

Fachgruppentreffen FT-MS und Hochauflösende Massenspektrometrie

21. - 22. September 2011
Kiel

Programm



Institut für Physikalische Chemie
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Sponsoren



Liebe Teilnehmer,

ich möchte Sie zum diesjährigen Fachgruppentreffen in Kiel herzlich begrüßen und Ihnen und mir eine interessante und intensive Tagung wünschen.

Das diesjährige Treffen steht sicherlich für interessante Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der FT-MS. Die beiden Hauptvorträge sind dafür ein direkter Nachweis. Mit 40 angemeldeten Teilnehmern zeigt sich, dass die Fachgruppe Leben entwickelt.

Ich möchte Ihnen einige Hinweise für die diesjährige Tagung noch geben :

Falls Sie einen Internet-Zugang benötigen, haben wir im Hörsaal unser WLAN-Netz freigeschaltet. Bitte benutzen Sie die folgende SSID und das Passwort :

SSID : ftms
Password : kiel2011

Heute Mittag können Sie in der Mensa I (gegenüber) essen. Die heutigen Gerichte sind im Anhang angegeben. Bitte beachten Sie, dass es 4 Kassen gibt, von denen nur die beiden rechten Geld annehmen.

Unser Dinner heute abend findet im Restaurant Baltic Bay in Laboe statt. Dazu werden wir mit dem Bus um 17:45 zum Anleger am Bahnhof gebracht. (Bitte seien Sie pünktlich, das Schiff wartet nicht ! Abfahrt 18:10). Die Fahrt wird etwa eine Stunde dauern. Für Getränke auf dem Schiff wird gesorgt. Einen Hinweis auf die Speisen am Abend finden Sie auch im Anhang.

An dieser Stelle möchte ich auch nochmals den Sponsoren der Tagung danken. Ohne die großzügige Unterstützung von AB Sciex, Bruker Daltonik, Thermo und Waters wäre dieses Fachgruppentreffen nicht durchführbar.

J. Grotemeyer und das Team der CAU Kiel

Tagungsprogramm

- 8:45 Uhr Eröffnung: Begrüßung
- Chair: Jürgen Grotemeyer
- 9:00 Uhr “Neues und Grundlegendes über Ionen-Käfige mit Schwerpunkt ICR”
Karl Peter Wanczek
- Chair: Jürgen Gross
- 9:50 Uhr “Crude oil analysis: difficulties of analysing a real complex sample”
Wolfgang Schrader
- 10:10 Uhr “Einsatz der hochauflösenden FT-ICR MS zur Charakterisierung des Einflusses verschiedener Biosynthesewege auf die komplexen Strukturen bakterieller Lipopolysaccharide.”
Buko Lindner
- 10:30 Uhr Kaffeepause & Poster
- Chair: Michael O. Glocker
- 11:00 Uhr “The Role and Practical Aspects of High Resolution Mass Spectrometry in Industrial Analysis”
Rainer Wolf
- 11:30 Uhr “An Approach to Asphaltene characterization via reversed phase chromatography and FT-ICR mass spectrometry”
Sami Lababidi
- 11:50 Uhr “Unterscheidung Isomerer Oligosaccharide mittels Vis-PD”
Andrea Hahn
- 12:10 Uhr “Nutzung hochauflösender LCMS zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen und Pestiziden in komplexen Nahrungs- und Futtermittlextrakten”
Catharina Crone
- 12:30 Uhr Pause
- Chair: Karl Peter Wanczek
- 13:30 Uhr “Felddesorption an FT-ICR-Massenspektrometern: ein attraktiver Exot”
Jürgen Gross
- Chair: Wolfgang Schrader
- 14:20 Uhr “A New Ultra-High Resolution FTICR Cell with Dynamic Harmonization”
Matthias Witt
- 14:40 Uhr “Systematic studies on TiO₂-based phosphopeptide enrichment procedures upon in-solution and in-gel digestions of proteins.”
Michael O. Glocker
- 15:00 Uhr Pause & Poster

- Chair: Martin Beyer
- 15:20 Uhr “Fragmentierungsverhalten von Xanthen-Farbstoffen im FT-ICR-Massenspektrometer”
Jonathan Peters
- 15:40 Uhr “Qualitative und quantitative Analytik komplexer Gemische auf QqToF-Systemen – Gerätedesign, Leistungsparameter, Applikationen”
Christof Lenz
- 16:00 Uhr “High resolution mass spectrometry as an important tool for structural elucidation in mechanistic studies of different organocatalytical reactions”
Mhd Wasim Alachraf
- 16:20 Uhr “Untersuchungen zum massenspektrometrischen Fragmentierungsverhalten von Steroiden”
Christoph Freudenhammer
- 16:40 Uhr “SYNAPT G2 - The next step in the evolution of High Definition MS”
Gunnar Weibchen
- Chair: Wolfgang Schrader
- 17:10 Uhr FT-MS: Mitgliederversammlung
- 17:45 Uhr BT: Bus & Schiff Transfer
- 19:00 Uhr Dinner
- 23:00 Uhr Rückfahrt

Neues und Grundlegendes über Ionen-Käfige mit Schwerpunkt ICR

Karl Peter Wanczek

Universität Bremen, Germany

Es wird ein Überblick über neue instrumentelle Entwicklungen auf dem Gebiet der Penning- und der Kingdon-Käfige und ihrer Anwendungen in Physik und Chemie gegeben.

Die diesen Anwendungen zugrundeliegenden Einsichten werden beschrieben. Die unterschiedlichen Ausprägungen der Methoden in der Physik: Penning-Käfig einerseits und Kingdon-Käfig oder Orbitron andererseits und in der Chemie: Syrotron und Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-(FT ICR)-Massenspektrometrie, bzw. Orbitrap werden dargestellt.

Crude oil analysis: difficulties of analysing a real complex sample

Wolfgang Schrader, Andras Gaspar, Fabiane Nachtigall, Sami Lababidi

Max-Planck-Inst für Kohlenforschung, Germany

Our society depends strongly on affordable energy resources. In recent years the price for fossil fuels showed a high volatility and how far reaching the consequences can be if an adequate supply of energy is disturbed. Unfortunately, sufficient sustainable resources are not yet available, and therefore, at least in the next decades, we will continue to be dependant on fossil energy. Although the light and sweet crude oils that in the past dominated for upgrading to transportation fuels are diminishing, there are still enough resources available. These consist of heavier crudes and other unconventional resources which need a higher chemical input to be converted into a commercial resource. Here, analytical chemistry can play a major role.

Mass spectrometric measurements of complex crude oil samples were carried out using 7T FT-ICR (Bruker APEX III) and a 12T LTQ-FT mass spectrometer (Thermo LTQ-FT), which enable compositional analysis of all the samples. Additional steps of separation have been done by using the SARA fractionation scheme. Normal phase liquid chromatography and FT-ICR mass spectrometry were used in order to isolate and elucidate the complex structure of sulfur and nitrogen compounds present in crude oil samples. Here, a separation on a Pd(II) column was implemented for sulfur and a separation on a polar aminocyano column was done for nitrogen compounds.

We are studying crude oil to be able to gain analytical information about the unconventional and heavy components of crude oil samples, like asphaltenes and bitumen. Mass spectrometry has been demonstrated to be a very important tool for the analysis of crude oil components, especially when ultra-high resolution instruments like Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometers (FT-ICR MS) are used. We have compared different ionization methods and the results are strongly influenced not only by the MS technique itself but very much so by the ionization methods, as different ionization methods discriminate different compound classes. A comparison of five different ion sources shows that results from APPI and APLI seem to give the broadest information for asphaltene and asphaltene deposits.

Additionally, we are studying different sample preparation methods to determine the selectivity for the analysis of crude oil components. One important method is liquid chromatography where it is possible to separate sulfur compounds using a Pd(II) column and for other heteroelements different methods are needed to include selectivity into the analysis scheme. Some new methods are introduced that allow a better characterization of complex crude oil samples.

Ultra-high resolution mass spectrometry allows a thorough analysis of complex crude oil samples.

Einsatz der hochauflösenden FT-ICR MS zur Charakterisierung des Einflusses verschiedener Biosynthesewege auf die komplexen Strukturen bakterieller Lipopolysaccharide.

Buko Lindner

Forschungszentrum Borstel, Germany

Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxine) spielen eine wichtige Rolle für die Pathogenität Gram- negativer Bakterien. Umweltfaktoren wie Temperatur, Stressfaktoren, und Nährstoffangebot haben einen Einfluss auf die Biosynthese der Lipopolysaccharide und damit auf deren chemische Struktur. Diese wiederum beeinflussen wesentlich die Wirt-Pathogen Interaktion und die Wirksamkeit von körpereigenen antimikrobieller Peptide. Es wird aufgezeigt, wie mittels hochauflösender FT ICR-MS und IRMPD-MS/MS die komplexen Strukturen des heterogen LPS analysiert werden können.

Einzel- oder mehrfach- Deletionsmutanten wurden unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen kultiviert. LPS wurde mittels PCP- Extraktion isoliert und nach Aufreinigung in nativer Form mittels ESI FT ICR-MS (7 Tesla Apex Qe, Bruker Daltonik) im negativen Ionenmodus analysiert. Durch unspezifische Fragmentierung entweder in der Quelle oder in der externen Kollisionszelle kann der Lipidanker (Lipid A) des in der Regel sehr heterogenen LPS vom Kernoligosaccharid getrennt werden. Für MS/MS Analysen von LPS-Spezies wurde nach deren Isolation in der ICR-Zelle IRMPD (infrared multiphoton dissociation) angewendet.

Anhand von verschiedenen *Escherichia coli* [1] und *Yersinia pestis* [2] Mutanten wird die Aussagefähigkeit der angewandten MS-Methoden aufgezeigt:

Aufgrund der zahlreichen negative geladenen Substituenten (P, Carboxylgruppen) läßt sich LPS meist nur im negativen Ionenmodus analysieren, wobei bis zu vierfach negative geladene Ionen detektiert werden. Durch die hohe Auflösung und die erzielbare Massengenauigkeit lassen sich die sehr heterogene Mischung der intakten LPS-Spezies auch als vierfach geladene Ionen sauber voneinander trennen und bekannten Strukturen zuordnen.

Durch die schonende Trennung des Lipid A vom Kernoligosaccharid im MS können deren labile, nicht- stoichiometrische Substitutionen mit P, P-Etn, Ara4N,.. im Lipid A und im Kernoligosaccharide eindeutig bestimmt werden. Dadurch ist es nicht erforderlich LPS durch chemische Reaktionen, bei denen bereits labile Substituenten verloren gehen können, in Lipid A und Kernoligosaccharide zu spalten und dann getrennt zu analysieren.

IRMPD-MS/MS liefert diagnostisch bedeutsame Fragmentionen, die u.a. im negativen Ionenmodus Information über die Sequenz von Zuckern und deren Substitution und im

positiven Ionenmodus Informationen über die Verteilung der bis zu sieben Fettsäurereste im Lipid A enthalten.

Referenzen

[1] G. Klein et.al. E.coli K-12 Suppressor-free mutants lacking early glycosyltransferases and late acyltransferases; JBC: 284, 15369-15389, 2009

[2] [A.P. Anisimow et. al. Yersinia pestis Lipopolysaccharide in host-pathogen interaction; Chapter 8 in A. Schafferman et.al. (eds.): The challenge of highly pathogenic Microorganisms, Springer-Science+Business Media B.V., 2010

Die vorgestellte Methode erlaubt eine sensitive (Probenbedarf < 10 µg), schnelle und weitreichende Charakterisierung von heterogenen intakten LPS-Isolaten.

Kombinierte ESI/LIFDI-Ionenquelle

H. Bernhard Linden¹, Jürgen H. Gross²

¹Linden CMS GmbH, Germany; ²Organisch-Chemisches Institut der Universität, Im Neuenheimer Feld 270, 69120 Heidelberg

Bruker ApexQe FT-ICR-Massenspektrometer werden wahlweise mit einer ESI-Ionenquelle oder einer ESI-MALDI-Kombiquelle ausgeliefert. In beiden Fällen werden ESI-Ionen im Quellengehäuse orthogonal in einen Ionentrichter umgelenkt. Im Falle der ESI-MALDI-Kombiquelle trägt die Gehäuserückwand die MALDI-Probenbühne, von der MALDI-Ionen axial in den Ionentrichter gelangen. Bei der reinen ESI-Quelle bleibt die Rückwand ungenutzt.

Liquid Injection Field Desorption/Ionization (LIFDI) ist eine zu ESI komplementäre Ionisierungsmethode. Mit LIFDI können i) oxidations- oder feuchtigkeitsempfindliche Substanzen bequem unter inerten Bedingungen in die LIFDI Ionenquelle überführt und schonend ionisiert werden [1,2] und ii) ESI unzugängliche unpolare Analyte intakte Molekülionen liefern [3,4]. Wir beschreiben eine ESI/LIFDI-Kombiionenquelle, deren LIFDI-Einheit die werkseitige Rückwand ersetzt.

Der Flansch der LIFDI-Einheit trägt eine Hochvakuumdurchführung für die LIFDI-Schubstange samt Anschlüssen für Turbomolekularpumpe, Hochvakuummessröhre und Beobachtungsoptik. Im LIFDI-Betrieb wird die LIFDI-Schubstange bis zur dritten Elektrode des Ionentrichters eingeschoben, wobei die werkseitige ESI-Ablenkelektrode vorher entfernt wurde. Für den LIFDI-Betrieb evakuiert die Turbomolekularpumpe die Ionenquelle bei verschlossener ESI-Transferkapillare binnen 15 Minuten auf ca. $3\text{-}4 \cdot 10^{-5}$ mbar, sodass LIFDI-Spektren emissionsgeregelt bei ca. $4 \cdot 10^{-8}$ mA Totalionenstrom gemessen werden können. Für den ESI-Betrieb wird die Transferkapillare geöffnet, die Turbomolekularpumpe ausgeschaltet und die LIFDI-Schubstange um ca. 11 mm zurückgezogen. Die vorderste LIFDI-Elektrode übernimmt die Funktion der ESI-Ablenkelektrode. In der Regel werden Ionen für 1–3 s pro Transient akkumuliert und Breitbandspektren aus 32-64 Transienten mit 1 M Datenpunkten aufgenommen.

Zum Tuning der LIFDI-Einheit wurde das Kation-Signal, m/z 483,5 einer ionischen Flüssigkeit verwendet [5], anhand dessen auch der Ionentransfer durch das

Massenspektrometer optimiert wurde. Danach wurde eine externe Massenkali-
brierung mit Polyethylenglycol 600 im LIFDI-Modus vorgenommen, wodurch eine
Massengenauigkeit von 1 ppm für LIFDI erzielt wurde. Für ESI und LIFDI
wurden jeweils eigene Methodenfiles generiert.

Anfangs wurden nur closed-shell Ionen mit guter Intensität nachgewiesen,
während die für FI, FD und LIFDI typischen $M^{+\bullet}$ Ionen nur bei Analyt-
massen oberhalb 1000 u beobachtet wurden. Zudem zeigten diese Spektren
deutlich höhere Fragmentationsintensitäten als Vergleichsspektren am
magnetischen Sektorfeldgerät.

Diese erhöhte Fragmentierung führen wir auf die Eigenschaften der zu
durchlaufenden Ionenoptik des ApexQe-Massenspektrometers und seiner
spezifischen Druckverhältnisse zurück. Verbesserungen in diesem Punkt zu
erzielen, ist Gegenstand laufender Arbeiten.

Es zeichnet sich ab, dass insbesondere die Radiofrequenz-Hexapol-Ionen-
falle zur Ionenakkumulation und ggf. Stoßaktivierung eine Schlüsselrolle
einnimmt. Nach Anpassung von deren Betriebsbedingungen konnten
Molekülionen verschiedener Substanzen, u.a., Pentafluoridbenzol und
Polystyrol 1050, mit sehr guten Intensitäten gemessen werden.

Die rasche Umschaltung der ESI/LIFDI-Kombiquelle vom ESI-Betrieb in
den LIFDI-Betrieb oder zurück erfolgt durch Ein/Ausschalten der
Turbomolekularpumpe, Positionieren der LIFDI-Schubstange,
Schließen/Öffnen des Eingangs der ESI-Transferkapillare und Wahl
des jeweiligen Parametersatzes. ESI Spektren, die mit der werksseitigen
ESI Ionenquelle aufgenommen wurden, zeigen die gleichen Intensitäten
wie ESI Spektren, die mit der ESI/LIFDI Kombiquelle aufgenommen
wurden.

Referenzen

- [1] Linden, H.B. Liquid Injection Field Desorption Ionization: a New Tool for Soft Ionization of Samples Including Air-Sensitive Catalysts and Non-Polar Hydrocarbons. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2004, 10, 459-468.
- [2] Gross, J.H.; Nieth, N.; Linden, H.B.; Blumbach, U.; Richter, F.J.; Tauchert, M.E.; Tompers, R.; Hofmann, P. Liquid Injection Field Desorption/Ionization of Reactive Transition Metal Complexes. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 52-58.
- [3] Schaub, T.M.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G.; Qian, K.; Green, L.A.; Olmstead, W.N. Speciation of Aromatic Compounds in Petroleum Refinery Streams by Continuous Flow Field Desorption Ionization FT-ICR Mass Spectrometry. *Energy & Fuels* 2005, 19, 1566-1573.
- [4] Schaub, T.M.; Hendrickson, C.L.; Quinn, J.P.; Rodgers, R.P.; Marshall, A.G. Instrumentation and Method for Ultrahigh Resolution Field Desorption Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry of Nonpolar Species. *Anal. Chem.* 2005,
- [5] Linden, H.B., Gross, J.H. Liquid Injection Field Desorption/Ionization–Electrospray Ionization Combination Source for a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* Manuskript eingereicht.

Erste Kombiquelle für ESI und LIFDI für ein FT-ICR-Massenspektrometer mit Ionentrichter.

Proton transfer in reactions of hydrated transition metals in oxidation state (I) with NO and D2O in the gas phase

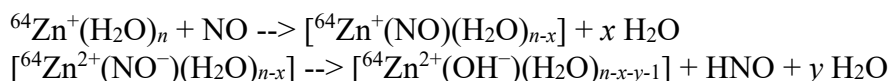
Christian van der Linde, Martin K. Beyer

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Germany

The reactivity of hydrated transition metals towards nitrous oxide was studied to get new insight into the redox-chemistry of hydrated transition metal species in oxidation state (I).

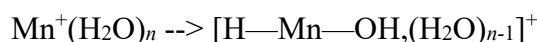
The experiments were performed on a modified Bruker Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometer. The clusters are produced in an external laser vaporization source, transferred by an electrostatic lens system, and stored in the ICR cell. The reactants are introduced at a constant pressure into the ultra high vacuum region of the FT-ICR by a needle valve. Spectra at different reaction delays were taken to monitor the reactions.

Hydrated monovalent iron and zinc show an interesting proton transfer reaction. In the first step nitric oxide is taken up by the cluster. Oxidation of Zn^+ through NO leads to Zn^{2+} and NO^- which is followed by a proton transfer to NO^- forming HNO. The overall reaction, formation of HNO from NO via oxidation of Zn^+ can be viewed as PCET. Mass spectrometry reveals the frozen intermediate $[Zn(NO)(H_2O)_n]^+$.



Another interesting proton transfer reaction in metal-water clusters is the formation of an inserted $[H-M-OH]^+$ structure. To form such an inserted structure a proton transfer through the water network and a two electron donation from the metal center are necessary. Scrambling experiments with D_2O are well suited to investigate this insertion reaction. Clusters with an inserted $[H-M-OH]^+$ structure show isotopic scrambling while clusters with intact water molecules $[M(H_2O)_n]^+$ do not.

From Vanadium it is known that hydroxide formation and H_2 elimination takes place. In the corresponding size region the scrambling was observed as expected. In the row chromium to zinc, only manganese undergoes the insertion reaction. Small manganese-water clusters show the insertion while big clusters do not.



Additionally aluminium and magnesium were investigated. From aluminium it is known that H_2 elimination takes place.^[1,2] Calculations found that the inserted structure $[H-Al-OH]^+$ is about 200 kJ/mol lower in energy as $Al^+(H_2O)$.^[3,4] For $[H-Al-OH]^+$ complete scrambling was expected, but the mass spectra show only scrambling for small clusters. We assign this behaviour to different structures of small and big clusters: $Al^+(H_2O)_n$ for big and $[H-Al-OH(H_2O)_n]^+$ for small.^[5]

[1] Beyer, M. K. et al., J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 7386-7389.

[2] Beyer, M. K. et al., J. Phys. Chem. A 1999, 103, 671-678.

[3] Reinhard, B. M. et al., J. Phys. Chem. A 2002, 106, 7988-7992.

[4] Siu, C.-K. et al., J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 10846-10860.

[5] van der Linde, C. et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 2011, 13, 6776-6778.

New reactions, new insights in redox-chemistry of hydrated M(I).

Sensitive Lipidanalytik von biologischen Proben durch Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit hochauflösender Massenspektrometrie

Nicole Zehethofer, Buko Lindner

Forschungszentrum Borstel, Germany

Lipide spielen eine wichtige Rolle bei Signalübertragung und bei Transportprozessen in biologischen Systemen. Um diese Prozesse zu verstehen ist eine umfassende Lipidanalytik der biologische Kompartimente (z. B. Phagosomen, Membrandomänen) essentiell. Die Lipidanalytik wird erschwert durch die Heterogenität der Lipide bezüglich Kopfgruppen, Fettsäurekettenlängen und Sättigungsgrad und durch die geringen Mengen, die aus den interessanten Kompartimenten isoliert werden können.

Da einige Lipide gleiche Elementarzusammensetzungen aufweisen und eine Unterscheidung über MS/MS schwierig ist (z.B. PC und PE) und andere Lipide nur einen geringen Massenunterschied aufweisen (z. B. unterscheiden sich Plasmalogene nur um m/z 0.0036 Da von den normalen Spezies) kombinieren wir hochauflösende Massenspektrometrie mit Flüssigkeitschromatografie um Lipide in biologischen Proben sensitiv zu identifizieren und zu quantifizieren.

Zur chromatographischen Auftrennung der Proben wurde Normalphasen-HPLC verwendet. Die nach Kopfgruppen separierten Lipide werden nach der Trennung online mittels ESI-MS analysiert. Entsprechend den R_f -Werten der Lipidgruppen werden die Massenspektren aufsummiert, prozessiert und dann mittels eines selbstentwickelten Programms (LipID[1]) ausgewertet, um die Kopfgruppen zu verifizieren und die Gesamtkettenlänge und den Sättigungsgrad der Fettsäuren zu bestimmen.

Bei Verwendung der μ HPLC-Methode (Flussrate 5 μ l/min, Injektionsvolumen 5 μ l) konnten für die gängigen Phospholipide (PC, PE, PS, PG, SM, Cer, PI, LPC, LPE, pPE und pPC) Nachweisgrenzen von unter 1 pmol auf der Säule und Standardabweichungen der Einzelmessungen unter 3% erzielt werden. Die Methode ist somit ausreichend um kleinste Unterschiede in der Lipidzusammensetzung biologischer Proben zu erfassen. An konkreten Beispielen wird gezeigt, dass die Methode in der Lage ist signifikante Unterschiede einiger Lipidspezies in biologisch relevanten Phänotypen aufzuzeigen.

[1] Hübner et al. J. Mass Spectrom. 2009, 44: 1676-1683

Bestimmung signifikanter Unterschiede einiger Lipidspezies in verschiedenen Phänotypen.

Extraction as a preliminary step to characterize heteroatomic compounds in crude oil by FT-ICR mass spectrometry

Sami Lababidi, Fabiane Nachtigall, Wolfgang Schrader

Max-Planck Institut fuer Kohlenforschung, Germany

Crude oil is a very complex mixture which represents a challenge for researchers to elucidate its structure. The presence of heteroatomic polycycles in crude oil causes a lot of technical problems. Therefore, a thorough knowledge of types and of polycyclic aromatic compounds in crude oils is essential for the optimization of refining processes and the speciation. High

resolution mass spectrometry is a very significant tool for the compositional determination of solid deposits in crude oils, Nevertheless, the use of complementary analytical approaches as a prior step to mass spectrometric measurements can elucidate the complexity of investigated samples and can cause selectivity as well as suppression of compounds.

Two distinctive extraction methodologies were applied on crude oil and on a solid deposit fraction. In regard to crude oil, two crude oils with different Nitrogen content and fouling properties were used in this study. Nitrogen compounds were extracted from the crude oils through the addition of pure ethanol solution and ethanol solution containing Al^{3+} , Fe^{3+} and H^+ ions. In a further step, the samples were derivatized using methyl iodide in the presence of silver tetrafluoroborate.

A solid deposit of a crude oil was dissolved in six organic solvents of different polarities. The isolated N-species were characterized using Fourier Transform Ion Cyclotron resonance Mass Spectrometry, the instrument used in this study was a 12T LTQ-FT-ICR MS (Thermo-Scientific, Bremen Germany).

The results indicate that the metal ion extraction exclusively extracts nitrogen species in the investigated crude oils. To confirm the selectivity of the extraction method applied, we methylated all the extracted samples obtained. Similar results were observed using pH 1. However, after extraction using both metal ions and acidic conditions, nitrogen compounds were found. For a better understanding the samples were derivatized to be able to study additional compounds that are not ionizable by ESI and again the extracted samples are showing the extracted nitrogen species. This shows that the ion extraction methods applied, employing both metal ions and acid pH, were indeed very selective for nitrogen species and show similar results.

Data analysis of the obtained mass spectra of the solvent extracted samples shows a variation to the used solvent. In positive mode measurements N_1 class was the dominating one for all the extraction procedures, which can be most likely pyridinic in nature. The presence of classes such as N_1O_1 , N_1S_1 , and O_1S_1 was also notable. On the other hand, classes such as O_1 and O_2S_1 could be detected in DMSO for instance, but not in toluene extraction. The ratios of classes to each other also differ between classes. For example, the N_2/N_1 ratio in dimethylsulfoxide is 0.44, whereas it is about 0.02 in dichloromethane extraction according to the number of isobaric masses.

Application of extraction methods for the mass spectrometric characterization of heteroatomic compounds in crude oil

A detailed mechanistic study of a new concept of a multicatalytical system using different types of mass spectrometric methods

Wasim Alachraf, Wolfgang Schrader

Max planck für Kohlenforschung, Germany

In the last few years, organocatalysis has emerged as a new approach utilizing purely organic molecules. In many cases, these small compounds give rise to extremely high enantioselectivities. Usually the reactions can be performed under an aerobic atmosphere with non-anhydrous solvents exemplifying the general stability of the catalysts. The catalysts can be easily synthesized in both enantiomerically pure forms and are often more stable than enzymes or other bioorganic catalysts. A new concept of multifunctional organocatalysts has

been introduced from the Schreiner group utilizing catalytic peptide moieties.^[1,2] a multi-reaction sequence ideally catalyzed by only one multifunctional catalyst in a one-pot sequence. Herein, we present a mechanistic study of such a one-pot cascade reaction with a multifunctional organocatalyst by employing ESI-MS, ESI-MS/MS, ESI-FT-MS, and ESI-FT-MSⁿ.

The mechanistic studies of the one-pot cascade desymmetrization / oxidation reaction of *meso*-1,2-alkane diols with a multicycatalyst was accomplished using a Thermo TSQ Quantum Ultra AM triple quadrupole. Additional measurements were completed using a 12 T LTQ-FT-ICR MS system (Thermo Fischer Scientific) to make accurate mass measurements for signal interpretation. Acylation of *meso*-1,2-cyclohexane diol was carried out with 7 eq acetic acid anhydride and the catalyst (5% mol) in dry toluene, followed with the oxidation step using *m*-CPBA as cooxidant. The reaction was performed at variable temperatures. Samples were taken after different time intervals for mass spectrometric study. The reaction was performed at different conditions utilizing a variety of techniques to study individually steps, intermediates, and side products.

The focus of this study was the detection of reaction intermediates and the investigation of the behavior of the different substrates and the catalyst in each reaction step, especially with such challenging oxidation conditions. One important point that needed to be investigated was the influence of the temperature on the reaction because, unexpectedly, the oxidation reaction was slower and gave a lower yield at room temperature comparing to 10 °C or even 0 °C, which showed the best results. The reaction was studied in detail, the important intermediates were detected and structurally confirmed by using MSⁿ experiments and especially the reason for the temperature effect was determined. All relevant data will be shown and a proposed mechanistic cycle will be reported.

Herein we presented an application of different types of MS methods in regard of mechanistic investigation of multifunctional organocatalytical reactions.

The Role and Practical Aspects of High Resolution Mass Spectrometry in Industrial Analysis

Rainer Wolf¹, Jan Willman²

¹Rainer Wolf, Competence Center Analytics, BASF SE, Ludwigshafen; ²Jan Willmann, Global Research Crop Protection, BASF SE, Limburgerhof

High resolution mass spectrometry (HMS) is a very powerful tool for LC/MS based structure elucidation. With the upcome of the first commercial TOF instruments more than 12-14 years ago the determination of accurate masses has been established and the calculation of elemental formulae based on accurate mass measurement became a ready to be used and important tool in structure elucidation. The real power of HMS came up with the development of routine FTMS (FT-ICR and Orbitrap based instruments). However, modern TOF mass spectrometers also play an important role, since resolution power as well as mass precision have dramatically increased within a small period of time

Most of these instruments are used for the determination of accurate masses and calculation of elemental composition from these data. Additional information is obtained by stable isotope ratios and the resolved fine structure of the isotopic pattern of the molecular ion peak. Typically the isotopic peaks (i.e. 13 and 14 carbon, 15 nitrogen, 18 oxygen, 29 and 30

silicium, 34 sulfur) can be separated into the isotopomers by the resolution of an FTMS instrument. Both features of FTMS, high mass precision and high resolution, inspire to think about new strategies in structure elucidation in addition to common ways of spectra analysis.

High resolution mass spectrometry is not only a superior tool in qualitative, but also in quantitative analysis. Modern high resolution instruments are extremely sensitive, full scan data can be obtained at a very low level of analyte concentrations and selectivity can be achieved by mass separation of isobars due to very small peak widths. This work around is extremely useful for screening methods and non target analysis. Especially complex mixtures can be quantified by this approach, e.g. in the context of ecotoxicological studies.

Another advantage of HMS in full scan mode is the fact, that in screening experiments the total information of all compounds in the sample is available. In contrast to SRM and MRM experiments obtained on a triple quadrupole instrument, (still unknown) analytes cannot be detected in the absence of references and screening for such analytes afterwards is almost impossible.

The lecture will demonstrate the benefit of HMS in the daily work of an industrial lab. The benefits and limitations of the two concepts of FTMS and TOF instruments will be discussed depending on the application they are used for.

HMS in quantitative Analysis, benefits of HMS in industrial analysis, concepts in structure elucidation

An Approach to Asphaltene characterization via reversed phase chromatography and FT-ICR mass spectrometry

Sami Lababidi, Wolfgang Schrader

Max-Planck Institut fuer Kohlenforschung, Germany

Asphaltenes are known to cause numerous challenges throughout all stages of the petroleum industry. They represent one of the fractions obtained when a crude oil is subjected to SARA fractionation, which categorize crude oil components according to their composition to saturate, aromatics, resins and asphaltenes. Asphaltene are defined as the fraction of a crude oil that precipitates when it is diluted in n-alkanes, and which is soluble in toluene. The complex structure of asphaltenes demanded various analytical approaches to be applied in order to investigate the chemical properties of asphaltenes. The characterization of asphaltenes is a very crucial step to conquer the technical difficulties accompanied with the presence of this fraction.

Liquid chromatography was one of the first analytical methods applied in crude oil industry, but its application on the asphaltene fraction was limited due to their complex structure. Size exclusion chromatography (SEC) has been extensively applied to achieve separation according to the molecular weight, but as a chemical interaction with the solid phase fewer experiments were performed in this regard. Since the asphaltene fraction was completely dissolved in THF, reversed phase HPLC was utilized to investigate asphaltene separation using different stationary phases (C18, phenyl, amino, and aminocyano). The chromatographic system was coupled to ultra high resolution mass spectrometer (12T LTQ FT-ICR, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), which enables the exact chemical composition of the examined fractions.

A Bitumen sample was fractionated in our research group according to SARA scheme, and the asphaltene fraction was isolated and washed with *n*-hexane for further investigations. Although the elemental analysis of the asphaltene sample indicates that nitrogen content is 1.2 % wt, which represents more than 50% of this heteroatom content in the bitumen, the complexity compounds present in the asphaltene fraction makes the access to compositional information about N-species not an easy task. The asphaltene sample was dissolved in tetrahydrofuran and introduced to reversed phase HPLC system provided with UV/Vis diode array detector. The mobile phase composition involved a gradient of acetonitrile and THF, and the flow rate was maintained at lower value (0.1 ml/min) to minimize aggregate formation. Many optimization experiments for baseline resolved peaks were performed using different stationary phases and eluent composition, but the resulting UV chromatogram reveals only one peak with two spikes eluted between 2.8 and 3.1 minutes of the retention time. For the characterization of the eluted asphaltene sample, the outlet of the column was coupled online to the mass spectrometer equipped with APCI as an ionization source. The ion chromatogram contains a broad peak which matches its counterpart in the UV chromatogram, and it comprises of O₂ class species at a high DBE, which could be aggregates of THF molecules with the polyaromatic core of the asphaltene structure. Previous measurements of the sample indicates the presence of N₁ class, but it was not detected in the coupling measurements, on the other hand small intensity peaks were observed in the ion chromatogram at earlier retention times, which their elemental composition indicates the presence of N₁O_x – species (x= 1 - 4), which can also involve the role of THF aggregation. Weak intensity signals of O₁S₁, S₁ and NOS classes were also observed in the mass spectrum.

Application of high resolution mass spectrometry coupled with reversed phase chromatography for the investigation of asphaltenes

Unterscheidung Isomerer Oligosaccharide mittels Vis-PD

Andrea Hahn, Jürgen Grotemeyer

CAU Kiel, Germany

Die Massenspektrometrie ist, aufgrund der häufig geringen Probenmengen, in der Kohlenhydratanalytik eine grundlegende Methode.

Durch ihre vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten ist die Identifizierung von komplexen Oligosacchariden aufwendig und erfordert eine Nachfragmentierung der Analyten. Dies gilt besonders, wenn es sich bei den Kohlendhydraten um isomere Strukturen handelt.

Verschiedene Fragmentierungsmethoden wurden entwickelt und verwendet, wobei besonders die Photodissoziationsmethoden (PD-Methoden), wie z.B. die Infrarot Multiphotonendissoziation (IRMPD), an Bedeutung gewonnen haben. Auch die Vakuum-Ultraviolett-PD (VUVPD)^[1] und Ultraviolett-PD (UVPD)^[2] wurde zur Fragmentierung von Oligosacchariden eingesetzt.

In unserer Arbeit zeigen wir, dass unter Verwendung von geeigneten chromophoren Gruppen, eine Fragmentierungen von Maltopentaose und der isomeren Oligosaccharide *lacto*-N-Fucopentaose I und II (LNFP I und LNFP II) mittels Vis-PD durchgeführt werden kann. Des Weiteren war eine Unterscheidung der Isomere möglich.

Die Experimente wurden mit einem APEX Qe FT-ICR-Massenspektrometer (Bruker Daltonics) mit einer Apollo II Combi Quelle, ESI / MALDI-Version durchgeführt. Die Fragmentierungen fand in einer ICR Infinity Cell statt. Für stoßinduzierte Fragmentierungen wurde Argon als Stoßgas verwendet, VIS-PD Experimente wurden mit einem Argon Ionen-Laser Innova 70c (Coherent) in Multi und Single-Line-Modus durchgeführt. Im Single-Line-Modus wurden, abhängig von dem verwendeten Label, die Wellenlängen 457 nm, 488 nm und 514 nm verwendet.

Maltopentaose wurde mit Rhodamine 110, Propidiumiodid, Proflavine, 2-Aminoazotoluol und 6-Aminoquinolin derivatisiert. Es wurden MS/MS Spektren der Derivate mittels CID und Vis-PD aufgenommen. Die Rhodamin 110- und 2-Aminoazotoluolderivate zeigten gute Fragmentierungseigenschaften.

Im positiven Ionenmodus wurden bei der Fragmentierung der protonierten Spezies fast ausschließlich Y-Typ Fragmente beobachtet. Im negativen Ionenmodus wurden B-, C-Typ Fragmente und Ringbruchfragmente beobachtet.

Die Rhodamin 110-Derivate der isomeren Oligosaccharide LNFP I und LNFP II wurden mittels CID und VIS-PD fragmentiert. Dabei wurden auch verschiedene Addukte als Ladungsträger verwendet.

Die protonierten Derivate der Isomere konnten mit den verwendeten Fragmentierungsmethoden im positiven nicht und im negativen Ionenmodus nur anhand weniger Fragmente unterschieden werden, wohingegen die Natrium-Adduktionen in den Spektren unterschiedliche Fragmente aufzeigten.

Die Fragmentspektren der Ionen des Typs $[M+H+Y]^{2+}$ und $[M+2Y]^{2+}$ ($Y = \text{Li, Na oder K}$) wiesen ebenfalls unterschiedliche Signale auf, wobei besonders Typ $[M+H+K]^{2+}$ eine gute Unterscheidbarkeit der Isomere bot.

[1] A. Devakumar, J.P. Reilly; Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007, 21, 1452-1460

[2] J.J. Wilson, Jennifer S. Brodbelt; Anal. Chem. 2008, 80, 5186-5196

Anwendung der Vis-PD zur Unterscheidung von isomeren Oligosacchariden.

Nutzung hochauflösender LCMS zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Mykotoxinen und Pestiziden in komplexen Nahrungs- und Futtermittlextrakten

Catharina Crone¹, Markus Kellmann¹, Frans Schoutsen²

¹Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany; ²Thermo Fisher Scientific, Breda, The Netherlands

Die moderne Erzeugung von landwirtschaftlichen Produkten geht mit einem teils immensen Einsatz von Pestiziden und Tierarzneistoffen einher. Darüber hinaus können durch Pilzbefall der Ausgangsstoffe als auch der Produkte die für Mensch und Tier stark gesundheitsgefährdenden Mykotoxine entstehen. Daher gelten strenge Richtlinien für die Grenzwerte dieser Stoffe in Nahrungs- und Futtermitteln.

Schnelle, empfindliche und hochselektive Methoden sind nötig, um die unterschiedlichen Substanzklassen zu screenen, ihre Präsenz sicher zu validieren und sie zu quantifizieren.

Hochauflösende Screeningmethoden werden seit einigen Jahren zunehmend auch in der Lebensmittelsicherheit eingesetzt. Sie bieten klare Vorteile gegenüber den klassisch angewandten Triple-Quadrupol Methoden. Gründe dafür sind das schnelle Aufsetzen von Methoden, die Möglichkeit, sehr viele und auch unbekannte Komponenten gleichzeitig zu analysieren sowie die retrospektive Datenauswertung. Voraussetzung ist allerdings, dass das Auflösungsvermögen des Gerätes ausreicht, um auch in komplexen Proben validierbare Ergebnisse zu erzielen und das Auftreten von falsch-negativen bzw. falsch-positiven Resultaten zu minimieren [1]. In den vorgestellten Experimenten wurden verschiedenen komplexe Nahrungs- und Futtermittelextrakte untersucht, die mit entsprechenden Mykotoxin- und Pestizidstandards in unterschiedlichen Konzentrationen gespickt wurden. Die Proben wurden mittels eines hochauflösenden Orbitrap Massenspektrometers analysiert, welches einen in die Ionenoptik integrierten Quadrupol als Massenfilter nutzt.

Durch die Kombination unterschiedlicher Scan Modi war es möglich, Full MS Experimente unter Nutzung verschieden breiter Isolationsfenster mit MS/MS Experimenten so zu kombinieren, dass a) Daten zur Quantifizierung sowie b) Fragmentspektren zur Bestätigung der gefundenen Komponenten in einem einzelnen LCMS Lauf erzeugt werden konnten. Der Betrieb des Systems mit verschiedenen Einstellungen der Massenauflösung (35,000; 70,000 und 140,000 FWHM bei m/z 200) zeigte deutlich die Notwendigkeit einer hinreichend hohen Auflösung für die Analyse komplexer Proben. Besonders bei einer geringen Konzentration der zugespikten Komponenten sind bei Auflösungen unter 70,000 FWHM Interferenzen mit Matrixpeaks zu beobachten, die eine Quantifizierung nicht erlauben oder gar zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Datenabhängige higher collision energy dissociation (HCD) - Spektren bei $R=17500$ FWHM konnten zur Bestätigung der jeweiligen Komponenten mittels Fragmenten akkurater Masse herangezogen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Erhöhung des dynamischen Bereiches durch das Eingrenzen des isolierten Massenbereiches im Quadrupol einen Gewinn an Empfindlichkeit erzielt werden konnte.

[1] M. Kellmann, H.Muenster, P.Zomer, H.Mol. Full Scan MS in Comprehensive Qualitative and Quantitative Residue Analysis in Food and Feed Matrices: How Much Resolving Power is Required? J Am Soc Mass Spectrom, 2009, 20, 1464–1476

Nutzung eines neuen, quadrupol-Orbitrap LCMS Instrumentes zur Quantifizierung und Bestätigung von Mykotoxinen und Pestiziden in komplexen Matrices

Felddesorption an FT-ICR-Massenspektrometern: ein attraktiver Exot

Jürgen Gross

Universität Heidelberg, Germany

Felddesorption (FD) ist eine zu ESI komplementäre Ionisierungsmethode, denn mit FD lassen sich gerade jene unpolaren Analyte untersuchen, die mit Elektrospray-Ionisation (ESI) keine Ionen liefern. Da die Moleküle durch Feldionisation meist in intakte Molekülionen überführt werden, kann man auch komplexe Gemische gut analysieren. Welche Leistung die Kombination einer Molekülionen-Spektrometrie in Kombination mit der hochauflösenden FT-ICR-MS erzielen kann, wurde insbesondere an Petroleumfraktionen eindrucksvoll gezeigt. Im Zusammenhang mit diesen Arbeiten wurde der Begriff „Petroleomics“ von der Gruppe von A.G. Marshall geprägt. Setzt man nun anstelle konventioneller FD die Variante Liquid Injection Field Desorption/Ionization (LIFDI) ein, so können auch oxidations- oder

feuchtigkeitsempfindliche Substanzen unter inerten Bedingungen in die Ionenquelle überführt und schonend ionisiert werden.

Dieser Beitrag stellt die FD-MS und LIFDI-MS in ihren Grundzügen vor und diskutiert die Besonderheiten bei deren Implementierung an FT-ICR-Massenspektrometern sowohl in instrumenteller Hinsicht als auch anhand analytischer Anwendungen. Darüberhinaus wird eine neuartige LIFDI-ESI-Kombinations-Ionenquelle vorgestellt, die für ein Bruker ApexQe FT-ICR-Massenspektrometer entwickelt wurde. Sie basiert auf einer für diese Geräte erhältlichen ESI-MALDI-Kombiquelle.

Erste Kombiquelle für ESI und LIFDI für ein FT-ICR-Massenspektrometer mit Ion Funnel

A New Ultra-High Resolution FTICR Cell with Dynamic Harmonization

Matthias Witt¹, Ingendoh Arnd¹, Roland Jertz¹, Gökhan Baykut¹, Boldin Ivan², Eugene Nikolaev²

¹Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany; ²Institute for Energy Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

FT-ICR mass spectrometry is the leading technique in mass resolving power and mass accuracy. Therefore, this technique is used in several applications like proteomics, top-down protein sequence analysis as well as analysis of complex mixtures like crude oil, bitumen and humic substances. Especially in complex mixture analysis further increase of resolving power is demanding. Higher mass resolving power can be achieved with higher magnetic field or principally new measurement methods. Recently, a new type of FT ICR measuring cell [1] based on Penning ion trap with shaped excitation and detection electrodes was introduced. This type of cell provides practically pressure limited resolution. This new ICR cell has been tested with a Bruker solarix 7T instrument [2].

A new type of FT-ICR cell with profiled excitation, detection and trapping electrodes for dynamic harmonization of the trapping field to remove the effect of ion cyclotron motion dephasing during signal detection has been experimentally characterized. Achievable mass resolving power and mass accuracy was measured for this cell and compared with Infinity cell. The maximum achievable cyclotron radius for this cell has been determined by measuring harmonics in the ICR signal. Tests have been performed with Bruker solarix 7T system equipped with a Dual source using electrospray and APPI ionization. Peptides, proteins and well as complex mixtures were used for the performance test.

Axial quadratic distribution of the electric potential of the new cell is achieved by shaping cell excitation and detection electrodes and applying trapping potentials to the electrodes, whose width is decreasing in direction toward the center of the cell and grounding others. In this configuration the averaged field distribution is hyperbolic in the whole volume. Very high resolving power of 22 000 000 was achieved for the alkaloid reserpine at m/z 609 [2]. The charge state 28⁺ of the 66 kDa protein BSA could be measured with isotopic resolution at m/z 1357 with a resolving power of 1 300 000. Even higher mass proteins like ADH tetramer (147 kDa) could be measured with isotopic resolution with a resolving power 500000. In all measurements the achieved resolving power was mainly pressure limited. Detailed investigations have shown that the cell permits to work with a cyclotron radius of up to 80% of the cell radius for mass detection. Experimental comparison of this cell with the Infinity cell [3] and other cell designs have shown advantage of the new cell concerning

resolving power and mass accuracy. Supercomputer modeling can explain the reason for the advantages of the new cell design [4]. The cell has also been tested with complex mixtures to see the limits concerning dynamic range and ion capacity. Very accurate masses have been observed for the fulvic acid standard SRFA with an RMS mass error below 100 ppb. High resolving power of 800 000 and a RMS mass error of only 130 ppb could be achieved in broad band mode for even more complex samples like bitumen without limiting the ion population in the ICR cell by quadrupole isolation.

[1] Boldin, I.A.; Nikolaev, E.N. FTICR cell with dynamic harmonization of the electric field in the whole volume by shaping of excitation and detection electrode assembly. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2011, 25, 122-126.

[2] Nikolaev, E.N.; Boldin, I. A.; Jertz, R.; Baykut, G. Initial Experimental Characterization of a New Ultra-High Resolution FTICR Cell with Dynamic Harmonization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011, 22, 1125-1133.

[3] Caravatti, P.; Allemann, M., The 'infinity cell': A new trapped-ion cell with radiofrequency covered trapping electrodes for fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Org. Mass Spectrom.* 1991, 26, 514-518.

[4] Nikolaev, E.N.; Heeren, R. M. A.; Popov, A. M.; Pozdnev, A. V., Chingin, K. S. Realistic modeling of ion cloud motion in a Fourier transform ion cyclotron resonance cell by use of a particle-in-cell-approach. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 3527-

Extremely high resolving power resolution was obtained for small masses as well as proteins using new type of FTICR cell.

Systematic studies on TiO₂-based phosphopeptide enrichment procedures upon in-solution and in-gel digestions of proteins.

Michael O. Glocker, Thomas Eickner

Proteom-Zentrum Rostock, Germany

There have been many successful efforts to enrich phosphopeptides in complex protein mixtures by the use of IMAC (immobilized metal affinity chromatography) and/or MOAC (metal oxide affinity chromatography) with which mass spectrometric analysis of phosphopeptides has become state-of-the-art in specialized laboratories, mostly applying nanoLC-ESI-MS-based investigations. However, widespread use of these powerful techniques is still not achieved. In this study we present a ready to use phosphopeptide enrichment procedure using commercially available TiO₂-loaded pipette tips in combination with MALDI MS analyses.

Using b-casein as a model protein and citric acid as additive during sample loading, a similar enrichment success can be achieved as compared to applying 2,5-dihydroxy benzoic acid (DHB) for this task. But the DHB-inherited drawbacks are eliminated. In addition, we show that combining DHB and 2,4,6-trihydroxy acetophenone (THAP) as matrix for MALDI-MS measurements retains the sensitivity of DHB for phosphopeptide analysis but adds homogenous crystallization properties of THAP, enabling preparation of evenly distributed matrix surfaces on MALDI-MS anchor targets, a prerequisite for automated MALDI-MS analyses.

TRIM28 and Stathmin are two examples for successful phosphopeptide enrichment of either SDS-PAGE or 2D gel electrophoresis-separated proteins. Finally, high resolution MALDI FT-ICR mass spectrometry after phosphopeptide enrichment suggests that chemical dephosphorylation may occur as a side reaction during basic elution of phosphopeptides bound to MOAC surfaces, suggesting that proteome-wide phosphopeptide analyses ought to be interpreted with caution. By contrast, in-depth analysis of phosphopeptide / non-phosphorylated peptide siblings may be used to estimate stability differences of phosphorylation sites in individual proteins, possibly adding valuable information on biological regulation processes.

[1] Eickner et al., Eur. J. Mass Spectrom. 2011; in press.

suitable protocol for MALDI-MS-based phosphopeptide stability estimations

Fragmentierungsverhalten von Xanthen-Farbstoffen im FT-ICR-Massenspektrometer

Jonathan Peters, Martin Clemen, Jürgen Grotemeyer

Universität Kiel, Germany

Der Farbstoff Rhodamin B zeigt bei Laser-Photodissoziation und SORI-CID im ICR eine zweifache Abspaltung von 44 Da. Diese wurde dem Verlust von zwei C_3H_8 -Spezies zugeordnet [1]. Ein solcher Verlust ist in der Literatur nicht bekannt, außerdem ist im Molekül keine C_3H_8 -Einheit vorgebildet. Die vorgestellte Arbeit hat den Zweck, den genauen Ort der Fragmentierung sowie deren Mechanismus näher zu untersuchen. Dazu wurden modifizierte Systeme des decarboxylierten Rhodamin B hergestellt. Zum einen verschiedene Deuterium-substituierte Verbindungen, zum anderen zwei Stufen eines Tetramethylrhodamin B. Komplettiert wurde das ganze durch die Synthese eines mit nur einer Ethylgruppe an jedem Stickstoff substituierten Moleküls.

Die Untersuchungen wurden an einem Apex-QE FT-ICR-Massenspektrometer (9,4 T) der Firma Bruker Daltonics durchgeführt. Die Ionisation erfolgte über eine Electrospray-Quelle. Fragmentation der Ionen wurde innerhalb der ICR-Zelle durch Laser-Aktivierung mittels eines Innova 70-Argon-Ionen-Lasers (Coherent, Inc.) bzw. Stoßaktivierung über SORI CID erreicht.

Die Synthese der Verbindungen wurde über Alkylierung von m-Aminophenol mit dem entsprechenden Alkyljodid und anschließender Kondensation mit Benzaldehyd durchgeführt.

Die Untersuchung von Tetra(ethyl- d_5)-Decarboxyrhodamin B zeigte zwei saubere Abspaltungen von 52 Da. Dies entspricht der Masse von C_3D_8 . Dadurch ist nachgewiesen, dass die Fragmentierung in den Substituenten der Stickstoffatome stattfindet.

Die Substanz, bei der ein Stickstoff zwei nicht-deuterierte und der andere zwei deuterierte Ethylgruppen trägt, verliert unter Anregung entweder ein 44 oder ein 52 Da –Fragment. Zusätzlich kann die jeweils andere Seite des Moleküls zu einem Gesamt-Verlust von 96 Da fragmentieren.

Anders verhält es sich bei der Spezies, die an jedem Stickstoff eine deuterierte und eine nicht-deuterierte Ethyl-Gruppe trägt. Hier wird zunächst 47 oder 49 Da abgespalten, was $C_3H_5D_3$ bzw. $C_3H_3D_5$ entspricht. Kombiniert man jede dieser Abspaltungen der einen mit der anderen Seite, erhält man einen Gesamt-Verlust von 94, 96 und 98 Da.

Die Tetramethyl-Variante ergibt zwei intensive Verluste von je 16 Da, was einer CH₄-Spezies entspricht. Zusätzlich tritt der Verlust eines Methyl-Radikals auf. Dieser Verlust ist auch in der Vorstufe dieses Tetramethyl-Decarboxyrhodamin Bs zu beobachten.

Schließlich wurde die jeweils einfach ethylierte Substanz untersucht. Sie zeigte u.a. intensive Verluste eines Methyl- und Ethyl-Radikals, sowie einer Kombination aus beiden Abspaltungen.

Als Erklärung für die Abspaltungen am Rhodamin B kann ein konzertierter Mechanismus dienen, bei dem eine Umlagerung stattfindet und so eine Propan-Einheit eliminiert wird. Alternativ kann es sich um einen konsekutiven Mechanismus mit zwei Radikalabspaltungen handeln. Beide Mechanismen werden diskutiert.

Erweitert wurden die experimentellen Ergebnisse mit einer DFT Rechnung zur Fragmentierung von Tetramethyl-Decarboxyrhodamin B. Hier wurde der energetische Verlauf für die genannten Reaktionswege bestimmt. Die Ergebnisse der Rechnungen werden im Hinblick auf die Spektren diskutiert.

[1] J. Peters und J. Grotemeyer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011, 25, 1169-1172

Untersuchung einer ungewöhnlichen Fragmentationsreaktion am chinoiden System der Xanthen-Farbstoffe durch Isotopensubstitution und Variation des Systems

Qualitative und quantitative Analytik komplexer Gemische auf QqToF-Systemen – Gerätedesign, Leistungsparameter, Applikationen

Christof Lenz

AB SCIEX, Germany

LC/MS/MS hat sich als Schlüsseltechnologie zur Identifizierung und Quantifizierung in komplexen Proben etabliert. Beide Analysenschritte erfordern höchste Acquisitions geschwindigkeit bei gleichzeitiger Wahrung der Empfindlichkeit und Datenqualität, werden aber gemeinhin auf verschiedenen Massenanalysatoren durchgeführt wie z.B. LIT-Orbitrap für die Identifizierung und Triple Quadrupol für die Quantifizierung.

Das AB SCIEX TripleTOF™ 5600 System ist ein QqToF-Massenspektrometer, das gezielt im Hinblick auf die Kombination qualitativer und quantitativer Analyse in integrierten Experimenten entworfen wurde. In diesem Vortrag werden die Überlegungen zum Design des Systems und die apparative Implementierung diskutiert sowie an Beispielen aus z.B. der Rückstandsanalytik illustriert.

Komplexe Gemische aus verschiedenen Applikationsgebieten wurden mit analytischer Chromatographie aufgetrennt (typischerweise Agilent 1200 Series HPLC, 2.1 mm Säulendurchmesser, Flussraten 300-700 µl/min).

Der Eluent wurde auf einem TripleTOF™ 5600 System mit DuoSpray™ Quelle unter Analyst® TF 1.5.1 Software analysiert. ToF Übersichtsscans wurden verwendet, um datenabhängig 5-50 MS/MS Scans pro Zyklus zu erzeugen. Die qualitative und quantitative Auswertung der Experimente erfolgte mit dezidierten Softwarepaketen (XIC Manager, MultiQuant™ 2.1 Software, MarkerView™ 2.0.1 Software).

Zum Design des TripleTOF™ 5600 Systems wurden zunächst die Designparameter festgelegt, die für die Durchführung integrierter qualitativer/quantitativer Analysen kritisch sind:

Empfindlichkeit, linearer dynamischer Bereich, Massenauflösung, Massengenauigkeit, Massenstabilität und Acquisitionsfrequenz.

Aus diesen Parametern wurden die technischen Merkmale des Systems abgeleitet, die hier diskutiert werden. Zielsetzung war, ein Massenspektrometer zu entwickeln, das eine möglichst gleichzeitige Verwendung der Designparameter ermöglicht.

Anhand von Beispielen z.B. aus der Rückstandsanalytik wird illustriert, dass mit dem System Screeningexperimente durchgeführt werden können, die beispielsweise die gleichzeitige Identifizierung und semiquantitative Bestimmung kompletter Pestizid-Panels im ppb-Bereich ermöglichen. In Verbindung mit quantifizierten Standardsubstanzen ist darüber hinaus eine quantitative Bestimmung im Leistungsbereich aktueller Triple Quadrupol-Systeme möglich.

QqToF-Massenspektrometer für integrierte qualitative/quantitative Analysen

High resolution mass spectrometry as an important tool for structural elucidation in mechanistic studies of different organocatalytical reactions

Mhd Wasim Alachraf, Wolfgang Schrader

Max planck für Kohlenforschung, Germany

In the last few years, organocatalysis has emerged as a new catalytic methods based on metal-free organic molecules. In many cases, these small compounds give rise to extremely high enantioselectivities. Usually the reactions can be performed under an aerobic atmosphere with wet solvents. The catalysts can be easily synthesized in both enantiomerically pure forms and they are often more stable than enzymes or other bioorganic catalysts. Also, these small organic molecules can be anchored to a solid support and reused more conveniently than organometallic or bioorganic analogues. Herein we present the successful application of mass spectrometry for a mechanistic study of some organocatalytic reactions. This investigation shows the advantages of using high resolution mass spectrometric methods for structure elucidation of unknown intermediates.

The mechanism of the organocatalytic reactions were studied by different types of mass spectrometric methods using a Thermo TSQ Quantum Ultra triple quadrupole and LTQ-FT mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific) equipped with a 12 T super-conducting magnet.

The investigated reaction is taken place in a micro flask; reaction samples are taken, diluted with the suitable solvent and measured with mass spectrometry in different times to detect changes in the reaction progress of all components. Different reactions were investigated through the determination of intermediates, products and side products to understand the reaction mechanisms and to optimize reaction conditions for a higher yield of desired products. Structural information was obtained by using ESI- MS and ESI- MSⁿ Studies to characterize the different intermediates.

In performance of MS for mechanistically reactions investigation:

The ability to determine short lived and low concentrated intermediates - which is not possible to measure with other methods like NMR or IR - is crucial for mechanistic studies. The ability to make structural elucidation of these short lived and low concentrated intermediates can be done by using MS/MS experiments, but structural information with high impact can be gained by doing accurate MS/MS studies. Here we present data that show how high resolution mass spectrometry can help in determining the mechanism of such complex catalytic reactions like cascade reactions where up to five different reactions are running in parallel in a one-pot synthesis with all substrate and reactants present from the beginning. Other analytical methods are having problems characterizing reaction components in such an experimental set-up.

Mass spectrometry allows the flexibility to modify the measurement procedure and to use different techniques i.e. kinetic measurement, the direct coupling of a micro reactor for online monitoring.

Isotope labelled solvent or reactants are also used in some reactions to follow converted compounds, monitor the intermediates activity or monitor the reaction rate for deeply understanding of the studied reaction.

Herein we presented high resolution mass spectrometry as a successful toll in regard of mechanistic investigation of organocatalytical reactions.

Untersuchungen zum massenspektrometrischen Fragmentierungsverhalten von Steroiden

Christoph Freudenhammer

CAU Kiel, Germany

Da die Elektrospray-Ionisation (ESI) zu einer potenten Technik in der Massenspektrometrie zur Untersuchung verschiedener Biomoleküle und Metabolite geworden ist, sollten die ihr zugrunde liegenden Reaktionen genauer untersucht werden, um deren Massenspektren und ihren Nutzen der für die Identifikation von komplexen Mischungen besser zu verstehen.

In diesem Beitrag berichten wir über einige Ergebnisse der Untersuchung von verschiedenen Steroidethern und Benzyloxyindolen in einem ICR-MS, ausgehend von der Tatsache, dass die Ether einen überraschenden Wasserverlust aus der Ether- und den freien Hydroxylgruppen aufweisen.

Die Experimente wurden mit einem APEX Qe FT-ICR Massenspektrometer von Bruker Daltonics, Bremen, ausgeführt, bestehend aus zwei Hauptkomponenten, einem supraleitenden Kryomagneten. (9.4 T / 11 cm bore) und dem Vakuumcart, in dem sich die Ionenquelle, eine Apollo II Dual ESI/MALDI Version, ein Quadrupolfilter zur Ionenisolierung mit Stoßzelle, die Ionentransferoptik und als Detektor eine ICR Infinity Cell befinden.

120 µl/h der ESI-Probe wurden mittels einer Spritzenpumpe in das System injiziert und die gebildeten Ionen in der Zelle durch On-resonance CID (meist bei Energien von 0.8% und Pulsdauern von 400 µs) bzw. IRMPD (häufig 30% Laserleistung und Pulsen von 150 ms) fragmentiert.

Die bereits diskutierte [3.3]-sigmatropen Umlagerung in Steroidbenzyl- bzw. allylethern wurde weiter untersucht. Neben der Verifizierung der mittels On-resonance-CID-Spektren erhaltenen Erkenntnisse über die Estr(ad)iolbenzyl-, -phenetyl-, -propenyl-, -propyl-, -ethyl- und -methylether durch Deuterierung der freien Hydroxylgruppen der Benzylether und IRMPD-Untersuchungen - die Estradiolbenzyletherspektren u. a. zeigen ausgehend vom MH^+ -Signal bei m/z 363.231 *zwei* Wasserabspaltungen bei 345.220 [$MH^+-(H_2O)$] und 327.209 [$MH^+-(H_2O)_2$] sowie weitere Signale im niedrigeren Massenbereich, wie denn Abspaltungen von C_6H_6 [285.184 Da] bzw. C_7H_8 [271.168 Da] – und dem Vergleich mit Spektren verschiedener Pregnanderivate [Pregnenolon, Hydroxy-Pregnenolon, Corticosteron] und der Estrogenvorstufe Dehydroepiandrosteron, sowie verschiedener Benzyloxy-Indole [5-Benzyloxy-indol, 5-Benzyloxyindol-3-essigsäure, 5-Benzyloxy-6-methoxy-indol, 6-Benzyloxy-5-methoxy-2-carboxyindole] wurde versucht, die entsprechenden Protonenaffinitäten der Ether mit Hilfe von Cooks' kinetischer Methode durch Dimerisierung mit unterschiedlichen Aminoquinolinen einzugrenzen.

Die Pregnane weisen dabei keine unerwarteten Wassereliminierungen aus nicharomatischen Hydroxylgruppen auf, während bei den beiden letztgenannten Indolen die sigmatrope Umlagerung [3,4] des benzyllischen Restes durch die Sperrung jeweils *einer* Nachbarposition am aromatischen Ring unterbleibt.

[1] P. Longevialle, R. Botter, *Org. Mass Spectrom.* 1983, 18 (1), 1.

[2] L. Claisen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1912, 45, 3157.

[3] P. Traldi et al., *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 1562.

[4] S. McLuckey, D. Cameron, R. G. Cooks, *J. Am. Soc. Chem.* 1981, 103 (6), 1313.

Fragmentierungspfade, ICR, Steroide, unerwartete Umlagerungen

SYNAPT G2 - The next step in the evolution of High Definition MS

Gunnar Weibchen

Waters GmbH, Germany

The drive towards improving the performance of mass spectrometry systems is relentless - to enable analysis of smaller quantities of sample, improve limits of detection, increase detection and identification rates and improving the confidence in results. Here we describe the key innovations within a new Quadrupole, ion mobility time-of-flight MS system and how their integration provide significantly improved sensitivity and selectivity for the most challenging analytical samples.

Sensitivity - for systems operating with atmospheric pressure ionisation sources, the sampling and transport of ions to lower pressure stages of the mass spectrometer and relatively inefficient, and improvements here can lead to large gains in sensitivity. Here, the implementation of a novel high-pressure source ion guide is described which increases the transport efficiency of ions from source to analyzer. The new ion guide consists of two conjoined stacked ring electrode arrangements. The ion optical axes of the two guides are parallel but radially offset by about 10 mm.

The off-axis design of the conjoined ion guide system both enables efficient ion confinement and focussing as well as increased robustness in that gas and other entrained neutrals streaming in from the source are essentially prevented from entering, and contaminating, subsequent stages of the mass spectrometer. The conjoined ion guide system was found to

have a transmission increase of up to 25x that of the single ion guide system for a variety of different analyte classes and exhibits a broad m/z transmission window for fixed operating parameters.

Selectivity - Interest in ion mobility coupled with mass spectrometry has grown over the last decade largely due to its use in investigation of structures of a variety of bio-molecules, but there is significant evidence demonstrating the potential uses of ion mobility in analyzing a diverse array molecular species ranging in mass from tens of Daltons to mega-Daltons. This is largely due to the orthogonality between IMS and MS separations. Its hyphenation with tandem mass spectrometry is capable of providing very rapid and sensitive analysis with higher selectivity than is afforded by high mass resolution alone. Key aspects of the SYNAPT G2-S instrument will be described which enable high resolution ion mobility resolving power to be employed within routine LC-MS or GC-MS workflows without detriment to duty cycle or speed of analysis. A variety of software tools and workflows have also been designed for the multidimensional data generated to enable a) routine increases in component identification rate and confidence of assignment, and b) a facile, unique route to enhanced investigation of compound structure via collision cross section (shape) determination, and in-depth (MS/MS/MS) fragmentation analysis.

Mensa-Essen Donnerstag mittag

Curryhuhn im Reisrand 3,30 €

Gyrossuppe mit Putenfleisch 2,50 €

Kasselerbraten mit Rotweinsöße 2,90 €

Paprika-Champignonpfanne mit Quarkdip 3,20 €

Blockhouse Rib Eye Steak, Champignons, Kartoffelgratin, Salat 6,50 €
zusätzlich

Kartoffeln, Bayrisch Kraut, Bio Erbsen, Salatab 0,55 €

Konferenz-Dinner
Restaurant BalticBay, Laboe

Suppe
Suppe nach Wunsch -serviert-

Kalt
Roastbeef mit Remoulade
Holsteiner Sauerfleisch mit roten Zwiebeln
Hähnchenkeule
Geräucherte Putenbrust mit Ananas
Thüringer Zwiebelmett
Kasseler auf Farmersalat
Entenkeulen in "sauer"

Fisch
Geräuchertes Fischsortiment
Forelle, Makrele, Lachs, Matjesfilets mit Hausfrauensauce

Warm
Kleine Frikadellen
Nürnberger Rostbratwürstchen
Hähnchenbrustfilet in Pilzrahm
Bratkartoffeln und frisches Marktgemüse
Dorschfilet in der Eihülle gebraten auf Spinat mit Gemüsereis

Salat
Bunte Blattsalate mit hausgemachtem Dressing
Marinierte Tomaten
Karotten- und Gurkensalat

Käse
Brie-Torte mit Trauben
Käseigel

Brot
Frische Brötchen
Schwarzbrot
Baguette und Butter

Dessert
Holsteiner Rote Grütze mit Vanillesoße
Überraschungsdessert