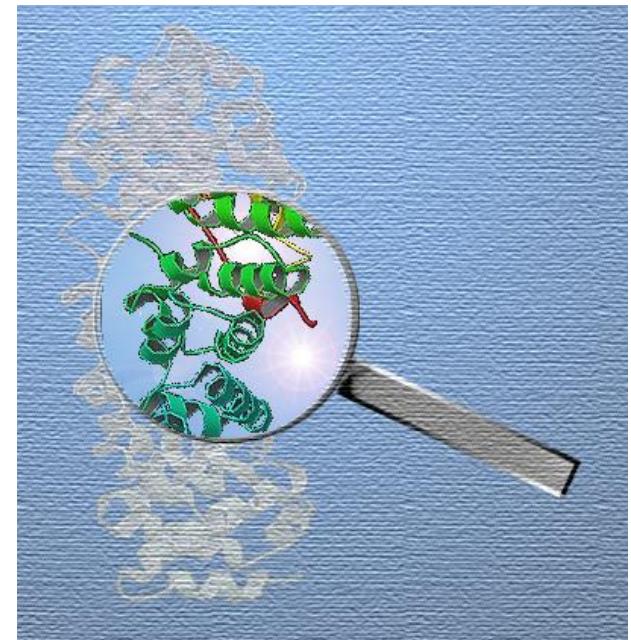


# **Massenspektrometrie II**

## **Arnd Ingendoh**

### **Teil 5 – Analysatoren FTMS und Orbitrap**

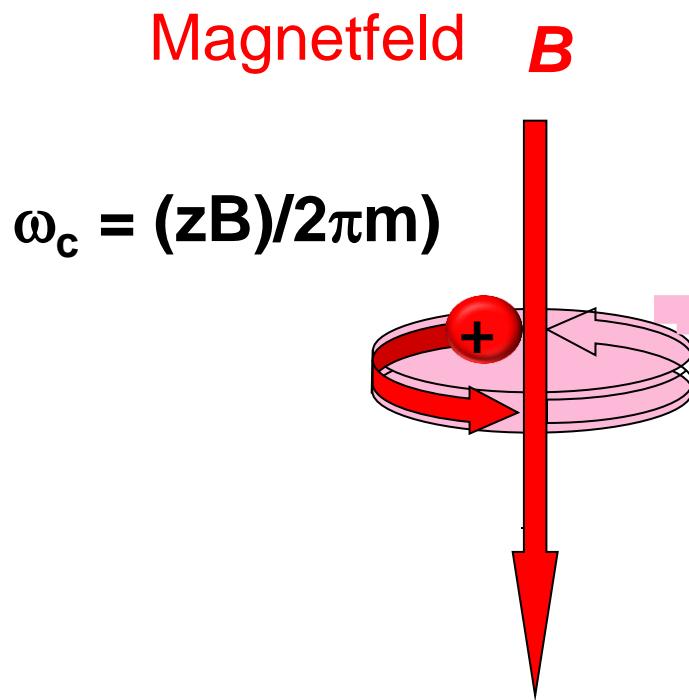


# Analysatoren

- Übersicht
- Quadrupole und Ionenfallen
- Flugzeitanalysatoren und QTOF Hybride
- **Hochauflösende MS: FTMS und Orbitrap**
- Abgrenzung der Verfahren

## 5a. Prinzip von FTMS (Fourier Transform – Ion Cyclotron – Mass Spectrometry)

Grundlage: Ion Cyclotron Bewegung in einem magnetischen Feld



Lorentzkraft auf ein Ion der Ladung  $z$  und Geschwindigkeit  $v$  im magnetischen Feld  $B$ :

$$F_L = z * v * B$$

Das ist gleich der Zentrifugalkraft, die auf das Ion wirkt:

$$F_z = m * \omega^2 * r$$

Mit Kreisgeschwindigkeit:  $v = 2 * \pi * \omega_c * r$

ergibt sich die Zyklotronfrequenz  $\omega_c$  aus:

$$F_L = F_z$$

$$\text{zu: } \omega_c = \frac{zB}{2\pi m}$$

Somit berechnet sich  $m/z$

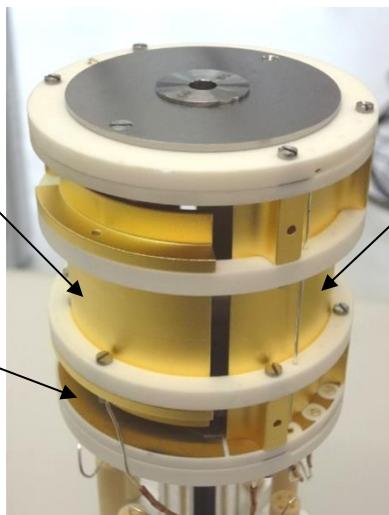
zu:

$$\frac{m}{z} = \frac{B}{2\pi\omega_c}$$

# Prinzip von FTMS

## Zylindrische Ion Cyclotron Messzelle

Detection electrode  
Trapping electrode



diameter: 60 mm  
length: 60 mm

Excitation  
electrode

Trapping electrode for  
electric field (segmented)

Externally  
generated ions

Excitation  
electrode

Detection  
electrode

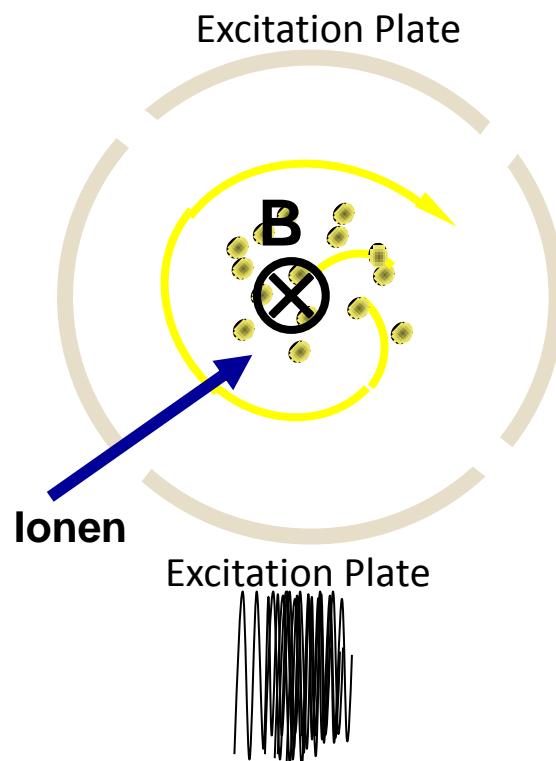
Magnetic  
field

Excitation  
electrode

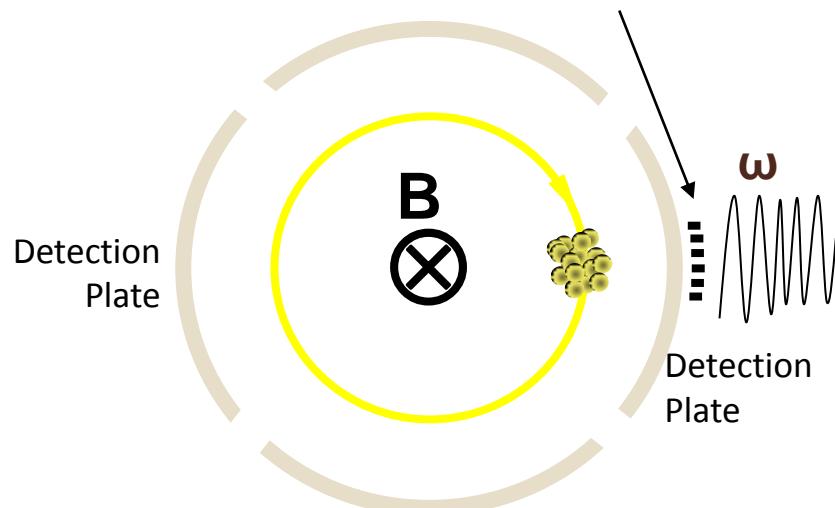
# Prinzip von FTMS

Anregung und Beobachtung der Ionenbewegung

1. Ionenanregung durch äußeren Impuls



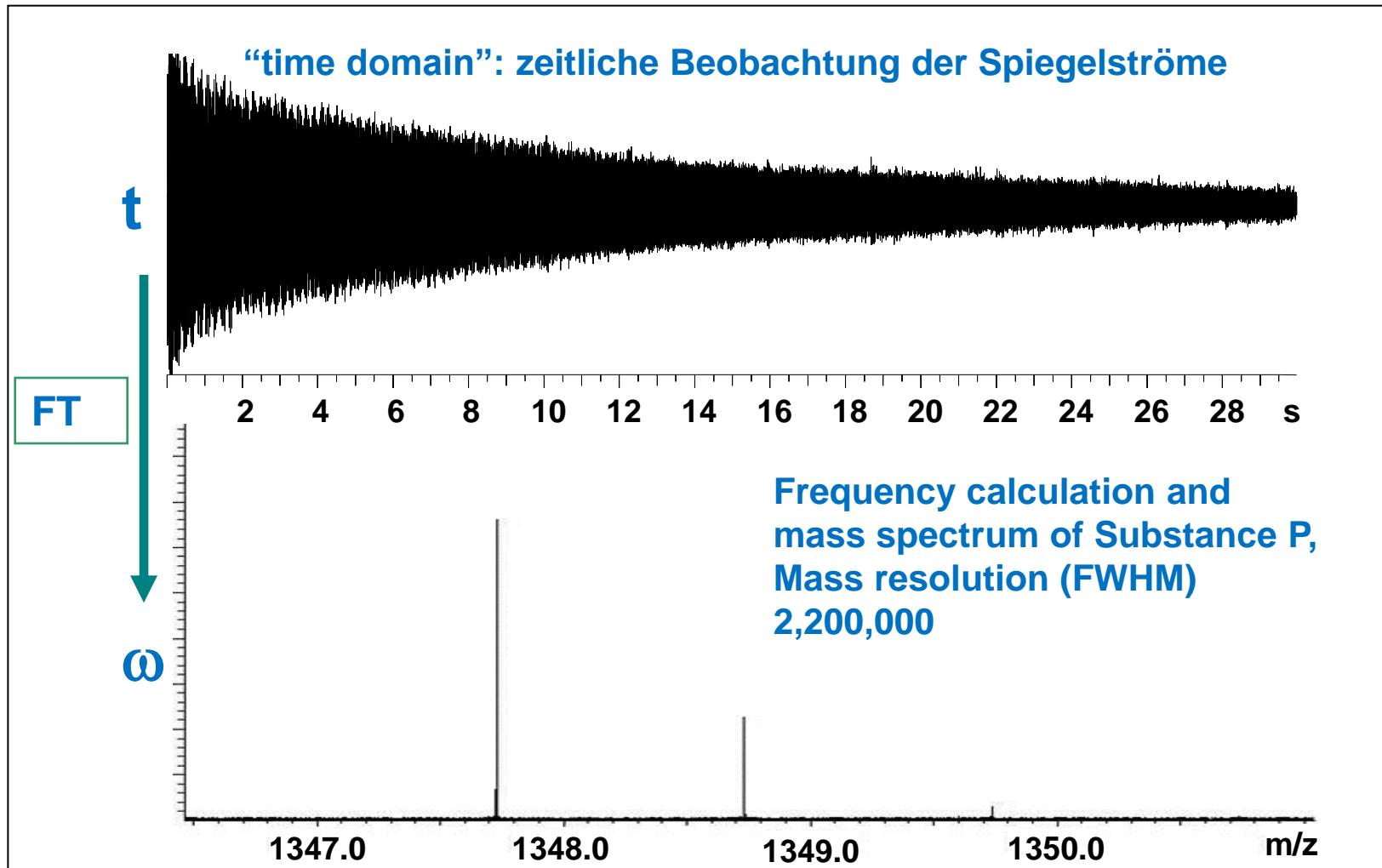
2. Ionenbeobachtung: das kreisende Ionenpaket erzeugt Spiegelladungen bei Annäherung an die Detektionsplatten



Chirp: Frequenzgemisch wird eingespeist, um die einzeln kreisenden Ionen gemäss ihrer  $\omega$  anzuregen und in Pakete zu synchronisieren

# Prinzip von FTMS

Fourier Transformation der beobachteten Ionenbewegung

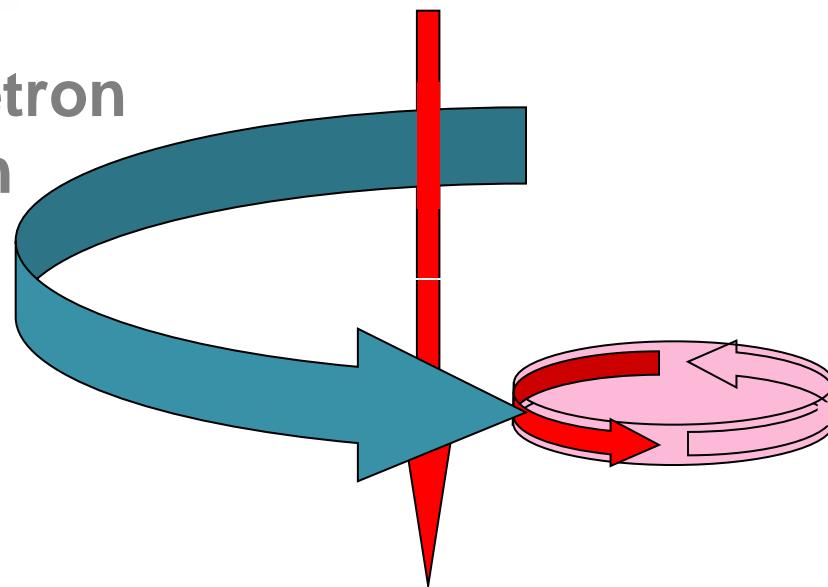


# Die Realität ist komplexer.....

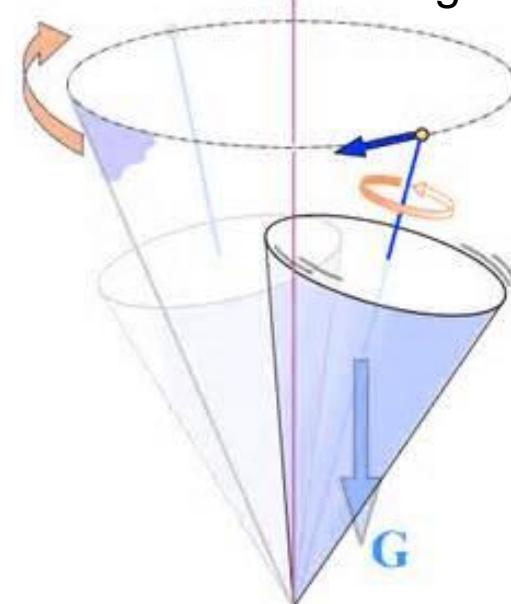


Magnetic field  $B$

Magnetron motion



Präzessionsbewegung eines Kreisels, der aus der Drehachse bewegt wird



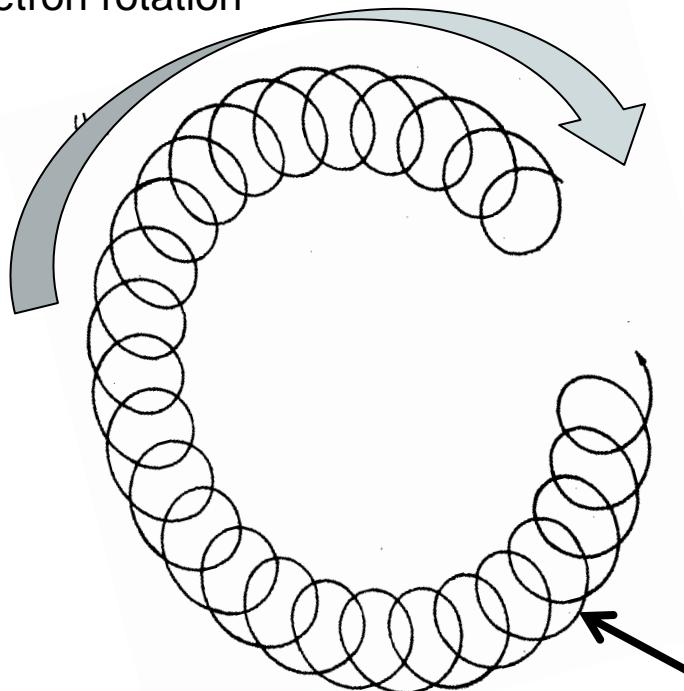
Cyclotron motion

1. Ionen kreisen nicht zentral um die B-Achse, sondern dort, wo sie ins Feld eintreten: Magnetronbewegung

# Die Realität ist komplexer.....

Superimposed Cyclotron, Magnetron and axial motion

Magnetron rotation



$$\omega'_c = \omega_c - \omega_m$$

Measured frequency  
(effective cyclotron motion)

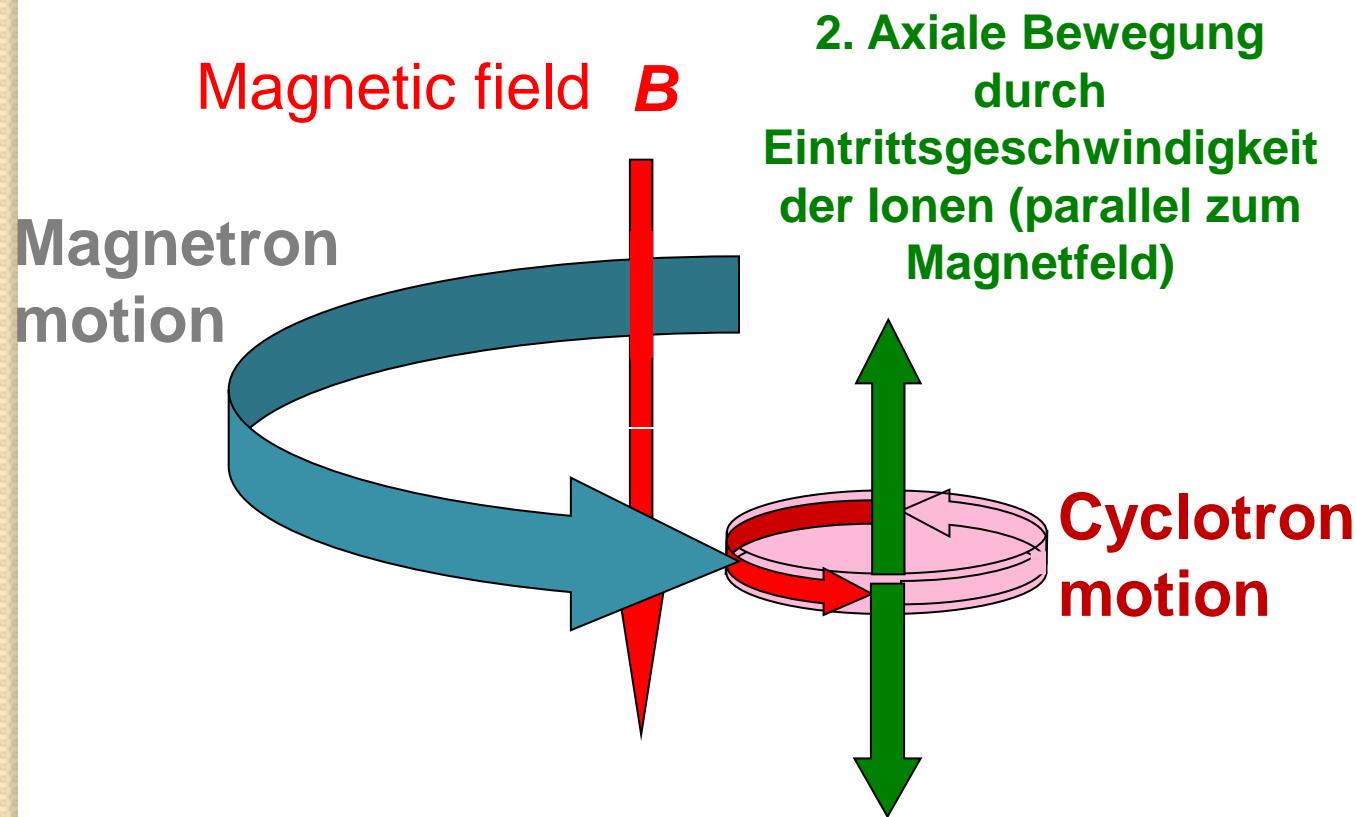
$$\omega_m = \omega_z^2 / 2\omega'_c$$

Axial oscillation

$$\omega_c = \frac{|eB|}{mc}$$

Cyclotron rotation

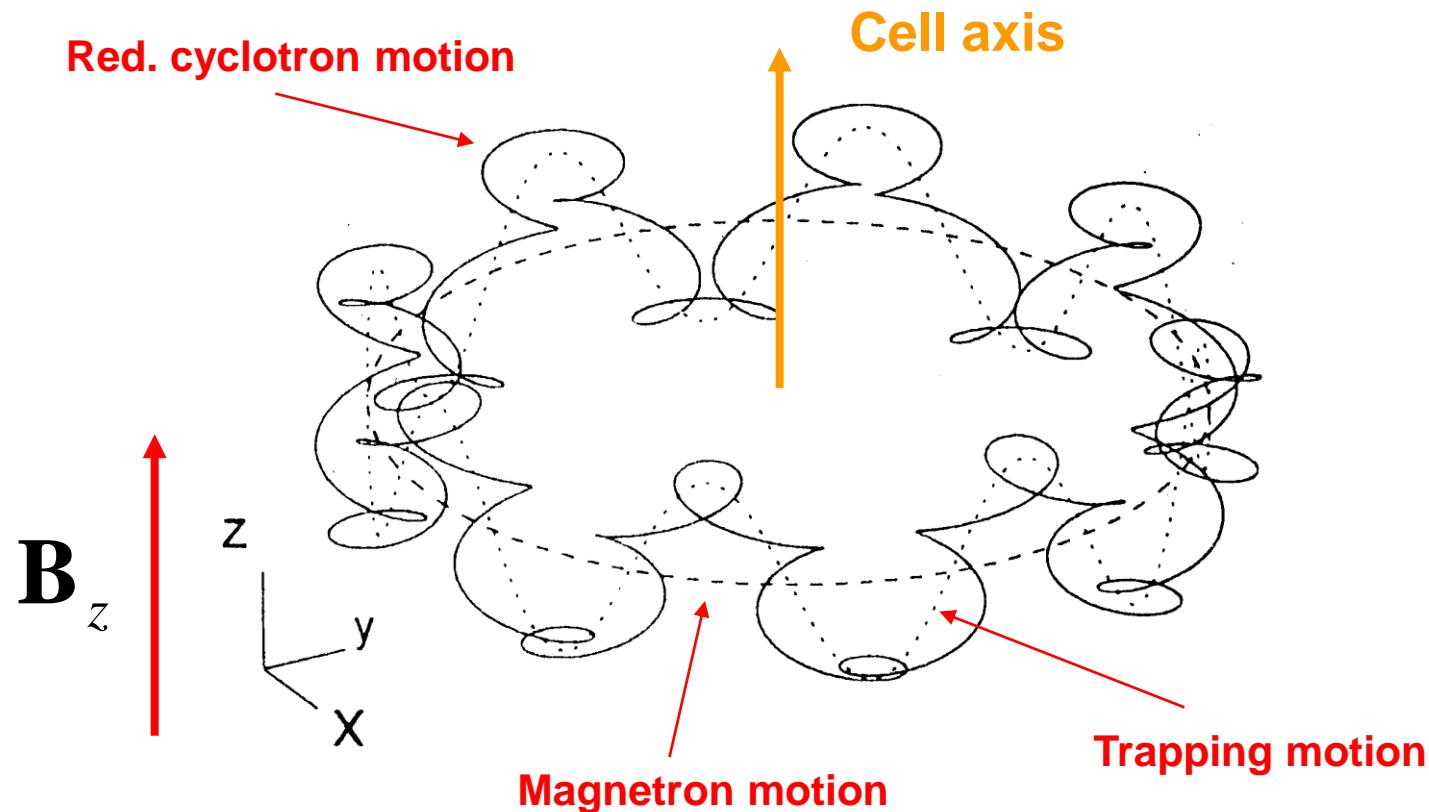
# Die Realität ist komplexer.....



# FTMS: Gesamtbewegung der Ionen

S

## Ion Trajectory in $E \times B$ Field

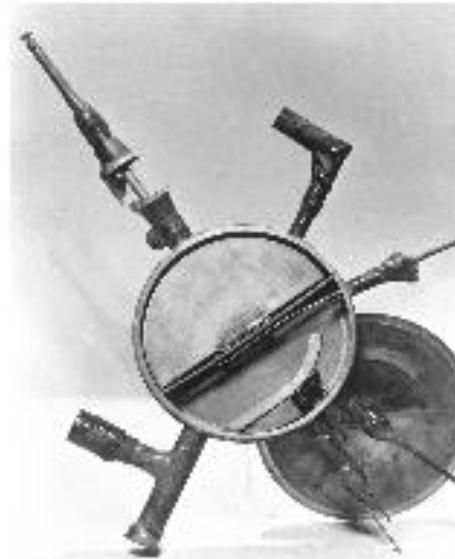


# Kurze Geschichte der FT-(ICR) MS



## E.O. Lawrence, University of California at Berkeley:

- Developed the theory of cyclotron acceleration
- Built the first ion cyclotron accelerator with his graduate student M.S. Livingston
- Reported first results from the cyclotron accelerator at the 1931 meeting of the American Physical Society (led to a grant of \$500 from the NRC to build a larger accelerator).
- Lawrence received the 1939 Physics Nobel Prize



The first cyclotron accelerator built by Lawrence, approximately 15 cm in diameter.

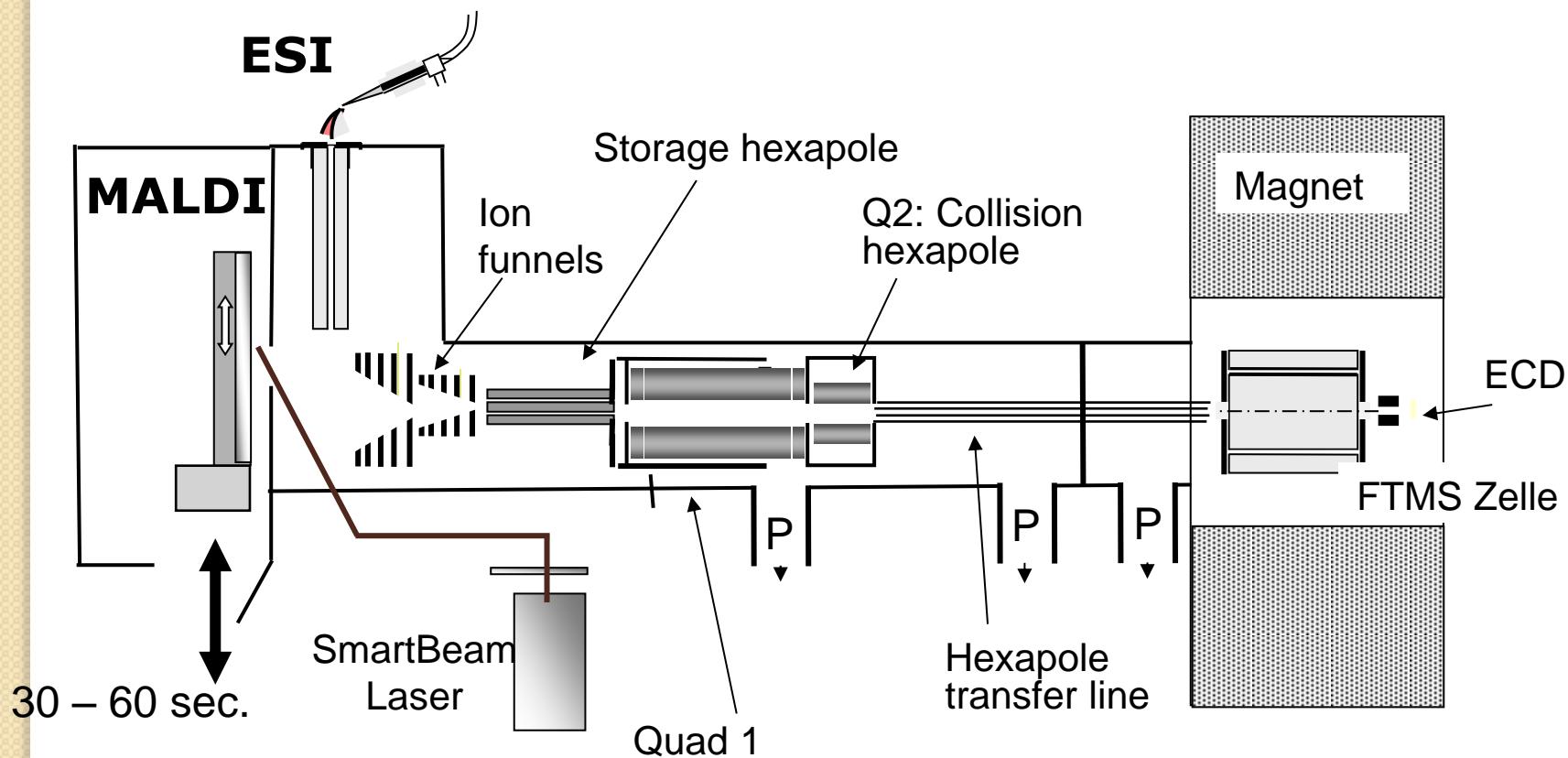
# Kurze Geschichte der FT-(ICR) MS



E.O. Lawrence and co-workers at the „Calutron Magnet“ with  $\varnothing = 467\text{cm}$  (Oak Ridge National Labs, 1945)

Teil des  
„Manhattan“  
Projekt in Los  
Alamos zur  
Trennung der  
Uran-Isotope

# FTMS: Instrument Setup



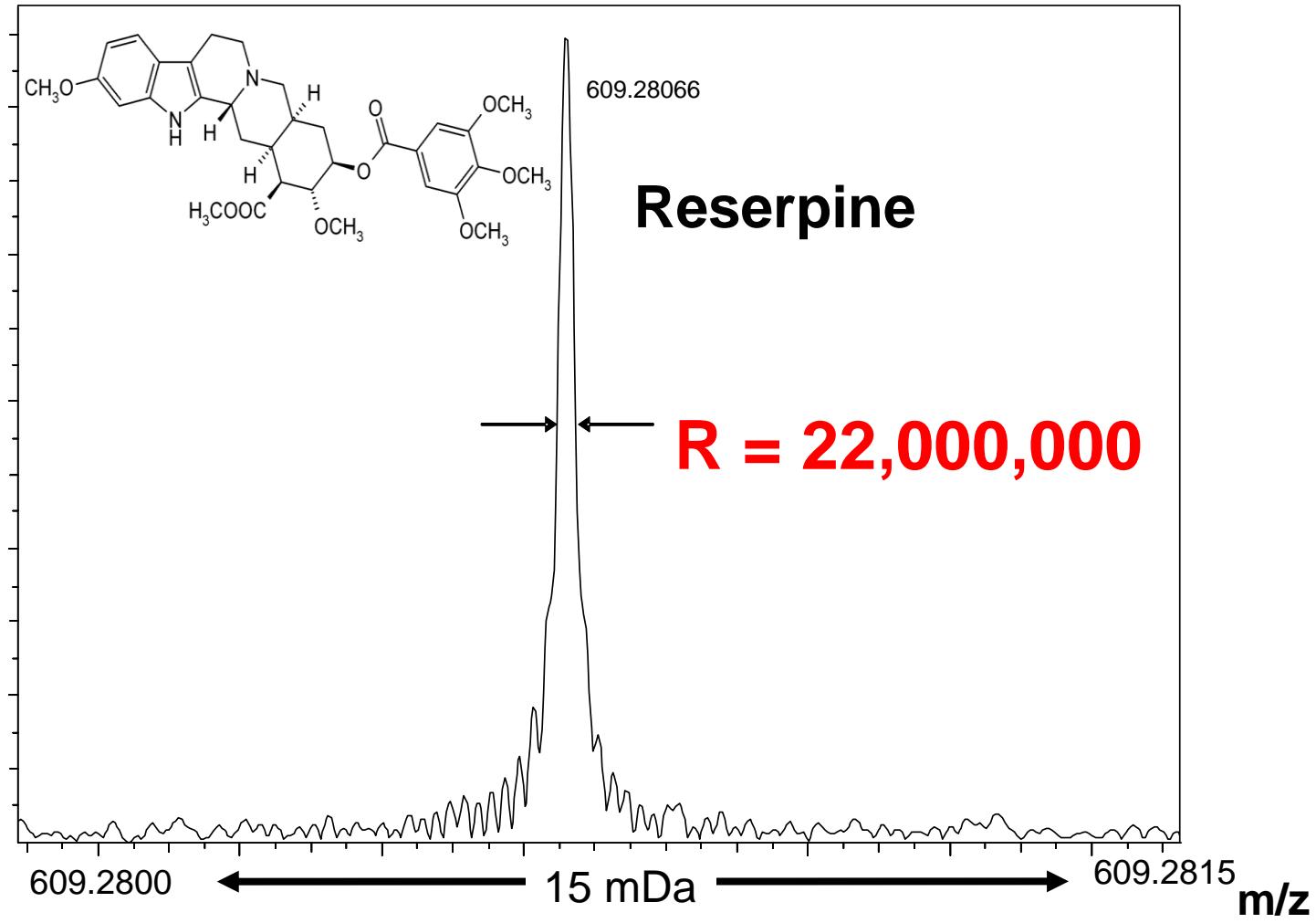
# Typische Anwendungen

Immer dann, wenn LC, GC oder andere Trenntechniken nicht angewandt werden können, d.h. allein die Massenauflösung komplexe Proben auf trennen muss.



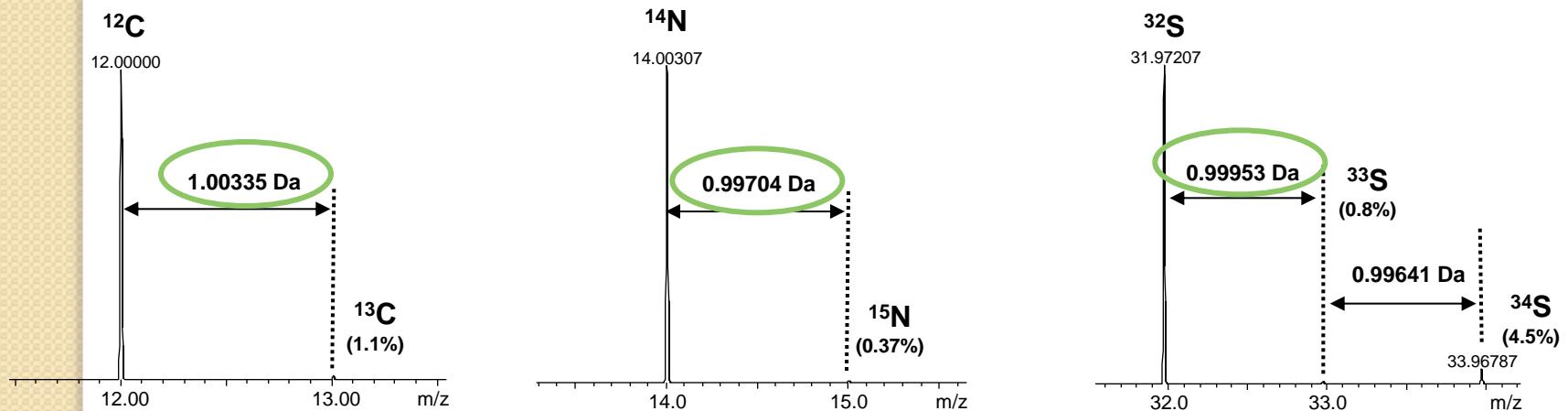
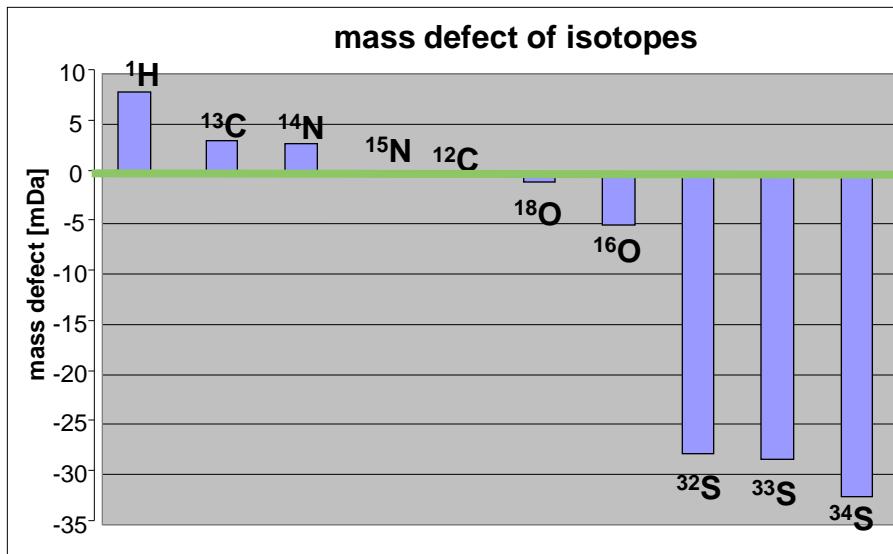
- Determination of elemental compositions
- Molecular Imaging of Tissue
- Metabolomics
- Complex Environmental sample analysis
- Petroleum Product Analysis
- Top-down Proteomics
- ....

# Massenauflösung > 20 Mio (7T Magnet)

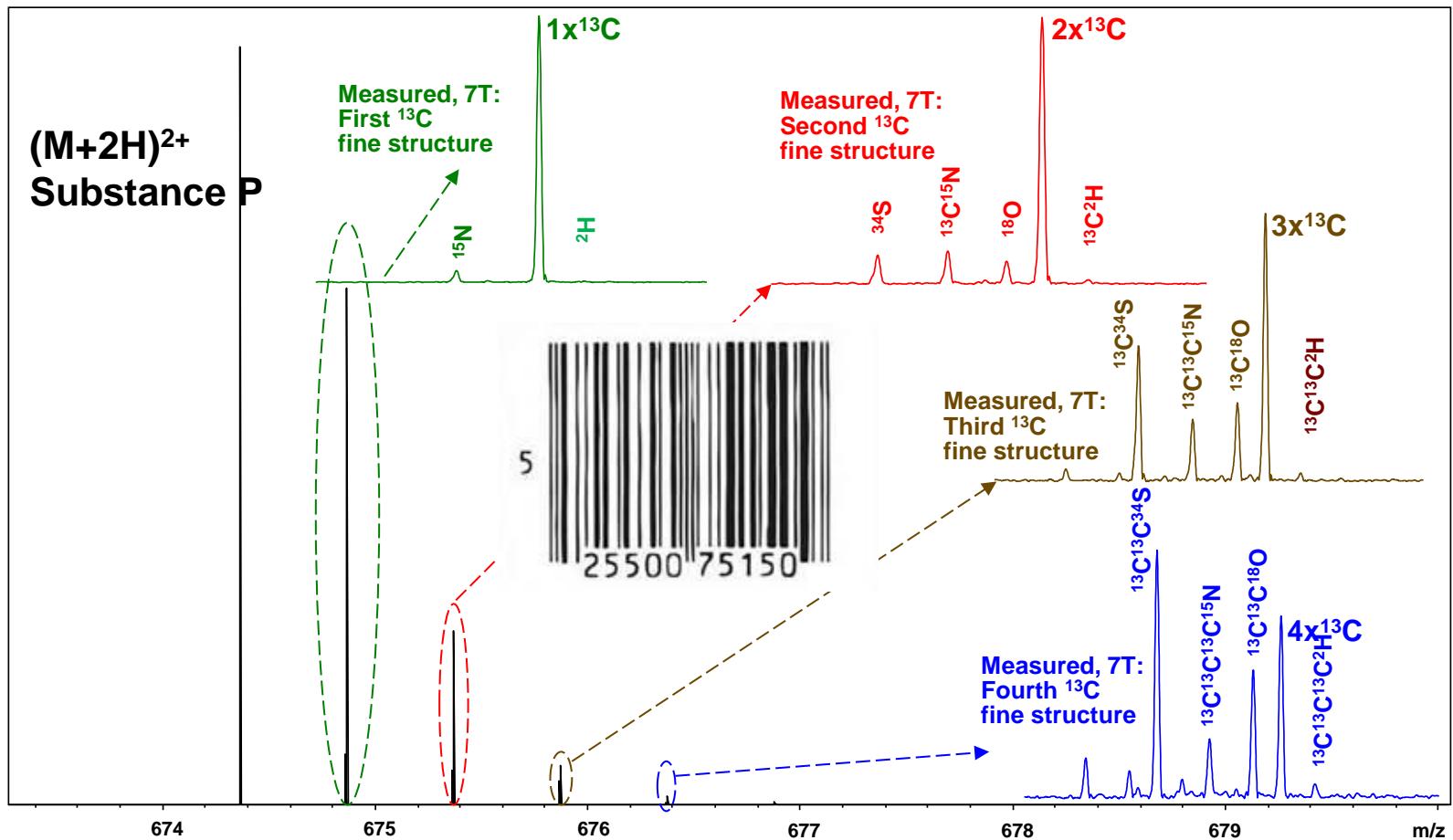


**Next isotope is > 1km away on this scale...**

# Auflösung der Isotopenfeinstruktur



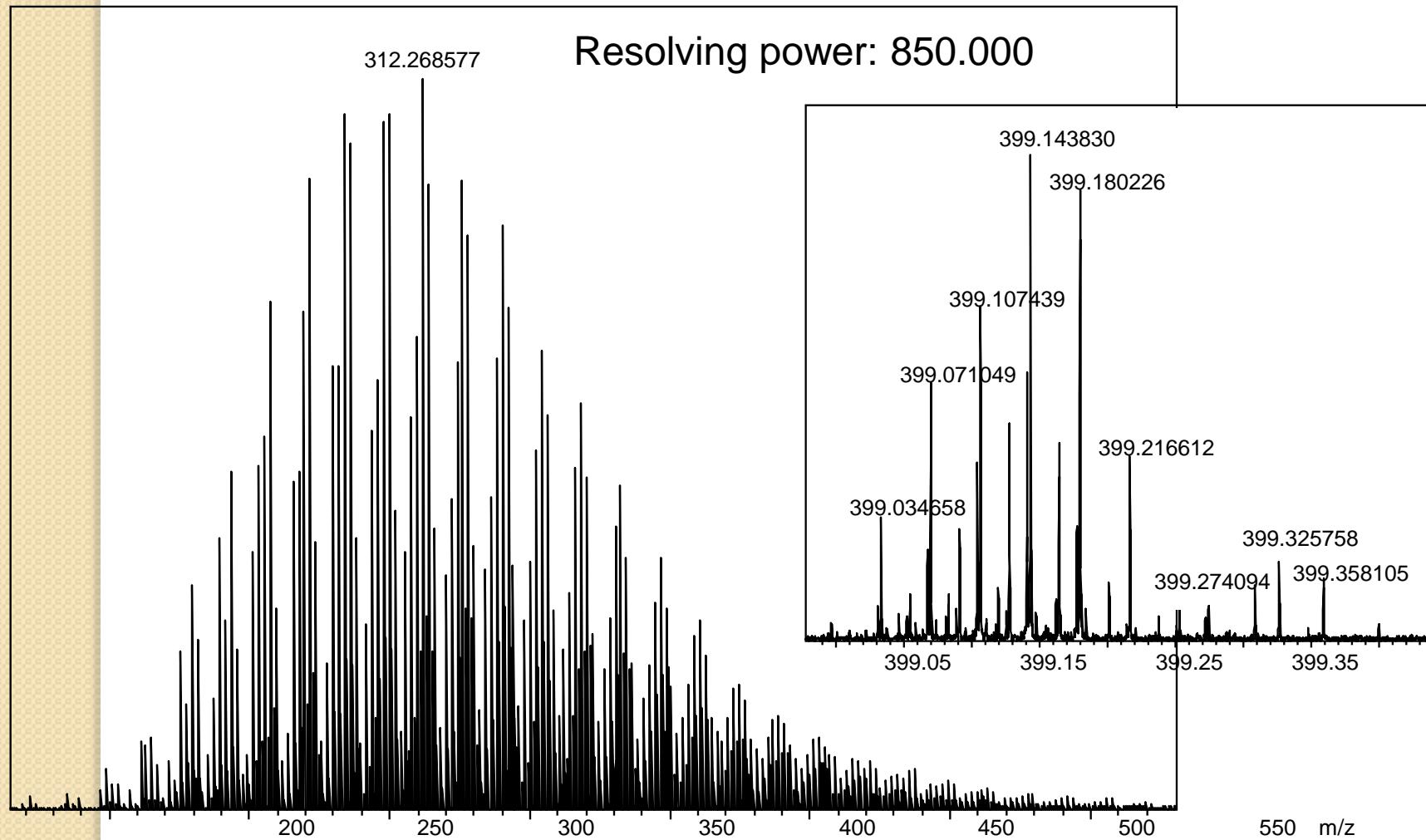
# Auflösung der Isotopenfeinstruktur



# Sub-ppm Massengenauigkeit in komplexen Mischungen

**Residual fuel oil, ESI positive ion mode**

1:5000 dilution in MeOH/Toluene 1:1



# Sub-ppm Massengenauigkeit in komplexen Mischungen

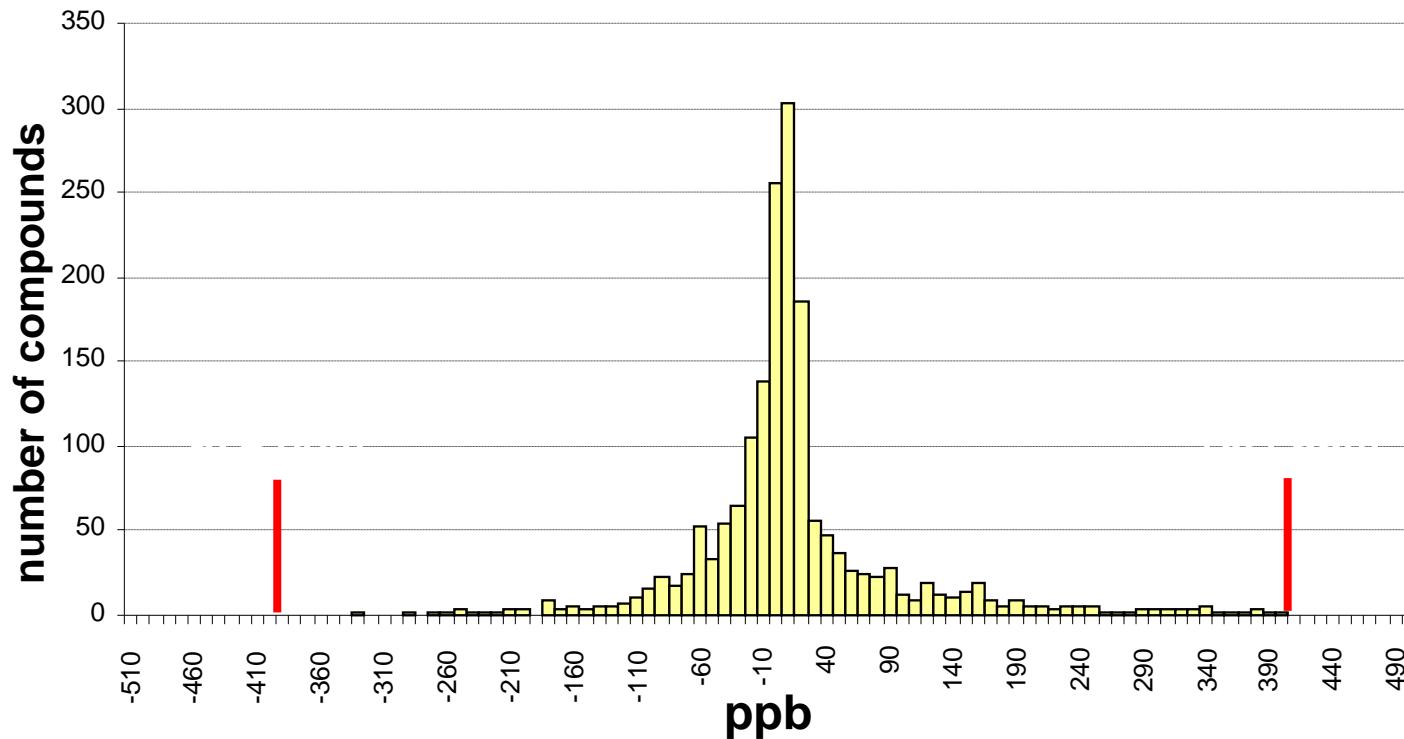
Residual fuel oil, ESI positive ion mode

1:5000 dilution in MeOH/Toluene 1:1

avg. mass deviation:

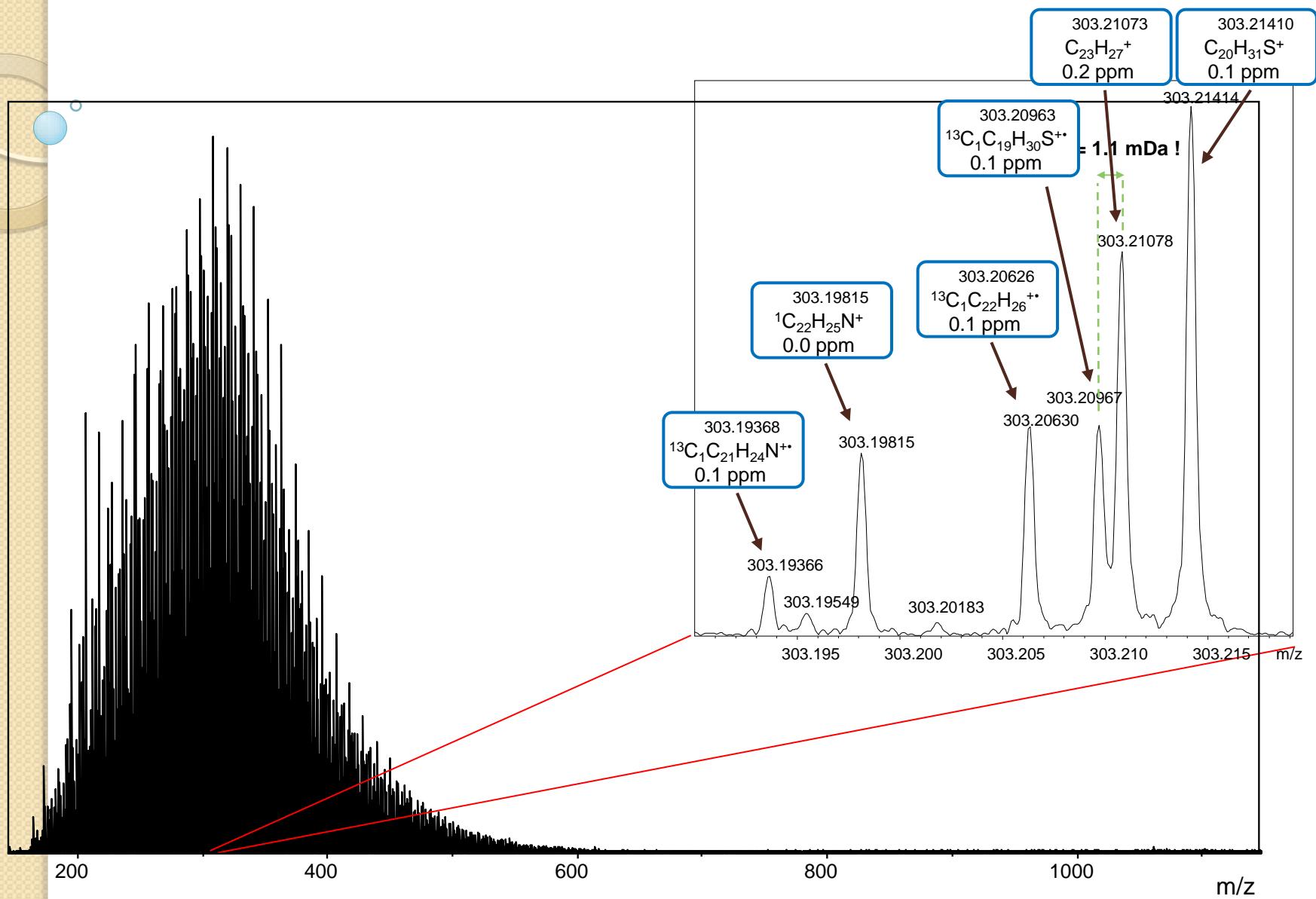
15 ppb (= 0.015 ppm)  $\pm$  84 ppb (= 0.084 ppm)

1778 compounds considered for statistics



None of the compounds has a mass error  $> \pm 0.4$  ppm

# Petroleomics



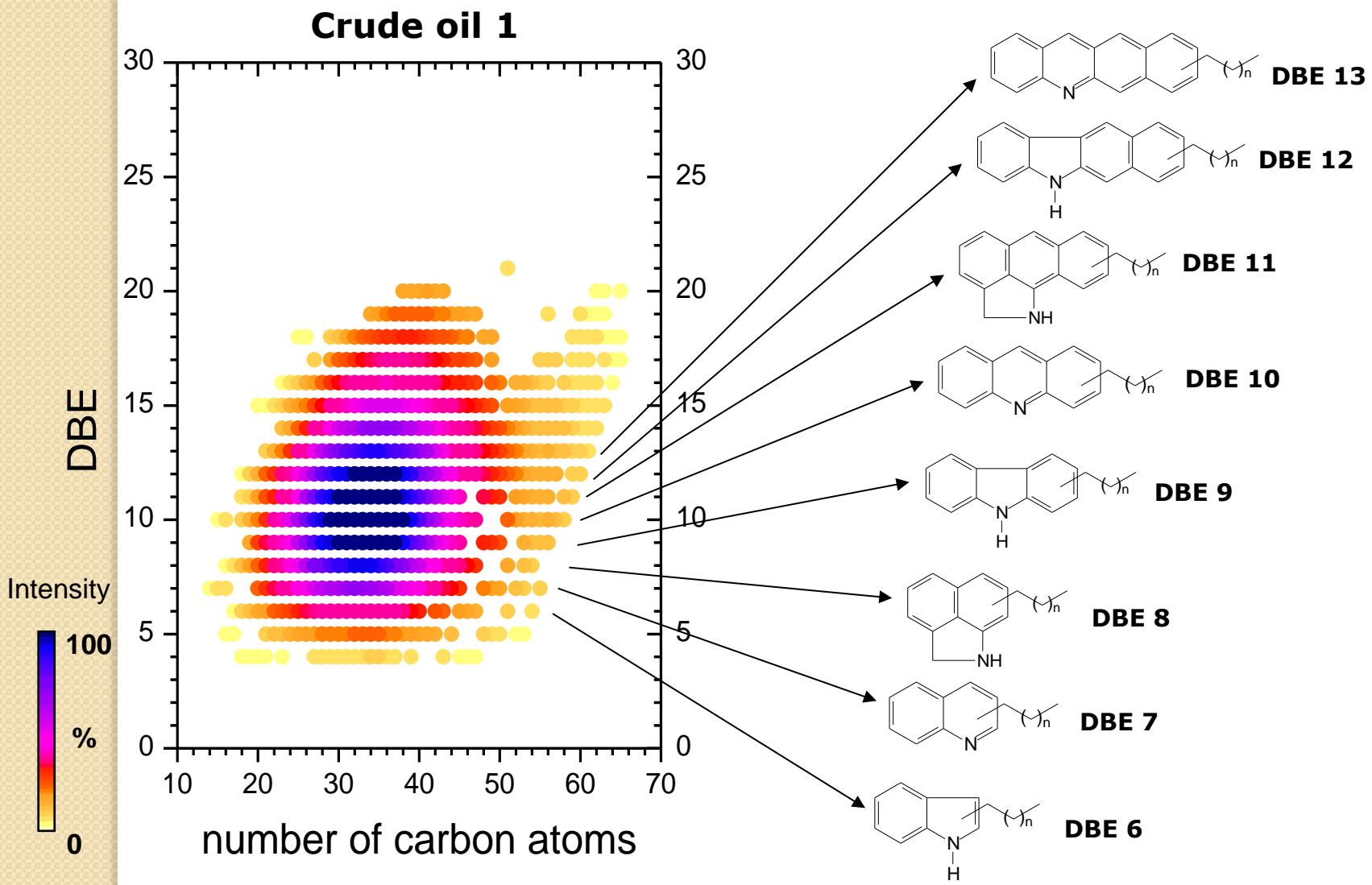
# Petroleomics

Ionization Method	Positive Ionization	Negative ionization
ESI	3820	3760
APCI	4540	3720
APPI	7450	3230
Total (non-redundant)		14700

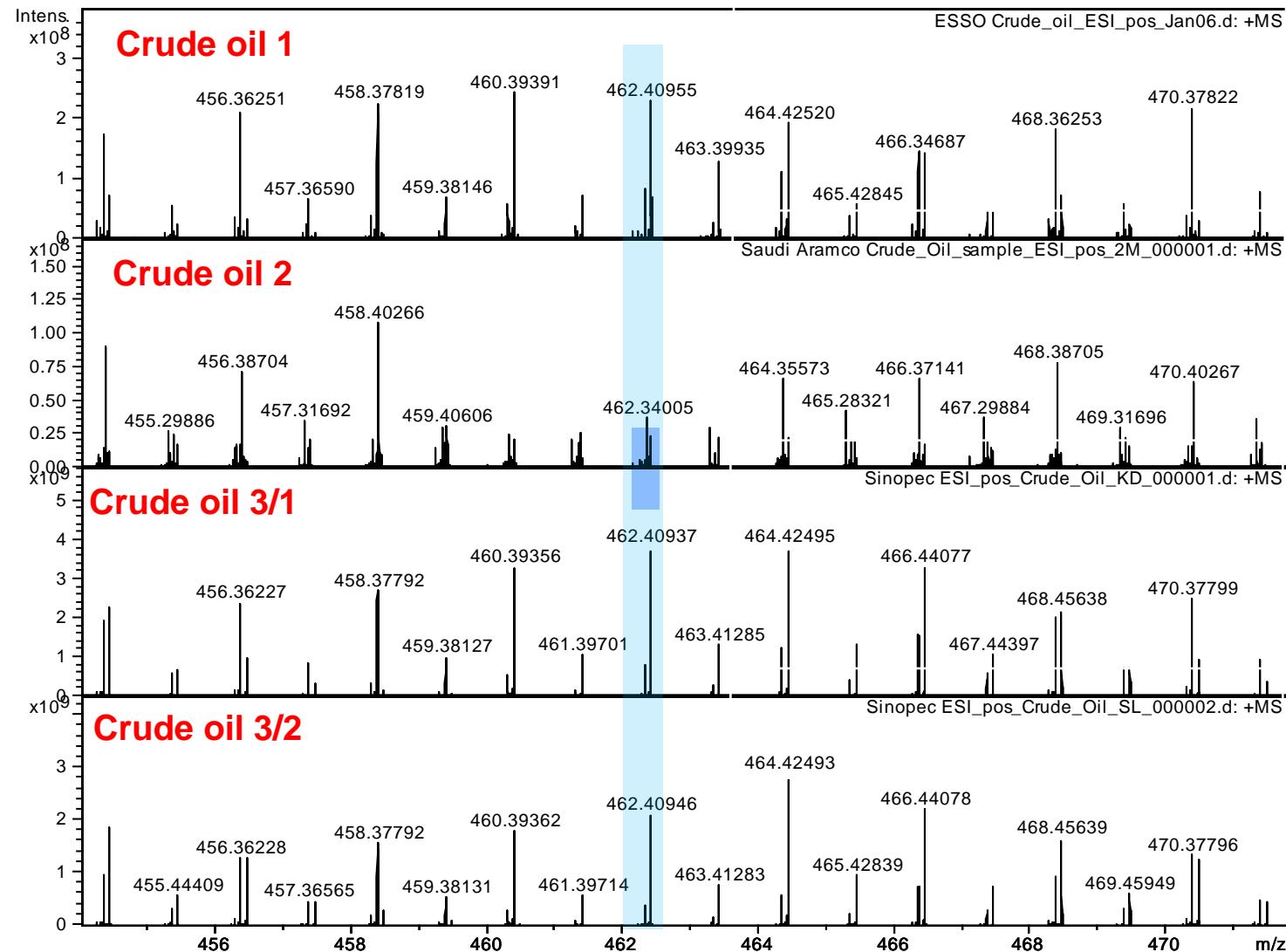
15.000 Komponenten kann man nicht mehr als Massenspektren erfassen!

# DBE vs. C plot for N compound class

## ESI positive ion mode

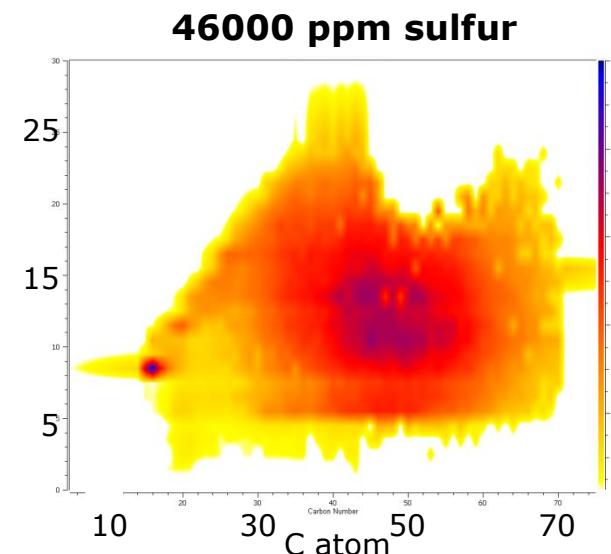
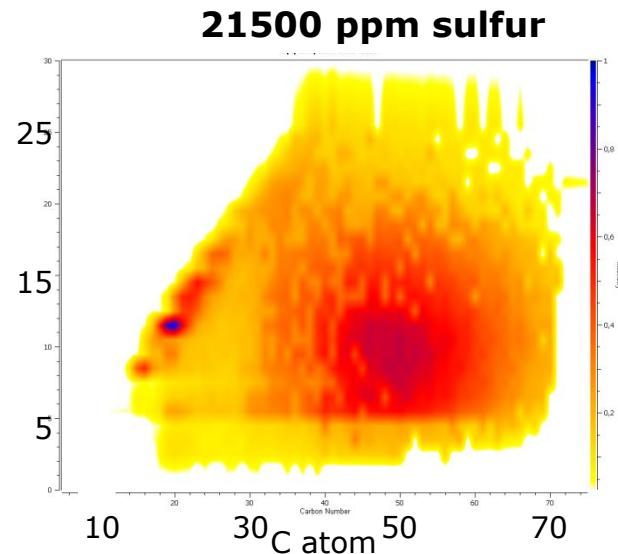
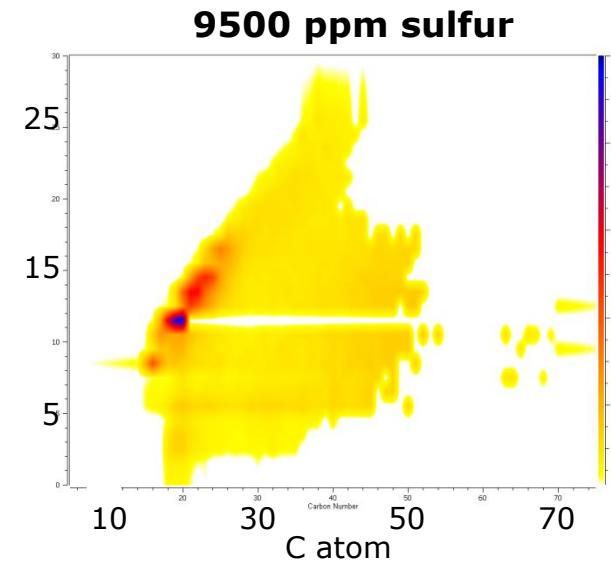
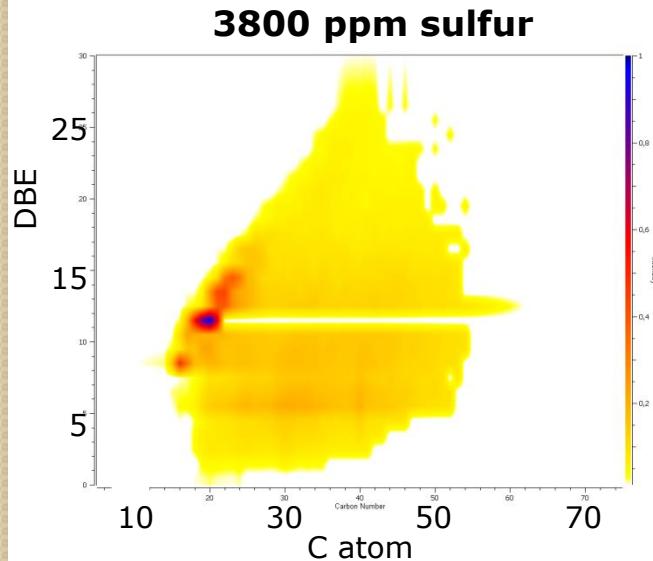


# Analyse des Schwefelgehalts von Rohöl



# DBE vs. C plots for S compound class

## APPI positive ion mode



# MALDI Imaging of Drugs and Metabolites

## Prinzip von MALDI imaging

34

*M. Stoeckli et al. / Analytical Biochemistry 311 (2002) 33–39*

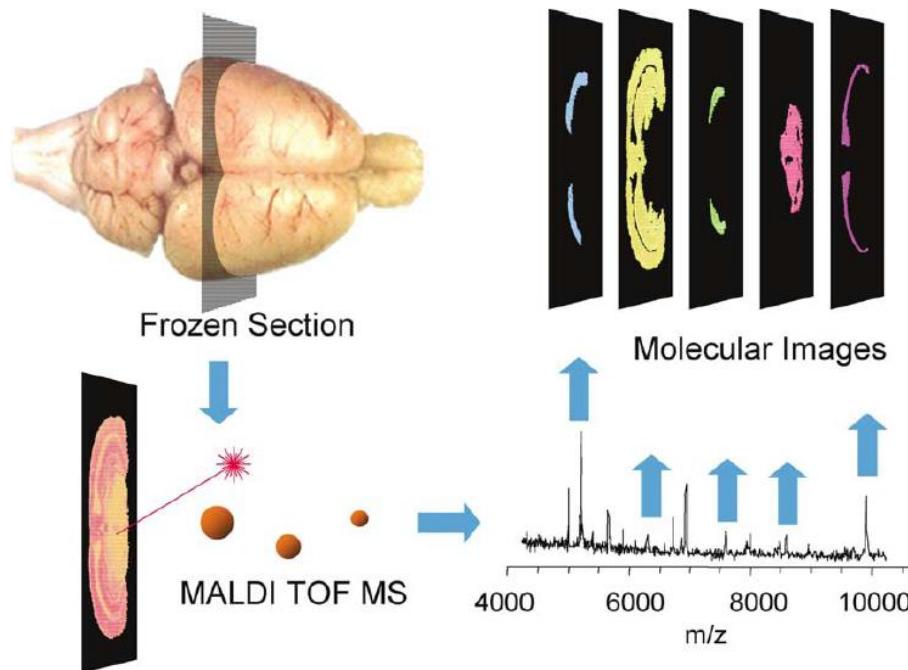


Fig. 1. MALDI MS imaging process: Cryostatic sections are fixed and coated with matrix, before they are analyzed in a TOF MS. Specific software is used for image acquisition and calculation of image data.

# MALDI Imaging of Drugs and Metabolites

High sensitivity required:

50 ng/mg (or mg/kg) Drug Dose is equivalent to **1 fg/pixel** (@ 50  $\mu\text{m}$ )

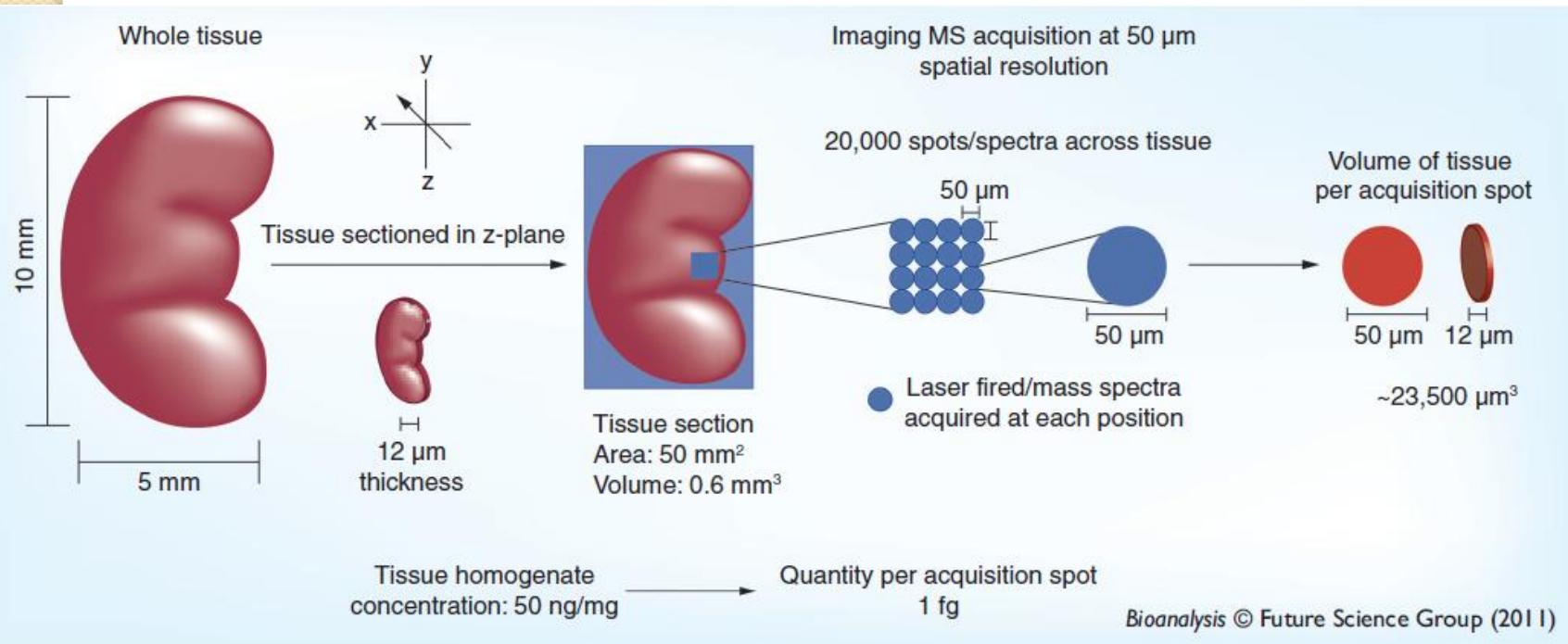


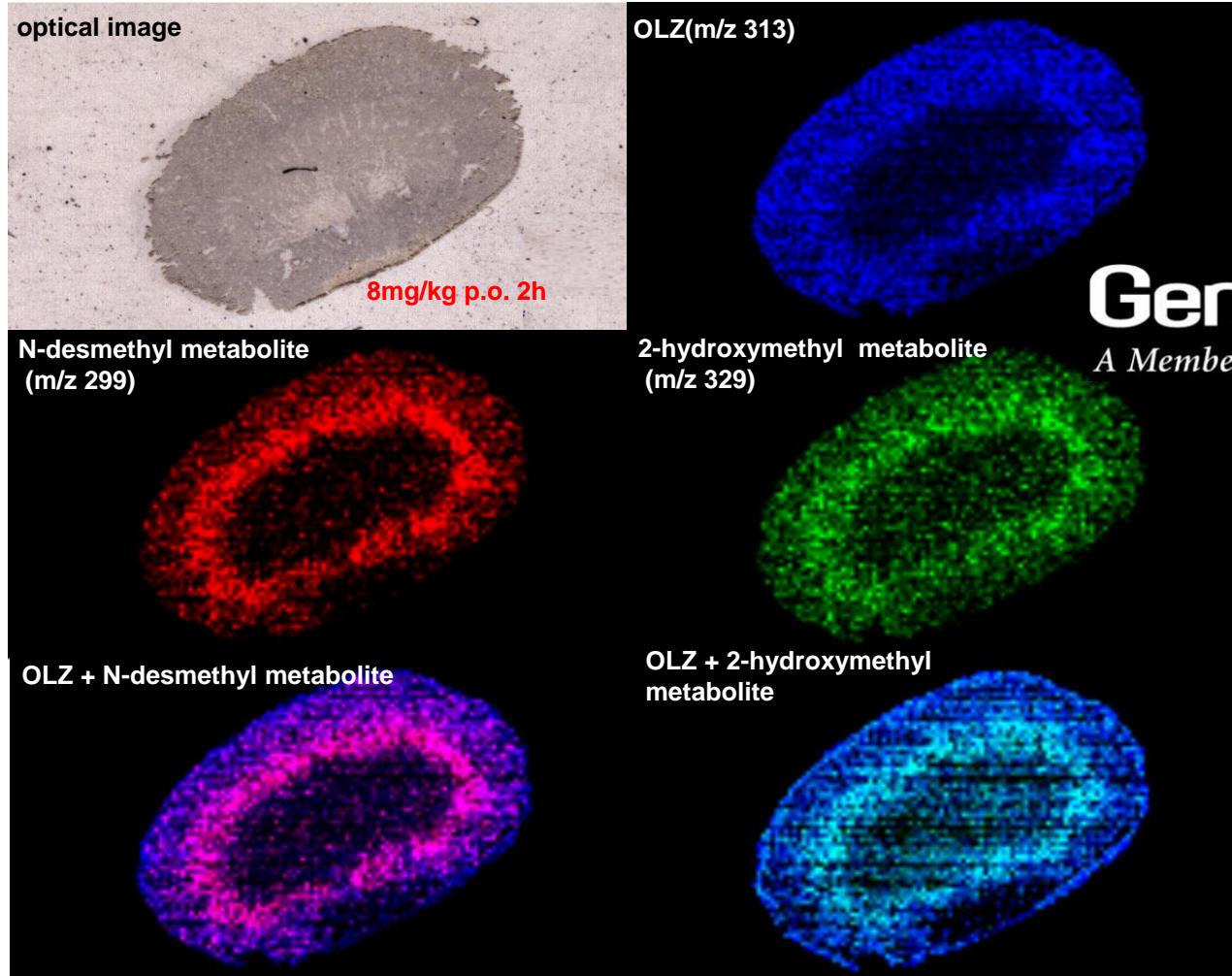
Figure 4. Limit of detection defined by MALDI pixel size.

Typischer Ø des Laserstrahls: 50  $\mu\text{m}$

Typische Dicke des geschnittenen Gewebes: 12  $\mu\text{m}$

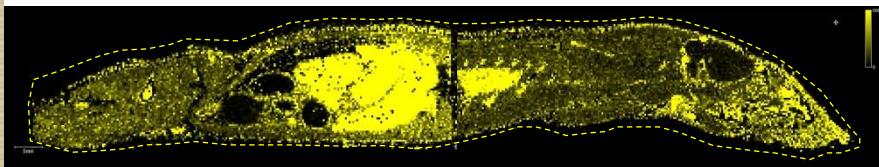
# Verteilung eines Wirkstoffes mit MALDI-FTMS Imaging

**Olanzapine (OLZ) 8mg/kg p.o.**

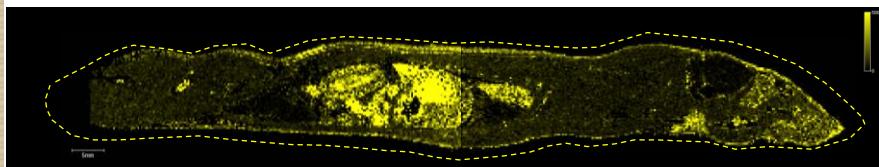


**Genentech**  
A Member of the Roche Group

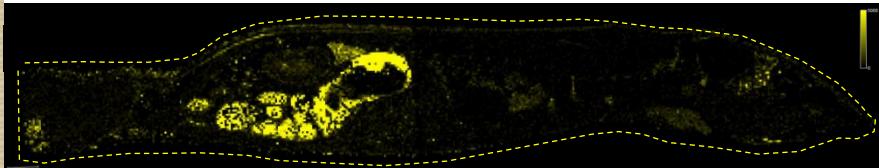
# Olanzapin Verteilung im Gewebe über Zeit



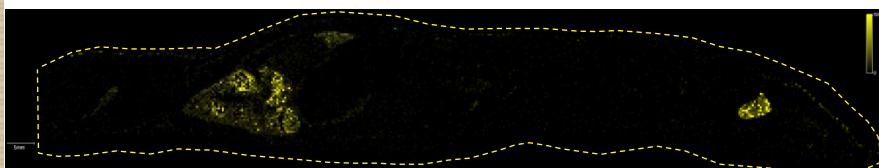
1 hour post-dose



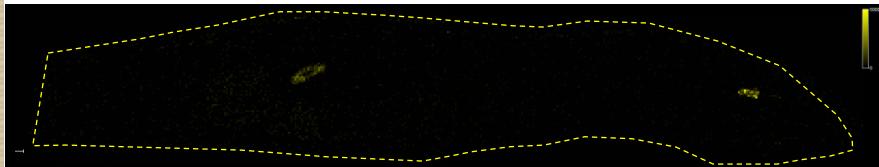
3 hours post-dose



6 hours post-dose



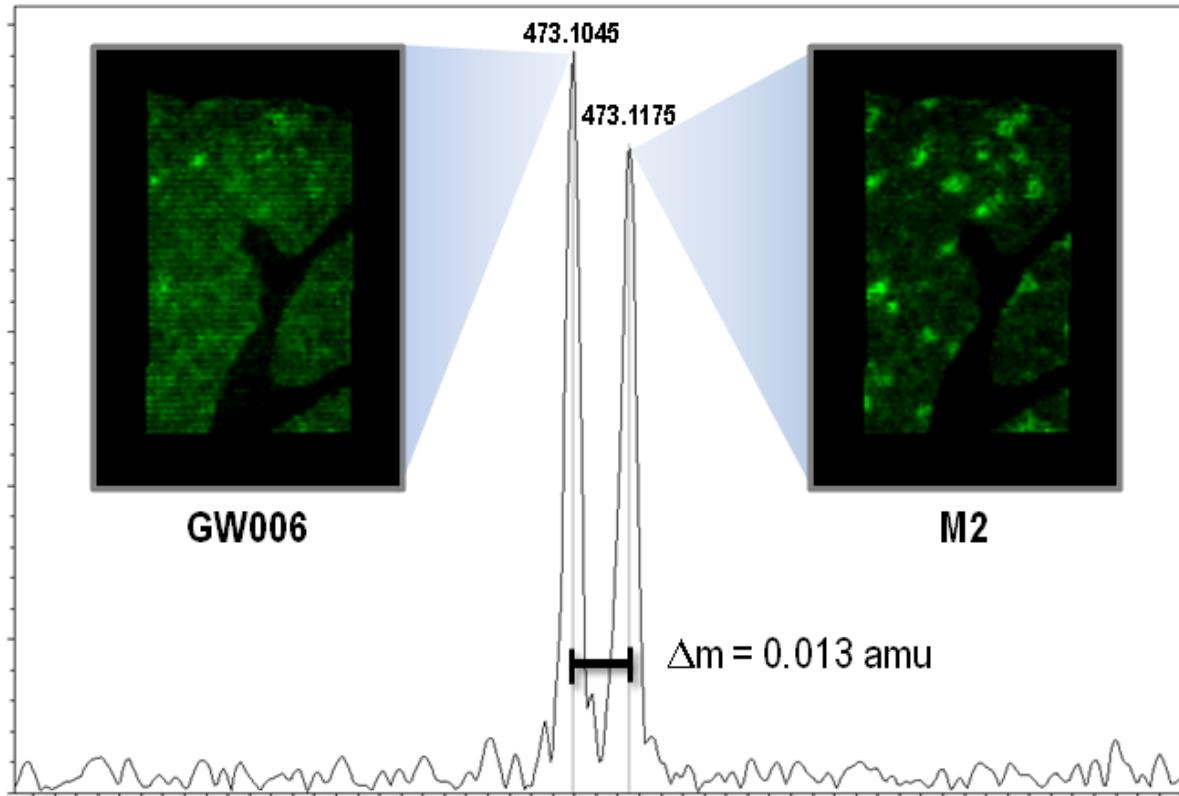
12 hours post-dose



24 hours post-dose

Gesamte Ratte wurde mit MALDI gescannt.

# Analyse der Metabolisierung mit MALDI Imaging Lapatinib als Beispiel



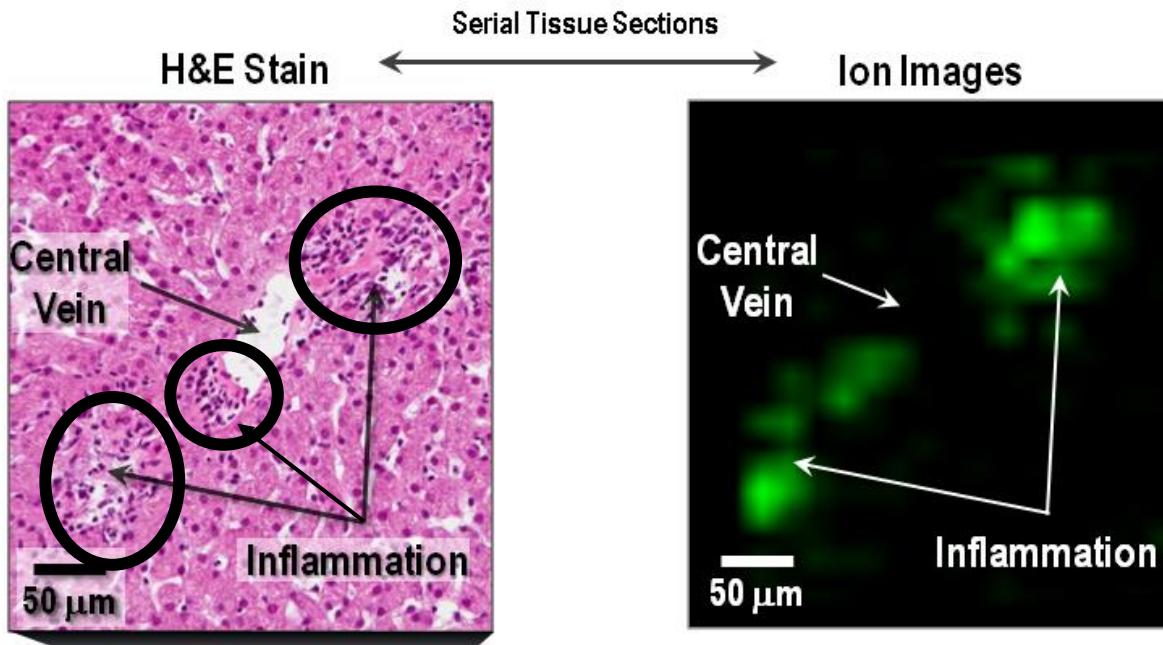
**Lapatinib and its metabolite M10 show a different distribution in dog liver.**

These two lapatinib related compounds show a different distribution in dog liver and have a mass difference of only 0.013 Da.

MALDI imaging on solariX allows unambiguous assignment of the metabolites



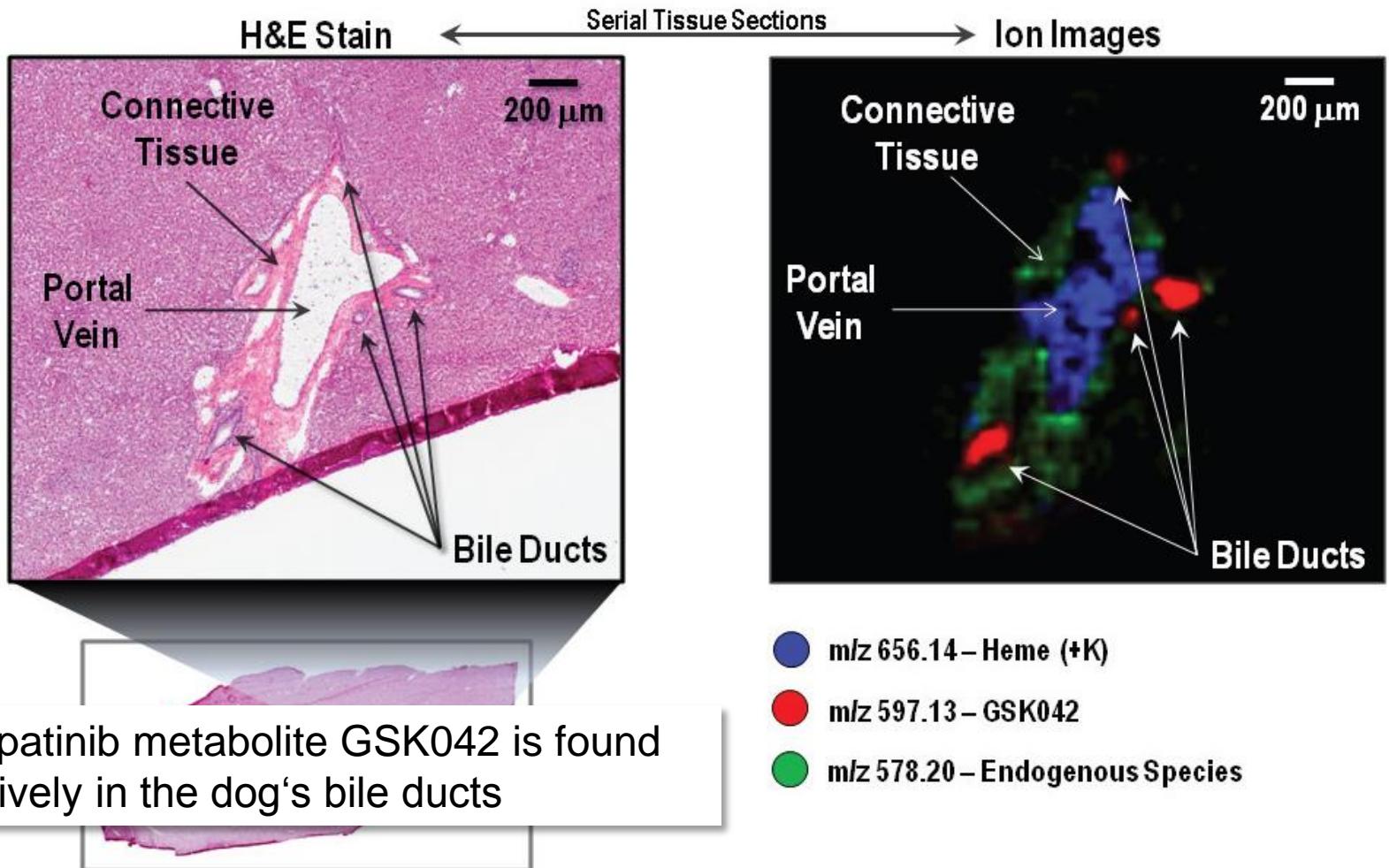
# Analyse der Metabolisierung mit MALDI Imaging Lapatinib als Beispiel



Comparison with histology shows that the lapatinib metabolite M10 is enriched in inflamed lesions.

“...in addition to parent and M10, ion images for 21 metabolites were also generated in the liver sections (data not shown).”

# Analyse der Metabolisierung mit MALDI Imaging Lapatinib als Beispiel



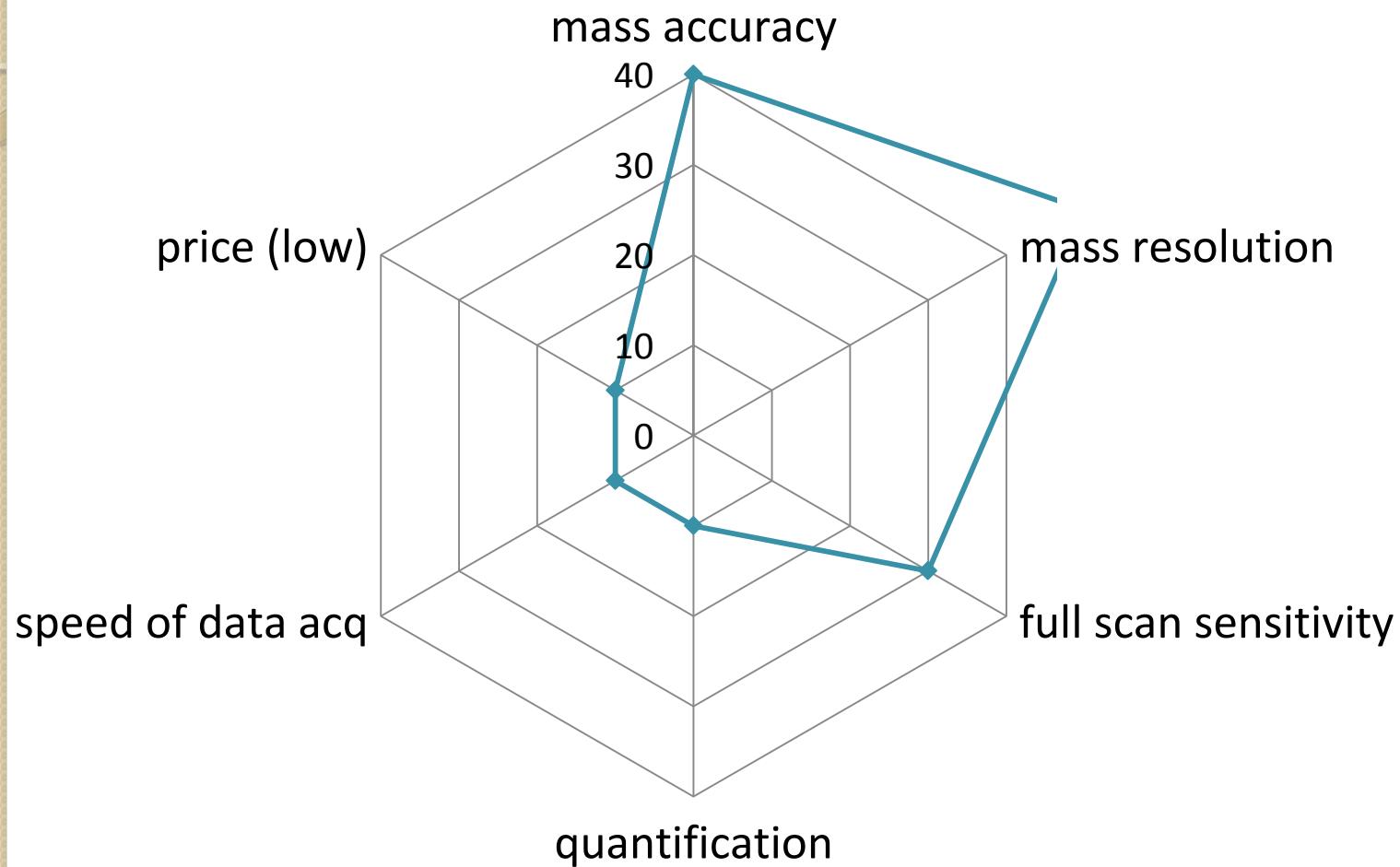
## Vorteile der FTMS Technologie

- Extrem hohe Massenauflösung, sehr hohe Massengenauigkeit
- Isotopenfeinstrukturaufklärung ermöglicht eindeutige Bestimmung der Summenformel
- Benötigt für viele Anwendungen keine Vortrennung durch LC mehr
- ESI und MALDI parallel verwendbar
- Viele Möglichkeiten für MS/MS: CID, ETD, ECD, ISD
- Hohe Empfindlichkeit durch selektive Speicherung von Ionen in der Messzelle

## Nachteile der FTMS Technologie

- Magnete sind relativ teuer in der Anschaffung und im Unterhalt
- Durch FT Prozess relativ langsam; bei LC Kopplung muss daher auf Auflösung verzichtet werden, um schnell genug zu arbeiten

# FTMS: Spinnenetz der Eigenschaften



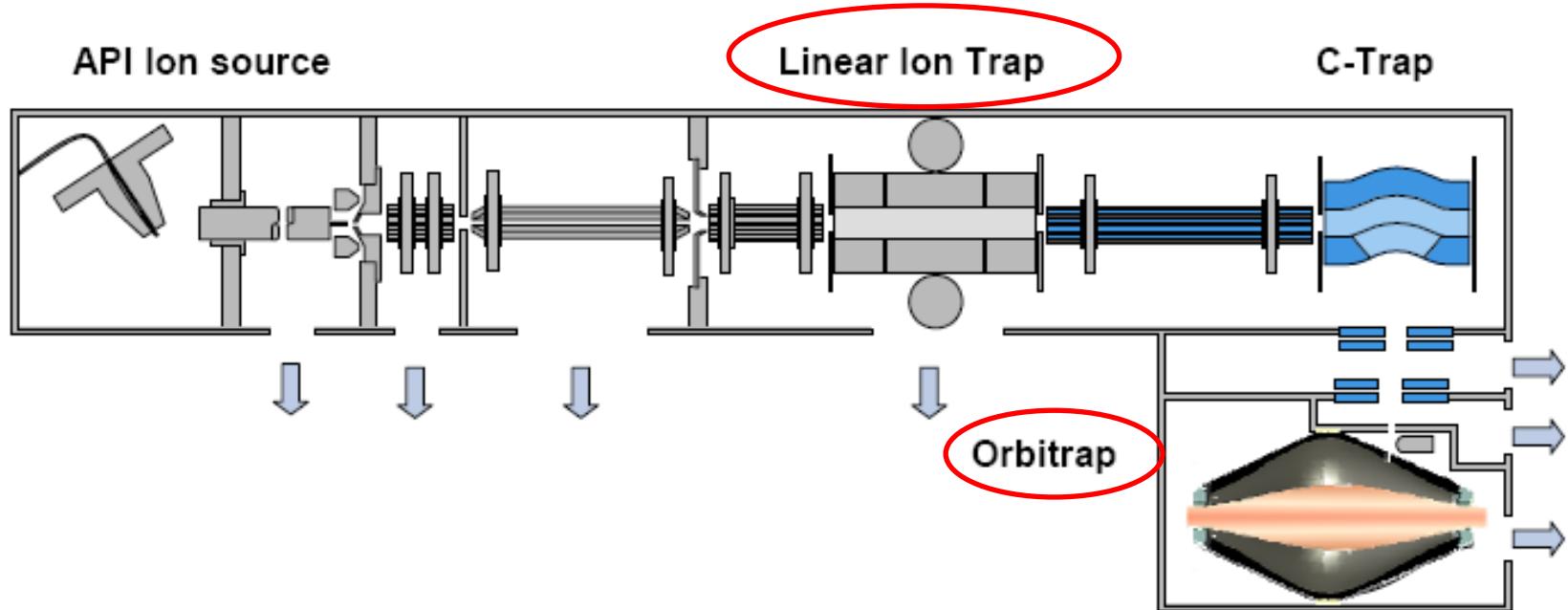
## 5b. Orbitrap

- **1923: Kingdon → Kingdon-Trap**
- **1981: Knight → ideal Kingdon-Trap**
- **2000: Makarov → “Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis.” *Anal Chem* 2000, 72, 1156-1162**



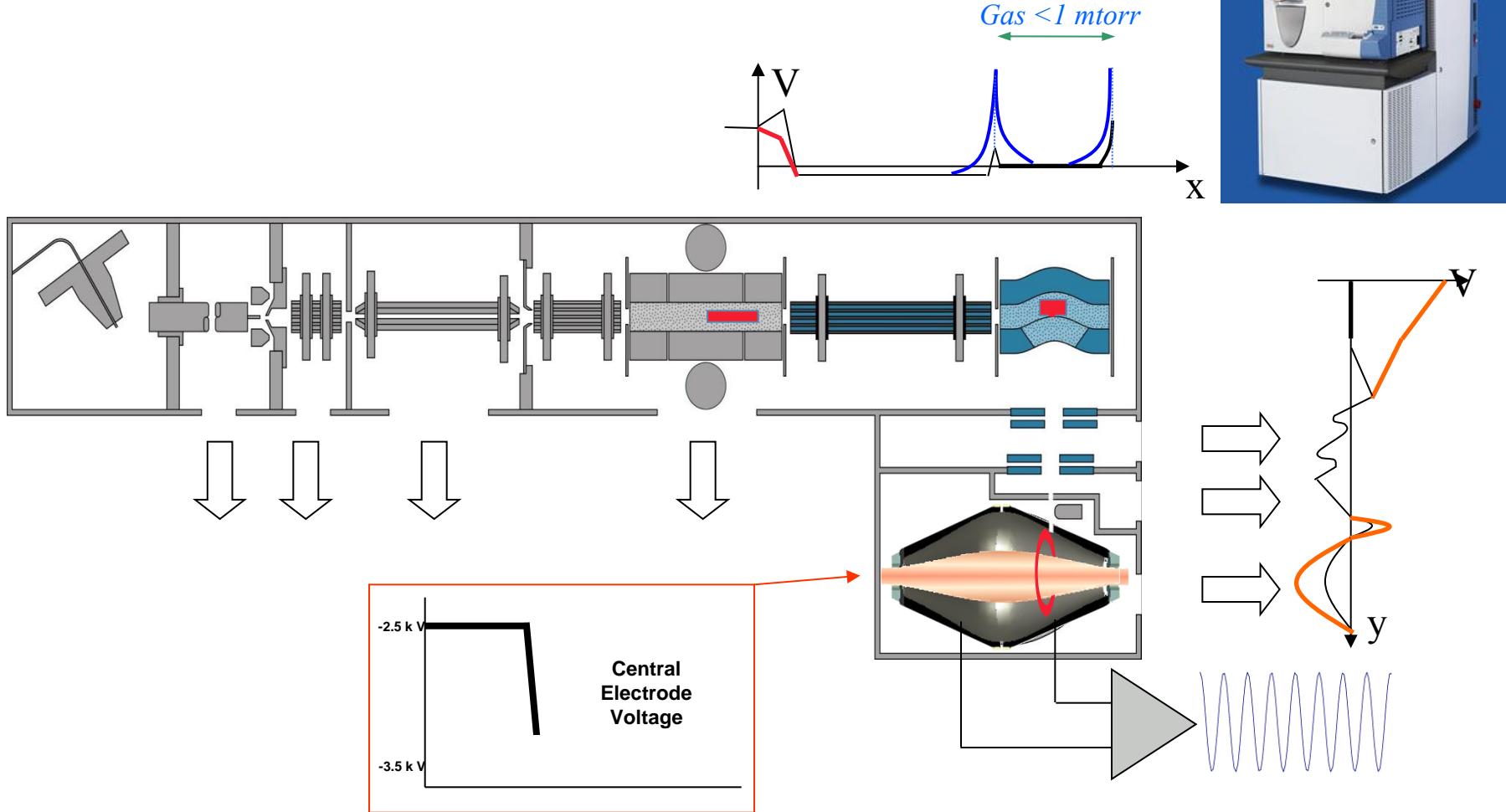
Source: Thermo-Fischer Life Science

# Orbitrap Schema: Hybridgerät aus Ionenfalle und Orbitrap



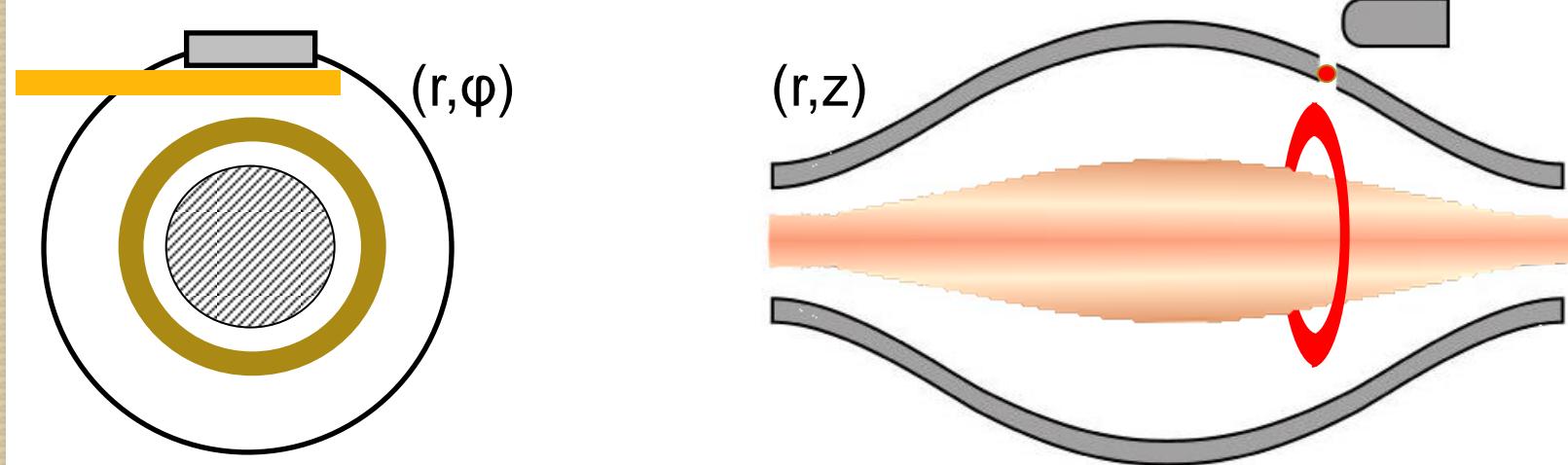
# Orbitrap: Ablauf des Analyseprozesses

- Ions are stored in the linear trap of LTQ

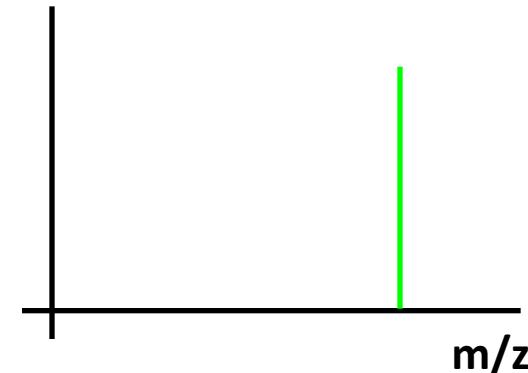
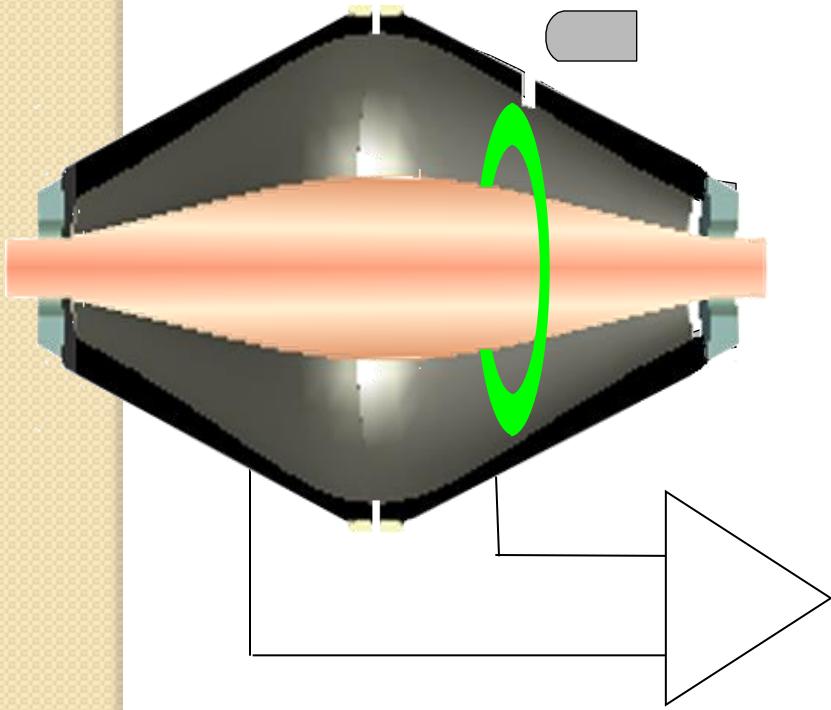


# Ion Injektion and Ringform

- An ion packet of a selected  $m/z$  enters the field
- Increasing voltage squeezes ions
- Voltage stabilises and ion trajectories are also stabilized
- Angular spreading forms a ROTATING RING



# Ionbewegung in der Orbitrap



$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

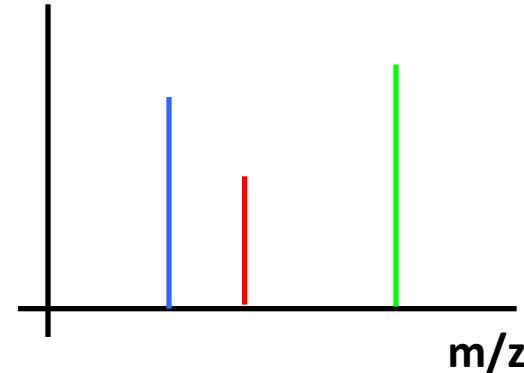
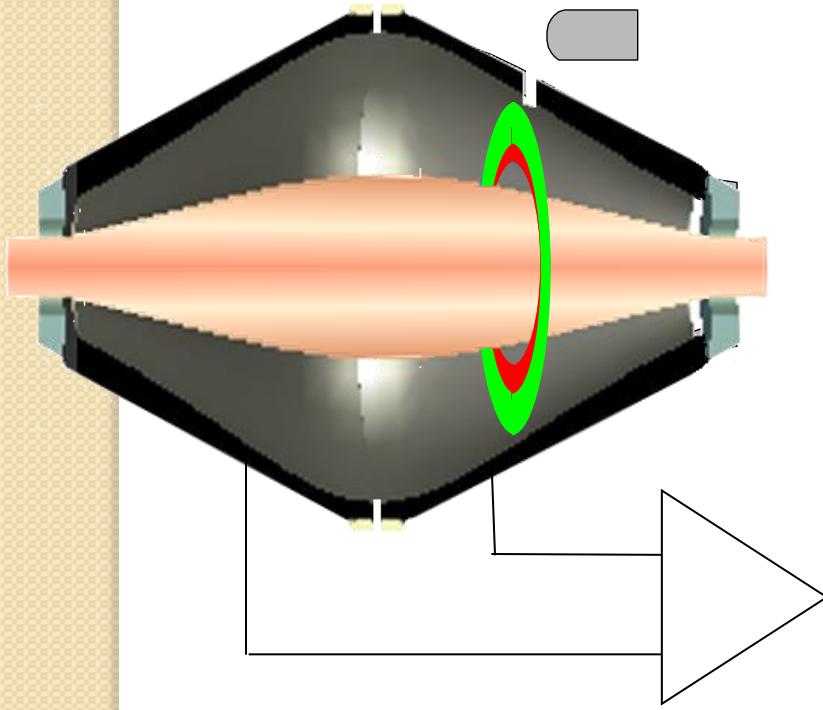
w = oscillation frequency  
k = instrumental const.  
 $m/z$  = .... what we want!

Ähnlich dem, was im FTMS geschieht

A.A. Makarov, *Anal. Chem.* 2000, **72**: 1156-1162.

A.A. Makarov et al., *Anal. Chem.* 2006, **78**: 2113-2120.

# Ionbewegung in der Orbitrap



FT

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

w = oscillation frequency  
k = instrumental const.  
m/z = .... what we want!

Ähnlich dem, was im FTMS geschieht

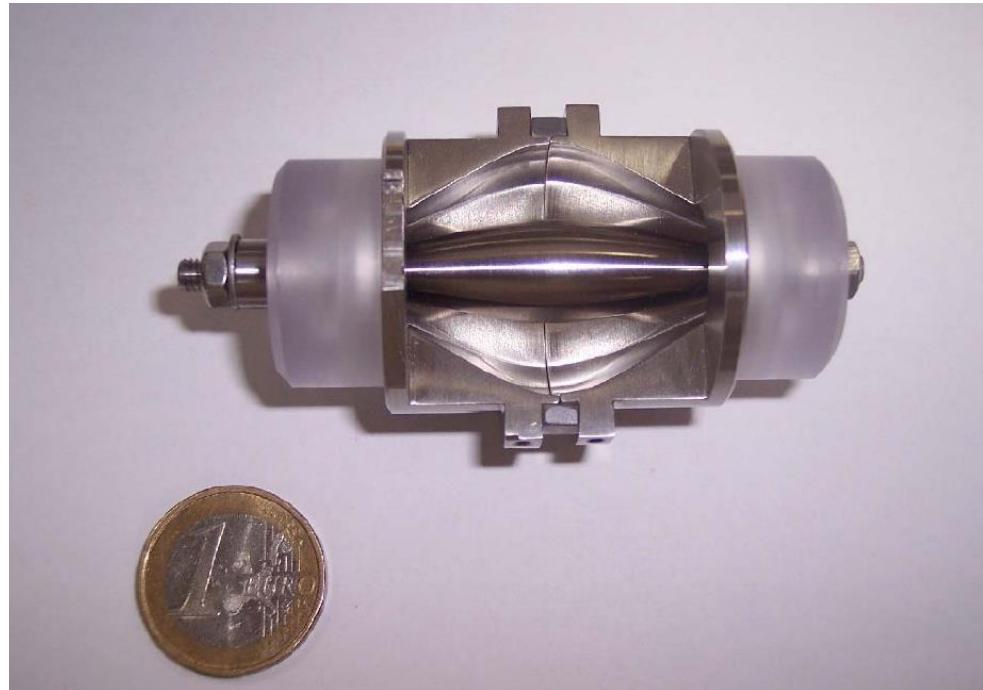
A.A. Makarov, *Anal. Chem.* 2000, **72**: 1156-1162.

A.A. Makarov et al., *Anal. Chem.* 2006, **78**: 2113-2120.

# Orbitrap im Vergleichsmassstab

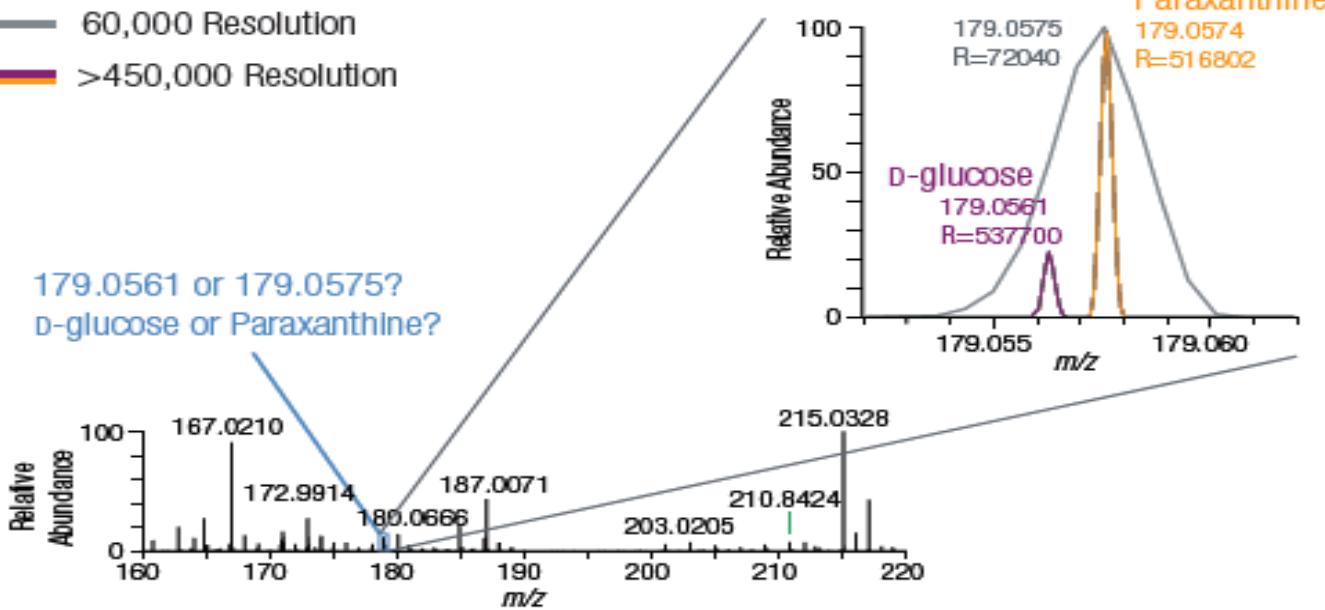
Wichtig:

- Kleine Abmessungen, um Spiegelladung zu messen und möglichst viele Durchgänge zu haben
- Hohe Spannung zwischen Elektroden, um möglichst viele Durchgänge zu haben
- Sehr niedriger Druck, um Stöße mit dem Restgas zu vermeiden



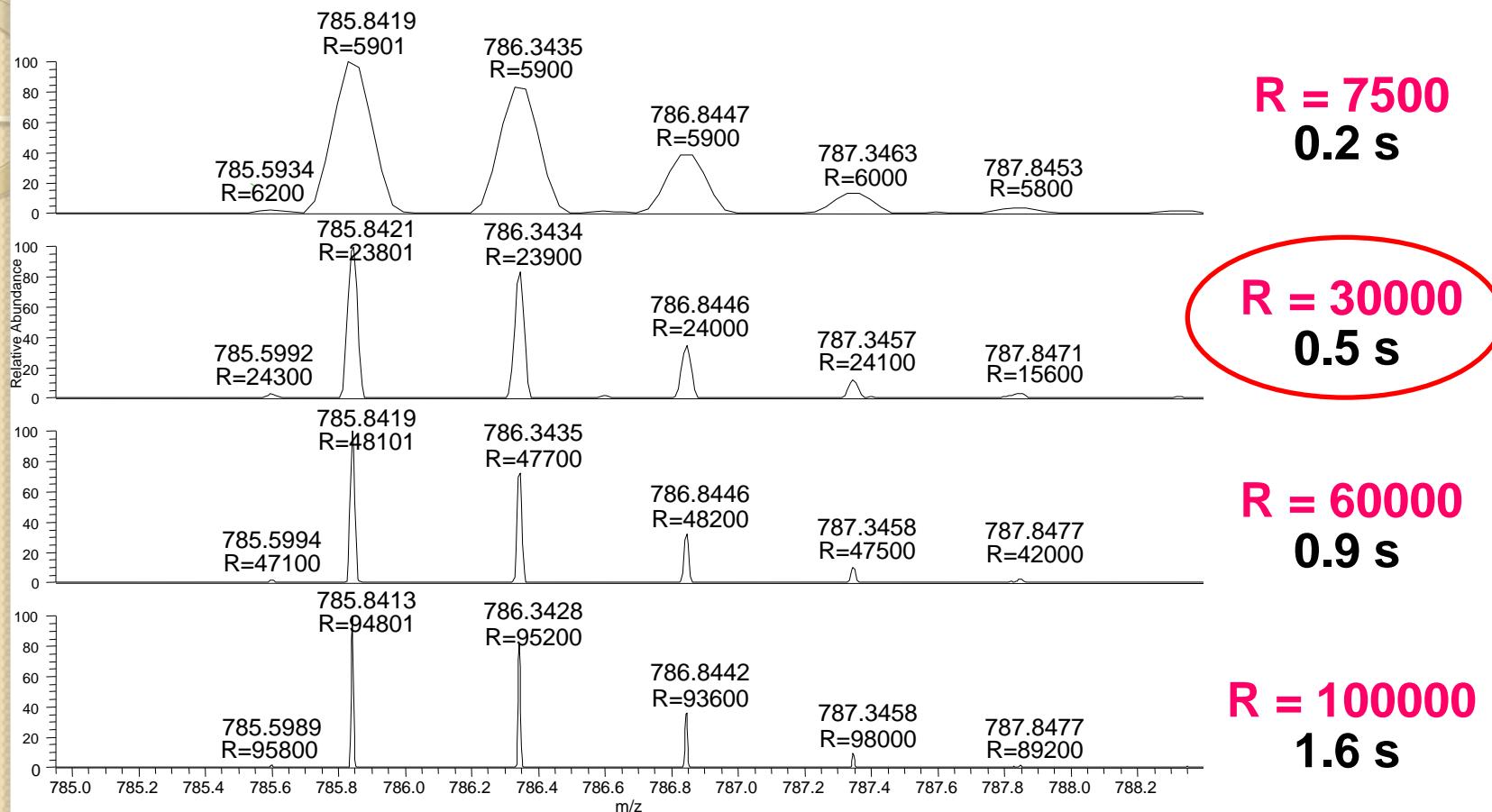
- Extrem hoher Anspruch an mechanische Fertigungstoleranz
- Sehr gutes Vakuumsystem, um in geringer Distanz zwischen C-trap ( $10^{-6}$  mbar) und Orbitrap ( $10^{-10}$  mbar) zu pumpen

# 450,000 Resolution on the Orbitrap Fusion MS



▲ The Orbitrap Fusion MS easily separates D-glucose and paraxanthine, isobaric analytes commonly found at significantly different concentrations in blood. D-glucose is vastly more abundant, but difficult to detect due to its low ionization efficiency.

# Massenauflösung ist zeitabhängig

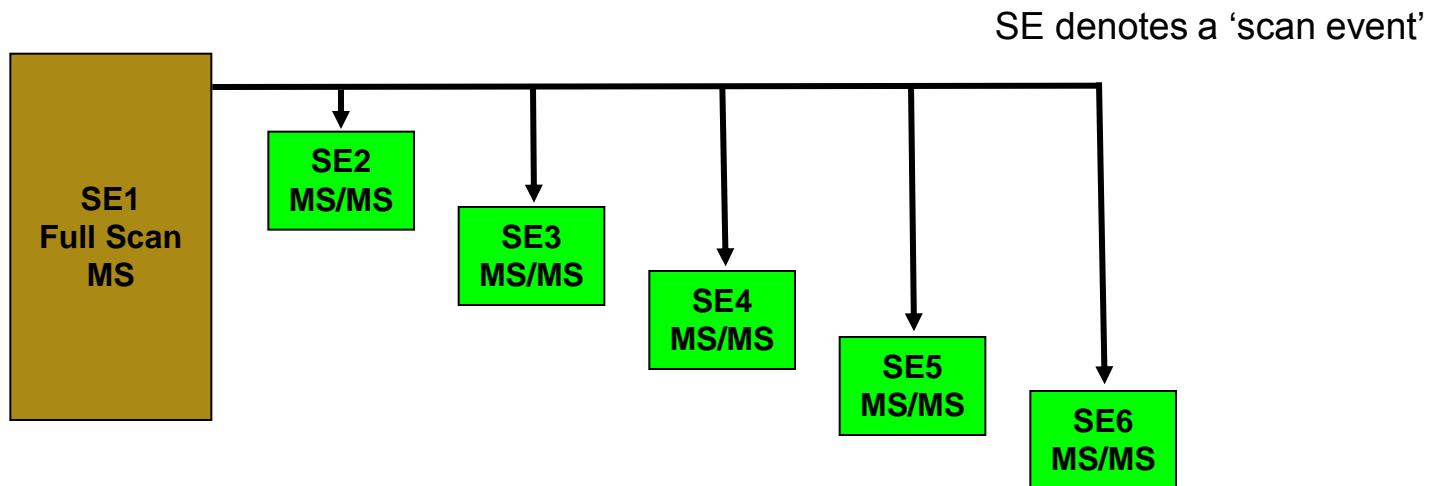


d.h. Auflösung > 60.000 brauchen viel Zeit (u.U.  
nicht kompatibel mit schneller HPLC)

# Paralleler Scan in der Orbitrap und in der Ionenfalle

Während Orbitrap ein MS Spektrum aufnimmt, werden in der Ionenfalle zeitgleich 5x MS/MS durchgeführt

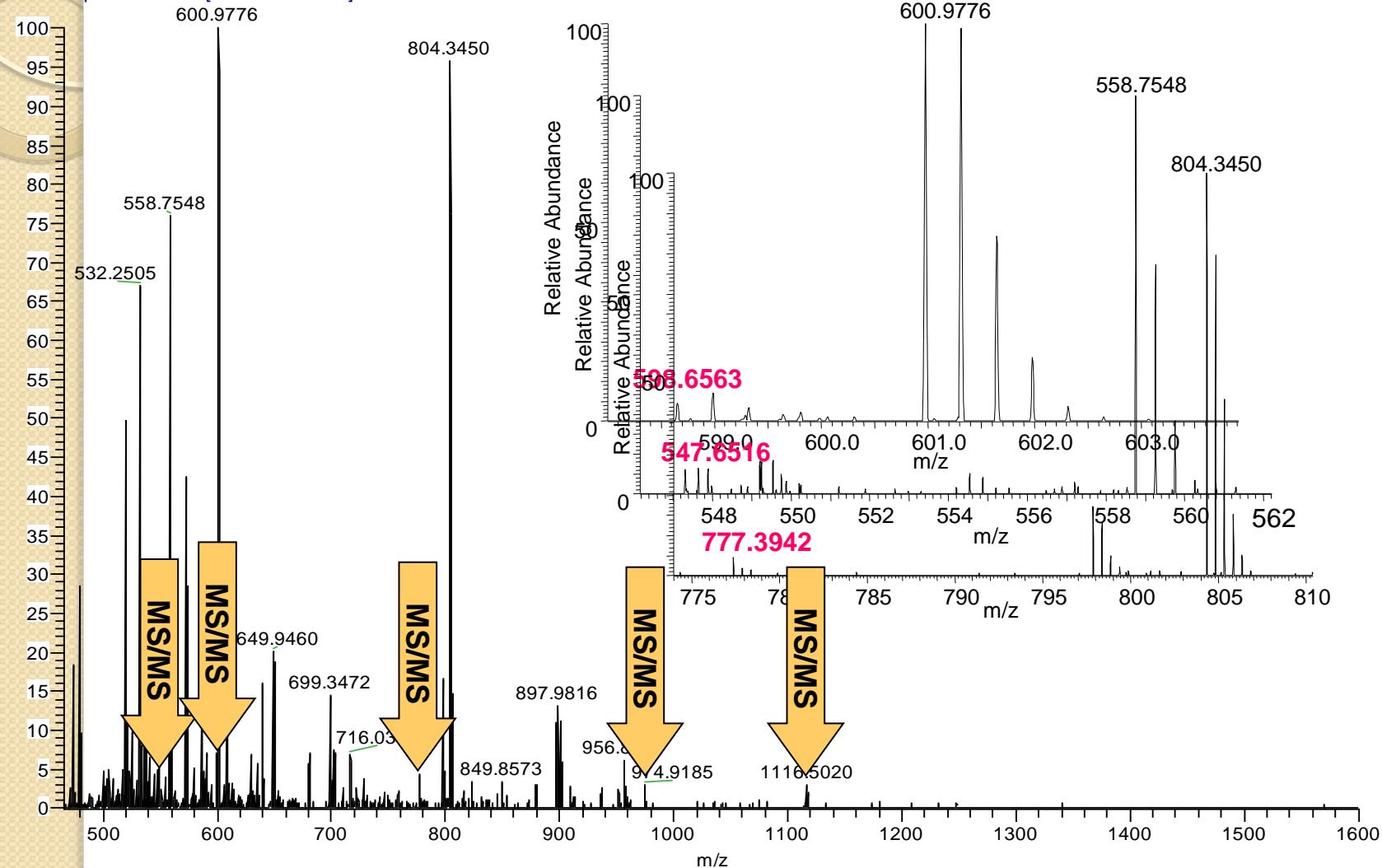
**Total time 2.4 seconds**



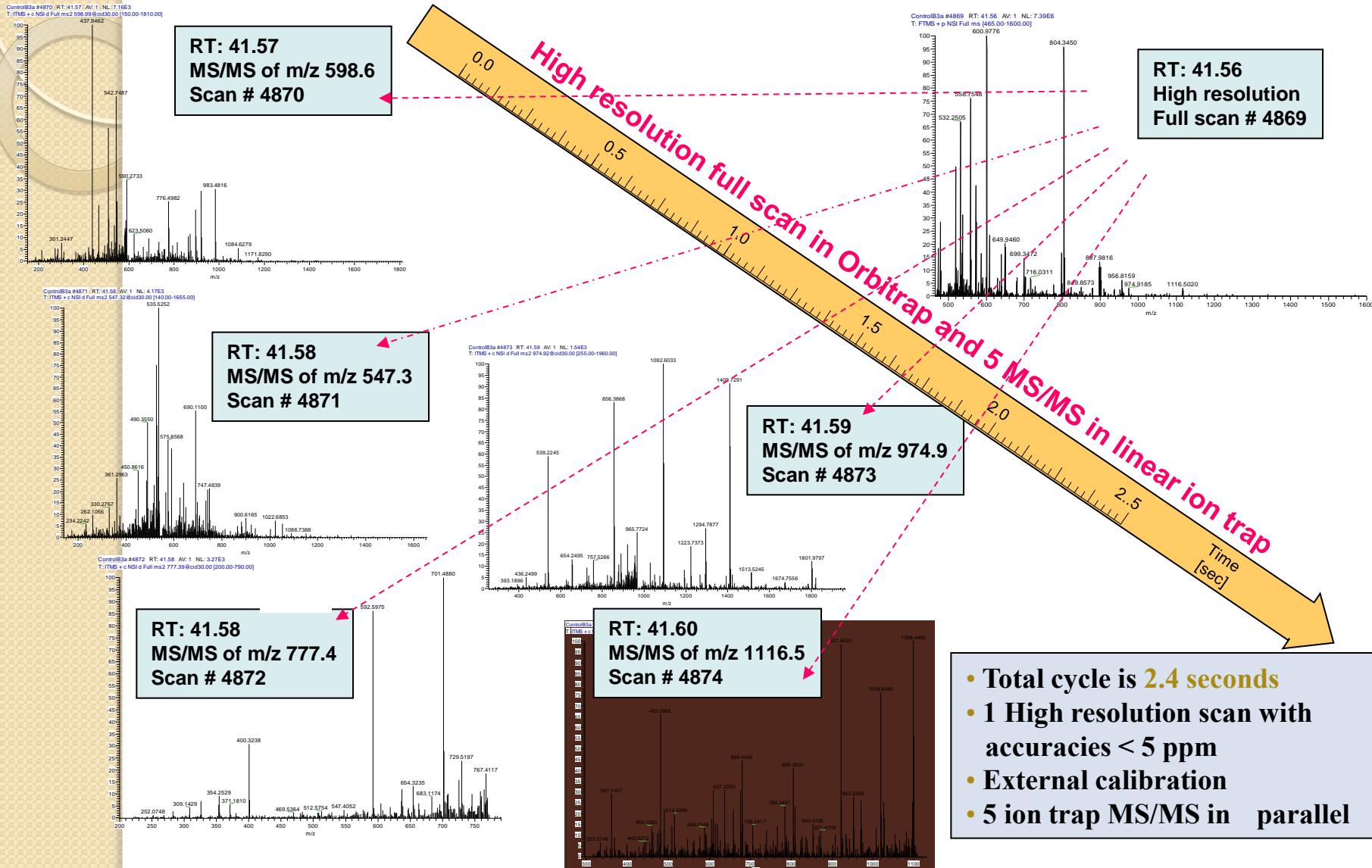
- Durch Parallelität entsteht hohe Messgeschwindigkeit trotz des langen Scans der Orbitrap: MS/MS Spektren können zur Datenbanksuche für die Proteinidentifizierung in Proteomics eingesetzt werden.
- Hohe Auflösung für MS (60.000), niedrige Auflösung für MS/MS (5.000).

# Zell-Lysat: Beispiel für parallele Scans

ControlB3a #4869 RT: 41.56 AV: 1 NL: 7.39E6  
T: FTMS + p NSI Full ms [465.00-1600.00]



# Zell-Lysat: Beispiel für parallele Scans



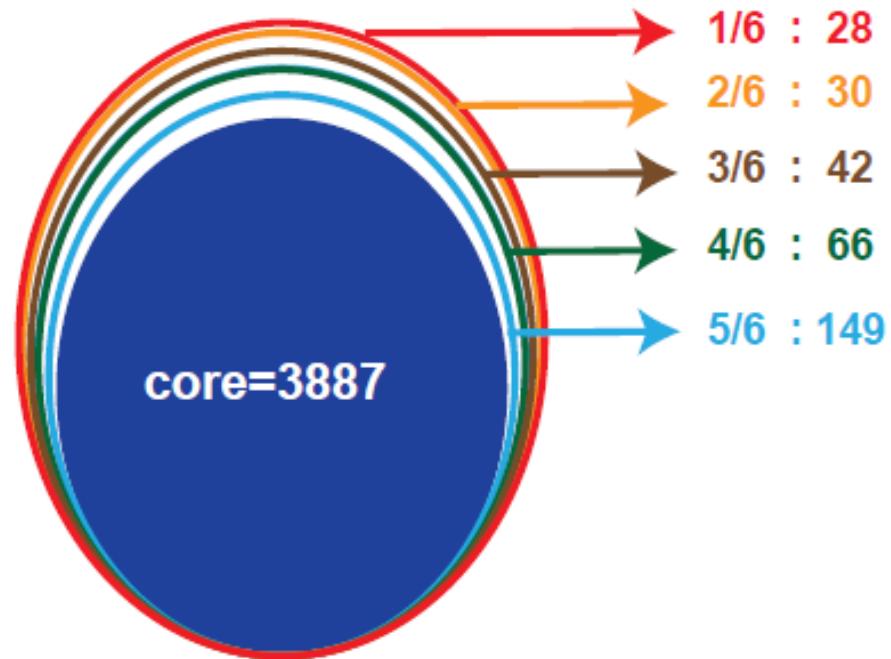
Alexander Makarov, Michaela Scigelova

Source: Thermo-Fischer Life Science

## Zell-Lysat: Beispiel für parallele Scans

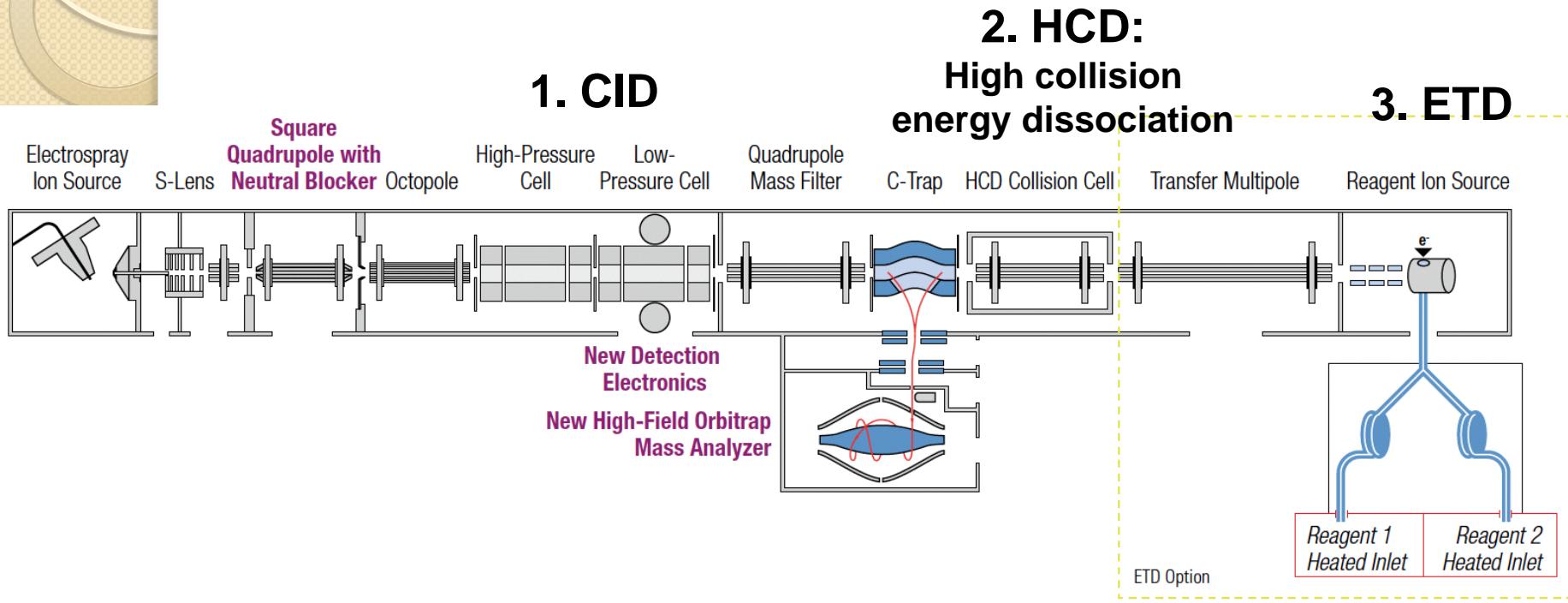
- Rapid and robust proteome analysis
  - 50 cm column length
  - 4 h gradient
  - 35 °C (nano-UHPLC)
- Near complete yeast proteome
- More than 4,000 proteins/run (with 1% FDR)
- Median sequence coverage 23%

**Minimum undersampling**

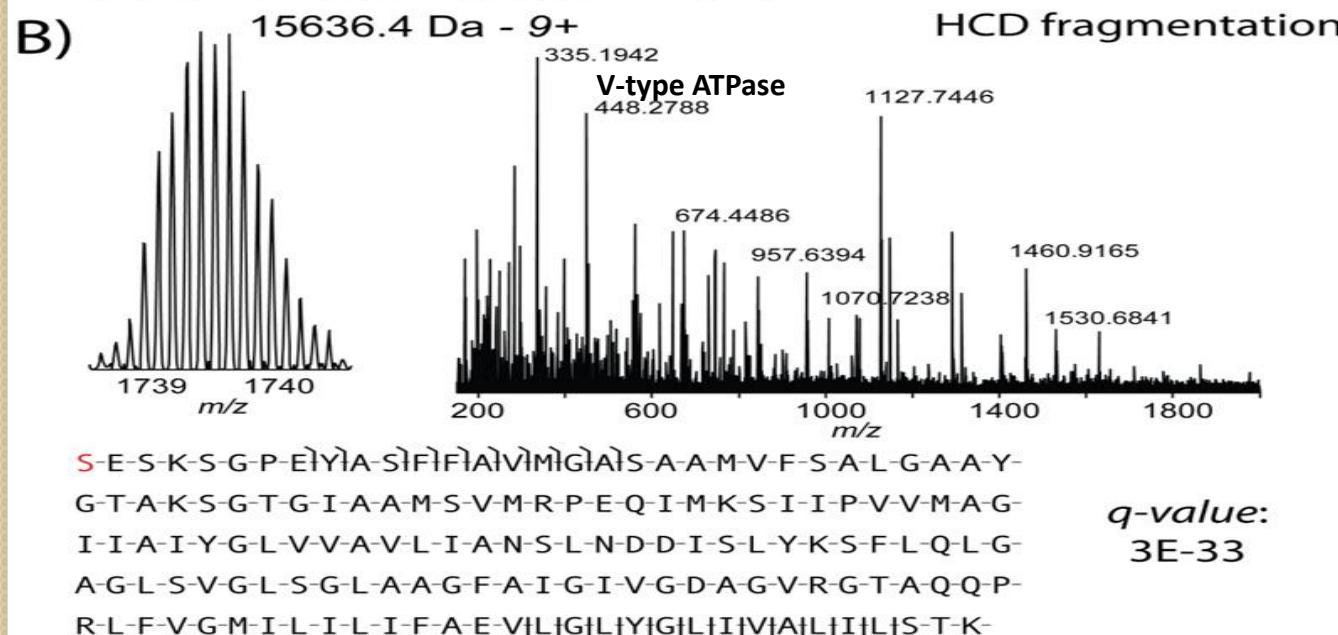
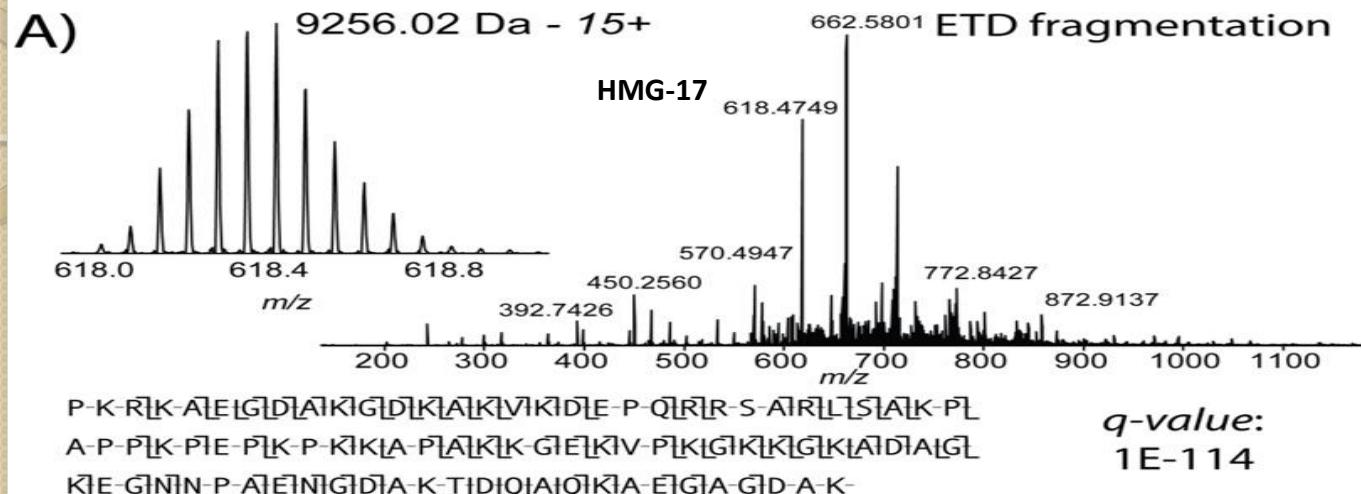


Nagaraj et al., Systems-wide perturbation analysis with near complete coverage of the yeast proteome by single-shot UHPLC runs on a bench-top Orbitrap. MCP 2011, M111.013722..

# Orbitrap Elite: verschiedene Möglichkeiten für MS/MS



# ETD und HCD zur Fragmentierung grosser Peptide / kleiner Proteine



## Vorteile der Orbitrap Technologie

- Sehr hohe Massenauflösung und Massengenauigkeit
- Parallele Datenaufnahme in Ionenfalle und Orbitrap macht das System sehr flexibel
- Viele Möglichkeiten für MS/MS: CID, ETD, HCD. Außerdem sind hochauflöste MS<sup>n</sup> Analysen möglich
- Hohe Messempfindlichkeit

## Nachteile der Orbitrap Technologie

- Durch FT Prozess relativ langsam; bei LC Kopplung muss daher auf Auflösung verzichtet werden, um schnell genug zu arbeiten
- Aufwendiges Vakuumssystem durch direkte Nähe von Hoch- und Niedrigdruckbereichen

# Orbitrap: Spinnenetz der Eigenschaften

