

## Analytische Chemie

Methoden der Organischen Spurenanalytik  
Prof. Dr. Thorsten Hoffmann – Universität Mainz

Vorlesung SoSe 2016  
Bachelor Polymerchemie

### Die Anfänge der Analytischen Chemie

- ⇒ Goldprüfung auf „trockenem Wege“ (Schmelzen i. Ofen)  
Erwähnung im *Alten Testament*
- ⇒ Grünspan (Kupferacetat) auf Verfälschung  
durch Eisen(II)-sulfat (*Plinius dem Älteren (23-79 n. Chr.)*  
(*Naturalis Historia*))
- ⇒ Später vor allem zur Erz- und Metallbestimmung weiterentwickelt z.B.  
im 14. und 15 Jahrhundert „*Probierrbüchlein*“ zur Gold- Silber-, Blei-,  
Kupferbestimmung oder zur Güteprüfung von Schwefel  
(Schwarzpulverherstellung)



- ⇒ *Paracelsius (Theophrast Bombast von Hohenheim) (1493-1541)* – erste Wasseranalytik
- ⇒ *Robert Boyle (1627-1691)* führt den Begriff „chemische Analyse“ ein
- ⇒ 1790 erstes Lehrbuch „Vollständiges chemische Probir-Cabinett“ von *Göttling/Jena*
- ⇒ 1841 erste Auflage „Anleitung zur quantitativen chemischen Analyse“ von *Fresenius*
- ⇒ 1859 Entwicklung der Spektralanalyse durch *Bunsen und Kirchhoff*



Paracelsius



Robert Boyle



Kirchhoff (l) und Bunsen



Carl Remigius Fresenius

### Analytische Chemie

pre-1850	1850-1900	1900-1925	1925-1950	1950-1975	1975-1992 (selected)
Titrimetry Gravimetry Gas-volumetry	Electrogravimetry Coulometry Optical emission spectroscopy ISEs	Raman spectroscopy X-ray emission spectroscopy X-ray diffraction Mass spectroscopy IR spectroscopy Isotope dilution analysis Radiochemical analysis Adsorption chromatography Conductimetry	$\gamma$ -Spectroscopy Electron spin resonance NMR Gas chromatography Paper chromatography Distribution chromatography High-frequency titration Electron diffraction Activation analysis Electrophoresis Photography MS	Neutron spectroscopy Laser spectroscopy Electron tunneling spectroscopy HPLC Chemiluminescence MECA spectroscopy RHEED LEIS Desorptionometry SIMS Millbauer spectroscopy EDX MGR RELS Auger electron spectroscopy Photoelectron spectroscopy Anemography SEM FEM SEI Neutron diffraction $\beta$ -Backscattering Atomic absorption spectroscopy Reflection MS Microbeam spectroscopy PIXE	Atomic force microscopy Scanning tunnel microscopy Atom probe Analytical electron microscopy IT spectroscopy ICR mass spectroscopy XRF R microscopy Scanning auger electron spectroscopy Dynamic SIMS CARS Photoacoustic spectroscopy SERIS FAMES NOMES Appearance-potential spectroscopy BLE FAB-MS GD-MS GD-MS Ion chromatography Ion neutralization spectroscopy EXAFS SIMS SXS XPS Capillary gas chromatography Gas chromatography Supercritical fluid chromatography HPLC Scanning DE Plasma spectroscopy CP-MS, MP-DES ETA-AAS ZC-NPB Multinuclear NMR Time-resolution spectroscopy GC-MS MS-MS-MS AAS-GC CP-MS CP-SC Laser CP-MS Thermogravimetry MS, Electrospray MS HPLC-MS LC-MS NMR Charged-particle activation analysis Raman microprobe HP chromatography Solid phase AAS Headspace GC FISE Static TOFMS LAPPA

Abb. aus: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Bd. 5)

Figure 3. Chronological summary of the arsenal of experimental methods currently available to analytical chemists; based on [14]

**Einige Begriffsbestimmungen:**

<b>Was ?</b>	Qualitative Analyse
<b>Wieviel ?</b>	Quantitative Analytik
<b>Welche Anordnung oder Form?</b>	Struktur- und/oder Speziationsanalyse
<b>Wo befindet sich der Analyt?</b>	Verteilungs- oder Oberflächenanalyse

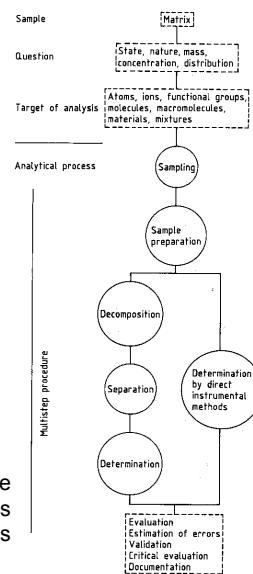
**Formulierung des analytischen Problems**

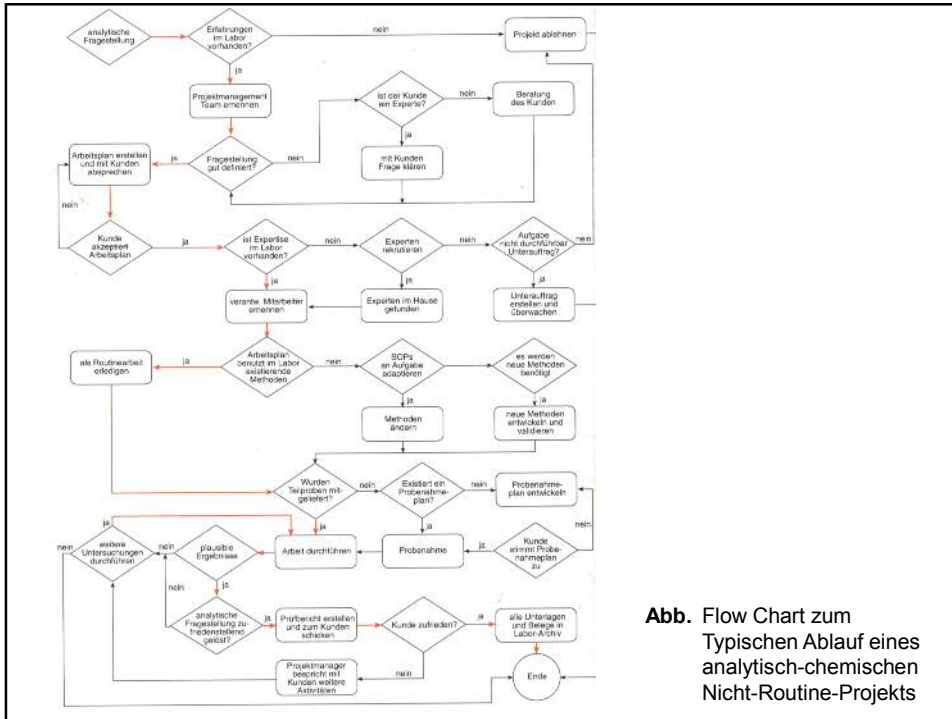
⇒ klare Definitionen notwendig  
 (Bsp.  $\text{CCl}_4$  in Luft,  $\text{Cr}^{3+}/\text{Cr}^{6+}$ ,  
 freies  $\text{Ca}^{2+}$  in physiologischen  
 Proben, „Heilwasser“,  
 patentrechtlich-relevante  
 Proben, technische Produkte  
 (z.B. Shampoo))

**Analysenplan**

Der Analysenplan (Forschungsplan)  
 beschreibt den zeitlichen Ablauf des  
 analytischen Prozesses (z.B. Meilensteine)

**Abb.** Strategische  
 Organisation des  
 analytischen Prozesses





**Abb.** Flow Chart zum Typischen Ablauf eines analytisch-chemischen Nicht-Routine-Projekts





# Einleitung Teil 1 (Titrimetrie (Volumetrie))

- Säure-Base Titrationsen
- Komplexometrische Titrationsen
- Redox-titrationsen

## Berechnung von Titrationskurven

(am Beispiel der Zugabe von 5 mL HCl (0,1 M) (Titrant) zu 100 mL NaOH (0,01 M) (Analyt))

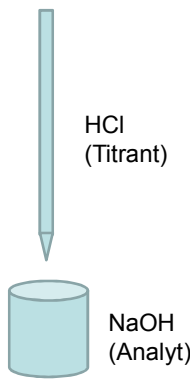
$$(\text{Konz.}_{\text{Titrant}} \times \text{Volumen}_{\text{Titrant}} = \text{Konz.}_{\text{Analyt}} \times \text{Volumen}_{\text{Analyt}})$$

(Äquivalenzpunkt nach Zugabe 10 mL HCl)

vor dem Äquivalenzpunkt

$$[\text{OH}^-] = \left( \frac{10.0 - 5.0}{10.0} \right) (0.0100 \text{ M}) \left( \frac{100.0}{100.0 + 5.0} \right) = 0.00476 \text{ M}$$

Labels in the diagram:  
- Anteil an übrigbleibendem OH<sup>-</sup> (points to the fraction (10.0 - 5.0) / 10.0)  
- Ausgangskonz. OH<sup>-</sup> (points to 0.0100 M)  
- Verdünnungsfaktor (points to the fraction 100.0 / (100.0 + 5.0))  
- Ausgangsvolumen der OH<sup>-</sup>-Ionen (points to 100.0)  
- Gesamtvolumen der Lösung (points to 100.0 + 5.0)



$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{K_w}{[\text{OH}^-]} = \frac{1.0 \cdot 10^{-14}}{0.00476} = 2.1 \cdot 10^{-12} \text{ M}$$

$$\Rightarrow \text{pH } 11.67$$

am Äquivalenzpunkt (Zugabe von 10 mL HCl)

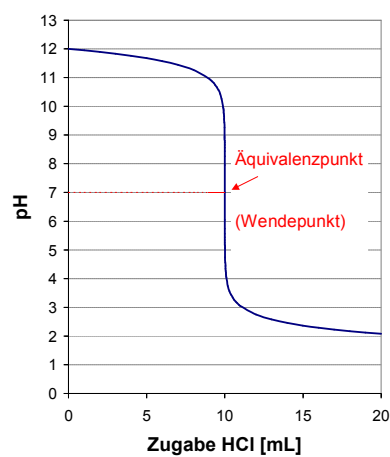
- ⇒ am Äquivalenzpunkt sind alle OH-Ionen der NaOH durch Abreaktion verbraucht
- ⇒ pH-Wert ergibt sich aus der Autoprotolyse des Wassers ⇒ pH 7

nach dem Äquivalenzpunkt (Zugabe von 10.5 mL HCl)

$$[H_3O^+] = (0.100 \text{ M}) \left( \frac{0.5}{100.0 + 10.5} \right) = 4.525 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Volumen des H<sup>+</sup>-Überschusses  
Gesamtvolumen der Lösung  
Ausgangskonz. an H<sup>+</sup>  
Verdünnungsfaktor

⇒ pH 3.34



### Titration einer schwachen Säure mit einer starken Base

Im Gegensatz zu dem System starke Säure / starke Base, bei welchen der Äquivalenzpunkt bei pH 7 liegt, stellt sich am ÄP für ein System schwache Säure / starke Base ein pH im alkalischen Gebiet ein

z.B.

Titration von 100 mL 0.1 M Essigsäure (Analyt) mit 10 M NaOH (Titrant)

$$(\text{Konz.}_{\text{Titrant}} \times \text{Volumen}_{\text{Titrant}} = \text{Konz.}_{\text{Analyt}} \times \text{Volumen}_{\text{Analyt}})$$

Feststellung des Neutralisationsäquivalents: 1 mL NaOH  
nach Zugabe von 1 mL NaOH:



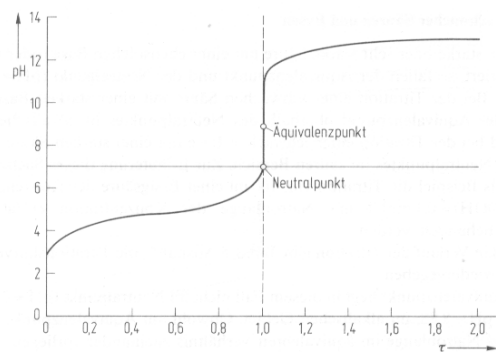
⇒ Na<sup>+</sup>-Ion ist kein Protolyt

⇒ Acetation (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) ist eine schwache Base (pKB = 9.25)

⇒ pH Berechnung wie bei einer 0.1 M Natriumacetat-Lösung (s.o.)

$$\text{pH} = 8.88$$

Abb. Titration von 0.1 M Essigsäure mit 10 M Natronlauge



$$\tau \text{ (Titrationsgrad)} = \frac{[\text{B}] \cdot V_{\text{B}}}{[\text{S}] \cdot V_{\text{S}}} \quad (\text{Analyt ist die Säure, Titrant die Base})$$

$$\text{oder} \quad \tau = \frac{[\text{S}] \cdot V_{\text{S}}}{[\text{B}] \cdot V_{\text{B}}} \quad (\text{Analyt ist die Base, Titrant die Säure})$$

$\tau = 1$  entspricht Neutralisationsäquivalent

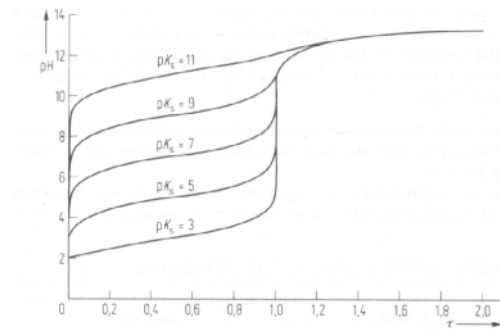
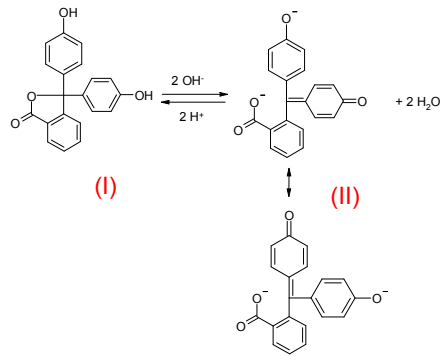


Abb. Titration von Säuren verschiedener Stärken mit Natronlauge

- ⇒ die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration (Zunahme des pH-Wertes in der Nähe des Äquivalenzpunktes) ist umso größer, je stärker die titrierte Säure ist.
- ⇒ die Lage des Äquivalenzpunktes ( $\tau = 1$ ) weicht umso stärker vom Neutralpunkt ab ( $\rightarrow$  alkalisch), je schwächer die titrierte Säure ist.

#### Säure-Base-Indikatoren

- ⇒ sind selbst Säuren oder Basen deren verschieden protonierte Spezies unterschiedlich gefärbt sind (oft reversible Protonierung)
  - ⇒ organische Farbstoffe (Reaktivfarbstoffe)
- z.B. Phenolphthalein: in saurer und neutraler Lösung  $\Rightarrow$  farblos. Lacton (I)
- ⇒ Lactonring öffnet sich bei Zugabe von Lauge und über das gesamte Molekül entsteht ein System konjugierter Doppelbindungen (II)
  - ⇒ unterschiedliche Lichtabsorptionseigenschaften

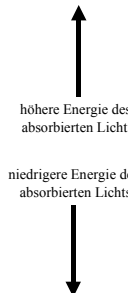


Phenolphthalein in saurer (I) alkalischer Lösung (II)

Zusammenhang zwischen absorbiertem Licht, Energie des absorbierten Lichts und Farberscheinung

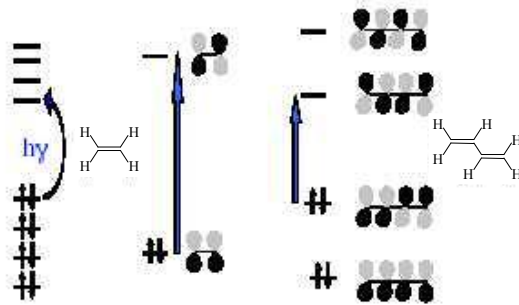
$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

Wellenlänge (nm)	Absorbiert	Ergibt
↑uv		
400-435	Violett	Grün-gelb
430-480	Blau	Gelb
480-490	Grün-blau	Orange
490-500	Blau-grün	Rot
500-560	Grün	Rotpurpur
560-580	Gelb-grün	Violett
580-595	Gelb	Blau
595-605	Orange	Grün-blau
605-750	Rot	Blau-grün
↓ir		



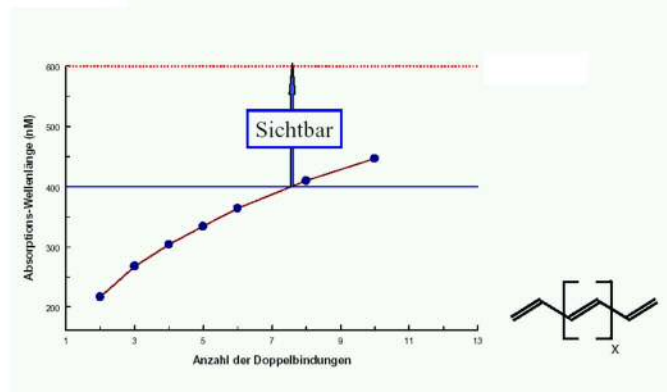
Zusammenhang zwischen Anzahl der konjugierten Doppelbindungen und absorbiertem Licht ( $\Rightarrow$  Farbe)

### Elektronische Anregung

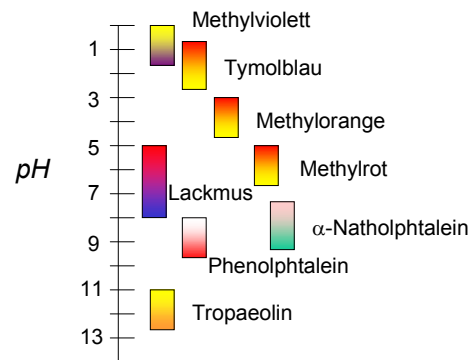


Zunahme der Anzahl der Doppelbindungen (größeres System zur Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen) ergibt eine Verschiebung des absorbierten Lichts in den sichtbaren Bereich :

### Polyen-Absorption



Einige häufig verwendete Indikatoren und ihre Umschlagbereiche:



#### Indikatorauswahl

- ⇒ Starke Säuren und Basen können unter Verwendung aller Indikatoren miteinander titriert werden, die zwischen Methylorange und Phenolphthalein umschlagen
- ⇒ Schwache Säuren lassen sich mit starken Laugen nur unter Verwendung solcher Indikatoren titrieren, die im schwach alkalischen Gebiet umschlagen (z.B. Phenolphthalein)
- ⇒ Schwache Basen lassen sich mit starken Säuren nur unter Verwendung solcher Indikatoren titrieren, die im schwach sauren Gebiet umschlagen (z.B. Methylorange)
- ⇒ Titrationsen schwacher Basen mit schwachen Säuren und umgekehrt ergeben nur ungenaue Resultate (notfalls Herstellung entsprechender Vergleichslösungen mit dem entsprechenden pH-Wert)

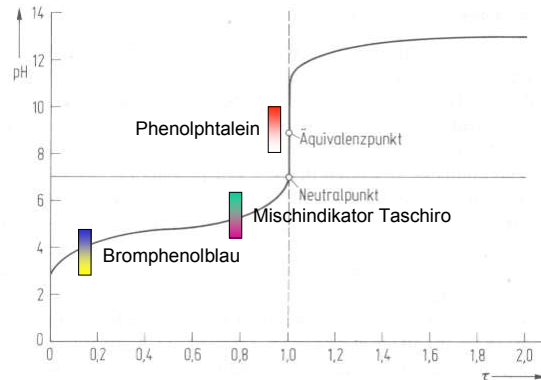


Abb. Titration von 0.1 M Essigsäure mit 10 M Natronlauge - Indiktorauswahl

**Anmerkungen:**

nicht zuviel Indikator  
 (Indikatoren sind selbst Säuren oder Basen  $\Rightarrow$  greifen in die Protonenkonzentration ein)

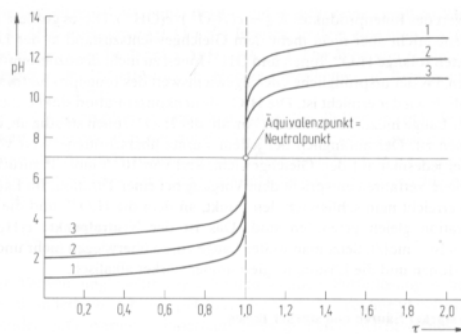


Abb. Titration von HCl mit NaOH (1 M)

- 1 [HCl] = 0.1 mol/L
- 2 [HCl] = 0.01 mol/L
- 3 [HCl] = 0.001 mol/L

**Fluoreszenzindikatoren**

$\Rightarrow$  Indikatorsäure und -base fluoreszieren im UV-Licht unterschiedlich  
 $\Rightarrow$  pH-Bestimmung in trüben oder farbigen Lösungen

**Mischindikatoren**

$\Rightarrow$  durch Zusatz von inerten Farbstoffen lassen sich oft die Umschlagsbereiche für das menschliche Auge besser wahrnehmen  $\Rightarrow$  Komplementärfarben ergeben „nichtfarbige“ Umschlagspunkte, z.B. Taschiro Mischindikator (Methylrot (Rot-Gelb) plus Methylenblau)  $\Rightarrow$  Violett (Rot/Blau)-Grün (Gelb/Blau) mit „neutralgrauen“ Umschlagspunkt

**Universalindikatoren**

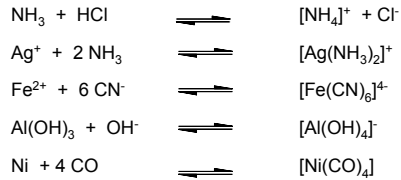
$\Rightarrow$  Mischung verschiedener Indikatoren



## Komplexometrie

Komplexe (Koordinationsverbindungen)

⇒ Unter „Komplexen“ versteht man Moleküle oder Ionen, in denen an ein ungeladenes oder geladenes **Zentralatom Z** entsprechend seiner **Koordinationszahl n** mehrere ungeladene oder geladene, ein- oder mehratomige Gruppen **L (Liganden)** angelagert sind

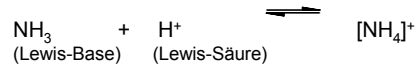


⇒ kationische, anionische oder neutrale Komplexe

in der Regel ein kationisches „Zentralatom“ und als Liganden Anionen (F<sup>-</sup> (Fluoro-), Cl<sup>-</sup> (Chloro-), Br<sup>-</sup> (Bromo-), I<sup>-</sup> (Iodo-), OH<sup>-</sup> (Hydroxo-), CN<sup>-</sup> (Cyano-)) oder neutrale Moleküle (NH<sub>3</sub> (Ammin-), H<sub>2</sub>O (Aqua-))

Zusammenhalt zwischen **Z** und **L** durch koordinative Bindungen

⇒ Donor-Akzeptor-Bindung zwischen einer **Lewis-Säure** (Elektronenpaarakzeptoren) **Z** und **Lewis-Basen** (Elektronenpaardonatoren) **L**



Anzahl der koordinativen Bindungen ⇒ Koordinationszahl (oft 4 und 6, auch 2 und 8)

⇒ Koordinationszahlen sind Molekülgeometrien zugeordnet

- 2 → linearer Aufbau
- 4 → Quadrat oder Tetraeder
- 6 → Oktaeder
- 8 → Würfel

⇒ die Ladung des Komplexes ergibt sich aus den Ladungen seiner Bestandteile (s.o.)

⇒ besteht zwischen Ligand und Zentralatom nennt man den Liganden **einähnig** (unidental)

⇒ bestehen zwei oder mehr koordinative Bedingungen → **zweizähnige, vierzähnige, sechszähnige** (multidental) Liganden

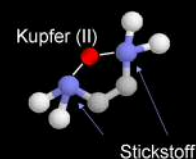
⇒ im Falle von mehrzähnigen Liganden bezeichnet man den Komplex als **Chelat**

z.B. Ethylendiamin (H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) (bidentaler Ligand)

Chelat (gr.) = Kresschere

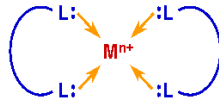
andere wichtige mehrzähnige Liganden:  
z.B. ATP Adenosinriphosphat  
oder  
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

Ethylendiamin-Kupfer (II)-Chelat



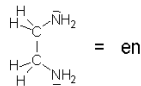
## Komplexometrische Titrationen

### Metall-Chelatkomplexe



Beispiele:

Ethylendiamin



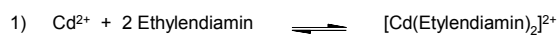
Aminosäuren



- ⇒ Metallionen sind *Lewis-Säuren* (Elektronenpaarakzeptoren)
- ⇒ die elektronenliefernden Liganden sind *Lewis-Basen* (Elektronenpaardonatoren)

### Chelateffekt

- ⇒ kennzeichnet die Fähigkeit von mehrzähligen Liganden stabilere Komplexe mit einem Metall zu bilden als vergleichbare einzählige



Stabilitätskonstante  $K$  (Komplexbildungskonstante)

$$K_1 = \frac{c([\text{Cd}(\text{Ethylendiamin})_2]^{2+})}{c(\text{Cd}^{2+}) \cdot c^2(\text{Ethylendiamin})} = 2 \times 10^{10}$$

$$K_2 = \frac{c([\text{Cd}(\text{Methylamin})_4]^{2+})}{c(\text{Cd}^{2+}) \cdot c^4(\text{Methylamin})} = 3 \times 10^6$$

- ⇒  $K_1 \gg K_2$  Ethylendiaminkomplex ist stabiler

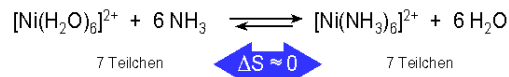
Ursache:

Es bilden sich in beiden Komplexarten 4 Stickstoff-Cadmium-Bindungen  
 ⇒ Reaktionsenthalpie in etwa gleich ⇒ liefert keine Erklärung

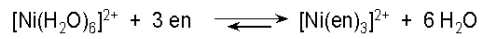
in Reaktion 1) sind drei Moleküle verwickelt, in Reaktion 2) fünf Moleküle  
 ⇒ Entropieverlust (Abnahme der Unordnung) ist für die Ethylendiaminreaktion weniger groß ( $3 \rightarrow 1$ ) als für die Methylaminreaktion ( $5 \rightarrow 1$ )

bzw. wenn die Metallionen bereits komplexiert vorliegen (z.B.  $\text{Ni}^{2+}$ ):

- ⇒ **Entropiegewinn (Zunahme der Unordnung) bei Chelatbildung**



$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$



$$[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+} \quad K_k = 2,0 \cdot 10^9 \text{ l}^6/\text{mol}^6$$

$$[\text{Ni}(\text{en})_3]^{2+} \quad K_k = 3,8 \cdot 10^{17} \text{ l}^3/\text{mol}^3$$

#### Gibbs-Helmholtz-Gleichung:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

$\Delta G$  = freie Bildungsenthalpie  
 $\Delta H$  = Komplexbildungsenthalpie  
 $\Delta S$  = Entropieänderung

z.B.  $\Delta H = -34 \text{ kJ mol}^{-1}$   
 $\Delta S = 230 \text{ J mol}^{-1}$  (für en-Komplexbildung)

z.B.  $\Delta H = -34 \text{ kJ mol}^{-1}$   
 $\Delta S = 0 \text{ J mol}^{-1}$  (für Ammin-Komplexbildung)

$\Delta G (298) = -103 \text{ kJ mol}^{-1}$  (für en-Komplexbildung)  
 $\Delta G (298) = -34 \text{ kJ mol}^{-1}$  (für Ammin-Komplexbildung)

$$K = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)$$

⇒ in diesem Bsp. wäre  $K_{\text{en-Komplex}} \sim 1 \cdot 10^{12} \times K_{\text{Ammin-Komplex}}$

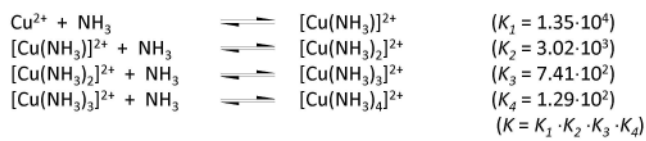
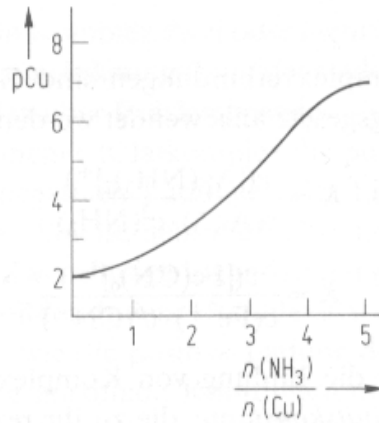
⇒ eine wesentliche Voraussetzung für die Eignung einer Komplexbildungsreaktion zu maßanalytischen Bestimmungen ist eine sprunghafte Abnahme der Konzentration der zu bestimmenden Ionenart in der Nähe des Äquivalenzpunktes

Bsp. Bildung des Kupfertetraamminkomplexes ( $K = 3.89 \cdot 10^{12}$ )



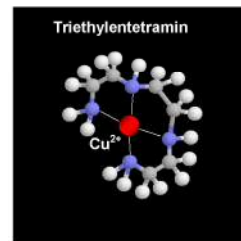
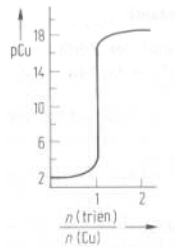
⇒ folglich ( $K$  ist sehr groß) könnte man einen deutlichen Sprung am ÄP erwarten (dies ist aber nicht der Fall, siehe Abb.)

Ursache: Stufenweiser Verlauf der Reaktion Titration einer  $\text{CuSO}_4$ -Lsg. (0.01M) mit Ammoniak



durch Chelatbildung können diese Zwischenstufen ausgeschaltet werden, z.B. im Falle des Kupfer(II) mit Triethylentetraamin

Stabilitätskonstante  
 $K = 3.16 \cdot 10^{20}$   
 (Chelateffekt)



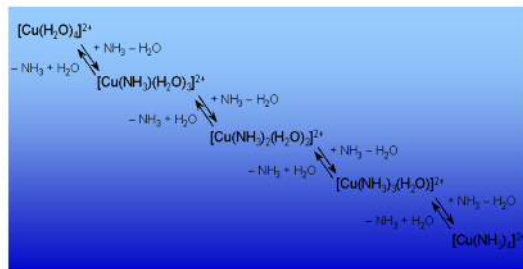
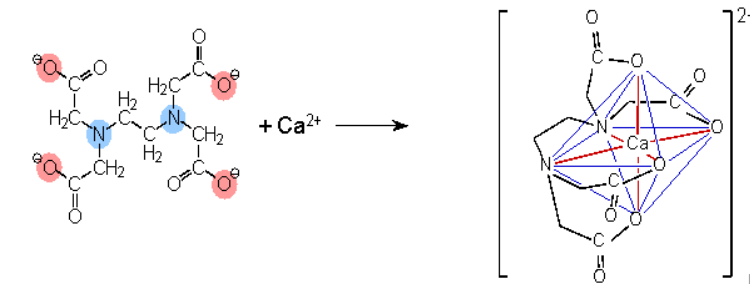
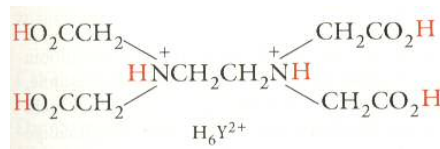


Abb. Ligandenaustauschreaktionen

#### Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)

EDTA ist der in der analytischen Chemie am häufigsten verwendete Chelatbildner. EDTA ist ein sechsprotoniges System  $[\text{H}_6\text{Y}^{2+}]$ .

$pK_{S1} = 0.0$   
 $pK_{S2} = 1.5$   
 $pK_{S3} = 2.0$   
 $pK_{S4} = 2.66$   
 $pK_{S5} = 6.16$   
 $pK_{S6} = 10.24$

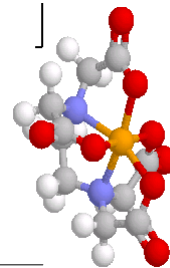


(Verwendung meist in Form des Na-Salzes)

der Anteil der verschiedenen protonierten Spezies hängt vom pH-Wert ab: z.B. Anteil der Form  $\text{Y}^{4-}$ :

$$\alpha_{Y^{4-}} = \frac{[\text{Y}^{4-}]}{[\text{H}_6\text{Y}^{2+}] + [\text{H}_5\text{Y}^+] + [\text{H}_4\text{Y}] + [\text{H}_3\text{Y}^-] + [\text{H}_2\text{Y}^{2-}] + [\text{HY}^{3-}] + [\text{Y}^{4-}]}$$

$$\alpha_{Y^{4-}} = \frac{[\text{Y}^{4-}]}{[\text{EDTA}]}$$



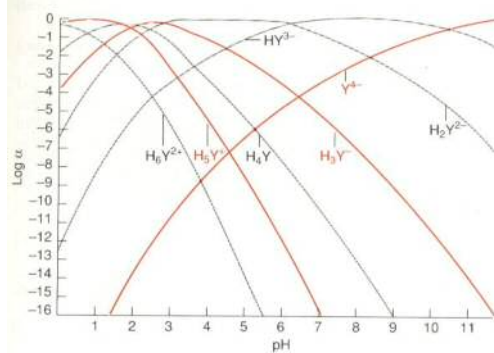


Abb. Spezies-Verteilung für EDTA als Funktion des pH-Werts

### EDTA-Komplexe

Stabilitätskonstante eines Metall-EDTA-Komplexes ist die Gleichgewichtskonstante für folgende Reaktion:



- ⇒ K definiert als Funktion der Konzentration an  $Y^{4-}$
- ⇒ K üblicherweise sehr groß (Alkalimetalle ausgenommen)

z.B:

Ion	log K	K
$K^+$	0.8	6.31
$Ca^{2+}$	10.69	$4.90 \times 10^{10}$
$Cu^{2+}$	18.80	$6.31 \times 10^{18}$
$Fe^{3+}$	25.10	$1.25 \times 10^{25}$

### Effektive Stabilitätskonstante (konditionelle Stabilitätskonstante)

Da bei kleineren pH-Werten nicht alle EDTA-Moleküle als  $Y^{4-}$  vorliegen (siehe Abb. oben), ist es oft vorteilhaft den Anteil der freien EDTA auszudrücken als:

$$[Y^{4-}] = \alpha_{Y^{4-}} [EDTA]$$

[EDTA] = Gesamtkonzentration aller Spezies, die nicht an M gebunden sind

$$\Rightarrow K = \frac{[MY^{n-4}]}{[M^{n+}][Y^{4-}]} = \frac{[MY^{n-4}]}{[M^{n+}]\alpha_{Y^{4-}}[EDTA]} \quad | \times (\alpha_{Y^{4-}})$$

$$\Rightarrow K' = \alpha_{Y^{4-}} \cdot K = \frac{[MY^{n-4}]}{[M^{n+}][EDTA]} \quad K' = \text{effektive Stabilitätskonstante}$$

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
$\alpha_{Y^{4-}}$	$3.3 \times 10^{-14}$	$2.6 \times 10^{-11}$	$3.8 \times 10^{-9}$	$3.7 \times 10^{-7}$	$2.3 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-4}$	$5.6 \times 10^{-3}$	$5.4 \times 10^{-2}$	0.36	0.85	0.98	1

z.B. Stabilitätskonstante für  $\text{CuY}^{2-}$  ist (siehe oben)  $K = 6.31 \times 10^{18}$ . Wie hoch ist die Konzentration an freiem  $\text{Cu}^{2+}$  ( $[\text{CuY}^{2-}] = 0.01 \text{ M}$ ) bei pH 2 und pH 8?



$$\Rightarrow \text{bei pH 2: } K' = (3.3 \times 10^{-14})(6.31 \times 10^{18}) = 2.08 \times 10^5$$

$$\Rightarrow \text{bei pH 8: } K' = (5.6 \times 10^{-3})(6.31 \times 10^{18}) = 3.53 \times 10^{16}$$

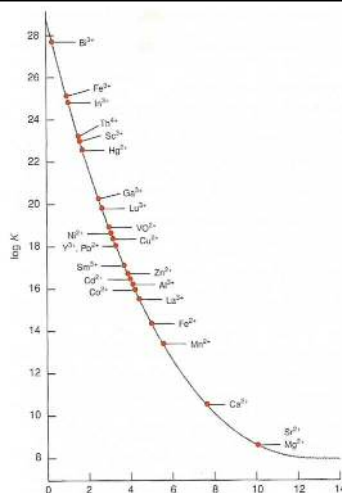
da bei der Dissoziation des  $\text{CuY}^{2-}$  Komplexes gleiche Mengen an EDTA und  $\text{Cu}^{2+}$  entstehen müssen:

	$\text{Cu}^{2+}$	+	EDTA	$\rightleftharpoons$	$\text{CuY}^{2-}$
Ausgangskonzentration (M)	0		0		0.01
Endkonzentration (M)	x		x		0.01-x

$$\Rightarrow K' = \frac{0.01-x}{x^2} = 2.08 \times 10^5 \text{ (bei pH 2) bzw. } 3.53 \times 10^{16} \text{ (pH 8)}$$

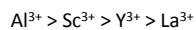
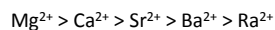
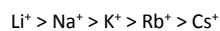
$\Rightarrow$  Auflösen nach x ( $=[\text{Cu}^{2+}]$ )  $\Rightarrow [\text{Cu}^{2+}] = 2.2 \times 10^{-4} \text{ M}$  bei pH 2  
(d.h. Dissoziationsgrad des Komplexes bereits 2.2% ( $\alpha = [\text{Cu}^{2+}]/[\text{CuY}^{2-}]$ ))

$$[\text{Cu}^{2+}] = 5.3 \times 10^{-10} \text{ M bei pH 8}$$



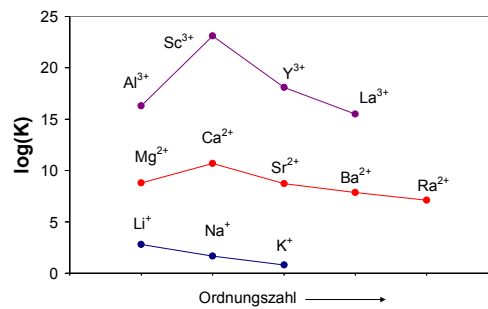
**Abb.** Mindest-pH für eine erfolgreiche Titration mit EDTA. Der minimale pH wurde willkürlich als der pH definiert, an dem  $K' = 1 \times 10^6$  ist.

Die Stabilität von Komplexverbindungen hängt unter anderem ab von der Größe und Ladung des Metallions ab, also qualitativ:

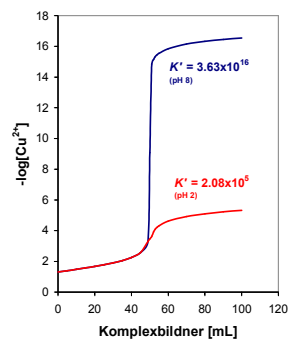


tatsächlich verhalten sich allerdings die beiden ersten Elemente der zwei- und dreiwertigen Metalle (also  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) anders (Abb.)

**Abb.** Stabilitätskonstanten für Metall-EDTA-Komplexe



**Abb.** Theoretische Titrationskurve für die Umsetzung von 50 mL 0.05 M  $\text{Cu}^{2+}$ -Lsg mit 0.05 M EDTA

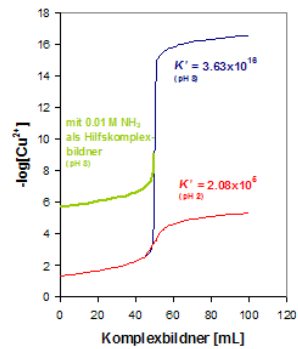


#### Hilfskomplexbildner

Der für EDTA-Titrationen oftmals gewünschte pH-Bereich (s.o.) läßt sich aufgrund der Ausfällung der Metallhydroxide nicht ohne weiteres einstellen. Durch den Zusatz eines Hilfskomplexbildners (z.B. Ammoniak), welcher lösliche Komplexe mit dem Metallion bildet (z.B. Amminkomplexe)



⇒ das Metallion kann solange in Lösung gehalten werden bis EDTA zugegeben wird



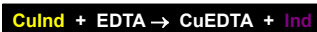
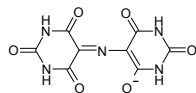
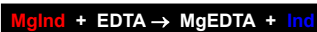
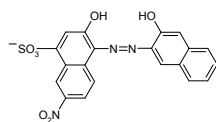
**Abb.** Theoretische Titrationskurve für die Umsetzung von 50 mL 0.05 M  $\text{Cu}^{2+}$ -Lsg mit 0.05 M EDTA bei Anwesenheit von 0.01 M  $\text{NH}_3$  (gepuffert auf pH 8)

### Metallindikatoren

Metallindikatoren werden zur Endpunktbestimmung von Titrations mit EDTA eingesetzt. Die Indikatoren bilden mit den Metallionen ebenfalls Chelatkomplexe. Anforderungen:

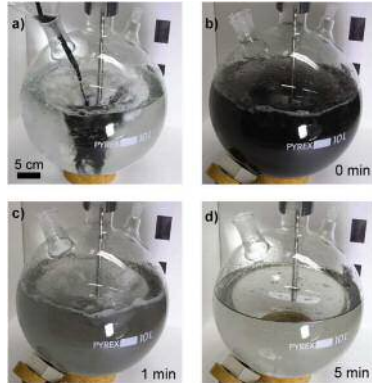
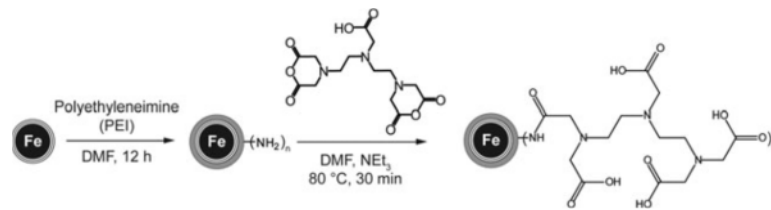
- Farbünderungen bei Komplexbildung mit Metallion
- weniger starke Bindung an Metallion als EDTA

Bsp. Eriochromschwarz T (oben) oder Murexid (unten)



⇒ da die meisten Metallindikatoren ebenfalls Säure-Base-Indikatoren sind, ist die Farbe des freien Indikators pH-abhängig ⇒ Indikatoren sind nur in bestimmten pH-Bereichen einsetzbar (z.B. Erio T nur oberhalb pH 6.5 da bei pH < 6.5 der freie Indikator weinrot ist)

## Entfernung Schwermetalle aus Abwässern



Magnetic EDTA: coupling heavy metal chelators to metal nanomagnets for rapid removal of cadmium, lead and copper from contaminated Water

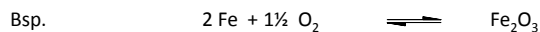
Fabian M. Koehler, Michael Rossier, Markus Waelle, Evagelos K. Athanassiou, Ludwig K. Limbach, Robert N. Grass, Detlef Gunther and Wendelin J. Stark  
Chem. Comm, 2009

## Redox titrationen

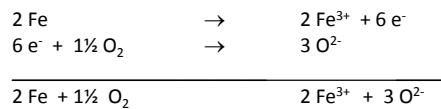


### Theoretische Grundlagen

Anfangs (*Lavoisier*, 1743-1794) verstand man in der Chemie unter Oxidation die chemische Umsetzung eines Stoffes mit Sauerstoff (*lat. oxygenium*) und unter Reduktion (*lat. reducere* – zurückführen) die Rückführung des oxidierten Stoffes in den ursprünglichen Zustand:

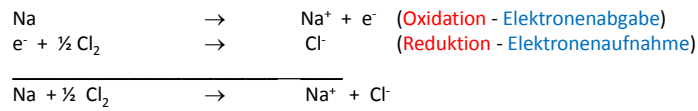


Heutzutage sind beide Begriffe erweitert worden (*Elektronentheorie der Valenz*)

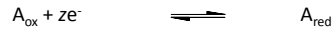


- ⇒ Unter **Oxidation** versteht man die **Abgabe** von Elektronen
- ⇒ Unter **Reduktion** versteht man die **Aufnahme** von Elektronen

damit stellt auch die Reaktion  $\text{Na} + \frac{1}{2} \text{Cl}_2 \rightarrow \text{NaCl}$  eine Oxidation des Metalls dar:

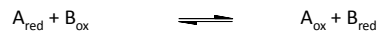


⇒ formale Übereinstimmung mit den Säure-Base-Reaktionen von Brönsted  
 ⇒ ebenso wie dort existieren korrespondierende Redoxpaare



$\text{A}_{\text{ox}}$  ≡ oxidierte Form,  $\text{A}_{\text{red}}$  ≡ reduzierte Form,  $z$  ≡ Anzahl der am Redoxvorgang beteiligten Elektronen.

komplette Redoxreaktion (Teilnahme zweier korrespondierender Redoxpaare):



$\text{A}_{\text{red}}$  wirken reduzierend (überführen  $\text{B}_{\text{ox}}$  in  $\text{B}_{\text{red}}$ )  
 ⇒ Reduktionsmittel (Elektronendonatoren)

$\text{B}_{\text{ox}}$  wirken oxidierend (überführen  $\text{A}_{\text{red}}$  in  $\text{A}_{\text{ox}}$ )  
 ⇒ Oxidationsmittel (Elektronenakzeptoren)

### Säure-Base Reaktionen

Übergang von Protonen  
 $\text{HCl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cl}^- + \text{H}_3\text{O}^+$   
 Säure1+Base2  $\rightleftharpoons$  Base1+Säure2  
 Starke und schwache Säuren/Basen  
 Säure/Basekonstante  $pK_s$   
 Henderson-Hasselbalch

$$pH = pK_s + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

### Redoxreaktionen

Übergang von Elektronen  
 $\text{Fe}^{2+} + \text{Ce}^{4+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + \text{Ce}^{3+}$   
 Red1+Ox2  $\rightleftharpoons$  Ox1+Red2  
 Starke und schwache Ox. und Red.  
 Redoxpotentiale  $E^0$   
 Nernst

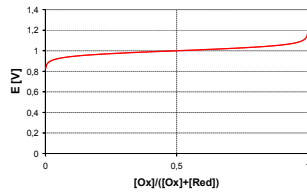
$$E = E^0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{[ox]}{[red]}$$

Beschreibung der Redoxpotentiale durch **Nernstsche Gleichung:**  
 (siehe auch Elektrochemische Methoden)

$$E = E^0 + \frac{0,059}{n} \log \frac{[ox]}{[red]}$$

⇒ je größer oder positiver E, desto stärker ist die Oxidationskraft  
 ⇒ je kleiner oder negativer E, desto größer ist die Reduktionskraft

Graphische Darstellung der Nernstschen Gleichung



**Abb.** Potential eines Redoxsystems (Ox/Red) als Funktion der Konzentration der Redoxpartner (für  $E^0 = +1V$ )

⇒ das Potential eines Redoxpaares wird im Wesentlichen durch  $E^0$  bestimmt

**Qualitativer Verlauf einer Redox titration**

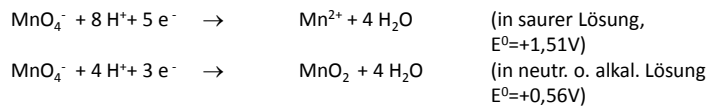
$$E^0(\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}) = +0,77 \text{ V}$$

$$E^0(\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}) = +1,44 \text{ V}$$

⇒ die Höhe des Sprunges am Äquivalenzpunkt wird fast ausschließlich von der Differenz der  $E^0$ -Werte der beiden Systeme bestimmt

⇒ größer diese Differenz, desto kleiner wird auch der Titrationsfehler

**Manganometrie**



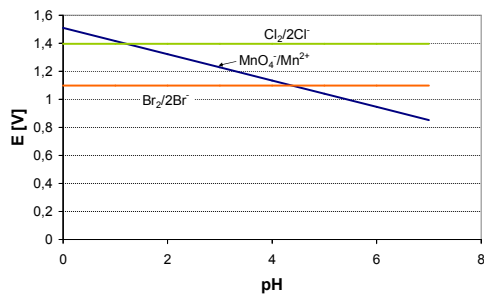
⇒ pH bestimmt Redoxpotential

Nernst:

$$E = 1,51 + \frac{0,059}{5} \log \frac{[MnO_4^-] \cdot [H^+]^8}{[Mn^{2+}]}$$

$$E = 1,51 + \frac{0,059}{5} \log \frac{[MnO_4^-]}{[Mn^{2+}]} + \frac{0,059 \cdot 8}{5} \log [H^+]$$

$$E = 1,51 + \frac{0,059}{5} \log \frac{[MnO_4^-]}{[Mn^{2+}]} - 0,094 pH$$



Permanganat ist ein starkes Oxidationsmittel, daher:

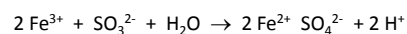
- ⇒ viele Analyten können quantitativ oxidiert und damit quantitativ bestimmt werden (Metallionen (z.B. Fe<sup>2+</sup>), org. Verb. (z.B. Oxalsäure))
- ⇒ Spuren von Verunreinigungen (z.B. org. Verb.) werden mitoxidiert (z.B. beim Ansetzen der Maßlösung, kein Urfehler)
- ⇒ Vorteil der Manganometrie: KMnO<sub>4</sub> dient in saurer Lösung als sein eigener Indikator (Mn<sup>2+</sup> farblos) (visuelle Wahrnehmung eines Permanganat-Überschusses schon ab 10<sup>-6</sup> mol/L)

Beispiele:

1) Titration von Fe<sup>2+</sup>-haltigen Lösungen ⇒ direkte Titration

2) Titration von Fe<sup>3+</sup>-haltigen Lösungen

- ⇒ zunächst quantitative Überführung von Fe<sup>3+</sup> in Fe<sup>2+</sup>
- ⇒ wichtig: zugesetztes Reduktionsmittel muss wieder vollständig aus der Lösung entfernt werden können (z.B. schweflige Säure)



dann austreiben des überschüssigen SO<sub>2</sub> durch Inertgasstrom

- ⇒ direkte Titration des Fe<sup>2+</sup>

- 3) Titration von  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -haltigen Lösungen  $\Rightarrow$  2 Titrationsen
1. liefert  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalt
  2. liefert Gesamteisengehalt  
 $\Rightarrow$  Differenz liefert  $\text{Fe}^{3+}$ -Gehalt

### Bestimmung von Fe nach Reinhardt-Zimmermann

Problem: In salzsauren Lösungen kann auch das Chlorid von Permanganationen zu Chlor oxidiert werden (siehe Abb. oben)

$\Rightarrow$  Unterbindung der Chloridionenoxidation durch Zugabe einer Mischung aus Mn(II)sulfat, Phosphorsäure und Schwefelsäure (Reinhardt-Zimmermann-Lösung)

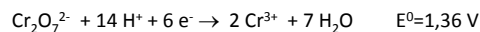
- 1) Erniedrigung von  $E_{(\text{Mn(VII)})/(\text{Mn(II)})}$  durch Erhöhung von  $[\text{Mn}^{2+}]$

$$E = 0,77 + \frac{0,059}{1} \log \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]}$$

- 2) Erniedrigung von  $E_{(\text{Fe(III)})/(\text{Fe(II)})}$  durch Erniedrigung von  $[\text{Fe}^{3+}]$  (Bildung eines farblosen Fe(III)-Phosphorsäurekomplexes)
- 3) Erleichterung der Erkennung des Umschlagpunktes (ansonsten Bildung von tiefgelben Chlorosäuren des Eisens (z.B.  $\text{H}_3[\text{FeCl}_6]$ )

### Oxidation mit Kaliumdichromat

orangefarbenes Dichromation ist in saurer Lösung ebenfalls ein starkes Oxidationsmittel (z.B. Chromschwefelsäure)

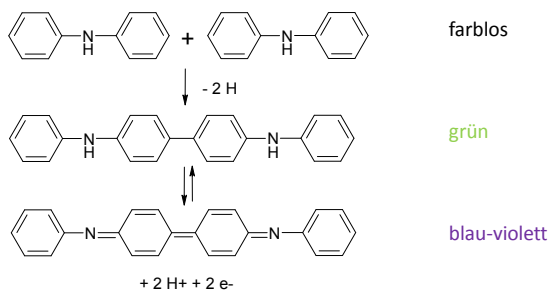


Vorteile: Eignung als Ursubstanz, auch Titrationsen in salzsauren Lösungen

Nachteile: schwierige Endpunkterkennung (schwach orange  $\rightarrow$  schwach grün)

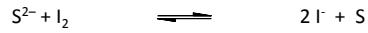
$\Rightarrow$  Einsatz von Redoxindikatoren

#### z.B. Diphenylamin

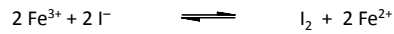




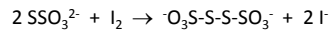
**Reduktionsmittel** können mit Iod-Lösung direkt titriert werden. Sie werden dabei unter Reduktion des Iods zu Iodid oxidiert, z.B.



**Oxidationsmittel** werden mit angesäuerter Kaliumiodid-Lösung im Überschuß reduziert, wobei das Iodid zum elementaren Iod oxidiert wird, z.B.

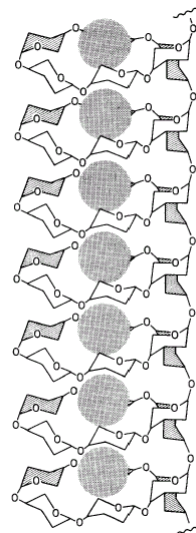


- ⇒ das entstandene Iod wird anschließend mit der Maßlösung eines geeigneten Reduktionsmittels titriert (z.B. Natriumsulfit, arsenige Säure, Natriumthiosulfat)
- ⇒ heute wird fast ausschließlich Natriumthiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) zur Titration des Iods verwendet (neutral bis schwach saure Lösung) (Oxidation zum Tetrathionat), nur in stärker alkalischen Lösungen benutzt man arsenige Säure



### Endpunkterkennung

- ⇒ der Endpunkt der iodometrischen Titration ist durch das Auftreten oder durch das Verschwinden des Iods gekennzeichnet. Die in der Iodometrie verwendeten Iodlösungen enthalten stets außer Iod auch Kaliumiodid und damit das tiefbraune komplexe Triiodid-Ion,  $\text{I}_3^-$
- ⇒ zur besseren Erkennung des Iods setzt man aber als Indikator etwas Stärkelösung zu. Stärke bildet mit Iod eine **tiefblaue Verbindung**, anhand der sich noch Iodkonzentrationen von  $10^{-5}$  mol/L erkennen lassen. Die Farbstärke der blauen Iod-Stärke-Verbindung übertrifft die des freien Iods erheblich
- ⇒ Erleichterung der Elektronen-delokalisierung





# Einleitung Teil 2 (org. Spurenanalytik)

---

## Einsatzgebiete organischer Analysenmethoden

### Umweltanalytik

- Luft (z.B. Abgasanalytik, luftgetragene organische Schadstoffe)
- Wasser (z.B. Wasserqualität, Herbizide, Pestizide)
- Böden (z.B. Mineralöle, Entsorgung und Aufarbeitung belasteter Böden)

### Prozesskontrolle und Prozessregelung

- Rektifikation
- Extraktion
- Qualitätskontrolle (z.B. Reinheit von Gasen)

### Pharmakologische / toxikologische / forensische Analytik

- Drogennachweis (z.B. Cannabis, Cocain, Methadon)  
z. B. in Haaren, Urin, Serum
- Dopingnachweis (z.B. Anabolika, THG)
- klinische Proben (z.B. Glucose in Blut)

### Lebensmittelanalytik

- polychlorierte Biphenyle in Milch
- Trinkwasseranalytik (Herbizide)

### Bioanalytik

- DNA-Sequenzierung
- Proteomics
- Metabolomics

**Exkurs: Qualitätsmanagement und Qualitätssicherung**  
(insbesondere für die Datendokumentation zu berücksichtigen)

⇒ **Good Laboratory Practise (GLP)**

„Gute Laborpraxis befasst sich mit dem formalen Ablauf und den Bedingungen, unter denen Laborprüfungen geplant, durchgeführt und überwacht werden sowie mit der Aufzeichnung und Berichterstattung der Prüfung“ (Cammann (2001))



**Abb.** Zeitungsmeldungen zu wissenschaftlichen Fehlverhalten (Victor Ninov (2001) Entdeckung des Elements 118 und Jan Hendrik Schön 2002) Nanotechnologie an organischen Halbleitern)

(Stichworte zur GLP: Arbeiten nach *Lege artis* (nach den allen Regeln der Kunst), Verantwortlichkeiten regeln, Protokollierung (Primärdaten 10 Jahre sichern, Autorenschaften etc.)

Konkrete und strengere Anforderungen an die Qualitätssicherung stellen die

⇒ **Akkreditierung** von Laboratorien bezüglich ihrer Fachkompetenz (Normenserie EN 45000)

„Verfahren, durch das eine autorisierte Körperschaft formal anerkennt, dass eine Person oder Körperschaft fähig zum Ausführen bestimmter Aufgaben ist (Cammann (2001))“

(z.B. laborinterne Infrastruktur, Qualifikation des Personals, verfahrenstechnische Vorschriften für Prüfmethode, sowie den Einsatz von Kalibrationen und Referenzmaterialien)

⇒ **Zertifizierung** bezüglich der Qualität der Organisation (ISO 9000)

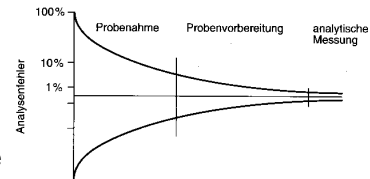
„Verfahren, durch das eine dritte Partei schriftlich bescheinigt, dass ein Produkt, ein Prozess oder eine Dienstleistung bestimmte Anforderungen erfüllt (Cammann (2001))“

(insbesondere die Dokumentation betreffend)

## Probenahme

Probenahmefehler:

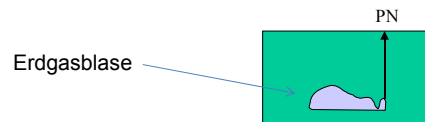
- ⇒ Eintrag von Analyt (Mehrfbefund, positive Artefakte)
- ⇒ Analytverlust (Minderbefund, negative Artefakte)
- ⇒ Fehler, die bezüglich der Repräsentanz bei der PN gemacht werden, lassen sich durch keine noch so aufwendige instrumentelle Analytik wieder korrigieren



**Gesamtmaterial** (z.B. Gebinde von Teeblättern, See, Erdatmosphäre)

**Probe** (Teil des Gesamtmaterials (z.B. 1 g Teeblätter, 1 mL See-wasser, 1 L Luftprobe))

- ⇒ *Probenahme für heterogene Untersuchungsobjekte kritisch*
- ⇒ repräsentative Probenahme essentiell für richtige Resultate



## Probenvorbereitung

z.B. Aufschlüsse, Aufkonzentrierung, Extraktionen, Vortrennungen (*clean up*)

## Quantifizierung

**Absolut- oder Primärmethoden**  
(Analytmenge direkt proportional einer physikalischen Größe)

- Gewicht – Gravimetrie
- Volumen – Volumetrie
- Ladungsmenge – Coulometrie

## Relativmethoden

- Quantifizierung bezüglich auf eingesetzte Standards (Kalibrierung)

“definitive” Methoden (i.a. matrixunabhängig)

- **Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie**
- Neutronenaktivierungsanalyse

# Probenahme

## Probenahme luftgetragener organischer Analyten

### z.B. organische Komponenten in der freien Atmosphäre:

- Alkane
  - Methan (~ 1.7 ppm)
  - Ethan (< 1 - 100 ppb)
  - Hexan (< 1 - 30 ppb)
- Alkene
  - Ethen (0 - 100 ppb)
  - Propen (0 - 30 ppb)
  - Isopren (0 - 30 ppb)
- Aromaten
  - Benzol
  - Toluol
- Aldehyde und Ketone
  - Formaldehyd
  - Aceton
- Säuren
  - Ameisensäure

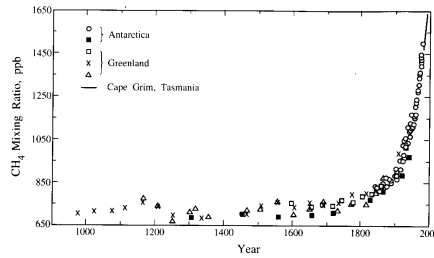


FIGURE 2.8 Methane mixing ratios over the last 1000 years as determined from ice cores from Antarctica and Greenland (IPCC, 1995). Different data points indicate different locations. Atmospheric data from Cape Grim, Tasmania, are included to demonstrate the smooth transition from ice core to atmospheric measurements.

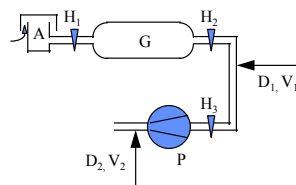
## Probenahmetechniken ohne Anreicherung

- *Probenahme in ein starres Behältervolumen* ("whole air sampling", "grab sampling")

### Glas ("Gasmäuse") (Graphik)

- **Vorteile:** Sichtkontrolle, gute Reinigungsmöglichkeit, keine Ausgasungen, inert (event. nach Silanisierung)
- **Nachteile:** keine Druckbefüllung, schwieriger Einsatz im Feld

**wichtig:** Spülen des Behälters (kontinuierliches Durchpumpen ca. des 10fachen Behältervolumens)

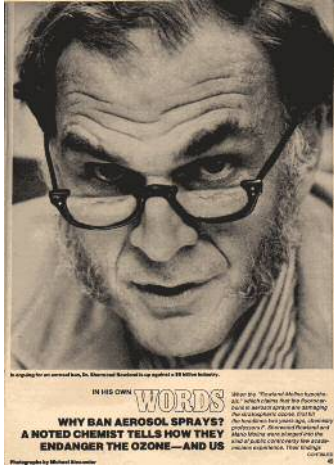


- A Ansaugkopf mit Vorabscheider
- G Sammelbehälter
- H<sub>1-3</sub> Absperrhähne
- P Pumpe
- D<sub>1-2</sub> mögliche Positionen für Druckmessung
- V<sub>1-2</sub> mögliche Positionen für Volumenstrommessung



**Metallbehälter** (elektropolierte Edelstahlbehälter, Aluminium)  
typisches Behältervolumen 1-2 L

**Vorteile:** Möglichkeit der Druckbefüllung, Handhabung  
**Nachteile:** hohe Kosten, aktive Oberflächen



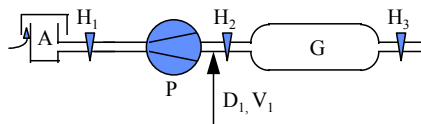
**Abb.** Sherwood Rowland (Nobelpreis für Chemie 1995) (aus Peoples Magazine 1976)



**Abb.** Standard-Probenahmebehälter aus Edelstahl (Summa-Kanister)

### Drei Arten der eigentlichen Probenahme (Metall- und Glasbehälter)

- Befüllen gereinigter evakuierter Behälters ohne Pumpeinrichtung, z. B. an explosionsgefährdeten Orten oder bei Ballonaufstiegen
- Befüllen mittels Pumpe, wobei die Pumpe hinter dem Sammelgefäß angeschlossen wird (Graphik oben), keine Gefahr der Kontamination durch die Pumpe selbst
- Druckbefüllung unter Verwendung von Metallbalgenpumpen



**Vorteile:** höheres Probenvolumen, Befüllung über lange Zeiträume (z. B. 24h Proben), leichte Ankopplung an Analysensystem

**Nachteile:** Gefahr von Kontaminationen, Kondensation von Wasserdampf

### Reinigung und Konditionierung der SammelgefäÙe

- wiederholtes Evakuieren (0.5 Torr) und Befüllen mit befeuchteter "Nullluft", Analyse des Behälterinhalts nach frühestens 24h (Blindwertmessung), EPA-Methode
- Ausheizen des Behälters während der Evakuierung (Verringerung der Blindwerte aber Gefahr aktiver Oberflächen (Analytverluste))
- Nach Reinigungsschritten erfolgt Befüllen des Behälters mit Umgebungsluft (Belegung von Sorptionszentren aber höhere Blindwerte)
- *Probenahme in ein veränderliches Behältervolumen*

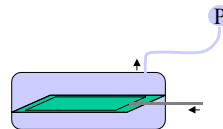
### Kunststoffbeutel (insbesondere PTFE)

**Vorteile:** geringes Gewicht, geringes Volumen vor der Füllung, z.T. einfache Befüllung

**Nachteile:** schwierige Reinigung, Wiederverwendbarkeit nicht immer gegeben, hohe Permeabilität bzw. Aufnahmefähigkeit für org. Spurenkomponenten



(Konzentrationsbereich > 1ppm)

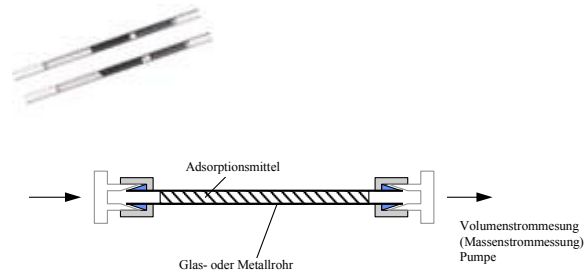


**Abb.** Bsp. zur Probenahme mit PTFE-Beuteln, Bestimmung gasförmiger Komponenten in Vulkanemissionen

## Probenahmetechniken mit Anreicherung

### Anreicherung an festen Adsorbentien

Einsatzbereiche: Bodenluft, Arbeitsplatz-Überwachung, Deponiegase, Raumluft

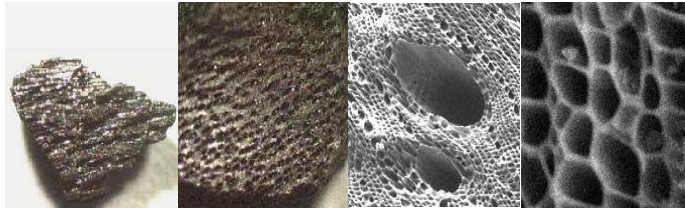


### Anforderungen an Adsorbentien

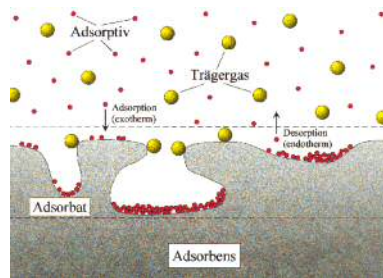
- hohe Kapazität (hohe Probenahmevolumina) (spezifische Oberfläche des Adsorbents)
- geringe Affinität zu Wasser (Luftfeuchtigkeit)
- hohe thermische Stabilität (Möglichkeit zur thermischen Desorption)
- keinen Beitrag zum Untergrund (Blindwerte)

Handelsname	Grundgerüst	Temperaturstabilität [°C]	Spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Eignung
Kieselgel	Kieselsäure	300	1–30	m
Aluminiumoxid	Aktiviertes Aluminiumoxid	300	300	m
Aktivkohle	Kohlenstoff aus Kokosnussschale	> 400	800	l, m
Carbopack B	graphitisierter Kohlenstoff	300	100	m
Carbosieve SIII	graphitisierter Kohlenstoff	225	1000	l, m
Tenax TA	2,6-Diphenyl-p-phenylenoxid	250	20–40	m
Porapak Q	Diphenylbenzen - Ethylvinylbenzen	250	700	m
Chromosorb 102	Styrol-Divinylbenzen	250	350	m
Amberlite XAD-4	Styrol-Divinylbenzen	200	750	m

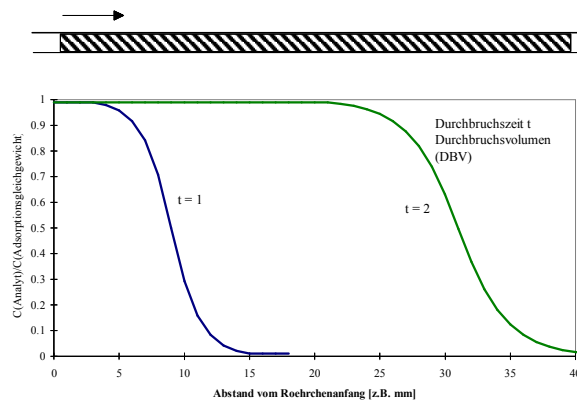
Tab. Häufig eingesetzte Adsorptionsmaterialien (l *leitflüchtig*, m *mittelflüchtig*)



**Abb.** Mikroskopische Aufnahmen von Aktivkohle



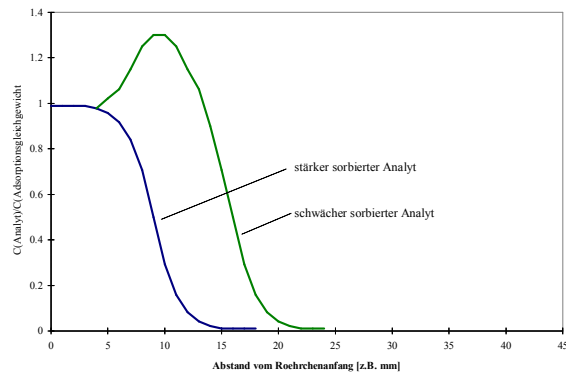
**Abb.**  
Schematische  
Darstellung der  
Adsorption



**Abb.** Darstellung zum zeitlichen Verhalten der Analytkonzentration während der Probenahme



⇒ wichtigste Größe zur quantitativen Anreicherung –  
Durchbruchsvolumen (DBV)



**Abb.** Darstellung zur Verdrängung schwächer sorbierter  
Analyten vom Adsorbents

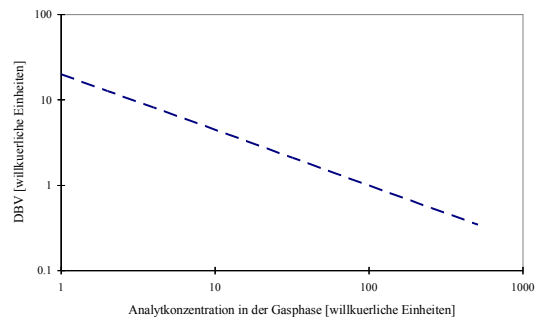
⇒ möglichst keine Wechselwirkung des Adsorptionsmaterials mit  
Luftfeuchtigkeit



**Abb.** Schematische Darstellung zur  
Oberflächenstruktur von Adsorbentien

Folge der uneinheitlichen Oberfläche

- ⇒ Adsorptionenthalpie hängt vom Bedeckungsgrad ab
- ⇒ Konzentrationsabhängigkeit des DBVs

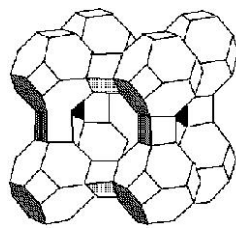
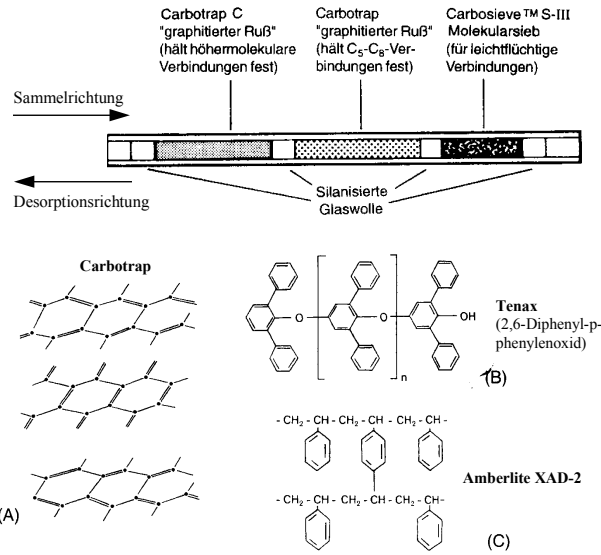


**Abb.** Konzentrationsabhängigkeit des Durchbruchvolumens

### Schlussfolgerungen zur quantitativen Anreicherung

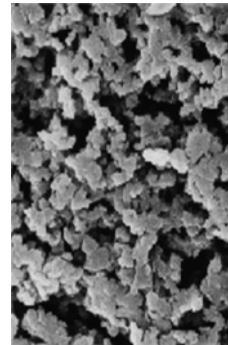
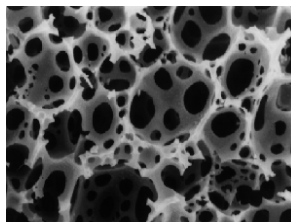
- ⇒ DBV schwer im Labor quantitativ zu bestimmen  
(Koadsorption, Konzentrationsabhängigkeit)
- ⇒ Überprüfung der vollständigen Anreicherung am Ort der Probenahme durch Verwendung von 2 Adsorptionseinheiten in Serie
- ⇒ DBVs sind abhängig von der Temperatur  
(Frontalchromatographie)

## Kombination verschiedener Adsorbentien



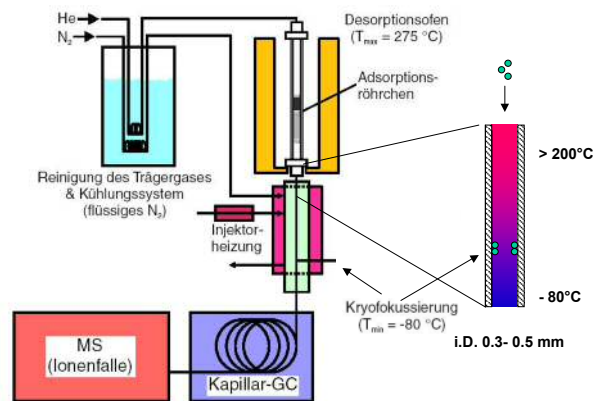
**Abb. Molekularsieb**  
(Abb. oben)

**Abb. Mikroskopische  
Aufnahmen poröser  
Polymere (z.B.  
Amberlite (rechte  
Abb.))**



## Möglichkeiten der Desorption

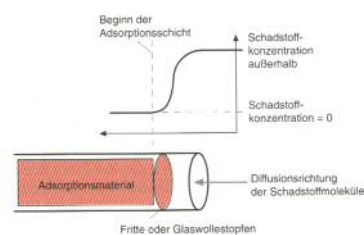
- thermische Desorption (vollständige Überführung der Analyten in das Analysensystem)



- Lösungsmitteldesorption (Verlust des hohen Anreicherungsfaktors, sinnvoll nur bei thermisch labilen Analyten oder extrem schwerflüchtigen Substanzen)

## Passivsammler

Neben den oben beschriebenen Möglichkeiten der aktiven Probenahme (Pumpen, Ansaugen) kann auch der Konzentrationsgradient zwischen der beprobten Gasphase und einem Adsorbens zur Probenahme ausgenutzt werden (*passive Probenahme*)



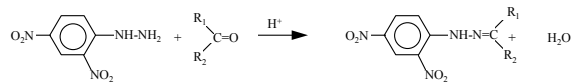
**Vorteil:** einfache Probenahme, Mittelung über längere Zeiträume (oft eingesetzt für die Überwachung von Innenraumluft und am Arbeitsplatz)

**Nachteil:** lange Probenahmezeit, keine Messung von Spitzenkonzentrationen möglich



**Anreicherung durch Absorption oder Chemisorption**  
(selektive Anreicherung)

- Carbonylverbindungen
- ⇒ Derivatisierung während der Probennahme mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin unter Bildung der Phenylhydrazone:

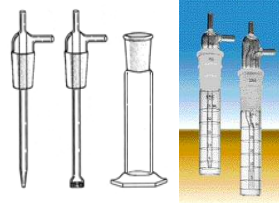


Probenahmemedium: Reagenzlösung auf Trägermaterialien oder in einem Impinger (Gaswaschflasche)



Abb. DNPH-Kartusche

Abb. Impinger



Bestimmung im Labor: Extraktion mit org. Lösungsmittel und HPLC/UV (360-375nm)

- organische Säuren
- ⇒ Überführung der flüchtigen Säuren (z.B. Ameisensäure/ Essigsäure) in ihre Alkalisalze mit basischen Substanzen ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KOH}$ )

⇒ **Bestimmung im Labor: Ionenchromatographie**

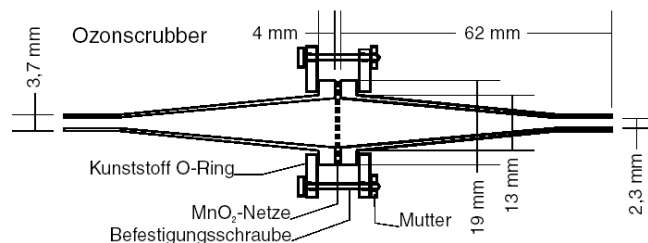
### Verluste und Artefaktbildung während der Anreicherung

- bei der Anreicherung von reaktiven Substanzen können stoffliche Veränderungen der Analyten durch chemische Reaktionen mit anderen Luftbestandteilen auftreten

Beispiele:

- ⇒ bei Messungen in der freien Atmosphäre insbesondere durch Abreaktion mit Ozon ( $O_3$ ) auf der Adsorbentienoberfläche, insbesondere **Verluste** von Alkenen oder auch Abbau von Phenylhydrazonen (**'negative artifacts'**)
- ⇒ aber auch **Artefaktbildung** ("Kunsterzeugnis"), z.B. Ozonolyse von Fetten (Triglyceride z.T. ungesättigter Fettsäuren wie Ölsäure (9-Octadecensäure)) während der Anreicherung ⇒ Nonanalbildung (**'positive artifacts'**)

- ⇒ selektive Entfernung der störenden Komponenten vor der Anreicherungseinheit
- Einsatz von Scrubbern (to scrub ≡ gründlich reinigen)  
z.B. **selektive** Entfernung von Ozon  
- KI,  $Na_2S_2O_3$ ,  $MnO_2$ , Titration mit NO, NOXON®  
(ungesättigtes Polymer)



### **Probenahme und Anreicherung organischer Komponenten aus Wasser und Feststoffen**

- **Headspace-Arbeitstechniken**
- **Festphasenextraktion**
- **SFE (*supercritical fluid extraction*)**

zu analysierende Komponenten im Vergleich mit luftgetragenen organischen Substanzen

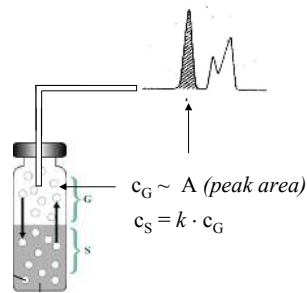
⇒ größerer zu erwartender Flüchtigkeitsbereich

---

### **Headspace-Techniken (Dampfraum-Analyse)**

- ⇒ entwickelt in den 60er Jahren (Geruchsstoffe im „Kopfraum“ von Konserven)
- ⇒ Verteilung der Analyten zwischen Matrix und Gasphase über der Probe
- ⇒ einfache Methode bei der Abtrennung von der Matrix, Reinigung und z.T. Aufkonzentrierung in einem Schritt ablaufen
- ⇒ Entnahme von Gasvolumen mit einer gasdichten Spritze
- ⇒ beschränkt auf flüchtige Substanzen
- ⇒ Prinzip: Gleichgewichtseinstellung zwischen Gas- und Flüssigphase ⇒ Graphik unten





**Abb.** Prinzip der Headspace-Analyse.  
**A** : Fläche des GC-Signals  
 **$c_G$ ,  $c_S$**  : Konzentration des Analyten in der Gas- bzw. Flüssigphase  
 **$k$**  : Verteilungskoeffizient

### Theorie zur Headspace-Analyse

$$k = \frac{c_s}{c_o} = \frac{\text{Konzentration im Wasser}}{\text{Konzentration in der Gasphase}} \quad (1)$$

Verteilungskoeffizient  $k$  (*partition coefficient*) ist abhängig von der Temperatur

$$c_s = k \cdot c_o \quad (2)$$

⇒ da Peakfläche  $A$  proportional zur Konzentration des Stoffes in der Gasphase folgt:

$$A \approx c_o = \frac{1}{k} \cdot c_s \quad (3)$$

⇒ um auf die Konzentration  $c_o$  in der ursprünglichen Probe zurückzuschließen zu können, wird vom Gleichgewicht der Massen ausgegangen:

$M_o = M_s + M_G$  nach GG-Einstellung mit  $M_o = c_o V_o$ ,  $M_s = c_s V_s$  und  $M_G = c_G V_G$

$$c_o \cdot V_o = c_s \cdot V_s + c_o \cdot V_G \quad (4)$$



Durch Verwendung von Gl. (2) kann die unbekannte Größe  $c_S$  durch  $k \cdot c_G$  ersetzt werden:

$$c_0 \cdot V_0 = k \cdot c_G \cdot V_S + c_G \cdot V_G \quad (5)$$

$$c_0 = c_G \cdot \frac{V_S}{V_0} \cdot \left( k + \frac{V_G}{V_S} \right) \quad (6)$$

Die Ausgangskonzentration  $c_0$  einer Probe ergibt sich mit  $V_0 = V_S$ :

$$c_0 = c_G \cdot \left( k + \frac{V_G}{V_S} \right) \quad (7)$$

Da die ermittelte Peakfläche  $A$  der Konzentration des flüchtigen Stoffes in der Gasphase  $c_G$  proportional ist (Gl. 3) gilt entsprechend:

$$c_0 \approx A \cdot (k + \beta) \quad \text{wobei} \quad \beta = V_G/V_S \quad (8)$$

$\beta$  Phasenverhältnis (phase ratio)

Die Einflüsse auf die Empfindlichkeit einer statischen Headspace-Analyse können nun leicht aus der Proportionalität der Gleichung 8 abgeleitet werden:

$$A \approx c_0 \cdot \frac{1}{k + \beta} \quad (9)$$

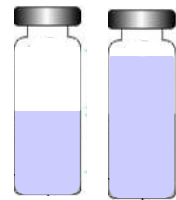
Substanz	40 °C	60 °C	80 °C
Tetrachlorethan	1,5	1,3	0,9
1,1,1-Trichlorethan	1,6	1,5	1,2
Toluol	2,8	1,6	1,3
o-Xylol	2,4	1,3	1,0
Cyclohexan	0,07	0,05	0,02
n-Hexan	0,14	0,04	<0,01
Ethylacetat	62,4	29,3	17,5
n-Butylacetat	31,4	13,6	7,6
iso-Propanol	825	286	117
Methyl-isobutyl-keton	54,3	22,8	11,8
Dioxan	1 618	642	288
n-Butanol	647	238	99

**Tab.** Verteilungskoeffizienten ausgewählter Verbindungen

$$k = \frac{c_S}{c_G} = \frac{\text{Konzentration im Wasser}}{\text{Konzentration in der Gasphase}}$$

Verbesserung der Nachweisgrenzen durch:

- ⇒ Temperaturerhöhung ( $k$  wird kleiner)
- ⇒ Verringerung des Phasenverhältnisses (allerdings nur für unpolare Analyten)
- kleine  $k$ -Werte, polare Analyten ⇒ Phasenverhältnis wenig wichtig)



$$\beta = 1 \quad \beta = 0.1$$

**Bedeutung (Einfluss von  $k$  und  $\beta$ ) für Fehlerabschätzungen und Auswahl interner Standards**

⇒ Zugabe hoher Konzentrationen anorganischer Salze ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) ⇒ „Aussalzen“ ⇒ Löslichkeit der organischen Analyten ( $k$ ) wird reduziert, insbesondere bei polaren Substanzen in polaren Lsgm. (z.B. Wasser)

### Statische Headspace-Technik

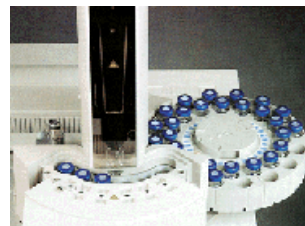


**Abb.** Vorgehensweise bei der statischen Headspace

⇒ Reduzierung des Matrixeinflusses: Standardisierung (wie oben, Zugabe anorganischer Salze ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) oder Standardadditionsmethode

⇒ leicht zu automatisieren (Probenwechsler)

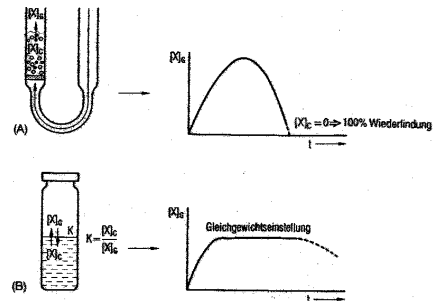
⇒ Einsatzgebiete: z.B. Aromaten in Wasser, Ethanol in Blut (forensische Blutalkoholbestimmung)



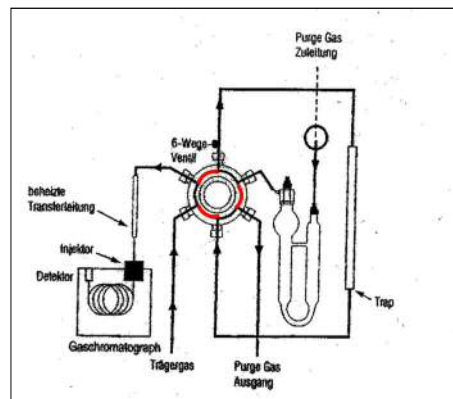
**Vorteile:** hoher Probendurchsatz, kaum Probenvorbereitung, Befüllung der Proben-Flaschen vor Ort, niedrige Analysenkosten

**Nachteile:** Injektion von Wasser und Sauerstoff, Matrixeffekte

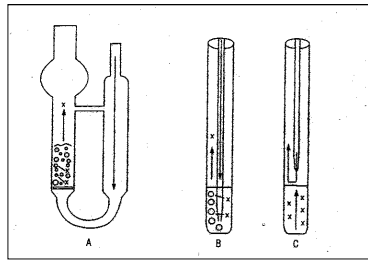
### Dynamische Headspace-Technik (Purge & Trap)



**Abb.** Gegenüberstellung der Methoden dynamische (A) und statische (B) Headspace



**Abb.** Gasflussplan einer Purge & Trap-GC-Kopplung, Schaltungen der Phasen am 6-Wege-Ventil: schwarze Linie: Purge-Phase, rote Linie: Desorptionsphase



**Abb.** Möglichkeiten der Probenzuführung in der Purge & Trap. (A) U-Rohr mit Fritte für Wassersproben (B) Probengefäß für Wasser- und Bodenproben (Feststoffe) (C) Probengefäß für schäumende Proben

Einsatzgebiete:

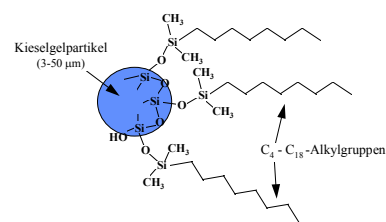
- leichtflüchtige halogenierte Kohlenwasserstoffe in Wasser
- Geruchsstoffausdünstungen aus Materialien (z.B. Leder, PKW-Innenausstattungen)
- Lebensmittelanalytik (z.B. Aldehyde in Speiseölen)

**Vorteile:** geringere Erfassungsgrenzen, bessere Matrixabtrennung

**Nachteile:** Kontaminationen, schwierig bei schäumenden Proben

### Festphasenextraktion (SPE, solid phase extraction)

- ersetzt mehr und mehr die Flüssig-Flüssig Extraktion
- Aufkonzentrierung der Analyten an der Oberfläche von Festphasen
- Einsatz von Glas- oder Kunststoffkartuschen, die zwischen zwei Fritten ein festes Adsorbens (z.B. Kieselgel), enthalten
- wichtig: Konditionierung ("Aktivierung") des Adsorbens mit reinem Lösungsmittel
- häufig verwendete Festphasen: chemisch gebundene unpolare Gruppen an Trägermaterialien (Grapik), z.B. C<sub>18</sub>-Phasen (*reversed phase*), grahierte Ruße, Ionenaustauscher



Festphase	Matrix	Analyten
Umkehrphasen* z. B. RP-18, RP-8, RP-Phenyl	polare Matrix z. B. wässrige Lösung	unpolar bis leicht polar Kohlenwasserstoffe, Aromaten, Vitamine, Pestizide, Arzneistoffe
Normalphasen* z. B. Kieselgel, Aluminiumoxid, Florisil	unpolare Matrix z. B. Hexan, chlorierte Kohlenwasserstoffe	polar Alkohole, Aldehyde, Ketone, Amine, Phenole, Aminosäuren, Lipide, Steroide, Pestizide, Arzneistoffe
Ionenaustauscher**	polare Matrix z. B. wässrige Lösung	ionisch Aminosäuren, Zucker, Nucleinsäuren, Metalle

Tab. Gängige Festphasenmaterialien

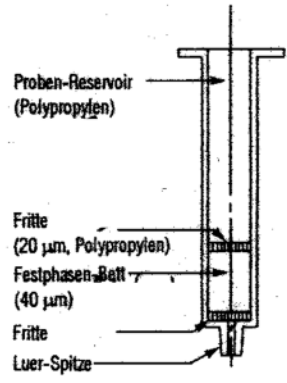


Abb. Aufbau einer gepackten Säule zur Festphasen-Extraktion

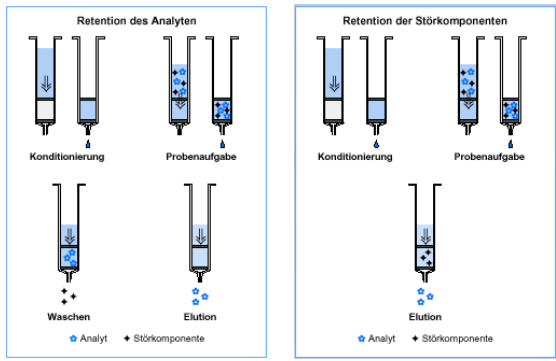


Abb. Verschiedene Vorgehensweisen bei der SPE

⇒ Einsatzbereiche der SPE: auch schwer- und nichtflüchtige Analyten (siehe Tabelle oben)

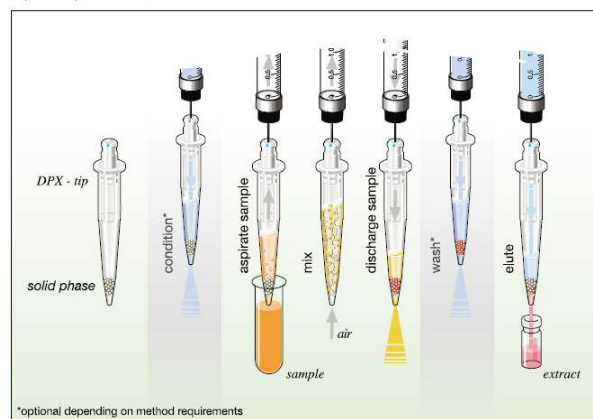


Abb. Retention und Elution mit einem Kationenaustauscher

**Abb.** Schematische Darstellung zum Ablauf der Anreicherung einer Wasserprobe auf Festphasen-Kartuschen mit C<sub>18</sub>-Material  
 (a) Konditionierung  
 (b) Beladung (Extraktion)/Waschen  
 (c) Trocknung  
 (d) Elution

## Disposable Pipette Extraction (DPX)

Disposable Pipette Extraction Process



### The DPX process

*If needed, the sorbent is conditioned with solvent prior to the extraction*

- 1) Sample is drawn into the pipette tip for direct contact with the solid phase sorbent
- 2) Turbulent air bubble mixing creates a suspension of sorbent in the sample ensuring optimal contact and highly efficient extraction
- 3) The extracted sample is discharged, typically after 30 seconds

*If needed, the sorbent can be washed to remove unwanted residue*

- 4) Extracted analytes are eluted into a vial for subsequent sample introduction to LC/MS or GC/MS

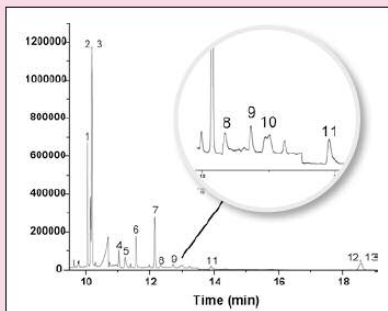
## Disposable Pipette Extraction (DPX)

Beispiel GC/MS -

### Benzodiazepines

Total ion chromatogram of 0.2 ppm benzodiazepines in 0.2 mL of urine following enzymatic hydrolysis and DPX. Derivatization was performed in the CIS inlet by injecting 50 µL of DPX eluent together with 20 µL of 50/50 MTBSTFA/acetonitrile. No separate solvent evaporation step was performed. Increasing the sample volume to 0.5 mL using multiple DPX extractions would increase the sensitivity.

- 1) Diazepam, 2) Nordiazepam-*d*<sub>5</sub>-TBDMS,
- 3) Nordiazepam-TBDMS, 4) Flunitrazepam,
- 5) 7-aminoflunitrazepam, 6) Oxazepam-2TBDMS,
- 7) Temazepam-TBDMS, 8) Nitrazepam,
- 9) Lorazepam-2TBDMS, 10) Clonazepam-TBDMS,
- 11) Alprazolam, 12) α-OH-Alprazolam-*d*<sub>5</sub>-TBDMS,
- 13) α-OH-Alprazolam-TBDMS



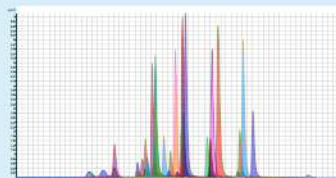
## Disposable Pipette Extraction (DPX)

Beispiel LC/MS -

### DPX-LC/MS/MS Drug Screening

Automated extraction and determination of 40 drugs in urine using automated DPX-LC/MS/MS. Complexes of 275 µL hydrolyzed urine spiked with drugs were diluted with 600 µL acetonitrile, vortexed and transferred to a DPX-SC tip. After automated DPX the sample was evaporated and reconstituted using 100 µL of methanol / 0.05% formic acid (1:1 v/v). The analysis was performed using an Agilent 1200 HPLC with a Zorbax Eclipse Plus column DB-C18, 2.1x100 mm, 1.8 µm and an Agilent 6410 TripleQuad Mass Spectrometer (ESI, dynamic MRM, positive mode).

**LC-Conditions**  
 Injection Volume: 2.5 µL  
 Mobile Phase: **A:** 5 mM ammonium formate with 0.05% formic acid  
**B:** Methanol with 0.05% formic acid  
 Gradient:  
 0.0 min 95 % A / 5 % B  
 1.5 min 70 % A / 30 % B  
 3.5 min 30 % A / 70 % B  
 4.5 min 5 % A / 95 % B  
 6.0 min 5 % A / 95 % B  
 7.5 min 95 % A / 5 % B  
 Flow Rate: 600 µL / min



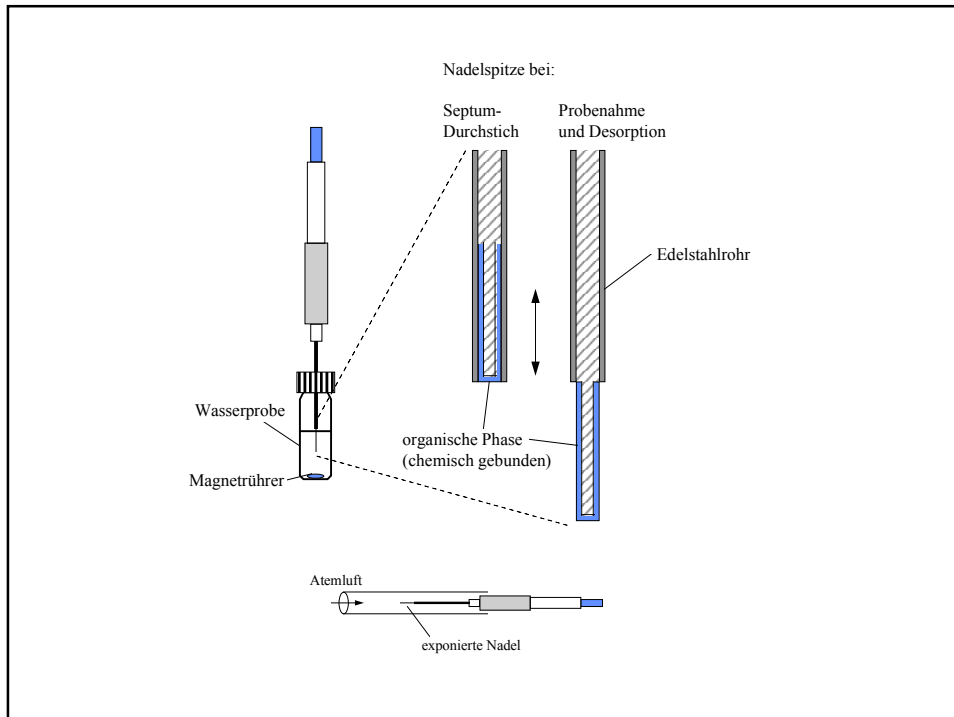
Extracted Ion Chromatograms of 40 drugs and metabolites in urine.

Compound	RT (min)	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Recovery (%)
Cocaine	2.297	300.2	152.0	95
Hydrocodone	2.446	300.2	189.0	113
Hydroxycodone	1.891	296.2	185.0	74
6-MAM	2.476	265.2	165.0	89
Morphine	1.426	285.2	152.1	72
α-Norpine	1.414	285.2	152.1	100
Oxycodone	2.392	316.2	241.0	91
Ultracodone	1.600	300.2	222.1	73
Buprenorphine	4.131	468.4	414.0	69
EDDP	3.867	278.2	234.1	81
Fentanyl	3.691	337.2	188.2	99
45-Fentanyl	3.690	342.0	188.1	100
Mefenorex	4.264	310.2	265.1	75
Notuspropine	5.631	414.3	187.0	68
Nuchteranyl	3.646	239.1	150.1	79
Ripiroxam	4.493	368.0	321.0	117
α-OH-alprazolam	4.368	325.0	287.0	128
Clonazepam	4.228	316.0	270.0	127
Clonazepam	4.811	285.0	257.0	78
Flunitrazepam	4.293	314.0	268.0	120
Lorazepam	4.447	321.0	279.0	150
Nitrazepam	4.243	352.0	236.0	101
Nordiazepam	4.691	271.0	165.0	79
α-Nordiazepam	4.674	276.0	215.0	100
Oxazepam	4.444	287.0	269.0	142
Temazepam	4.565	301.0	255.0	96
l-Desmethylnaloxadiol	3.263	250.1	189.1	65
Nonpropoxyphene	4.261	336.0	292.1	70
Propoxyphene	4.220	343.3	58.0	78
α-N-propoxyphene	4.210	345.3	271.3	100
tramadol	3.164	264.2	68.0	70
Carbamazepin	4.400	281.2	176.1	72
α-OH-Carbamazepin	4.490	285.2	182.1	100
gabapentin	2.504	172.1	154.0	61
Meprobamate	3.189	278.1	198.0	73
PCP	3.620	244.3	91.2	71
α-PCP	3.629	249.3	164.3	100
α-OH-THC	3.512	245.0	192.0	47
Amphetamine	2.683	136.2	81.1	60
β-Amphetamine	2.573	141.1	83.0	100
Benzoylecgonine	3.041	250.3	168.3	89
Cocaine	3.161	304.2	183.1	146
MDA	2.580	180.0	163.3	79
MDEA	2.806	208.0	135.0	100
MDMA	2.643	184.0	163.0	85
Methamphetamine	2.642	150.2	81.1	65
Methamphetamine	3.206	234.2	84.1	100

### Festphasen-Mikroextraktion (SPME, *solid phase micro extraction*)

- Möglichkeit zur Anreicherung aus der Flüssig- oder Gasphase
- weitgehend unbeeinflusst durch andere Matrixbestandteile (z.B. Schwebstoffe)
- organische Phasen unterschiedlicher Polarität

⇒ weiter Einsatzbereich:  
Gas-, Wasser-, Bodenanalytik,  
klinische Analytik (z.B. Atemluft  
(Graphik), Nahrungsmittelanalytik





### Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE, „twister“)

- Polydimethylsiloxan (PDMS) beschichtetes Rührstäbchen für Magnetrührer
- Rühren in der zu analysierenden flüssigen Probe
- zu untersuchende Komponenten werden aus der Matrix im PDMS sorbiert
- anschließend Thermodesorption der angereicherten Analyten gefolgt von GC
- ca. 50-mal wiederverwendbar

**Vorteil:** vollständige Überführung der sorbierten Analyten in das GC-System

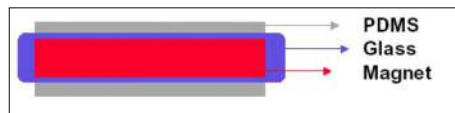
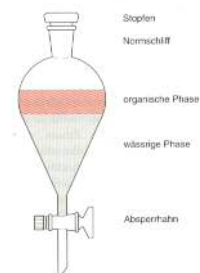


Abb. „Twister“

### Flüssig/Flüssig- und Flüssig/Fest-Extraktion

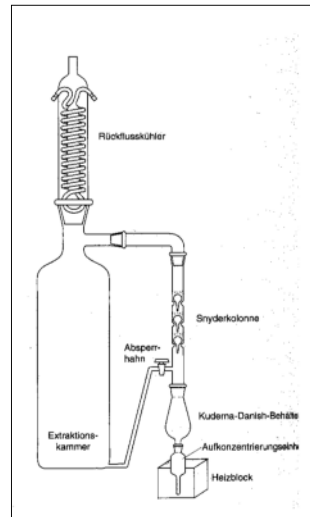
Einfachste Möglichkeit - Scheidetrichter

- Verteilung des Analyten ( Nernstsche Verteilungsgesetz)
- Zusatz von anorganischen Salzen (Beeinflussung des Verteilungskoeffizienten)
- Einstellung des pH-Wertes für saure bzw. basische Analyten wichtig (z.B. Ansäuern der Probe zur Extraktion von Phenolen)
- Einengen des Lösungsmittels (Rotationsverdampfer, Kuderna-Danish-Apparatur oder Abblasen mit N<sub>2</sub>)

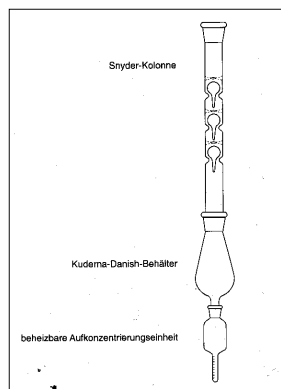


- Analog: Flüssig/Fest-Extraktion (Soxhlet-Extraktion)

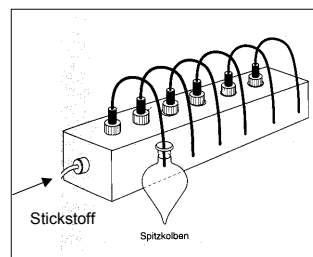
**Abb.** Apparatur zur kontinuierlichen Flüssig/Flüssig-Extraktion



**Exkurs: Aufkonzentrierung - Einengen der Extraktionslösungen**  
(Kuderna-Danish-Apparatur und Einblasvorrichtung)



**Abb.** Kuderna-Danish-Apparatur

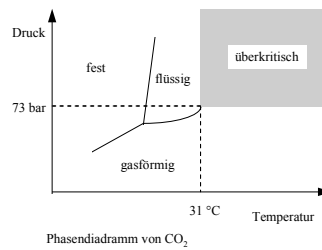


**Abb.** Einblasvorrichtung

- Vermeidung von Analytverlusten beim Einengen mit Stickstoff z.T. durch Zugabe geringer Mengen von schwerflüchtigen Flüssigkeiten ("keeper") (z.B. Phtalsäureester)

### Extraktion mit überkritischen Fluiden (SFE, *supercritical fluid extraction*)

- Alternativmethode insbesondere zur Soxhlet-Extraktion (aber auch Extraktion von Flüssigkeiten)
- überkritische Fluide sind verdichtete Phasen jenseits ihrer kritischen Temperatur und ihres kritischen Drucks
- Ihre Eigenschaften liegen zwischen denen von Flüssigkeiten und Gasen (siehe Tabelle unten)

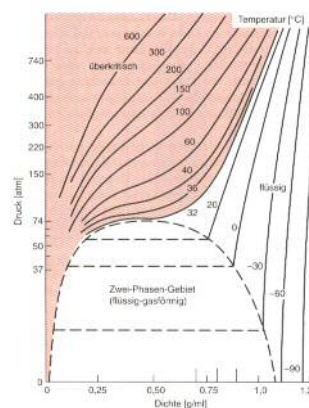


	Gasförmig	Überkritisch	Flüssig
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	1 · 10 <sup>-3</sup>	3 · 10 <sup>-1</sup>	1 · 10 <sup>0</sup>
Viskosität [g/cm s]	1 · 10 <sup>-4</sup>	5 · 10 <sup>-4</sup>	1 · 10 <sup>-2</sup>
Diffusionskoeffizient [cm <sup>2</sup> /s]	1 · 10 <sup>-1</sup>	1 · 10 <sup>-4</sup>	5 · 10 <sup>-6</sup>

**Tab.** Typische Kenndaten von Gase, überkritischen Fluiden und Flüssigkeiten



- wichtige Größen für Extraktionen: *Viskosität* (Durchdringung der Probenmatrix), *Diffusionskoeffizient* (Zeit der Extraktion), *Lösevermögen* (ähnlich flüssiger Lösungsmittel, aber in der Rückstandsanalytik weniger wichtig als bei technischen Prozessen)
- Lösevermögen nimmt mit steigender Dichte zu, wobei letztere eine starke Abhängigkeit von den Parametern Druck und Temperatur hat (siehe Abb. unten)



**Abb.** Druck/Dichte-Diagramm von Kohlendioxid

Substanz	kritische Temperatur [°C]	kritischer Druck [MPa]
Xe	16.6	5.83
CHF <sub>3</sub>	25.9	4.83
CClF <sub>3</sub>	28.8	3.92
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>31.1</b>	<b>7.37</b>
N <sub>2</sub> O	36.4	7.24
NH <sub>3</sub>	132.2	11.27
CH <sub>3</sub> OH	239.4	8.09
H <sub>2</sub> O	374.1	22.04

Tab. Kritische Daten ausgewählter Substanzen

- CO<sub>2</sub> - ist das am häufigsten verwendete überkritische Fluid (relativ niedrige kritische Temperatur (Extraktion thermolabiler Substanzen (Steroide)), chemisch inert, geringe Toxizität, hohe Reinheit, niedrige Kosten)
- durch Druck- und Temperatursteuerung kann das Lösungsvermögen beeinflusst werden: niedriger Druck: begünstigt Extraktion unpolare Analyten, höherer Druck ⇒ höheres Lösungsvermögen auch für polare Substanzen (aber niedrigerer Diff.-Koeff. (Zeit))

- geringe Polarität von CO<sub>2</sub> (relative geringe Löslichkeit von polaren Analyten) kann durch Zugabe von Modifikatoren (*Modifiern*) (Methanol, Dichlormethan) verbessert werden. Durch Modifikatoren wird nicht nur die Löslichkeit der Analyten verbessert, sondern diese treten auch mit den Adsorptionsstellen der Matrix in Wechselwirkung (Verdrängung der Analyten)
- auch die Zugabe von derivatisierenden Modifiern ist möglich (z.B. Silylierung)

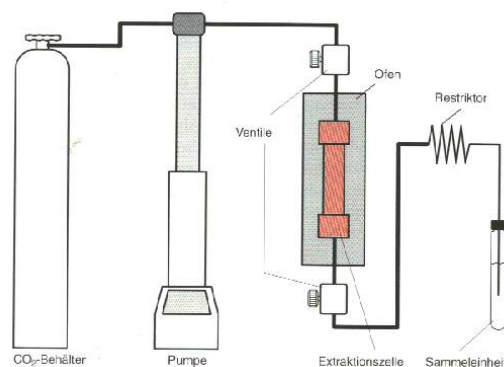


Abb. Schematischer Aufbau eines SFE-Systems

- da  $\text{CO}_2$  unter Normalbedingungen gasförmig ist  $\Rightarrow$  Entspannung des Fluids nach der Extraktion führt zur Aufkonzentrierung
- Restriktoren (Quarzkapillaren, Nadelventile) sind üblicherweise beheizt (Joule-Thompson-Effekt)

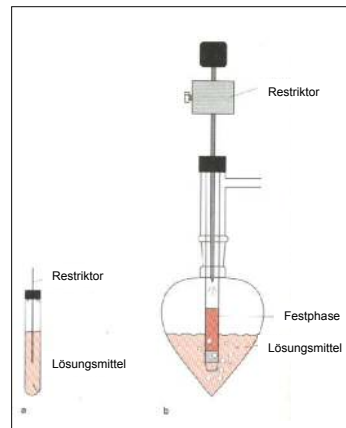


**Abb.** Extraktionszelle für die SFE

**Abb.** Auffangvorrichtungen für SF-Extraktionen  
(a) Lösungsmittel  
(b) kombinierte Fest/Flüssig Sammelvorrichtung

**Vorteile:** hohe Extraktionseffizienz, vergleichsweise schnelle Extraktionsmethode

**Nachteile:** vergleichsweise hohe Kosten (apparativ aufwendig) zeitaufwendige Ausarbeitung der Analysenprozedur (z.B. Auswahl von Modifiern)



### **Beispiele für den Einsatz von SFE**

- Nitroaromaten in Böden (militärische Altlasten)
- Dioxin-Analytik (Flugaschen, biologische Proben, Böden, Sedimenten)
- Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) in luftgetragenen Partikeln
- Polychlorierte Biphenyle (PCBs) in Nahrungsmitteln
- Steroide (Cholesterin, Testosteron) aus biologischen Proben
- Drogennachweis in Haaren

# Trenntechniken - Allgemeines

---

## Chromatographische Techniken

⇒ Immense Bedeutung in der organischen Spurenanalytik

wichtige Zeitschriften:

*J. Chromatogr., J. Chromatogr. Sci., Chromatographia, J. Liq. Chromatogr.*

Bücher:

*K. Camman, Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum 2001*

*R. Kellner, "Analytical Chemistry", Wiley-VCH, 1998*

*W. Gottwald, "GC für Anwender", Verlag Chemie, 1995*

*G. Schomburg, "Gaschromatographie", Verlag Chemie, 1987*

*Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Vol. B, Nr. 5,*

*"Analytical methods", 1994*

## Historisches

- Entwicklung der ersten chromatographischen Technik durch *Mikhail Semenovich Tswett* im Jahr 1903 (Trennung verschiedener Chlorophylle aus Blättern an Calciumcarbonat)

- Wortbedeutung Chromatographie: *chroma* (gr.): Farbe; *graphein* (gr.): schreiben ⇒ „Farbschreiben“



Abb. M.S. Tswett

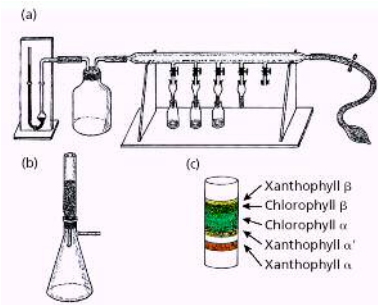


Abb. Illustrationen aus Tswetts erster Publikation

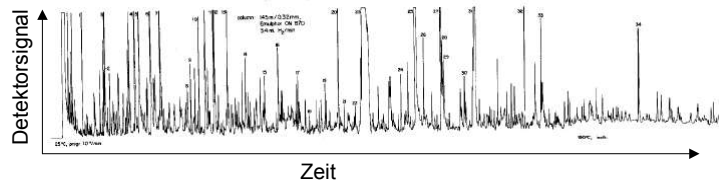


Abb. Chromatogramm einer Tabakrauchfraktion. Von den etwa 3000 in dieser Fraktion vorhandenen Komponenten konnten ca. 1000 chromatographisch getrennt werden.

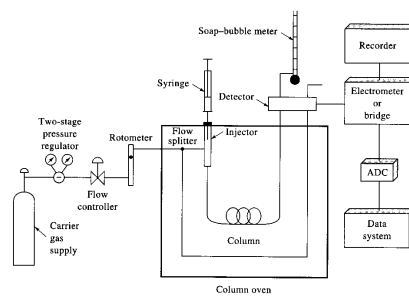
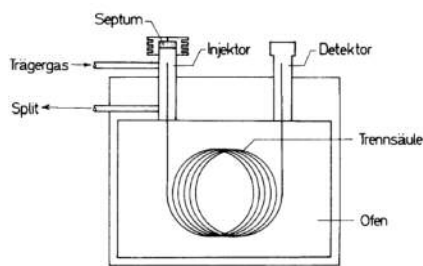
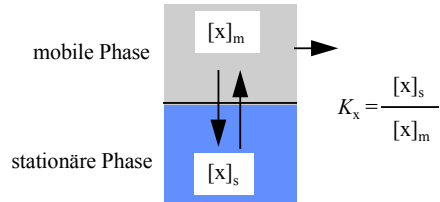


Abb. Beispiele für einfache chromatographische Systeme (Gaschromatographie)



**Grundlage aller chromatographischer Trennmethode:**

- Unterschiede der Verteilungsgleichgewichte der Komponenten (unterschiedliche Verteilungskoeffizienten  $K$ ) einer Mischung in einem Zweiphasensystem



sowie

- die relative Bewegung der beiden Phasen zueinander

	mobile Phase		
	gasförmig	überkritisch	flüssig
Stationäre Phase	GC Gas Chromatography	SFC Supercritical-Fluid Chromatography	LC Liquid Chromatography
Fest	Adsorptionschromatographie (Gas-Solid Chromatography (GSC))	SFC (Supercritical-Fluid Chromatography)	Dünnschichtchromatographie (Thin-Layer Chromatography (TLC)) Säulenchromatographie Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)
Flüssig	Verteilungschromatographie (Gas-Liquid Chromatography (GLC))	SFC	RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Chromatography)



### Chromatographische Kenngrößen

- **Messgröße**  $\Rightarrow$  Detektorsignal als Funktion der Bruttoretentionszeit ( $t(B)$ )
- **Bruttoretentionszeit ( $t(B)$ )**  $\Rightarrow$  Zeit zwischen Aufbringen der Komponenten auf die Säule (Injektion) und der Detektion (Peakmaximum)
- **Totzeit ( $t_T$ )**  $\Rightarrow$  kleinste mögliche Retentionszeit für Substanzen, die keine Wechselwirkung mit der stationären Phase eingehen (Inertsubstanzen z.B. Luft in der GC)

- **mittlere Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase ( $v$ )**

$$v = L / t_T \quad \begin{array}{l} L \text{ Länge der Säule [cm]} \\ t_T \text{ Totzeit [s]} \end{array}$$

(mittlere Geschwindigkeit, da sich  $v$  bei komprimierbaren mobilen Phasen (z.B. Gasen) entlang der Säule ändert)

- **Nettoretentionszeit ( $t'$ )**  $\Rightarrow$  Bruttoretentionszeit minus Totzeit  
 $t' = t(B) - t_T$

- **Kapazitätsfaktor  $k'$**  (auch Retentionsfaktor)  $\Rightarrow$  andere Größe zur Beschreibung der Retention (Maß um wieviel länger sich eine Substanz in der stationären Phase aufhält als in der mobilen Phase)

$$k' = \frac{t'}{t_T} = \frac{t(B) - t_T}{t_T} \quad \Rightarrow \quad k' \text{ (dimensionslos) ergibt sich unmittelbar aus dem Chromatogramm}$$

ideale Werte für  $k$  liegen zwischen 1 und 5

- **Trennfaktor  $\alpha$  (auch Selektivität)**  $\Rightarrow$  relative Retention zweier Substanzen (dimensionslos)  $\Rightarrow$  Quotient der Kapazitätsfaktoren der beiden benachbarten Signale (Abb. oben, C + B):

$$\alpha = \frac{k'(C)}{k'(B)} = \frac{t'(C)}{t'(B)}$$

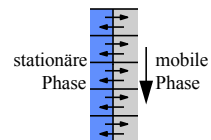
- $\Rightarrow$  definitionsgemäß ist  $\alpha$  immer größer oder gleich 1
- $\Rightarrow$  bei  $\alpha = 1$  eluieren beide Substanzen gleichzeitig (Coelution)
- $\Rightarrow$  keine Trennung

- **Phasenverhältnis  $\beta$**   $\Rightarrow$  Volumenverhältnis zwischen mobiler ( $V_m$ ) und stationärer Phase ( $V_s$ )

$$\beta = V_m / V_s$$

- **Trennstufenzahl und Bodenhöhe (HETP)**

- $\Rightarrow$  der eigentlich dynamische chromatographische Trennvorgang lässt sich zerlegen in nacheinander ablaufende diskrete Trennschritte (Abb.)



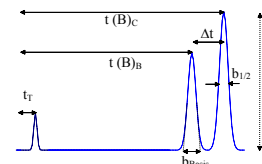
- $\Rightarrow$  in jedem dieser *theoretischen Böden* kommt es zur Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Phasen (höhere Bodenzahl  $\Rightarrow$  bessere Trennung)

- $\Rightarrow$  die theoretische Trennstufenzahl ( $N_{th}$ ) lässt sich aus der Signalbreite (Halbwertsbreite  $b_{1/2}$ ) oder der Basislinienbreite ( $b_{Basis}$ ) ermitteln:

$$N_{th} = 16 \left( \frac{t(B)}{b_{Basis}} \right)^2$$

- $\Rightarrow$  Höhe einer theoretischen Trennstufe (HETP, height equivalent to a theoretical plate) ergibt sich dann:

$$HETP = \frac{L}{N_{th}}$$



- Auflösung  $R$  (Resolution)

im Gegensatz zum Trennfaktor bezieht die Auflösung die Signalformen zur Beschreibung der Trennung mit ein

$$R = \frac{t(B)_C - t(B)_B}{\frac{b_{Basis(C)} + b_{Basis(B)}}{2}} \quad \text{und mit } b_{Basis(B)} \cong b_{Basis(C)} \cong b_{Basis} \Rightarrow R = \frac{\Delta t}{b_{Basis}}$$

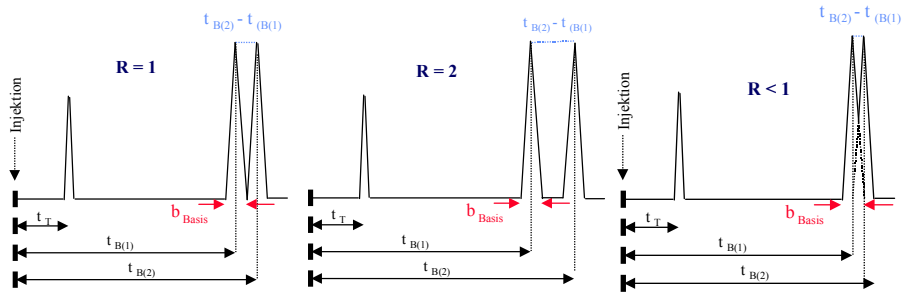


Abb. Beispielchromatogramme für verschiedene Auflösungen (idealisierte Peakformen)

- Grundgleichung zur chromatographischen Auflösung:

$$R = \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{k'(C)}{1 + k'(C)} \frac{\sqrt{N_{th}}}{4}$$

⇒ Grundlage zur Optimierung von Trennungen:

- z.B. zur Auswahl
- des Säulenmaterials ( $\alpha$ )
- der Menge an stationärer Phase ( $k'$ )
- der notwendige Säulenlänge ( $N_{th}$ )

Herleitung der nebenstehenden Gleichung:

Umstellen von  $N_{th} = 16 \left( \frac{t(B)}{b_{Basis}} \right)^2$  nach  $b_{Basis}$  und einsetzen in  $R = \frac{t(B)_C - t(B)_B}{b_{Basis}}$  ergibt:

$$R = \frac{t(B)_C - t(B)_B}{t(B)_C} \frac{\sqrt{N_{th}}}{4} \quad \text{unter Verwendung}$$

der Definition des Kapazitätsfaktors

$$k' = \frac{t(B) - t_T}{t_T} \quad \text{resultiert:}$$

$$R = \frac{k'(C) - k'(B)}{1 + k'(C)} \frac{\sqrt{N_{th}}}{4}$$

Einführung des Trennfaktors  $\alpha = \frac{k'(C)}{k'(B)}$

und Umstellung:

$$R = \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{k'(C)}{1 + k'(C)} \frac{\sqrt{N_{th}}}{4}$$

# Trenntechniken

## Gaschromatographie

- Gaschromatographie ist die am weitesten verbreitete analytische Technik  $\Rightarrow$  ca. 30.000 Geräte / Jahr
- GC ist die Methode der Wahl für die Trennung flüchtiger Verbindungen (organisch und anorganisch) Molekulargewichtsbereich  $\Rightarrow$  von 2 bis  $> 1000$

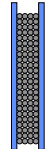


gepackte Säule



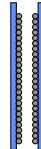
Kapillarsäule

1 - 5 mm iD  
Länge 1 - 5 m  
Rohrwandungen  
Glas oder Metall

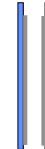


gepackte oder  
mikrogepackte  
Säulen

0.1 - 0.5 mm iD  
Länge 10 - 150 m  
Rohrwandungen  
Quarzglas



Dünnschicht-  
Kapillarsäule

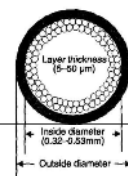


Dünnsfilm-  
Kapillarsäule

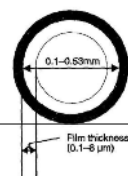
Abb.  
Säulentypen  
in der GC



gepackte Säulen



Dünnschichtsäulen  
(PLOT porous layer  
open tubular column)



Dünnsfilmsäulen  
(WCOT wall coated  
open tubular column)



**Abb.** Mechanismen der Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase (ABsorption  $\equiv$  "Auflösen im Ganzen"; ADsorption  $\equiv$  "Verbleiben auf der Oberfläche")

- heutzutage fast ausnahmslos Einsatz von Kapillarsäulen (insbesondere Dünnschichtsäulen) in der organischen Spurenanalytik
- ⇒ guter Stoffaustausch zwischen mobiler und stationärer Phase
- ⇒ hohe Permeabilität (geringer Druckabfall)
  - ⇒ Möglichkeit lange Säulen einzusetzen
  - ⇒ hohe Trennstufenzahl ( $N_{th}$ )
  - ⇒ geringere Anforderungen an die Selektivität der Säule
  - ⇒ Säulen sind universeller einsetzbar

Säulenparameter für Dünnsäulen:

- Durchmesser
- Länge ( $N_{th}$ )
- stationäre Phase ( $\alpha$ )
- Filmdicke ( $k'$ )

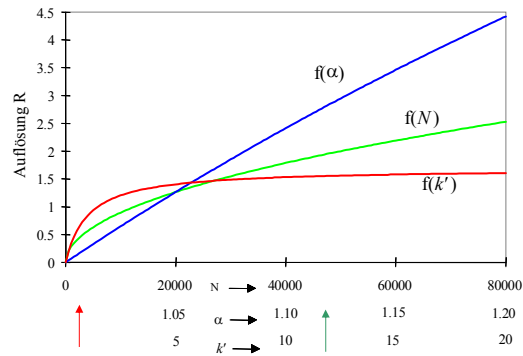


Abb. Graphische Darstellung der Grundgleichung zur chromatographischen Auflösung (s.o.)

Auswahl der Kapillarsäulenparameter: z.B. leichtflüchtige Analyten ( $k'$  ist klein – roter Pfeil)

- ⇒ größere Menge an stationärer Phase
- ⇒ Erhöhung von  $k'$  führt zu verbesserter Auflösung (große Steigung der "roten" Funktion  $f(k')$  bei kleinen  $k'$ )

oder z.B. bei ohnehin größerem  $k'$  (schwerflüchtige Analyten - grüner Pfeil)

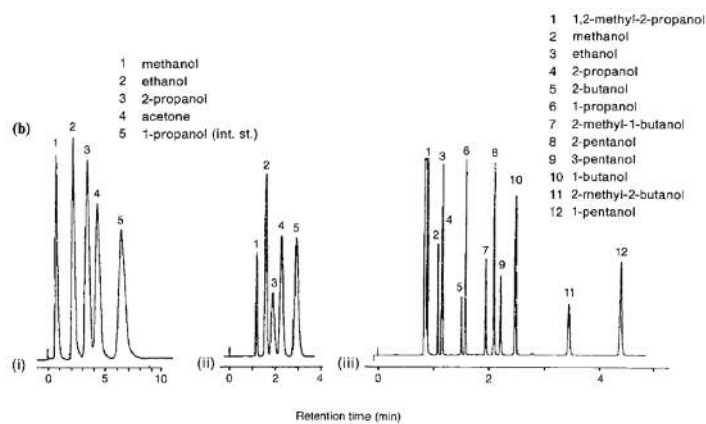
- ⇒ zur Verbesserung von  $R$  längere Säule ( $N_{th}$ ) oder andere Phase ( $\alpha$ )



Charakteristische chromatographische Größen in Abhängigkeit vom Säulendurchmesser

innerer Durchmesser [mm]	HETP [mm]	$N_{th}$ [ $m^{-1}$ ]	typische Flussraten ( $H_2$ ) [ml/min]	Probenkapazität pro Substanz
0.1	0.1	10000	0.2-0.5	< 1 ng
0.18	0.18	5556	0.4-1.0	
<b>0.22</b>	0.22	4545	0.8-2.0	
<b>0.32</b>	0.32	3125	1.7-4.0	
0.53 "wide bore"	0.53	1887	3-50	> 200 ng

- ⇒ geringere i.D. haben zwar hohe Trennstufenzahlen, erlauben aber nur geringe Flussraten und geringe Substanzmengen
- ⇒ größere i.D. ("wide bore") haben zwar nur niedrige Trennstufenzahlen, erlauben aber höhere Flussraten und größere Substanzmengen
- ⇒ individuelle Auswahl für jedes Trennproblem ("Standardsäulen": 0.22 oder 0.32 mm i.D., 1  $\mu m$  Filmdicke, 25-50 m Länge)



**Abb.** Vergleich der Trennung auf einer gepackten Säule (links) (2 m Länge, 3 mm i.D.), einer *wide bore* Kapillarfilmsäule (Mitte) (10 m Länge, 0.53 mm i.D. FD 2  $\mu m$ ) und einer "Standard"-Kapillardünnsäule (rechts) (25 m Länge, 0.25 mm i.D., FD 0.25  $\mu m$ )

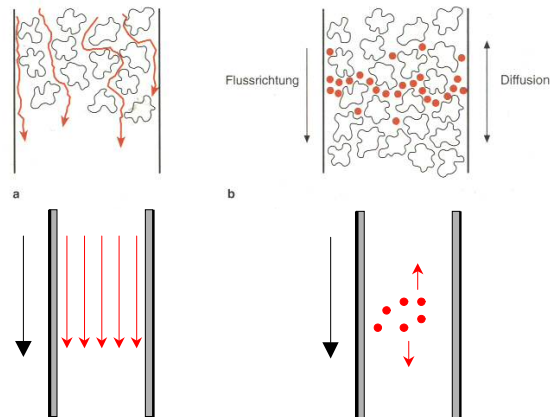
### Mobile Phasen in der GC

⇒ hauptsächlich Helium, aber auch N<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>

⇒ Einfluß der mobilen Phase auf Peakverbreiternde Prozesse **Van-Deemter Gleichung**:

$$HETP = A + \frac{B}{v} + C \cdot v$$

mit A = Term zur Beschreibung der Eddy-Diffusion  
B = Term zur Beschreibung der Longitudinaldiffusion  
C = Term zur Beschreibung des Massentransfers

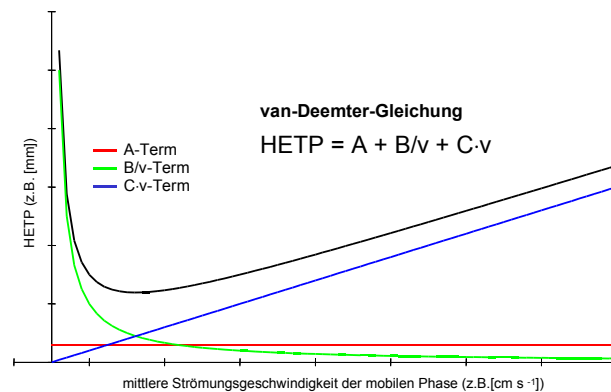


**Abb.** Schematische Darstellung der Eddy-Diffusion **(a)** und der Longitudinaldiffusion **(b)** bei gepackten Säulen (oben) und Kapillarsäulen (unten)

**Eddy-Diffusion**  $\Rightarrow$  unterschiedliche Wegstrecken durch das Packungsmaterial ansonsten gleicher Moleküle führen zu einem Erreichen des Detektors zu unterschiedlichen Zeitpunkten  $\Rightarrow$  Peakverbreiterung (nicht relevant bei Kapillarsäulen)

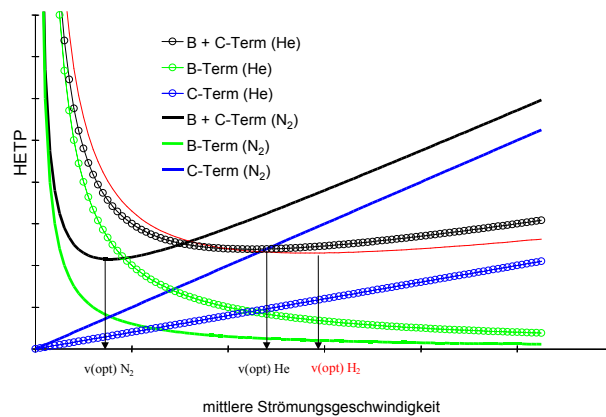
**Longitudinaldiffusion**  $\Rightarrow$  zufällige Bewegung der Moleküle (molekulare Diffusion) entlang der Säulenachse  $\Rightarrow$  Peakverbreiterung

**Massentransfer**  $\Rightarrow$  Gleichgewichtseinstellung an der Phasengrenze stationäre/mobile Phase benötigt Zeit  $\Rightarrow$  da die mobile Phase aber in Bewegung ist, kann sich der Gleichgewichtszustand nicht vollständig einstellen  $\Rightarrow$  Zunahme der Höhe eines theoretischen Bodens (HETP)



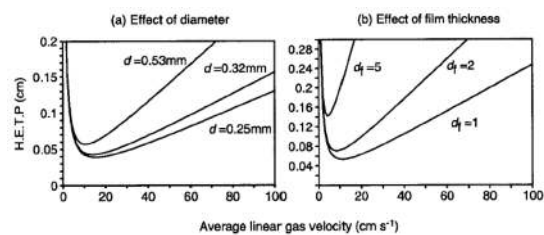
**Abb.** Beiträge der Eddy-Diffusion (A-Term), der Longitudinaldiffusion (B-Term) und des Massentransfers (C-Term) zum Kurvenverlauf der van-Deemter Funktion (schwarze Kurve)

- ⇒ Minimum der Funktion ⇒ optimale mittlere Geschwindigkeit der mobilen Phase (Effizienz der Trennung erreicht maximalen Wert)
- ⇒ zwei der Terme hängen mit dem Diffusionskoeffizienten der zu trennenden Substanzen in der Gasphase ab (B-Term und C-Term)



**Abb.** Einfluss des Trägergases auf die Form der Van-Deemter-Kurve (für Kapillarsäulen). Der niedrigere Diffusionskoeffizient der Komponenten in Stickstoff bewirkt einen geringeren Einfluss der Longitudinaldiffusion (B-Term) auf die Bodenhöhe mit steigender Trägergasgeschwindigkeit, aber verzögert auch die Geschwindigkeit der GG-Einstellung (C-Term)

- ⇒ die Höhe eines theoretischen Bodens der verschiedenen Trägergase vergleichbar, das Optimum ist für Helium und Wasserstoff aber zu höheren Strömungsgeschwindigkeiten verschoben ⇒ kürzere Analysenzeiten
- ⇒ das Optimum für He und H<sub>2</sub> ist "breiter" (geringere Abhängigkeit von HETP von  $v$ ) ⇒ Anforderung an die Genauigkeit der Strömungsgeschwindigkeit weniger ausgeprägt
- ⇒ He und H<sub>2</sub> ideale Trägergase (Nachteile: Kosten, Expositionsgefahr)



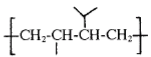
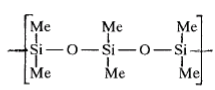
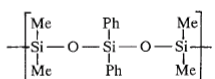
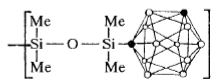
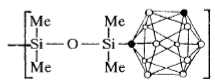
**Abb.** Einfluss des Kapillarsäulendurchmessers  $d$  und der Filmdicke  $d_f$  (in  $\mu\text{m}$ ) auf die Van-Deemter-Kurven

### Stationäre Phasen für Dünnsäulen

⇒ Duzende von unterschiedlichen stationären Phasen

Anforderungen an stationäre Phasen

- thermische Stabilität (Temperaturen bis zu 400°C)
- geringer Dampfdruck (geringes „Säulenbluten“)
- geringe Viskosität (schneller Massentransfer)
- gute Absorptionseigenschaften für die zu trennenden Substanzen

Stationary phase	Material	Structure
Squalan	Branched-chain alkane grease,	
OV101	Dimethyl silicone Dimethylpolysiloxane	
OV3	5% Phenyl dimethyl silicone Diphenylpolysiloxane	
OV17	50% Phenyl dimethyl silicone	
Dexil 300	Carborane dimethyl silicone	 ● = C, carbon, ○ = borane, B-H
Carbowax 20M	Polyethylene glycol	$\text{HO}-[\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}]_n-\text{H}$

Stationary phases usually **bonded** and/or **cross-linked**

• **bonding** - covalent linking of stationary phase to support

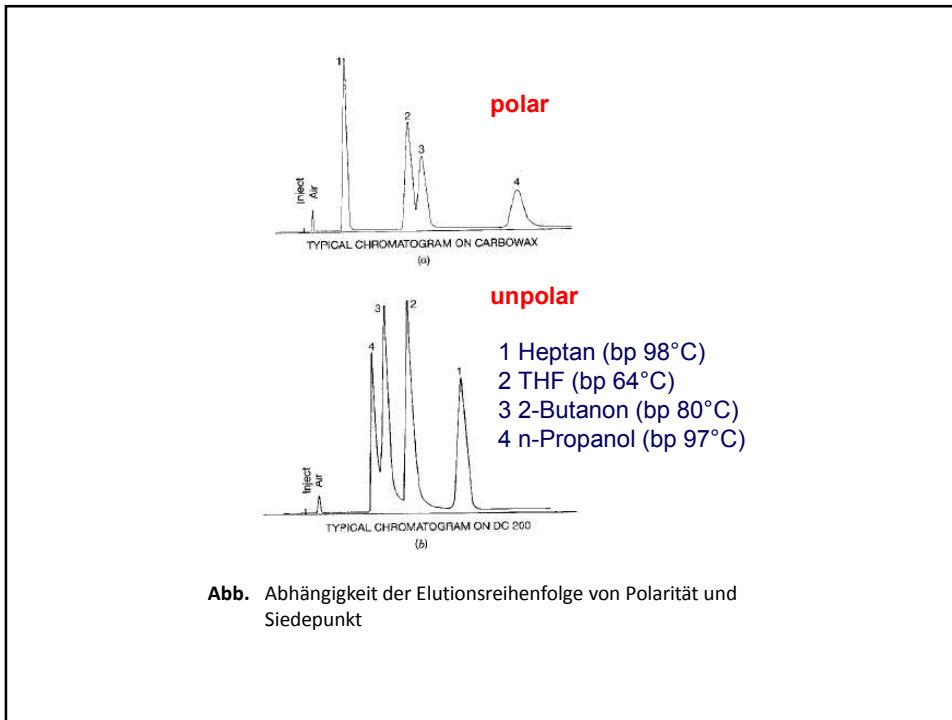
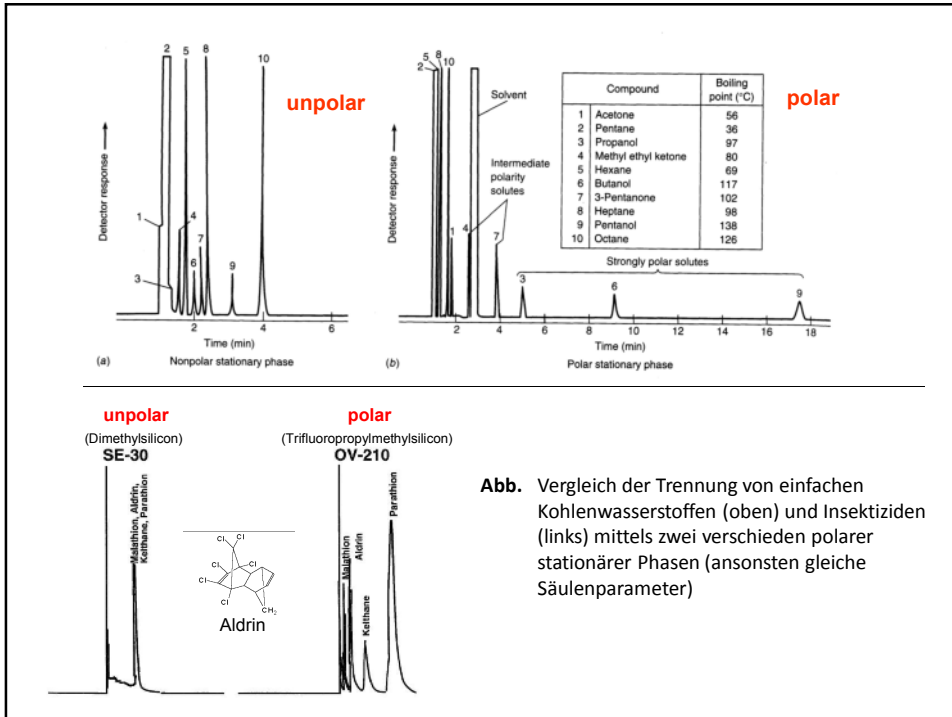
• **cross-linking** - polymerization reactions after bonding to join individual stationary phase molecules

**Tab.** Auswahl verschiedener Materialien für stationäre Phasen

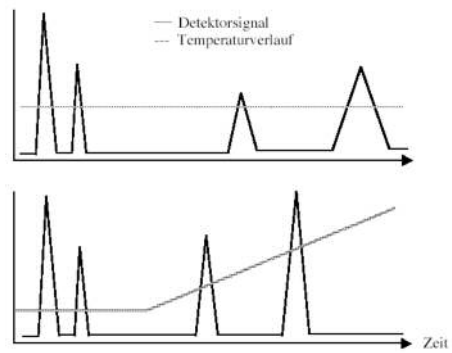
Wichtigste Faustregel bei der Auswahl der stationären Phase:

⇒ „Gleiches löst Gleiches“

⇒ polare Phasen für polare Analyten (und *vice versa*)



**Abb.** Temperatureinfluss auf die Trennung (am Beispiel der Alkantrennung)



**Abb.** Schematische Darstellung zum Zusammenhang von Peakbreite und Temperatur („Fahren von Temperaturprogrammen“)



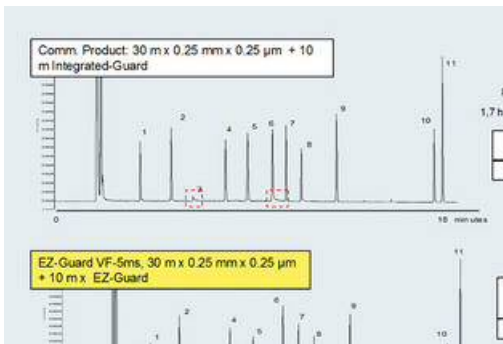
### Vorsäulen (unbeschichtete, deaktivierte Kapillaren) – Guard columns

Einsatz von Vorsäulen in der Gaschromatographie:

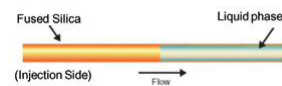
- Schutz der analytischen Säule vor Kontamination
- „on column“ Injektionen (Injektionen ohne Split, „retention gaps“)
- Fokussierung des Analyten

Verbindung von analytischer Kapillarsäule und externer Vorsäule - Kopplungsstücke (Quickseals/Pressfits, Single Ferrule- und Hochtemperatur-Säulenverbinder)

- Nachteil: Undichtigkeiten und hohes Gewicht, Bildung „aktiver Stellen“

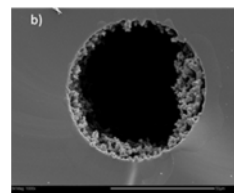


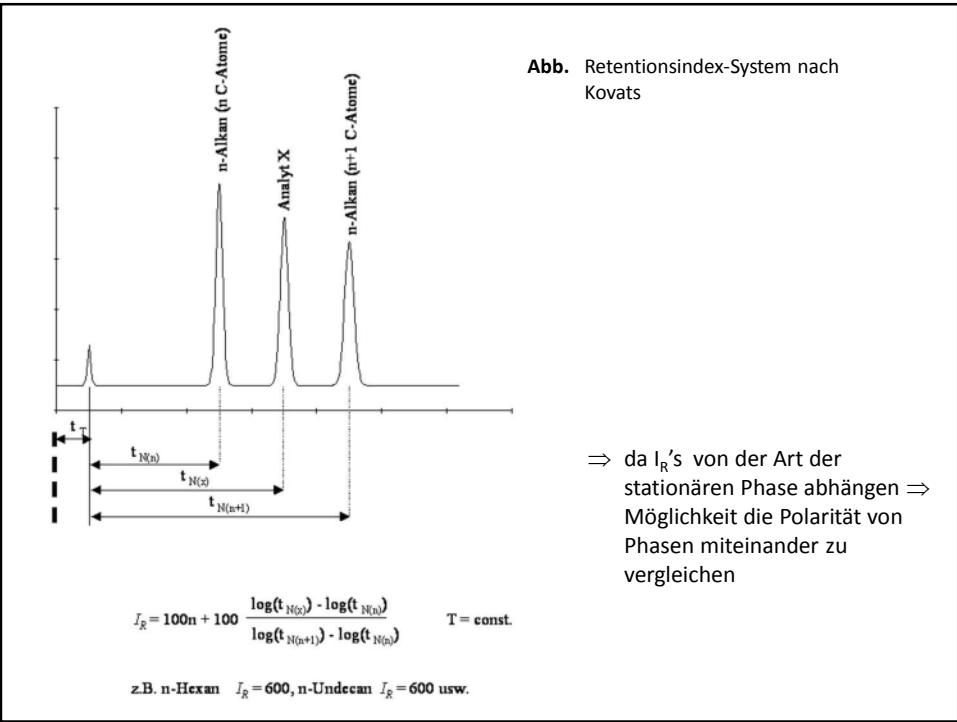
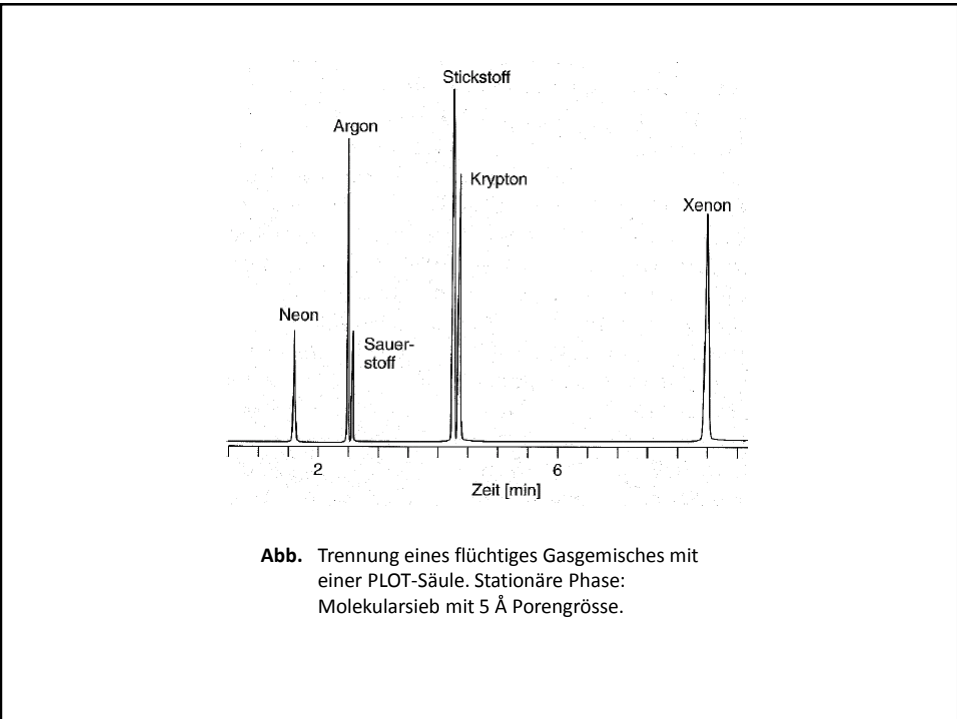
Entwicklung integrierter Guard columns



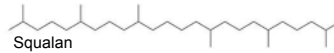
### Feste stationäre Phasen

- ⇒ Einsatz nur in speziellen Fällen, z.B. zur Analyse von sehr flüchtigen gasförmigen Substanzen, wie  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ , Halogene etc.
- ⇒ Adsorption der Analyten ⇒ an der Oberfläche der stationären Phase findet keine Diffusion in die stationäre Phase statt
- ⇒ feste Phasen ⇒ oft Molekularsiebe (poröses Aluminium-Silikat) oder Polymere mit gut definierten Porengrößen
- ⇒ gepackte oder Kapillarsäulen (PLOT)





## McReynolds-Konstanten



- **Squalan** kann nur Van-der-Waals (unpolare) Wechselwirkungen mit den Analyten eingehen
- andere (polare) Wechselwirkungen sind im Vergleich dazu **stärker**
- der Vergleich der Retention (RT) eines (polaren) Analyten auf einer gegebenen stationären Phase mit der RT auf einer Squalanphase reflektiert die zugrundeliegenden **zusätzlichen polaren WW**
- Die Stärke der intermolekularen WW hängen von der chemischen Funktionalität von Analyt und stationärer Phase ab – eine Klassifizierung durch (unterschiedliche funktionalisierte) **Referenzsubstanzen** bietet sich an
- **McReynolds Konstanten** ausgewählter Referenzsubstanzen messen den Grad der WW (*attractive interaction*) zwischen den Referenzsubstanzen (bzw. ihren chemischen Funktionalitäten) und der jeweiligen stationären Phase (Angabe der Differenz von RI (s.u.))

### Typical Characteristic Molecular Interaction

benzene	pi - type (aromatic, olefinic)
1-butanol	electron attracting effect (alcohols, nitriles, acids, nitro compounds, chloro compounds)
2-pentanone	dipole - dipole (ketones, aldehydes, ethers, epoxides, amino)
1-nitropropane	electron donating effect (nitro, nitrile)
pyridine	non bonding electron attraction (bases), H bonding capability

$$\Delta I = (I_{sp} - I_{squalane}) \text{ for the probe compound}$$

⇒ Angabe der **McReynolds-Konstanten** der 5 „Modellsubstanzen“ (Benzol, Butanol, 2-Pentanon, Nitropropan und Pyridin) von den Herstellern von GC-Säulen ⇒ Auswahlhilfe für stationäre Phasen

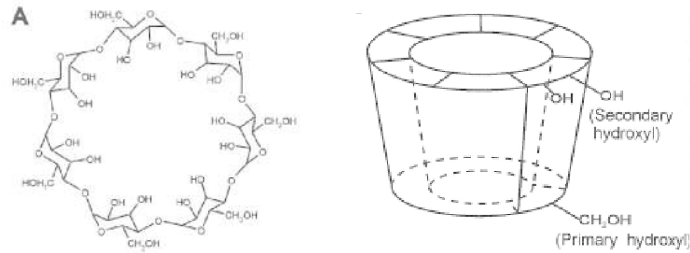
Stationary Phase	Probes*					Temp. Limits	
	Benz	Alc	Ket	N-Pr	Pyrid	Lower	Upper
Squalane	0	0	0	0	0	20	125
Apolane 87®	21	10	3	12	25	20	260
OV-1®	16	55	44	65	42	100	375
OV-101®	17	57	45	67	43	20	375
Dexsil 300®	41	83	117	154	126	50	450
OV-17®	119	158	162	243	202	20	375
Tricresylphosphate	176	321	250	374	299	20	125
QF-1	144	233	355	463	305	0	250
OV-202® and OV-210®	146	238	358	468	310	0	275
OV-225®	228	369	338	492	386	20	300
Carbowax 20M®	322	536	368	572	510	60	225
DEGS	492	733	581	833	791	20	200
OV-275®	629	872	763	1106	849	20	275

\* Benz = Benzene  
 Alc = n-Butanol  
 Ket = 2-Pentanone  
 N-Pr = Nitropropane  
 Pyrid = Pyridine

**Tab.** IR-Werte der 5 Modellsubstanzen auf verschiedenen stationären Phasen

### Chirale Phasen

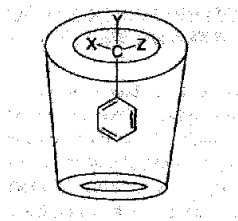
- ⇒ auch optische Isomere können durch Verwendung chiraler Phasen getrennt werden, z.B. durch Einsatz von Cyclodextrin-Phasen
- ⇒ cyclische Oligosaccharide aus 6 – 12 Glucoseeinheiten
- ⇒  $\alpha$ -Cyclodextrin (6 Einheiten),  $\beta$ -Cyclodextrin (7),  $\gamma$ -Cyclodextrin (8)



- ⇒ konusförmige Käfigstruktur mit relativ hydrophoben Innenseite
- ⇒ unterschiedliche Wechselwirkung mit optischen Isomeren

ORpak CDA-453 HQ	ORpak CDB-453 HQ	ORpak CDC-453 HQ
$\alpha$ -CD derivative	$\beta$ -CD derivative	$\gamma$ -CD derivative

**Abb.** Unterschiedliche Cyclodextrine erlauben die Anpassung an unterschiedlich große Analytmoleküle

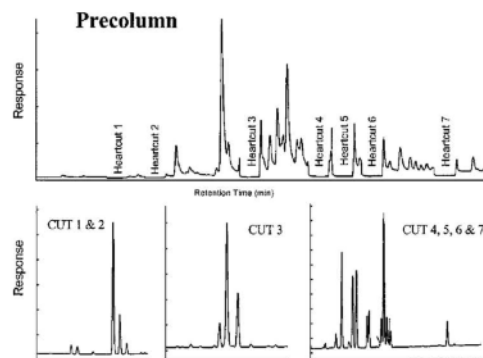
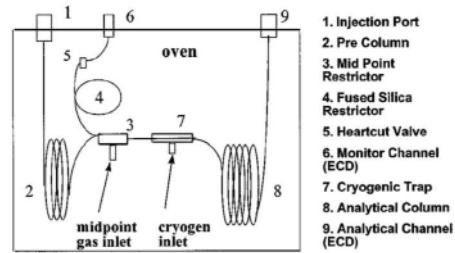


**Abb.** Schematische Darstellung eines hydrophoben Einschlußkomplexes mit einem chiralen Analytmolekül

### Klassische 2-dimensionale Gaschromatographie (Heartcut-Technik)

⇒ Überführen einer Komponente auf eine zweite Säule („Schneiden“)

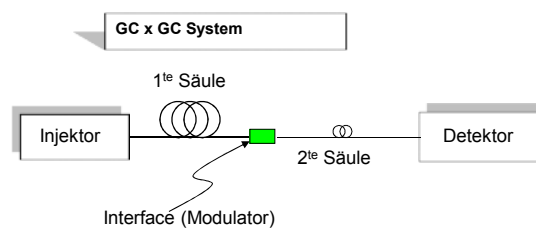
⇒ Anwendungen:  
 z.B. Trennung eines komplexen Kohlenwasserstoffgemisches auf Säule 1  
 ⇒ Überführen einer Komponente auf eine chirale Säule ⇒  
 Trennung der optischen Isomere



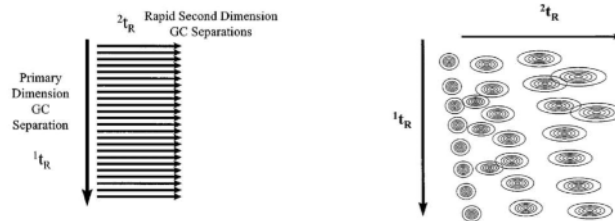
**Abb.** 2-dimensionale GC einer PCB-Mischung, 1.te Kapillarsäule 25m, 2.te Kapillarsäule 50 m (Marriott und Kinghorn, 1998)

### **GC×GC (*Comprehensive 2-dimensional GC*)**

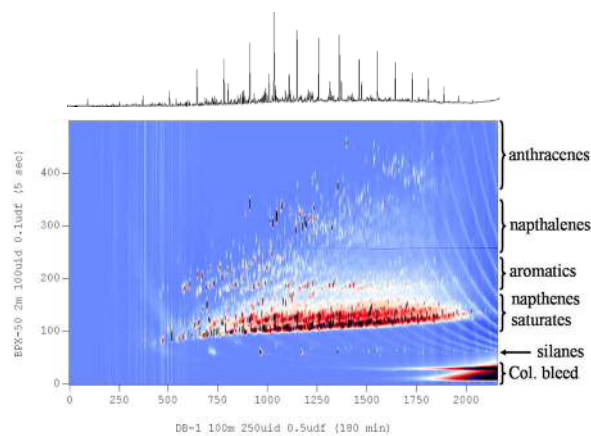
- ⇒ Überführen eines definierten Retentionszeitintervalls (3-10 Sekunden) von Säule 1 (lang, kleines  $\beta$ , Phase 1) auf ein gekühltes Interface (Modulator)
- ⇒ Funktion des Modulators: Fokussierung der Komponenten gefolgt von schneller Injektion in die 2te Säule (cyclisch alle 3-10 s)
- ⇒ 2te Säule (kurz, großes  $\beta$ , Phase 2) ⇒ schnelle Chromatographie (entsprechend der Intervallzeit)



- ⇒ „Zerlegen“ des ersten Chromatogramms



**Abb.** Schematische Darstellung einer GC×GC Trennung (orthogonale Chromatographie)



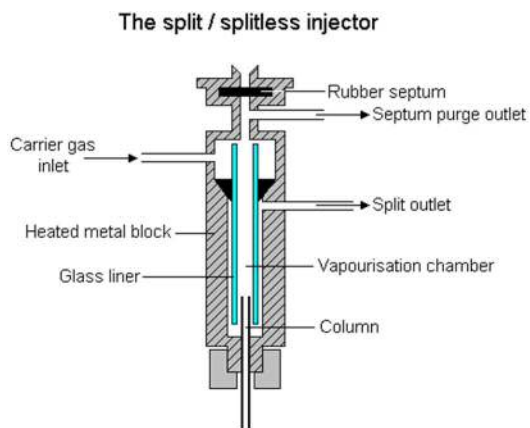
**Abb.** GC×GC Trennung eines Dieselöls (ca. 5000 Komponenten)

⇒ Voraussetzung für GC×GC Trennungen ⇒ sehr schnelle Detektoren

## GC Injektoren (I)

**Direktinjektion** ( $T_{\text{injektor}} > T_{\text{GC-Ofen}}$ ) mittels Mikroliterspritzen

Injektionsvolumen 0.001  $\mu\text{L}$  bis einige  $\mu\text{L}$  (abhängig von Injektionsmodus und Säule)



## GC Injektoren (II)

### Split-Splitless Injektoren

**Split Injektion:** Routine Methode

0.1-5 % der Probe wird auf die Säule überführt, der Rest über das Splitventil verworfen (Aktivkohle)

**Splitless Injektion:**

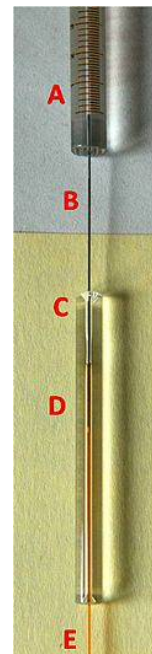
die gesamte Probe wird auf die Säule überführt (potentiell bessere NWG, Gefahr der Überladung)

### On-Column Injektoren

die Probe wird flüssig direkt in den Säulenanfang (On-Column) überführt, oft ohne den Injektor zu heizen (bzw nur gering zu heizen). Meist liegt die Temperatur des Injektors und der Säule unterhalb des Siedepunkts des Lösungsmittels.

Die Analyten werden am Säulenanfang konzentriert  $T_{\text{injektor}} < T_{\text{B(Lsgm.)}}$

Folge: keine/geringere Diskriminierung von hochsiedenden Komponenten und keine Zersetzung von instabilen Verbindungen bei hohen Temperaturen (aber Gefahr der Überladung, schwierige Injektion (Nadeldurchmesser < als Säulennendurchmesser))

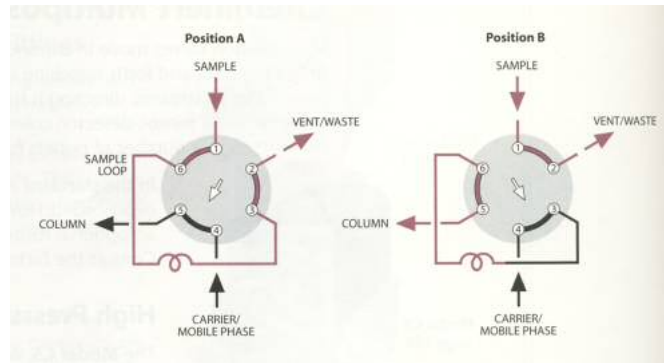




### GC Injektoren (III)

#### Injektion über Probenschleife (6-Wege Ventil) (rotary valve)

- Analyten (z.B. Kohlenwasserstoffe) in der Gasphase
- LC



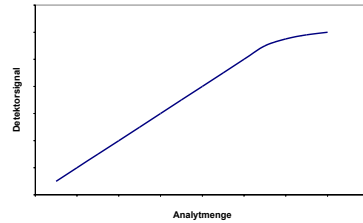
### Detektoren für die GC

Gaschromatographischer Detektor	Kurzbezeichnung	Komponenten
Wärmeleitfähigkeitsdetektor	WLD	z.B. Permanentgase
Flammenionisationsdetektor	FID	Kohlenwasserstoffe
Stickstoff-Phosphor-Detektor	FID-NP	N- und P-haltige Verbindungen
Elektroneneinfangdetektor	ECD	halogenhaltige Substanzen
Photoionisationsdetektor	PID	Aromaten, Alkene
Infrarotdetektor	IR	z.B. sauerstoffhaltige Verbindungen
Massenspektrometer	MS	universell

⇒ GC-Detektoren sind Messinstrumente, die Eigenschafts-unterschiede zwischen Probenkomponenten und Trägergas messen und diese Informationen in elektrische Signale umwandeln

wichtige Parameter zur Beschreibung von Detektoreigenschaften sind:

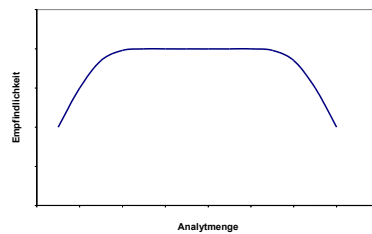
### Empfindlichkeit



⇒ als Detektorempfindlichkeit bezeichnet man das Verhältnis von Ausgangssignal zu Probemenge. Trägt man das Messsignal über der Analytmenge auf, dann entspricht die Steigung der Kurve der Empfindlichkeit (je steiler die Kurve ist, umso empfindlicher spricht der Detektor an)

### Dynamischer Bereich

⇒ Bereich, für den die Empfindlichkeit des Detektors unabhängig ist von der Analytmenge ist (Angabe üblicherweise in Zehnerpotenzen (z.B.  $10^4$ ))



### **Selektivität**

Ansprechverhalten des Detektors auf unterschiedliche Verbindungen (z.B. elementselektiv, selektiv für funktionelle Gruppen (z.B. Carbonylfunktion))

### **Zeitauflösung**

Zeitliches Ansprechverhalten des Detektors (Messfrequenz)

### ***Konzentrationsabhängige Detektoren:***

⇒ Signalthöhe hängt nicht nur von der Masse an Substanz im Detektor ab, sondern auch von dem betreffenden Volumen an Trägergas im Detektor (z.B. WLD, ECD, IR)

### ***Massenabhängige Detektoren:***

⇒ Höhe des Signals hängt nur von der absoluten Masse des Analyten ab (FID, MS)

$$S = f_E \cdot \frac{m}{V}$$

*konzentrationsabhängig*

$S$  Signalthöhe

$m$  Masse an Komponente

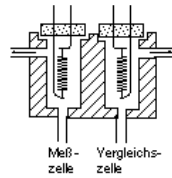
$$S = f_E \cdot m$$

*massenabhängig*

$f_E$  Empfindlichkeit

$V$  Volumen

### Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD)

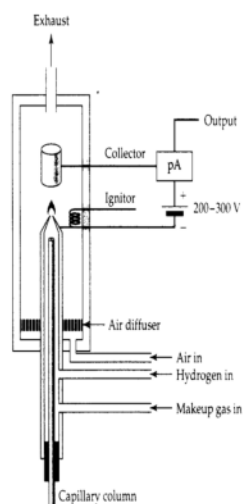


⇒ differentielle Messung (MZ, VZ) der Wärmeleitfähigkeit des Trägergases (Messung des elektrischen Widerstandes der beiden Heizdrähte (Wheatstonsche Brückenschaltung))

Abb. WLD

- ⇒ **Vorteile:** einfacher Detektor, zerstörungsfreie Detektion, großer dynamischer Bereich ( $\sim 10^5$ )
- ⇒ **Nachteil:** vergleichsweise hohe NWG
- ⇒ Helium oder Wasserstoff als Trägergas

### Flammenionisationsdetektor (FID)

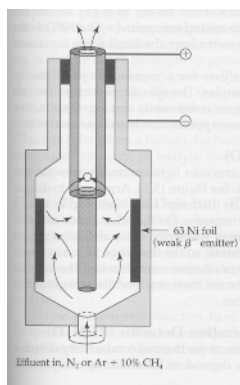


- ⇒ Verbrennen der Komponenten in einer Wasserstoffflamme
- ⇒ bei der Verbrennung von organischen Substanzen entstehen Ionen und Elektronen

z.B.  $\text{CH} + \text{O} \rightarrow \text{CHO}^+ + \text{e}^-$

- ⇒ zwischen Brennerende und einer Sammelelektrode wird eine Spannung von einigen hundert Volt angelegt ⇒ Messung des resultierenden Stroms
- ⇒ **Vorteile:** sehr empfindlich für Kohlenstoffverbindungen, großer dynamischer Bereich ( $\sim 10^7$ ), robust
- ⇒ **Nachteil:** Brenngase notwendig, Zerstörung der Analyten
- ⇒ alle Trägergase

#### Elektroneneinfangdetektor (ECD, *electron capture detector*)



- ⇒ ein mit  $^{63}Ni$  beschichtetes Blech dient als  $\beta$ -Strahlenquelle
- ⇒ durch die  $\beta$ -Strahlung wird zunächst das Trägergas (Argon mit 10% Methan) ionisiert. Dabei entstehen langsame Elektronen, die durch die Sammelelektrode (Anode) eingefangen werden. Solange keine Verbindungen in den Detektor gelangen, die mit den langsamen Elektronen reagieren können, bleibt der Strom konstant (Nullstrom)

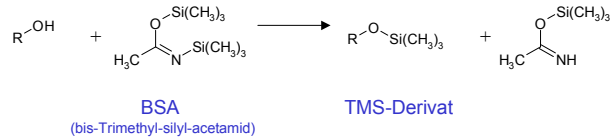
- ⇒ kommen mit dem Trägergas auch Moleküle in den Detektor, die Elektronen einfangen können, gelangen weniger Elektronen zur Sammelelektrode. Diese Änderung liefert den Signalstrom.
- ⇒ **Vorteile:** sehr empfindlich für Verbindungen mit elektro-negativen Gruppen (insbesondere Halogenverbindungen)
- ⇒ **Nachteil:** rel. kleiner dynamischer Bereich ( $10^2$ - $10^3$ )
- ⇒ neuere Systeme arbeiten mit gepulstem Potential um bei konstantem Strom zu messen (*pulsed constant current*) ⇒ kein Analyt im Detektor ⇒ niedrige Pulsfrequenz zur Erhaltung des Stroms ⇒ elektroneneinfangende Substanzen im Detektor ⇒ höhere Frequenz zur Erhaltung des Stroms
- ⇒ dynamischer Bereich  $\sim 10^5$

### **Derivatisierung**

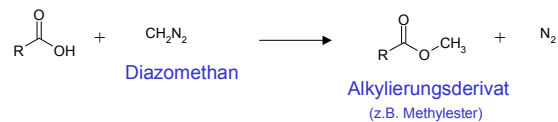
- ⇒ Prozess zur chemischen Modifizierung der Analyten mit dem Ziel diese gaschromatographisch trenn- und detektierbar zu machen:
  - ⇒ Erhöhung der Flüchtigkeit (z.B. Carbonsäuren, Zucker)
  - ⇒ Verbesserung des chromatographischen Verhaltens oder der Detektierbarkeit (insbesondere für ECD)
- Strategie zur Erhöhung der Flüchtigkeit:
- ⇒ Eliminierung von polaren OH, NH und SH-Gruppen

### Silylierung

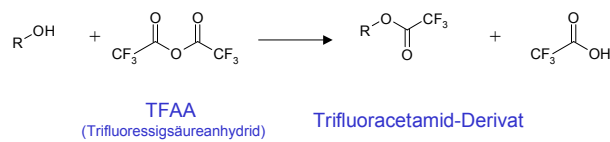
⇒ aktive Wasserstoffatome werden durch eine Trimethylsilylgruppe ersetzt, z.B. Alkohole:



### Alkylierung z.B. Carbonsäuren:



### Acylierung (Übertragung einer R-CO-Gruppe, oft CF<sub>3</sub>-Gruppen)



### Olfaktometrische Detektion

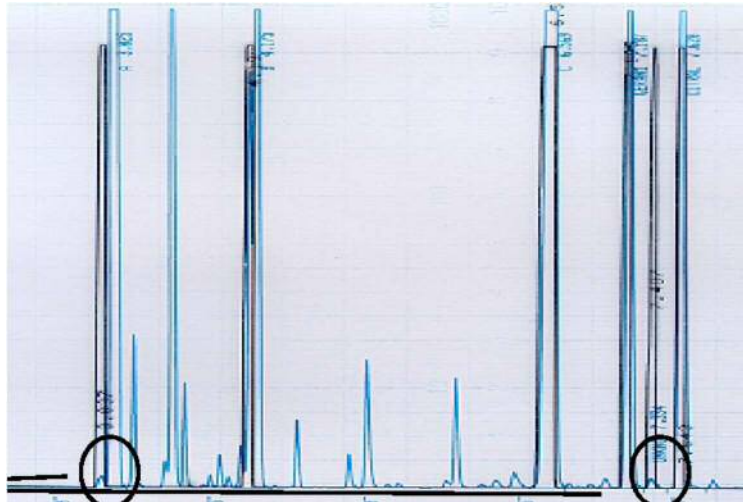
⇒ Nutzung der menschlichen Nase als Detektor

**Nachteile:** für die meisten Substanzen sehr unempfindlich, nicht quantitativ, schlecht reproduzierbar


**Vorteil:** selektiv für geruchsintensive Verbindungen



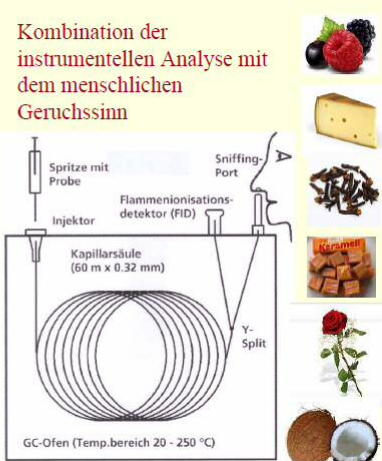
⇒ Einsatzgebiete: Parfüm- und Nahrungsmittelindustrie



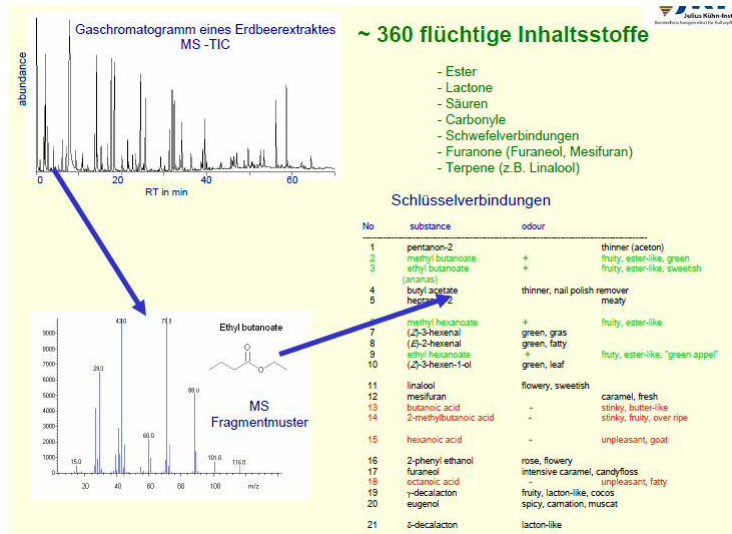
**Abb.** Analyse eines Citrusöls. Übereinandergelegte Chromatogramme eines FID (blau) und mittels eines Olfaktometers erhaltenen Chromatogramms (schwarz). ⇒ deutliche Unterschiede speziell für die markierten Signale (Ceranial, Citral)



### Kombination der instrumentellen Analyse mit dem menschlichen Geruchssinn



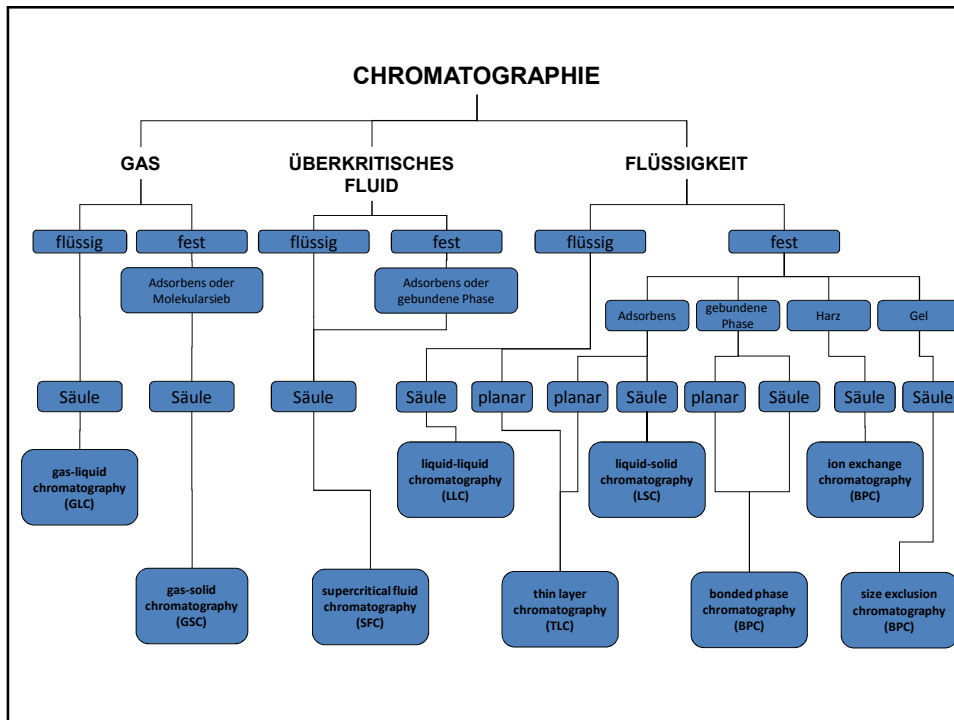




# Trenntechniken

## Flüssigchromatographie

---



**Flüssigchromatographie (LC, Liquid Chromatography)**

HPLC (High Performance (or Pressure) Liquid Chromatography)

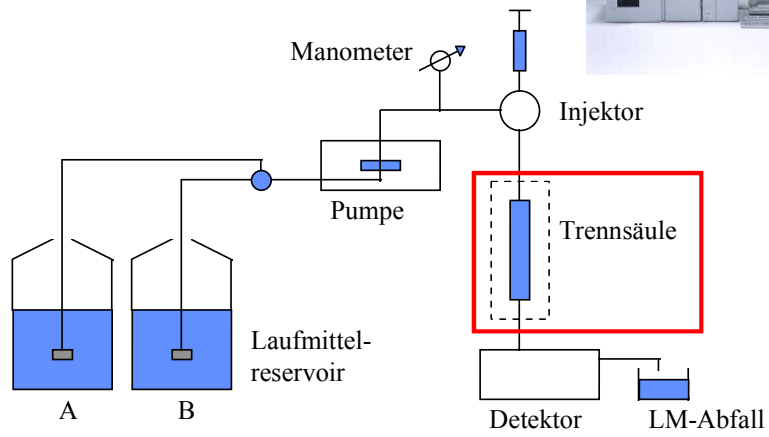
Name	Trennprinzip
Normalphasen-HPLC -	Adsorption (und Verteilung)
Umkehrphasen-HPLC -	Verteilung (und Adsorption)
Hydrophilic Interaction LC	Verteilung (und Adsorption)
Grössenausschluss-Chrom.	Grössenausschluss
Ionenchromatographie	Ionische Wechselwirkung
Affinitätschromatographie	Bindungsaffinität (nicht-kovalente Bindungen)
Chirale Chromatographie	Bildung und Trennung von Diastereomeren

Dünnschichtchromatographie (TLC, Thin-Layer Chromatography)

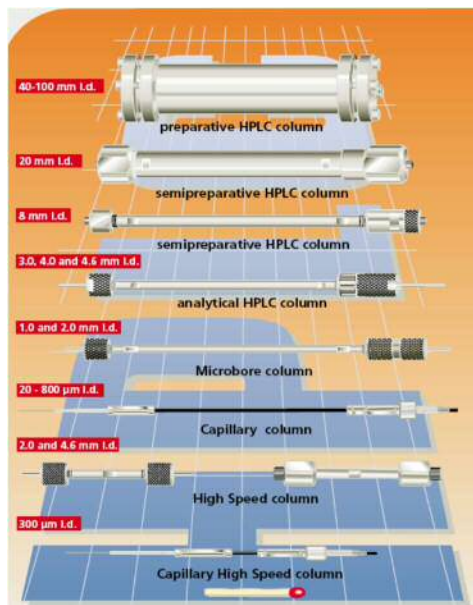
Kapillar-Elektrophorese (CE)

→CE ist streng genommen keine Chromatographie

**Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)**  
**High Pressure Liquid Chromatography**  
**High Performance Liquid Chromatography**



**Trennsäulen**



Unterschiede zur Gaschromatographie:

- Selektivität hängt nicht nur von der stationären Phase ab sondern auch von der mobilen Phase (Laufmittel, Eluent)
- Stofftransport in flüssiger Phase ist deutlich langsamer (kleinere Diffusionskoeffizienten)
- bei der GC nur Trennung von Substanzen, die sich bis ca. 400°C unzerstört verdampfen lassen

#### Adsorptionschromatographie

Adsorptionschromatographie = Trennung beruht auf der unterschiedlich starken Adsorption der Analytmoleküle an die Oberfläche einer festen stationären Phase. Dies ist das wesentliche Trennprinzip der Normalphasen-LC (normal phase liquid chromatography = NPLC), wo meist Kieselgelpartikel als stationäre Phase eingesetzt werden, an welche Analytmoleküle aufgrund ihrer Polarität unterschiedlich stark adsorbieren. Die Trennung erfolgt also gemäss der Polarität der Moleküle.

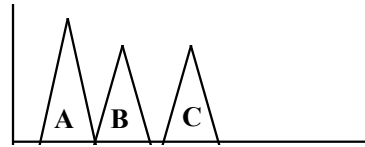
#### Verteilungschromatographie

Verteilungschromatographie = Trennung beruht auf der Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen. Bei der Umkehrphasen-LC (reversed phase liquid chromatography = RPLC) werden an Kieselgelpartikel chemisch gebundene stationäre Phasen verwendet (z.B. Alkylketten). Im Gegensatz zur NPLC ist hier die stationäre Phase apolar bzw. hydrophob, weshalb die Moleküle in umgekehrter Elutionsreihenfolge nach Polarität bzw. nach ihrer Hydrophobizität getrennt werden.

Polarität der Analyten:

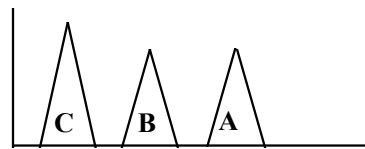
$$A < B < C$$

z.B. **A** Alkan,  
**B** Monoalkohol  
**C** Dialkohol



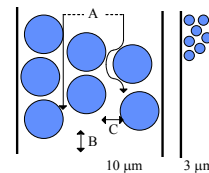
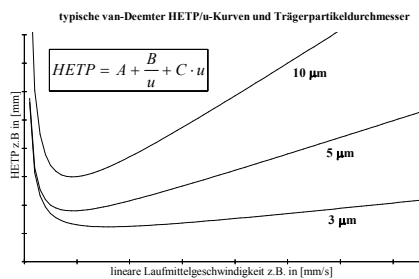
Retentionszeit →

Normalphasen-Chromatographie



Retentionszeit →

Umkehrphasen-Chromatographie



van-Deemter Gleichung:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

- A = Einfluss der Streudiffusion (Eddy-Diffusion) auf die Signalverbreiterung, strömungsunabhängiger Term, abhängig von der Art des Korns und der Packung
- B = Einfluss der axialen molekularen Diffusion auf die Signalverbreiterung, bei der LC von geringerer Bedeutung als bei der GC (kleinere Diffusionskoeffizienten)
- C = Term der nicht optimalen Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes (endliche Geschwindigkeit des Massenüberganges)

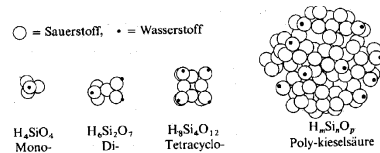
**A & C sehr wichtig bei der LC**  
**A ⇒ Wegunterschiede;**  
**C ⇒ kleinere Diffusionskoeffizienten**

⇒ kleinere Korngrößen vorteilhaft

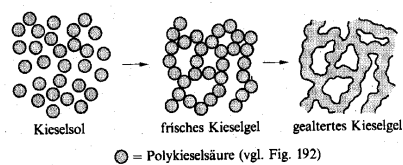
## Stationäre Phasen

### Silicagel (Kieselgel)

⇒ Stationäre Phase und insbesondere Trägermaterial für chemisch gebundene stationäre Phasen i.d. HPLC



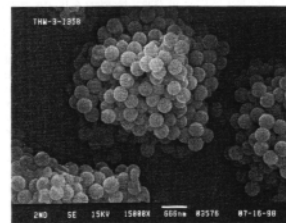
**Abb.** Veranschaulichung der Kondensation von Mono- zu Polykieselsäure (Bildung von Kieselgel-Partikeln)(aus: Hollemann/Wiberg)

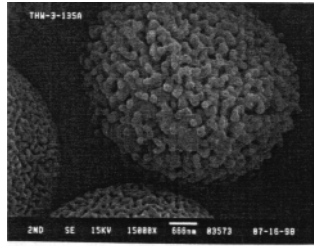


**Abb.** Bildung der Porenstruktur von Kieselgel-Partikeln (aus: Hollemann/Wiberg)

### Eigenschaften

- ⇒ vergleichsweise einfacher Herstellungsprozess (auch monodisperse Partikel)
- ⇒ große spezifische Oberfläche (Porosität – Porenstruktur und –größe durch Zugabe von Porogenen steuerbar)
- ⇒ inert gegenüber polaren und unpolaren Lösungsmitteln (z.B. kein Quellen)
- ⇒ Druckstabilität
- ⇒ einfache chemische Modifizierung der Oberfläche

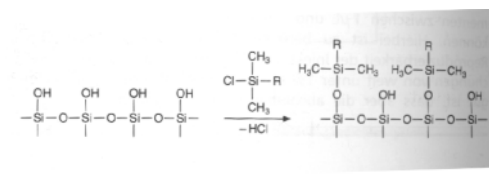




**Abb.** Mikroskopische Aufnahmen von Kieselgel-Partikeln für die HPLC

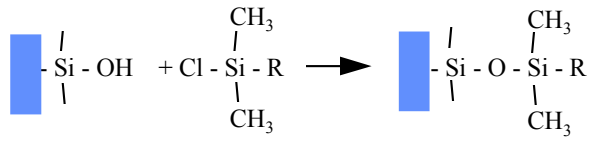
- ⇒ poröse, sphärische Mikropartikel mit Durchmessern oft < 5  $\mu\text{m}$  mit chemisch gebundenen Phasen
- ⇒ neben chemisch modifizierten Kieselgelen selten auch andere Trägermaterialien/stationäre Phasen ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ), poröse, graphitisierte Kohlenstoffpartikel oder Partikel auf Polymerbasis
- ⇒ erlauben Trennungen auch bei extremen pH-Werten (z.B. RP-C18-Säule pH zwischen 2 und 8 notwendig)

### Chemisch gebundene Phasen



**Abb.** Chemische Modifizierung von Kieselgel mit Alkyldimethylchlorosilanen

- ⇒ unterschiedliche Funktionalitäten
- ⇒ unterschiedliche Polaritäten



chemisch-gebundene Phasen

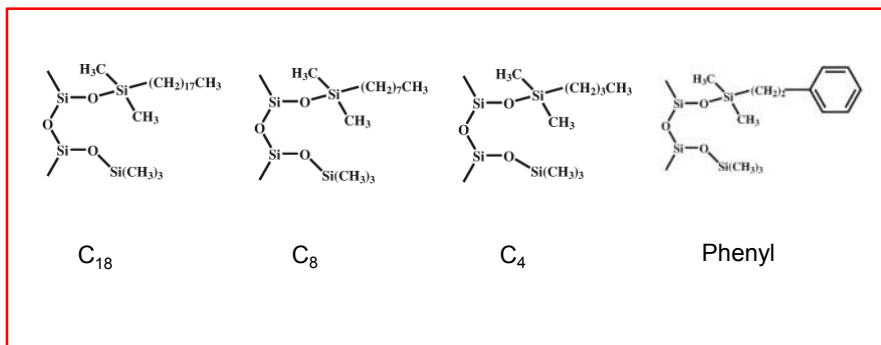
**Normalphasen**

- R =  $-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$  (Cyanopropyl-)  
 $-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$  (Diol-)  
 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  (Amino-)

**Umkehrphasen**

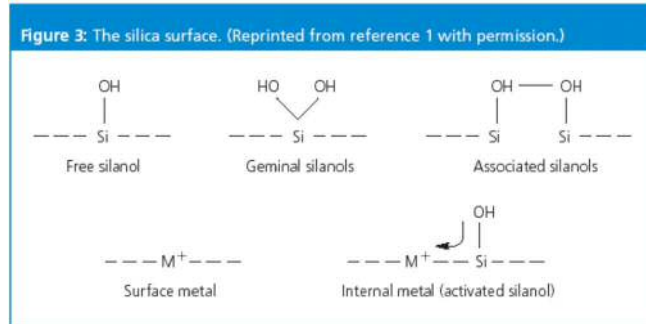
- R =  $-(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$  (n-Butyl-)  
 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$  (n-Octyl-)  
 $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$  (n-Octadecyl-)

Die Klassiker der Umkehrphasenchromatographie





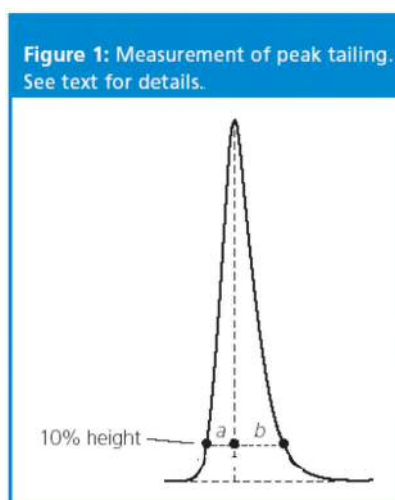
Aus sterischen Gründen verbleiben auch nach chemischer Modifizierung noch freie Silanolgruppen auf der Kieselgeloberfläche



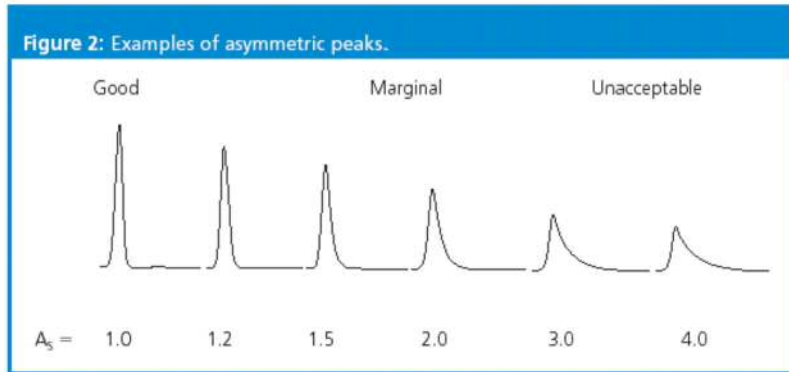
**Abb.** Freie Silanolgruppen und Metallspuren an der Kieselgeloberfläche ⇒ Wechselwirkung mit Analyten (aus: LC-GC Europe)

⇒ als polare, aktive Zentren wechselwirken diese anders mit den Analyten als die eigentlichen stationären Phasen, d.h. mehr als ein Retentionsmechanismus wirkt auf die Analyten

Folge: Peak tailing

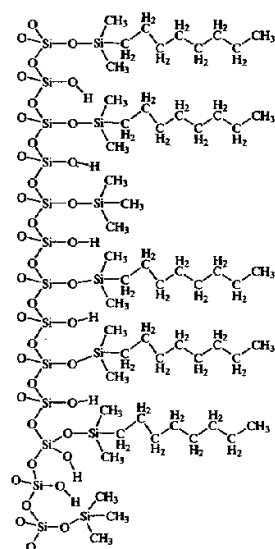


**Abb.** der Asymmetriefaktor  $A_s = b/a$  (aus: LC-GC Europe)

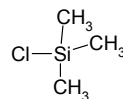


**Abb.** Peak Tailing  $\Rightarrow$  Beschreibung durch Angabe des Asymmetriefaktors (aus: LC-GC Europe)

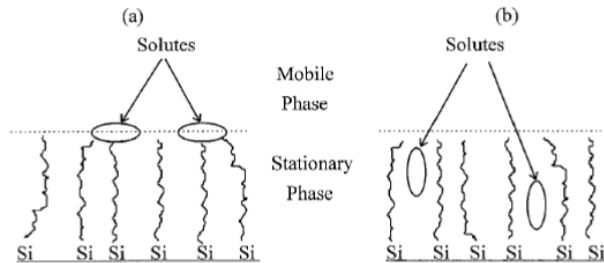
$\Rightarrow$  Verbesserung durch sogenanntes *End-Capping*



**Abb.** Beseitigung aktiver Oberflächenzentren durch *End-Capping* (üblicherweise durch Umsetzen mit Trimethyl-chlorsilan (unten) nach dem Binden der eigentlichen stationären Phase)



⇒ Umkehrphasen-Chromatographie mit chemisch gebundenen Phasen dominieren heutige HPLC Anwendungen



⇒ typische Säule z.B.: Länge 25cm, i.D. 4mm, 5µm Trägermaterial (Kieselgel), C<sub>18</sub>-Phase

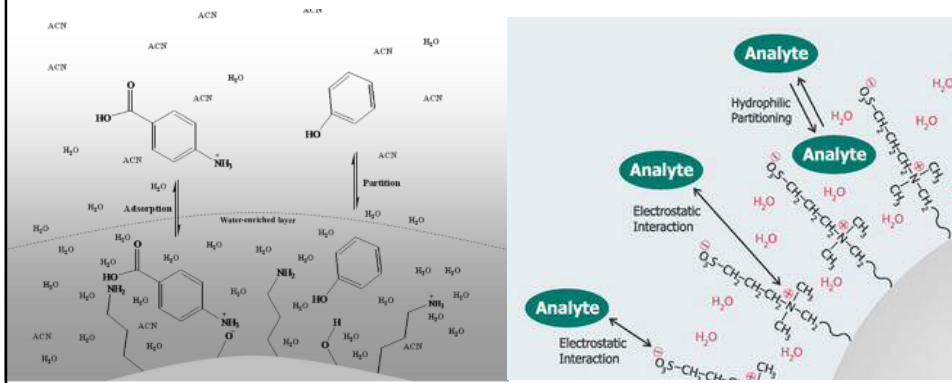
Frage: Was passiert mit sehr polaren Molekülen ?

### HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

(Hydrophile Interaktionschromatographie)

Trennung von polaren, hydrophilen Analyten unter Verwendung von LC-MS Kompatiblen Lösungsmitteln

Prinzip: polare stationäre Phase (z.B. zwitterionisches-Material (s. Abb. unten)) und relativ unpolare mobile Phase (Acetonitril/Wasser)  
 - zur RP-Chromatographie komplementäre Technik (Elution der unpolaren zuerst)  
 - gewährleistet eine deutliche Retention von allen Substanzen, welche auf RP-Materialien kaum oder gar nicht retardiert werden, die also in der Nähe der Totzeit der Säule eluieren



## HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

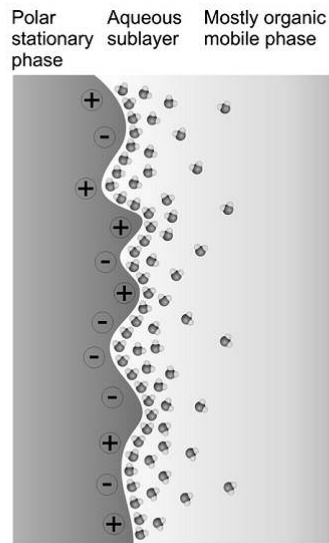


Fig. 9. Schematic picture of an adsorbed diffuse water layer at the surface of a polar stationary phase in highly organic environment.

### Mobile Phasen

#### Auswahlparameter:

- ⇒ Balance der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Analyt und den beiden Trennphasen
- Polarität der stationären Phase ~ Polarität der Analyten (**Kapazitätsfaktor  $k'$**  zwischen 2 und 5)
- Polarität der mobilen Phase ⇒ elutrope Reihe

Lösungsmittel	Polaritätsindex P' (nach Snyder)	Viskosität 25°C [mPa s]	UV cutoff [nm]
Heptan	0.2	0.4	195
Butanol	3.9	2.6	210
Dioxane	4.8	1.2	215
Methanol	5.1	0.54	205
Acetonitril	5.8	0.34	190
Wasser	10.2	0.89	187

zunehmende Elutionsstärke  
bei Normalphasen-Chrom.

zunehmende Elutionsstärke  
bei Umkehrphasen-Chrom.

Tab. Eigenschaften einiger gebräuchlicher Laufmittel

- Polaritätsindex  $P'$   $\Rightarrow$  numerisches Maß der relativen Polarität von Lösungsmitteln
- durch Mischen von geeigneten Lösungsmitteln  $\Rightarrow$  Einstellung beliebiger  $P'$
- wichtig: Entgasung der Lösungsmittel

$\Rightarrow$  entweder **isokratisch** (gleichbleibende Lösungsmittelzusammensetzung) oder unter Einsatz eines **Lösungsmittelgradienten**

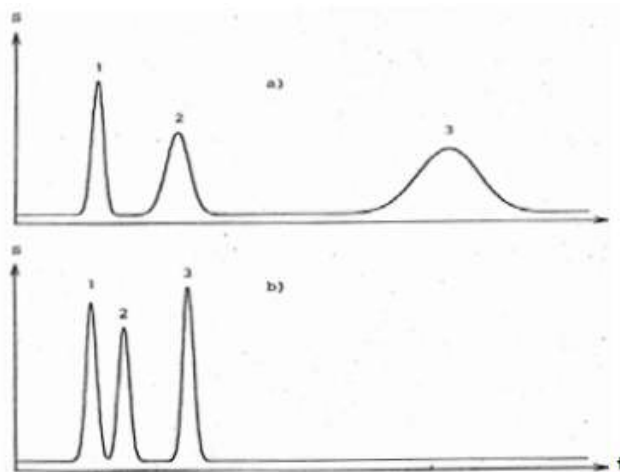
#### Niederdruckgradienten

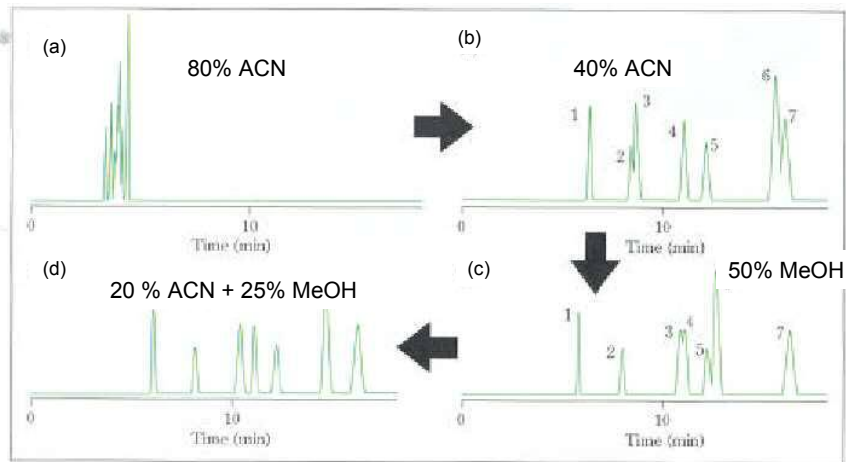
$\Rightarrow$  Lösungsmittel werden von Dosierpumpen in eine Mischkammer befördert und gemischt  
 $\Rightarrow$  eine Hochdruckpumpe saugt die Mischung an und pumpt sie in die Trennsäule (**Vorteil:** preisgünstiger)

#### Hochdruckgradienten

$\Rightarrow$  Lösungsmittel werden jeweils von einer Hochdruckpumpe in die Mischkammer befördert (Mischung findet auf der Hochdruckseite statt)  
**(Vorteil:** geringere Verzögerung zwischen Herstellung der Mischung und Einspeisung)

$\Rightarrow$  entweder **isokratisch** (gleichbleibende Lösungsmittelzusammensetzung) oder unter Einsatz eines **Lösungsmittelgradienten**





Systematische Entwicklung einer HPLC-Methode (RP)

(a) anfängliches Trennergebnis mit 80% Acetonitril / H<sub>2</sub>O, (b) mit 40% Acetonitril / H<sub>2</sub>O,

(c) 50% Methanol / H<sub>2</sub>O

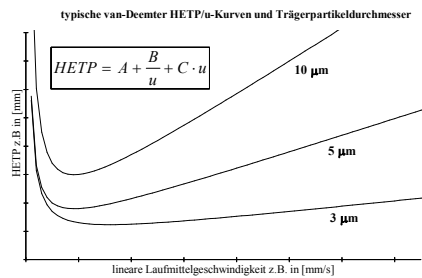
(d) 20% Acetonitril / 25% Methanol / H<sub>2</sub>O

### Verbesserung der Effizienz von HPLC-Trennungen

Der Partikeldurchmesser spielt eine erhebliche Rolle für die theoretische Bodenhöhe

Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung maßgeblich (van Deemter)  
Diffusion dauert bei großen Partikeln lange.

→ kleinere Partikel verbessern die Effizienz



**Drei Möglichkeiten werden von Entwicklern zur Lösung des Problems herangezogen:**

- 1) Herstellung druckfester Materialien und Geräte (bis 1000 bar) erlaubt Verwendung von 1,7µm Partikeln bei schnellen Flussraten

→ UHPLC (*Ultra High Performance LC*)

aber auch (Herstellerabhängig):

*RRLC: Rapid Resolution Liquid Chromatography*  
*RSLC: Rapid Separation Liquid Chromatography*  
*UFLC: Ultra Fast Liquid Chromatography*  
*UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography*

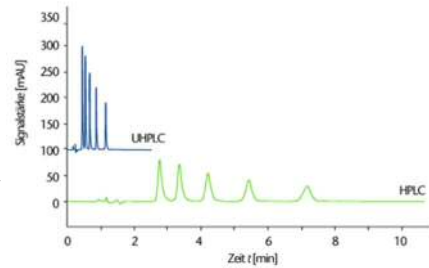
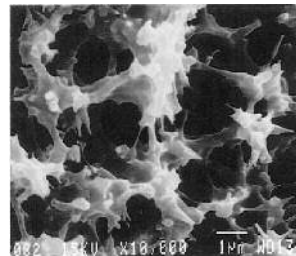
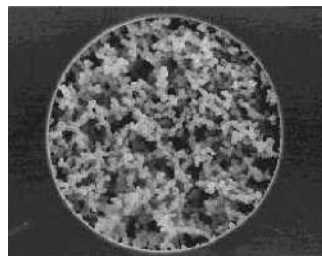


Abb. Vergleich die Trennung eines Benzoessäureester-Gemisches mithilfe von UHPLC und HPLC.

**Drei Möglichkeiten werden von Entwicklern zur Lösung des Problems herangezogen:**

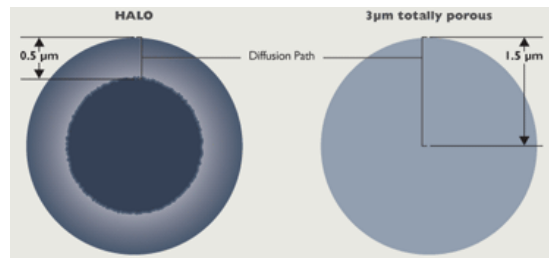
- 2) **monolithische Säulen** (siehe oben) → z.B. Merck



⇒ geringerer Druckabfall als bei gepackten Säulen aber höhere Probenkapazität als offene Kapillarsäulen

Drei Möglichkeiten werden von Entwicklern zur Lösung des Problems herangezogen:

### 3) Fused Core Technologie



(HALO® von Advanced Material Technology oder Supelco)

Poröse Silika Schicht wird auf nicht porösem Träger-Kern aufgebracht. Kern Durchmesser 2µm, 0,5 µm poröse Schicht

→ Trenneffizienz wie sub 2µm Partikel, Rückdruck wie 3µm Partikel

### Mikro-HPLC (*Microscale HPLC*)

**Vorteile** der Miniaturisierung von HPLC-Säulen:

- schnellere Trennungen
- geringer Druckabfall ⇒ Möglichkeit zur Verwendung kleinerer Partikel ⇒ Verbesserung der Effizienz der Trennung (Auflösung)
- Erniedrigung der NWG für konzentrationsabhängige Detektoren („Verdünnungsprozeß“ durch Diffusion während der Trennung geringer)
- geringerer Lösungsmittelverbrauch (insbesondere wichtig für die Kopplung mit der Massenspektrometrie (Nano-ESI))

⇒ typischer Säulenlängen 3-7 cm, i.D. 0.3-1 mm, 3µm Trägermaterial



**Nachteile:**

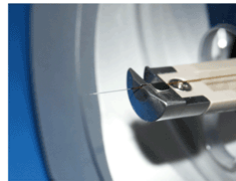
- geringere Probenkapazität (relativ)
- hohe Anforderungen an Detektor (z.B. Volumen der Detektorzelle)



**Abb.** Mikro-HPLC-Säule



**Abb.** „Nano“-HPLC-Säule (gefüllte Glaskapillare)



**Abb.** Nano-ESI

**Prinzipien der Biopolymerchromatographie**

*interaktive Chromatographietypen*

Ionen-(austausch)- chromatographie	IC (IEC)	elektrostatische Wechselwirkungen
Normalphasen-chromatographie	NPC (NP-HPLC)	polare Wechselwirkungen
Umkehrphasen-chromatographie	RPC (RP-HPLC)	unpolare Wechselwirkungen
Ionenpaar-Umkehrphasen- Chromatographie	IPRPC	elektrostatische Wechselwirkungen
<i>Hydrophobic interaction chromatography</i>	HIC	dispersive Wechselwirkungen
Affinitätschromatographie	AC	biospezifische Wechselwirkung
<i>Metal interaction chromatography</i>	MIC	Komplexierung mit einem immobilisierten Metall

**Tab.** Methoden und Prinzipien zur Biomolekülchromatographie

## Prinzipien der Biopolymerchromatographie

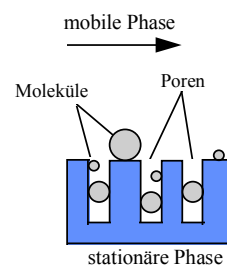
Chromatographie	Acronym	Trennprinzip
<i>nicht-interaktive Chromatographietypen</i>		
Größenausschlusschromatographie	SEC	Unterschiede der Molekülgröße
Slalom-Chromatographie	-	Unterschiede in Moleküllänge und Flexibilität

### (Größen)-Ausschlusschromatographie

(Size Exclusion Chromatography (SEC), Gel-Chromatographie)

- Technik zur Trennung hochmolekularer Verbindungen
- Unterschied zu den bisher beschriebenen chromatographischen Techniken: im Idealfall keine physikalischen Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase (*noninteractive mode chromatography*)

⇒ Trennung beruht auf Größenfraktionierung der Moleküle



⇒ zwei Sorten von Packungen (stationäre Phasen):

- Polymerkügelchen (~ 10µm Teilchengröße)
- Kieselgel- oder poröse Glasteilchen (~ 10µm Teilchengröße)

Typ	durchschnittliche Porengröße [Å]	Molekularmasse Ausschlußgrenze [amu] (atomic mass units)
<i>Polystyrol/</i>	10 <sup>2</sup>	700
<i>Divinylbenzol-</i>	10 <sup>4</sup>	(1 bis 20) x 10 <sup>4</sup>
<i>Copolymerisate</i>	10 <sup>6</sup>	(5 bis 10) x 10 <sup>6</sup>
<i>Kieselgel</i>	125	(0.2 bis 5) x 10 <sup>4</sup>
	500	(0.05 bis 5) x 10 <sup>5</sup>
	1000	(5 bis 20) x 10 <sup>5</sup>

$V_0$  freies Volumen außerhalb der Partikel  
 $V_p$  Volumen der Poren  
 $V_E$  Elutionsvolumen

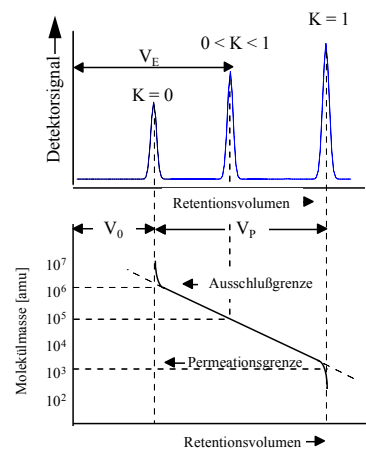
$$V_E = V_0 + KV_p$$

mit:

$K = 0$  wenn die Analyten vollständig ausgeschlossen werden

$K = 1$  wenn die Analytmoleküle vollständig in die Poren eindringen können

$K$  zwischen 0 und 1 wenn für die Analytmoleküle nur Teile des Porenvolumens zugänglich sind



### Anwendungsbeispiele:

- Bestimmung von Molekülmassenverteilungen von Polymeren
- Isolierung hochmolekularer Substanzen von niedrigmolekularen Substanzen (Gel-Filtration), z.B. zur Isolierung von Proteinen (z.B. Entsalzen von Proteinlösungen)

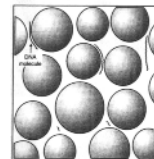
Biopolymer	$M_r$	Molecular dimensions (nm)
Cytochrome <i>c</i>	12 310	$2.5 \times 2.4 \times 3.7^a$
Carbonic anhydrase	28 800	$4.7 \times 4.1 \times 4.1^a$
Lactate dehydrogenase	146 200	$7.4 \times 7.4 \times 8.4^a$
Ferritin	474 000	$8 \times 8 \times 8^a$
DNA, 100 base pairs	69 400	$35 \times 2 \times 2$ (straight rod)
DNA, 800 base pairs	519 200	$60 \times 60 \times 60$ (random coil) <sup>b</sup>

Abb. Prinzipien der SEC (oben) und Slalom-Chromatographie (unten)



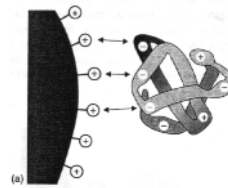
### Slalom-Chromatographie

- ⇒ zur Trennung unterschiedlich langer DNA-Stränge (> 1000 Basenpaare)
- ⇒ Säulen mit inerter Kugelpackung (keine Wechselwirkung mit der Kugeloberfläche)
- ⇒ DNA-Stränge werden in gestreckte Form gezwungen, wobei die längeren Stränge längere Zeit benötigen die Säule zu verlassen



### Ionen-(austausch)-Chromatographie

- ⇒ Trennung basiert auf Unterschieden der zugänglichen Oberflächenladungen der Biomoleküle
- ⇒ stationäre Phase aus positiv (Anionenaustausch) oder negativ (Kationenaustausch) geladenen, immobilisierten funktionellen Gruppen auf Trägermaterialien
- ⇒ Desorption durch Änderung der Ionenstärke der mobilen Phase („fahren“ eines Gradienten der Ionenstärke)
- ⇒ bei einigen Biopolymeren (z.B. Proteine) starke Abhängigkeit der Oberflächenladungen vom pH-Wert

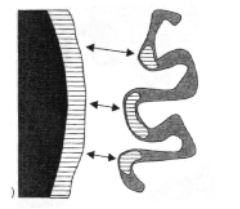


### Normalphasen—Chromatographie für Biomoleküle

- ⇒ polare Oberfläche stationäre Phase – unpolare mobile Phase
- ⇒ Retention durch Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen
- ⇒ polare stationäre Phase entweder durch Derivatisierung der Oberfläche oder polare unbehandelte Träger (z.B. Kieselgel)

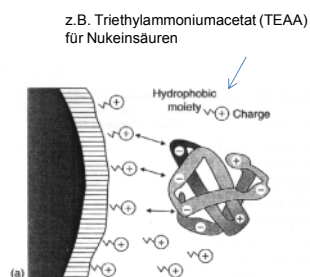
### Umkehrphasen—Chromatographie für Biomoleküle

- ⇒ unpolare Oberfläche stationäre Phase – polare mobile Phase (z.B. Wasser-Methanol, Wasser-Acetonitril)
- ⇒ Retention durch Wechselwirkung hydrophober Biomolekülteile mit der stationären Phase
- ⇒ einige Biomoleküle (z.B. Proteine) verlieren bei der Trennung ihre dreidimensionale Struktur (Denaturierung) (organische Lösungsmittel, „dicke“ stationäre Phase)  
⇒ Verlust der biologischen Aktivität



### Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie

- ⇒ stationäre Phasen und Elutionsbedingungen wie i.d. Umkehrphasenchromatographie
- ⇒ dem RP-System wird ein amphiphiles Ion (Träger einer Ladung und eines hydrophoben Restes) zugegeben
- ⇒ die amphiphilen Ionen werden adsorbiert und wechselwirken mit den Oberflächenladungen der Analyten
- ⇒ Elution durch Erhöhung des organischen Anteils der mobilen Phase (Erniedrigung des Oberflächenpotentials)
- ⇒ wird eingesetzt wenn die Analyten stark ionischen Charakter zeigen und damit sehr hydrophil sind (keine Retention auf RP-Materialien) (z.B. Nukleinsäuren, RNA)

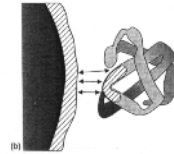


oder z.B. Alkylsulfonate ( $R-SO_3^-$ ) (Sulfonsäuresalze) für basische Analyten (organische Amine)

### Hydrophobic interaction chromatography (HIC)

- ⇒ Trennung der Analyten basierend auf deren hydrophoben Charakter
- ⇒ Anlagerung der Biopolymere wird durch hohe Salzkonzentrationen induziert ( $1-5 \text{ mol L}^{-1}$ ) (Ammoniumsulfat)
- ⇒ Elution durch Erniedrigung der Salzkonzentration

⇒ entscheidend ist die Organisation der Wassermoleküle, die die Analyten umgeben ⇒ lagert sich eine hydrophobe Region eines Biomoleküls an die stationäre Phase an, werden Wassermoleküle „freigesetzt“ ⇒ Entropiezunahme ⇒ thermodynamisch begünstigt ⇒ starker Temperatureinfluss



- ⇒ verglichen mit der Umkehrphasen-Chromatographie
  - stationäre „weniger“ hydrophob (z.B. C4 statt C18-Phasen)
  - kein organisches Lösungsmittel zur Elution
  - dreidimensionale Strukturen bleiben erhalten

### Hydrophobic interaction chromatography (HIC)

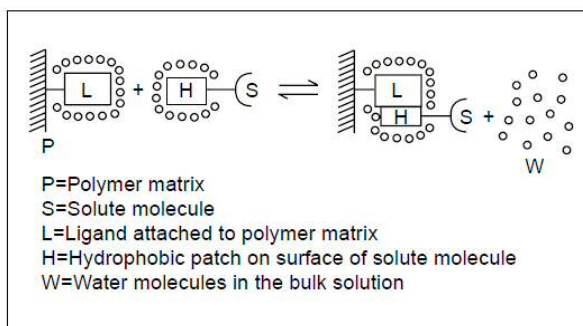
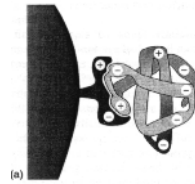


Fig. 1. Close to the surface of the hydrophobic ligand and solute (L and H), the water molecules are more highly ordered than in the bulk water and appear to "shield off" the hydrophobic ligand and solute molecules. Added salt interacts strongly with the water molecules leaving less water available for the "shielding off" effect, which is the driving force for L and H to interact with each other.

### Affinitätschromatographie

- ⇒ biospezifische Wechselwirkungen zwischen einer kovalent an das Packungsmaterial gebundenen Gruppe und dem Analyt
- ⇒ oft eingesetzt zur Reinigung von Proteinen
- ⇒ Schlüssel-Schloß-Prinzip (oft Wasserstoffbrückenbindungen) mit hoher Spezifität
- ⇒ Elution oft durch pH-Wertänderung (Erniedrigung auf 2-4) ⇒ Protonierung der sauren Gruppen



- ⇒ oder durch Zugabe von „displacer“-Molekülen

Beispiele zur Affinitätschromatographie:

#### Immunoaffinitäts-Chromatographie

- ⇒ Ausnutzung der Eigenschaft von Wirbeltieren selektiv Antikörper gegen körperfremde Substanzen zu bilden

**Antikörper** ⇒ Serumproteine (*auch Immunglobuline*), die u.a. von weißen Blutkörperchen als Antwort auf körperfremde Substanzen (Antigene) gebildet werden)

**Antigene** ⇒ z.B. Bakterien, Viren, Proteine, Kohlenhydrate aber auch beliebige hochmolekulare synthetische Verbindungen (MW >1000)

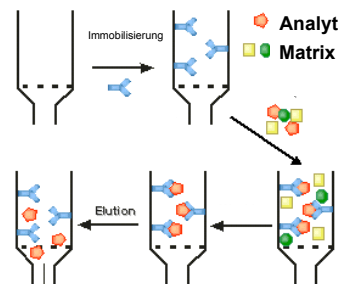




**Abb.** Struktur eines typischen Antikörpermoleküls

⇒ Antikörper besitzen zwei Bindungsstellen für ein bestimmtes Antigen (Analyt), in die das spezielle Antigen genau hineinpasst (Schlüssel-Schloss-Prinzip)

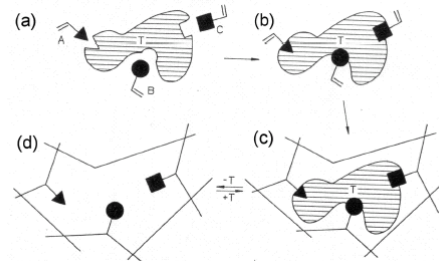
⇒ die Antikörper werden auf einem Träger immobilisiert



**Abb.** Immunaffinitäts-Chromatographie

- ⇒ Einsatz z.B. in der Lebensmittelindustrie ⇒ BSE-Problematik (Nachweis von Rind in Fleischerzeugnissen) ⇒ Nachweis eines spezifischen Rinderproteins
- ⇒ sind die zu bestimmenden Substanzen zu klein (sogenannte Haptene oder Halbantigene) müssen sie an Trägerproteine kovalent gebunden werden (Carrier) ⇒ diese fungieren dann als eigentliches Antigen
- ⇒ „geeignete“ Haptene sind elektrophile Substanzen (z.B. Epoxide), die mit nukleophilen Strukturelementen der Proteine, hier vor allem mit Amino- und mit SH-Gruppen, reagieren
- **Vorteil** (Immunaffinitäts-Chromatographie): sehr spezifisch
- **Nachteil**: schlechte chromatographische Auflösung R (langsame Gleichgewichtseinstellung)

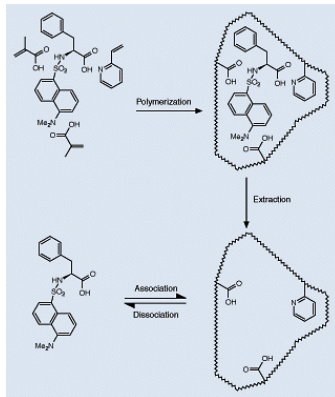
### Molekular geprägte Polymere (MIP, *molecular imprinted polymers*)



**Abb.** Prinzip zur Herstellung MIPs (A,B,C sind Moleküle mit verschiedenen Haftgruppen), T ist das Templat (späteres Zielmolekül). Nach Anlagerung an das Templat (a,b) werden A,B und C unter Zugabe von Vernetzungsmolekulen copolymerisiert (c) und T schließlich extrahiert

- ⇒ im Polymer bleiben spezifische Imprints zurück (Abb. oben (d), deren Gestalt und Anordnung der funktionellen Gruppen (Dipole, H-Bruckendonoren und -akzeptoren, Ladungen, hydrophobe Wechselwirkungen) komplementär zum eingesetzten Templat sind
- ⇒ derart geprägte Polymere zeigen eine ausgeprägte Affinität für das zum Prägen verwendete Templat, weisen also entsprechende spezifische Bindungsstellen auf
- ⇒ *Molecular Imprinting* ist heute die erfolgreichste Methode, molekulare Erkennungseigenschaften biologischer Rezeptoren und Antikörper mit Hilfe künstlicher Systeme zu imitieren, speziell bei kleinen Zielmolekülen zeigen sie bereits antikorperahnliche Affinitäten und Querempfindlichkeiten

- **Vorteile:** einfache, kostengünstige und reproduzierbare Herstellungsverfahren, Stabilität gegenüber verschiedensten Lösemitteln und hohen Temperaturen
- **Nachteile:** für die Erkennung größerer Moleküle nur begrenzt einsetzbar (nur wenige Beispiele von MIPs, die Selektivität gegenüber Makromolekülen wie z. B. Proteinen aufweisen)

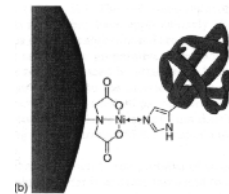


**Abb.** Herstellung eines MIPs für Dansyl-L-Phenylalanin

Christian Huber, „Biopolymer Chromatography“  
[www.separationsnow.com/repository/pdfs/5903-\\_a.pdf](http://www.separationsnow.com/repository/pdfs/5903-_a.pdf)

### Metal interaction chromatography

- ⇒ Metallionen werden an die Oberfläche des Trägers chemisch gebunden ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) (oft mittels eines chelatisierenden Liganden (z.B. Iminodiacetat)
- ⇒ Imidazol-, Amino- und Thiolgruppen komplexieren mit den immobilisierten  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen (⇒ AS: Histidin, Lysin und Cystein)
- ⇒ Phosphatgruppen in Nukleinsäuren mit  $\text{Fe}^{3+}$
- ⇒ vicinale Diole ( $-\text{HCOH}-\text{HCOH}-$ )(Zucker) mit  $\text{Cu}^{2+}$
- ⇒ Elution durch Gradienten steigender Salzkonzentrationen oder durch Gradienten der Konzentrationen kompetitiver Liganden (z.B. Imidazol, Phosphat)

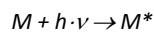


## Detektoren für die LC

Detektionsprinzip	NWD	dynam. Bereich	Bemerkungen
UV-vis-Detektion (Absorption)	+	+++	Standarddetektor
Diodenarray-Detektion (Absorption)	+	+++	auch Hinweise zur Identifizierung (UV/vis-Spektrum)
Fluoreszenz-Detektion	+++	+++	nachweisstark/preisgünstig
Chemilumineszenzdetektion	+++	++	hochselektiv
Elektrochemische-Detektion	+++	++	<b>ausgewählte Substanzgruppen</b>
Verdampfungslichtstreu-Detektion	o	++	<b>Universaldetektor, keine salzhaltigen Eluenten</b>
Brechungsindexdetektion	--	+	<b>Universaldetektor</b>
Massenspektrometrische Detektion	+++	+	auch Identifizierung

## UV-vis-Detektion

- ⇒ Messung der Lichtabsorption zwischen ca. 190 und 900 nm
- ⇒ Absorption beruht auf der Anregung äußerer Elektronen von Molekülen (elektronische Anregung)



- ⇒ Es gibt verschiedene Arten der elektronischen Anregung, abhängig von den vorhandenen funktionellen Gruppen:

$\sigma$  to  $\sigma^*$  Alkane

$\sigma$  to  $\pi^*$  Carbonylverbindungen

$\pi$  to  $\pi^*$  Alkene, Carbonylverbindungen

$n$  to  $\sigma^*$  Sauerstoff-, Stickstoff-, Schwefel- und Halogenverbindungen

$n$  to  $\pi^*$  Carbonylverbindungen

Bindende  $\sigma$ -Orbitale:

Stabile Einfachbindungen mit Zylindersymmetrie.

Bindende  $\pi$ -Orbitale:

Mehrfachbindungen, entstanden aus überlappenden  $p$ -Orbitalen. Knotenebene entlang der Bindung.

Nichtbindende n-Orbitale:

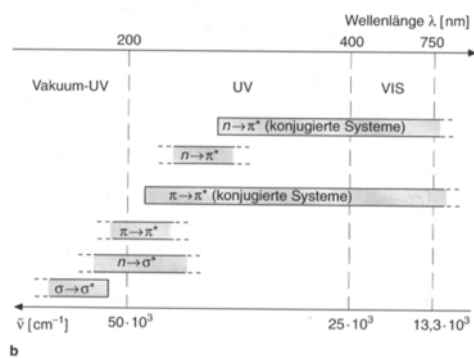
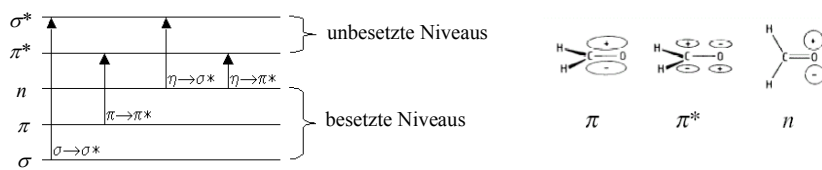
Einsame Elektronenpaare an Heteroatomen (O, N). Nicht an der Bindung beteiligt (aber in H-Brücken).

Antibindende  $\sigma^*$ -Orbitale:

Zylindersymmetrisch, wirken aber destabilisierend (anti-bindend) wegen Knoten zwischen den Atomen.

Antibindende  $\pi^*$ -Orbitale:

Elektronendichte nach außen delokalisiert. Knoten in Bindungsebene und zwischen den Atomen.

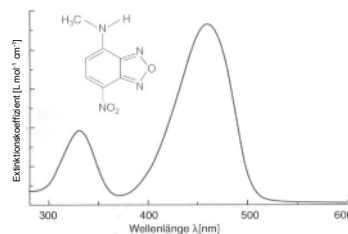


**Abb.** Absorptionsbereiche verschiedener Elektronenübergänge

Chromophor	Übergang	Beispiel	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]
C—H	$\sigma \rightarrow \sigma^*$	CH <sub>4</sub>	122
C—Hal	$n \rightarrow \sigma^*$	H <sub>3</sub> C—Cl	173
	$n \rightarrow \sigma^*$	H <sub>3</sub> C—Br	204
	$n \rightarrow \sigma^*$	H <sub>3</sub> C—I	258
	$n \rightarrow \sigma^*$	CHI <sub>3</sub>	349
C—NO <sub>2</sub>	$\pi \rightarrow \pi^*$	H <sub>3</sub> C—NO <sub>2</sub>	210
	$n \rightarrow \pi^*$		278

**Tab.** Absorptionen isolierter chromophorer Gruppen

- ⇒ ein Großteil der Energie wird in Form von Wärme abgegeben
- ⇒ Moleküle ohne freie Elektronenpaare oder Doppelbindungen (z.B. Alkane) sind durch UV/vis-Messungen nicht zugänglich
- ⇒ da neben der elektronischen Anregung auch Vibrations- und Rotationsübergänge angeregt werden ⇒ Spektren mit breiter Bandenstruktur (insbesondere in Lösung)
- ⇒ hochauflösende Spektrometer nicht erforderlich



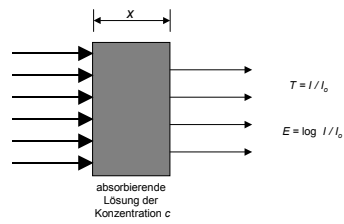
**Abb.** UV/vis-Absorptionsspektrum eines Benzooxadiazols

⇒ Quantifizierung nach Lambert-Beersche-Gesetz

$$\log I_0/I = E = \varepsilon(\lambda) \cdot x \cdot c \quad \text{mit } E = \text{Extinktion (engl. absorbance)}$$

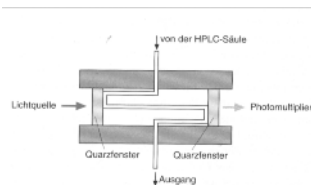
$\varepsilon(\lambda) = \text{molarer Extinktionskoeffizient}$   
 $x = \text{Schichtdicke}$   
 $c = \text{Konzentration des Analyten}$

(englische Variante  $A = a \cdot b \cdot c$ )

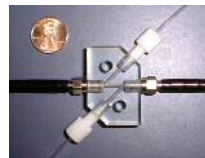


**Abb.** Abhängigkeit der Lichtschwächung von Schichtdicke und Konzentration

⇒ möglichst lange Messzellen mit möglichst kleinem Volumen



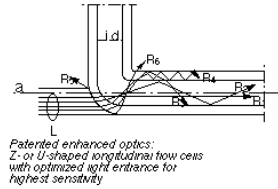
**Abb.** Geometrie einer Durchflussküvette für die UV/vis-Detektion



**Abb.** „Z-Zelle“ mit Lichtleitern

⇒ Typische Zelldimensionen Normal-HPLC 10mm Länge, Volumen 8 $\mu$ L

⇒ für Micro-HPLC zu große Volumina ⇒ on-column Detektion



*Patented enhanced optics:  
Z- or U-shaped longitudinal flow cells  
with optimized light entrance for  
highest sensitivity*

**Abb. On-column-Zellen**

- ⇒ typische Dimensionen on-column-Zellen 5 mm Länge, Volumen 20-40 nL
- ⇒ drei Versionen von UV/vis-Detektoren

⇒ drei Versionen von UV/vis-Detektoren

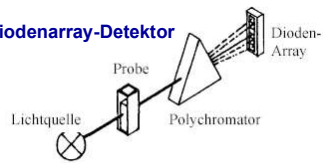
- Festwellenlängendetektor (Hg-Niederdrucklampe – 254 nm)
- Detektoren mit Lichtquellen mit kontinuierlichen Spektrum (Kontinuumstrahler, Deuteriumlampen (190-370 nm), Wolfram-Halogen-Lampen (370-750 nm), Auswahl der Messwellenlänge mit einem Monochromator (Absorptionsmaxima der Analyten)
- Diodenarray-Detektoren ⇒ Kontinuumsstrahler ⇒ simultane Registrierung der Intensität verschiedener Wellenlängen (z.B. 512 Dioden) ⇒ Identifizierung von Substanzen anhand ihrer UV/vis-Spektren ⇒ auch „Reinheitsprüfung“ durch Errechnung von Peakflächenverhältnissen bei verschiedenen Wellenlängen



### UV/vis-Detektor mit variablen Wellenlängen



### Diodenarray-Detektor



**Abb.** Prinzipieller Aufbau von UV/vis-Detektoren mit variabler Wellenlängeneinstellung und DAD

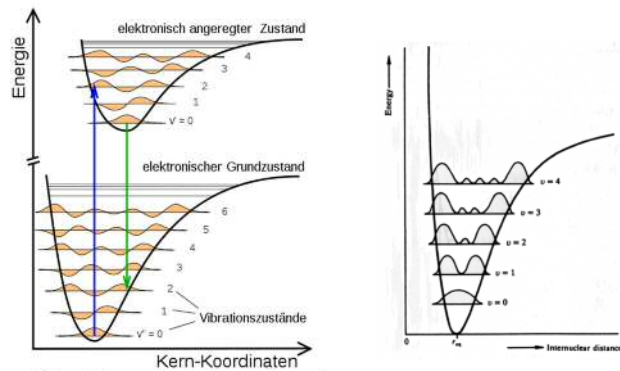
### Fluoreszenzdetektion

- ⇒ statt Absorptions- bieten sich auch Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung organischer Analyten an
- ⇒ Vorteil: keine Differenzmessung



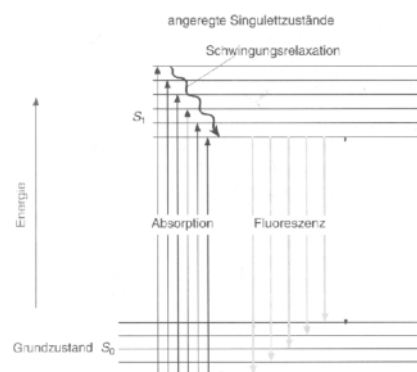
- ⇒ physikalische Grundlage ⇒ zunächst wie oben (elektronische Anregung durch Absorption von Photonen)

- ⇒ Das Franck-Condon-Prinzip beruht auf der Tatsache, dass der Wechsel von Elektronen zwischen verschiedenen Zuständen so schnell stattfindet (in ca.  $10^{-15}$  Sekunden), dass sich der Kernabstand während der Anregung nicht ändert (Eine Kernschwingungsperiode dauert ca.  $10^{-13}$  s.). Diese hohe Geschwindigkeit des elektronischen Übergangs gegenüber der Kernbewegung wird durch die geringe Masse der Elektronen ermöglicht. Wenn ein Molekül nun von einem elektronischen Zustand in einen anderen übergeht, so ist dieser Übergang umso wahrscheinlicher, je mehr die Vibrations-Wellenfunktionen der beiden Zustände zueinander kompatibel sind (vibronischer Übergang).

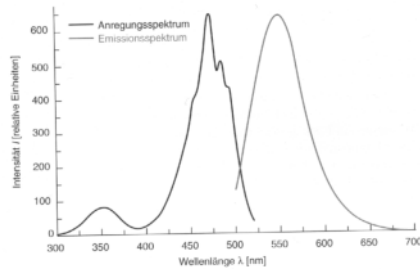


**Abb.** Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips (links) und der Aufenthaltswahrscheinlichkeit in verschiedenen angeregten Niveaus

- ⇒ da die Schwingungsenergie sehr schnell abgebaut wird (ca.  $10^{-12}$  s) erfolgt die Lichtemission aus niedrigeren Schwingungsniveaus
- ⇒ Rotverschiebung der Fluoreszenzstrahlung (Stokes shift)



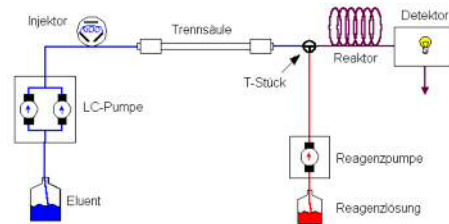
**Abb.** Termschema zur Darstellung der an der Fluoreszenz beteiligten elektronischen Übergänge



**Abb.** Anregungs- und Emissionsspektrum eines Benzoxadiazols (s.o.)

- ⇒ insbesondere PAHs fluoreszieren sehr stark (native Fluoreszenz) ⇒ NWG mit Fluoreszenzdetektoren um 2-3 Zehnerpotenzen besser als mit UV/vis
- ⇒ bei anderen Analyten ⇒ Derivatisierung der Analyten mit entsprechenden fluorophoren Reagenzien

- ⇒ neben der Derivatisierung vor der Trennung (Vorsäulenderivatisierung) wird auch häufig nach der Trennung derivatisiert (Nachsäulenderivatisierung)

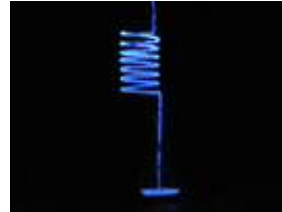
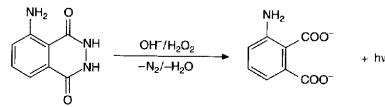


- ⇒ Intensität der Fluoreszenzstrahlung  $I_f = const. \cdot \epsilon(\lambda) \cdot x \cdot c$  (*const.* enthält Fluoreszenzausbeute)
- ⇒ Intensität des Fluoreszenzsignals ist direkt proportional zur Strahlungsleistung der Anregungsquelle (im Gegensatz zur Absorption) ⇒ Sensitivität von Fluoreszenzmessungen kann durch lichtstarke Laser verbessert werden
- ⇒ laserinduzierte Fluoreszenz (LIF)
- ⇒ weiterer Vorteil ⇒ Fokussierung der Laser auf kleine Volumina möglich

### Chemilumineszenzdetektion

⇒ ebenfalls sehr nachweisstark aber selten einsetzbar

⇒ z. B. Luminol-Chemilumineszenz



⇒ z.B. Nachweis von organischen Peroxiden (aber auch  $H_2O_2$ , Metallionen (u.a. Blut))

### Brechungsindex-Detektion

⇒ Durchfluss-Refraktometer

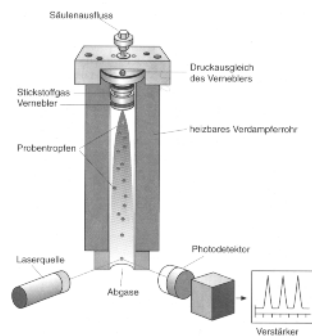
⇒ Messung der Unterschiede des Brechungsindex der mobilen Phase und Analyt

⇒ universell aber vergleichsweise unempfindlich

⇒ keine Gradientenelution möglich

### Verdampfungs-Lichtstreuendetektion

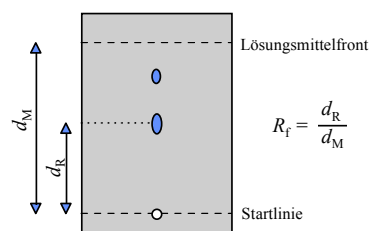
- ⇒ Prinzip: Zerstäubung des Eluats ⇒ Verdampfung des Laufmittels ⇒ Messung der Lichtstreuung der übrigbleibenden Partikeln
- ⇒ Analyten müssen einen signifikant höheren Siedepunkt als die mobile Phase aufweisen
- ⇒ keine nichtverdampfbaren Zusätze i.d. mobilen Phase (z.B. Puffer)



**Abb.** Aufbau eines Verdampfungs-Lichtstreuendetektors

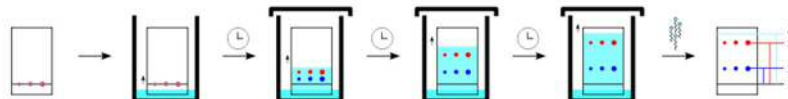
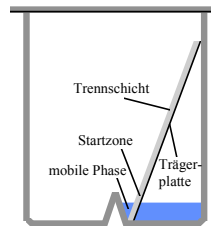
### Dünnschichtchromatographie (TLC, Thin-Layer Chromatography)

- im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Techniken (*Säulenchromatographie*) handelt es sich bei der TLC um eine *planare chromatographische Technik*
- Bewegung der mobilen Phase relativ zur stationären Phase i.a. durch Kapillarwirkung
- Messprinzip: Entwicklung eines *internen* Chromatogramms (Analyten wandern unterschiedliche Weglängen in der gleichen Zeit) und werden nach der Trennung auf der stationären Phase detektiert (*Säulenchromatographie* ⇒ *externe* Chromatogramme)  
Messgröße: Retentionsfaktor  $R_f$  (Graphik)

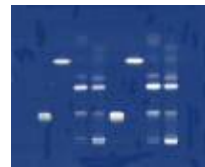


### Stationäre und mobile Phasen

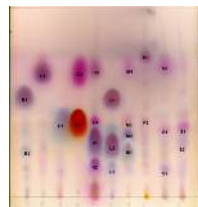
- gleiche Phasen wie in der HPLC (Normal- und Umkehrphasen, SEC)
- konventionelle Platten (Glas oder Kunststoffe)  
5 x 10 oder 10 x 20 cm, Partikeldurchmesser 20  $\mu\text{m}$ ,  
Schichtdicken 200-250  $\mu\text{m}$   
 $\Rightarrow N_{\text{th}} \sim 200$  bei  $d_M$  12 cm und einer Entwicklungszeit von 25 min
- Hochleistungs-DC-Platten (HPTLC, high-performance TLC)  
Partikeldurchmesser 5  $\mu\text{m}$  oder kleiner,  
Schichtdicken 100  $\mu\text{m}$   
 $\Rightarrow N_{\text{th}} \sim 4000$  bei  $d_M$  3 cm und einer Entwicklungszeit von 10 min  
(aber geringe Probenkapazität)



Known  
Cocaine  
Known  
Heroin  
Known  
Methamphetamine  
Unknown  
From Case



**Abb.** Normale (links) und Hochleistungs TLC (rechts)

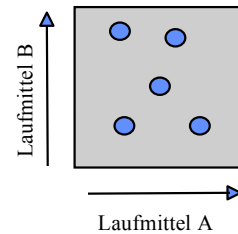


**Abb.** Verschiedene ätherische Öle

- Selektivität von TLC Trennungen kann durch zweidimensionale Chromatogramme verbessert werden (Einsatz unterschiedlicher mobiler Phasen, Graphik)

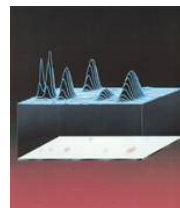
### Lokalisierung und Quantifizierung der Analyten (nicht zerstörende Methoden)

- durch Lumineszenzphänomene der Analyten (inhärente Fluoreszenz, Phosphoreszenz)
- durch fluoreszierendes Material in der stationären Phase (z.B. Pyrenederivate, Fluorescein, Rhodamin)  $\Rightarrow$  Abschwächung der Fluoreszenz
- durch elementares Iod (je nach Analyt allerdings irreversible Reaktionen)



$\Rightarrow$  nach Lokalisierung der interessierenden Komponenten - Abtrennung und Analyse (z.B. IR oder MS)

- direkte Quantifizierung durch ortsaufgelöste Messung der diffusen Reflexion im UV-VIS Bereich (scannende Densitometer)



### Einsatzgebiete

- vor allem Screening-Methoden (parallele Entwicklung mehrerer Proben)
  - pharmazeutische Industrie zur Reinheitskontrolle
  - biochemische Studien (Aminosäuren, Peptide)
  - klinische und forensische Analytik (Zucker, Drogen)
  - Lebensmittelanalytik (Vitamine)

**Überkritische Fluidchromatographie** (*supercritical fluid chromatography* (SFC))

Prinzip: als mobile Phase wird ein überkritisches Fluid (meist CO<sub>2</sub>) eingesetzt wobei als stationäre Phasen kurze gepackte Säulen verwendet werden (ähnlich HPLC) oder (mittlerweile seltener) längere offene Kapillaren (ähnlich GC)

- Kombiniert einige der Vorteile der HPLC (Analyse nicht flüchtiger Verbindungen) mit Vorteilen der GC (z.B. Einsatz unterschiedlicher Detektoren)

	gasförmig	überkritisch	flüssig
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	1 · 10 <sup>-3</sup>	3 · 10 <sup>-1</sup>	1 · 10 <sup>0</sup>
Viskosität [g/cm s]	1 · 10 <sup>-4</sup>	5 · 10 <sup>-4</sup>	1 · 10 <sup>-2</sup>
Diffusionskoeffizient [cm <sup>2</sup> /s]	1 · 10 <sup>-1</sup>	1 · 10 <sup>-4</sup>	5 · 10 <sup>-6</sup>

- hohe Dichte ⇒ Lösungsvermögen für organische Substanzen (eventuell unter Zusatz von Modifiern (z.B. Methanol), vergl. SFE)
- geringe Viskosität ⇒ höhere Flussraten als in der LC und damit schnellere Trennungen
- große Diffusionskoeffizienten ⇒ schnelle Gleichgewichtseinstellungen zwischen mobiler und stationärer Phase (C-Term van-Deemter) aber auch Signalverbreiterung durch Diffusion (B-Term van-Deemter)

Säulentyp	ID [mm]	Länge [m]	Korngröße[μm]
offene Kapillaren	0.025 - 0.1	1 - 35	
gepackte Kapillaren	0.1 - 0.5	0.05 - 0.5	3, 5, 10
gepackte Säulen	2 - 4.6	0.03 - 0.25	3, 5, 10

**Tab.** Einige gebräuchliche Säulentypen bei der SFC



### Anwendungen

- SFC bietet sich als Trennmethode an wenn es sich um nicht flüchtige oder thermolabile Analyten handelt, welche sich nur schlecht durch die üblichen HPLC Detektoren nachweisen lassen (entweder Einsatz universeller (FID) oder selektiver GC Detektoren (z.B. ECD) (leichtere Abtrennung der mobilen Phase als in der LC)
- bietet sich an wenn SFE (*supercritical fluid extraction*) bei der Probenvorbereitung eingesetzt wird
  - Polymeranalytik (Trennung von Oligomeren)
  - PAH-Analytik
  - Naturstoff-Analytik
  - Pharmazeutika
- eher seltener eingesetzt da instrumentell aufwendig und Retentionsverhalten schwieriger zu kontrollieren ist: Beispielsweise existiert mit der Kompressibilität ein weiterer Faktor der die Retention beeinflusst aber schwer vorhersagbar ist (in der GC: auch Kompressibilität aber keine WW mit der mobilen Phase, in der LC: keine Kompressibilität der mobilen Phase)

### Venus Atmosphere

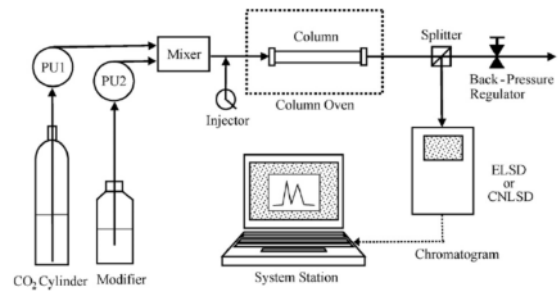
Surface pressure: 92 bars (9,2 MPa)  
Average temperature: 464 °C  
96.5% Carbon Dioxide, 3.5% Nitrogen



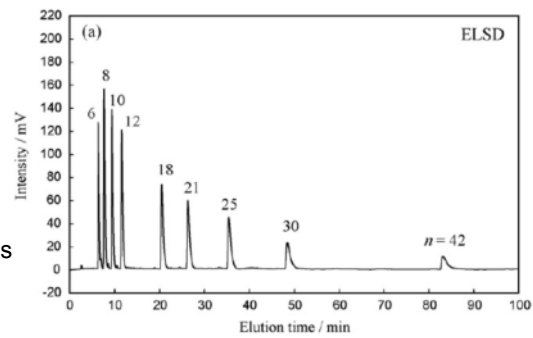
“The pressure found on Venus's surface is high enough that the carbon dioxide is technically no longer a gas, but a supercritical fluid. This supercritical carbon dioxide forms a kind of sea that cover the entire surface of Venus. This sea of supercritical carbon dioxide transfer heat very efficiently, buffering the temperature changes between night and day (which last 56 terrestrial days).”

Fegley, B. et al. (1997). Geochemistry of Surface-Atmosphere Interactions on Venus ISBN 0-81-651830-0.

## Anwendungen



Trennung eines PEG-Gemisches  
(Takahachi, 2009)



## Trenntechniken

### Elektrophoretische Trennverfahren

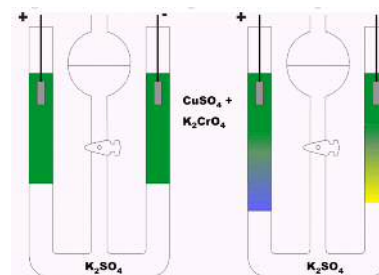
---

⇒ erste Elektrophorese in den 30iger Jahren von Arne Tiselius (Nobelpreis Chemie 1948)

⇒ Auftrennung menschlichen Serums in 4 Hauptkomponenten (Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Globuline)

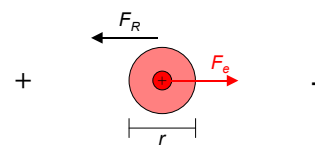


**Abb.** Prinzip von elektrophoretischen Trennungen: Ausnutzung der Ionenwanderung im elektrischen Feld



### Theoretische Grundlagen

**Elektrophorese** ⇒ Transport von Ionen in einer Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes, wobei die wirkende elektrische Kraft  $F_e$  definiert ist:



$$F_e = z_i \cdot e_0 \cdot E$$

$z_i$	Ladungszahl der Komponente i
$e_0$	Elementarladung [C]
$E$	elektrische Feldstärke [V/cm]

- in einem **viskosen wäßrigen Medium** wirkt  $F_e$  die **Reibungskraft**  $F_R$  entgegen:

$$F_R = k \cdot \eta \cdot v_i$$

$k$	Konstante [cm] ( $6\pi r$ für sphärische Partikel (Stokesches Gesetz))
$\eta$	Viskosität der Lösung [Pa·s]
$v_i$	Wanderungsgeschwindigkeit der Komponente i [cm/s]

- daraus folgt für die Geschwindigkeit einer Komponente  $i$  in einem konstanten elektrischen Feld ( $F_e = F_R$ ):

$$v_i = \frac{z_i \cdot e_0}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \cdot E \quad r \text{ hydrodynamischer Radius des hydratisierten Ions (ungleich Ionenradius)}$$

- daraus ergibt sich unter definierten experimentellen Bedingungen eine Stoffkonstante der Komponente  $i$ , die **elektrophoretische Mobilität**  $\mu_i$ :

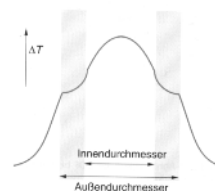
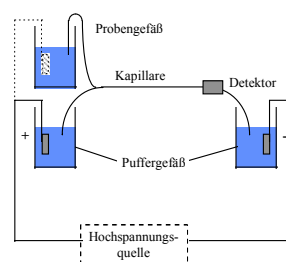
$$\mu_i = \frac{v_i}{E} = \frac{z_i \cdot e_0}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad [\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}]$$

- ⇒ nur Trennung **geladener Analyten**, Trennung beruht auf Unterschieden der Molekülgröße ( $r$ ) und Ladung  $z_i$
- ⇒ elektrophoretische Verfahren stellen daher zunächst einmal **keine chromatographischen Methoden** dar (keine Verteilung zwischen einer mobilen und stationären Phase)
- ⇒ aber: sehr ähnliche Instrumentierung (Kapillarchromatographie) als auch Mischformen (s.u. micellare elektrokinetische Chromatographie)

## Kapillarelektrophorese

### Instrumentierung

- ⇒ Hochspannungsversorgung bis 30 kV
- ⇒ meist unbeschichtete **Quarz-(Fused-silica)-Kapillaren** aber auch Teflonkapillaren
- ⇒ Kapillarinne Durchmesser 10-100  $\mu\text{m}$
- ⇒ Kapillarlängen 20-100 cm
- ⇒ UV-VIS-Detektoren (*on-column detection*)
- ⇒ Entstehung von **Joulescher Wärme** (Stromfluss) ⇒ kleine Kapillardurchmesser zur besseren Wärmeabfuhr
- ⇒ Probenaufgabe (Graphik oben)
  - hydrodynamische Injektion (Überdruck-Injektionsseite, Unterdruck-Detektorseite)
  - elektrokinetische Injektion

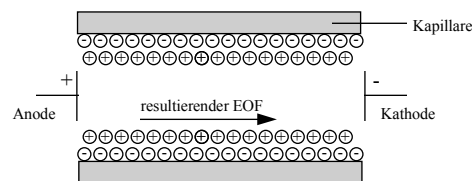


## Grundlagen der elektrophoretischen Trennungen

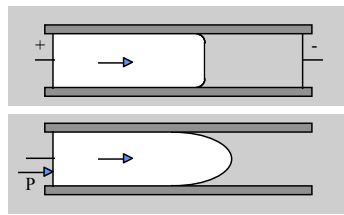
**Elektrosmose** (elektrosmotischer Fluß, EOF):

- ⇒ eine Vielzahl von Materialien (Glas, Quarz, Teflon) bilden aufgrund von Oberflächenladungen (Quarz bzw. Glas ⇒ Dissoziation der Si-OH Gruppen) bei Kontakt mit einer Elektrolytlösung eine **elektrochemische Doppelschicht** aus
- ⇒ Innenseite der Kapillare: negativ geladen ⇒ positiv geladene Flüssigkeitssäule
- ⇒ Elektrosmose tritt auf wenn ein elektrisches Feld an das flüssige Elektrolytssystem angelegt wird

- ⇒ positiv geladene Flüssigkeitssäule bewegt sich im elektrischen Feld in Richtung Kathode ⇒ EOF ⇒ Transport der Flüssigkeit ähnlich einer mechanischen Pumpe



- ⇒ in Gegensatz zu einem hydrodynamischen Fließprofil (parabelförmig) ist das Profil des EOF annähernd **stempelförmig**

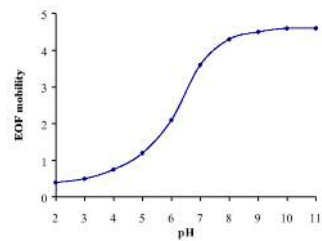


**Abb.** Fließprofil eines elektrophoretisch betriebenen (oben) und eines Druckbetriebenen Systems (unten)

⇒ flaches Fließprofil beim EOF hat vernachlässigbare Bandenverbreiterung zur Folge (⇒ EOF trägt nicht zur Peakverbreiterung bei ⇒  $N_{th}$ )

#### Einflussfaktoren EOF

⇒ bei hohen pH-Werten ist der EOF deutlich grösser als bei niedrigen, da der Dissoziationsgrad der Silanolgruppen zunimmt (bei  $\text{pH} > 9$  ⇒  $\alpha=1$ )

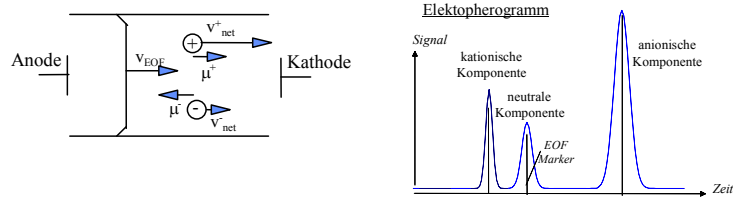


**Abb.** pH-Abhängigkeit des EOF (*fused-silica*-Kapillare)

⇒ mit **steigender Ionenstärke** nimmt der EOF ab (Beeinflussung der Doppelschicht)

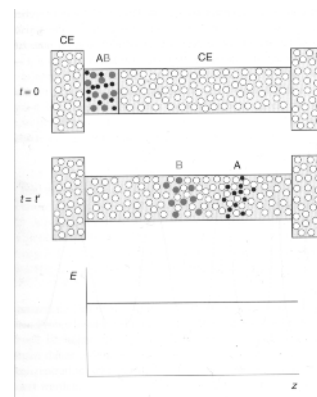
⇒ zu der oben definierten elektrophoretischen Mobilität einer Komponente  $i$  ( $\mu_i$ ) addiert sich folglich der EOF

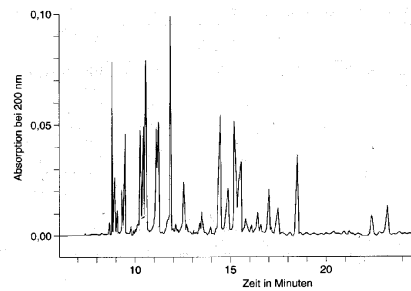
- ⇒ mit **steigender Ionenstärke** nimmt der EOF ab (Beeinflussung der Doppelschicht)
- ⇒ zu der oben definierten elektrophoretischen Mobilität einer Komponente  $i$  ( $\mu_i$ ) addiert sich folglich der EOF



### Kapillarzonenelektrophorese (CZE, capillary zone electrophoresis)

- ⇒ Trennung der Analytionen aufgrund von Mobilitätsunterschieden
- ⇒ gleiche Puffer in beiden Reservoiren (Grundelektrolyt)
- ⇒ durch seine relativ hohe Konzentration im Vergleich zum Analyten bestimmt der Grundelektrolyt Leitfähigkeit als auch den pH in der Kapillare





**Abb.** Zonenelektrophoretische Trennung eines tryptischen Verdaus (enzymatische Spaltung mittels Trypsin (bei Arginin und Lysin) eines Proteins)

- ⇒ Optimierung der Trennung am einfachsten durch **pH-Wert Änderung** (Pufferzusammensetzung) ⇒ Beeinflussung des Dissoziationsgrads der Analyten / starke Mobilitätsänderung am pK-Wert des Analyten
- ⇒ Peakverbreiterung nur durch longitudinale Diffusion
- ⇒ *wichtig*: scharfe Anfangszone bei der Probenaufnahme (ca. 1 nL)
- ⇒ Anwendungen der CZE speziell in der biochemischen und klinischen Analytik (Aminosäuren, Proteine, Nucleinsäuren)

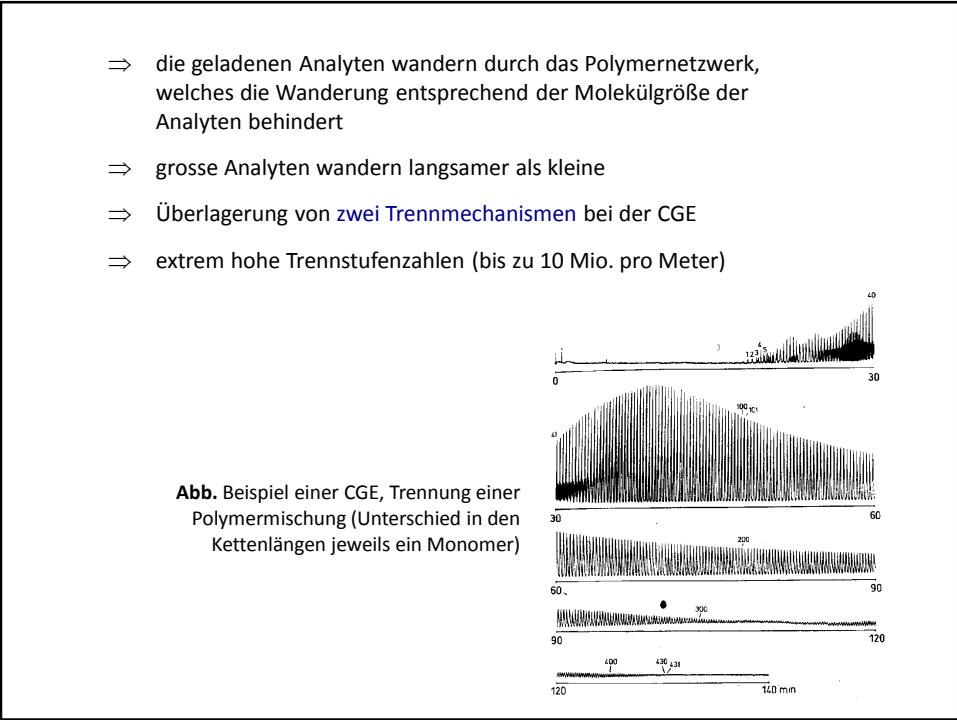
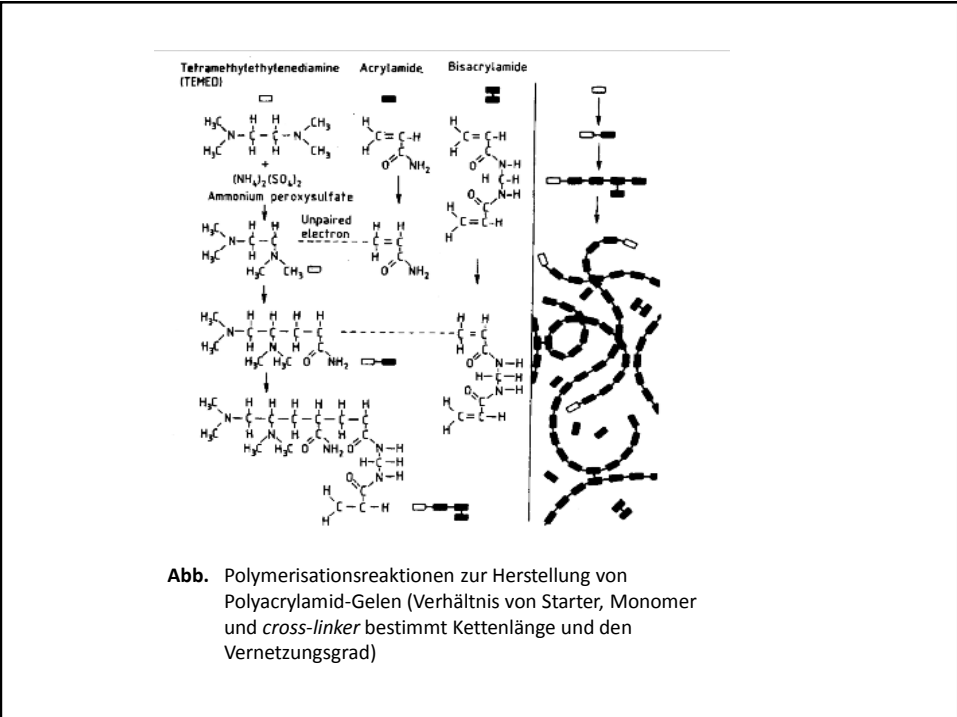
**Vorteile** (gegenüber der klassischen Gelelektrophorese):  
hohe Trennstufenzahlen (Fließprofil) ca. 1.000.000 pro Meter,  
schnelle Trennungen

**Nachteile**: schwierige Detektion (Detektorvolumen < 0.5 nL)

#### **Kapillargelelektrophorese (CGE, capillary gel electrophoresis)**

- ⇒ bei sehr großen Analyten sind die Unterschiede in ihren elektrophoretischen Mobilitäten gering ⇒ zusätzliche Einführung eines Gels in die Kapillare um die Trennung zu verbessern (**Siebmatrix**)
- ⇒ meist synthetische Polymere (vernetzte **Polyacrylamidgele**), Polymerisations- und Vernetzungsgrad bestimmt die Selektivität





*Exkurs:*

### Anwendung der CGE zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms

#### Das Humangenomprojekt

- ⇒ offizieller Start Oktober 1990 - 2003 (> 1000 Wissenschaftler, ca. 40 Nationen)
- ⇒ Träger USA: NIH - National Institute of Health  
DOE - Department of Energy (Atomic Energy Commission), z. B. Untersuchung strahlungs-induzierter Mutationen
- ⇒ seit 1995 auch deutsche Beteiligung (DFG, BMBF)
- ⇒ 1998 private Unternehmen (Celera Genomics) greifen in das „Rennen“ um die Entschlüsselung ein (Craig Venter)

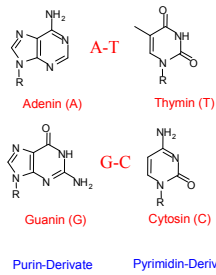


Ziel: komplette Sequenzierung des menschlichen Genoms:

- ⇒ Kartierung von **3 Milliarden Basenpaaren**
- ⇒ Identifizierung von **100.000 Genen**
- ⇒ **in 24 Chromosomen**

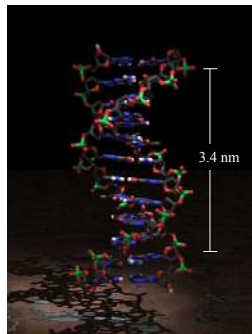
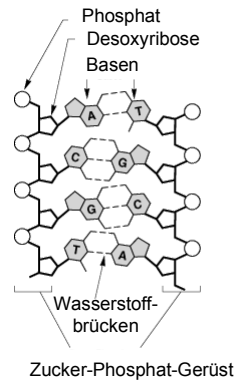


Watson-Crick-



### DNA

Desoxyribonucleinsäure



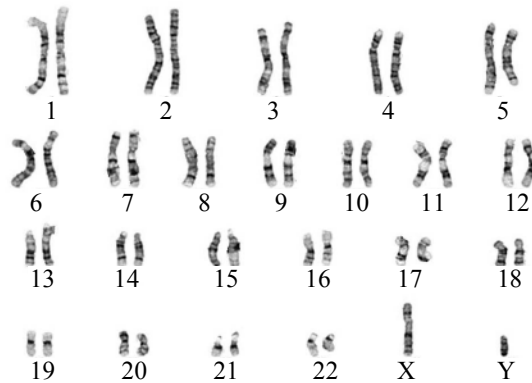
**Abb.** Molekülmodell der DNA Doppelhelix

⇒ 3 - 10 % des Genoms trägt **protein-codierende Sequenzen** (Exons)

### Chromosomen

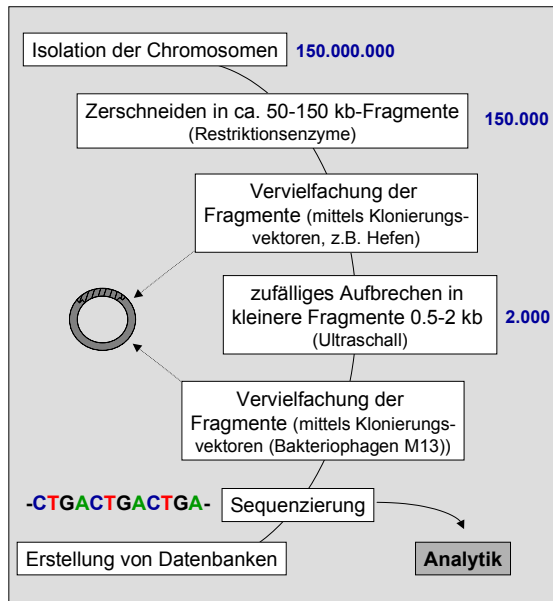
- ⇒ die 3 Milliarden Basenpaare sind auf 24 Chromosomen verteilt
- ⇒ 22 Autosomen und 2 Geschlechts-Chromosomen

Chromosom 1      ⇒ ca. 250 Millionen BP  
Y-Chromosom    ⇒ ca. 50 Millionen BP



**Abb.** Chromosomenkarte (Karyogramm)

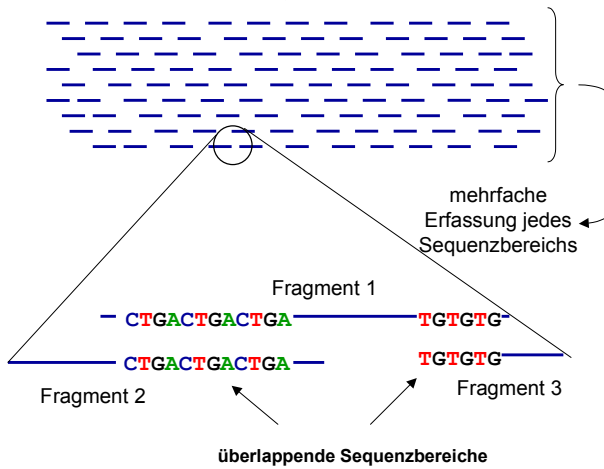
**Prozessablauf der DNA-Sequenzierung**



⇒ Zusammensetzen der DNA-Sequenz aus den Einzelfragmenten (*shotgun approach*)

langer DNA-Abschnitt (50-150 kb)

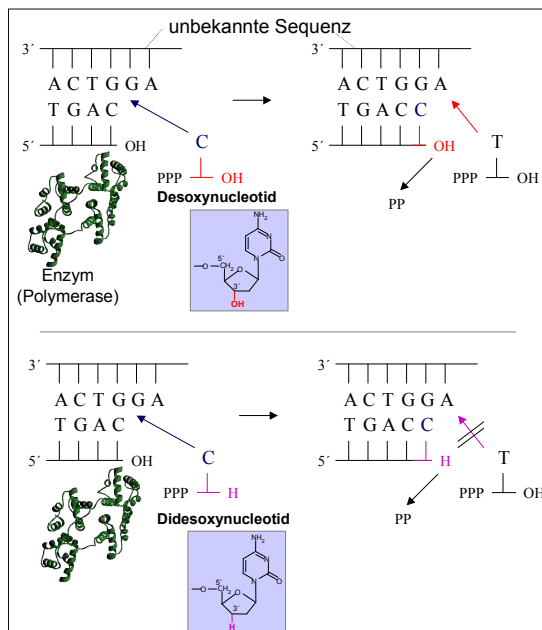
zufälliges Aufbrechen (0.5-2 kb)



**Abb.** Strategie des *shotgun approach*

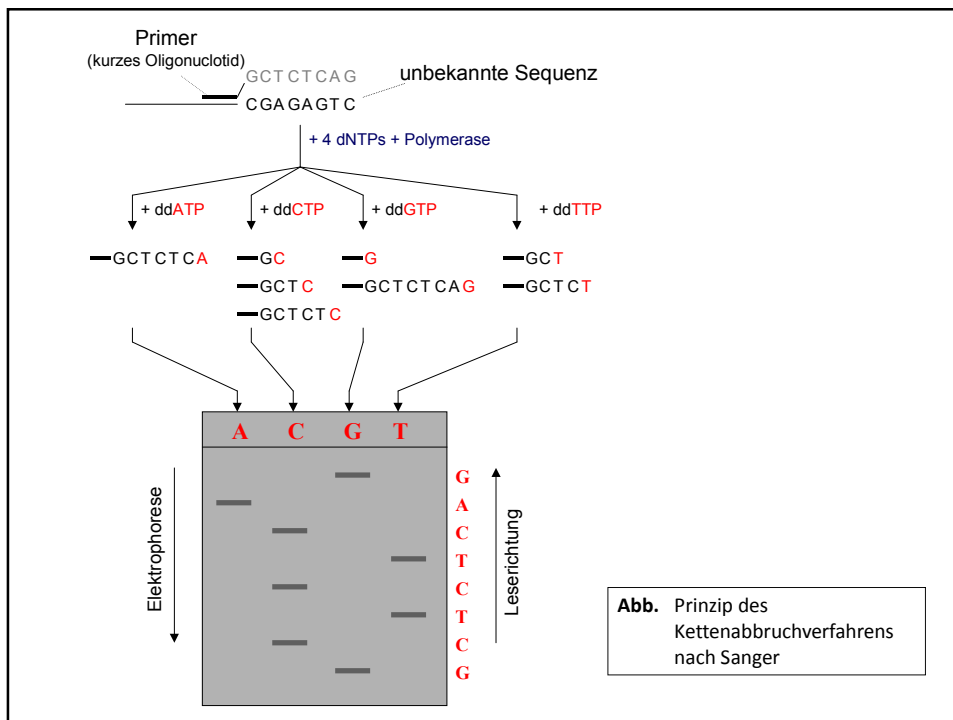
### DNA Sequenzierung nach Sanger (Dideoxy-Verfahren)

- ⇒ auch Kettenabbruchverfahren
- ⇒ ausgehend von einer bekannten Startsequenz (*primer*) wird durch Zugabe eines Nucleotidgemisches und einer DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA-Stranges initiiert
- ⇒ die Reaktion wird in 4 parallelen Ansätzen gleichzeitig gestartet, jeweils mit nur einem Typ eines Dideoxy-Nucleotids (Terminator)

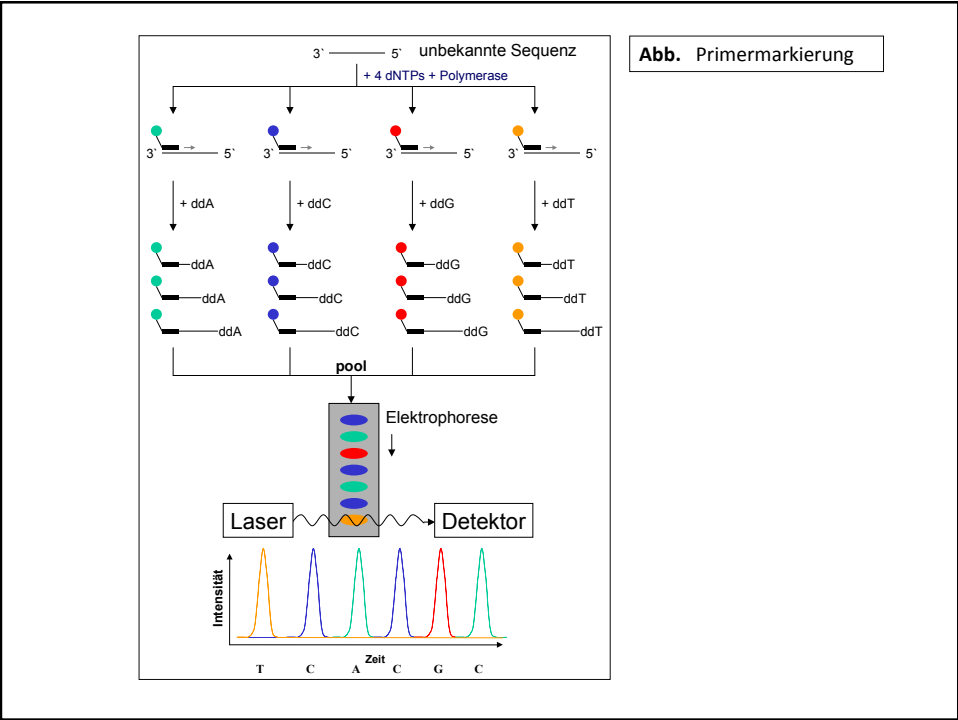


**Abb.** Synthese eines DNA-Stranges mit Einbau eines normalen Bausteins (Desoxynucleotid)(oben) und eines „Terminators“ (Dideoxynucleotid)(unten)

⇒ Verhältnis Desoxynucleotid : Dideoxynucleotid bestimmt die Länge der Produktkette (typisch 200:1)

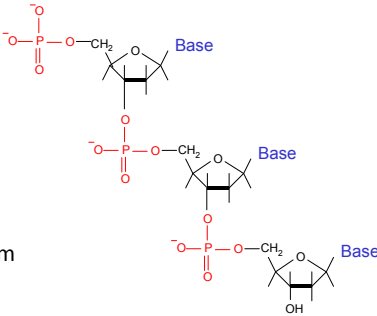


- ⇒ die unterschiedlichen langen synthetisierten Produkte können **gelelektrophoretisch getrennt** werden
- ⇒ Rekonstruktion der Basenabfolge (**Sequenz**)
- ⇒ **zeitlimitierender Arbeitsschritt** ist die Trennung
- ⇒ durch spezielle **Primermarkierung** können alle 4 Produkttöpfe vereint und gemeinsam gelelektrophoretisch getrennt werden

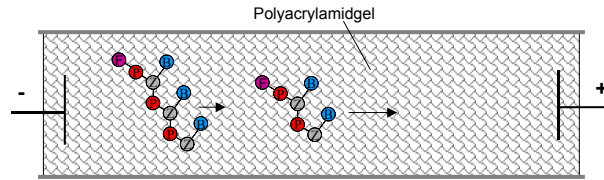


⇒ Durchbruch beim HGP ⇒ Einführung der Kapillarelektrophorese

- Vorteile:** (gegenüber klassischen Gelelektrophorese)
- kürzere Trennzeiten (höhere elektrische Feldstärken)
  - on-line Detektion
  - leichtere Automatisierung
  - geringere Analytmengen

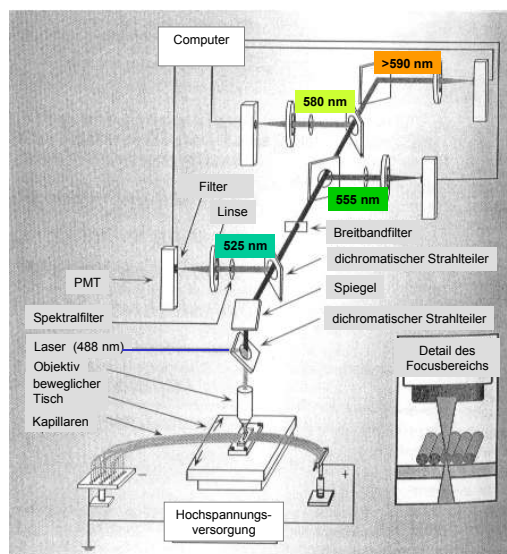


Kapillarinndurchmesser 10 - 100 µm  
Kapillarlängen 20 - 100 cm



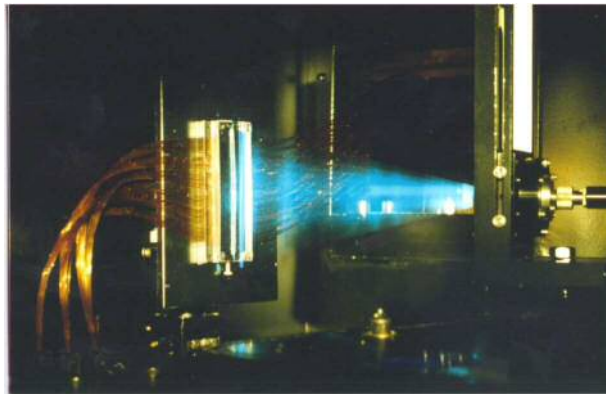
⇒ aufgrund der mit zunehmender Länge zunehmenden Ladung lassen sich unterschiedlich lange Sequenzabschnitte nicht ohne eine „Siebmatrix“ trennen

#### 4 Farben Fluoreszenz Multikapillar-Elektrophorese (Capillary Array Electrophoresis; CAE)



**Abb.** Aufbau einer 4-Farben-Fluoreszenz-Multikapillar-Elektrophorese Apparatur

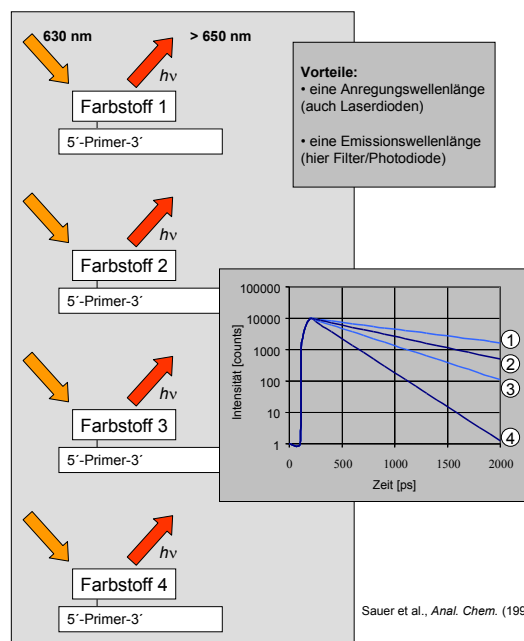




**Abb.** Multikapillar-Elektrophorese Apparatur ohne bewegliche Komponenten

Weitere Möglichkeit zur basenspezifischen Detektion

⇒ zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung



**Abb.** Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung zur basenspezifischen Detektion

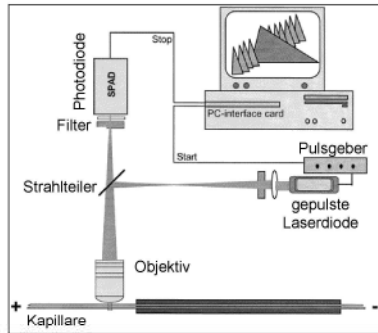


Abb. Aufbau zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung

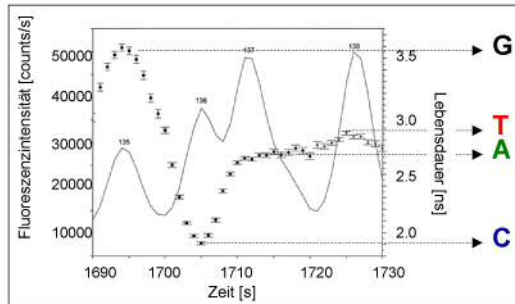


Abb. Zuordnung der Basen anhand der Fluoreszenzlebensdauer

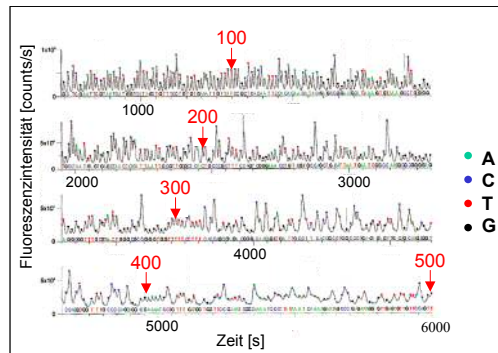


Abb. Elektropherogramme eines DNA-Sequenzierungslaufs (Sauer et al., Anal. Chem. (1998))

- ⇒ 1000 Buchstaben pro Seite (Abb. Rechts)
- ⇒ 300 Seiten pro Buch
- ⇒ insgesamt 10.000 Bände

**Potentielle medizinische Anwendungsgebiete**  
in Zusammenhang mit dem HGP

Tests zur genetischen Prädisposition

- ⇒ genom-basierte molekulare Diagnostik
- ⇒ „evidence based medicine“
- Vorhersehbarkeit von Krankheiten führt zu zielgerichteten Therapien

```

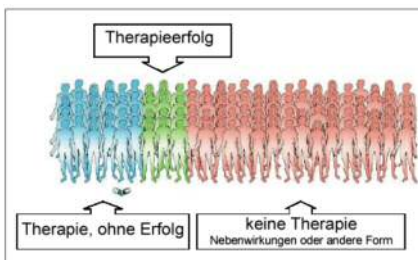
Hicell
1  STGCAGCGA TTTTTCGC TGAGTGAATG ATTAGCTAGC TAAGTCCTTA
51  TCTTCCAGA TGACCACTTC CCGACATGTA TATGTACCGS TAAATGCATG
101  CAGTCATGAC TGAATATAT STAGCCCTCC TGGAAATATC AGAGTCATPS
151  AATATTITTI TTATGTGTTG TAAATAAAC TTATGALAG AATTCAGAG
201  AGATGTACCC AGCTCAGGAA TCACAGCTCC CTAAAAATAT ACTTARCAAT
251  TCTTTFICTT CCTAGAGGA CCATCTCTAC ATATGTAAAC ATAAATGCAC
301  CMACTTAGT ACCCCATCTA GCTATCTGCA TCACTGACCA TTTCTTACGC
351  CCTCCACATA GTTACGTAI IMAATGTCCA GTAATCTGAS TATATATATA
401  TAAATCCATG TCATTCCGCA CTGATCACTC CACAGCAATG AAACATATAA
451  CAGAGACAGC ATATAGATA GCCAACCTCC TCATCAAGCG AAGGAGAAA
501  CGAGAAAC CTGGAAGTCC AGGTGGGCAI GCCGAGATC GTTGATCTCG
551  TGGATCATTA TACCAAGCG CCCCAGCAT TATATTATATA CCGGGAGTGC
601  AAGTCCAAAT CCTACAAAC TCTCTAGAG ATAABAGGA AACCAACCC
651  TAAABAAAS GAAGCACTT CTAAGGATA AACGGALACA AACTCTCAT
701  TAAATGATAC AAATTAATG CCGCATCTIT ATCGAAGTCS GTCTTCTGTS
751  GATAACTTC CTGTATGCA TTAGAGCTTA TCTTCTAAGS ACTCGCGCGC
801  TGGTACCTC CATCGCCAA DITPAG
Hicell

```

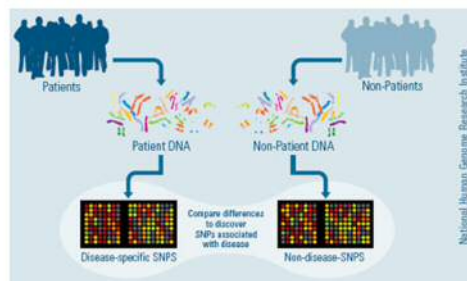
### Die Vision: Individuelle Therapie durch Pharmaco-Genomics



TMAC  
B. Krieger,  
TU München



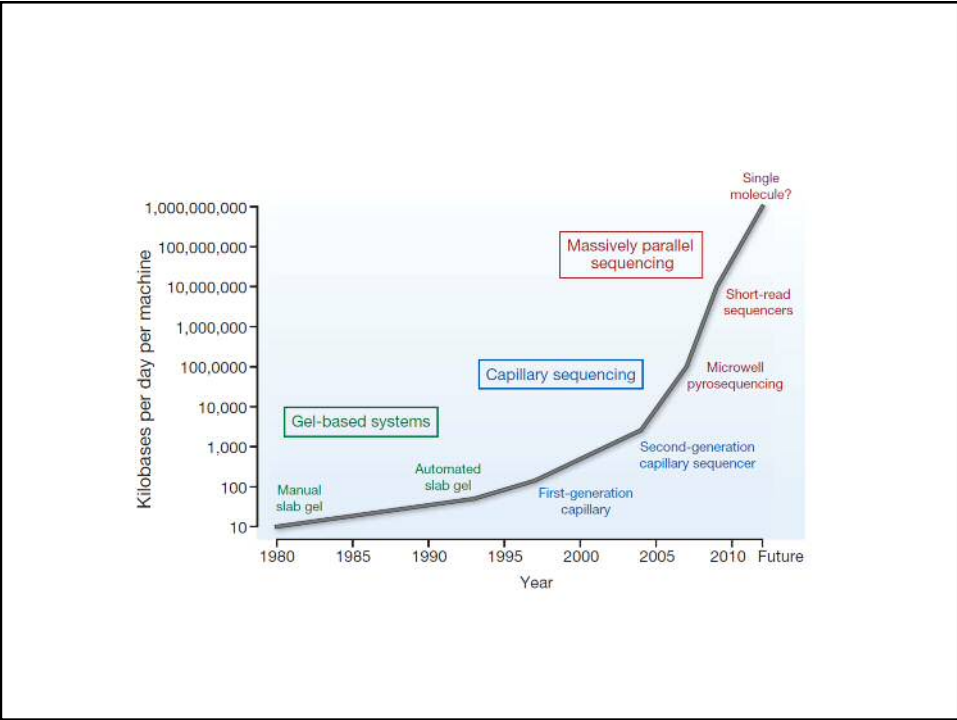
### SNPs und Erkrankungen



Genome-wide association studies

National Human Genome Research Institute

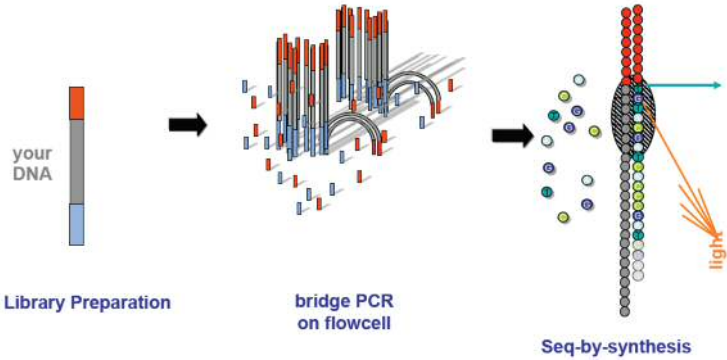
49



# Massively parallel sequencing

Sequencing-by-synthesis technology

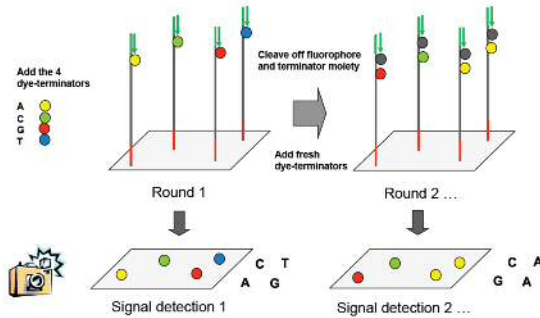
## Illumina Sequencing - principle



## Sequencing-by-synthesis technology

### Illumina Sequencing

• „Sequencing-by-synthesis“ using reversible dye-terminators



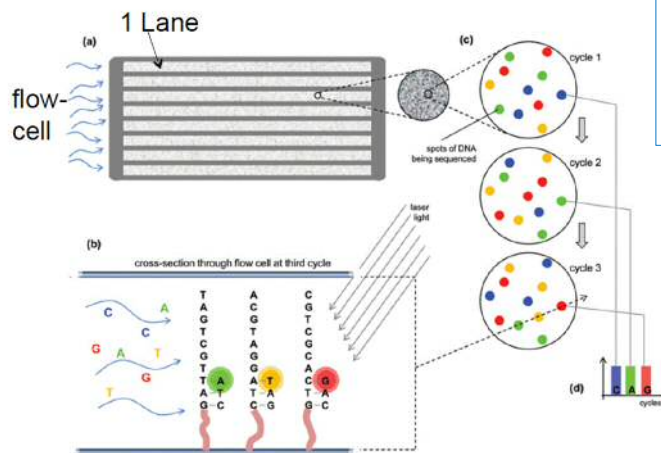
Finally, another cycle of dNTP addition are initiated. Since single bases are added to all templates in a uniform fashion, the sequencing process produces a set of DNA sequence reads of uniform length.

The “Illumina” sequencing method is similar to Sanger sequencing, but it uses modified dNTPs containing a terminator which blocks further polymerization- so only a single base can be added by a polymerase enzyme to each growing DNA copy strand.

The terminator also contains a fluorescent label, which can be detected by a camera. Following the addition of the four dNTPs to the templates, the images are recorded and the terminators are removed. This chemistry is called “reversible terminators”.

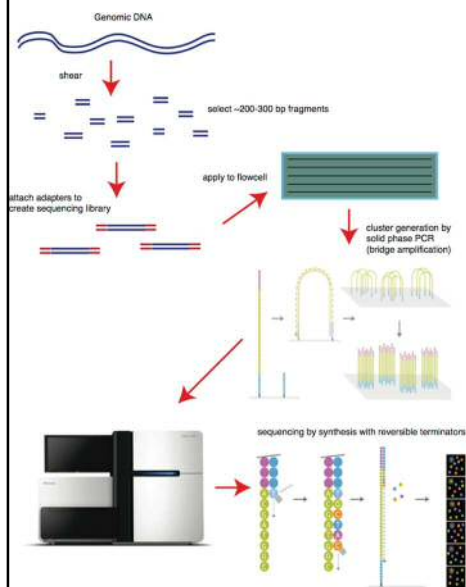
## Sequencing-by-synthesis technology

### Illumina-Sequenzierung



The sequencing reaction is conducted simultaneously on a very large number (many millions in fact) of different template molecules spread out on a solid surface.

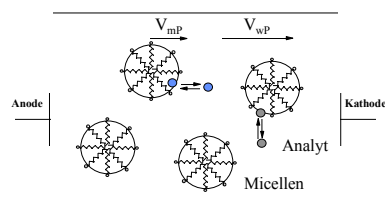
## Sequencing-by-synthesis



Since the fluorescent imaging system used in Illumina sequencers is not sensitive enough to detect the signal from a single template molecule, the major innovation of the Illumina method is the amplification of template molecules on a solid surface. The DNA sample is prepared into a “sequencing library” by the fragmentation into pieces each around 200 bases long. Custom adapters are added to each end and the library is flowed across a solid surface (the “flow cell”) and the template fragments bind to this surface. Following this, a solid phase “bridge amplification” PCR process (cluster generation) creates approximately one million copies of each template in tight physical clusters on the flowcell surface. Illumina has improved its image analysis technology dramatically which allows for higher cluster density on the surface of the flowcell

## Micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MECC)

- ermöglicht die Trennung ungeladener Analyten
- Prinzip: oberflächenaktive Substanzen werden in den Pufferlösungen gelöst (Konzentrationen der Tenside müssen oberhalb der kritischen micellaren Konzentration liegen):



- meistens Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) als Micellenbildner
- Micellengröße zwischen 40 und 100 SDS Einheiten

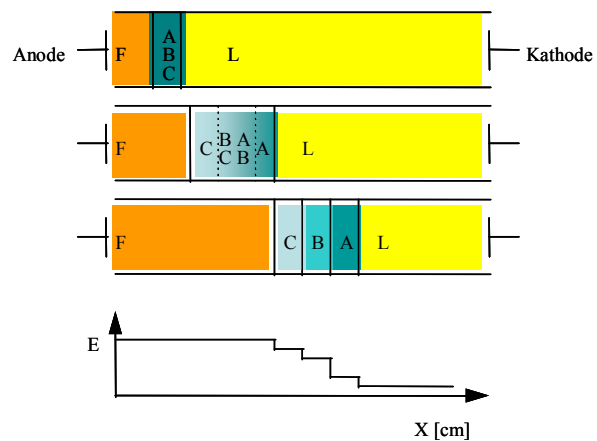
- hohe negative Ladung auf den Oberflächen der Micellen (anionischer Micellenbildner) ⇒ elektroosmotischer Fluß muß größer sein als elektrophoretische Mobilität der Micellen
- ⇒ Puffergemisch besteht aus einer sich schnell fortbewegenden wässrigen Phase und einer langsameren micellaren Phase (hydrophob)
- injizierte neutrale Analyten verteilen sich zwischen den beiden Phasen, wobei der Verteilungskoeffizient von der Polarität der Analyten abhängt (analog der Reversed-Phase HPLC)
- ⇒ Trennung beruht auf unterschiedlichen Verweilzeiten in der micellaren Phase

- neben diesem Trennmechanismus besteht weiterhin die elektrophoretische Trennung geladener Analyten (Überlagerung von zwei Trennprinzipien)
- Vorteile gegenüber der HPLC:
- einfaches Austauschen der pseudostationären Phase
  - schnelle Einstellung der Gleichgewichte zwischen den zwei Phasen
  - ⇒ höhere Säuleneffizienzen (2 Trennmechanismen)
- Anwendungen
    - Umweltanalytik (Phenole in Wasser)
    - pharmazeutische Industrie

### Kapillar isotachophorese (ITP)

Prinzip: Verwendung eines diskontinuierlichen Elektrolytensystems:

- die Kapillare und kathodenseitiges Pufferreservoir sind mit einem sogenannten Leitelektrolyten gefüllt, dessen Kationen (Anionen) die höchste elektrophoretische Mobilität von allen im System vorkommenden Kationen (Anionen) besitzen müssen
- das Anodenreservoir (Kathodenreservoir) ist mit einem Folgeelektrolyten gefüllt, dessen Mobilität die niedrigste von allen Kationen (Anionen) ist
- die Analyten befinden sich zwischen Leit- und Folgeelektrolyt (auch die elektrophoretischen Mobilitäten der Analytionen liegen zwischen denen der Leit- und Folgeelektrolyten)

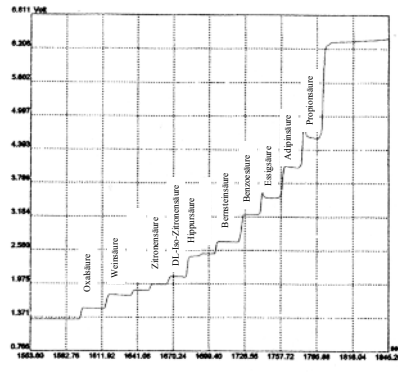


- Auftrennung der Analyten A, B und C je nach elektrophoretischer Mobilität bis zur vollständigen Trennung  $\Rightarrow$  alle Zonen sind gezwungen sich mit gleicher Geschwindigkeit (iso-tacho) durch die Kapillare zu bewegen



- nach Trennung der Analyten ändert sich die elektrische Feldstärke (E) stufenförmig über die Kapillarlänge (je nach Leitfähigkeit der Zone)

- ⇒ durch Diffusion von Ionen z.B. in einen Bereich niedrigerer Feldstärke wird deren Geschwindigkeit verringert
- ⇒ Zurückfallen in anschließende Zone (und umgekehrt) ⇒ **Zonenschärfungseffekt**



aber auch:

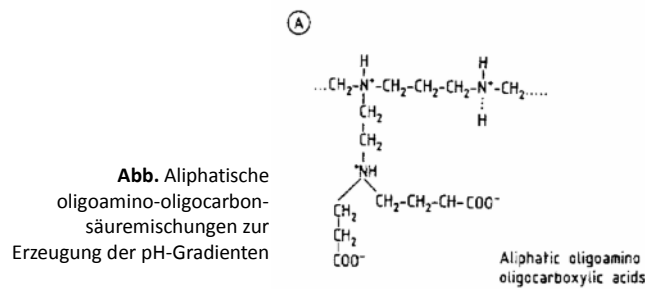
#### Konzentrationseffekt („Zusammenschieben“ der Zonen)

- die Konzentration des Analyten in seiner Zone adaptiert sich an die des Leitelektrolyten (Beschreibung durch Kohlrauschs „beharrliche Funktion“, siehe elektrochemische Monographien)
- verdünnte Proben können angereichert werden (Konzentrationsfaktoren bis zu  $10^4$ )

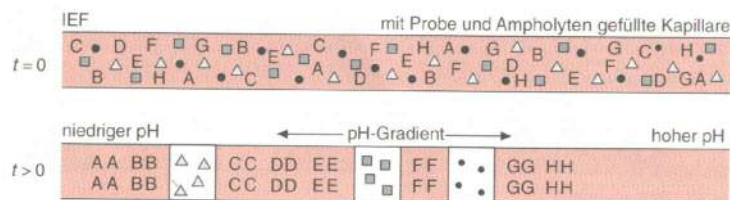
#### Isoelektrische Fokussierung (CIEF, capillary isoelectric focussing)

- insbesondere zur Proteinanalytik (Trennung der Analyten anhand ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (pI-Werte charakteristisch für die Aminosäurekomposition)
- zur Erinnerung: pI-Wert gibt an, bei welchem pH-Wert eine amphotere Substanz nach aussen hin elektrisch neutral ist

- Prinzip der CIEF: Erzeugung eines pH-Gradienten entlang der Kapillare und Anlegen einer Spannungsdifferenz  $\Rightarrow$  Wanderung der Analyten bis zu dem Punkt, an dem der pH ihrem isoelektrischen Punkt entspricht
- zur Erzeugung der pH-Gradienten werden verschiedene amphotere Substanzen (z.B. Aminocarbonsäuren mit unterschiedlichen Verhältnissen an Amino- und Carbonsäuregruppen) gemischt



- nach Anlegen der Spannung wandern die Ampholytmoleküle bis zu dem Punkt, an dem sie ihren isoelektrischen Punkt erreichen (z.B. ein Ampholyt mit 10 Carbonsäuregruppen und einer Aminogruppe wird zunächst in Richtung Anode wandern und erst im stärker sauren elektrisch neutral, ein Molekül mit 10 Aminogruppen und einer Carbonsäuregruppe wird zunächst in Richtung Kathode wandern und erst im stärker basischen neutral werden)



**Abb.** Schematische Darstellung der CIEF (AA, BB usw.: Ampholyte mit unterschiedlichen pI-Werten, Symbole: Analyten (z.B. versch. Proteine))

- üblicherweise werden belegte Quarzkapillaren verwendet um den EOF zu reduzieren bzw. zu unterdrücken (Vermeidung der Oberflächenladungen durch Dissoziation der Silanolgruppen)

### Probenaufgabe für die Kapillarelektrophorese

aufgrund der geringen Injektionsvolumina (0,5 – 50 nL) ist die Probenaufgabe für alle CE-Techniken ein grosses Problem

#### Drei Injektionstechniken:

- hydrostatische Injektion
- Druck-Injektion
- elektrokinetische Injektion



Abb. Prinzip der Druck-Injektion (Überdruck auf der Injektions- oder Unterdruck auf der Detektorseite)



Abb. Prinzip der hydrostatischen Injektion

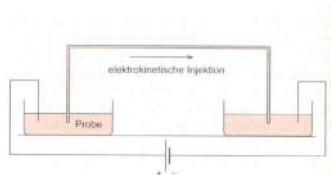
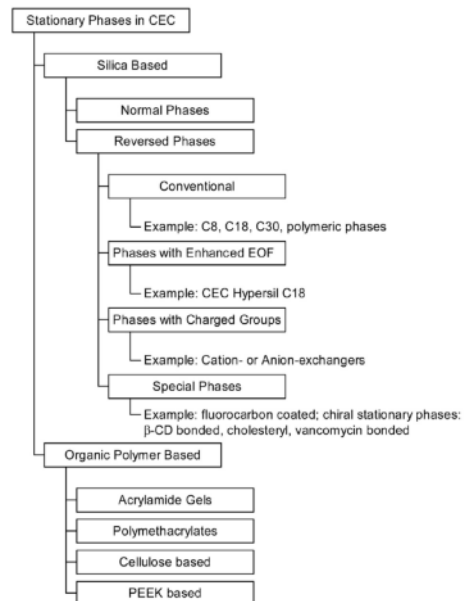


Abb. Prinzip der elektrokinetischen Injektion (Probleme durch Diskriminierung von Probenkomponenten verursacht durch Unterschiede in den elektrophoretischen Mobilitäten verschiedener Substanzen)

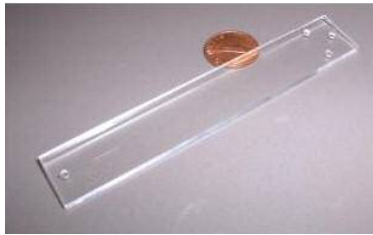
### Kapillar-Elektrochromatographie (CEC, capillary electrochromatography)

CEC ist eine chromatographische Technik, bei welcher der Fluss der mobilen Phase durch die chromatographische Trennphase durch Elektroosmose hervorgerufen wird und nicht durch Druckdifferenz wie in der konventionellen Flüssigchromatographie

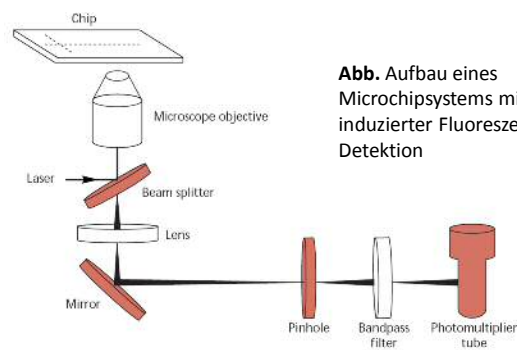
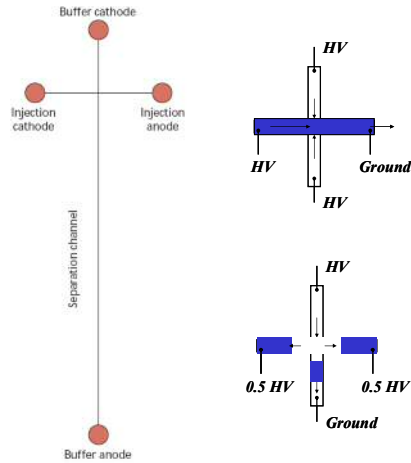


### Miniaturisierung von CE-Systemen (*microchip electrophoresis*)

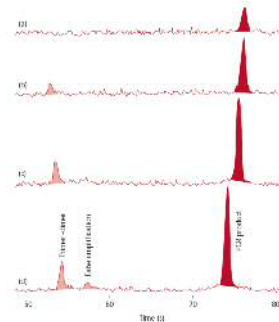
⇒ aufgrund verschiedener Aspekte der Kapillarelektrophorese bietet sich der Einsatz sogenannter Microchip-Techniken an („*Lab-on-a-chip*“)



**Abb.** Elektrophorese-Microchip (oben), eine typische Kanal-Anordnung für eine elektrophoretische Trennung (mitte) und die Elektrodenanordnung für die Probeninjektion (rechts)

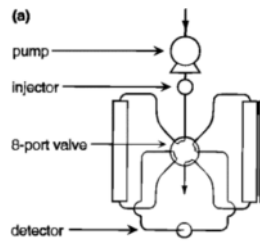


**Abb.** Aufbau eines Microchipsystems mit Laser-induzierter Fluoreszenz-Detektion



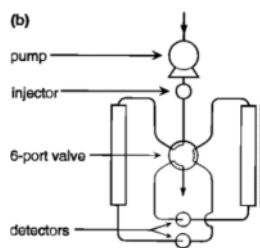
**Abb.** Beispiel einer CE-Trennung mittels Microchips (Kontrolle einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten) (a)-(d): unterschiedliche PCR-Zyklen (15-30 Zyklen)

### Cyclic electrophoretic and chromatographic separation methods



Cyclic methods can be used in chromatographic systems to overcome pressure limitations to resolution

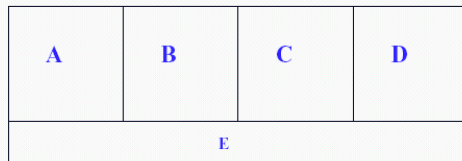
⇒ Column switching technologies



# Massenspektrometrie

## Einleitung & Ionisationstechniken

Die Entwicklung der Massenspektrometrie geht auf die Arbeiten von J.J. Thomson im Jahre 1913 zurück, in denen er zeigte, dass das Edelgas Neon aus einer Mischung von zwei Isotopen der Massen 20 und 22 besteht.



- a. Einlaßsystem
- b. Ionenquellen
- c. Analysator
- d. Detektor/Datensystem
- e. Vacuumsystem

**Abb.** Allgemeines Schema zum Aufbau eines Massenspektrometers

## Nobelpreisträger / Massenspektrometrie



**Joseph John Thomson**  
(1856 - 1940)

The Nobel Prize in Physics 1906, "in recognition of the great merits of his theoretical and experimental investigations on the conduction of electricity by gases"



**Francis William Aston**  
(1877 - 1945)

The Nobel Prize in Chemistry 1922 "for his discovery, by means of his mass spectrograph, of isotopes, in a large number of non-radioactive elements, and for his enunciation of the whole-number rule"



**Wolfgang Paul** (1913 - 1993)  
University of Bonn  
Bonn, Germany

The Nobel Prize in Physics 1989 "for the development of the ion trap technique"



**John B. Fenn** (1917)

The Nobel Prize in Chemistry 2002 "for the development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"



**Koichi Tanaka**  
(1959)

The Nobel Prize in Chemistry 2002 "for the development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"

## Allgemeines

Arbeitsprinzip:

- Überführung von neutralen Spezies in Ionen (Ionenquelle)
- Trennung der Ionen (Masse zu Ladungsverhältnis,  $m/z$ ) (Analysator)
- Nachweis der Ionen (Detektor)

Die Massenspektrometrie ist keine zerstörungsfreie Methode wie IR- oder NMR-Spektroskopie – der Analyt wird bei der Messung verbraucht.



## Terminologie

*Massenspektrum* - zweidimensionale Darstellung der Ionenhäufigkeit (Intensität der Signale) gegen Ionenmasse zu Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ )

*Basispeak (base peak)* – intensivster Peak im Massenspektrum einer Substanz, auf den die anderen Signale (Peaks) normiert werden können (relative Intensität %)

*Strichspektren* – Zuordnung der  $m/z$ -Verhältnisse zu ganzzahligen Werten (Nominalmassen s.u.)

*Profilspektren* – Wiedergabe der kompletten Peakform

*Peaklisting* – tabellarische Wiedergabe des Massenspektrums (s.u.)

*Totalionenstrom (total ion current, TIC)* – Summe der Ströme, die von den Ionen aller  $m/z$ -Werte im Spektrum erzeugt wird

*Molekülion* – normalerweise das Ion mit der höchsten Masse im Massenspektrum, das dazugehörige Signal bezeichnet man auch als Molpeak

*Fragmentionen* – bilden sich aus dem Molekülionen durch Zerfall (Primär- und Sekundärfragmentionen)

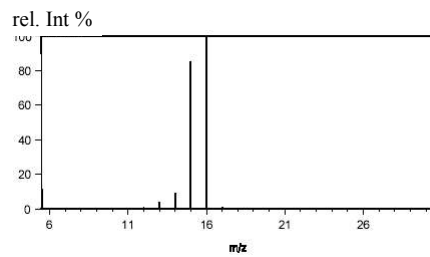
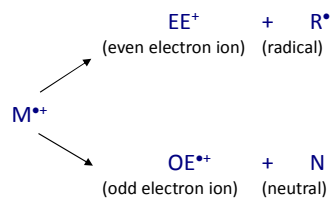


Abb. Strichspektrum

Erster Schritt: Bildung von Ionen in der Gasphase z.B. durch Elektronenstoß-Ionisation:



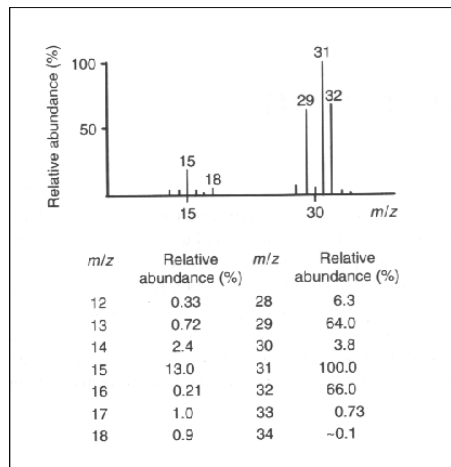
Einige der gebildeten  $M^{*+}$  zerfallen üblicherweise in verschiedene Bruchstücke (Fragmentierung). Da das gebildete Radikalkation eine ungerade Anzahl von Elektronen besitzt, kann es auf zwei verschiedenen Wegen fragmentieren:



Die gebildeten Ionen ( $\text{EE}^+$ ,  $\text{OE}^{*+}$ ) können ihrerseits wieder fragmentieren etc.

- ⇒ die meisten gebildeten Ionen tragen nur eine Ladung (z.B. Verlust eines Elektrons) aber auch mehrfach geladene Ionen können auftreten (z.B. Electrospray-Ionisation)
- ⇒ der Analysator trennt nach Masse zu Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) d.h. ein doppeltgeladenes Ion ( $z=2$ ) der Masse  $m=100$  würde bei  $m/z$  50 auftauchen





**Abb.** Massenspektrum von Methanol (Elektronenstoß-Ionisation) (graphische und tabellarische Darstellung)

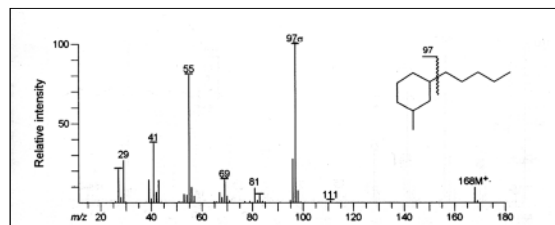
⇒ die Molekülionen ( $M^{*+}$ ) treten bei den höchsten  $m/z$ -Verhältnissen ( $m/z$  32)

⇒  $m/z$  15 zeigt ein Fragmentation (Methylgruppe) – die Differenz zu  $M^{*+}$  (17) deutet auf den Verlust von OH hin (charakteristisch für Alkohole)

⇒ das Signal bei  $m/z$  16 könnte formal durch verschiedene Ionen hervorgerufen werden:  $CH_4^{*+}$ ,  $O^+$  oder sogar  $CH_3OH^{2+}$ .

Alle Zahlen in [ $u$ ] (atomic mass units) (= Da (Dalton))	Nominalmasse	exakte Masse (isotopenrein)	mittlere Masse (natürliche Häufigkeit der Isotopen)
$C_7H_{16}$ (Heptan)	100	100.125	100.205
$C_6H_{12}O$ (Cyclohexanol)	100	100.089	100.161

$$1 u = 1 Da = 1.665402 \times 10^{-27} \text{ kg}$$

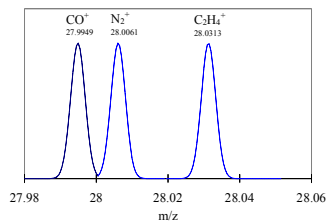
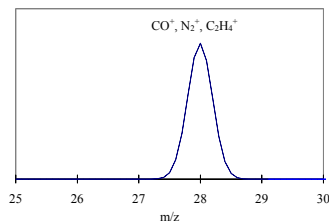
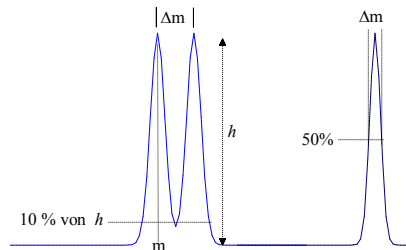


**Abb.** Massenspektrum von 1-Methyl-3-pentylcyclohexan (Elektronenstoß-Ionisation)

### Definition der Auflösung ( $R$ ) in der Massenspektrometrie

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Bei einer Auflösung  $R$  kann die Masse  $m$  gerade von der Masse  $m + \Delta m$  getrennt werden (z.B. Massendifferenz  $C_7H_{16}$  und  $C_6H_{12}O$  ist  $0.036 \text{ u} \Rightarrow$  notwendige Auflösung  $R = 100/0.036 \approx 3000$ )



**Abb.** Vergleich der Massenspektren von  $CO$ ,  $N_2$  und  $C_2H_4$  bei geringer (links  $R \sim 60$ ) und hoher Auflösung (rechts,  $R \sim 3000$ )

### Mittlere freie Weglänge der Ionen

$\Rightarrow$  alle Massenspektrometer werden unter Vakuum betrieben, da die gebildeten Ionen idealerweise ohne Stöße mit anderen Molekülen den Detektor erreichen sollen (Kollisionen würden zum Zerfall des Ions oder einer Änderung der Flugbahn führen  $\Rightarrow$  Wandverluste)

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  
 $\sigma$  = Stoßquerschnitt [ $m^2$ ]

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

$\Rightarrow 6.6 \times 10^{-8} \text{ bar}$       bzw.  $5 \times 10^{-5} \text{ Torr}$  bzw.  $6.6 \times 10^{-3} \text{ Pa}$   
 $1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$        $1 \text{ Torr} = 133.3 \text{ Pa}$

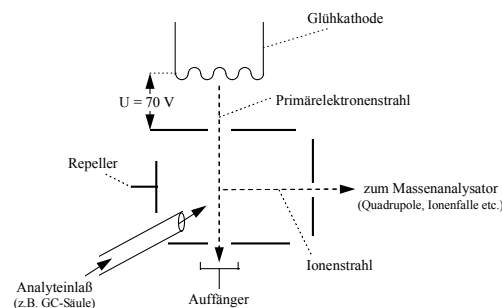
### Ionenquellen - Einlasssysteme

- ⇒ **Verdampfung vor der Ionisation**  
(EI, CI, PI)
- ⇒ **Desorption aus einer kondensierten Phase**  
(FAB, MALDI)
- ⇒ **Zerstäubung einer Lösung zu einem feinen Aerosol –Sprayverfahren**  
(ESI, APCI, TSP)

### Ionenerzeugung

#### Elektronenstoß-Ionenquellen (electron ionisation, electron impact, EI)

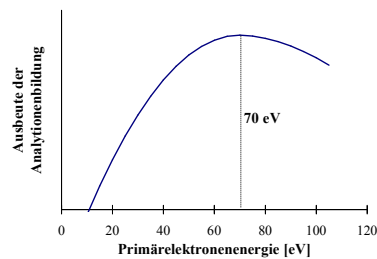
- am häufigsten verwendete Methode zur Erzeugung von Ionen
- Prinzip: Die durch einen geheizten Wolfram oder Rheniumdraht ausgesandten Elektronen werden durch ein Potentialgefälle von meist 70 V (siehe unten) beschleunigt und treffen auf die Analyten im Einlaßsystem des MS ⇒ Bildung von positiven Analytionen



- reduzierter Druck ( $10^{-2}$  -  $10^{-6}$  Torr), Temperatur 200 - 300°C (flüchtige Analyten)
- Anzahl der Elektronen wird bestimmt durch die Temperatur der Glühkathode (Filament)
- Emissionsstrom kann an der Auffängerelektrode gemessen werden
- Energie der Elektronen hängt ab vom Potentialgefälle welches die Elektronen durchlaufen

$$E_k = z \cdot e \cdot V$$

- Ausbeute der unter Elektronenbeschuss gebildeten Ionen der Probenmoleküle variiert mit der Primärelektronenenergie



**Abb.** Ionenausbeute als Funktion der Primärelektronenenergie

- unter 20 eV (Primärelektronenenergie) überwiegt die Molekülionenbildung (geringe Fragmentierung) ("Nieder-eV-Spektren")

**Vorteil:**

⇒ Informationen über Molekülgewicht unbekannter Substanzen

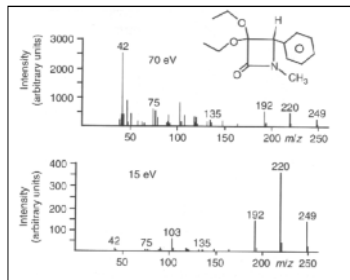
**Nachteil:**

⇒ aufgrund der thermischen Energieverteilung der Primärelektronen (Boltzmann-Verteilung) sind die Massenspektren stark vom Quellenaufbau abhängig

⇒ schlechte Reproduzierbarkeit (ungeeignet zum Aufbau von MS-Bibliotheken)

⇒ außerdem beeinflusst die sinkende Ionenausbeute (Graphik oben) die Nachweisgrenze für Analyten

⇒ üblicherweise EI-Spektren bei Primärelektronenenergien von 70 eV



**Abb.** Vergleich der EI-Spektren von  $\beta$ -Lactam bei zwei verschiedenen Primärelektronenenergien

### Mechanismus der Ionisierung

Jedem Elektron kann je nach Energie (Geschwindigkeit ( $1/2 m \cdot v^2$ )) eine Wellenlänge ( $\lambda$ ) zugeordnet werden (De Broglie):

$$\lambda = \frac{h}{m_e \cdot v} \quad \text{mit } h = \text{Plancksches Wirkungsquantum,}$$

$$m_e = \text{Elektronenmasse,}$$

$$v = \text{Geschwindigkeit}$$

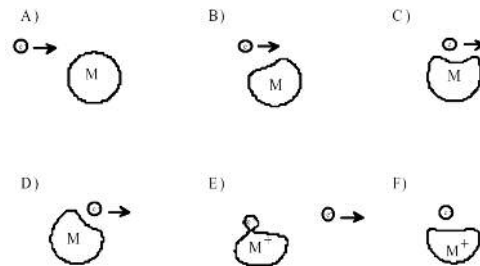
Danach beträgt die Wellenlänge 270 pm ( $2.7 \text{ \AA}$ ) für Elektronen mit einer kinetischen Energie von 20 eV und 140 pm ( $1.4 \text{ \AA}$ ) für 70 eV. Diese Wellenlängen liegen im Bereich der Bindungslängen in organischen Molekülen, z.B.:

C-C	1.54 $\text{\AA}$
C=C	1.33 $\text{\AA}$
C-H	1.1 $\text{\AA}$

$\Rightarrow$  starke Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Molekülen  $\Rightarrow$  Energieübertragung

$\Rightarrow$  übersteigt die übertragene Energie die Ionisierungsenergie des Moleküls  $\Rightarrow$  Verlust eines Elektrons (daher sollte statt dem früher verwendeten Begriff „Electron impact“ besser „Electron Ionisation“ verwendet werden)

- ⇒ die Graphik oben (Ionenausbeute/Primärelektronenenergie) erklärt sich qualitativ also wie folgt:
- ⇒ kleine Energien ( $E_{\text{kin}} < 10 \text{ eV}$ ) – keine Ionisierung (IP)
  - ⇒ mittlere Energien ( $20 \text{ eV} < E_{\text{kin}} < 100 \text{ eV}$ ) - (starke WW der Elektronen mit Molekülen ⇒ hohe Ionenausbeute
  - ⇒ hohe Energien ( $E_{\text{kin}} > 100 \text{ eV}$ ) – sehr kurze Wellenlänge der Elektronen ⇒ die Moleküle werden „transparent“ für den Elektronenstrahl

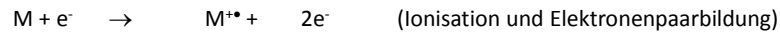


**Abb.** Vereinfachtes Schema zur Elektronenstoß-Ionisierung

#### Effizienz und Energieübertragung bei der Ionisierung:

- ⇒ Im Mittel wird lediglich ein Ion auf 1.000-10.000 Moleküle gebildet
- ⇒ ca. 15 eV (ca. 1400 kJ mol<sup>-1</sup>) werden auf die Moleküle übertragen (bei EI mit 70 eV)
- ⇒ ca. 960 kJ mol<sup>-1</sup> (10 eV) beträgt die Ionisierungsenergie organischer Moleküle
- ⇒ Überschussenergie (>IP) führt zur Fragmentierung

Hauptbildungsweg für Ionen:



aber auch



- Bildung negativer Ionen (Elektroneneinfang) unter Elektronenstoß ist ca. 1000 mal weniger wahrscheinlich als die Bildung positiver Ionen
- positive Analytionen (Radikalkationen  $M^{+\bullet}$ ) dissoziieren meist unmittelbar in der Ionenquelle (Fragmentierung,  $\mu\text{s}$ -Bereich)  $\Rightarrow$  charakteristische Massenspektren der Analyten

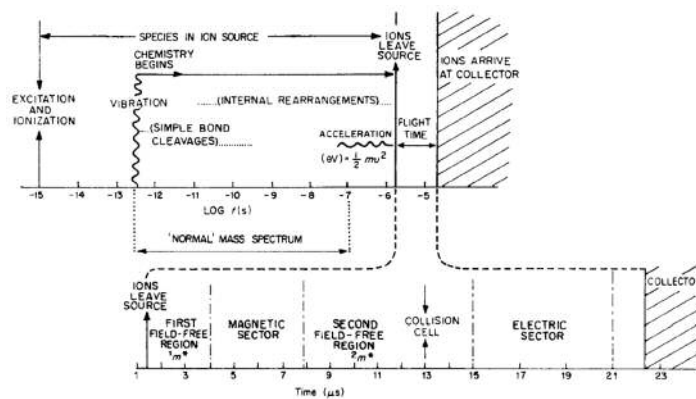
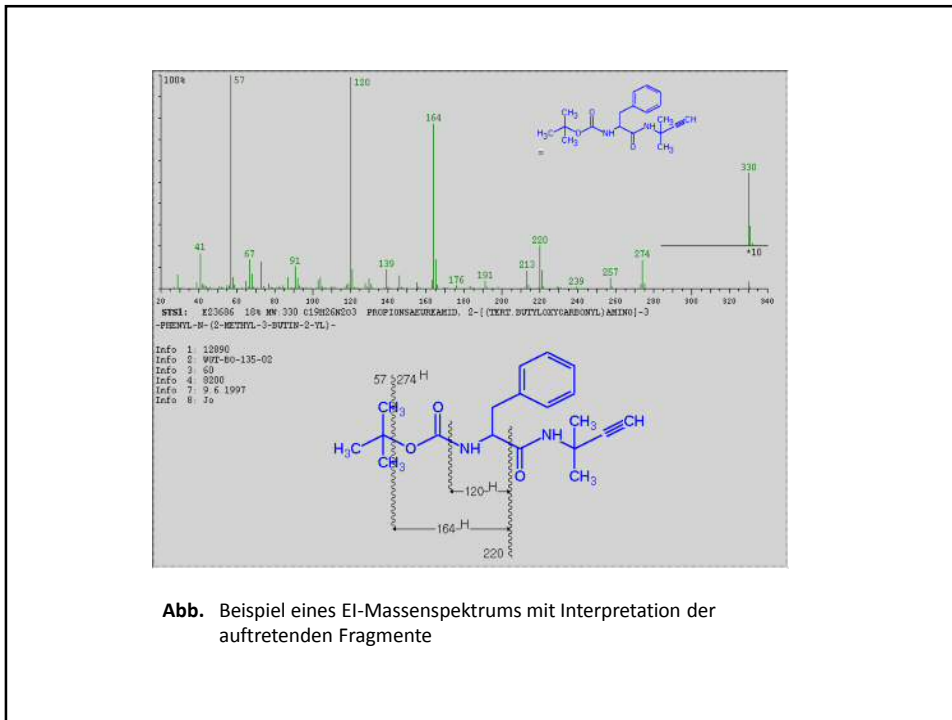
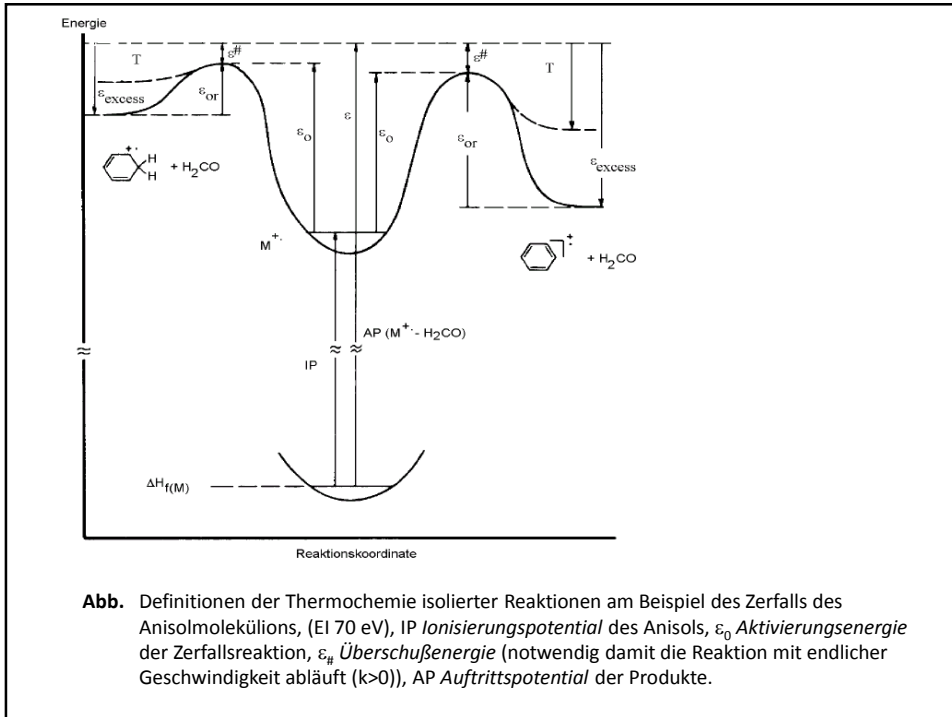


Abb. Massenspektrometrische Zeitskala (Holmes, OMS,169, 1985).



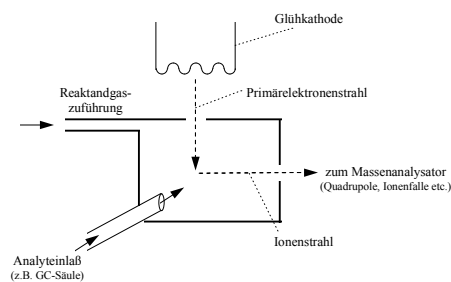


### Chemische Ionisierung (CI)

- ⇒ EI führt oft zur starken Fragmentierung der Analytmoleküle („harte Ionisierung“ z.T. keine Molekülionen)
- ⇒ CI stellt eine schonendere Ionisierungstechnik dar, bei welcher weniger Energie auf die Analytionen übertragen wird ⇒ weniger Fragmentierung

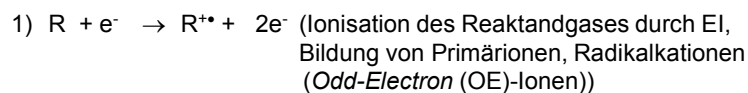
#### CI bei reduziertem Druck (oft bei GC/MS):

ein CI-Gas (Reaktandgas, z.B. Methan, Isobutan oder Ammoniak) wird durch Elektronenstoß ionisiert ⇒ die gebildeten Reaktandgasionen reagieren in der Gasphase mit den Analyten (meist Protonierung der Analyten)



- obwohl bei reduziertem Druck gearbeitet wird, muß der Druck in der Ionenquelle größer sein als bei EI-Ionisation (mittlere freie Weglänge) ( $\sim 10^{-1}$  - 1 torr) ⇒ Ionen/Molekül-Reaktionen

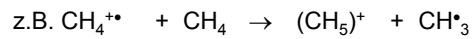
ablaufende Vorgänge (R Reaktandgas, M Analytmolekül):



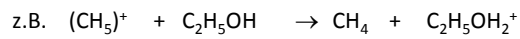
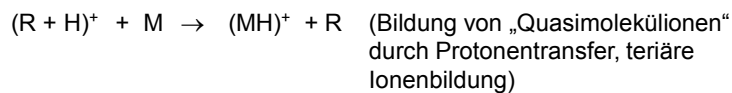
z.B. Methan:



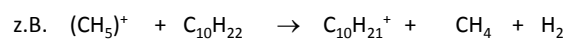
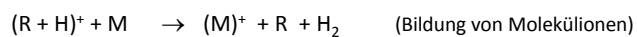
2)  $R^{\bullet} \rightarrow (RH)^+$  Bildung von Sekundärionen (Kationen, *Even-Electron* (EE)-Ionen) durch Wasserstofftransfer nach Kollision mit neutralen R)



3a) Protonentransfer (z.B. Heteroatome im Analytmolekül)



3b) Hydrid-Abstraktion (z.B. gesättigte Kohlenwasserstoffe)



- hoher Überschuss an Reaktandgas (1/1000 - 1/10000 M/R)
- die Verwendung der unterschiedlicher CI-Gase bestimmt die Gruppe von Analyten, welche in der Quelle ionisiert werden

### Protonentransfer

Protonentransferreaktionen sind im Prinzip Brönstedtsche Säure-Base Reaktionen zwischen den Reaktantgasen (z.B.  $\text{CH}_5^+$ ) als Säure (Protonendonatoren) und den Analyten als Base (Protonenakzeptoren)

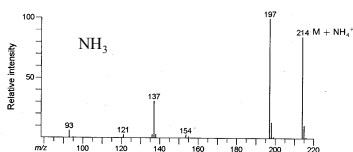
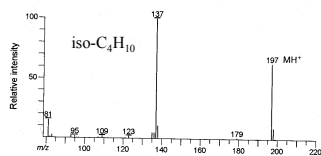
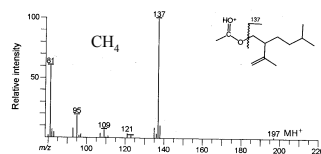
⇒ die Effizienz einer Protonentransferreaktion zwischen dem CI-Gas und dem Analyt kann anhand der Protonenaffinitäten (PA) abgeschätzt werden



Protonenaffinitäten (PA) gebräuchlicher CI-Gase z.B.  $\text{CH}_4 < \text{iso-C}_4\text{H}_{10} < \text{NH}_3$

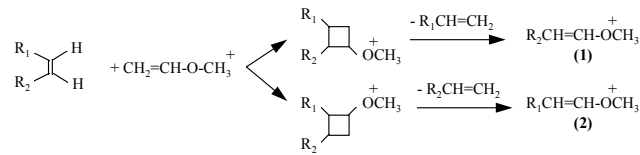
Moleküle	PA [kJ mol <sup>-1</sup> ]
$\text{CH}_4$	543
$\text{i-C}_4\text{H}_{10}$	677
$\text{NH}_3$	854
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	776

- je größer die PA des Reaktandgases desto "weicher" und selektiver ist die Ionisation (z.B. bei Einsatz von Ammoniak)
- ⇒ Ionisation von Substanzen mit sehr einer hohen Protonenaffinität, beispielsweise Amine oder Amide)



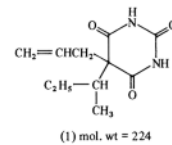
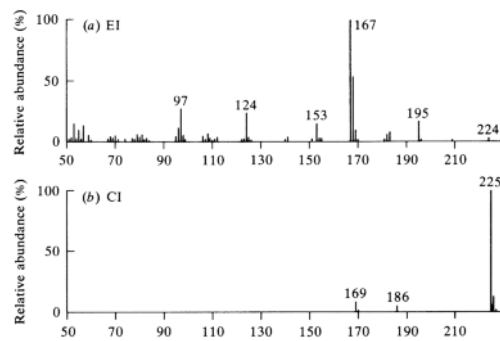
CI Massenspektren von Lavandulylacetat (MW 169) mit verschiedenen Reaktandgasen

- aber auch Strukturaufklärung durch Einsatz spezieller CI-Gase, z. B. Methylvinylether zur Lokalisation von Doppelbindungen unbekannter Analyten:



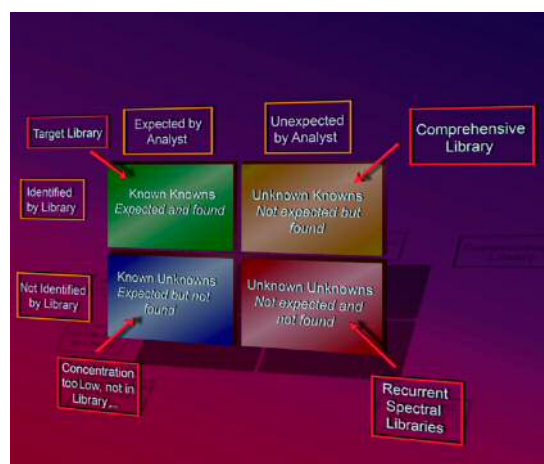
### Vergleich CI und EI

- CI ist "weichere" Ionisation als EI  $\Rightarrow$  geringere Fragmentierung der Analytionen  $\Rightarrow$  Verhältnis zwischen Molekulationen (Quasimolekulationen) und Fragmentationen ist höher  $\Rightarrow$  hilfreich zur Bestimmung von Molekülmassen unbekannter Verbindungen



- Quasimolekülonen  $(M+H)^+$  sind stabiler als Radikalkationen  $(M^+)$   
 ⇒ d.h. wenn es zur Fragmentierung kommt, ist der Informationsgewinn aus der Abspaltung des Neutralteilchens größer (nur Abspaltung besonders stabiler Neutralteilchen ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $HCOOH$ )) ⇒ weniger Strukturinformationen, aber diagnostisch z. T. wertvoller

### Massenspektrometrische Möglichkeiten zur Strukturaufklärung/Identifizierung unbekannter Substanzen



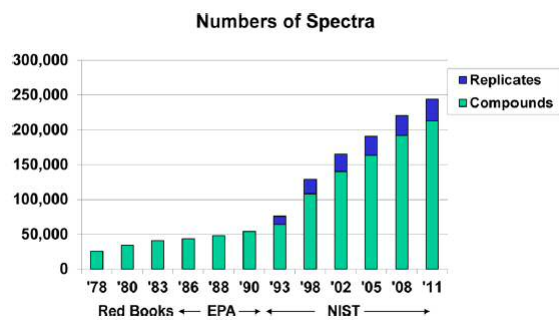
S. Stein (2012) Mass Spectral Reference Libraries: An Ever-Expanding Resource for Chemical Identification, doi.org/10.1021/ac301205z | Anal. Chem. 2012, 84, 7274–7282

## Massenspektrometrische Möglichkeiten zur Strukturaufklärung/Identifizierung unbekannter Substanzen

### 1) Aufnahme kompletter Spektren (EI), niedrige Auflösung ( $R \leq 1000$ )

#### a) Vergleich mit MS-Datenbanken

(Auftreten bestimmter  $m/z$ -Verhältnisse und deren Intensitäten wird mit Referenzsubstanzen verglichen)



Numbers of compounds and replicate spectra in the NIST/  
EPA/NIH mass spectral library of electron ionization spectra

**Abb.** Beispiel einer Bibliothekssuche eines EI-Spektrums einer unbekanntan Substanz

Wiley Reference

Id:145003 CAS RegNO:120-12-7 Formula:C14 H10  
 Anthracene [CAS] Anthracin Green Oil Paranaphthalene  
 Mw: 178 Qindex: Source:  
 WLN: L C666J

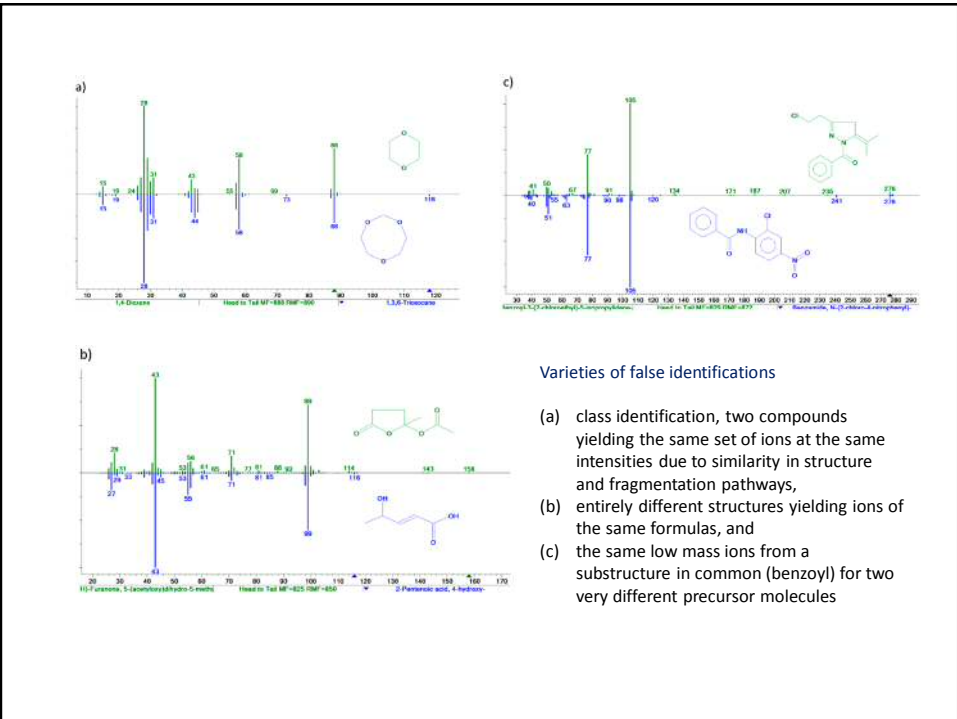
REF CAS No.:120-12-7 Anthracene [C

1 91% RL [WILEY6] Anthracene [CAS]  
 2 76% RL [WILEY6] Phenanthrene [CA  
 3 74% RL [WILEY6] Phenanthrene  
 4 68% RL [WILEY6] Benzene, 1,1'-(1,2  
 5 63% RL [WILEY6] BENZ[A]AZULENE

- verschiedene Vergleichsalgorithmen (z.B. "fit", "reverse fit")
- unterschiedliche EI-Datenbanken (z.B. Wiley ca. 390.000 Spektren, NIST)

## AMDIS (NIST)

Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System



# Mass Spectrum Interpreter

The mass spectrum interpreter is a utility developed at NIST to assist in the evaluation of mass spectra.

The major peaks in a mass spectrum can be rationalized using estimates of bond dissociation energies and a limited number of well-understood reaction paths (Ion Thermochemistry in the gas phase)

The Interpreter finds possible structural origins of peaks in a mass spectrum and provides formula and isotopic processing utilities. It operates in conjunction with MS Search Programs.

ion = red  
neutral = black  
bond break/migration shown

Possible formulas of selected ion or loss

Different paths leading to ion ranked by rate

m/z, ion & loss formula, H-loss/gain, relative rate

Color coded according to reaction type

Explained = black  
Unexplained = white

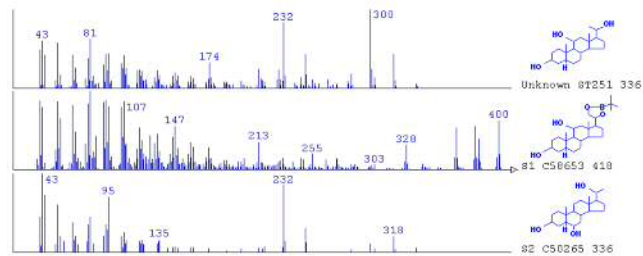
Isotopic clusters marked

Not Shown:  
Quality Index Values  
Peaks inconsistent with formula  
Isotope Calculator  
Precursor m/z adjuster

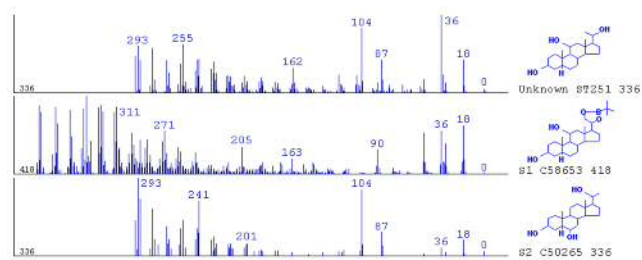
Moving peak/loss m/z counter



**Alternativ zum reinen Vergleich mit Bibliotheken:**  
Software-unterstützte "Ähnlichkeitssuche" (z. B. MassLib)



**Abb.** Beispiel einer Bibliothekssuche mit MassLib (normale Darstellung der EI-Spektren einer unbekanntes (oben) und zweier Bibliotheksspektren)



**Abb.** Massenspektren wie oben (MassLib-Demo – gleiche Substanzen) nun dargestellt als Differenz der registrierten  $m/z$ -Verhältnisse zum jeweiligen Molekülion.

⇒ Möglichkeit einer Substanzidentifizierung auch ohne Referenzspektrum

### 1) b) Interpretation der Massenspektren & Fragmentierungswege

- mit Hilfe von Monographien wie McLafferty (Interpretation von Massenspektren)

Einige Basisregeln (für typische organische Verbindungen (C, H, O, S, N und Halogene enthaltend):

#### Die Stickstoff-Regel

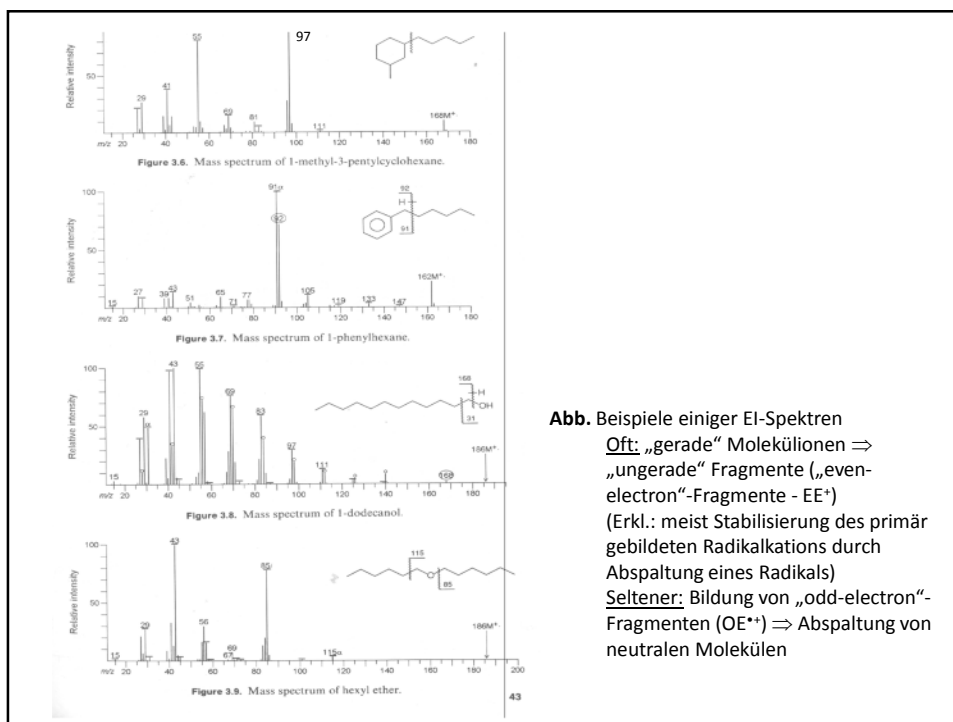
- ⇒ enthält eine Verbindung kein (oder eine gerade Anzahl) Stickstoffatom(e) wird das Molekölion eine gerade Zahl sein (Achtung bei Cl ! Quasimolekölionen !)
- ⇒ enthält eine Verbindung ein (oder eine ungerade Anzahl) Stickstoffatom(e) wird das Molekölion eine ungerade Zahl sein

#### Logische Neutralverluste

- ⇒ die bei der Fragmentierung abgespaltenen Neutralteilchen sollten „nachvollziehbar“ sein ⇒ vom Molekölion ausgehend sind Verluste von 4 - 14 und 21 – 25 sehr unwahrscheinlich

#### Wichtigkeit von Signalen im Massenspektrum

- ⇒ steigende Intensität
- ⇒ steigende Masse



**Abb.** Beispiele einiger EI-Spektren  
**Oft:** „gerade“ Molekülionen  $\Rightarrow$  „ungerade“ Fragmente („even-electron“-Fragmente - EE<sup>+</sup>)  
 (Erkl.: meist Stabilisierung des primär gebildeten Radikalkations durch Abspaltung eines Radikals)  
**Seltener:** Bildung von „odd-electron“-Fragmenten (OE<sup>+</sup>)  $\Rightarrow$  Abspaltung von neutralen Molekülen

## 2) Auswertung der Isotopenverteilung (meistens Molekülionen)

- insbesondere aus  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ ,  $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ ,  $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ ,  $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$
- auch mit Instrumenten mit niedriger Auflösung
- beschränkt auf kleinere oder mittlere Molekülmassen (< 1000)

### Klassifizierung der Elemente in 3 Kategorien:

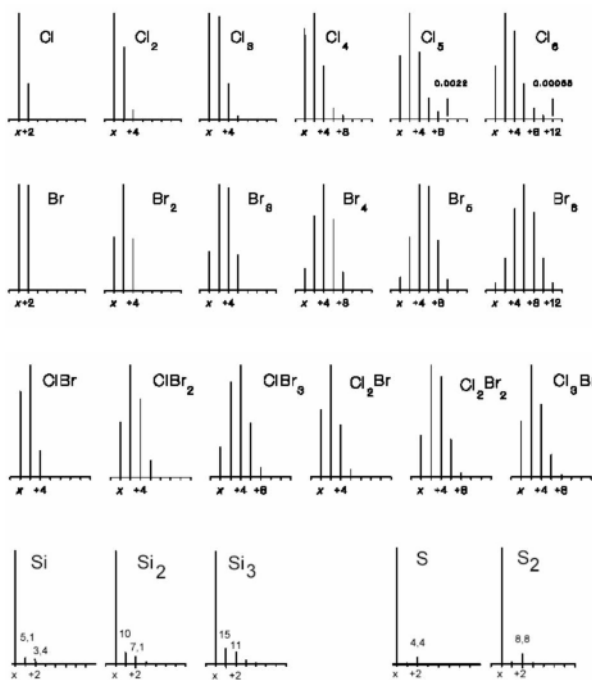
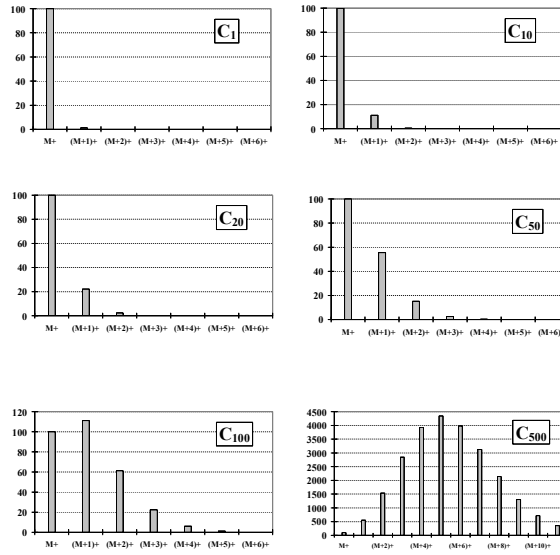
**„A“-Elemente:** lediglich ein Isotop in „relevanten“ Anteilen

**„A+1“-Elemente:** zwei Isotope, das schwere 1 Masseneinheit schwerer als das Hauptisotop

**„A+2“-Elemente:** zwei wichtige Isotope, das schwere 2 Masseneinheit schwerer als das Hauptisotop

Element	A		A + 1		A + 2		Kategorie
	Masse	%	Masse	%	Masse	%	
H	1	100	2	0.015			„A“
C	12	100	13	1.1			„A + 1“
N	14	100	15	0.37			„A + 1“
O	16	100	17	0.04	18	0.2	„A + 2“
F	19	100					„A“
Si	28	100	29	5.1	30	3.4	„A + 2“
P	31	100					„A“
S	32	100	33	0.79	34	4.2	„A + 2“
Cl	35	100			37	32.0	„A + 2“
Br	79	100			81	97.3	„A + 2“
I	127	100					„A“

**Methoden zur Identifizierung unbekannter organischer Substanzen**  
 Molekülionen-Intensitäten und Isotopenverteilung  
 (basierend auf  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverteilung)  
 relative  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit 1.1%



**Abb.** Wichtige Isotopenmuster  
 (ohne Berücksichtigung  
 anderer Isotopenbeiträge,  
 z.B. Kohlenstoff)

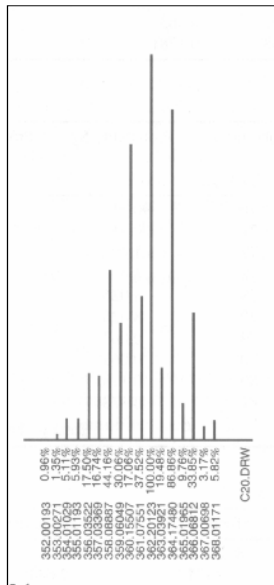


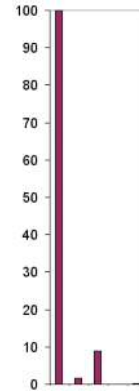
Abb. Isotopenmuster des Molekülions von  $C_9H_{16}Se_3$   
(aus DeHoffmann/Stroobant)

**Berechnung der Isotopenverteilung – Ein Beispiel**  
**Schwefelkohlenstoff  $CS_2$**

Isotop	rel. Häufigkeit [%]
$^{32}S$	95.02
$^{33}S$	0.75
$^{34}S$	4.21

mögliche Kombinationen	Masse	statistische Wahrscheinlichkeit
$^{32}S\ ^{32}S$	64	$0.9502 \times 0.9502 = 0.9031$
$^{32}S\ ^{33}S$ oder $^{33}S\ ^{32}S$	65	$(0.9502 \times 0.0075) \times 2 = 0.0142$
$^{32}S\ ^{34}S$ oder $^{34}S\ ^{32}S$	66	$(0.9502 \times 0.0421) \times 2 = 0.080$
$^{33}S\ ^{33}S$	66	$0.0075 \times 0.0075 = 5.6 \times 10^{-5}$
$^{33}S\ ^{34}S$ oder $^{34}S\ ^{33}S$	67	$(0.075 \times 0.0421) \times 2 = 0.00063$
$^{34}S\ ^{34}S$	68	$0.0421 \times 0.0421 = 0.00178$

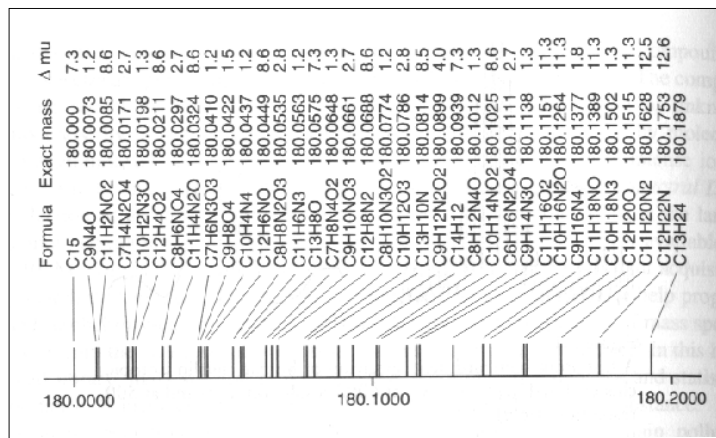
Nominalmasse	%	% des intensivsten Signals
64	90.31	100
65	1.42	1.5724
66	8.026	8.889
67	0.063	0.06975
68	0.1781	0.1972



⇒ aber auch kommerzielle Software zur Berechnung der Isotopenverteilung (z.B. IsoPro 3.0)

### 3) genaue Massenbestimmung des isotopenreinen Moleküllions

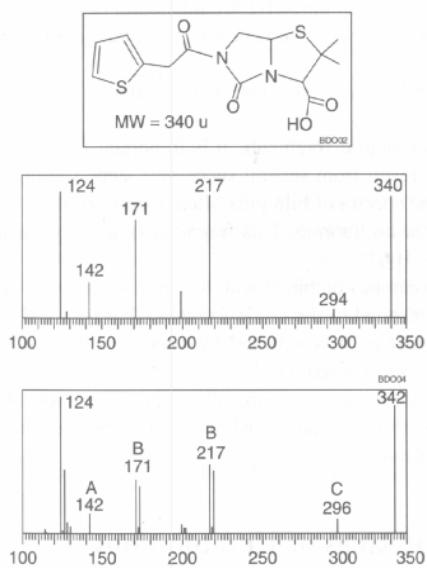
- z.B. Heptan/Cyclohexanol (Tabelle oben)  $\Delta m = 0.036 \text{ u}$  (notwendige Auflösung ca. 3000)
- für größere Moleküle (bis max.  $m/z$  1000) werden hochauflösende Instrumente notwendig
- exakte Massenkalisierung ist eine wesentliche Voraussetzung z.B. über sogenanntes "Peak Matching", Beschleunigungspotentiale  $V_r$  (Referenzsubstanz  $m_r$ ) und  $V_x$  (unbekannte Substanz,  $m_x$ ) werden
- abgeglichen,  $m_x = m_r \cdot (V_r/V_x)$  oder Interpolation zwischen sehr genau bekannten PFK (Perfluorkerosin)-Signalen



**Abb.** Exakte Massen und Summenformeln einiger möglicher Ionen im Bereich von  $m/z$  180 (nur C, H, N und O)

[http://www.chemcalc.org/mf\\_finder/mfFinder\\_em\\_new](http://www.chemcalc.org/mf_finder/mfFinder_em_new)

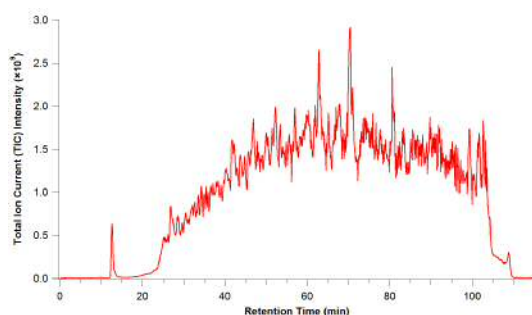
#### 4) MS/MS-Untersuchungen



**Abb.** Produktionspektren aus der Fragmentierung des Molekülions und des korrespondierenden (M+2)-Ions einer Schwefelverbindung; (A) nicht verschobene Signale - daher ohne Schwefel (B) „doppelte“-Signale - daher ein Schwefel im Fragment (C) einfache Signale um 2 Massen verschoben - daher beide S im Fragment (aus DeHoffmann/Stroobant)

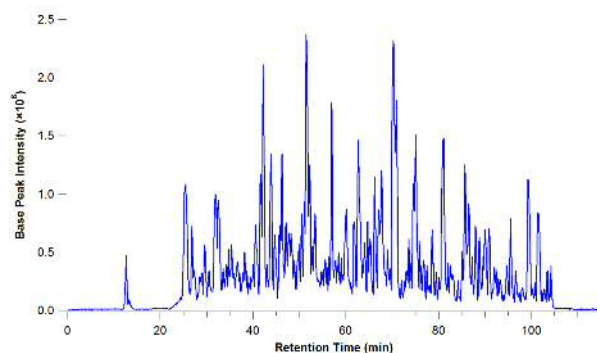
### Total ion current (TIC) chromatogram

The total ion current (TIC) chromatogram represents the summed intensity across the entire range of masses being detected at every point in the analysis. The range is typically several hundred mass-to-charge units or more. In complex samples, the TIC chromatogram often provides limited information as multiple analytes elute simultaneously, obscuring individual species.



### Base peak chromatogram

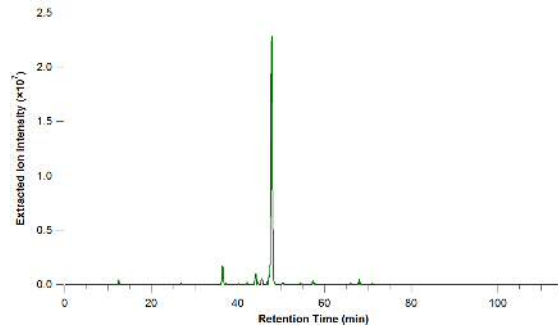
The base peak chromatogram is similar to the TIC chromatogram, however it monitors only the most intense peak in each spectrum. This means that the base peak chromatogram represents the intensity of the most intense peak at every point in the analysis. Base peak chromatograms often have a cleaner look and thus are more informative than TIC chromatograms because the background is reduced by focusing on a single analyte at every point.





### Extracted ion chromatogram (XIC) / Selected Ion Monitoring (SIM)

In an extracted ion chromatogram (XIC or EIC), also called a reconstructed ion chromatogram (RIC), one or more  $m/z$  values representing one or more analytes of interest are recovered ('extracted') from the entire data set for a chromatographic run. The total intensity or base peak intensity within a mass tolerance window around a particular analyte's mass-to-charge ratio is plotted at every point in the analysis.



A selected ion monitoring (SIM) chromatogram is similar to an XIC, with the exception that the mass spectrometer is operated in SIM mode, such that only a selected  $m/z$  value (or more) is/are detected in the analysis

### Quantitative Analysen

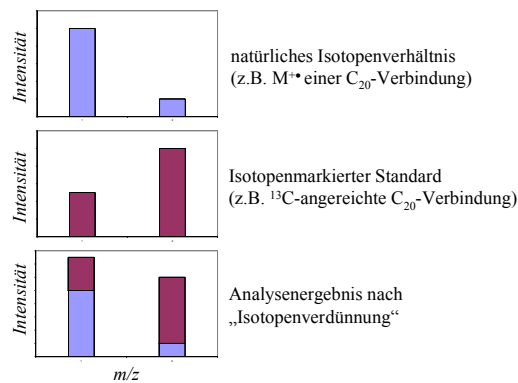
generell sind Massenspektrometer vergleichsweise instabile Detektoren (z.B. im Vergleich mit FID), ausgelöst durch chemischen oder elektronischen "Untergrund", abnehmende Empfindlichkeit ("Instrumentendrift"), ungenügende Ionenstatistik etc.

- a) *Aufnahme einzelner ausgesuchter  $m/z$ -Verhältnisse* ("single ion monitoring" (SIM), „selected ion recording" (SIR), "multiple (single) ion detection")
- insbesondere geeignet in Kombination mit chromatographischen Techniken (GC/LC)
  - Verbesserung der Nachweisgrenze (bis zu 2 Größenordnungen) (Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird verbessert, bessere Ionenstatistik)
  - gleichzeitige Quantifizierung charakteristischer Isotopensignale kann die Verlässlichkeit der Analysenergebnisse erhöhen
  - Quantifizierung über Signalflächen oder -höhen

*b) Interne und externe Standards*

- **externe Standards** (unbekannte Probe und Kalibrationsstandard werden getrennt analysiert) sind geeignet wenn kein Einfluß von der Probenmatrix zu erwarten ist und die Anforderungen an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Resultats nicht hoch sind
- **interne Standards** (andere, aber chemisch/physikalisch ähnliche Verbindungen) können den Einfluß kritischer Analysenschritte (z.B. Probenahme- und Injektionsvolumen, Extraktionseffizienz) auf das Analysenergebnis eliminieren (homologe Substanzen, analoge Substanzen (z.B. mit anderen Heteroatomen)) meist in Verbindung mit externer Kalibration – oft deuterierte Analyten z.B. für die Drogenanalytik (Opiate, Amphetamine, Kokain and Cannabis in Urin) oder PAH-Analytik (z.B. 10D-Anthracen – Böden-Luft )
- “Standardaddition”

- **Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie** - eine bekannte Menge einer isotoopenmarkierten, ansonsten identische Verbindungen (z. B.  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ,  $^{127}\text{I}/^{129}\text{I}$ ,  $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ , H/D) wird der Probe zugesetzt – in vielfacher Hinsicht „ideale“ Kalibrationsmethode
- ⇒ eine Vielzahl von Einflüssen auf das Analysenergebnis wird kompensiert (nicht nur Matrixeffekte und Instrumentendrift sondern auch z.B. Probenahmeartefakte, Verluste während der Probenvorbereitung)
- ⇒ nur noch das Isotopenverhältnis muss zur Quantifizierung bestimmt werden



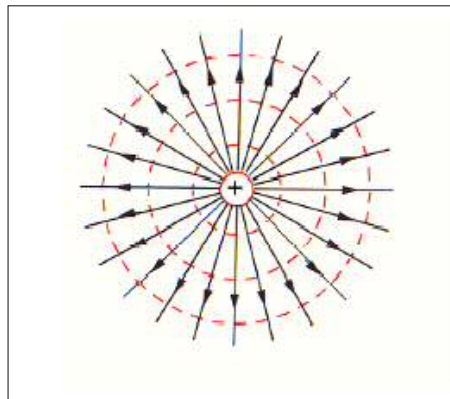
**Abb.** Darstellung des Prinzips der Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie anhand der Verhältnisse zweier Massen (z.B.  $M^{+}$  und  $(M+1)^{+}$   $\Rightarrow$  durch  $^{13}C$ )

### Desorptionsmethoden

- größere organische Moleküle (z.B. im Bereich der Bioanalytik, klinischen Analytik oder Polymeranalytik) können nicht oder nur unter Zersetzung in die Gasphase überführt werden. Die nachfolgenden Methoden erlauben auch die Desorption/Ionisation von Substanzen in der kondensierten Phase

### Feld-Ionisation (FI) und Feld-Desorption (FD)

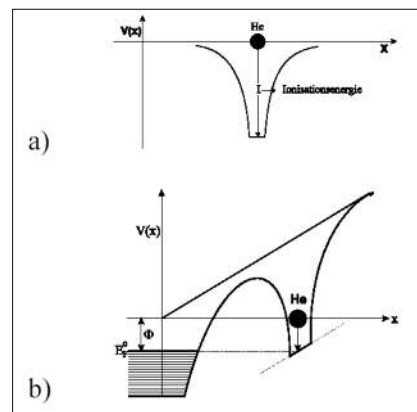
- als Ionisationsmethode für die Massenspektrometrie durch Beckey (1959), davor bereits für die Feldionenmikroskopie genutzt
- Prinzip: Analyten werden auf einer (Metall)-Oberfläche (*field emitter*) deponiert und dort hohen elektrischen Feldstärken ausgesetzt (ca.  $1 \text{ V/\AA}$ )
- zur Erreichung derartig hoher Feldstärken werden Oberflächen mit sehr kleinen Radien benötigt (z.B. Spitzen, dünne Drähte)(siehe Abb.)



**Abb.** Feldlinien (electric field lines) um eine Punktladung  $\Rightarrow$  da die elektrische Feldstärke proportional zur Feldliniendichte ist, steigt mit sinkendem Radius der Ladung die elektrische Feldstärke an.

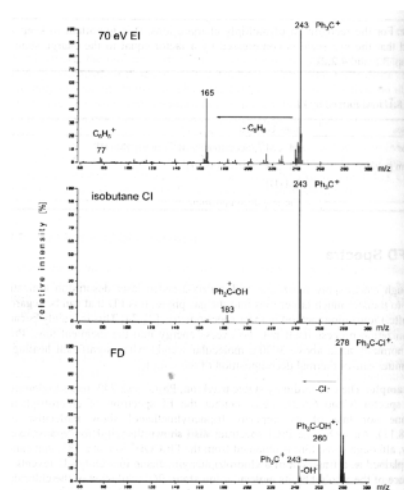
- **Prozess der Feldionisation:**

$\Rightarrow$  Bei einem freien Atom (ohne Feld) sind die Elektronen in einem symmetrischen Potentialtopf eingeschlossen. Das äußerste Elektron kann nur unter Aufwendung der Ionisationsenergie  $I$  befreit werden (a).



**Abb.** Eindimensionales Energieschaubild für ein freies Atom (a) und für ein Atom nahe einer Oberfläche mit hohem elektrischen Feld (b)

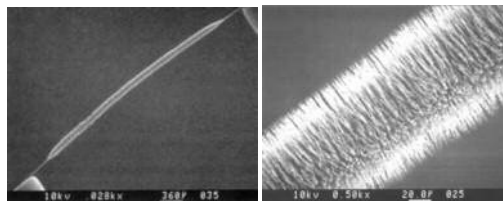
- ⇒ existiert ein inhomogenes Feld nahe der Oberfläche wird der Potentialtopf asymmetrisch verbogen (Abb. (b)). Befindet sich das Atom sehr nahe an der Oberfläche, dann ist der trennende Potentialwall schmal und kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit durchtunnelt werden.
- ⇒ Ionisation des Atoms (Bildung eines Kations) und Beschleunigung des Ions weg von der Oberfläche ins MS (Feldionenmikroskopie ⇒
- Im Gegensatz zu EI wird keine oder nur eine geringe Überschussenergie übertragen ⇒ geringe Fragmentierung



**Abb.** Vergleich von EI, CI und FD Massenspektren von Chlor-Triphenylmethan (verunreinigt mit Triphenylmethanol).

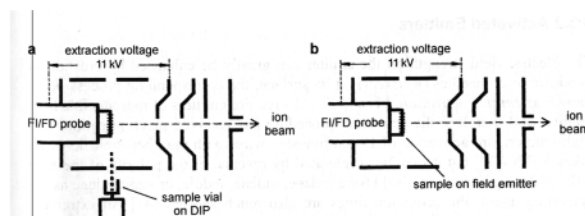
### Aufbau der FI-/FD-Quelle

- Verwendung von dünnen Wolframdrähten als Emitter
- Erhöhung der Feldstärke durch Mikronadeln („whiskers“) auf der Oberfläche des Emitters („*activated emitter*“)
- Aktivierung der Emitteroberfläche z.B. durch kontrolliertes Aufwachsen von Kohlenstoffnadeln durch Hochtemperatur-Pyrolyse von Benzol, Inden etc. (aber auch Silizium- oder metallische Whisker können pyrolytisch oder elektrochemische gewonnen werden)

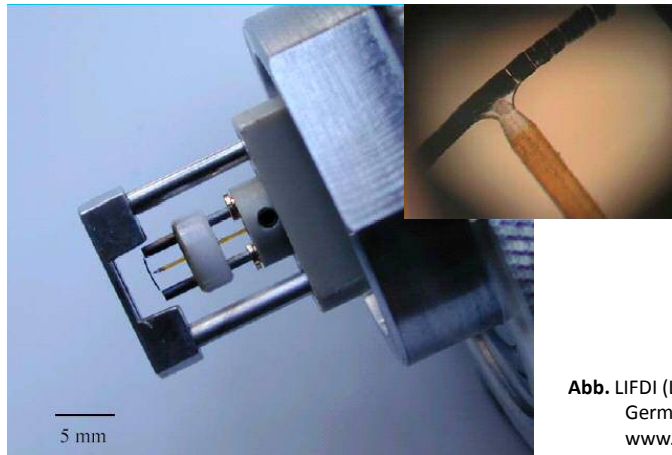


**Abb.** Wolframdraht (10  $\mu\text{m}$ ) mit Kohlenstoffnadeln ([www.carbotec.com](http://www.carbotec.com))

- **Feldionisation (FI):** Verdampfung des Analyten und Überführung in die Nähe des Emitters (z.B. GC/MS)  $\Rightarrow$  vergleichsweise geringe Empfindlichkeit
- **Felddesorption (FD):** Probe wird direkt auf den Emitter überführt
- **Liquid Injection Field Desorption Ionization (LIFDI):** da die Beladung des Emitters ausserhalb der Ionenquelle des Massenspektrometers zeitaufwendig ist (und z.B. für luftempfindliche Analyten ausgesprochen umständlich)  $\Rightarrow$  Überführung der Analyten durch Kapillaren auf die Rückseite des Emitters



**Abb.** Schema des instrumentellen Aufbaus bei FI (a) und FD (b)



**Abb.** LIFDI (Linden CMS,  
Germany  
[www.fdms.de](http://www.fdms.de))

Nachdem die Probe auf den Emitter aufgebracht wurde  $\Rightarrow$  Anlegen einer Hochspannung (mehrere Kilovolt) zwischen Emitter und Gegenelektrode  $\Rightarrow$  gleichzeitiges Aufheizen des Emitters  $\Rightarrow$  charakteristisch ist die Bildung von Molekülionen ( $M^+$ ) und  $[M+Na]^+$   $[M+H]^+$ .

**Vorteile von FI/FD:**

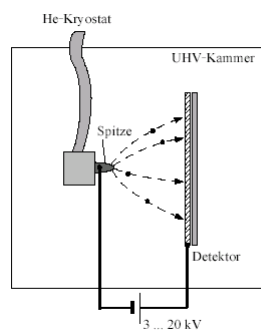
- einfache Massenspektren
- geringer chemischer Untergrund
- geeignet für kleinere organische Analyten (z.B. Zucker), „empfindliche“ Analyten (z.B. metallorganische Verbindungen), Oligomere/Polymere und insbesondere auch unpolare höhermolekulare Analyten (z.B. petrochemische Fraktionen)

**Nachteile:**

- Emitter sind mechanisch sehr empfindlich
- relativ hohe Analysenzeiten (keine Kopplung mit LC)
- nicht anwendbar wenn die Analyten bei den Desorptionsbedingungen thermisch unbeständig sind  $\Rightarrow$  Molekulargewichte bis zu 3000 Da

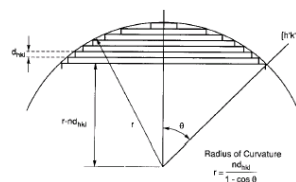
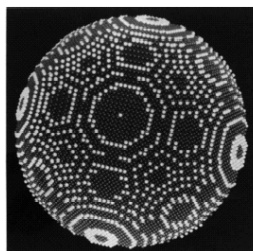
### Exkurs: Feldionisationsmikroskopie (FIM)

- da die Bildung von Ionen von der lokalen Feldstärke und damit von der Oberflächenstruktur (Radien, Kanten etc.) des Emitters abhängt, kann die Oberflächenbeschaffenheit des Emitters mittels des FD-Effekts abgebildet werden
- ionisiert werden in diesem Fall Gasatome (z.B. He) in unmittelbarer Nähe der Emitteroberfläche  $\Rightarrow$  die Anzahl der gebildeten Ionen ist an Orten hoher Feldstärken (z.B. Kanten von Gitterlagen) größer  $\Rightarrow$  Ionen werden von der Oberfläche weg beschleunigt und an einem Detektor registriert  $\Rightarrow$  Abbildung der Emitteroberfläche mit atomarer Auflösung



**Abb.** (links) Schema eines Feldionen-Mikroskops

**Abb.** (unten links) Kugelmodell einer kristallinen Spitze. Ecken- und Kantenatome sind hell hervorgehoben.





### Fast Atom Bombardment (FAB)

- entwickelt durch Barber 1980
- Prinzip: Beschuss der Analyten mit schnellen, schweren Atomen (z.B. Xe)  
Herstellung schneller Atome: Ionisierung von Xe  $\Rightarrow$  Xe<sup>+</sup>, dann Beschleunigung in einem elektrischen Feld und Einführung des Ionenstrahls in eine Xe-gefüllte Kammer:

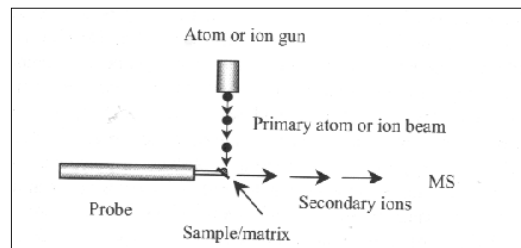


Abb. Fast Atom Bombardment-Quelle

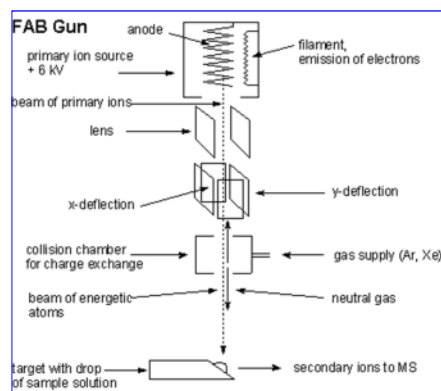
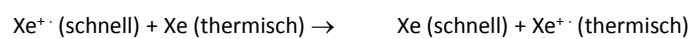


Abb. FAB-Kanone



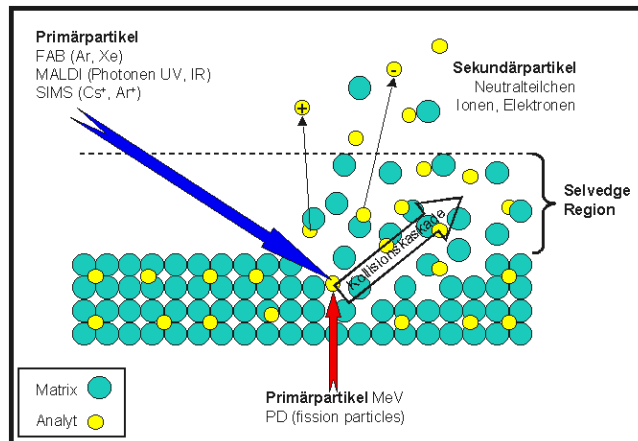
- ca.  $10^{10}$  Atome  $s^{-1} mm^{-2}$
  - Analyt ist aufgelöst in einer schwerflüchtigen, flüssigen Matrix (hauptsächlich Glycerin) Konzentration nM bis mM
  - kinetische Energie der Xenonatome (manchmal auch  $Cs^+$  (**Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS)**) (im keV Bereich) führt zur Desorption/Ionisation der Analytmoleküle (Zucker, Peptide und Nucleotide)
  - Effektivität der Ionenbildung nimmt **mit zunehmender Masse der Primärteilchen zu** (heute wird praktisch ausschließlich mit beschleunigten Xenon Atomen oder seltener mit thermisch erzeugten Cäsium-Ionen als Primärpartikel bei FAB-MS gearbeitet).
  - FAB-MS führt zu **kontinuierlichen, relativ intensiven Ionenströmen**, weil die vom Primärstrahl zerstäubte Oberfläche des Matrixtropfens ständig erneuert wird.
  - Probensubstanzen müssen in der Matrix **molekular gelöst** sein. Verfügt der Analyt über oberflächenaktive Eigenschaften, wird ein besonders empfindlicher FAB-MS Nachweis beobachtet
- ⇒ Hinweis auf den FAB-Mechanismus (*sog. precursor Modell*) ⇒ vorgebildete ionische Analytmoleküle an der Oberfläche des Matrixtropfens werden direkt desorbiert und massenspektrometrisch analysiert

Wechselwirkungen des keV-Primärteilchens mit den Matrixtropfen/Analyten führen allerdings auch zu Ionisationsreaktionen:

#### **Vorgänge bei der Desorption/Ionisation:**

- Beim Eindringen in die flüssige Matrix geben die **keV-Primärpartikel** in einer Stoßkaskade ihre kinetische Energie ab, wobei sich bis zu 150 Å tiefe Krater in der Tropfenoberfläche bilden (*impact cavities*).
- Ca. **1000 Matrixmoleküle** mit den darin gelösten Analytmolekülen pro Primärpartikel werden in einem Zeitfenster von  $10^{-10}$  s desorbiert.
- Die kinetische Energie des auftreffenden Primärteilchens führt zu einer kurzzeitigen **thermischen Erhitzung** (*thermal spike*).
- Nachfolgend **sinkt die innere Energie** der thermisch angeregten Moleküle nachhaltig, da intermolekulare Wechselwirkungen der flüssigen Phase überwunden werden und ähnlich eines Überschall-Strahls eine Ausdehnung ins Vakuum erfolgt (*supersonic jet*).
- Es resultiert ein Übergangsbereich zwischen flüssiger Matrix und dem Vakuum (*selvedge region*).

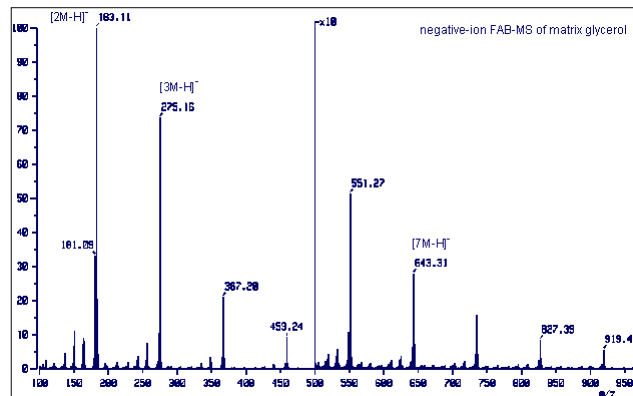
- Diese Region ist gekennzeichnet durch hohen Druck bzw. hohe Teilchendichte  $\Rightarrow$  die **mittlere freie Weglänge** in dieser Region ist **kurz**, so dass die Analytmoleküle beim Durchtritt viele Stöße erleiden, die ihre Energie moderieren und zudem Ion-Molekülreaktionen verursachen.



**Abb.** Vorgänge bei verschiedenen Desorptionsmethoden (aus: www.uni-koeln.de)

$\Rightarrow$  Das Entstehen der *selvedge region* bei FAB-MS ist demnach verantwortlich für die **sanfte Desorption und Ionisation** selbst labiler Analytmoleküle. Die Überwindung intermolekularer Wechselwirkungen und die Ausdehnung ins Vakuum erfolgen aus dem Reservoir der inneren Energie, sodaß die desorbierten Moleküle stark abkühlen. Es verbleibt letztlich **wenig Überschussenergie** bei den generierten Ionen, womit das Auftreten von intensiven kationisierten Quasimolekülionen ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  etc.) und das **weitgehende Fehlen von Fragmentierungen** erklärt werden können.

- werden negative Ionen detektiert, treten Ionen des Typs  $[M-H]^-$  durch Abstraktion eines Protons auf.
- FAB-MS-Spektren zeigen für die Matrix charakteristische Ionenserien (z.B. Glycerin:  $[(Gly)_n+H]^+$  n= 1-15 bzw.  $[(Gly)_n-H]^-$  n= 1-15)



**Abb.** „Hintergrundspektrum“ im negativen Ionenmodus einer Glycerinmatrix

- durch unvollständige Desolvatation der desorbierten Molekülverbände können Mischclusterionen des Typs  $[M+m+H]^+$  (mit M: Analytmolekül; m: Matrixmolekül) auftreten.

- als Referenzsubstanzen für Massenfeinbestimmungsexperimente und Kalibrierung eignen sich die **Cluster der Matrixsubstanzen** (Glycerin:  $[(Gly)_n+H]^+$  n= 1-15) bzw. die Cluster von anorganischen Salzen wie z.B. Csl  $[(Csl)_nCs]^+$  mit n=1-48.
- als **Matrixsubstanzen** werden verschiedene Protonendonoren, Protonenakzeptoren und auch aprotische schwerflüchtige Verbindungen eingesetzt.

hauptsächlich:

Glycerin

Thioglycerin

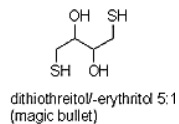
Nitrobenzylalkohol (NBA)



glycerol



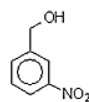
thioglycerol



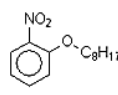
dithiothreitol-erythritol 5:1 (magic bullet)

einige FAB-

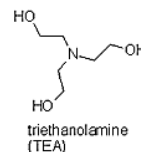
Matrixsubstanzen



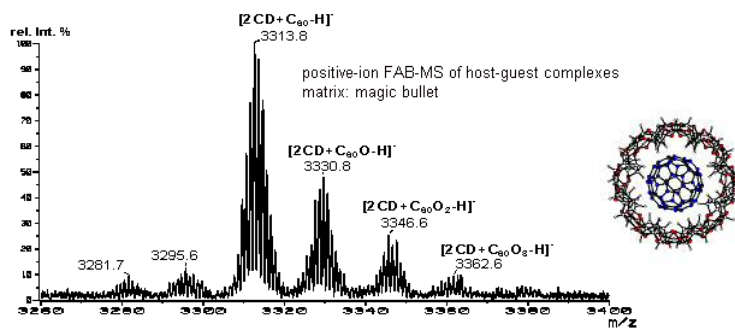
3-nitrobenzyl alcohol (3-NBA)



2-nitrophenyl octylether (NPOE)



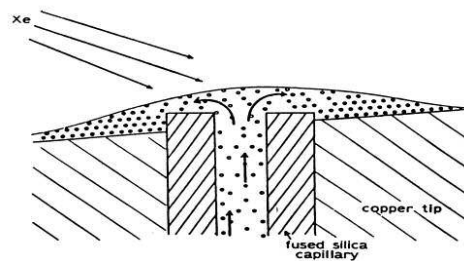
triethanolamine (TEA)



**Abb.** Wirt-Gast (*Host-guest*)-Komplexe von Cyclodextrinen mit Fullerenoxiden (negative-ion mode, „magic bullet“-Matrix).

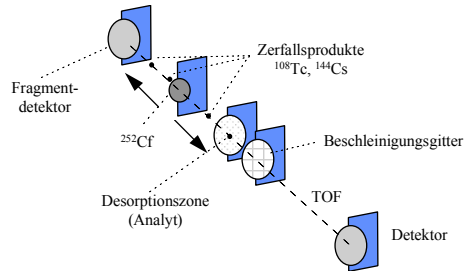
**Kontinuierliches FAB**  
(Continuous flow FAB)

- Möglichkeit zur Kopplung mit der Flüssigchromatographie



### <sup>252</sup>Cf Plasma Desorption

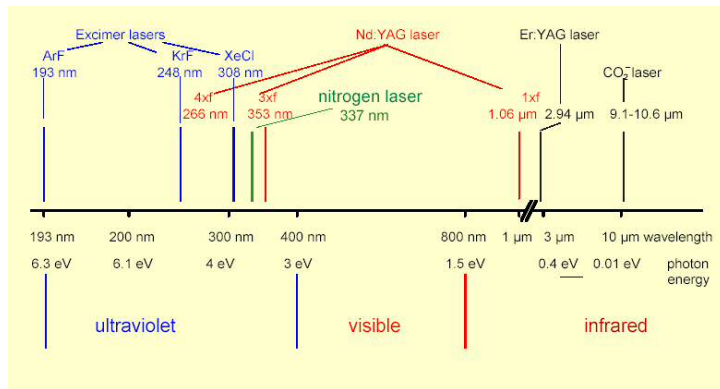
- nutzt den Kernzerfall von Californium-252 in leichtere Nuklide mit Massen um Technecium-108 und Cäsium-144. Beide Zerfallsprodukte besitzen hohe kinetische Energien (100MeV) und wandern in entgegengesetzte Richtungen, das eine Produkt gibt den Startimpuls für das TOF MS, das andere **desorbiert und ionisiert** die Analyten



- hauptsächlich zur Peptidanalytik (Ionenbildung von Substanzen bis zu 50000 Da)
- der eigentliche Desorptions-/Ionisierungsprozess verläuft über die Bildung von „Elektronen-Loch-Paaren“ (ca. 300/ Å) in der Trägerfolie/Analytschicht ⇒ Rekombination setzt Energie frei (Wärme/Vibration) ⇒ Desorption grösser Ionen

### Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

- *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation* Massenspektrometrie ⇒ Weiterentwicklung der Laser Desorption (LD-MS oder LDI-MS). (LD-MS Spektren zeigen allerdings geringe Intensitäten und starke Fragmentierungen der Analytmoleküle).
- MALDI ⇒ Hillenkamp und Karas 1987 (org. Matrix) sowie Tanaka (Co-Pulver/Glycerin)
- Prinzip: die Analyten werden mit konzentrierten wässrigen Lösungen der gewählten Matrix gemischt (Matrix/Analyt 1.000: 1 bis 10.000:1) und auf dem Probenhalter getrocknet ⇒ ins Vakuum überführt und mit **gepulsten UV oder IR Lasern** beschossen (0.5 - 20 ns UV, 5 - 200 ns IR) ⇒ Absorption des Laserlichts durch die Matrix ⇒ entweder **elektronisch angeregte** Matrixmoleküle bei UV-Lasern (resonante Anregung der Elektronen des aromatischen Systems der Matrices) oder **schwingungs-angeregte** Matrixmoleküle bei IR-Lasern (bei  $\lambda \sim 3 \mu\text{m}$  ⇒ O-H- und N-H Streckschwingungen) ⇒ Desorption und Ionisation der Analytmoleküle



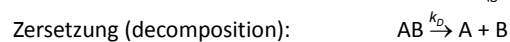
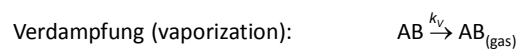
**Abb.** Wellenlängen und Photonenenergien typischer Desorptionslaser (aus Hillenkamp, ASMS 2001)

- Zur Anregung wird bei MALDI-MS entweder im ultravioletten Wellenlängenbereich mit N<sub>2</sub>- oder Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG)-Lasern oder im infraroten Wellenlängenbereich mit CO<sub>2</sub> oder Er:YAG-Lasern gearbeitet.

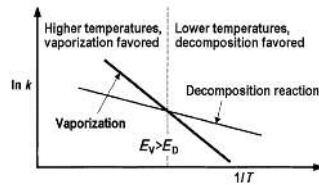
Warum Laser zur Einkopplung von Energie ?

⇒ Prinzip des „Schnellen Heizens“ (*rapid heating technology*)

- mit steigender Molekülgröße der Analyten gewinnt die Zersetzung der Analyten im Vergleich mit der Verdampfung an Bedeutung
- Verdampfung und Zersetzung sind zwei konkurrierende Prozesse



Die Abbildung unten zeigt einen Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_v$ ,  $k_D$ ) als Funktion der reziproken Temperatur („Arrhenius-Plot“  $\Rightarrow \ln k = -E_a/RT + \ln A$ )

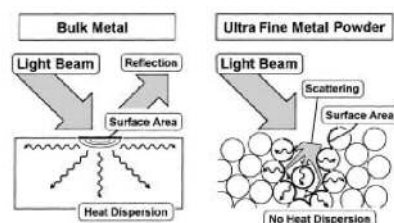


**Abb.** Temperaturabhängigkeit von Verdampfung und Zersetzung (aus Tanaka (2003), Angew. Chemie)

- für thermisch labile Verbindungen ist bei tieferen Temperaturen  $k_D$  grösser als  $k_v \Rightarrow$  thermische Zersetzung der Analyten
- da die Aktivierungsenergie der Verdampfung grösser ist als die Aktivierungsenergie der Zersetzung ( $E_v > E_D$ )  $\Rightarrow$  Steigung  $\ln k$  gegen  $1/T$  grösser  $\Rightarrow$  umgekehrte Verhältnisse bei hohen Temperaturen (kleinem  $1/T$ )
- Folge: Werden hohe Temperaturen extrem schnell erreicht sollte eine hohe Zahl der Analyten verdampfen („energy sudden“ methods)

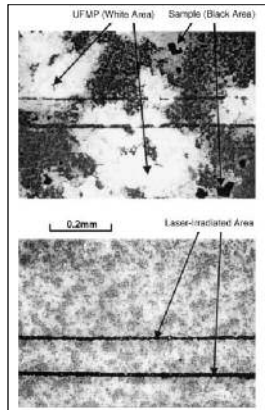
#### Ultrafeines Metallpulver/Glycerin-Matrix

- um diese schnelle Aufheizung zu erreichen  $\Rightarrow$  Konversion des Laserlichts in thermische Energie notwendig  $\Rightarrow$  Tanaka nutze ultrafeine Kobaltkugeln (30-300 nm Durchmesser) als Matrix



**Abb.** Unterschiede in der Lichtabsorption von massivem Metall und ultrafeinem Metallpulver

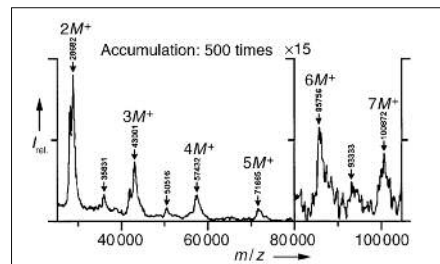




**Abb.** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Analyt/Metallpulver-Mischung ohne (oben) und mit (unten) Glycerin

Zugabe einer zweiten Matrixsubstanz (Glycerin) um,

- eine bessere Durchmischung von Analyt und Metallpulvermatrix zu erreichen (Abb.)
- die Analytmoleküle zu lösen (i.e. voneinander zu isolieren)



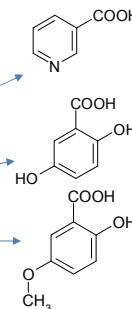
**Abb.** Clusterionen von Lysozym (aus: Tanaka (2003), Angew. Chemie)

### Organische Martices

typische Matrixmoleküle (UV-Laseranregung):

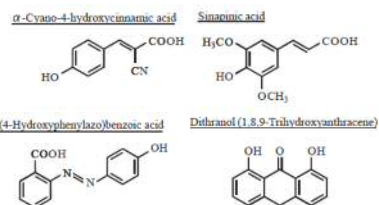
Moleküle müssen eine chromophore Gruppe (UV-Bereich) enthalten ( $\Rightarrow$  aromatische Systeme)

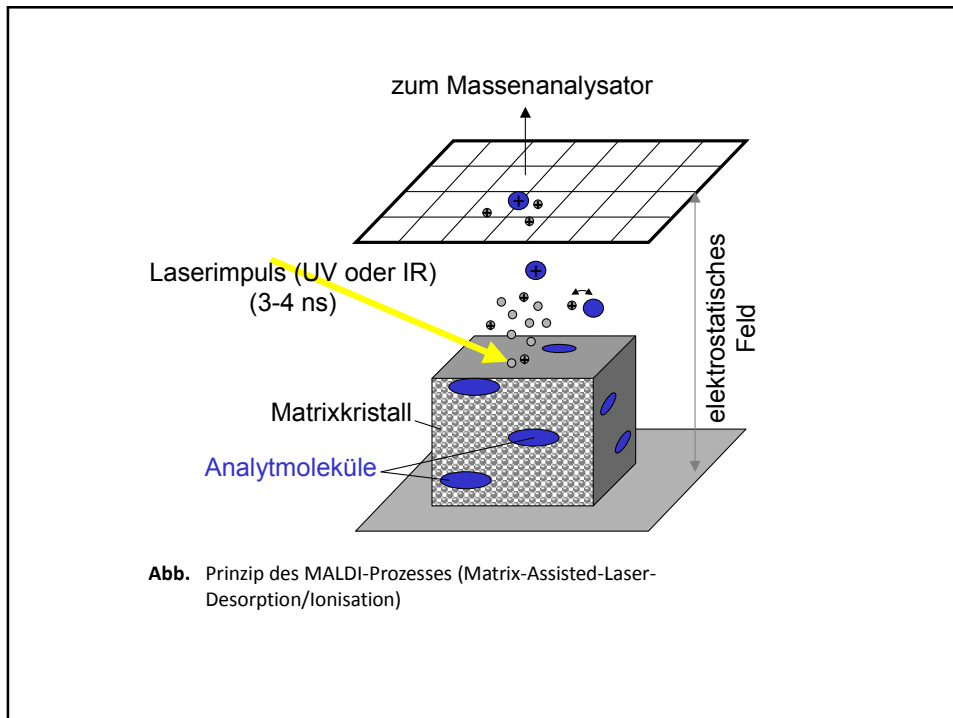
- Nikotinsäure
- 2,5 Dihydroxybenzoesäure (DHB)
- Super-DHB (2-Hydroxy-5-methoxy-benzoesäure)



Matrixmoleküle (IR-Laseranregung):  
geringe Anforderungen an Molekülbau (O-H, C-O und N-H-Streck- sowie O-H-Biegeschwingung)

- Malonsäure (Propandisäure, *malonic acid*)
- Bernsteinsäure (Butandisäure, *succinic acid*)
- Harnstoff
- Glycerin



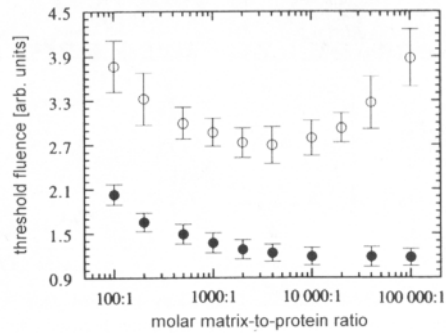


#### Funktion der Matrix beim MALDI Prozess:

1. Die Matrix isoliert die Analytmoleküle voneinander (daher der große Überschuß) und schützt sie vor zu hoher Laserenergie.
2. Die Matrixsubstanzen werden durch die Absorption der Laserenergie selbst elektronisch angeregt und stellen die zur Desorption der Analytmoleküle notwendige Energie zur Verfügung.
3. Die Matrix wirkt als Brönstedt-Säure oder Base d.h. sie liefert Protonen oder abstrahiert diese zur Ionisation des Analyten. Eine Ionisation des Analyten kann zudem durch Elektronenabstraktion in einer Elektronen-Transferreaktion mit einem Matrix-Molekül-Radikalkation erfolgen.

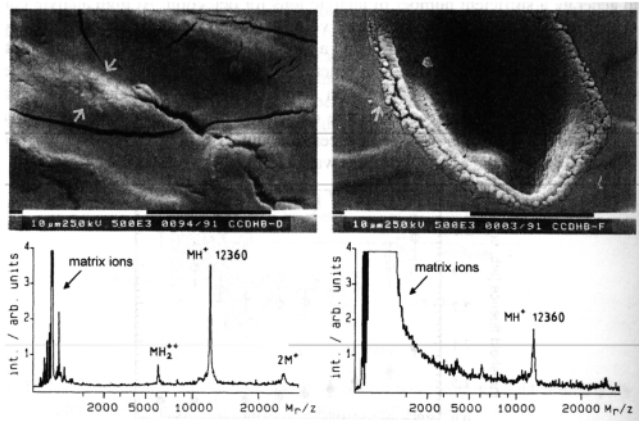
#### Mechanismen der Ionenbildung

- Studien zum Mechanismus der Ionenbildung - weiterhin aktives Forschungsfeld
- eine minimale Laserintensität (Desorptions-/Ionisationsschwelle, *threshold fluence*) muss überschritten werden, um Ionen zu beobachten (siehe Abb.)

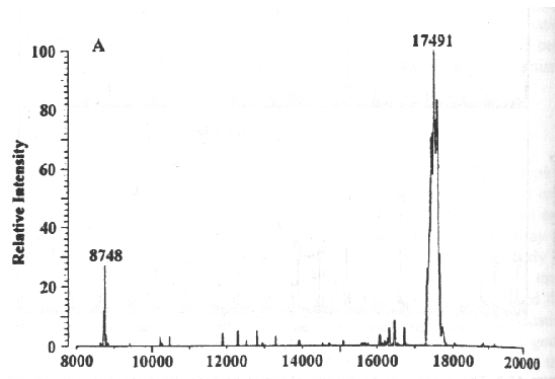


**Abb.** Desorptions-/Ionisationsschwellen für positive Ionen von Cytochrom C (O) (Zellprotein/ Mitochondrien) und Sinpinsäure (●) als Funktion des molaren Matrix-zu-Protein-Verhältnisses

- der Anstieg des Schwellwertes bei grossen Matrix-Analytverhältnissen kann durch die sinkende Anzahl der Analytionen erklärt werden
- der Anstieg des Schwellwertes bei kleinen Matrix-Analytverhältnissen kann durch die Verdünnung der Matrixmoleküle durch den Analyt erklärt werden (verminderte Energieabsorption pro Volumenelement)
- typischerweise erhält man die „besten“ MALDI-Spektren wenn die Laserintensität knapp oberhalb des Schwellenwertes liegt (Abb. unten)



**Abb.** SEM-Bilder einer Matrix-Oberfläche (DHB) mit fokussiertem (rechts) und defokussiertem (links) Laserstrahl sowie die jeweiligen Massenspektren (Cytochrom C) (aus: J.H. Gross, 2004)

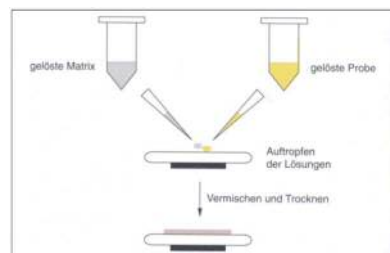


**Abb.** MALDI – Spektrum eines mit dem Tabakmosaikvirus infizierten Tabakblattes (Identifizierung eines charakteristischen Proteins in der Außenhülle des Virus) (aus: C. Dass, 2000).

#### Probenvorbereitung

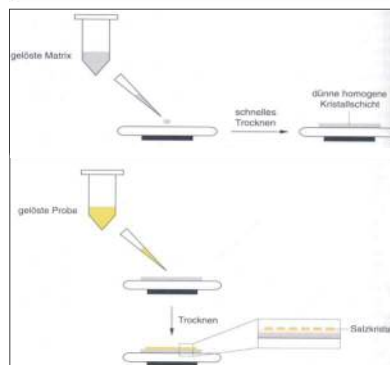
##### Standardpräparation

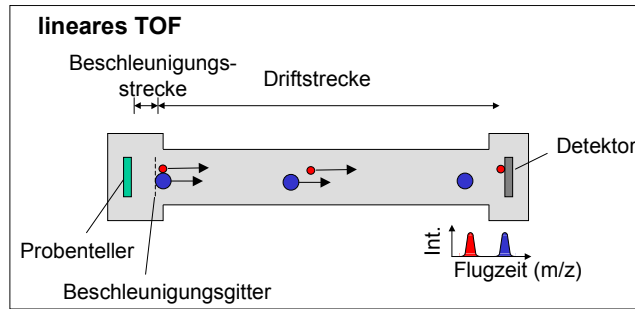
- Lösungen von Matrix und Probe werden auf dem Matrixtarget gemischt



##### Dünnschichtpräparation

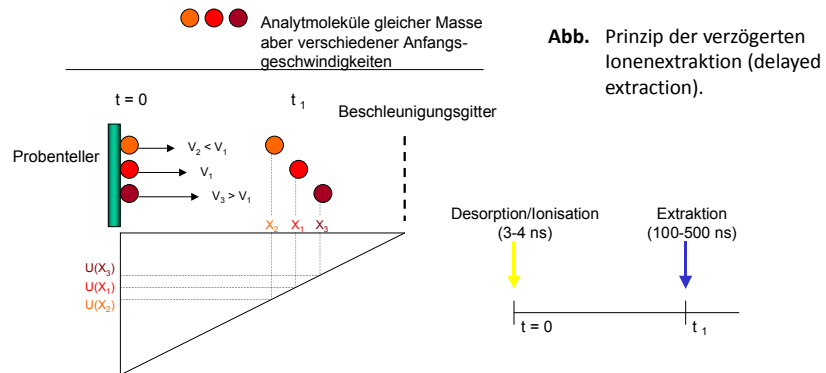
- Targets sind bereits mit einer Schicht Matrix gefüllt





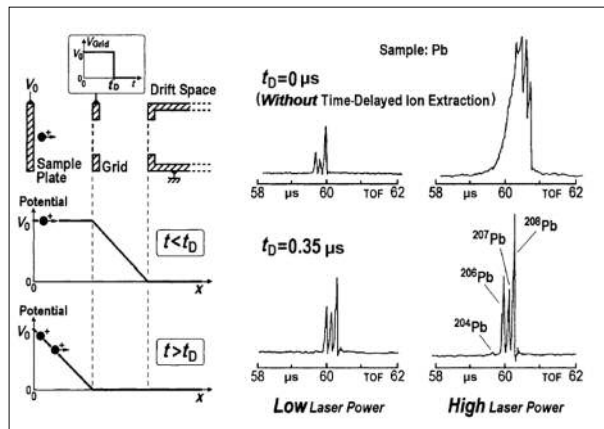
**Abb.** Einfaches Flugzeitmassenspektrometer (time-of-flight, TOF)

**Prinzip des DE-MALDI**

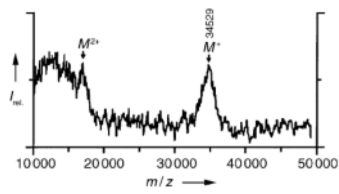


**Abb.** Prinzip der verzögerten Ionenextraktion (delayed extraction).

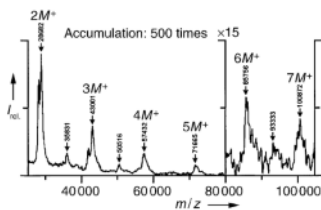
- Zur Zeit  $t=0$  werden die drei Analytmoleküle durch Laserbeschuss vom Probenträger freigesetzt, besitzen aber unterschiedliche Geschwindigkeiten. Nach der Zeit  $t=1$  wird das Beschleunigungspotential zwischen Probenteller und Beschleunigungsgitter angelegt  $\Rightarrow$  ursprünglich schnelle Ionen befinden sich näher am Gitter und durchlaufen daher ein geringeres Potentialgefälle (und umgekehrt)  $\Rightarrow$  Fokussierung



**Abb.** Schaubild und Massenspektren zur Verbesserung der Auflösung durch DE



**Abb.** MolekÜlion von Carboxypeptidase A (MG ca. 35k Da)

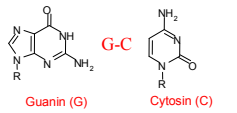
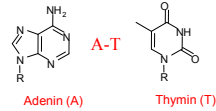


**Abb.** Molekül-Clusterionen von Lysozyme (MG =14306 Da) (Tanaka, 2003, Angewandte Chemie, Nobel Lecture)

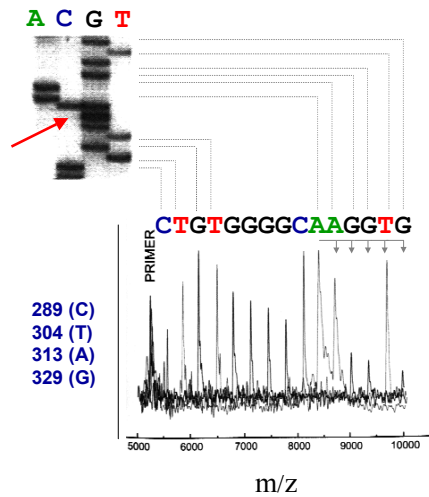
**Vergleich einer DNA-Sequenzierung mittels Gelelektrophorese und MALDI-TOF**

⇒ Einige DNA-Sequenzen besser mit MALDI-TOF

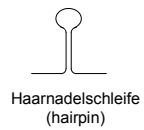
Watson-Crick-Basenpaare



Purin-Derivate      Pyrimidin-Derivate



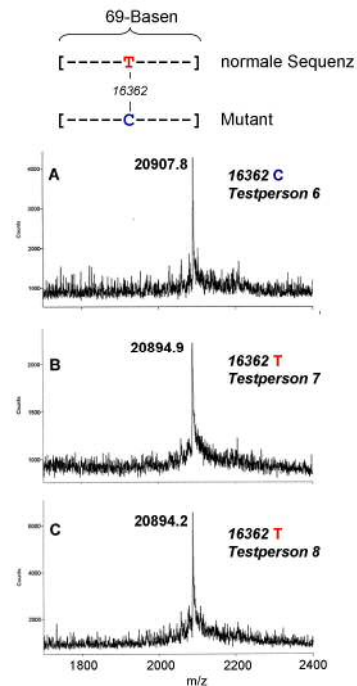
G-G  
 CTGTG GCAAGGTG  
 sequenzspezifische Sekundärstrukturen  
 können zu Mobilitätsänderungen in der CE führen  
 (Kompressionen)



aus: Cantor et al., *Genomics* (1999)

### DE-MALDI-TOF zur Detektion von Punktmutationen

SNPs (single nucleotide polymorphisms)



### SNPs (single nucleotide polymorphisms)

- Häufigkeit ca. 1 auf 1000 bp  $\Rightarrow$  3 Millionen im gesamten Genom
- jedes Individuum besitzt eine einzigartige Kombination von SNPs
- Vermutung: SNPs in intragenetischen Regionen  $\Rightarrow$  Ursache für Unterschiede in der Anfälligkeit für Krankheiten und deren individuellen Therapieerfolgen

#### Konsequenzen für MALDI-TOF:

- Sequenzierung vieler Individuen (ethnisch diverse Populationen) (Erstellung von SNP-Karten)

Entwicklung von Verfahren zur routinemäßigen Bestimmung bekannter SNPs (individuelle Therapieoptimierung)



⇒ High-Throughput-Screening

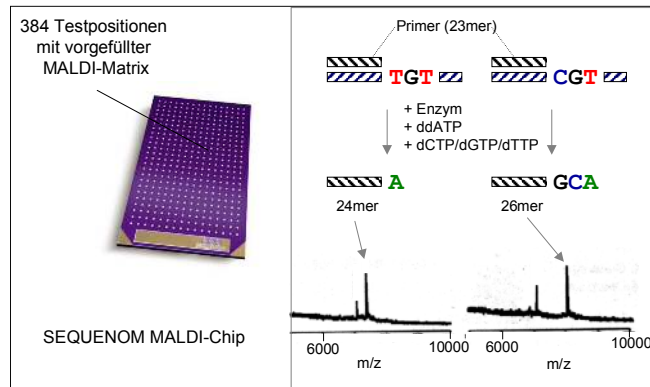


Abb. High-Throughput MALDI-Chip

<http://www.youtube.com/watch?v=GVkMw82uPoo>

## Analyse synthetischer Polymere

Fragestellungen mittels MALDI-MS

- direkte Bestimmung von Molekülgewichtsverteilung
- Untersuchung des Polymerabbaus (z.B. lichtinduziert)
- Kinetische Analyse des Polymerisationsprozesses

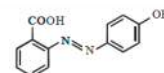
## Analyse synthetischer Polymere mittels MALDI-MS

Auswahl der MALDI-Matrix ist schwieriger als bei Biomolekülen (sehr unterschiedliche Funktionalitäten, grosser Polaritätsbereich (z.B. PEG, Polystyrol) z.B.:

PEG-Analytik – Matrix 2,6-DHB



Polyamid-Analytik – Matrix 2'-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure



auch verwendet: Ionische Flüssigkeiten (enthalten ausschließlich Ionen – also flüssige Salze ohne Lösungsmittel)

z.B. N,N-diisopropylethylammonium alpha-cyano-4-hydroxycinnamate [DEA-CHCA]

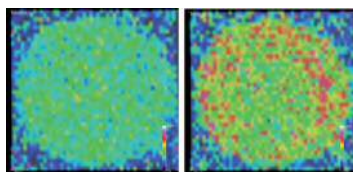
Schlußfolgerung zur Auswahl der MALDI-Matrix: Lektüre von (neueren) Fachartikeln (z.B. Batoy et al., Appl. Spectrosc. Rev., 2008, 43, 485–550)

**Kationisierungs-Reagenzien:** Zur Ionisierung der oft schwierig zu ionisierenden synth. Polymere Zugabe von "Kationisierungs-Agentien" wie Na-, K-Salze (heteroatomhaltige Polyether, Polyester, Polyamide, Polyacrylate) oder Ag- oder Cu-Salze wenn DB vorhanden sind (Polybutadiene, Polystyrol) Problem: Polyolefine (Polyethen, Polypropen) (weder heteroatome noch DB)

## Probenvorbereitung MALDI zur Polymeranalytik

'Dried droplet'-Methode = Deposition gelöster Matrix und des Analyten entweder nacheinander ("sandwich") oder zusammen in einem Tropfen – Verdunstung des LM

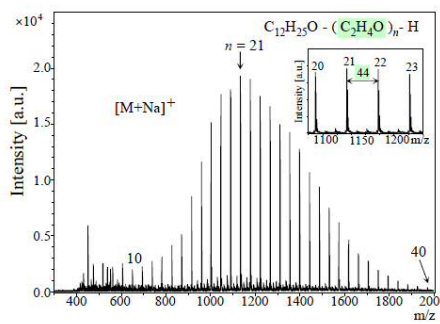
- Bildung von nichthomogenen Oberflächen (separates Auskristallisieren von Matrix und Analyt)
- Folge: Bildung von 'hot spots' (hohe Ionenströme)
- für einige Fragestellungen tolerierbar (Strukturaufklärung von Monomerbausteinen oder Untersuchung von Endgruppen)
- ungeeignet zur Molekülgewichtsbestimmung



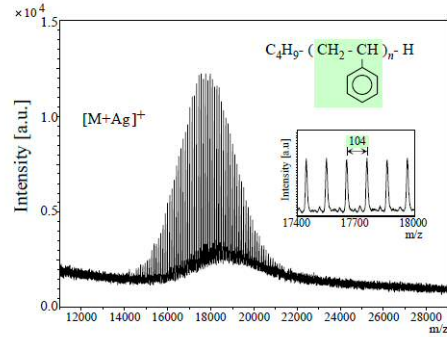
MALDI-imaging of a polystyrene spot ( $M$  ca. 5000 kg mol<sup>-1</sup>) prepared using the "dried droplet" method (THF), ion intensities of PS42 (left) and PS58 (right) showing accumulation of higher masses at the outer periphery of the spot - significant lateral molecular mass differences - segregation of polymers

aus:; Gruendling et al. Polym. Chem., 2010, 1, 599-617

## Beispiele MALDI zur Polymeranalytik

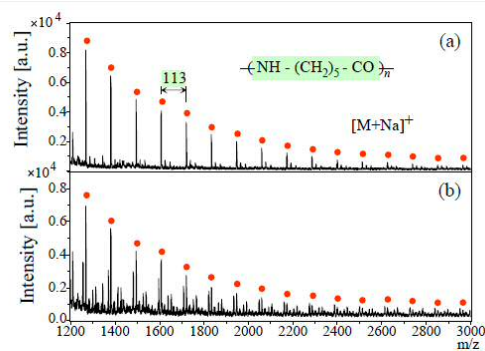


MALDI Massenspektrum von Poly(ethylenglykol) Monododecylether (2,5-DHB als Matrix und NaCl als „Kationisierungs-Reagenz“)



MALDI Massenspektrum eines gering polydispersen Polystyrols ( $M_w = 17200$ ) (Dithranol als Matrix und Silbertrifluoracetat als „Kationisierungsreagenz“)

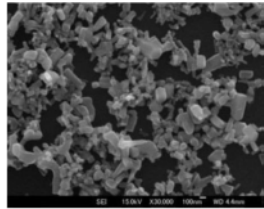
## Beispiele MALDI zur Polymeranalytik



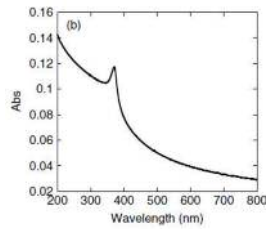
MALDI Massenspektrum von Polyamid 6 (2'-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure als Matrix und Natriumtrifluoracetat als „Kationisierungs-Reagenz“)  
a) Vor und b) nach thermischer Belastung (150°C, 7 Tage an Luft)

## Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS)

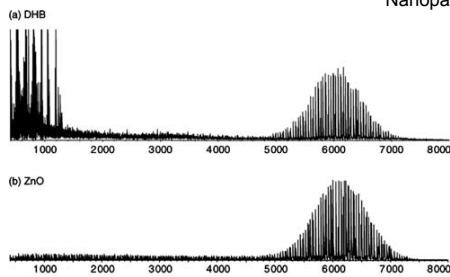
Motivation – keine Interferenzen durch Matrixmoleküle (insb. Kleinere Massen)



SEM Image von ZnO



UV Absorptionsspektrum eines "Films" aus ZnO-Nanopartikeln (passend für 337 nm Stickstofflaser)

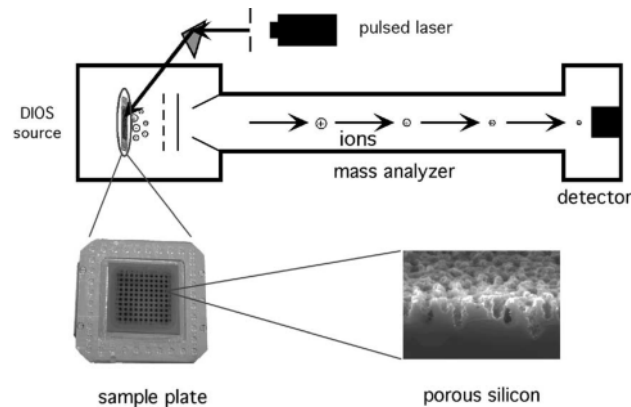


Vergleich der Massenspektren von Polyethylenoxid 6000 (100 pmol) mittels MALDI ((a) DHB) SALDI ((b) ZnO-Nanopartikel Watanabe et al., J. Mass Spectrom. 2008; 43: 1063–1071

## Desorption/Ionization On Silicon (DIOS)

Motivation – keine Interferenzen durch Matrixmoleküle (insb. kleinere Massen)

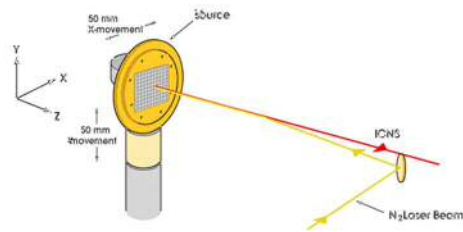
- "klassische" MALDI-Matrices "umschließen" die Analyten und absorbieren UV-Strahlung
- auch Nanopartikel (SALDI) oder nanoporöse Materialien können das leisten
- poröses Silicium (*porous silicon*) erfüllt diese Eigenschaften



aus : Lewis et al., International Journal of Mass Spectrometry 226 (2003) 107–116

## Weitere Variante – Entkopplung Desorption und Ionization

Motivation – selektive, fragmentarme Ionisierung



**Abb.** Kombination von IR-(Desorption) und UV-(Ionisation)-Lasern (aus Murray et al. 2002)

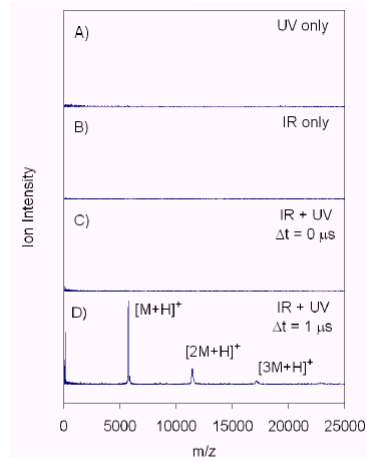
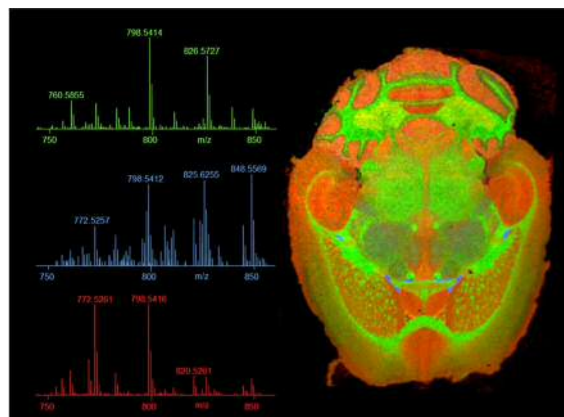


Figure 1: Mass spectra of bovine insulin in DHB at A) 337 nm only, B) 10.6  $\mu\text{m}$  only, C) 337 nm and 10.6  $\mu\text{m}$  at  $\Delta t = 0 \mu\text{s}$  and D) 337 nm and 10.6  $\mu\text{m}$  at  $\Delta t = 1 \mu\text{s}$ .

## Exkurs

### Mass spectrometry imaging: highly resolved spatial and molecular information

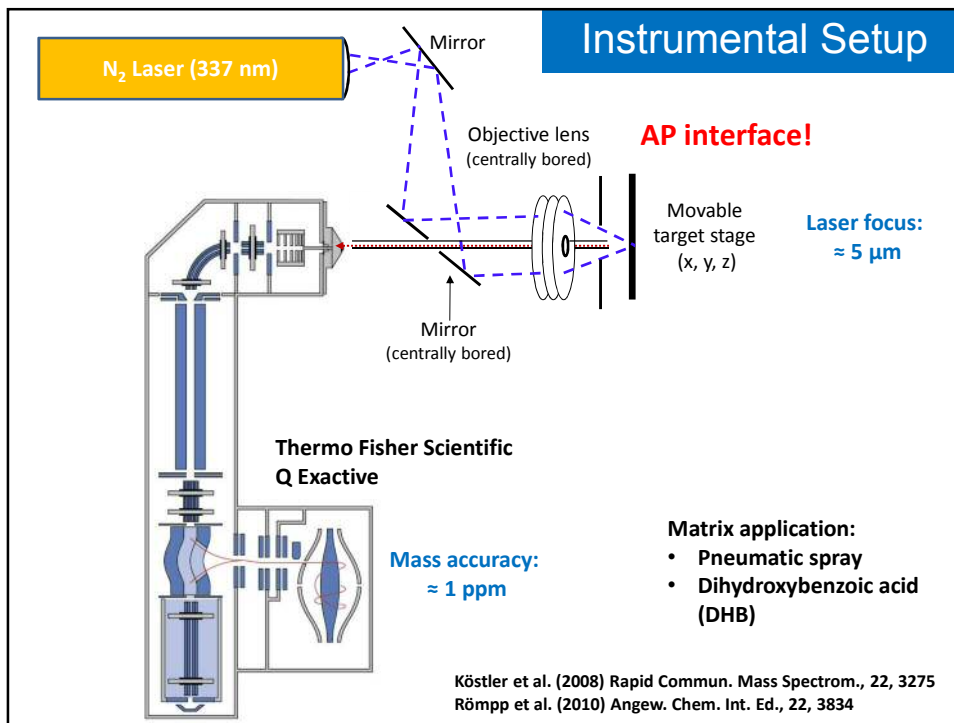
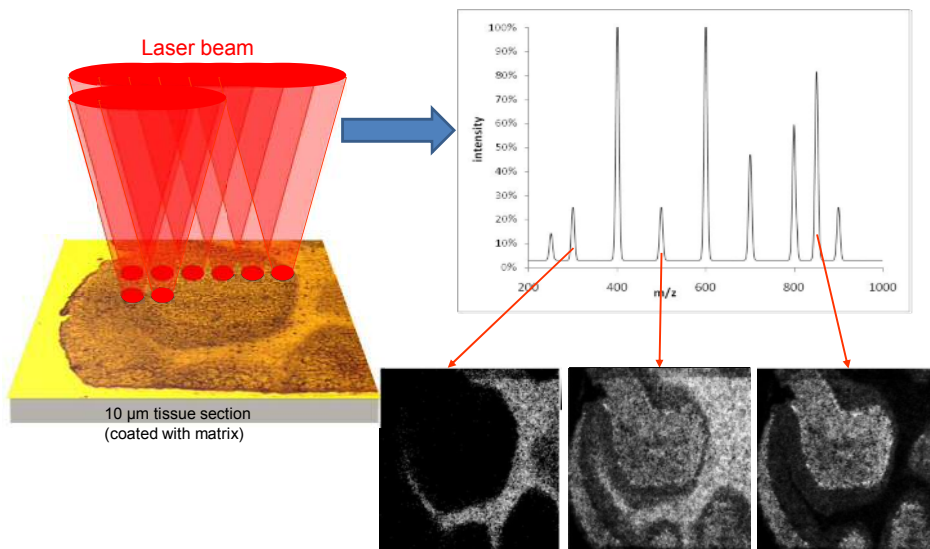


Andreas Römpf

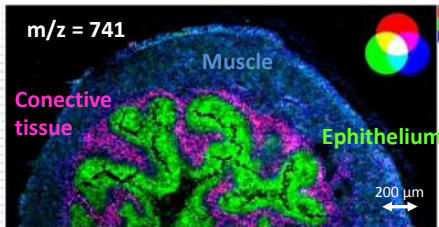
*Institute of Inorganic and Analytical Chemistry  
Justus Liebig University, Giessen, Germany*

# What is mass spectrometry imaging ?

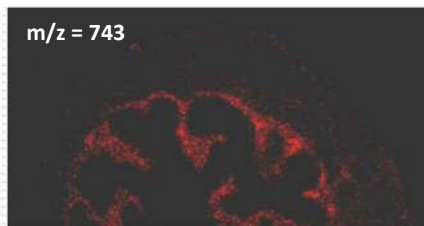
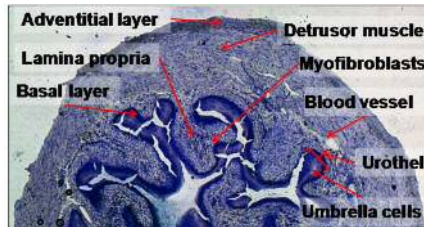
Matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI)



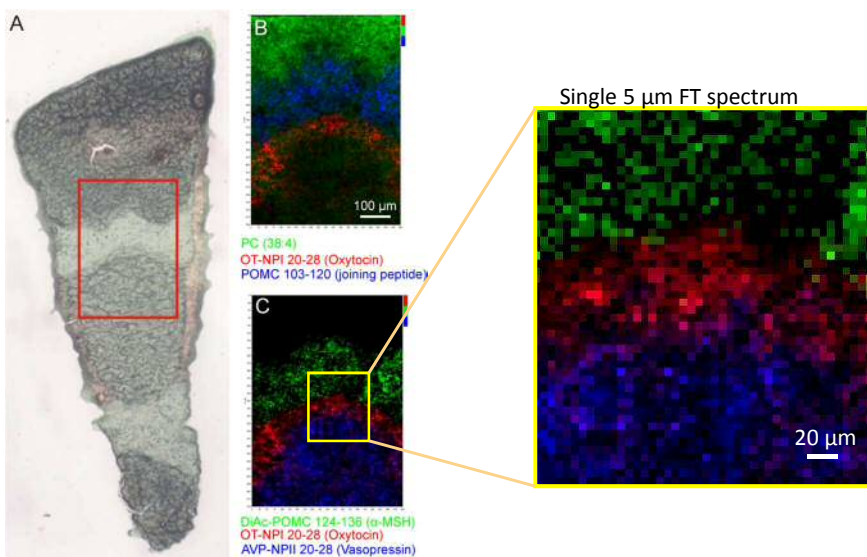
MS images



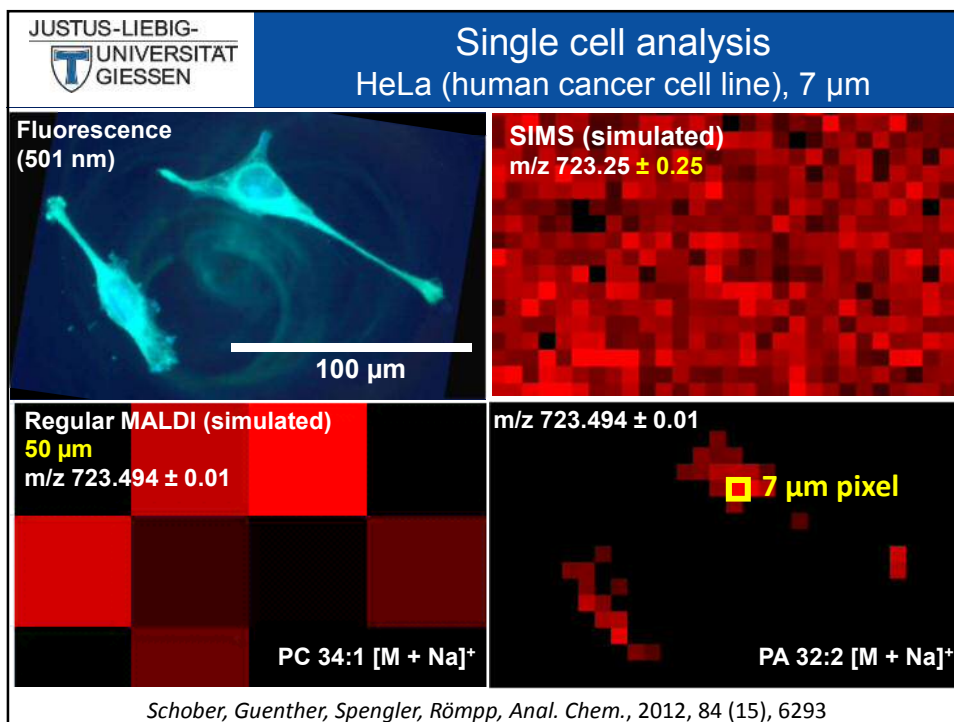
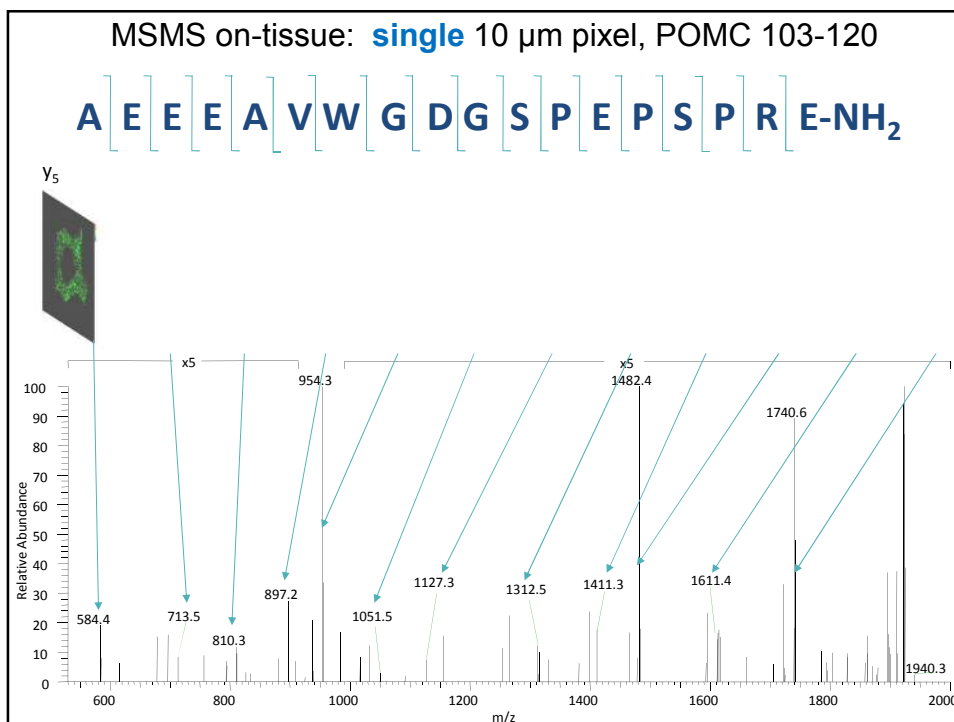
Histological micrograph (toluidine)



Römpf, Guenther, Schober Schulz, Takats, Kummer, Spengler (2010) Angew. Chem. Int. Ed., 9(22): 3834-3838

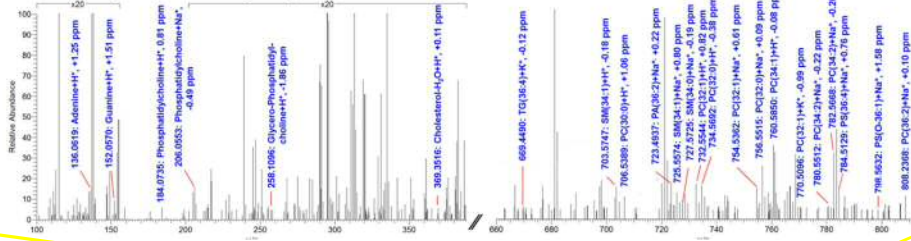








C Mass spectrum of single 7  $\mu\text{m}$  pixel



Regular MALDI (simulated)

50  $\mu\text{m}$

$m/z$  723.494  $\pm$  0.01

PC 34:1 [M + Na]<sup>+</sup>

$m/z$  723.494  $\pm$  0.01

7  $\mu\text{m}$  pixel

PA 32:2 [M + Na]<sup>+</sup>

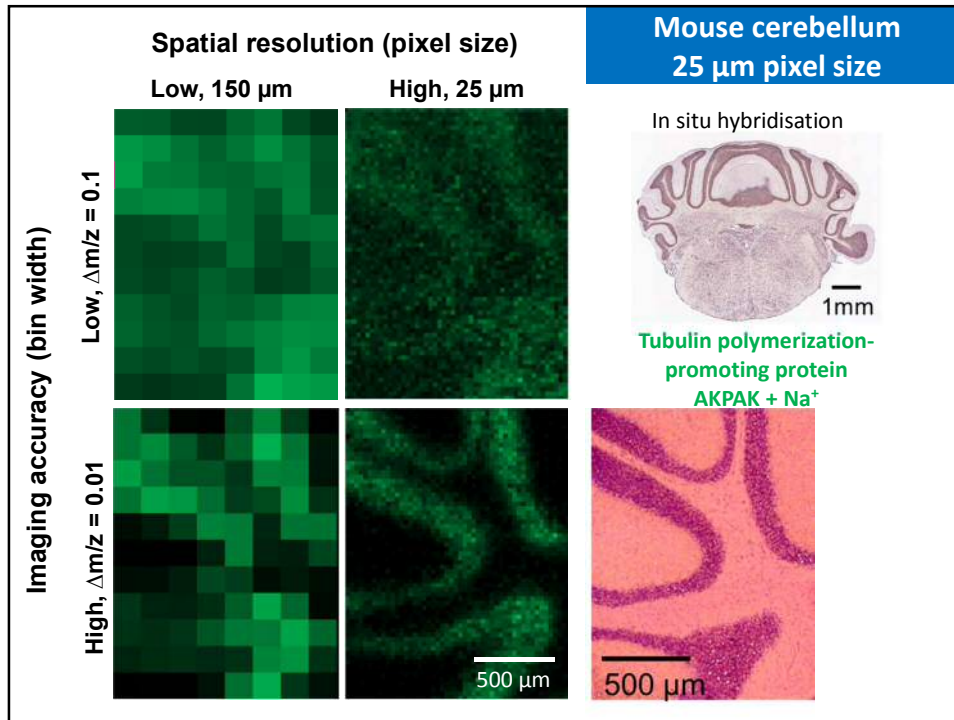
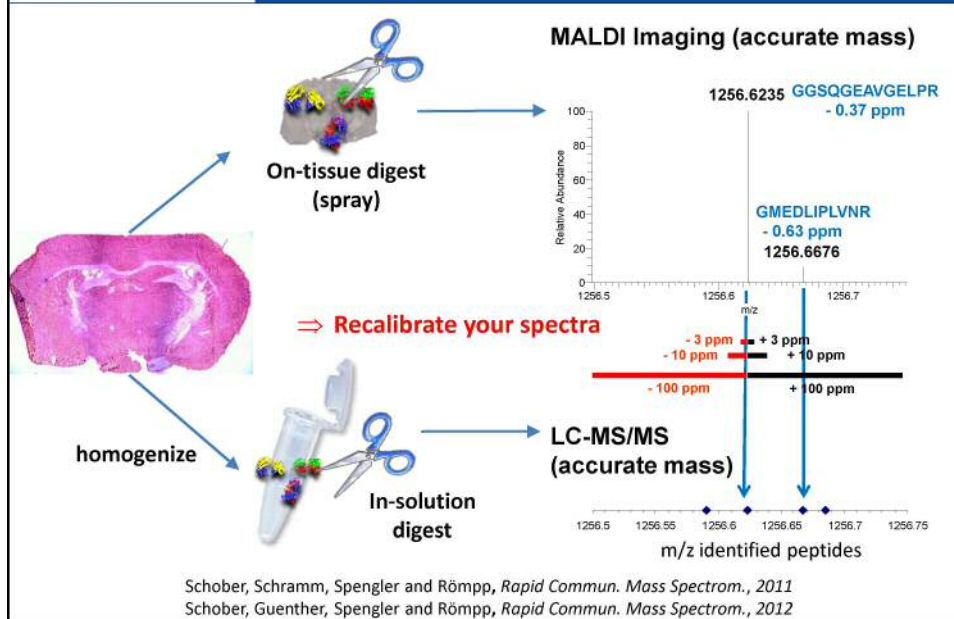
Schober, Guenther, Spengler, Römpf, *Anal. Chem.*, 2012, 84 (15), 6293

Identification difficult due to

- Limited mass range (typically < 30 kDa)
- Limited sensitivity
- Limited fragmentation efficiency (singly charged!)

⇒ Identity of protein often not known

## Identification of tryptic peptides



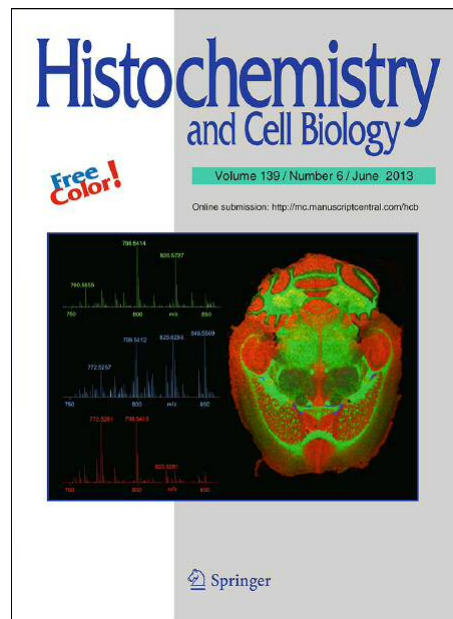
## Mass spectrometry imaging with high resolution in mass and space

*Andreas Römpp and  
Bernhard Spengler*

Histochem Cell Biol (2013) 139:759-783

DOI 10.1007/s00418-013-1097-6

(Open Access)



Römpp and Spengler, Histochem Cell Biol, 2013

## Elektrospray-Ionisation (ESI)

- Der Begriff Elektrospray-Ionisation basiert auf Arbeiten von Dole (1968) und wurde letztlich durch Fenn 1984 etabliert (Nobelpreis Chemie 2002).
- Beim Elektrospray-Verfahren wird eine Lösung des Analyten ( $10^{-3}$  bis  $10^{-5}$  mol/l) bei Atmosphärendruck aus einer Kapillare (ca. 0,1 mm  $\varnothing$ ) in ein starkes elektrisches Feld versprüht.
- Die an der Kapillarspitze und einer Gegenelektrode angelegte kV-Spannung ist verantwortlich für die rasche und feine Zerstäubung der aus der Kapillare austretenden Lösung und für die effektive Ionisierung der Analyt-Moleküle.
- Ab eines Schwellenwerts der angelegten Spannung (2-6 kV) bildet sich ein stabiler Spray, der je nach Ladungspolarität zur Bildung von positiven bzw. negativen Ionen führt.
- Eine schonende Ionisierung wird erhalten, wenn eine stabile Vernebelung ohne Entladungen erzeugt wird.

- Diese optimale Einstellung kann für eine breite Variation an Lösemittelzusammensetzungen und Flussraten ( $\mu\text{l}$  bis  $\text{ml}/\text{min}$ ) erreicht werden. Ein um die Kapillare konzentrisch angeordneter **Inertgasstrom** (meist  $\text{N}_2$ ) wird zur Unterstützung der Vernebelung gerade bei **hohen Flussraten** ( $\mu\text{l}$  bis  $\text{ml}/\text{min}$ ) eingesetzt.
- Zur vollständigen **Desolvatation** der ladungstragenden Flüssigkeitstropfen und zur effektiven Ionenbildung wird in einer ESI-Ionenquelle entweder eine beheizte Transferkapillare oder ein dem Spray entgegengerichteter, beheizter Stickstoffstrom eingesetzt.
- ESI  $\Rightarrow$  außergewöhnlich **hohe Ionenbildungseffizienz** von ca. 0,01 bis 0,1 (vergl. EI ca.  $10^{-4}$ ).
- Die generierten Ionen werden letztlich durch eine **Öffnung im Zentrum der Geenelektrode** in den Analysatorteil des Massenspektrometers überführt.

ELECTROSPRAY: FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS PHASE, WHAT WE KNOW NOW

Paul Kebarle<sup>1\*</sup> and Udo H. Verkerk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta,

Canada T6G 2G2

<sup>2</sup>Centre for Research in Mass Spectrometry CB 220, Chemistry Building,

York University, 4700 Keele Street, Toronto, Ontario, Canada M3J 1P3

Received 23 November 2008; received (revised) 15 February 2009; accepted 15 February 2009

Published online 21 June 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/msi.20247

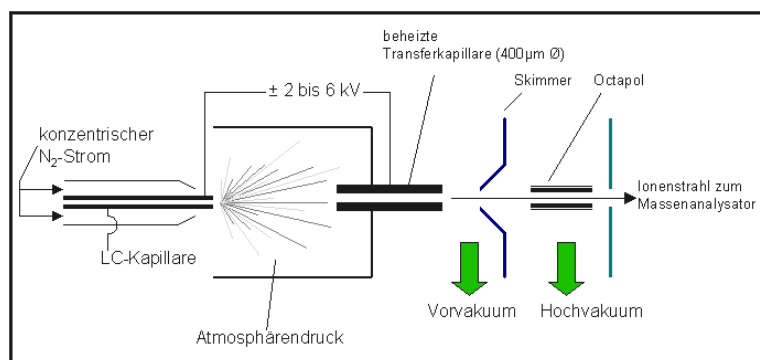


Abb. Elektrospray-Ionenquelle (aus: [www.uni-koeln.de](http://www.uni-koeln.de))

### Modellvorstellungen zur Ionenbildung bei Electrospray Ionisation MS

Vorgang der Ionenbildung bei ESI  $\Rightarrow$  Unterteilung der Abläufe in drei Abschnitte:

1. Bildung ladungstragender Tropfen
2. Verkleinerung der Tropfen
3. Bildung gasförmiger Ionen

#### Bildung ladungstragender Tropfen (positive Ionen)

- Durch die an die enge Kapillarspitze angelegte kV-Spannung, resultiert ein sehr starkes elektrisches Feld von ca.  $E \sim 10^6$  V/m. In der aus der Kapillare austretenden Elektrolytlösung erfolgt eine Ladungstrennung:

$\Rightarrow$  Positive Ladungsträger werden auf der Flüssigkeitsoberfläche angereichert, zur Gegenelektrode gezogen und zum Teil dort reduziert.

$\Rightarrow$  Negativ geladene Ionen dagegen wandern zum positiv geladenen Kapillarende und werden entladen bzw. oxidiert

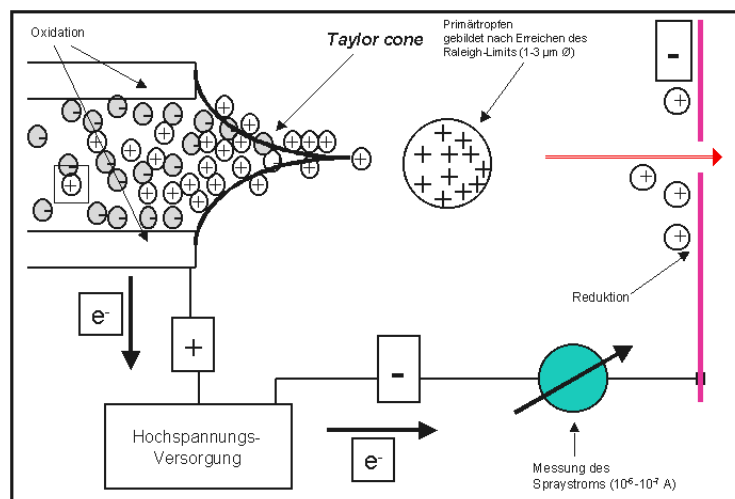
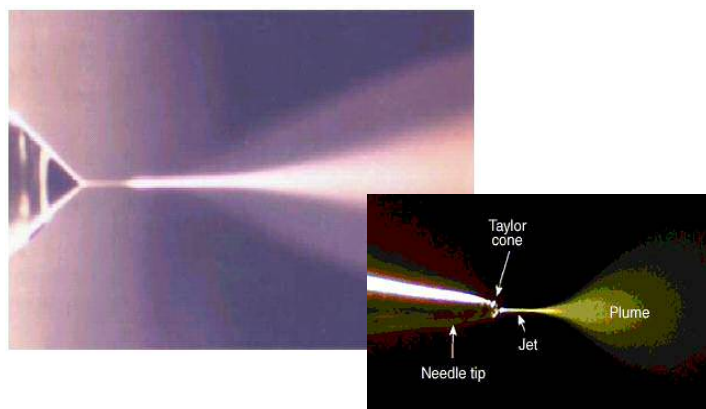
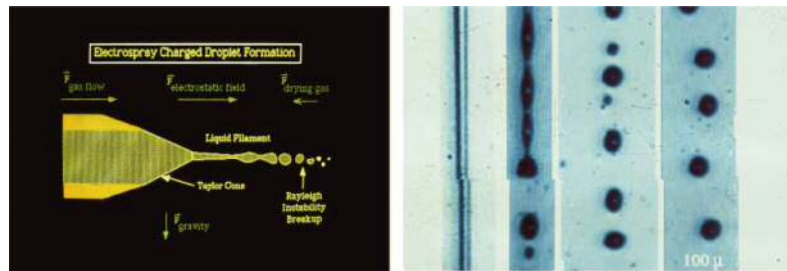


Abb. Bildung ladungstragender Tropfen

- Insgesamt resultiert ein konstanter Spraystrom der Stärke  $I \sim 10^{-7}$  bis  $10^{-6}$  A.
- Die Anreicherung von positiver Ladung auf der Flüssigkeitsoberfläche ist Ursache der Bildung eines Flüssigkeitskonus, da die Kationen zum negativen Pol gezogen werden.
- Dieser sogenannte Taylor Konus (*Taylor cone*) resultiert aus der Balance des elektrischen Feldes und der Oberflächenspannung der Lösung. Ab einer bestimmten Distanz zum Kapillarende erfolgt eine zunehmende Destabilisierung und es werden Tropfen mit positiver Überschußladung in einem stabilen Spray emittiert (*liquid filament*).



**Abb.** Taylor-Konus und „liquid filament“

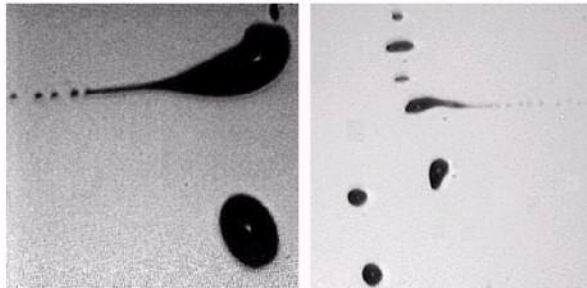


**Abb.** Schema zum ESI Prozess und Fotos des Zerfalls des liquid filaments (Bildung sog. *varicose waves*, Primärtropfenablösung, Auseinanderdriften der Primärtropfen durch Abstoßung)

### Verkleinerung der Tropfen

- Die Größe der gebildeten Tropfen hängt von der Flussrate, der Oberflächenspannung, der Viskosität, der angelegten Spannung und der Konzentration des Elektrolyten ab. Für eine Flussrate von ca. 5 µl/min wässrige Lsg. und einer Konzentration von 1 mmol ergeben sich Tropfen mit Radius  $r \sim 1-3 \mu\text{m}$  und einer Überschussladung entsprechend der Ladung von 50000 einfach geladenen Ionen.
- Diese Tropfen verlieren durch Verdampfen Lösemittelmoleküle und bei Erreichen des **Raleigh Limits** (elektrostatische Abstoßung der Oberflächenladungen > Oberflächenspannung) werden viel kleinere Tropfen (sog. Mikrotropfen) emittiert. Dies geschieht aufgrund von elastischen **Oberflächenvibrationen** der Tropfen die zur Bildung *Taylor cone*-ähnlicher Strukturen führen.

- Am Ende solcher **Ausstülpungen** werden kleine Tropfen die ca. 2 % der Masse, aber 15% der Ladung des "Muttertropfens" tragen, gebildet. Durch diesen ungleichen Zerfall der "Muttertropfen" erhöht sich pro Durchlauf von Tropfenbildung und Verdampfung bis zum Raleigh-Limit das Verhältnis von Oberflächenladung zur Zahl gepaarter Ionen im Tropfen dramatisch. Das heißt, dass nur die **hochgeladenen Mikrotropfen** für die letztlich erfolgende Ionenbildung verantwortlich sind und die verbleibenden großen Muttertropfen den überwiegenden Teil der Salzfracht (gepaarte Ionen) tragen.



**Abb.** Zerfall hochgeladener „Muttertropfen“ (aus: Gomez und Tang, 1993)

[http://www.youtube.com/watch?feature=player\\_detailpage&v=Sbxda9ipc\\_s&list=PL6FBB4A8865A367F3](http://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=Sbxda9ipc_s&list=PL6FBB4A8865A367F3)

### **Bildung gasförmiger Ionen aus Mikrotropfen**

Im Wesentlichen wurden **zwei Modelle** vorgeschlagen, um die Bildung gasförmiger Ionen aus Mikrotropfen zu erklären:

- Die ältere Theorie stammt von Dole und wird als das Modell des geladenen Rückstands (*charged residue model, CRM*) bezeichnet. Man geht davon aus, dass letztlich aus extrem kleinen Tropfen mit Radius  $r \sim 1\text{nm}$ , die nur noch ein Analyt enthalten, durch Lösemittelverdampfung gasförmige Ionen entstehen.
- Die zweite Vorstellung stammt von Irbane und Thomson und wird als Ionenemissions-Modell (*ion emission model IEM* oder *ion desorption IDM*) bezeichnet. Hierbei erfolgt die Bildung gasförmiger Ionen aus hochgeladenen Mikrotropfen mit Radius  $r \sim 8\text{nm}$  und ca.  $N \sim 70$  Elementarladungen. Diese Ionenemission aus den Mikrotropfen steht beim IEM in Konkurrenz zum weiteren Raleigh-Zerfall der Tropfen.



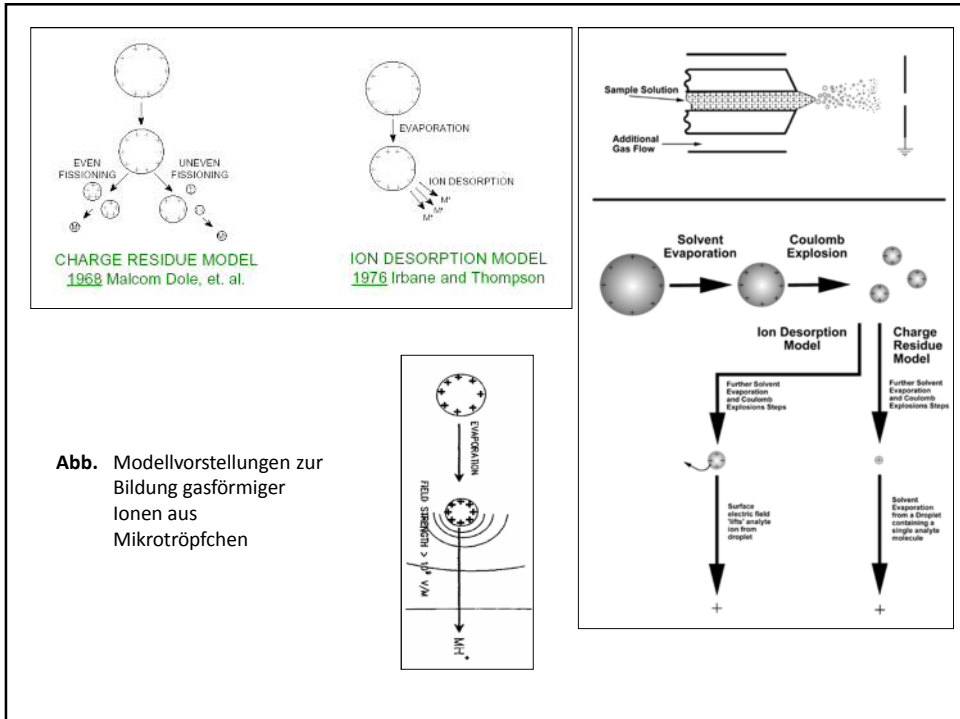
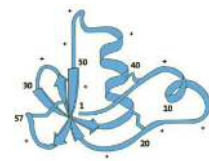
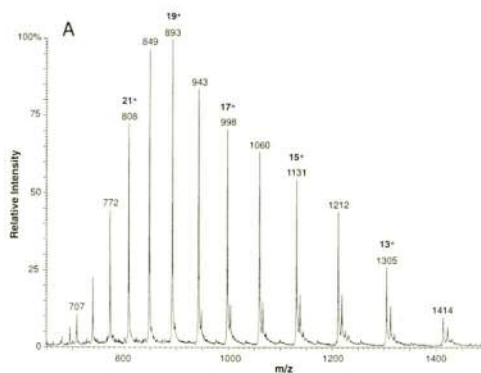


Abb. Modellvorstellungen zur Bildung gasförmiger Ionen aus Mikrotröpfchen

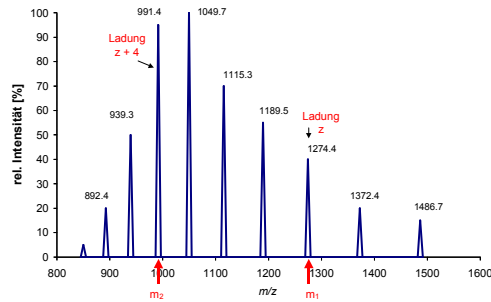
Besonderheit der Electrospray-Ionisation  $\Rightarrow$  Bildung mehrfach geladener Ionen (bei  $M > 1000$ )  $\Rightarrow$  da im Massenspektrometer das Masse zu Ladungsverhältnis detektiert wird, eröffnet sich ein sehr großer Massenbereich.



Proteine: basische Aminosäure-Reste werden protoniert (Arginin, Lysin, Histidin)

Abb. ESI-MS-Spektrum von Myoglobin

Beispiel: Ermittlung des Molekulargewichts einer unbekannten Substanz anhand eines ESI-Spektrums:



**Abb.** Elektrospray-Spektrum (positive Ionen) einer unbekannten Substanz mit einem Molekulargewicht von  $M$ .

Das Signal bei  $m_1$  ( $m/z$  1274.4) trägt  $z$  Ladungen (oder genauer gesagt ist  $z$ -fach protoniert). Daraus folgt also:

$$m_1 = \frac{M + z}{z} \Rightarrow M = m_1 \cdot z - z \rightarrow$$

Das Signal bei  $m_2$  ( $m/z$  991.4) trägt 4 Ladungen mehr (4 Protonen mehr). Daraus folgt:

$$m_2 = \frac{M + z + 4}{z + 4} \Rightarrow M = m_2 \cdot (z + 4) - z - 4 \rightarrow$$

$$\Rightarrow m_1 \cdot z - z = m_2 \cdot (z + 4) - z - 4$$

$$\Rightarrow m_1 \cdot z = m_2 \cdot (z + 4) - 4$$

$$\Rightarrow m_1 \cdot z = m_2 \cdot z + 4 \cdot m_2 - 4$$

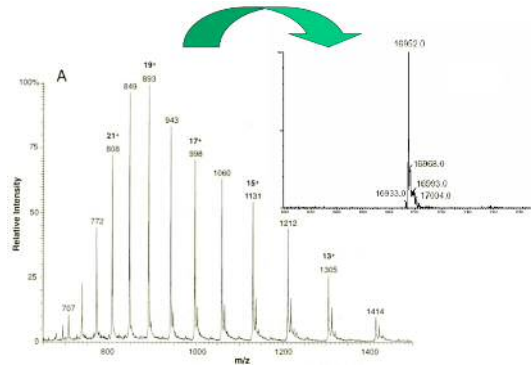
$$\Rightarrow m_1 \cdot z - m_2 \cdot z = 4 \cdot m_2 - 4$$

$$\Rightarrow z \cdot (m_1 - m_2) = 4 \cdot (m_2 - 1)$$

$$z = \frac{4 \cdot (m_2 - 1)}{(m_1 - m_2)} = 14$$

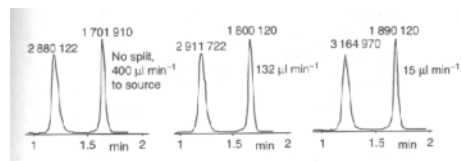
$$M = m_1 \cdot z - z = 1274 \cdot 14 - 14 = 17828$$

- Jedes der Signale trägt Information zum Molekülion  $\Rightarrow$  Dekonvolution (Entfaltung) verbessert Genauigkeit und Verlässlichkeit der Methode



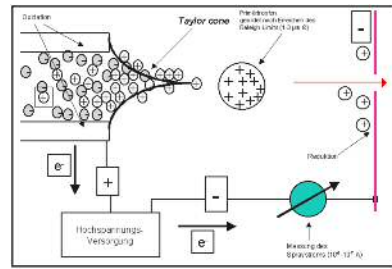
**Abb.** Original-ESI-Spektrum und dekonvolviertes Massenspektrum von Myoglobin

ESI-Signalintensität hängt von der Analytkonzentration ab – nicht der Analytmenge die Ionenquelle überführt wird



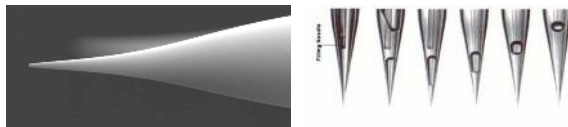
**Abb.** HPLC – ESI – Signale zweier Medikamente (selected ion monitoring) bei Überführung unterschiedlicher Flussraten in die Ionenquelle. Die Zahlen über den HPLC-Signalen sind Flächenangaben (willkürliche Einheiten)  $\Rightarrow$  zunehmende Empfindlichkeit mit abnehmender Flussrate. (aus: de Hoffmann,1999)

**Ursache:** Wenn positive Ionen die Flüssigkeit verlassen, müssen Elektronen durch Oxidationsprozesse an der Kapillarwand bereitgestellt werden (⇒ ESI ist ein elektrochemischer Prozess)

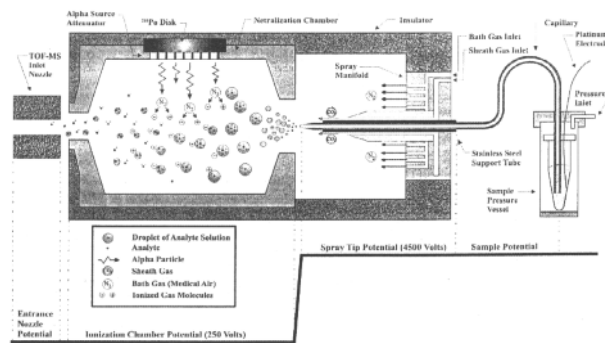


⇒ Gesamtzahl der gebildeten Ionen pro Zeit welche in den Analysator gelangen können, wird limitiert durch den Strom der durch Oxidation (bzw. Reduktion) bereitgestellt werden kann – nicht durch die Flussrate (bis hin zu sehr kleinen Flüssen).

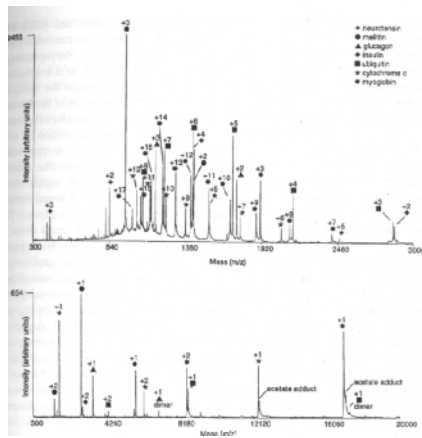
⇒ „Mikro-Elektrospray“ ( $\mu$ ESI) und „Nano-Elektrospray“ (nESI)



**Abb.** Nano-Esi Pipettenspitze (Gold-bedampfte Glaspipetten)

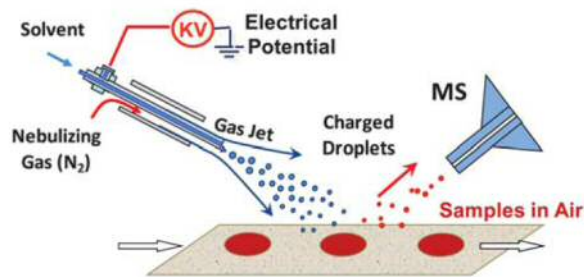


**Abb.** „Charge-Reduction“ ESI Quelle (aus: C. Dass, 2000)

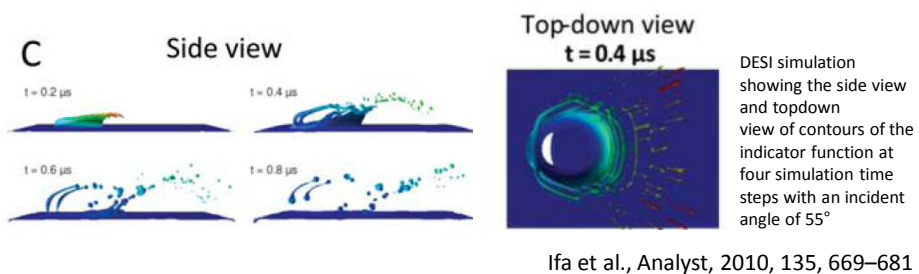


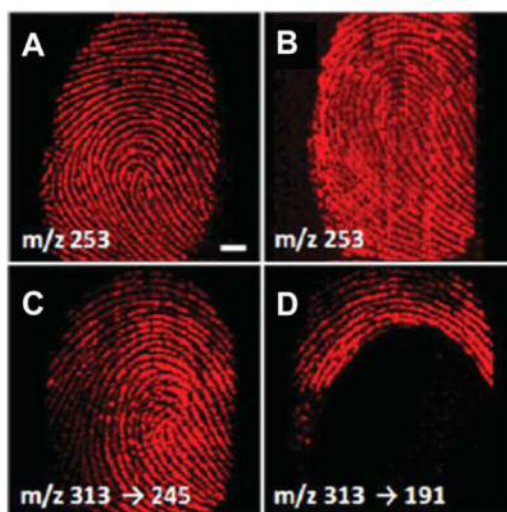
**Abb.** ESI-Massenspektren einer Mischung von 7 Proteinen: Oben: Konventionelles ESI, Unten: „Charge-Reduction“ ESI  $\Rightarrow$  vorteilhaft für komplexe Gemische

### Desorption electrospray ionization (DESI-MS)



**Fig. 1** Illustration of desorption electrospray ionization (DESI).<sup>1</sup>

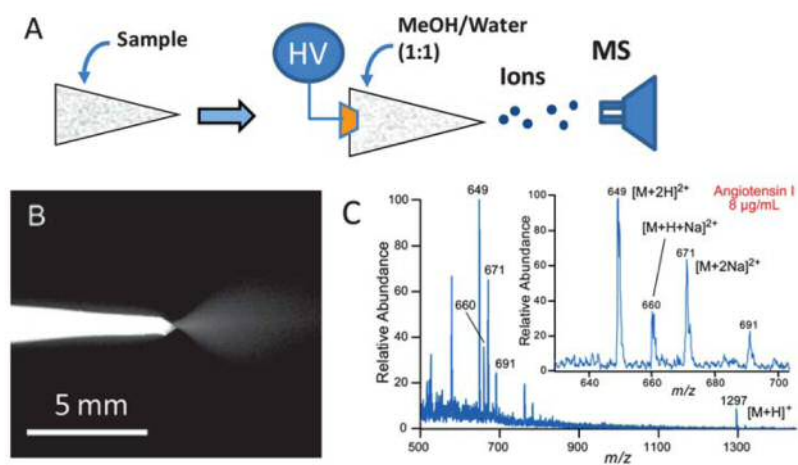




**Fig. 10** Virtual DESI image of the fatty acid *cis*-hexadec-6-enoic acid ( $m/z$  253) from a LFP blotted on glass (A) and lifted by an adhesive tape (B);  $\Delta^9$ -THC and/or cannabidiol on paper as identified by the MS/MS transition  $m/z$  313  $\rightarrow$  245 (C);  $\Delta^9$ -THC distinguished from cannabidiol by the unique MS/MS transition  $m/z$  313  $\rightarrow$  191 (D). Adapted from ref. 52.

Ifa et al., *Analyst*, 2010, 135, 669–681

### Paper spray

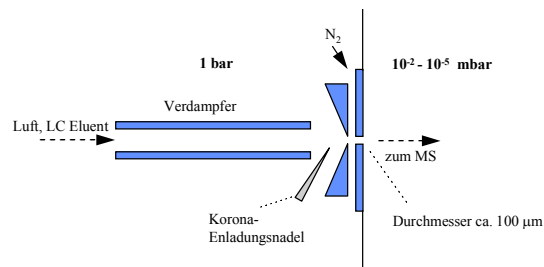


Ifa et al., *Analyst*, 2010, 135, 669–681

### Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI)

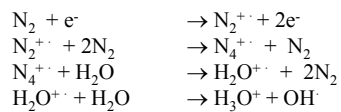
(oft bei LC/MS)(*atmospheric pressure chemical ionisation, APCI*)

- außerhalb der Ionenquelle wird durch elektrische Entladung unmittelbar vor dem Einlaß des MS ein Plasma erzeugt (Bildung von Primärionen wie  $N_2^+$ ,  $N_4^+$  und  $H_3O^+$ ), welche wiederum mit den Analyten reagieren

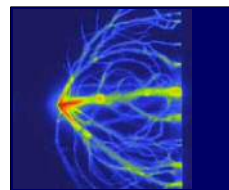
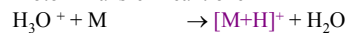


- die Korona-Entladung (2-10  $\mu A$ ) (Potentialdifferenz zwischen Nadel und MS-Einlass ca. 1500-5000 V) durch extrem inhomogenes elektrisches Feld (Spitze-Platte)

- die freigesetzten Elektronen setzen eine Kette von Reaktionen in Gang (Atmosphärendruck  $\Rightarrow$  kurze mittlere freie Weglänge), z.B. bei der Bildung positiver Analytionen:

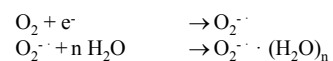


Proton-Transfer Reaktionen

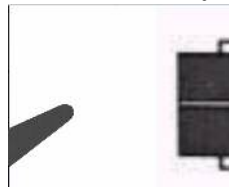
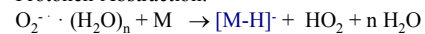


Point-to-Plate Entladung

- bzw. negativer Analytionen:



Protonen-Abstraction:



- bei erhöhtem Druck in der Ionenquelle steigt die Ausbeute an "stabilen" negativen Reaktandionen (3-Körperprozess):

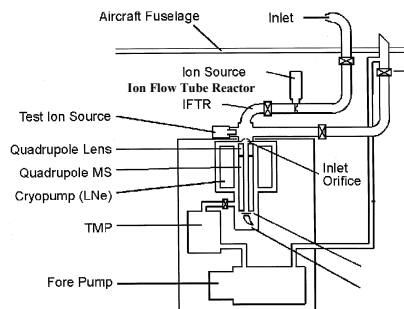


- ⇒ Negative Chemische Ionisation (NCI) bietet sich bei Atmosphärendruckionisation an
- ⇒ Einfache Kopplungsmöglichkeit mit der Flüssigchromatographie

#### APCI zur Echtzeit-Analyse organischer Substanzen (positiv oder negativ CI)

- Versuch die **Selektivität** von **chemischer Ionisation** auszunutzen, um die quantitative Messung von Einzelkomponenten aus komplexen Gemischen in **Echtzeit** (ohne Trennung) zu erlauben. Beispielsweise zur Bestimmung luftgetragener organischer Komponenten

- Prinzip: Verwendung von  $\text{H}_3\text{O}^+$  als **Primärionen**, welche in einer Driftröhre (Reaktionszone, *ion flow tube reactor*) vor dem MS-Einlasssystem mit den Analyten reagieren können ⇒ Selektivität ergibt sich aus den unterschiedlichen Protonenaffinitäten luftgetragener Komponenten (keine Ionisation von  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ , Ar,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NO}_x$ )
- **Protonenaffinität** einiger organischer Verbindungen höher als die von Wasser und es kommt zu Protonen-Transfer-Reaktionen in der Reaktionszone (PTR-MS) (Bestimmung von Alkenen im pptv-Bereich mit hoher Zeitauflösung) ⇒ Messungen von organischen Spurengasen in der oberen Troposphäre



Schematische Darstellung eines On-line CI-MS für Flugzeug-gestützte Messungen



# Massenspektrometrie

## Massenspektrometrische Analysatoren

---

allgemeines Arbeitsprinzip:

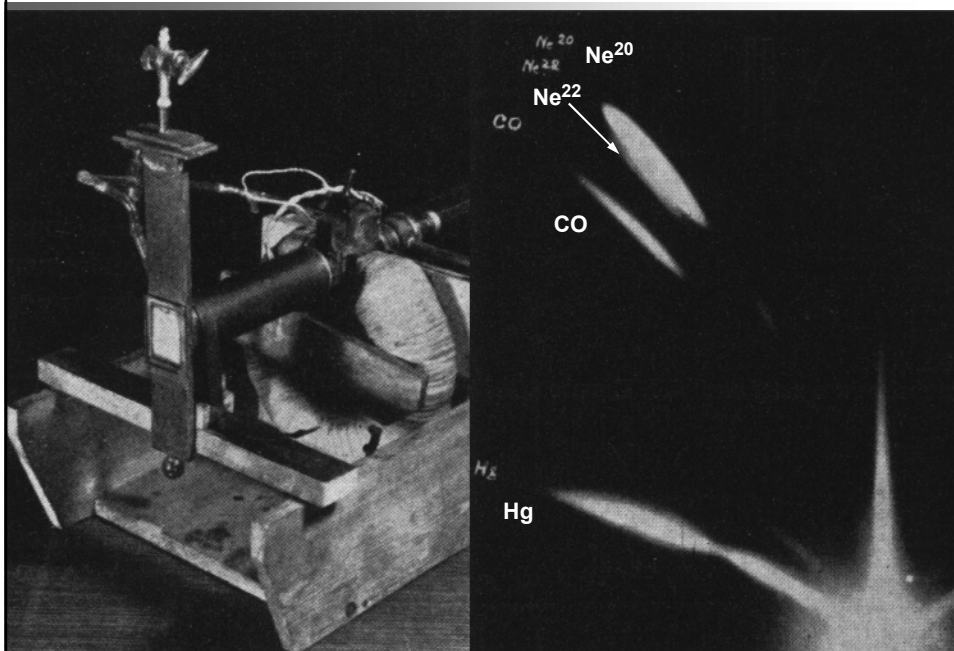
- Überführung von neutralen Spezies in Ionen (Ionenquelle)
- Trennung der Ionen (Masse zu Ladungsverhältnis,  $m/z$ ) (Analysator)
- Nachweis der Ionen (Detektor)

### Analysatoren

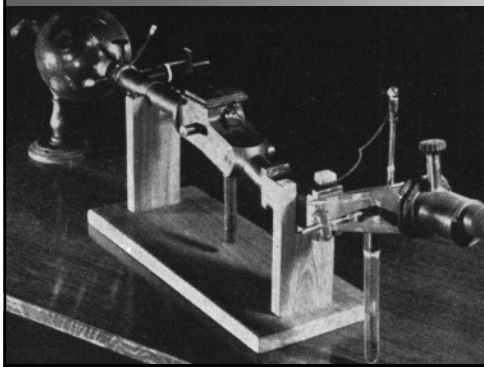
2 Arten von Analysatoren:

- kontinuierlich-arbeitende Analysatoren  $\Rightarrow$  "scannen" von  $m/z$ -Verhältnissen (magnetische und elektromagnetische Sektorfeldgeräte, Quadrupol)
- gepulst arbeitende Analysatoren  $\Rightarrow$  simultane Arbeitsweise (alle  $m/z$ -Verhältnisse)(Flugzeitmassenspektrometer, Ionenfallen, Ionencyclotron-Resonanz)

### THOMSON'S PARABEL-SPEKTROGRAPH (1910)

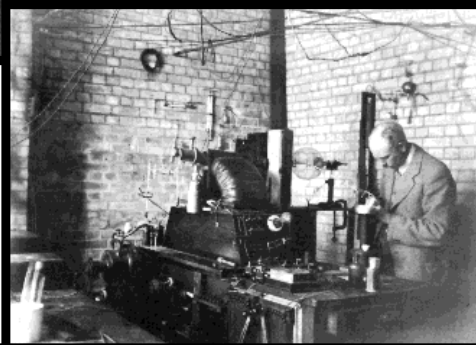


## DIE 20ER JAHRE - DAS JAHRZEHNT DER ISOTOPEN

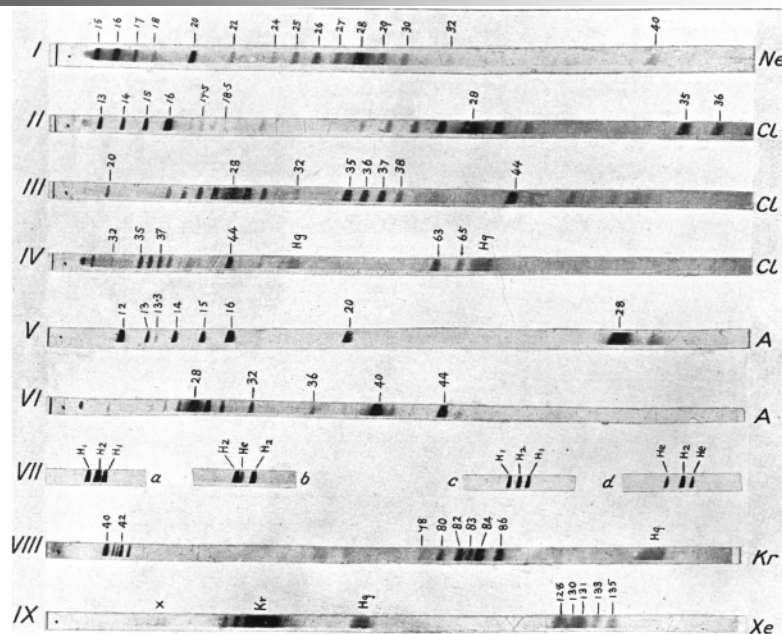


ASTON'S MASSENSPEKTROGRAPH  
VORLÄUFER SPÄTERER  
HOCHAUFLÖSENDER  
MASSENSPEKTROMETER

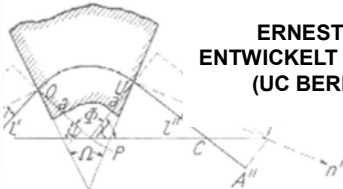
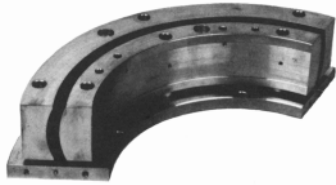
F.W. ASTON IM CAVENDISH LABORATORY,  
CAMBRIDGE (1920)



## ISOTOPEN SEPARATION (F.W. ASTON 1920)



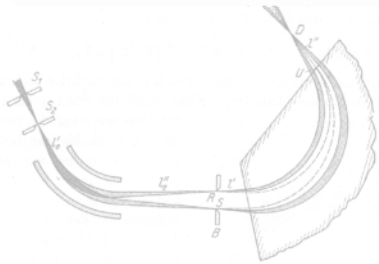
## DIE 30ER JAHRE - IONOPTIKEN UND THEORIEN



**ERNEST LAWRENCE  
ENTWICKELT DAS CYCLOTRON  
(UC BERKELEY, 1931)**

leitung der Linsenformel des magnetischen  
an errechnet die Bildweite  $l''$   
ei [Gl. (9a)] unter Berücksie  
Gln. (10), (11), (12)

$$\psi = \frac{l}{a + l}$$



**HAROLD UREY ENTDECKT  
DAS DEUTERIUM (1932)**

$$l'' = \frac{a \cdot \text{tg } \chi}{1 - \text{tg } \chi \cdot \text{tg } \epsilon'}$$

$$1 + \frac{\text{tg } \Phi + \text{tg } \Psi}{1 - \text{tg } \Phi \cdot \text{tg } \Psi} \cdot \text{tg } \epsilon''$$

$$= -a \cdot \frac{\text{tg } \Phi + \text{tg } \Psi}{1 - \text{tg } \Phi \cdot \text{tg } \Psi + (\text{tg } \Phi + \text{tg } \Psi) \cdot \text{tg } \epsilon''}$$

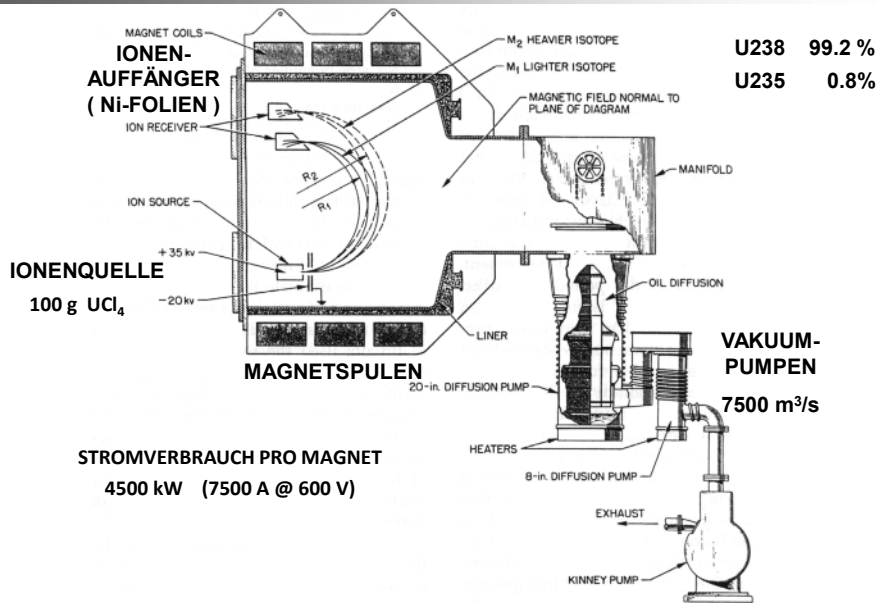
$$\frac{\text{tg } \Phi + \frac{l'}{a + l' \cdot \text{tg } \epsilon'}}$$

$$\frac{\text{tg } \Phi \cdot \frac{l'}{a + l' \cdot \text{tg } \epsilon'} + \left( \text{tg } \Phi + \frac{l'}{a + l' \cdot \text{tg } \epsilon'} \right) \cdot \text{tg } \epsilon''}{\text{tg } \Phi (a + l' \cdot \text{tg } \epsilon') + l'}$$

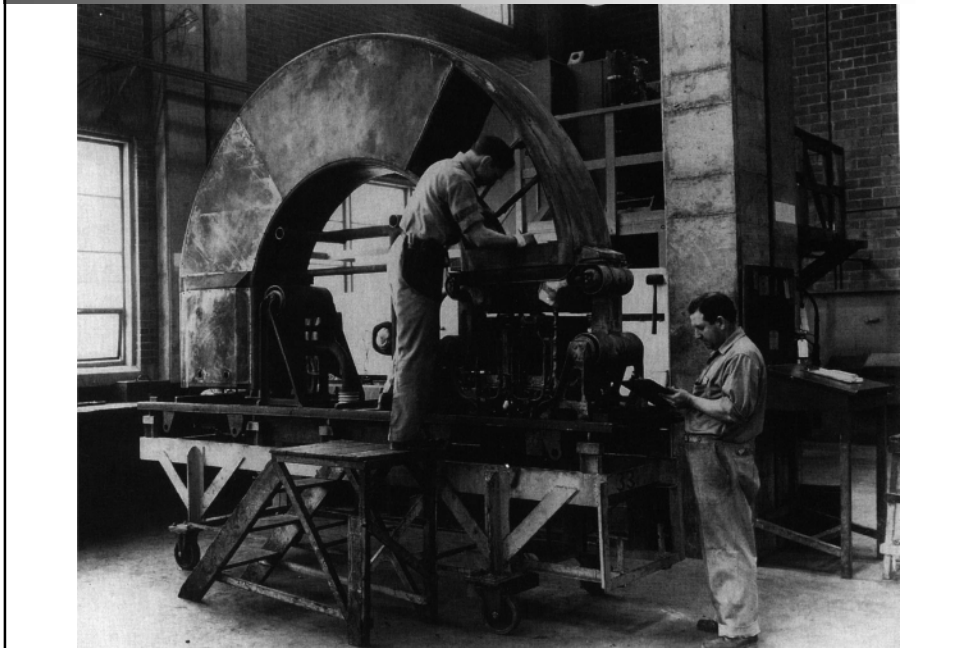
$$\frac{l'}{\Phi - a - l' \cdot \text{tg } \epsilon' - [\text{tg } \Phi (a + l' \cdot \text{tg } \epsilon') + l'] \cdot \text{tg } \epsilon''}$$

**JOSEF MATTAUCH UND RICHARD HERZOG  
ENTWICKELN DAS DOPPELFOKUSSIERENDE  
(HOCHAUFLÖSENDE) MASSENSPEKTROMETER  
(WIEN 1934)**

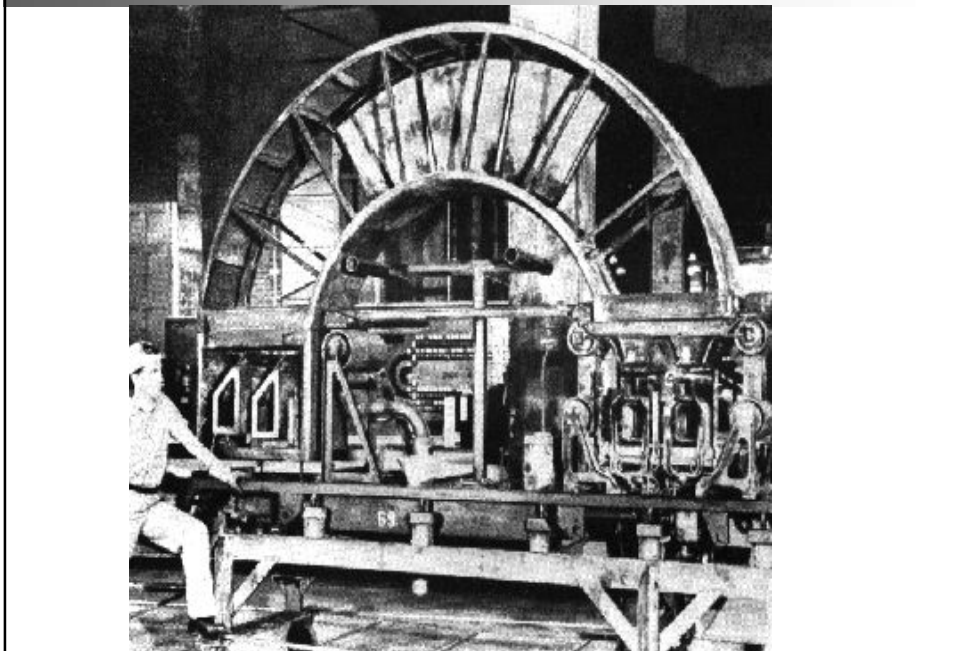
## DER KRIEG - PRÄPARATIVE MASSENSPEKTROMETRIE DAS CALUTRON



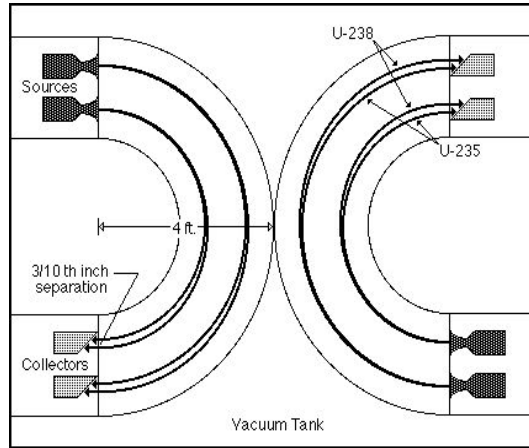
**PRÄPARATIVE MASSENSPEKTROMETRIE - DAS CALUTRON**



**PRÄPARATIVE MASSENSPEKTROMETRIE - DAS CALUTRON**



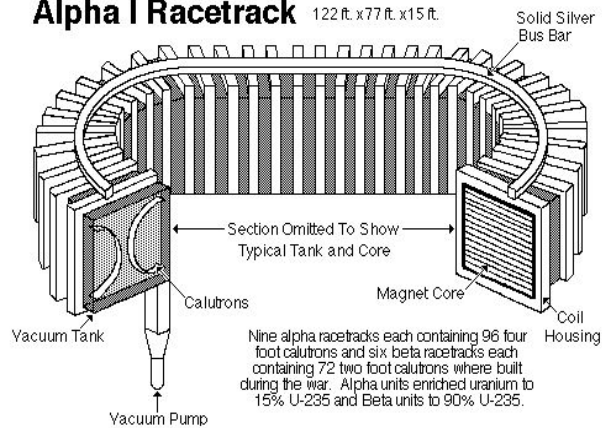
**PRÄPARATIVE MASSENSPEKTROMETRIE - DAS CALUTRON**



**PRÄPARATIVE MASSENSPEKTROMETRIE - DAS CALUTRON**

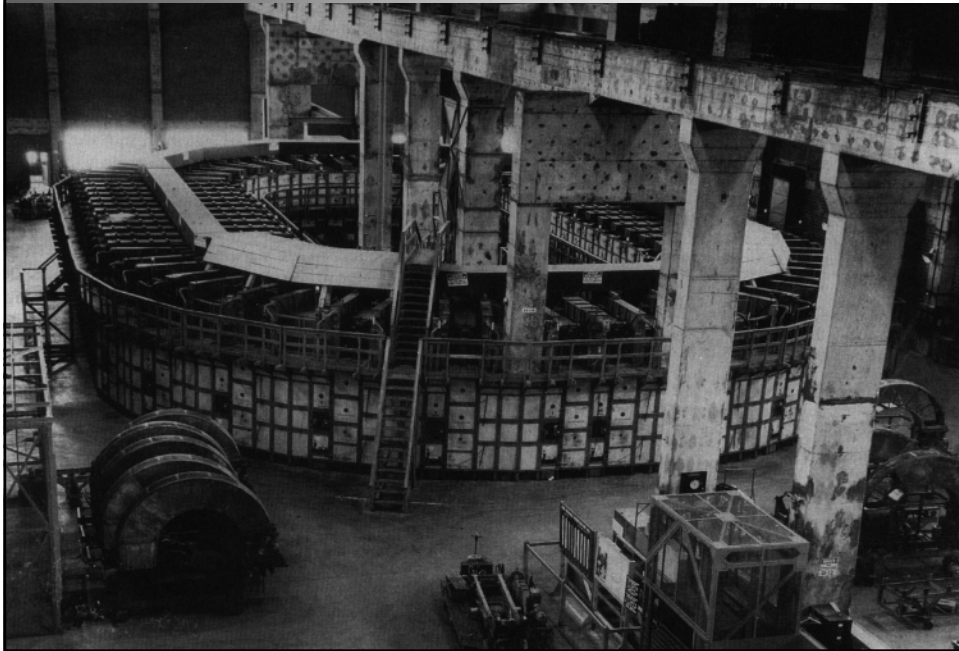
**Alpha I Racetrack**

122 ft. x 77 ft. x 15 ft.



Nine alpha racetracks each containing 96 four foot calutrons and six beta racetracks each containing 72 two foot calutrons were built during the war. Alpha units enriched uranium to 15% U-235 and Beta units to 90% U-235.

## PRÄPARATIVE MASSENSPEKTROMETRIE - DAS CALUTRON



## PRÄPARATIVE MASSENSPEKTROMETRIE - DAS CALUTRON



MAGNETSPULEN AUS REINEM SILBER VOR DER RÜCKGABE AN DAS US DEPARTMENT OF TREASURY (ca. 1948)

A TREASURY OFFICIAL WAS APPROACHED ABOUT THE POSSIBILITY OF LOANING SILVER TO A WARTIME EMERGENCY PROJECT. WHEN THE OFFICIAL ASKED ABOUT THE AMOUNT OF SILVER REQUIRED, HE WAS TOLD THAT THE PROJECT WOULD REQUIRE ABOUT 15'000 TONS OF THE METAL. HIS RESPONSE WAS 'SIR, WE MEASURE OUR SILVER IN OUNCES, NOT TONS'....



**Magnetische und Elektromagnetische-Sektorfeldgeräte:**

- erstes Massenspektrometer (Dempster 1918) - **magnetisches Sektorfeldgerät:**

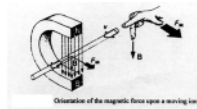
Prinzip: Nach Durchlaufen eines Potentialgefälles ( $V$ ) folgt für die kinetische Energie  $E_k$  von Ionen:

$$E_k = \frac{m \cdot v^2}{2} = z \cdot e \cdot V$$

$m$  Masse des Ions [kg]  
 $z$  Anzahl der Ladungen  
 $e$  Elementarladung [C]  
 $v$  Geschwindigkeit nach Beschleunigung [m/s]

in einem magnetischen Feld (magnetischen Flussdichte  $B$ ), ist die Kraft, welche auf die Ionen wirkt gegeben durch

$$F_m = B \cdot z \cdot e \cdot v$$

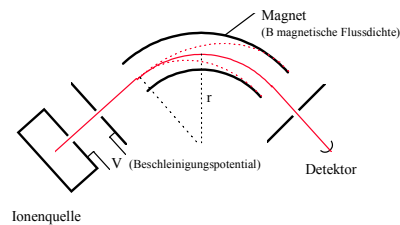


und die Ionen folgen einer Kreisbahn, deren Radius durch die gleichzeitig wirkende Zentrifugalkraft  $F_z$  gegeben ist:

$$F_z = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{und mit } F_m = F_z \quad B \cdot z \cdot e \cdot v = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \frac{m}{z} = \frac{B^2 \cdot r^2 \cdot e}{2 \cdot V}$$

für jedes  $m/z$ -Verhältnis erhält man bei konstantem  $B$  und  $V$  einen spezifischen Radius  $r$ .

Durch Variation von  $B$  oder  $V$  (bei gegebener Geometrie) lassen sich Massenspektren aufzeichnen (üblicherweise Variation von  $B$  bei konstanter Beschleunigungsspannung)



### Doppelfokussierende Massenspektrometer

Zwei Faktoren beeinträchtigen die Auflösung eines magnetischen Sektorfeld-Analysators:

- unterschiedliche Wege der Ionen im magnetischen Feld (z.B. durch unterschiedlichen „Eintrittswinkel“)
- unterschiedliche kinetische Energie der Ionen (z.B. Boltzmann'sche Geschwindigkeitsverteilung)

Ersteres kann durch eine geeignete Gerätegeometrie ausgeglichen werden (direction focusing → Abb.)



Der zweite Grund, welcher zur Verschlechterung der Auflösung  $R$  eines magnetischen Sektorfeldgerätes führt, kann durch Vorschalten eines elektrostatischen Feldes vor dem Magnetfeld verbessert werden, da nun bei gegebenem elektrischen Feld  $E$  nur Ionen gleicher kinetischer Energie den magnetischen Analysator erreichen:

$$z \cdot e \cdot E = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{und unter Verwendung der Definition der kinetischen Energie } E_k \text{ (oben)}$$

$$r = \frac{2 \cdot E_k}{z \cdot e \cdot E} \quad \Rightarrow \text{ Flugbahn unabhängig von } m, \text{ nur abhängig von } E_k$$

⇒ der elektrostatische Analysator ist also kein Massenanalysator, sondern „sortiert“ nach kinetischer Energie der Ionen

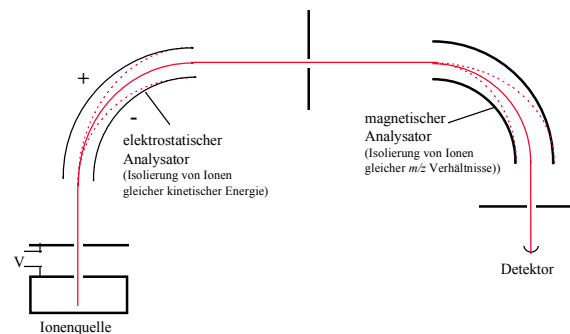
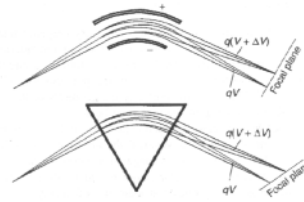


Abb. Aufbau eines doppelfokussierenden Massenspektrometers (Nier-Johnson-Geometrie)



Die Gerätegeometrie wird so gewählt, dass die Energiedispersion des ersten Sektors (z.B.  $E$ ) gerade durch die Energiedispersion des zweiten Sektors ( $B$ ) kompensiert wird



⇒ Auflösungen von 10.000 bis 100.000

- die Beschleunigungsspannung zur Überführung der Ionen in den Analysator wird bis zu 10 kV betrieben werden ⇒ **gutes Vakuum in der Ionenquelle** ansonsten Entladungen
- Sektorfeldgeräte zeigen eine **konstante Auflösung** ( $R=m/Dm$ ) über einen weiten Massenbereich ⇒  $Dm$  ist klein für kleine Massen und groß für große Massen

Bsp.  $R = 1000$  Masse eines Ions 100 ⇒  $Dm_0 = 0,1$   
 Masse eines Ions 1000 ⇒  $Dm = 1$

⇒ die Masse 100 wird beobachtet während das Instrument von Masse 99.95 bis 100.05 scannt

⇒ die Masse 1000 wird beobachtet während das Instrument von Masse 999.5 bis 1000.5 scannt

wäre die Scanrate (gescannter Massenbereich pro Zeiteinheit, z.B. eine Masseneinheit pro Sekunde) identisch, würde die Masse 100 nur 1/10-tel der Zeit (0.1 s) den Detektor erreichen wie die Masse 1000  $\Rightarrow$  bei gleicher Zahl von Ionen wäre die Gesamtzahl der Ionen mit  $m/z$  100 zehnmal geringer

$\Rightarrow$  daher wird **exponentiell gescannt** (langsamer bei kleinen  $m/z$  - Verhältnissen)

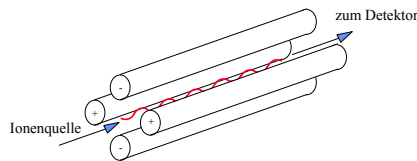
#### Peak-Matching

Zwei Komponenten werden gleichzeitig in der Ionenquelle ionisiert, eine ist unbekannt und die exakte Masse wird gesucht ( $m_x$ ) - die Masse der anderen Substanz ist genau bekannt ( $m_r$ ) (Referenzsubstanz).

Die **Beschleunigungsspannung** wird schnell **alternierend modifiziert** bis beide Signale exakt übereinander liegen („peak matching“)  $\Rightarrow m_x = m_r \cdot (V_r/V_x)$

#### Quadrupol-Analysatoren

- meist verwendeter Analysator (speziell GC/MS)
- erstmals beschrieben von Paul und Steinwedel 1953 (Bonn)
- Prinzip:  
4 Pole bilden ein **hyperbolisches elektrisches Wechselfeld**, wobei durch übereinanderlegen eines Hochfrequenzfeldes und eines Gleichstrompotentials einzelne  $m/z$ -Verhältnisse herausgefiltert werden (Massenfilter)

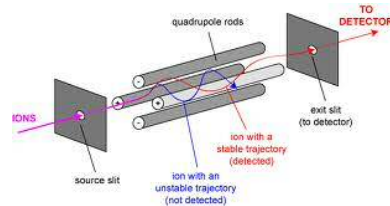


$\Rightarrow$  Ionen die entlang der z-Achse wandern, unterliegen einem elektrischen Gesamtfeld, das sich zusammensetzt aus einem quadrupolaren Wechselfeld welches einem konstanten Feld überlagert ist:

$$\Phi_0 = +(U - V \cos \omega t) \quad \text{und} \quad -\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t)$$

$\Phi_0$  Potential an den Polen  
typische Werte:  $U = 500-2000 \text{ V}$ ,  $V = 0-3000 \text{ V}$

## Quadrupol-Analysatoren

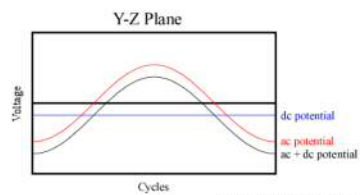
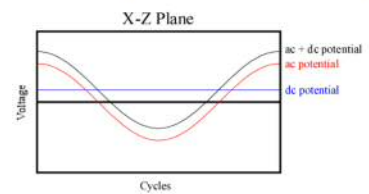
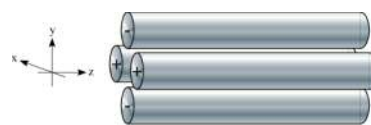


## Ionentrajektorien in Quadrupol-Analysatoren

$$\Phi_0 = +(U - V \cos \omega t) \quad \text{und}$$

$$-\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t)$$

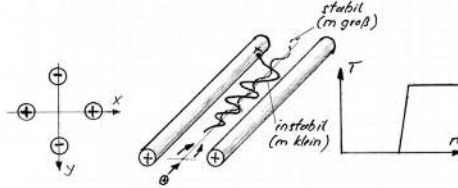
$\Phi_0$  Potential an den Polen  
typische Werte:  $U = 500\text{-}2000\text{ V}$ ,  
 $V = 0\text{-}3000\text{ V}$



© 2008 Dunnivant & Ginsbach

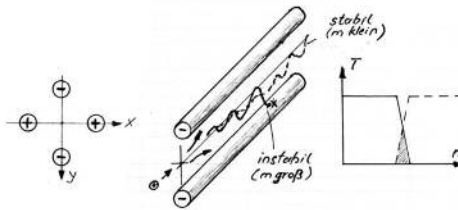
## Iontrajektorien in Quadrupol-Analysatoren

Bewegung der Ionen  
in x-Richtung



Ionen schwingen in der Potentialmulde des statischen Feldes hin und her  
Leichte Ionen können dem Wechselfeld folgen  $\Rightarrow$  Amplitude wird immer größer  $\Rightarrow$  Ionen stoßen an Elektrode und gehen verloren.  
Schwere Ionen dagegen kommen durch, da sie sich nicht so stark aufschaukeln.

Bewegung der Ionen  
in y-Richtung



Ionen rutschen den Potentialtopf' des statischen Feldes hinunter  
Leichte Ionen können von dem Wechselfeld immer wieder zurückgeholt werden und kommen durch.  
Schwere Ionen sind zu träge, driften an die Elektrode und gehen verloren.

## Iontrajektorien in Quadrupol-Analysatoren

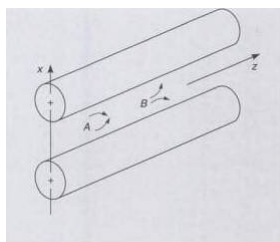


Abb. 18.8 Betrieb eines in der  $xz$ -Ebene liegenden Quadrupols. A: Ionen werden zur  $z$ -Achse hin fokussiert; B: Ionen werden zu den Stäben in der  $xz$ -Ebene abgelenkt.

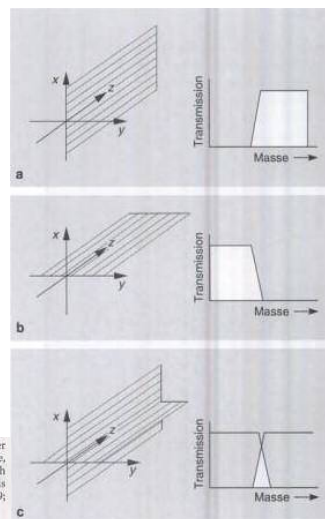


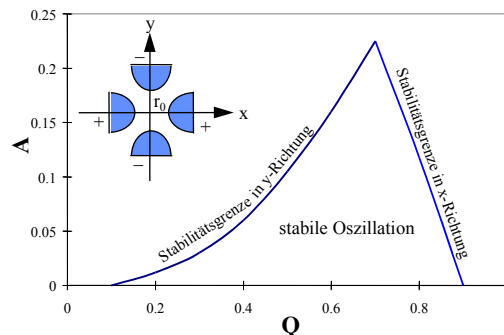
Abb. 18.9 Der Quadrupol wirkt als a) Hochpaß-Massenfilter in der  $xz$ -Ebene; b) als Tiefpaß-Massenfilter in der  $yz$ -Ebene, und c) als Schmalbandfilter, wenn sowohl Hochpaß- als auch Tiefpaß-Massenfilter aktiv sind. (Nachdruck mit Erlaubnis aus P.E. Miller und M.B. Denton, *Anal. Chem.*, 1986, 63, 619; Copyright 1986 American Chemical Society.)

- Durch Variation des elektrischen Wechselfeldes können nacheinander verschiedene  $m/z$ -Verhältnisse den Analysator verlassen (**scannen**)  $\Rightarrow$  Aufnahme des Massenspektrums
- mathematische Beschreibung der Vorgänge ist kompliziert (**Mathieu-Gleichungen**)

Mathieu –Parameter A und Q

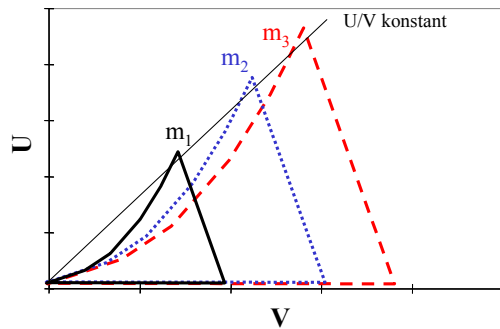
$A = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2}$	U	Gleichspannungspotential
	m	Masse des Ions
	$\omega/2\pi$	Frequenz der Wechselfeldspannung
$Q = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2}$	V	Amplitude des Wechselfeldspannungspotentials
	$r_0$	Radius des Quadrupolfeldes
	e	Elementarladung
	z	Anzahl der Ladungen

Für einen Quadrupol-Analysator sind  $r_0$  und  $\omega$  sind konstant, U und V sind die Variablen. Daraus können so genannte Stabilitätsdiagramme errechnet werden (also ob die Auslenkung der Ionen in x- oder y-Richtung den Radius des Analysators überstieg oder nicht)



**Abb.** Ausschnitt eines Stabilitätsdiagramms für Quadrupolanalysatoren

$$U = A \frac{m \omega^2 r_0^2}{z 8e} \quad \text{und} \quad V = Q \frac{m \omega^2 r_0^2}{z 4e} \quad (\text{siehe oben})$$



**Abb.** Stabilitätsgebiete als Funktion von U und V für Ionen unterschiedlicher Massen ( $m_1 < m_2 < m_3$ )

⇒ wird U und V linear variiert (also bei konstantem U/V-Verhältnis) ⇒ **Durchscannen** des Massenspektrums

**Vorteile** gegenüber Sektorfeldgeräten:

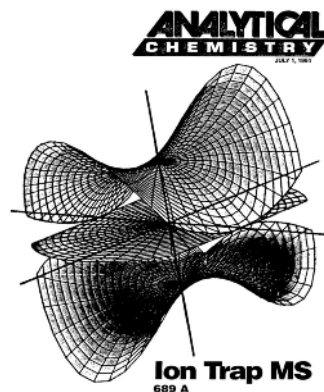
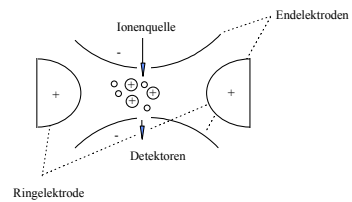
- einfache Handhabung, kompakt, preisgünstig

**Nachteile:**

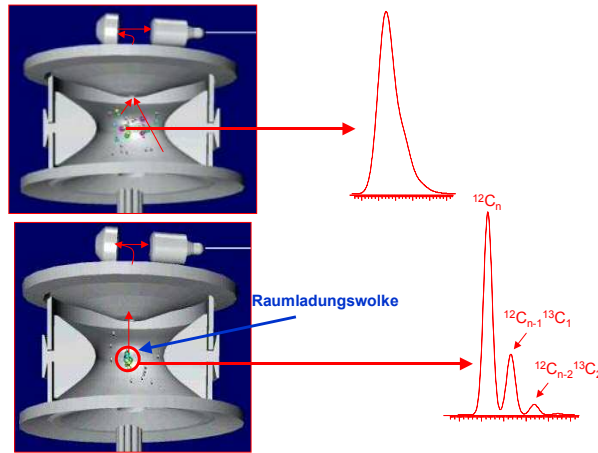
- geringere Auflösung (bis ca. 3000), kleinerer Massenbereich (bis ca.  $m/z$  4000)

### **Ionenfällen (ion traps)**

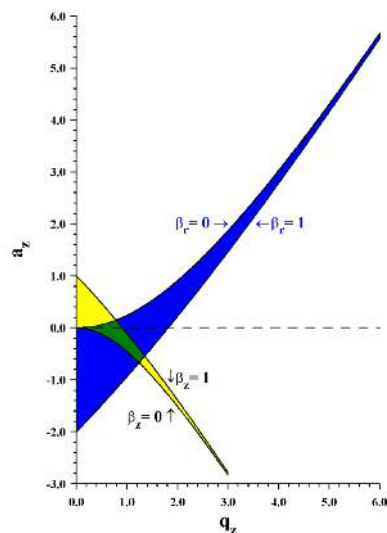
- wird speziell in den letzten Jahren in Verbindung mit der GC eingesetzt
- Prinzip: ähnlich Quadrupole-Analysatoren, wobei das Hochfrequenzfeld nun 3-dimensional aufgebaut wird ⇒ dadurch können die Ionen zunächst einmal "gespeichert" werden bevor sie durch Variation der RF-Spannung je nach  $m/z$ -Verhältnis die Ionenfalle in Richtung Detektor verlassen "mass selective instability"



Auflösung und Nachweisvermögen von Ionenfallen waren zu Beginn nicht zufriedenstellend  $\Rightarrow$  Verbesserung beider Leistungskriterien durch Zugabe eines leichten "Puffer"-Gases, i.a. He



- $\Rightarrow$  Kollisionen mit Heliumatomen reduziert die kinetische Energie der Analytione und zwingt sie in das Zentrum der Ionenfalle  $\Rightarrow$  **gemeinsamer Startpunkt** führt zu **erhöhter Auflösung** und effizientere Überführung zum Detektor



**Abb.** Stabilitätsdiagramm

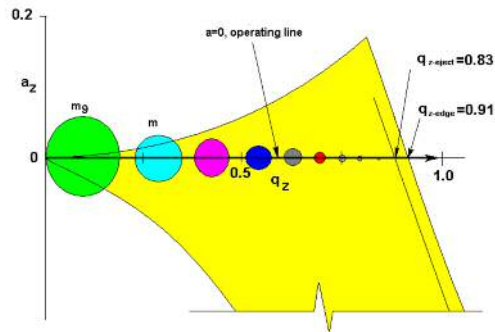
die blaue Fläche zeigt A- (DC) und Q- (RF)-Werte, welche stabile Trajektorien in **radialer** Richtung ergeben

die gelbe Fläche zeigt A- und Q- Werte, welche stabile Trajektorien in **z-Richtung** ergeben

die grüne Fläche zeigt A- und Q- Werte, welche **stabile Trajektorien** in der Ionenfalle ergeben

Normalerweise wird kein Gleichspannungspotential angelegt  $\Rightarrow$   
**Arbeitslinie** bei  $a_z=0$

$\Rightarrow$  bei gegebenen Frequenz und Amplitude der Radiofrequenz (1.1 MHz) liegen unterschiedliche Ionen ( $m/z$ -Verhältnisse) an verschiedenen Stellen der Arbeitslinie



### Aufnahme des Massenspektrums

Wenn  $U = 0 \Rightarrow a_z = 0$ , für  $q_z$  ergibt sich:

$$q_z = \frac{8z^* eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2} \quad \begin{array}{l} z^* \text{ Anzahl der Ladungen,} \\ r_0 \text{ und } z_0 \text{ Abmessungen der Falle} \end{array}$$

da  $\omega$  einen festen Wert besitzt,  $z^*$  üblicherweise 1 ist und  $e$ ,  $r_0$  sowie  $z_0$  konstant sind

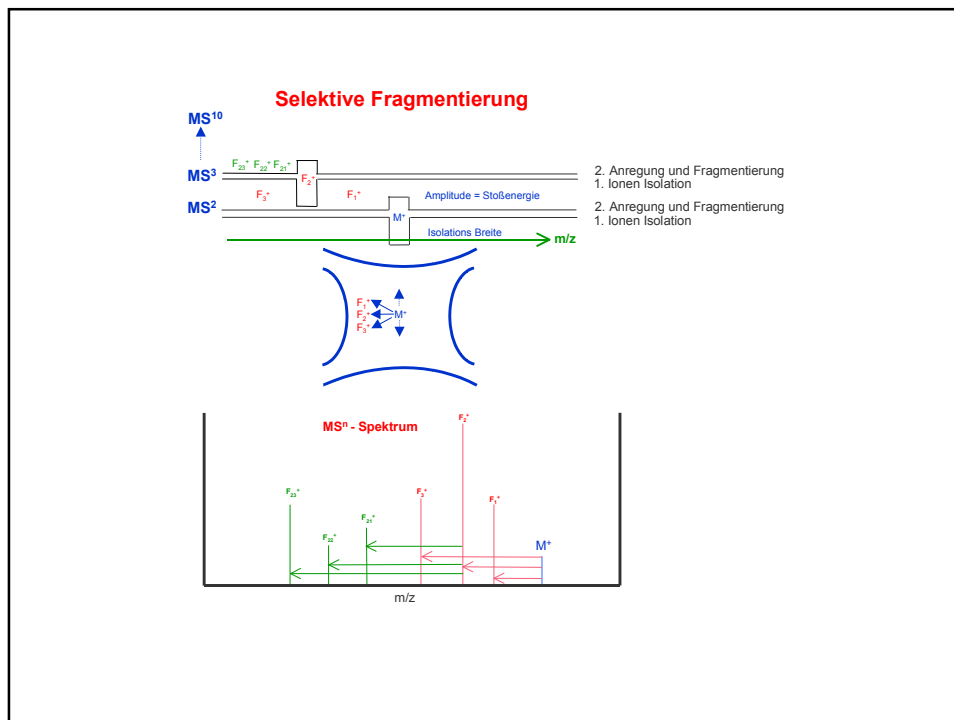
$\Rightarrow q_z$  wird größer mit steigendem  $V$  und kleiner mit steigendem  $m$

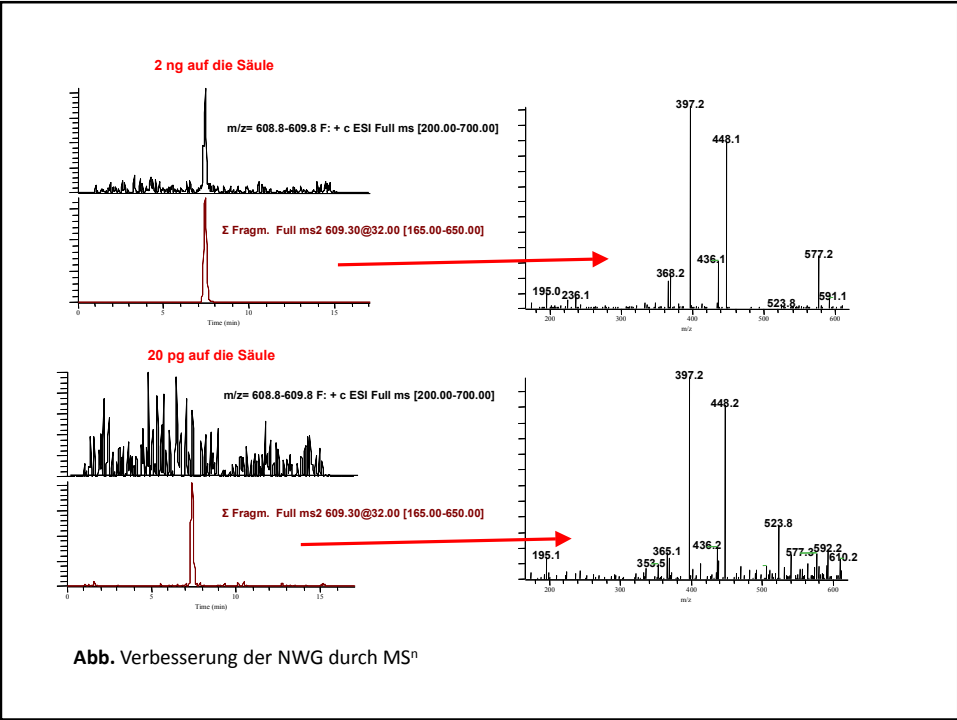
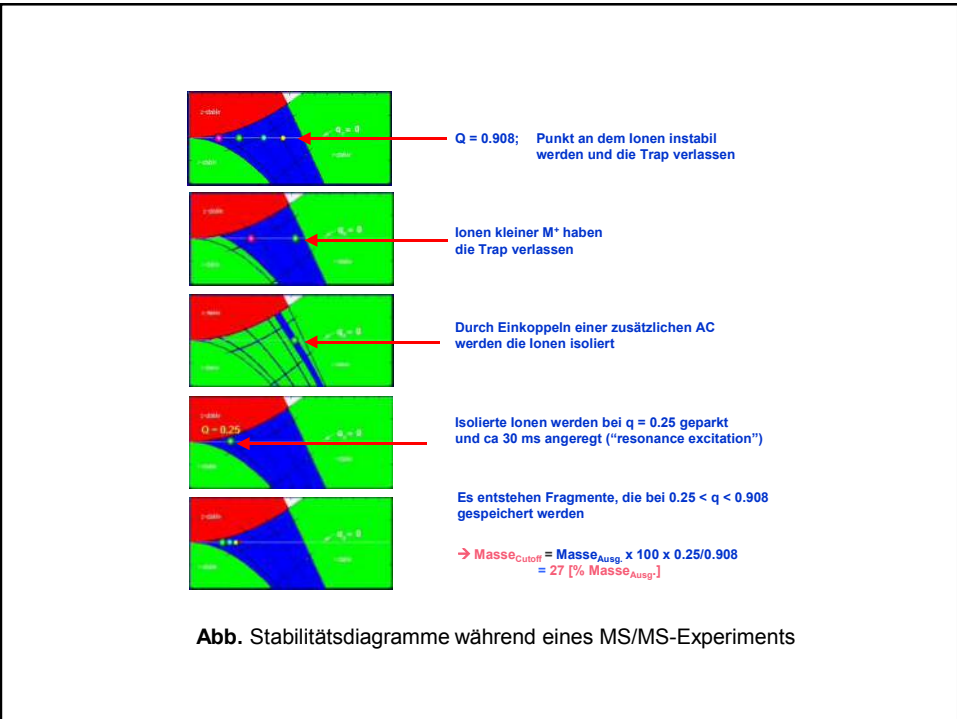
$\Rightarrow$  wird  $V$  im Laufe der Zeit erhöht, verlassen nacheinander die verschiedenen Massen die Falle in  $z$ -Richtung, beginnend mit niedrigen Massen (*“mass selective instability”*)

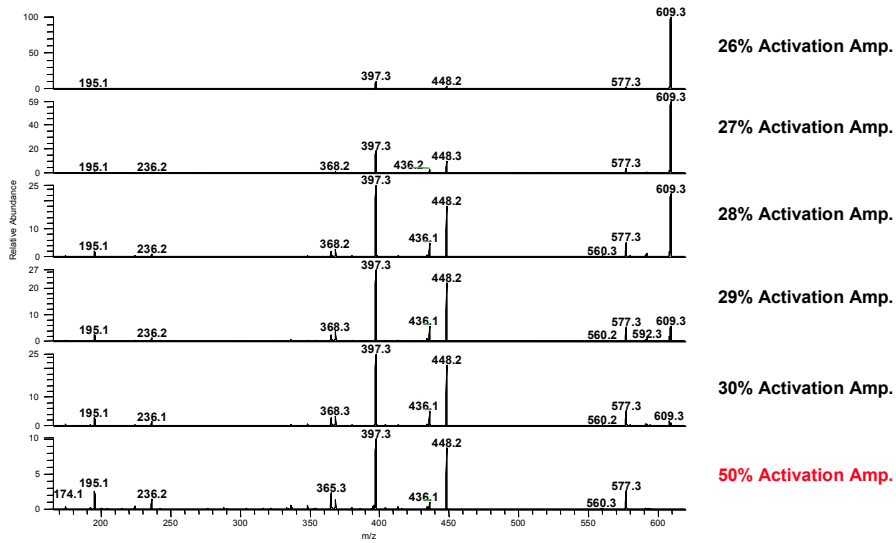


### Tandem-Massenspektrometrie in Ionenfallen (“*tandem-in-time*”)

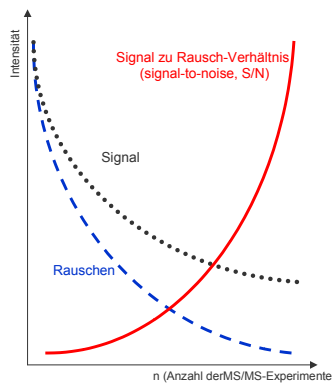
- ⇒ zunächst **Isolierung** eines einzelnen  $m/z$ -Verhältnisses in der Ionenfalle (“*mass selective instability*“ für kleinere Ionen, Einkoppeln einer zusätzlichen variablen Wechselspannung (kHz) an den Endelektroden für größere Ionen als die zu isolierende Masse („*resonant ejection*“)
- ⇒ „parken“ der Ionen bei  $q_z = 0.25$
- ⇒ Übertragung von Translationsenergie auf das isolierte Ion („*resonance excitation*“)
- ⇒ Ionen kollidieren mit Heliumatomen („*collision induced dissociation*“, CID) und bilden Fragmente
- ⇒ Aufnahme des Massenspektrums ( $MS^2$ ) oder Isolierung des nächsten Ions ( $MS^n$ )





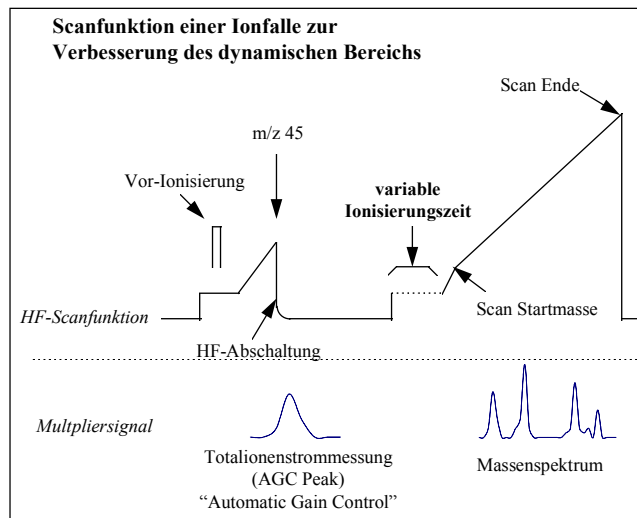


**Abb.** MS/MS-Spektrum von Resperin (MW 608) bei verschiedenen Anregungsenergien



**Abb.** Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses durch MS<sup>n</sup>

- ⇒ **Füllgrad** der Ionenfalle ist kritisch (Raumladungseffekte bei zu hohen Ionenkonzentrationen ⇒ „verschmieren“ der Massenspektren) ⇒ **Lineare Ionenfallen** (z.B. LTQ Thermo)
- ⇒ bei sehr variablen Probenkonzentrationen ist die Einstellung des Füllgrads von entscheidender Bedeutung
- ⇒ **dynamische** „software-kontrollierte“ Optimierung (AGC)



**Abb.** Scanfunktion einer Ionenfalle

**Vorteile von Ionenfallen:**

- Arbeitsdrücke vergleichsweise hoch (ca.  $10^{-3}$  Torr) ( $\Rightarrow$  einfache Kopplung mit chromatographischen Techniken)
- Möglichkeit von MS/MS
- sehr niedrige absolute Nachweisgrenzen (komplette Spektren bei Substanzmengen  $< 10\text{pg}$ )
- mittlerweile Massenbereiche bis  $m/z$  40000

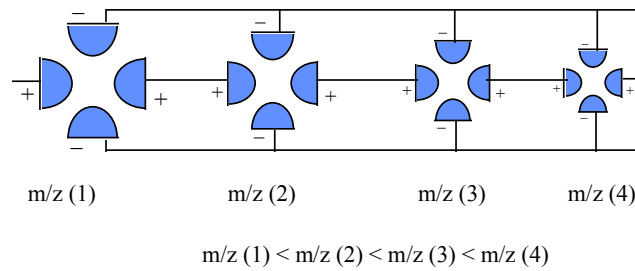
**Nachteile von Ionenfallen:**

- vergleichsweise niedrige Auflösung (niedriger als doppelfokussierende MS)
- eingeschränkter dynamischer Bereich und Reproduzierbarkeit
- deutlich höhere Anschaffungskosten als Quadrupolgeräte

Ausblick: miniaturisierte Ionenfallen (Massenbereich)

$$(m/z)_{\max} = \frac{4eV_{\max}}{Qr_0^2\omega^2} \quad \text{d.h. verkleinern von } r_0 \text{ führt zur höheren } (m/z)_{\max}$$

Oder "Orgelpfeifen-Ionenfalle" (Anordnung von Ionenfallen mit unterschiedlichen Radien und unterschiedlichen Längen, statt Veränderung der RF-Amplitude ("mass selective instability") wird gleiche Amplitude für alle Fallen eingesetzt (Einzellionenspeicherung) und das Massenspektrum resultiert aus der räumlichen Information:



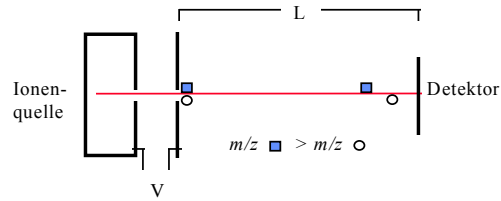
Tian et al., JMS, 2014,

### Flugzeitmassenspektrometer (time of flight, TOF)

- Prinzip:  
Trennung der Ionen nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld (wie Sektorfeld) durch die **unterschiedlichen Laufzeiten** ( $t$ ) der einzelnen  $m/z$ -Verhältnisse:

$$t = \sqrt{\left(\frac{m}{z}\right)\left(\frac{1}{2 \cdot e \cdot V}\right)} \cdot L$$

Meßgröße: Flugzeit ( $\mu$ s-Bereich)



#### Vorteile:

- praktisch alle Ionen welche die Ionenquelle verlassen erreichen den Detektor ( $\Rightarrow$  **niedrige Nachweisgrenzen** bei vollständiger Aufnahme des Massenspektrums)
- praktisch unbegrenzter **Massenbereich** ( $> 300$  kDa)
- gut geeignet in Kombination mit MALDI (Startimpuls durch Laser)

#### Nachteile:

- lineares TOF: **schlechte Auflösung** (Dauer des Ionenbildungspulses (*time distribution*), Größe des Volumens, in dem die Ionen gebildet werden (*space distribution*), kinetische Energie der Ionen, (*kinetic energy distribution*))
- eine Möglichkeit zur Verbesserung der Auflösung: **verzögerte Ionenextraktion** (delayed extraction  $\Rightarrow$  siehe unter MALDI)

#### Einheiten:

$$V = \frac{\text{kg} \cdot \text{m}^2}{\text{s}^3 \cdot \text{A}} \quad C = \text{A} \cdot \text{s} \quad t = \sqrt{\frac{\text{kg} \cdot \text{s}^3 \cdot \text{A}}{\text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}}} \cdot m$$

### Elektrostatische Reflektoren (Reflektron)

- Verbesserung der Auflösung durch Einsatz von Reflektoren (Graphik)(schnellere Ionen dringen etwas tiefer in das Reflektorfeld ein als langsamere und haben folglich etwas längere Laufwege)
- ⇒ Korrektur der Energiedispersion der Ionen, welche die Ionenquelle verlassen
- ⇒ Auflösung 5000-10000

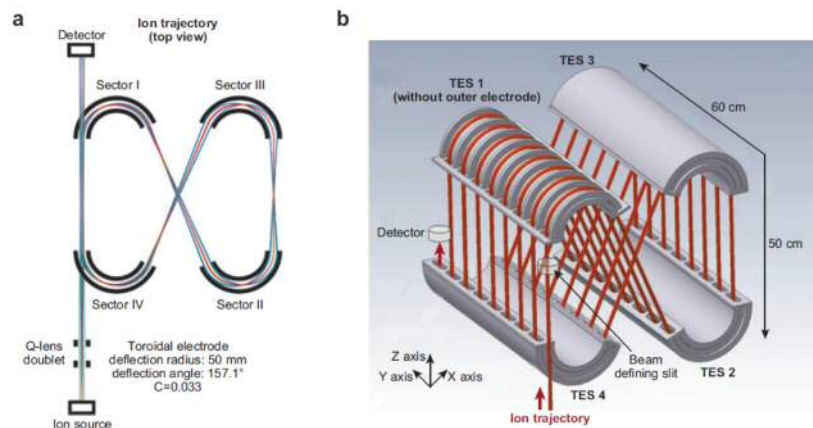
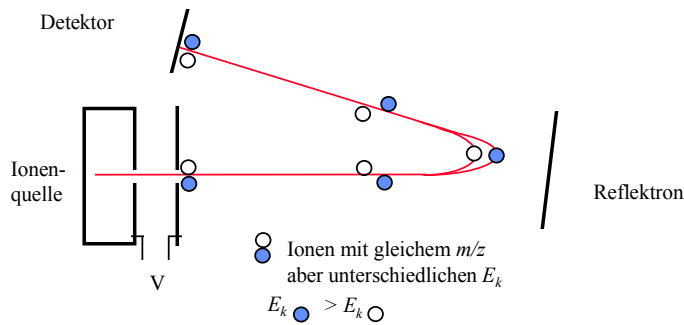


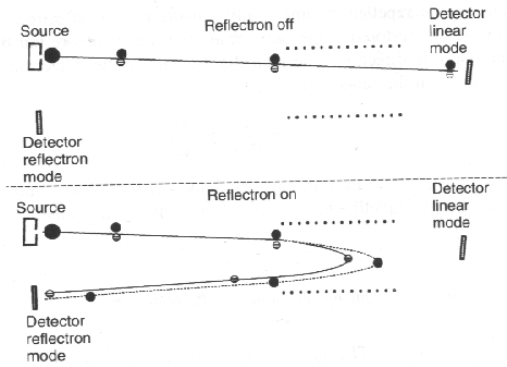
Figure 3

Two multiple-pass time-of-flight mass analyzer designs. (a) Multum II, with four toroidal sectors. Figure adapted with permission from Reference 71. (b) Spiral ion optical device. See text for discussion. Figure adapted with permission from Reference 13.

aus: Marshall et al., 2008, Annu. Rev. Anal. Chem. 2008. 1:579–99

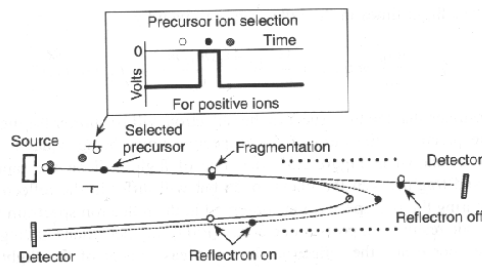
### Tandem-Massenspektrometrie mit Reflektor-TOF-MS

Wird ein lineares TOF mit einem Reflektor kombiniert können auch Tandem- Massenspektrometrie betrieben werden:



**Abb.** Tandem-Massenspektrometrie mit einer **Kombination** eines linearen und eines Reflektor TOF-Instruments: (●) Ionenschwarm einer definierten Masse welches die Ionenquelle verläßt; (●) „survivor ions“; (○) Fragmentionen (*post-source decay ions*)

- ⇒ fragmentiert ein Ion nach der Beschleunigung in der Ionenquelle und bevor es in das Reflektorfeld eintritt, haben die Bruchstücke die gleiche Geschwindigkeit und damit die gleiche Flugzeit zum Detektor bei ausgeschaltetem elektrischen Feld
- ⇒ allerdings haben sie **unterschiedliche kinetische Energien** – dringen also bei eingeschaltetem elektrischen Feld unterschiedlich weit ins Reflektor ein ⇒ unterschiedliche Laufzeiten
- ⇒ „post-source-decay“ (PSD) → Peptidsequenzierung

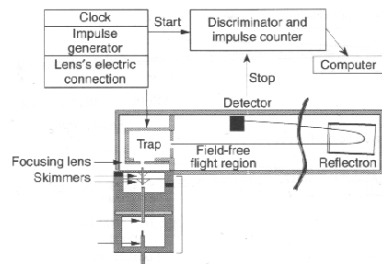


**Abb.** TOF-Analysator mit einer Deflektions-Elektrode zur Selektion einzelner Vorläufer-Ionen (*precursor ions*)



### Kopplung von TOF-Analysatoren mit kontinuierlichen Ionenquellen

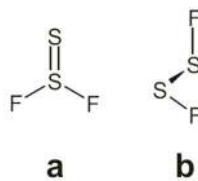
- ⇒ TOF-Analysatoren passen gut zu **gepulsten Ionenquellen** (z.B. MALDI)
- ⇒ für kontinuierliche arbeitende Ionenquellen (z.B. Elektrospray oder APCI) muss der kontinuierliche Ionenstrom in einen gepulsten umgesetzt werden
- ⇒ **Orthogonaler Quellenaufbau** (kontinuierlicher Ionenstrom wird rechtwinklig zum TOF in die Ionenquelle gebracht und die Beschleunigungsspannung wird gepulst) ⇒ ein Großteil der Ionen geht verloren
- ⇒ Kombination von Ionenfalle (speichern) und TOF (R ca. 25000)



**Abb.** Kopplung einer ESI-Quelle mit einer Ionenfalle und einem Reflektor-TOF

### Intermezzo

Es ist bekannt, dass  $F_2S_2$  in zwei isomeren Formen (**a** & **b**) vorkommt:



Können massenspektrometrische Methoden helfen um zu klären, welche der beiden Formen vorliegt ?

Die Bildungsenthalpien von (a) und (b) sind – 289 und – 278 kJ mol<sup>-1</sup>

⇒ Unterschied ~ 11 kJ mol<sup>-1</sup>

$$\Delta m = \frac{\Delta E}{c^2} = \frac{11 \text{ kJ mol}^{-1}}{(2.998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1})^2 \times 6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}$$
$$= 2.0 \times 10^{-37} \text{ kg} \cong 1.2 \times 10^{-10} \text{ Da}$$

Damit ergibt sich eine notwendige Auflösung von:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{102}{1.2 \cdot 10^{-10}} = 8.5 \cdot 10^{11}$$

J. Meija, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2005), 383, 728.

### Fourier Transform Massenspektrometrie

- ⇒ Fourier Transform Massenspektrometrie (FTMS) basiert auf dem Prinzip der **Ionen-Zyklotron-Resonanz** (*ion cyclotron resonance* (ICR)).
- ⇒ Ionen (gebildet durch EI, MALDI oder ESI) werden innerhalb einer Zyklotron-Zelle in einem **starken homogenen Magnetfeld** gespeichert.
- ⇒ die Ionen werden durch das Magnetfeld auf **Kreisbahnen** gezwungen deren Radien sehr viel kleiner als der Zellenradius sind und kreisen dort.

Zentripedalkraft:	$F = z \cdot v \cdot B$	$v$	Geschwindigkeit
		$z$	Anzahl der Ladungen
		$B$	magnetische Flußdichte
Zentrifugalkraft:	$F' = \frac{m \cdot v^2}{r}$	$m$	Masse
		$r$	Radius

$$\text{mit } F' = F \Rightarrow z \cdot v \cdot B = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad \text{oder} \quad z \cdot B = \frac{m \cdot v}{r}$$

⇒ ein kreisendes Ion vollendet eine komplette Kreisbahn mit einer Frequenz  $\nu_0$  gleich:

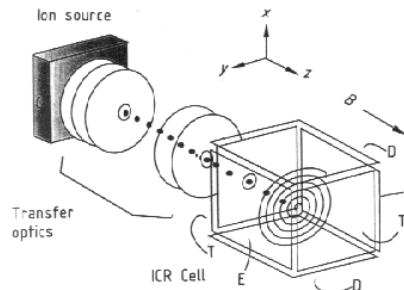
$$\nu_0 = \frac{v}{2\pi \cdot r}$$

woraus folgt:  $2\pi \cdot \nu_0 = \frac{v}{r} = \frac{z}{m} \cdot B$

⇒ die **Frequenz hängt ab vom  $m/z$ -Verhältnis** und der magnetischen Feldstärke  $B$  – nicht von der Geschwindigkeit des Ions (allerdings beeinflusst  $v$  den Radius  $r$ )

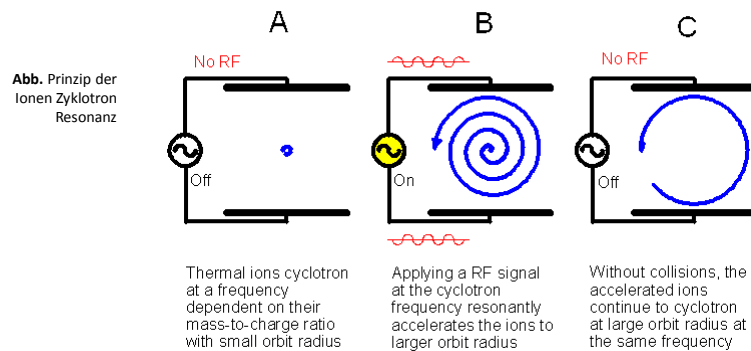
Bsp. einfach geladene Ionen des Peptids Vasopressin (MW 1084) hat eine Zyklotronfrequenz von 66.585 kHz in einem 4.7T Magnetfeld, die doppelgeladenen Ionen eine von 133.170 kHz.

**Abb.** ICR-Instrument. Das magnetische Feld ist entlang der z-Achse orientiert. Die Ionen werden ebenfalls entlang der z-Achse injiziert und durch eine kleine Gleichspannung (ca. 1V) zwischen Front- und Endplatte (T) „getrappt“



⇒ Zyklotron Resonanz wird eingesetzt, um das Massenspektrum aufzuzeichnen

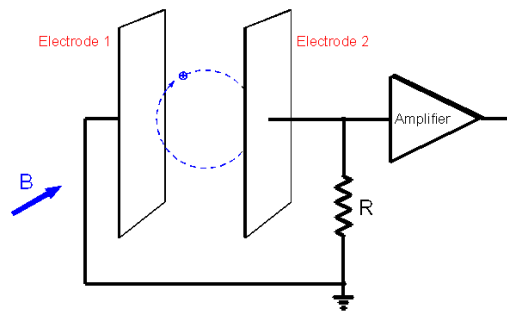
Prinzip: ein elektrisches Wechselfeld wird zwischen zwei Seitenplatten (E) der Zelle angelegt ⇒ wenn die Frequenz dieses Feldes mit der der interessierenden Ionen übereinstimmt (**Resonanz**) ⇒ Energieaufnahme und Beschleunigung der Ionen ⇒ Ionen kreisen auf größeren Bahnen (**Gyroradien** werden größer) – Ionen mit anderem  $m/z$ -Verhältnis (anderen Zyklotronfrequenzen) ⇒ keine Anregung ⇒ **massenselektiv**



#### Detektion der Ionen in der ICR Zelle (*Image Current Detection*)

Fourier Transform Massenspektrometer messen nicht die Ionen selbst (wie alle anderen MS-Systeme), sondern den so genannten „*image current*“, welcher durch die Bewegung der Ionenpakete in der Zelle entsteht.

⇒ das Phänomen ist in der Abb. unten für ein Paket positiver Ionen, welche nach Anregung auf großen Bahnen in der Zelle kreisen skizziert.



Wenn die Ionen sich von Elektrode 1 weg bewegen und sich Elektrode 2 nähern, zwingt das elektrische Feld der positiven Ionen Elektronen im externen Stromkreis durch den Widerstand in Richtung Elektrode 2 zu fließen. Während des anderen Halbzyklus verlassen die Elektronen Elektrode 2 und fließen Richtung Elektrode 1  $\Rightarrow$  *image current*.

- $\Rightarrow$  die Frequenz des *image current* ist identisch mit der Zyklotronfrequenz des Ions, die Amplitude ist proportional zur Anzahl der Ionen in der ICR-Zelle
- $\Rightarrow$  eine nach Verstärkung leicht messbare Wechsellspannung entwickelt sich über den Widerstand R.
- $\Rightarrow$  Detektion der Ionen ohne diese selbst zu „verbrauchen“

### Fourier Transform Massenspektrometrie

Bevor Fourier-Transformationen auf die Ionen-Zyklotron-Resonanz angewandt wurde, mußte jedes  $m/z$ -Verhältnis individuell und nacheinander untersucht werden (Einstrahlung einer einzelnen Anregungsfrequenz  $\Rightarrow$  Anregung eventuell vorhandener Ionen  $\Rightarrow$  Ablesen des *image currents*  $\Rightarrow$  Entfernen aller Ionen aus der Zelle (*quench pulse*)  $\Rightarrow$  Wiederholung der Prozedur (Ionenbildung, Anregung, Detektion) mit etwas anderer Anregungsfrequenz

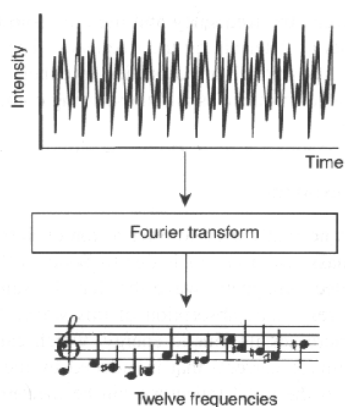
- $\Rightarrow$  sehr lange Aufnahmezeiten (20 Minuten) und großer Probenverbrauch.

Bei der FTMS werden alle in der Zelle vorhandenen Ionen innerhalb einer kurzen Zeitspanne angeregt (schnelles Einstrahlen eines breiten Frequenzbandes innerhalb einer  $\mu\text{s}$ ).

⇒ wird eine Vielzahl von Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnissen **gleichzeitig angeregt**, setzt sich das Signal am Ausgang des Verstärkers aus den Frequenzkomponenten aller  $m/z$ -Verhältnisse zusammen

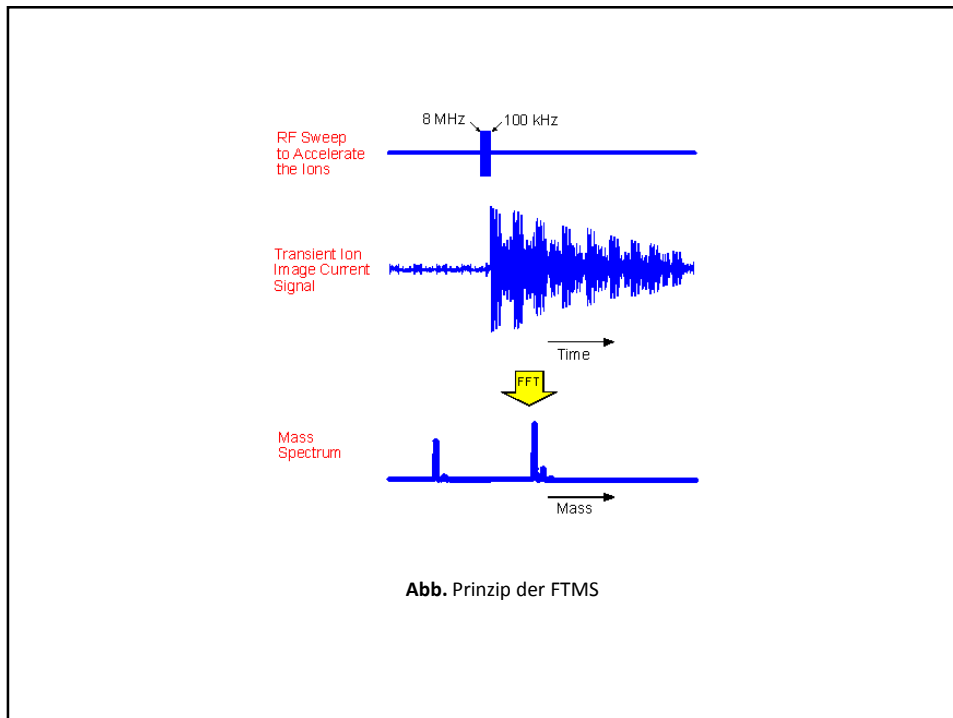
⇒ durch Fourier-Transformationen wird das komplexe Signal von einer **zeit-abhängigen** Funktion in eine **frequenz-abhängige** Funktion umgerechnet

⇒ das Massenspektrum der kreisenden Ionen kann dann aus den Frequenzen (Gleichung oben) errechnet werden



**Abb.** Prinzip der Fourier-Transformation:

Ein Geräuschsignal, dessen Intensität als zeit-abhängige Funktion gemessen wird, setzt sich zusammen aus einer Vielzahl gleichzeitig angeschlagener Einzeltöne. Die Fourier Transformation erlaubt die Auffindung der Einzeltöne und ihrer jeweiligen Intensitäten.



⇒ die Auflösung (FWHM) ist direkt proportional zur Aufnahmezeit und kann angenähert berechnet werden:

$$R = \nu_0 T / 2$$

wobei  $\nu_0$  die Zyklotronfrequenz des interessierenden Ions ist und T die Beobachtungszeit in Sekunden

*Bsp.: 4.7T Magnet ⇒ R = 66,000 für das Peptid Vasopressin (m/z 1084) bei einer Aufnahmezeit von 2 s.*

⇒ **Auflösung** hängt von der **Beobachtungszeit** (begrenzt durch Relaxationszeit) ab ⇒ sehr gutes Vakuum (ca.  $10^{-5}$  Pa) notwendig für Messungen mit hoher Auflösung

⇒ „Nachweisgrenze“ liegt bei ca. 10 Ionen in der Zelle

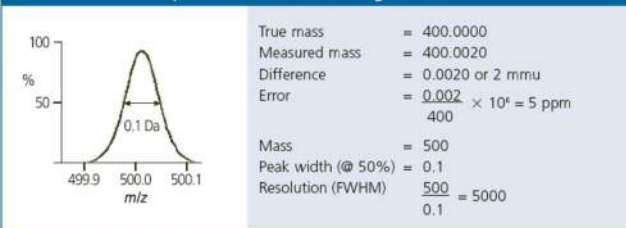
⇒ auch MS/MS-Experimente möglich (Prinzip ähnlich Ionenfallen)

⇒ Fourier Transform stellt beträchtliche Anforderung an die elektronischen Bauteile z.B. Aufnahme Spektrums über eine 2 Sekunden ⇒ 500,000 Auslesungen pro Sekunde (Nyquist-Theorem – Ausleserate mindestens doppelt so groß wie die höchste zu messende Frequenz) ⇒ mindestens 1 Million Daten (bei höherem R entsprechend mehr) müssen im Datenpuffer abgelegt werden können.

### ORBITRAP Massenspektrometer

- ⇒ seit 2005 auf dem Markt (Thermo)
- ⇒ ebenfalls eine Fourier-Transform-MS Technik
- ⇒ massenspektrometrische Auflösung > 150.000
- ⇒ exzellente Massengenauigkeit 2–5 ppm (bis herunter zu 0.2 ppm)  
(Makarov et al., 2006)
- ⇒ guter Übersichtsartikel von Perry et al. (2008) ORBITRAP MASS SPECTROMETRY: INSTRUMENTATION, ION MOTION AND APPLICATIONS, Mass Spectrom. Reviews

Figure 1: Mass accuracy determination and the FWHM method for determining resolution for a mass spectrometer measured at a given ion.



Massengenauigkeit  
in der MS

Olsen et al. (2005) Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 4:2010–2021.

Makarov et al. (2006) Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* 78:2113–2120.

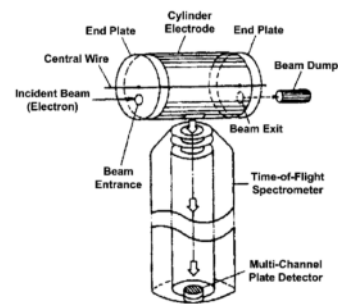
Perry et al. (2008) *Mass Spectrometry Reviews*, Volume 27, Issue 6: 661-699 (hieraus alle folgenden Orbitrap-Bilder)



⇒ Weiterentwicklung der **Kingdon Trap** (1923)

⇒ **Speichern von Ionen** in einem reinen elektrostatischen (Gleichstrom)-Feld um einen zentralen Draht (central electrode) und einer äußeren zylindrischen Elektrode (outer electrode) sowie zwei Endelektroden (Abb. rechts)

⇒ werden Ionen im Speichervolumen produziert oder von außen überführt, die eine ausreichende Geschwindigkeitskomponente senkrecht zur Zentralelektrode besitzen ⇒ **stabile Umlagerung** („Orbit“)(orbital trapping) (trapping in radialer Richtung)



**FIGURE 1.** Schematic showing a Kingdon trap coupled to a time-of-flight mass spectrometer. (Reproduced, with permission, from Sekioka, Terasawa, and Awaya (1991). Copyright © 1991 Gordon and Breach, S. A.)

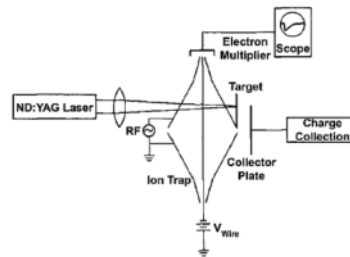
⇒ Endelektroden werden mit einem abstoßenden Potential belegt (repulsive potential) ⇒ **ion trapping auch in axialer Richtung**

⇒ stabile Ionenbewegung braucht folglich beides - Rotation um und axiale Bewegung entlang der Zentralelektrode

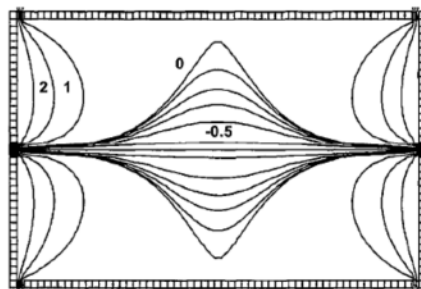
⇒ Nutzung der Kingdon-Trap zunächst um z.B. submillimeter Glas- und Kupferpartikel (50–60  $\mu\text{m}$  Durchmesser) zu trappen und Orbital-Mechanik zu studieren, mit möglichen Implikationen zum Verständnis der Dynamik von Asteroiden, Galaxien und planetarischen Ringen

⇒ später wurde die Form und das Potential der äusseren Elektrode variiert (Knight 1981) um eine harmonische Oszillation der Ionen in axialer Richtung zu erreichen („ideal Kingdon trap“)

⇒ Anlegen einer Wechselspannung zwischen der geteilten äusseren Elektrode erlaubte die Beobachtung von **Resonanz** – allerdings war die Resonanz schwächer, breiter und frequenzverschoben ⇒ Knight schlug vor, dass die Zentralelektrode das harmonische Wechselfeld deformiert

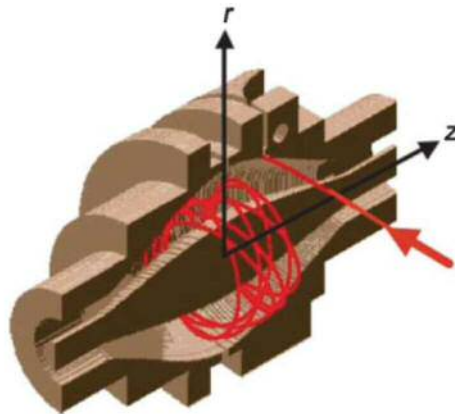


**FIGURE 2.** Schematic showing the Knight-style Kingdon trap (“ideal Kingdon trap”(Gillig, Bluhm, & Russell, 1996; Makarov, 2000)). The modified shape of the outer electrode produces a quadrupolar potential superimposed upon the logarithmic radial potential of a cylindrical capacitor. Ions are injected through the gap in the outer electrode (at  $z = 0$ ), application of RF to the outer electrode excites the ions to begin harmonic oscillations along  $z$ . No mass analysis was reported. Trapped



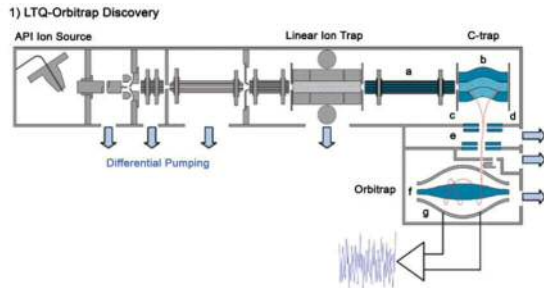
**FIGURE 3.** SIMION plot of the equipotential lines for ideal Kingdon trap parameters, end plates at 14 V and wire at -1 V. Potentials indicated

⇒ Berechnungen mit einem **Simulationsprogramm** (SIMION – Simulationsprogramm zur Berechnung von Trajektorien von Ionen in elektrischen/magnetischen Feldern) zeigten, dass die Zentralelektrode eine spindelförmige Geometrie besitzen sollte um ein rein harmonisches Potentialfeld entlang der z-Achse aufzubauen



**FIGURE 4.** Cutaway view of the orbitrap mass analyzer. Ions are injected into the orbitrap at a point (arrow) offset from its equator ( $z = 0$ ) and perpendicular to the  $z$ -axis, where they begin coherent axial oscillations without the need for any further excitation. (Adapted, with permission, from Hu et al. (2005). Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.) [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

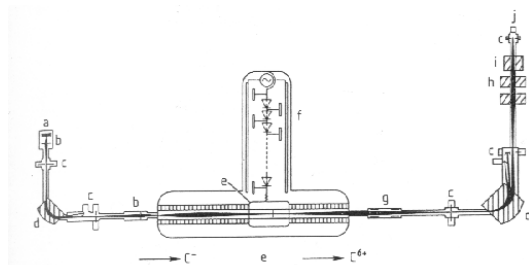
- ⇒ der **Orbitrap Massenanalysator** (praktisch eine modifizierte „Knight-style“ Kingdon trap) setzt sich zusammen aus einer **spindel-förmigen** Zentralelektrode und einer **fass-förmigen** Außenelektrode (Abb. oben)
- ⇒ die axiale Frequenz der Ionen wird benutzt um das  $m/z$ -Verhältnis zu messen, da diese **unabhängig von der anfänglichen Eigenschaften** (kinet. Energie) der Ionen ist ⇒ wie bei ICR hohe massenspektrometrische Auflösung
- ⇒ Messung des **Image Current** zur Detektion der Ionen



**FIGURE 18.** Schematics of the commercial LTQ-Orbitrap instruments. (1) Discovery model LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Makarov et al., 2006a): (a) transfer octopole; (b) curved RF-only quadrupole (C-trap); (c) gate electrode; (d) trap electrode; (e) ion optics; (f) inner orbitrap electrode (central electrode); (g) outer orbitrap electrode. (2) LTQ-Orbitrap XL model, with an additional octopole at the rear of the

## Beschleuniger-Massenspektrometrie, AMS (accelerator mass spectrometry)

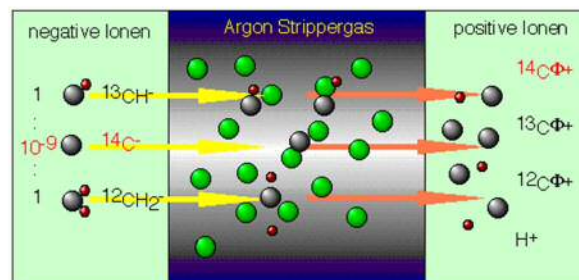
- ⇒ hauptsächlich zur Messung von  $^{14}\text{C}$  zur Altersbestimmung
- ⇒ Anforderung: Bestimmung sehr kleiner Mengen  $^{14}\text{C}$  ~ 4 Attomol ( $4 \times 10^{-18}$  mol) in großem Überschuss  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  oder insbesondere  $^{14}\text{N}$  (1:  $10^{12}$ )



**Figure 17.** Accelerator mass spectrometry  
a) Ion source; b) Lens; c) Slits; d) Beam bending magnet; e) Stripper foil charged to  $2.5 \times 10^6$  V; f) High voltage source; g) Electrostatic lens; h) Magnetic lens; i) Velocity filter; j) Ion detector  
(Reproduced with permission from [97])

### Funktionsprinzip des AMS

- ⇒ die Probe (einige mg) wird in Form von Graphit oder  $\text{CO}_2$  in die Quelle gebracht und durch Beschuß mit **Cs-Ionen ionisiert** und beschleunigt (25 keV)
- ⇒ es werden **negative Ionen** extrahiert um  $^{14}\text{C}$  von  $^{14}\text{N}$  zu trennen (letzteres bildet keine negativen Ionen)
- ⇒ der erste Magnet wird als gewöhnlicher **magnetischer Massenanalysator** genutzt und Masse 14 selektiert (neben  $^{14}\text{C}$ -Ionen werden hauptsächlich  $^{12}\text{CH}_2^-$ -Ionen und  $^{13}\text{CH}^-$ -Ionen darunter sein)
- ⇒ die Ionen treten in den eigentlichen Beschleuniger ein und werden durch ein Potentialgefälle im **Megavoltbereich** derart beschleunigt, das sie bei der Kollision mit Atomen im so genannten „Stripper Kanal“ (Strippergas (Ar) oder einer Stripper-Folie) nicht nur in Atome zerlegt werden, sondern auch mehrere Elektronen verlieren (hauptsächlich Bildung von  $\text{C}^{3+}$ -Ionen)





**Abb.** AMS Beschleuniger

- ⇒ die Beschleunigerstrecke ist von einem SF<sub>6</sub>-Tank (5 bar) umgeben
- ⇒ das Zentrum des Beschleunigers (**Terminal**) liegt auf Potentialen bis zu 14 Millionen Volt (positives Potential)
- ⇒ die negativen Ionen werden daher auf dieses Zentrum hin beschleunigt und nach Verlust der Elektronen als Kationen von diesem abgestoßen (**Tandem-Beschleuniger**)
- ⇒ die Geschwindigkeit der Ionen am Ende des Beschleunigungsvorgangs liegt bei einigen **Prozent der Lichtgeschwindigkeit** (ca. 80 Millionen km/h)
- ⇒ ein **zweiter Sektorfeld-Analysator** ermöglicht nun die Trennung der verschiedenen C-Isotope

### Probenvorbereitung für AMS

- ⇒ Probenvorbereitung sehr wichtig (z.B. Kontaminationen durch Bodenmaterial bei archäologischen Proben)
- ⇒ Entfernen der Oberflächenschichten
- ⇒ 30 µg – 3 mg Kohlenstoff werden benötigt

Chemische Vorbehandlung je nach Probe z.B. für Knochen:

- ⇒ Zerkleinern des Knochenmaterials (Bohrstaub)
- ⇒ Extraktion von Huminsäuren (Auslaugen)
- ⇒ Demineralisierung (Säurezugabe)
- ⇒ Extraktion des Collagens und Umwandlung in Gelatine
- ⇒ Ionenaustauscher (Entfernen anderer Verunreinigungen)
- ⇒ Gefriertrocknen
- ⇒ Verbrennen zu CO<sub>2</sub>

### „Kleine“ AMS-Systeme



Abb. „Small AMS“ an der ETH Zürich

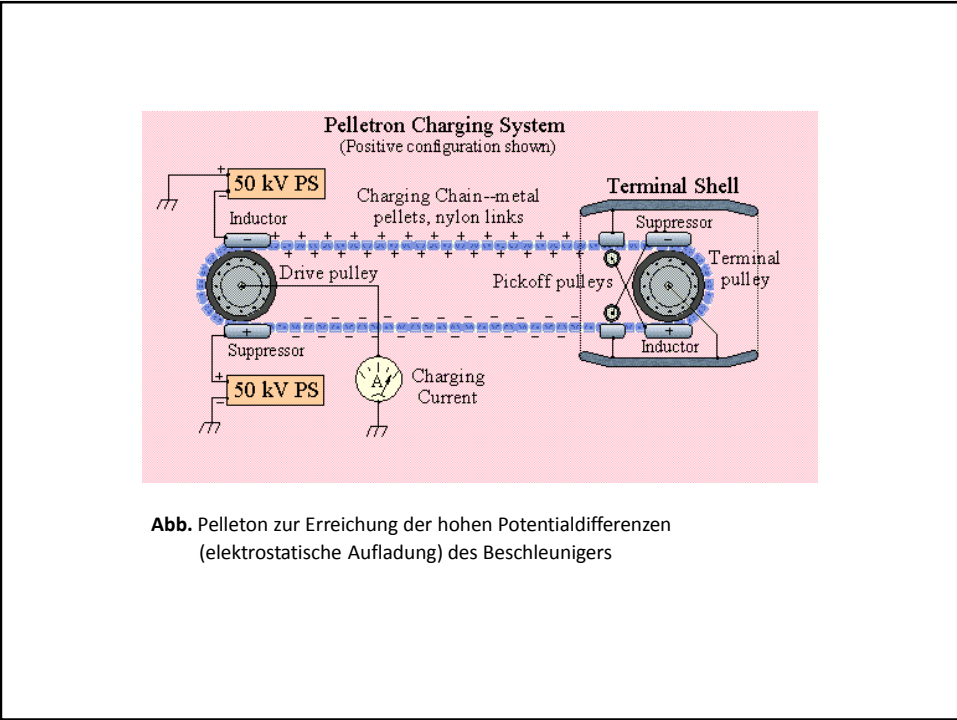
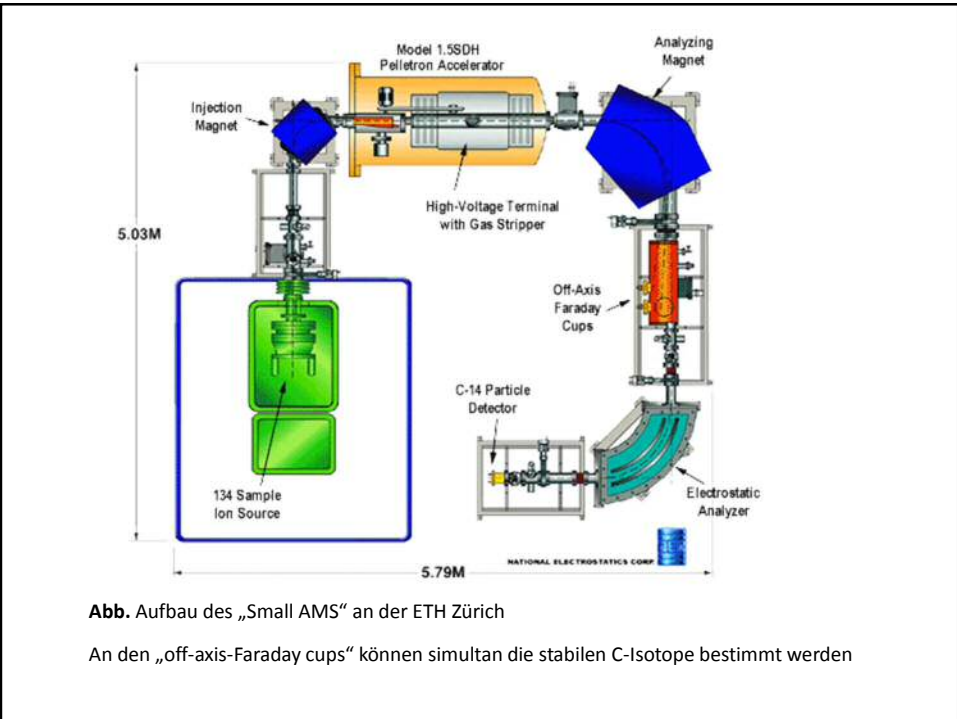






Abb. Der geöffnete Beschleuniger des AMS der ETH

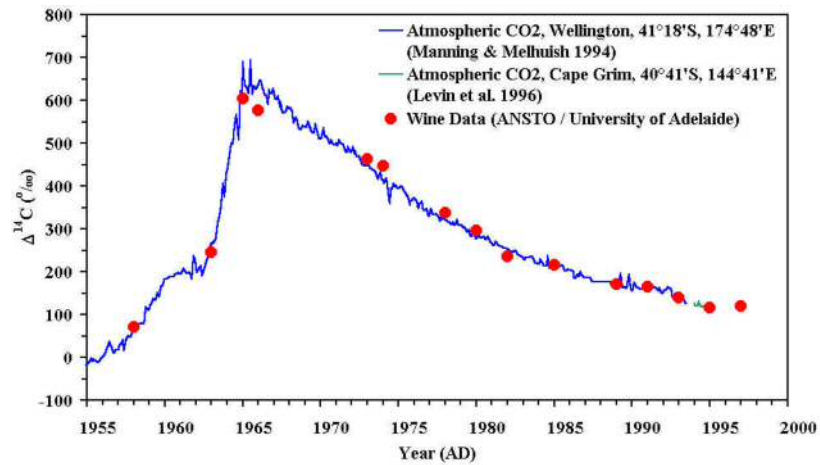
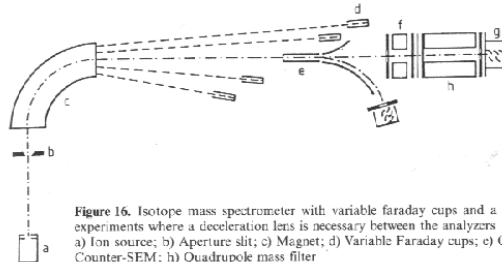


Abb. Altersbestimmung von Weinen durch den Vergleich des  $^{14}\text{C}$ -Gehaltes von atmosphärischem  $\text{CO}_2$  (Nuklearwaffentests in den 60iger Jahren) und dem von Weinen.

### Isotopen Massenspektrometrie

#### IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry)

⇒ zur Bestimmung der genauen relativen Verhältnisse stabiler Isotope, z.B.  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}/^2\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}/^{17}\text{O}/^{18}\text{O}$



- ⇒ oft in Verbindung mit einer GC-Trennung mit anschließender Verbrennung zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  und Elektronenstoßionisation der Produkte
- ⇒ genaue Massenbestimmung (genaues Verhältnis von  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) durch simultane Messung der Ionen