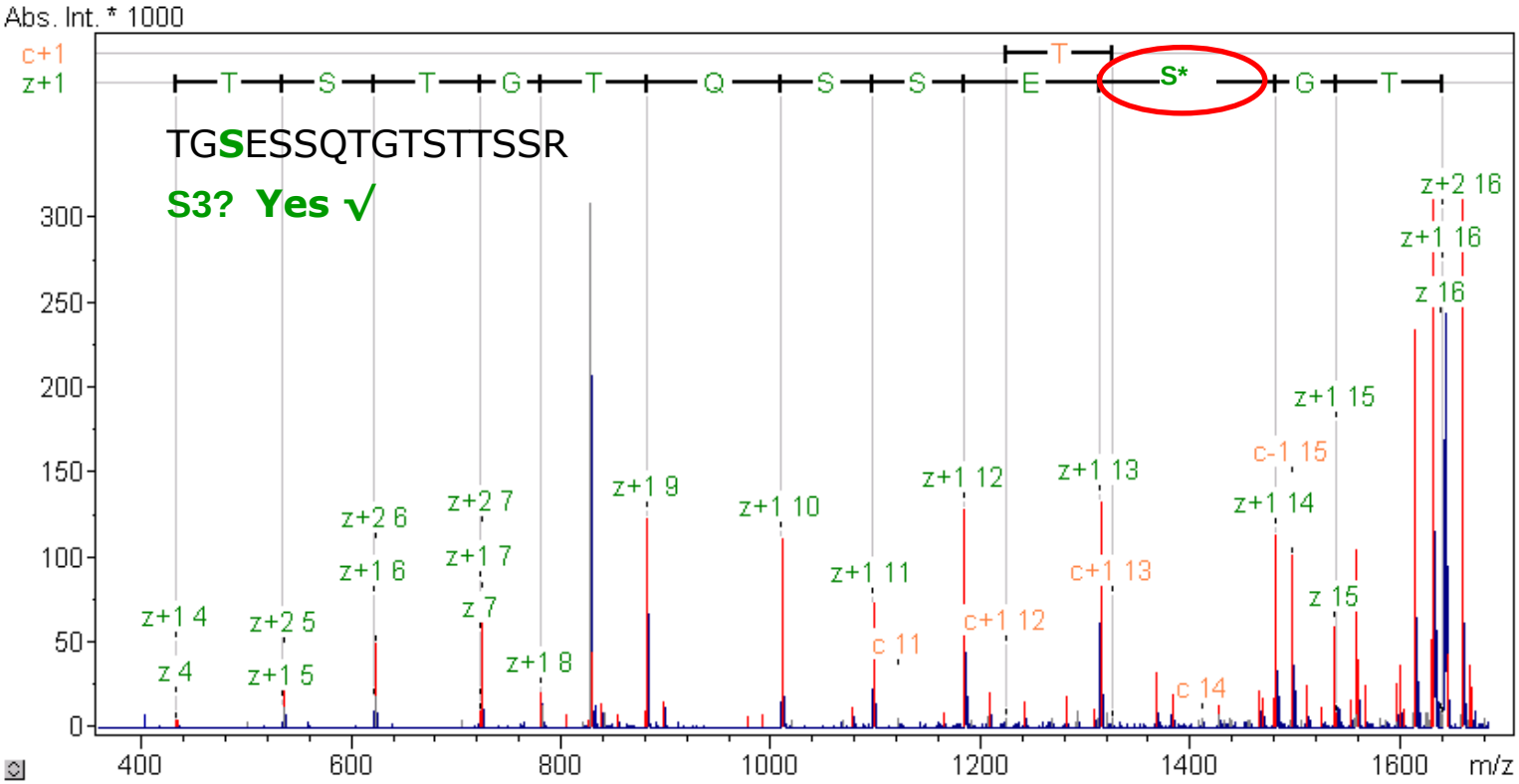
CID spectrum of the doubly charged phosphopeptide
TG**S**E**SS**Q**T**G**TSTTSS**R (11 potential phosporylation sites)
With CID, the phospho-group gets lost immediately.



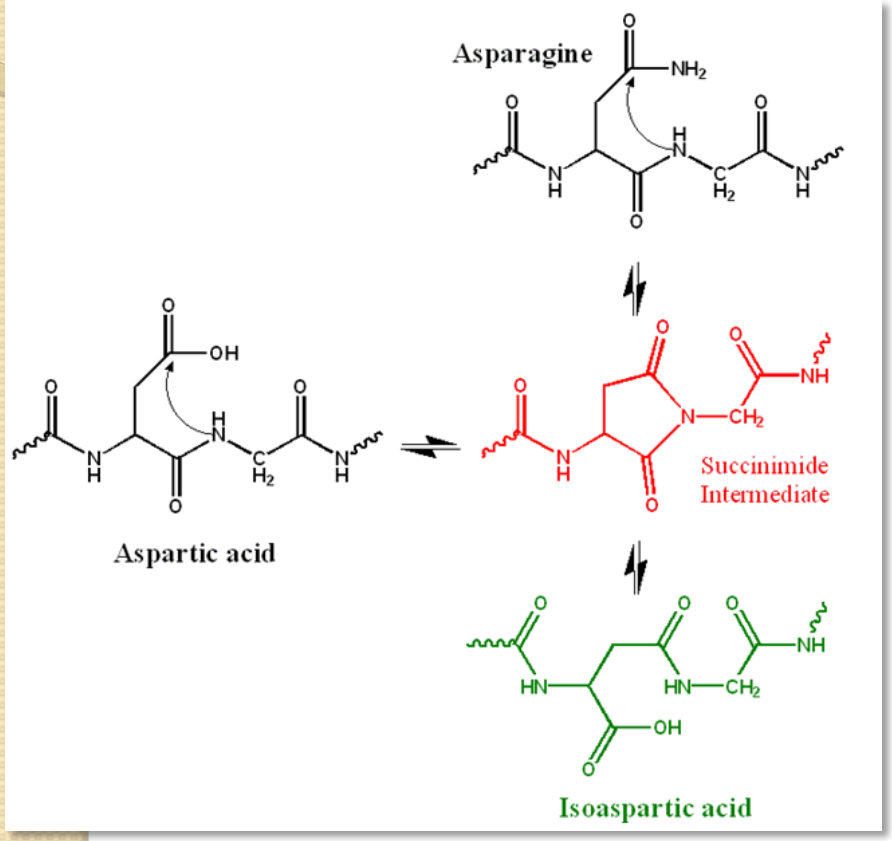
from eukaryotic translation initiation factor 4B

ETD zur Ortsbestimmung der Phosphorylierung

ETD spectrum of the doubly charged phosphopeptide
TG**S**E**SS**Q**T**G**TSTTSS**R (11 potential phosporylation sites)
Correct asignment of the phospho-group which is maintained on the respective amino acid.



ETD: Deamidation of Asparagine



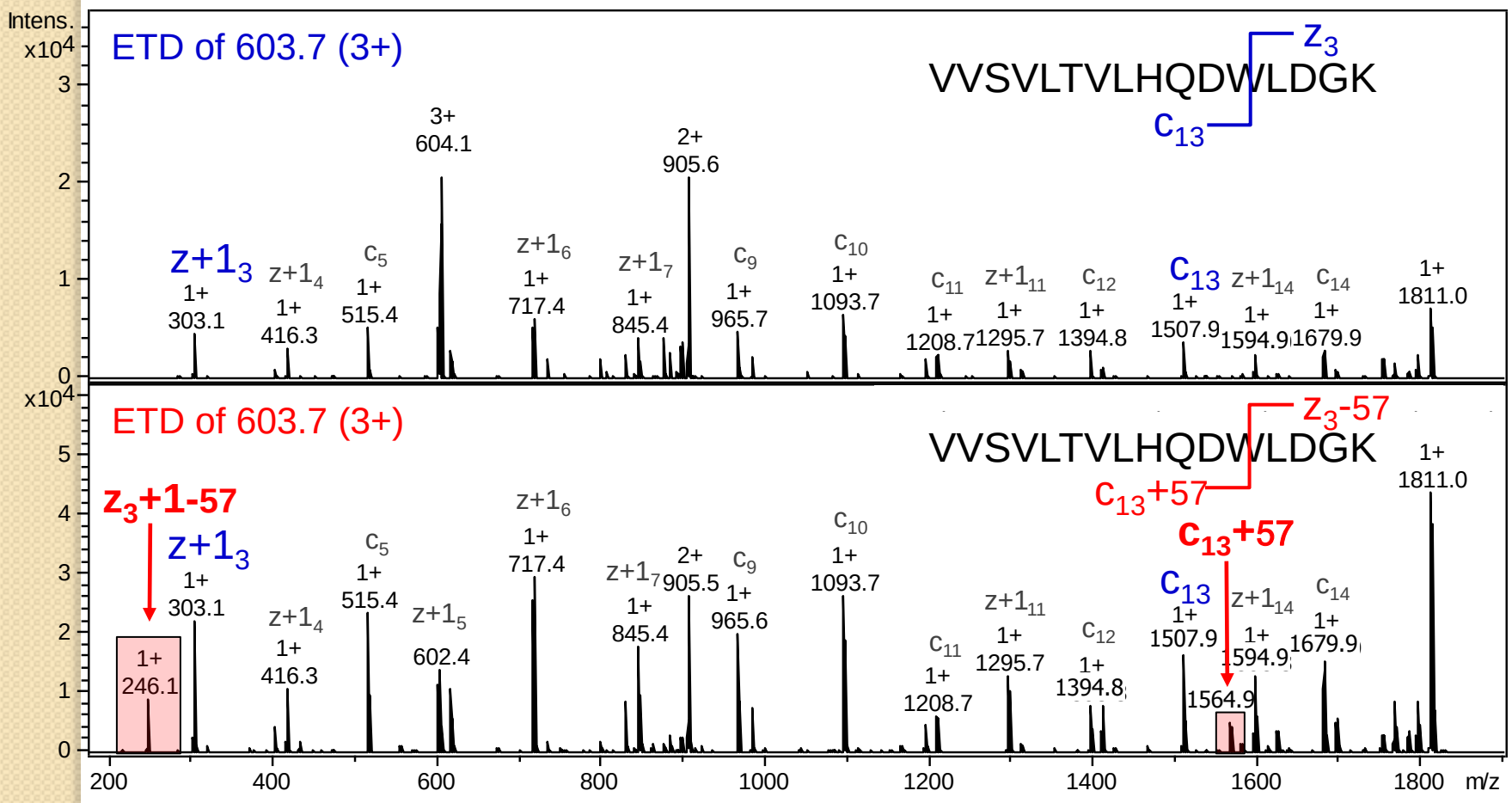
Asn → Asp & IsoAsp = Δm 1 Da
Asp & IsoAsp are isobaric!

Deamidation of asparagine (Asn):

- Reduces shelf life of drugs
- Reduces activity of drug
- Protein folding diseases

Asp & IsoAsp can only be differentiated by ETD!

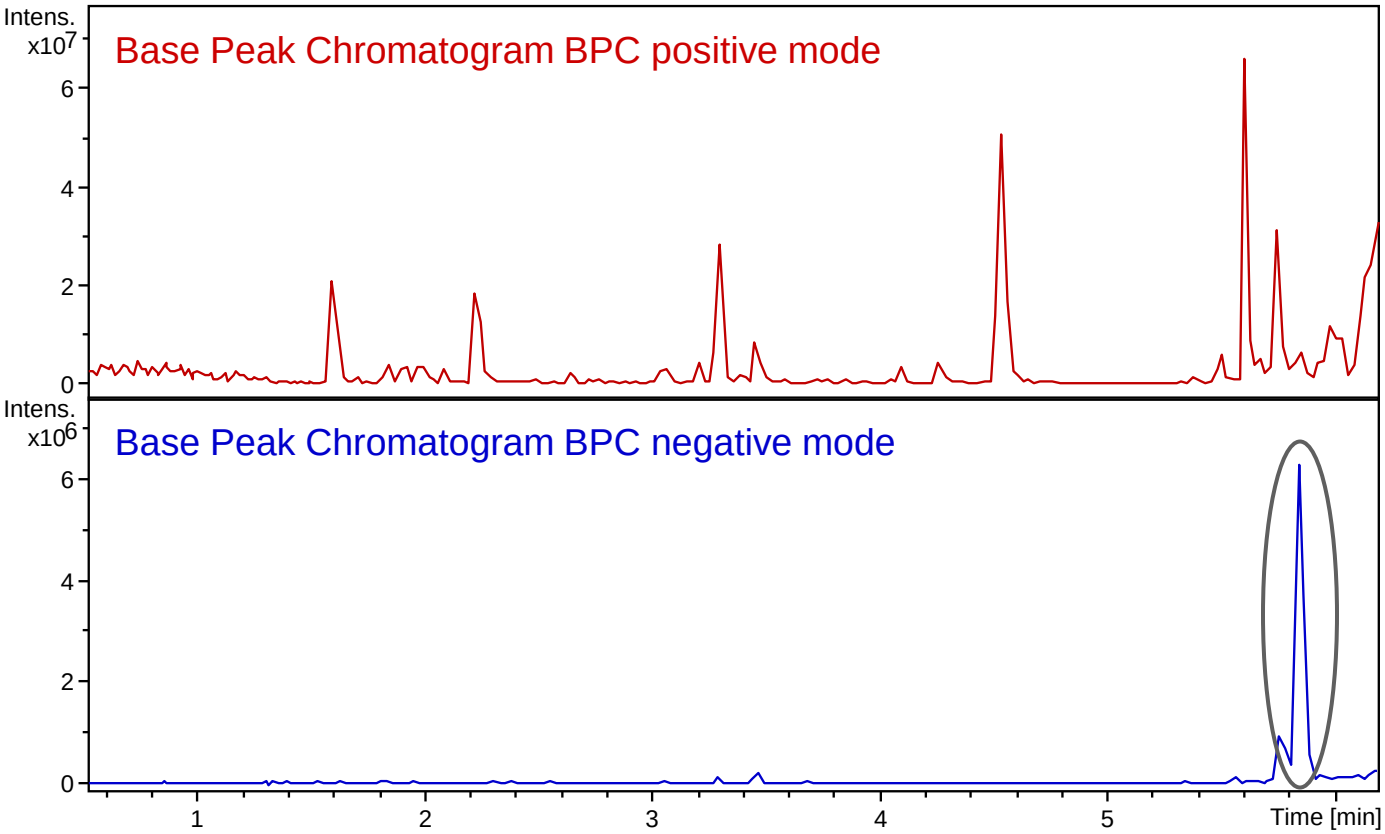
ETD: Deamidation of Asparagine



Mukherjee R, Biocon; *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2010; **24**: 879-884

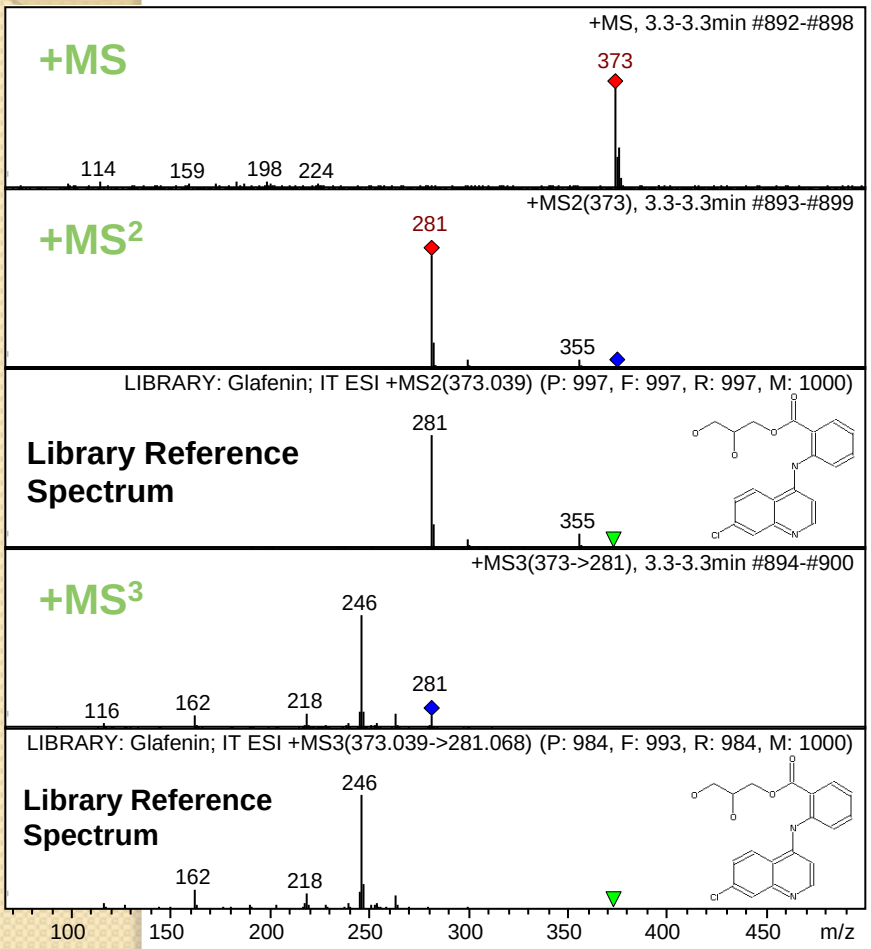
Identifizierung von Unbekannten durch Spektrenbibliotheksuche

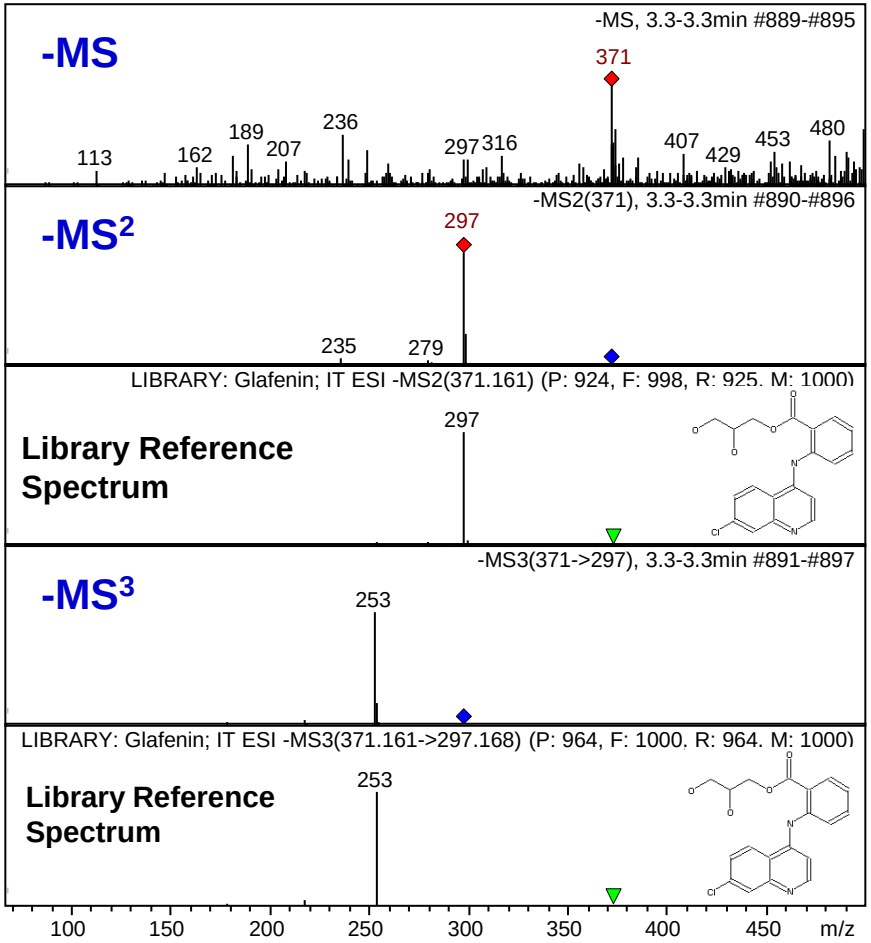
- Analysis of a drug mixture using **alternating polarity and MS^3**
- One compound is ionized only in negative ion mode



Identifizierung von Unbekannten durch Spektrenbibliotheksuche

Identification of **glafenin** in positive and negative mode via MS^2 and MS^3.

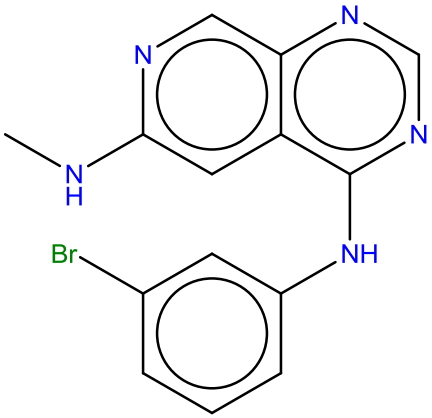




Synthesis Control

Verification of sample identity:

$C_{14}H_{12}BrN_5$ (MW 329.03 Da)

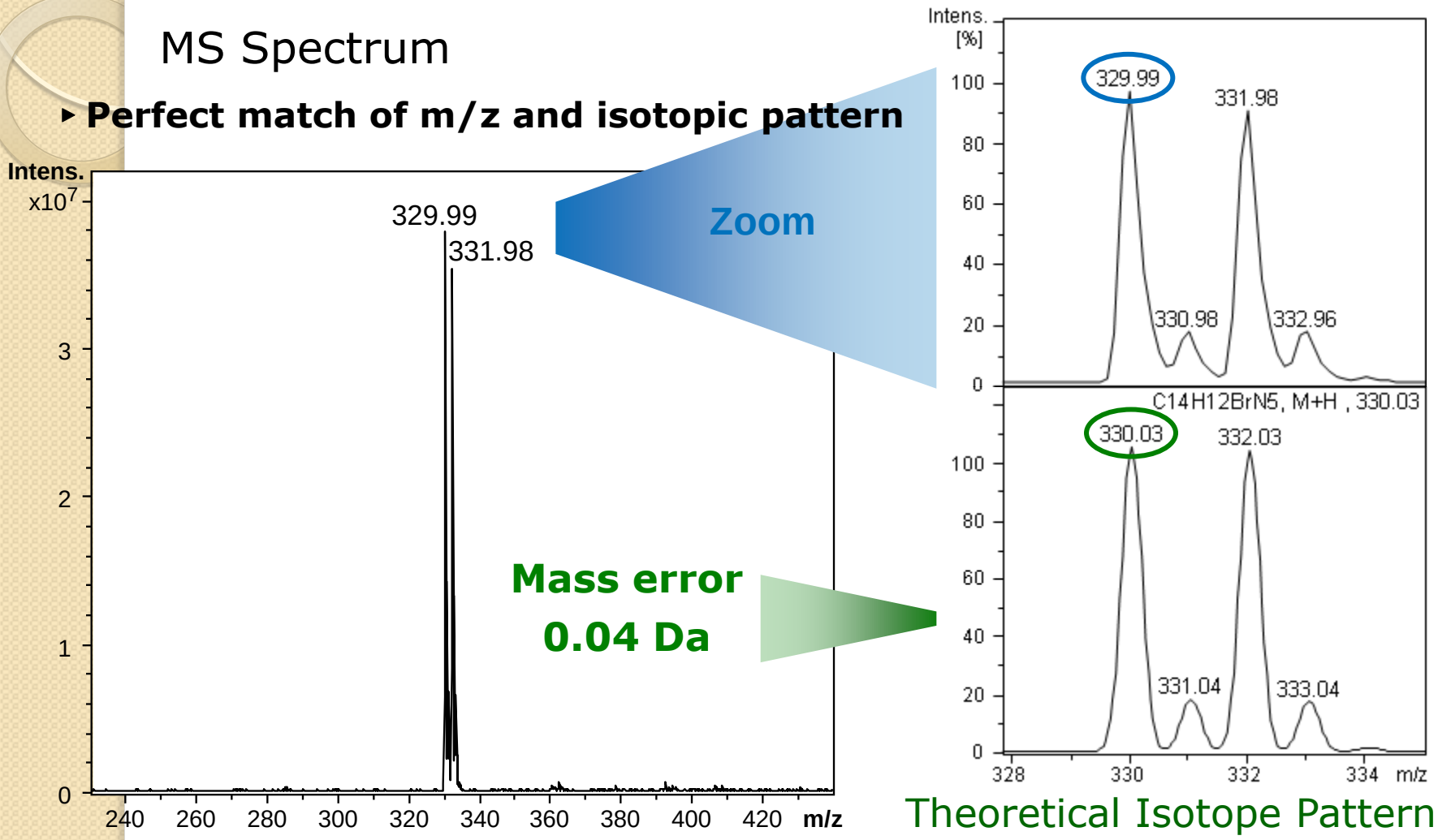


- Confirmation of the **molecular weight (MW)**
- Reassurance of the **molecular structure**

Synthesis Control

MS Spectrum

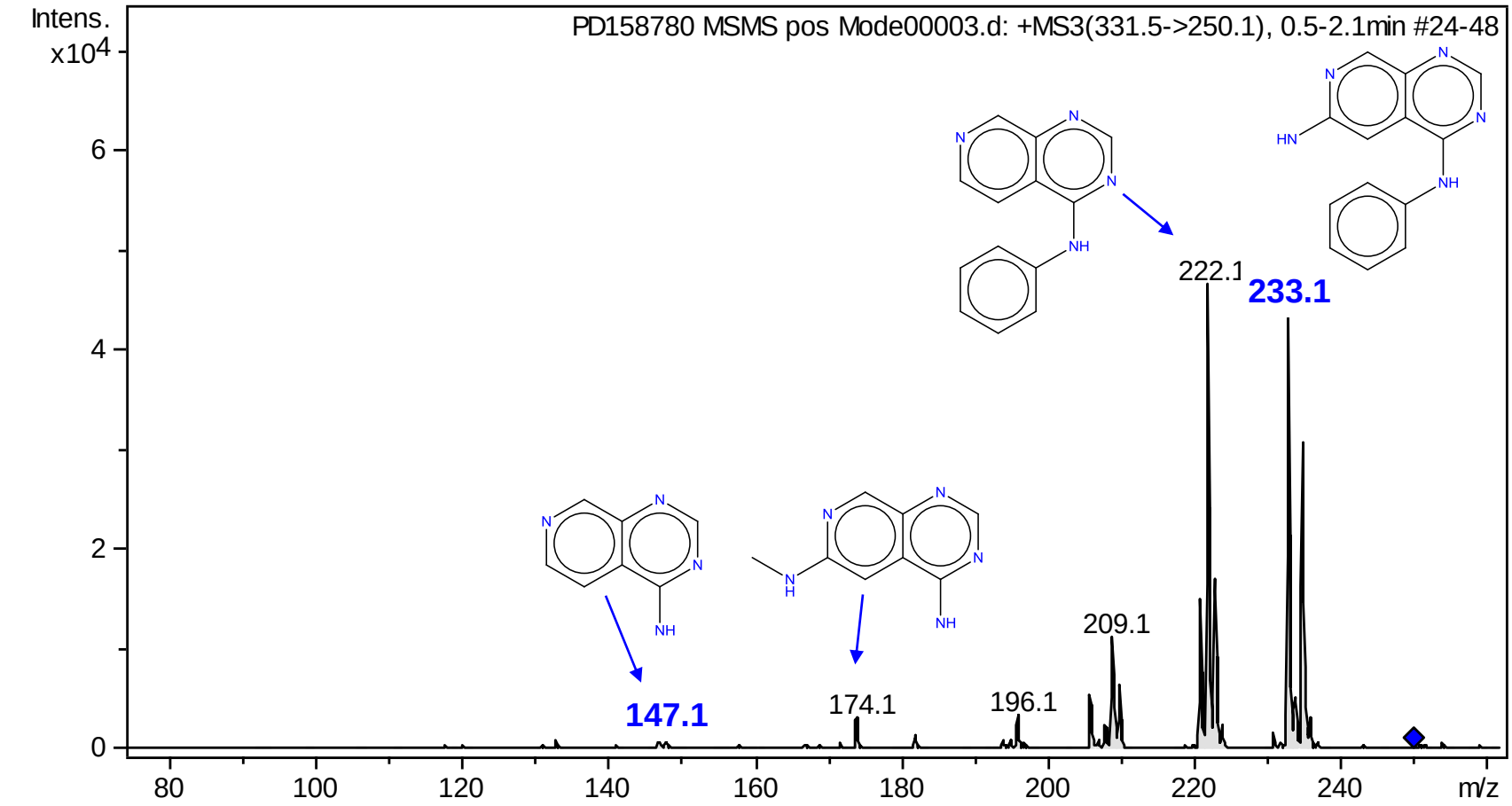
- **Perfect match of m/z and isotopic pattern**



Theoretical Isotope Pattern

Synthesis Control

Strukturverifizierung durch MS³



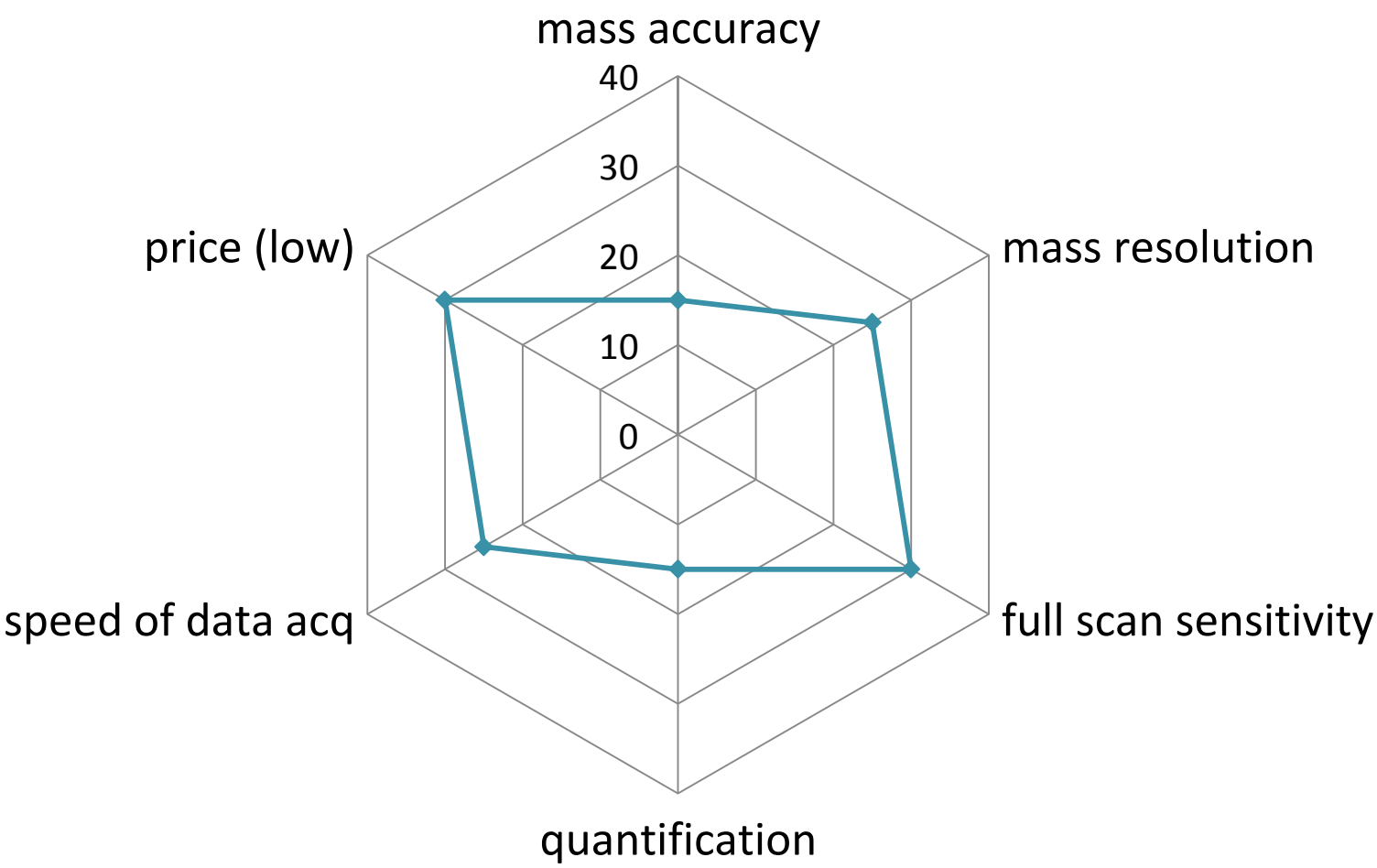
Vorteile der Ionenfallen

- Hohe “full scan” Empfindlichkeit: gesamte Information bei Molekülmischungen oder MS/MS Spektren kann erhalten werden
- Hohe Empfindlichkeit und Messgeschwindigkeit
- Verschiedene MS/MS Möglichkeiten: CID und ETD
- MS^n zur Strukturverifizierung
- hoher Automatisierungsgrad, robust und einfach zu bedienen
- Geringe Anschaffungskosten

Nachteile der Ionenfallen

- Begrenzte Massengenauigkeit
- 1/3 cut-off bei MS/MS
- Begrenzte Möglichkeit zur Quantifizierung

Ionenfalle: Spinnenetz der Eigenschaften



That‘s it for Part One!!!

Questions???