

ANGEWANDTE CHEMIE

87. Jahrgang 1975

Heft 12

Seite 425–460

Felddesorptions-Massenspektrometrie

Von H. D. Beckey und H.-R. Schulten^[*]

Neue analytische
Methoden (2)

Die Felddesorption (FD) ermöglicht die massenspektrometrische Untersuchung großer organischer Moleküle ohne deren Verdampfung. Der gegenwärtige Stand des theoretischen Verständnisses der Ionisierung dieser Moleküle im adsorbierten Zustand an organischen Emittlern wird beschrieben. Die speziellen Probleme der Technik sowie aussichtsreiche apparative Entwicklungen für künftige analytische Aufgaben werden umrissen. Im Mittelpunkt des Fortschrittsberichtes stehen analytische Untersuchungen von biochemischen Modellverbindungen sowie Abbauprodukten von Umweltchemikalien und Arzneimitteln. Die Methode eignet sich besonders für den Nachweis und die Identifizierung von Submikrogramm-Mengen polarer, underivatisierter Substanzen in komplizierten Gemischen oder vorgereinigten Extrakten aus biologischem Material.

1. Einleitung

Mitte 1969 war in dieser Zeitschrift ein Fortschrittsbericht über qualitative und quantitative Analysen mit dem Feldionisations-Massenspektrometer (FI-MS) erschienen^[1]. In diesem Beitrag wurde bereits die damals gerade in die Massenspektrometrie eingeführte Felddesorptions(FD)-Technik organischer Moleküle^[2] erwähnt. Inzwischen hat sich die FD-Technik rasch entwickelt; dieser neue Zweig der Massenspektroskopie wird vor allem zur Analyse thermisch empfindlicher und biologisch wichtiger Substanzen herangezogen. Das physikalisch-chemische Prinzip, die analytischen Möglichkeiten, aber auch die Probleme der FD-Methode sollen im folgenden in einer ersten Zusammenfassung dargestellt werden.

2. Prinzip der FD-Massenspektrometrie

Der Begriff „Felddesorption“ ist schon lange bekannt, insbesondere durch die grundlegenden Arbeiten von Müller^[3] und Gomer^[4]. In diesen Arbeiten wurden Atome oder kleine Mole-

küle wie H₂, O₂ oder N₂ durch hohe elektrische Felder von der Größenordnung 1×10^8 bis 5×10^8 V/cm von Metallspitzen im Feldionenmikroskop desorbiert.

Unter Felddesorptions-Massenspektrometrie versteht der Massenspektroskopiker heute eine spezielle Technik der Auftragung fester organischer Verbindungen auf eine „aktivierte“ Feldanode (Emitter), die anschließende Felddesorption der Verbindungen im ionisierten Zustand und die massenspektrometrische Analyse dieser Ionen. Eine Feldanode wird als „aktiviert“ bezeichnet, wenn sie mit einer sehr großen Zahl organischer Mikronadeln bedeckt ist.

Die festen organischen Proben werden bei dieser Technik nicht verdampft^[5], sondern zunächst (meistens bei Raumtemperatur) gelöst oder suspendiert^[2,1]. Dann wird eine aktivierte Feldanode (vorzugsweise ein 10- μ m-Wolframdraht mit dichter Mikronadel-Bedeckung) in die möglichst konzentrierte Lösung eingetaucht („emitter dipping technique“). Nach dem Herausnehmen der Feldanode bleibt ein Teil der Lösung in den Zwischenräumen der Mikronadeln oder an diesen haften. Bei einer mittleren Nadellänge von 30 μ m sind dies etwa 10^{-2} μ l.

Bei einer anderen Methode („syringe technique“)^[6] wird ein kleiner Tropfen der Lösung aus einer Mikroliterspritze mit einem Mikromanipulator auf die Feldanode aufgebracht. Der

[*] Prof. Dr. H. D. Beckey und Dr. H.-R. Schulten
Institut für Physikalische Chemie der Universität
53 Bonn, Wegelerstraße 12

Vorteil dieser Methode besteht darin, daß definierte Volumina der Lösung *quantitativ* aufgetragen werden können (was z.B. einen Empfindlichkeitstest ermöglicht), daß man mit kleineren Mengen der Lösung auskommt und daß diese genau in die Mitte der Feldanode aufgetragen werden kann.

Nach dem Auftragen der Lösung wird die auf das Ende einer Schubstange gesteckte Feldanode durch eine Vakuumschleuse in die Ionenquelle eines Massenspektrometers eingeführt. Das Lösungsmittel verdampft, und die zu untersuchende Substanz scheidet sich als fester Belag auf und/oder zwischen den Mikronadeln ab.

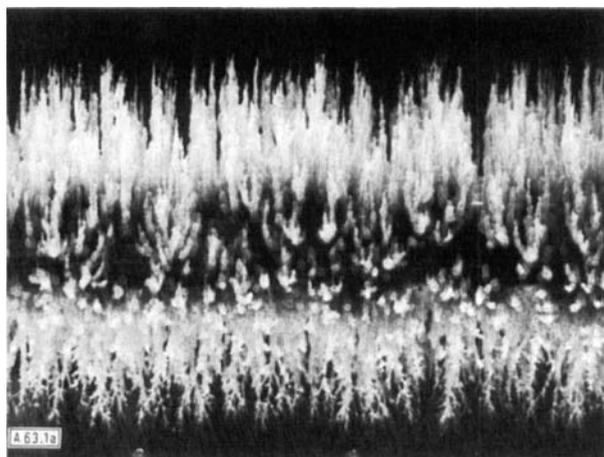


Abb. 1. a) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines aktivierten Wolframdrahtes von 10 µm Durchmesser, der mit Benzonitrildampf bei 1200 °C aktiviert wurde. Die Mikronadeln sind etwa 20 µm lang; b) Aufnahme von Mikronadeln mit einem Transmissionselektronenmikroskop. Auf und zwischen den Mikronadeln befindet sich ein dünner Niederschlag (geringere Schwärzung) von D-Glucose, die aus 0,01 M wässriger Lösung abgeschieden wurde. Durch einige Glucosefäden (nach Verdunstung des Wassers entstanden) werden die Enden der feinen Nadeln einander genähert und dabei etwas durchgebogen.

Abb. 1a zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines aktivierten Wolframdrahtes ohne Probensubstanz. Abb. 1b gibt eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Mikronadeln wieder, auf und/oder zwischen denen D-Glucose aus 0,01 M Lösung niedergeschlagen wurde. Obwohl nur etwa 10^{-8} g D-Glucose abgeschieden wurden,

konnte ein gut auswertbares FD-Massenspektrum aufgenommen werden. Bei etwa 10^{-5} M Adenosinlösung ist die untere Grenze der Nachweisempfindlichkeit für die „emitter dipping technique“ erreicht; das heißt, daß etwa 10^{-11} g die minimale Menge einer organischen Substanz ist, die im FD-MS bei Benutzung eines modifizierten Varian-MAT-CH₄-Massenspektrometers nachweisbar ist. Diese Grenze ist einerseits von der Substanzart, dem Lösungsmittel, dessen pH-Wert und der morphologischen Struktur der Mikronadeln, andererseits von der Transmission des Massenspektrometers (siehe Abschnitt 8.1) sowie der Empfindlichkeit des Ionennachweissystems abhängig. Sollen Substanzen nachgewiesen werden, die in kleineren Konzentrationen als 10^{-5} mol/l vorliegen, dann müssen größere Volumina der Lösung auf die Feldanode gebracht werden. Man kann z.B. die Feldanode leicht heizen, damit das Lösungsmittel schneller verdampft. Wenn die Stromheizung nur die Verdunstungskälte des Lösungsmittels kompensiert, unterbleibt eine thermische Zersetzung der Probe^[7]. Da sich auf diese Weise 10^3 -mal größere Volumina als bei der „dipping technique“ auftragen lassen, können noch etwa 10^{-8} M Lösungen untersucht werden.

Die Empfindlichkeit der FD-Methode (ausgedrückt in Coulomb Kollektorstrom pro µg verdampfter Substanz) ist nur unwesentlich geringer als bei der Elektronenstoß-Ionisierung (EI-Methode) in Verbindung mit dem System zur Direktverdampfung von festen organischen Substanzen. Die relativ große Empfindlichkeit der FD-Methode beruht auf den ökonomischen Prozessen der Ionisierung und Substanznachlieferung. Offensichtlich wird ein hoher Anteil aller auf dem Emitter adsorbierten Moleküle als Ionen desorbiert, und man darf erwarten, daß ein hoher Anteil dieser Ionen in Richtung der Gegenelektrode emittiert wird (infolge der Feldverteilung vor den Mikronadeln). Messungen zur Winkelverteilung von feld-desorbierten Ionen an aktivierten Emittoren liegen noch nicht vor. Bisher wurde nur die Winkelverteilung des Feldionenstromes an einzelnen Metallspitzen gemessen^[8, 9].

Zur Aufnahme eines FD-Massenspektrums wird die Feldanode zunächst mit einem Mikromanipulator mechanisch justiert (von den Autoren modifizierte Massenspektrometer des Typs Varian MAT CH₄/CH₅, AEI MS9 und CEC21 – 110B) oder durch ein Schleusensystem an eine fest vorgegebene Position in der Ionenquelle gebracht (Massenspektrometer des Typs Varian MAT CH₅, 711, 731). Danach wird der Ionenstrahl elektrisch fokussiert, indem man die Feldanode auf Raumtemperatur beläßt (so daß keine feste Substanz feld-desorbiert) und Aceton in die Ionenquelle einläßt. Nach der Optimierung des Feldionenstromes wird die Acetonzufuhr unterbrochen. Die Feldanode wird auf ein positives Potential von normalerweise 3–10 kV gegen Erde und die wenige mm entfernte Gegenelektrode auf ein negatives Potential von einigen kV gebracht, so daß die Gesamtspannung zwischen Feldanode und Gegenelektrode größenordnungsgemäß 10–12 kV beträgt. Der Ionenstrom für die Molekülionen des Lösungsmittels (z.B. Aceton, Äther, Benzol, Wasser) am MS-Detektor klingt bei schwacher Aufheizung der Feldanode rasch ab. Ein Restionenstrom des Lösungsmittels stört die folgenden Messungen nicht. Relativ leicht flüchtige organische Feststoffe weisen im FD-Massenspektrum bereits bei Raumtemperatur oder bei leicht erhöhter Temperatur der Feldanode eine für die Probe charakteristische Verteilung der Massenlinien auf. Bei den meisten polaren organischen Feststoffen ist jedoch zur Erzeugung eines hinreichend intensiven FD-Massenspektrums

eine stärkere Aufheizung der Feldanode notwendig (größenordnungsmäßig 10–40 mA Heizstrom bei aktivierten 10- μ m-Wolframdrähten).

Es soll nunmehr qualitativ erläutert werden, warum die organischen Proben durch die FD-Technik thermisch weniger belastet werden als durch Feldionisierung (FI), Elektronenstoß-Ionisierung (EI) oder Chemische Ionisierung (CI). Bei den drei zuletzt genannten Techniken müssen feste Proben verdampft werden. Hierzu muß die volle Sublimationsenergie der Proben aufgebracht werden. Bei der FD-Technik wird zur Überführung der adsorbierten Moleküle in Ionen und zur Desorption dieser Ionen von der Feldanode nur die bei hinreichend hohen Feldern geringe Felddesorptionsenergie Q_{des} benötigt. Dies sei anhand von Abb. 2 für ein adsorbiertes Atom gezeigt (für adsorbierte Moleküle sind die Verhältnisse wesentlich komplizierter). Abb. 2a zeigt die Potentialkurven für die Wechselwirkung eines adsorbierten Atoms oder Atomions mit einer reinen Metalloberfläche $M^{[4]}$. Dabei werde angenommen, daß die Ionisierungsenergie I des Atoms A wesentlich größer als die Austrittsarbeit des Metalls ist. Zur Überführung des adsorbierten Atoms in das Ion A^+ muß die Energie $E_{des} = Q_{des} + I - \Phi$ aufgebracht werden (einige eV). Bei Überlagerung eines hohen elektrischen Feldes ($\approx 1 \text{ V}/\text{Å}$) ergeben sich die in Abb. 2b dargestellten Potentialkurven.

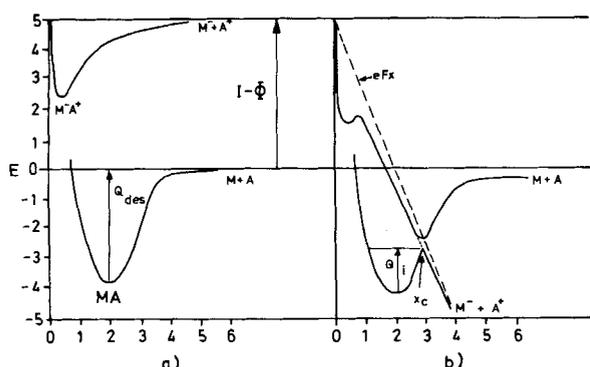


Abb. 2. a) Potentialkurven für die Wechselwirkung eines Atoms (A) oder Atomions (A^+) mit einer festen Metalloberfläche (M), ohne äußeres elektrisches Feld (Φ = Austrittsarbeit des metallischen Emitters); b) Potentialkurven unter der Einwirkung eines hohen elektrischen Feldes. Kleinere Polarisierungsterme wurden vernachlässigt. eFx = Potential des äußeren Feldes, F . Abszisse: x = Abstand des Atoms von der Metalloberfläche in Å . Weitere Bezeichnungen siehe Text.

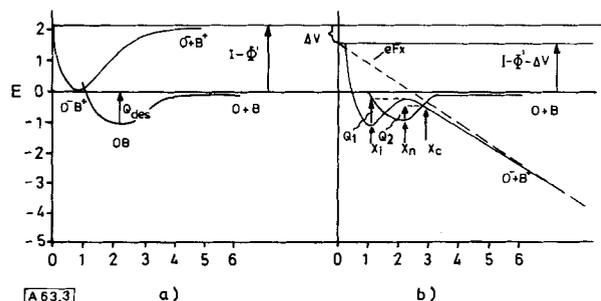


Abb. 3. a) Potentialkurven für die Wechselwirkung eines Moleküls (B) oder eines Molekülions (B^+) mit einer Oberfläche (O) aus festem organischem Material, ohne äußeres elektrisches Feld (Φ = Austrittsarbeit des organischen Emitters); b) Potentialkurven unter der Einwirkung eines hohen elektrischen Feldes. Für die Desorption eines bei x_1 adsorbierten Ions muß die Felddesorptionsenergie Q_1 , für die Desorption eines bei x_n adsorbierten neutralen Moleküls die Energie Q_2 aufgebracht werden (x_c = Schnittpunkt der Potentialkurven für den neutralen und ionischen Zustand des Moleküls). Eine Abstoßung der Potentialkurven aufgrund der „noncrossing rule“ wurde in Abb. 3b im Gegensatz zu Abb. 2b nicht berücksichtigt.

Zur Bildung des Ions A^+ wird nur die wesentlich geringere Energie Q_{des} benötigt. Bei extrem hohen Feldstärken kann das Atom sogar ohne Zufuhr thermischer Energie im ionisierten Zustand desorbiert werden. Die Theorie der Felddesorption von Atomen an reinen Metalloberflächen wird u.a. von Müller und Tsong^[10] behandelt.

Eine quantitative Theorie der Felddesorption großer organischer Moleküle an Mikronadeln aus organischen Polymeren mit geordneten, graphitisierten Bereichen^[11] existiert bisher noch nicht. Die beobachteten komplizierten Phänomene sollen anhand von Abb. 3a und 3b nur qualitativ begründet werden. Es sind u.a. folgende Effekte zu berücksichtigen:

1. Nur ein Teil der organischen Moleküle ist an der Oberfläche der Feldanode chemisorbiert. Die leicht felddesorbierenden Moleküle sind durch van-der-Waals- und Dipol-Kräfte an die Oberfläche gebunden. Die Potentialmulde für neutrale Moleküle (Abb. 3a) ist daher wesentlich flacher als diejenige in Abb. 2a.

2. Die Potentialkurve für den ionischen Adsorptionszustand im hohen elektrischen Feld wird um einen Betrag ΔV zu tieferen Potentialen verschoben. Der größte Teil von ΔV dürfte auf den Potentialabfall in den Mikronadeln zurückzuführen sein; ein weiterer Teil rührt vom Eindringen des elektrischen Feldes in die Mikronadeln her.

3. Die Elektronenaustrittsarbeit kann bei organischen Emittlern infolge tiefliegender, lokalisierter Energieniveaus um einige eV größer als bei metallischen Emittlern sein^[12].

Durch diese drei Effekte können sich die Potentialkurven für den neutralen und den ionisierten Zustand des Moleküls einmal oder mehrmals überschneiden (Abb. 3b).

3. Feldanoden für die FD-Massenspektrometrie

Die besten Ergebnisse bei der FD-Massenspektrometrie wurden mit Mikronadeln von 20–40 μm Länge erzielt (vgl. ^[13]). Einerseits sind möglichst lange Mikronadeln für die Aufnahme der Analysensubstanz günstig, da eine große Oberfläche für die Adsorption zur Verfügung steht; andererseits nimmt mit zunehmender Nadellänge die Feldstärke in den Emissionszentren und damit die Intensität der produzierten Ionenströme ab. Die oben angegebene Nadellänge ist der günstigste Kompromiß.

Von der Bonner Arbeitsgruppe wurden mehrere Aktivierungsmethoden zur Herstellung von Mikronadeln entwickelt^[14].

Bei Raumtemperatur mit Benzotrinitril erzeugte Nadeln werden häufig durch chemisch aggressive Substanzen, insbesondere bei hoher Temperatur, zerstört^[15]. Chemisch beständiger waren die bei hoher Temperatur aktivierten Feldanoden^[16]. Schulten et al. entwickelten eine Hochtemperatur (HT)-Aktivierungstechnik, die zu chemisch und thermisch äußerst resistenten Mikronadeln führt^[15,17] [*]. Derartige Mikronadeln ermöglichen u.a. die Eichung der Massenskala mit perhalogenierten Verbindungen wie Perfluorkerosin oder Perfluortributylamin, welche die bei Raumtemperatur erzeugten Nadeln zerstören.

Es muß betont werden, daß die FD-Massenspektrometrie organischer Substanzen mit der Qualität der Ionenemitter steht oder fällt.

[*] In [17] wird eine reproduzierbare HT-Aktivierung von Feldanodendrähten beschrieben. Bei sorgfältiger Beachtung aller angegebenen Parameter ist vor der Aktivierung keine Oxidations-Reduktions-Prozedur [18] am Wolframdraht erforderlich.

4. Optimale Feldanodentemperatur für die Felddesorption

Sehr wichtig bei der FD-Massenspektrometrie ist das Auffinden der optimalen Feldanodentemperatur T^* (in der Literatur auch manchmal als „best anode temperature“ (BAT) bezeichnet). Diese stimmt wegen des Temperaturgradienten zwischen Anodendraht und Nadelspitzen nicht mit der Temperatur des Trägerdrahtes überein. T^* wird bei elektrischer Aufheizung der Anode meist durch Angabe des Heizstromes charakterisiert.

Durch Aufheizen der Mikronadeln mit Wärmestrahlung können bei bestimmten Substanzen größere absolute und relative Moleküllionenströme erreicht werden^[19]. Diese indirekte Heizung der Feldanode hat außerdem den Vorzug, daß die mittlere Temperatur an der Oberfläche des Emitters nach der Eichung mit NTC-Widerständen bis auf etwa $\pm 2^\circ\text{C}$ bestimmt werden kann^[20]. Bei der optimalen Temperatur T^* der Feldanode ist die Intensität der Moleküllionen maximal, die der Fragmentionen minimal. Wenn eine thermisch-/feldinduzierte Fragmentierung durchgeführt werden soll, arbeitet man oberhalb von T^* ^[23].

Die Ermittlung von T^* soll zunächst für den Fall diskutiert werden, daß das FD-Spektrum mit elektrischer Registrierung, ohne Anwendung der „Multi-Scaling“-Technik (siehe Abschnitt 5) mit einem langsamen Massenscan aufgenommen wird. Bei der Bestimmung des Molekulargewichtes einer Probe ist die optimale Anodentemperatur das Ergebnis eines Kompromisses: Heizt man die Feldanode zu stark, so verdampft die Probe zu rasch für die Aufnahme eines vollständigen Massenspektrums. Heizt man dagegen zu schwach, so ist die Felddesorption der Probe zu gering zur Erzeugung eines Ionenstromes, der sich hinreichend stark aus dem Untergrundrauschen des Ionendetektors heraushebt.

T^* (ausgedrückt in mA Heizstrom) ist abhängig vom Drahtdurchmesser, der effektiven Feldstärke, der Substanzart, dem Lösungsmittel, dessen pH-Wert, der Dicke der Substanzschicht auf der Feldanode, besonders der Länge und Struktur der Mikronadeln. Falls die Substanz unlöslich ist, kann man sie in einem leicht verdampfenden Lösungsmittel suspendiert auf den Emitter auftragen^[21].

Man ermittelt T^* , indem man zunächst den Massenbereich der bei der Felddesorption fast immer dominierenden Moleküllionenengruppe am Massenspektrometer einstellt, diesen Bereich mehrfach durchfährt und dabei die Temperatur der Feldanode langsam erhöht. Häufig erhält man nur in einem engen Temperaturintervall ein intensives und relativ gut reproduzierbares FD-Massenspektrum. T^* liegt bei manchen Substanzen bei Raumtemperatur (z. B. Naphthalin, Phenanthren und Endrin, also Substanzen mit relativ hohem Dampfdruck), bei anderen bei mehreren 100°C , d. h. man muß dann die Feldanode mit Strömen von 10–40 mA aufheizen.

5. Ionennachweis durch Photoplatten oder schnelle elektrische Registrierung

Die Nachteile der FD-Technik (kleine absolute Ionenstromintensitäten, unbekannte Optimaltemperatur T^* bei Proben unbekannter Zusammensetzung; siehe auch Abschnitt 7) können durch integrierenden Ionennachweis mit Photoplatten oder durch schnelle elektrische Registrierung unter Anwendung der „Multi-Scaling“-Technik überwunden werden.

Bei Verwendung von Photoplatten in einem doppelfokussierenden Massenspektrometer kann man die optimale Emittertemperatur in der Weise ermitteln, daß man die Feldanode soweit erhitzt, bis der Ionenstrom an der Gegenelektrode etwa $5 \times 10^{-8}\text{ A}$ beträgt (8 kV Beschleunigungsspannung, $d = 2\text{ mm}$)^[22]. Die Schwankungen und die generelle Abnahme des Ionenstromes infolge des Substanzverbrauches sind wegen der gleichzeitigen Registrierung aller Ionenarten auf der Photoplatte ohne Bedeutung. Dies ist für die FD-Technik noch wichtiger als für die Elektronenstoßmethode. Außerdem kann man mit der Photoplatte ein FD-Massenspektrum weit oberhalb T^* aufnehmen; außer der Moleküllionenengruppe weist es dann zahlreiche Fragmentionen auf^[23] und gestattet Schlüsse auf funktionelle Gruppen oder Verzweigungsstellen eines unbekanntes organischen Moleküls. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist die Pyrolyse von Polymeren (s. Abschnitt 8.2).

Anstelle des Nachweises mit Photoplatten kann eine schnelle elektrische Registrierung der Ionen vorgenommen werden. Bei der „Multi-Scaling“-Technik wird das Massenspektrum so schnell durchgefahren, daß sich die Intensitäten der Ionenarten während einer Scanperiode nicht merklich ändern. Da nur wenige Ionen/s auf dem Ionendetektor auftreffen, muß man Zähltechniken anwenden und kann z. B. einen Vielkanalanalysator benutzen. Zweckmäßigerweise arbeitet man mit einem Prozeßrechner, der den Massenscan durch das Magnetfeld steuert, die Ionenarten speichert und die Temperatur der Feldanode programmiert. Wir verwenden einen Prozeßrechner, Typ PDP 8/E der Firma Digital Equipment[*].

6. Anwendung der Felddesorptions-Massenspektrometrie

Die Anwendung der Massenspektrometrie im biochemischen Bereich hat sich in den letzten vier Jahren außerordentlich rasch verbreitet. Schwerpunkte sind die analytischen Informationen neuer Techniken und Methoden in Umweltforschung und Medizin. An die massenspektrometrischen Analysenmethoden werden besondere Anforderungen gestellt.

1. Die Nachweisempfindlichkeit der Messungen sollte mindestens im Nanogrammbereich liegen.

2. Die Selektivität der Methode sollte es gestatten, Substanzen auch in nur vorgereinigten Rohextrakten aus biologischem Material eindeutig neben den unvermeidbaren Beimengungen nachzuweisen.

3. Die Massenspektren sollten außer charakteristischen Fragmentionen möglichst hohe Intensitäten der Moleküllionen aufweisen, da in vielen Fällen die Feststellung des Molekulargewichtes und der Bruttoformel das Hauptziel der Untersuchung ist.

4. Die Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse müssen zuverlässig sein, auch wenn die Proben thermisch nicht stabil sind.

6.1. Analyse von Pestiziden

Das Massenspektrometer hat sich beim qualitativen und quantitativen Nachweis toxischer Substanzen in der Umwelt bewährt. Besonders vorteilhaft war die Kopplung an den Gaschromatographen sowie die schnelle, elektronische Da-

[*] Die Programme für die Ausführung dieser Operationen wurden von H. U. Winkler, Bonn, ausgearbeitet.

tenregistrierung und -verarbeitung (Spekrenbibliothek, Lernmaschinen).

6.1.1. Chlorierte polycyclische Kohlenwasserstoffe

Abb. 4a zeigt das Elektronenstoßionisierungs(EI)-Massenspektrum des Insektizids, Akarizids und Rodentizids Endrin^[25]. Das Molekülion bei $m/e=378$ wird mit etwa 1% relativer Intensität registriert. Bei den von Damico et al.^[24] aufgenommenen FI-Massenspektren einer Reihe chlorierter polycyclischer Kohlenwasserstoffe machten die Molekülionen dieser Verbindungen den überwiegenden Anteil der produzierten Ionenströme aus. Die Flüchtigkeit des Endrin reicht aus, um bei 20°C ein Feldionisations-Massenspektrum aufzunehmen. Außer der intensiven Molekülionengruppe (Basis) wird mit etwa 10% relativer Intensität das Signal bei $m/e=342$ beobachtet. Aus den entsprechenden Massenspektren für die metastabilen Ionen erhält man den Hinweis für die HCl-Abspaltung aus dem Molekül. In Abb. 4b ist das bei Raumtemperatur, elektrischem Nachweis und niedriger Auflösung (modifiziertes Varian-MAT-CH4-Massenspektrometer) registrierte Felddesorptions-Massenspektrum dargestellt^[26]. Es besteht ausschließlich aus der Molekülionengruppe, Fragmente sind nicht nachweisbar. Unter den angegebenen Bedingungen erhält man auch für andere Pestizide des Dimethanonaphthalin-Typs wie Dieldrin, Aldrin und Isodrin FD-Spektren, in denen nur die Molekülionen erscheinen^[27].

Von den Insektiziden des Dimethanoindol-Typs sind bisher die FD-Massenspektren von Chlorden, Heptachlor, Endosulfan, Kelevan und Kepone publiziert worden^[27, 39]. Bei der Gegenüberstellung der EI- und FD-Spektren des Chlordens ergibt sich unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie bei Abb. 4a und 4b ebenfalls das typische Bild des fragmentlosen Spektrums bei FD und der intensiven Fragmentierung bei EI. Allerdings desorbiert Chlorden nicht mehr optimal bei Raumtemperatur wie Endrin, sondern bei leicht erhöhter Emittertemperatur (8 mA Emittter-Heizstrom $\approx 50^\circ\text{C}$). Auch im EI-Spektrum des Chlordens zeigt sich die geringere Flüchtigkeit, denn oberhalb von $m/e=66$ treten nur noch zwei Signale ($m/e=101$ und $m/e=237$) mit mehr als 3% relativer Intensität auf^[25].

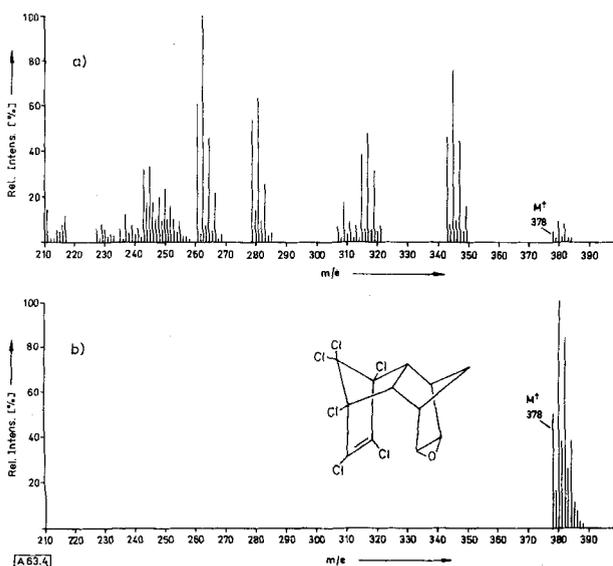


Abb. 4. a) EI-Massenspektrum von Endrin. Probentemperatur 55°C [25]; b) FD-Massenspektrum von Endrin. 0 mA Emittter-Heizstrom $\approx 30^\circ\text{C}$. Beide Spektren wurden elektrisch registriert.

6.1.2. Chlorierte Diphenylmethane

Als Beispiel für das Verhalten von Pestizid-Stammsubstanzen unter den Bedingungen der Felddesorption seien die weitverbreiteten, extensiv angewendeten Insektizide des Chlordiphenylmethan-Typs erwähnt. Die Stammsubstanz *p,p'*-DDT ergibt bei photographischem Nachweis und einem Auflösungsvermögen von ca. 15000 (10% Taldefinition) das in Abb. 5 dargestellte FD-Spektrum^[28]. In der Absicht, thermisch-/feldinduzierte Fragmentierung zu erzeugen, wurde dieses FD-Spektrum bei erhöhter Emittertemperatur aufgenommen (5 mA Emittter-Heizstrom). Nimmt man das FD-Massenspektrum von *p,p'*-DDT bei Raumtemperatur auf, so wird sowohl bei elektrischem als auch photographischem Nachweis praktisch nur die Molekülionengruppe registriert. Im EI-Spektrum erscheint diese mit einer relativen Intensität unter 5%, ebenso wie die Signale bei $m/e=317$ und $m/e=282$ ($M-\text{Cl}$; $M-2\text{Cl}$)^[29]. Der Verlust von einem oder zwei Chloratomen vom DDT-Molekül wird bei FD deutlicher angezeigt, noch stärker ist jedoch der direkte Bindungsbruch zwischen C^1 und C^2 bei $m/e=235$ ausgeprägt (Basissignal im EI-Spektrum^[29]). Da man auch ein relativ intensives Signal bei $m/e=117$ für $(\text{CCl}_3)^+$ beobachtet, wird ein typisches Kennzeichen vieler FD-Spektren deutlich, nämlich die häufige Spaltung des untersuchten Moleküls in zwei komplementäre, geladene Teilchen. Durch diese direkten Bindungsbrüche wird die Interpretation des Spektrums wesentlich vereinfacht.

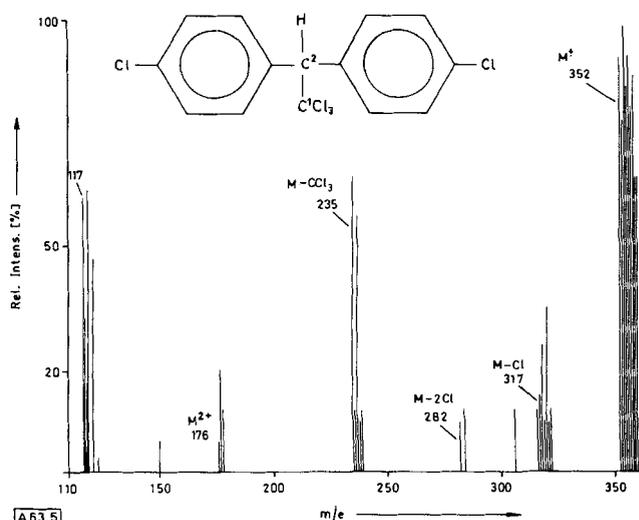


Abb. 5. FD-Massenspektrum von *p,p'*-DDT [28].

Interessant sind, besonders von den theoretischen Aspekten ihrer Entstehung im hohen Feld her, die doppelt geladenen Ionen, z.B. M^{2+} bei $m/e=176$ und $(M-\text{CCl}_3)^{2+}$ bei $m/e=117.5$. Röllgen und Beckey^[30-32] haben gezeigt, daß bei der FI-Massenspektrometrie intermediäre Oberflächenbindungen der einfach geladenen Ionen ein entscheidendes Merkmal für die Bildung der doppelt geladenen Ionen sind. Die entsprechenden FD-Prozesse werden durch die feste Adsorbatschicht kompliziert. Für die doppelt geladenen Ionen, die durch Bindungsbruch und/oder Eliminierung von Neutralteilchen aus dem Ausgangsmolekül entstanden sind, findet man häufig ein intensives Signal bei der um eine Massenzahl erhöhten Masse. Genaue Massenbestimmungen an Sultamderivaten^[23] ergaben, daß eine Protonierung in der adsorbierten Schicht für die Aufnahme der zweiten Ladung in Betracht

gezogen werden kann. Neueste FD-Messungen von Games et al.^[33, 34] an Alkalimetallsalzen von Gallensäuren (z. B. Natriumglykocholat) ergaben doppelt geladene Ionen der Zusammensetzung $(M + 2Na)^{2+}$. Wenn es sich um die Felddesorption organischer Moleküle handelt, spricht man daher besser statt von Protonierung allgemein von der Übertragung eines Kations: „Kationisierung“^[15, 35]. Aus analytischer Sicht ist dieser Prozeß besonders wichtig, denn die Anlagerung z. B. eines Alkalimetall-Kations an ein großes organisches Molekül mit nucleophilen Funktionen erzeugt stabile „even-electron“-Ionen. Dadurch erhöht sich die Möglichkeit zur Ionisierung und zum Nachweis des intakten Moleküls^[70].

6.1.3. Organische Phosphorverbindungen

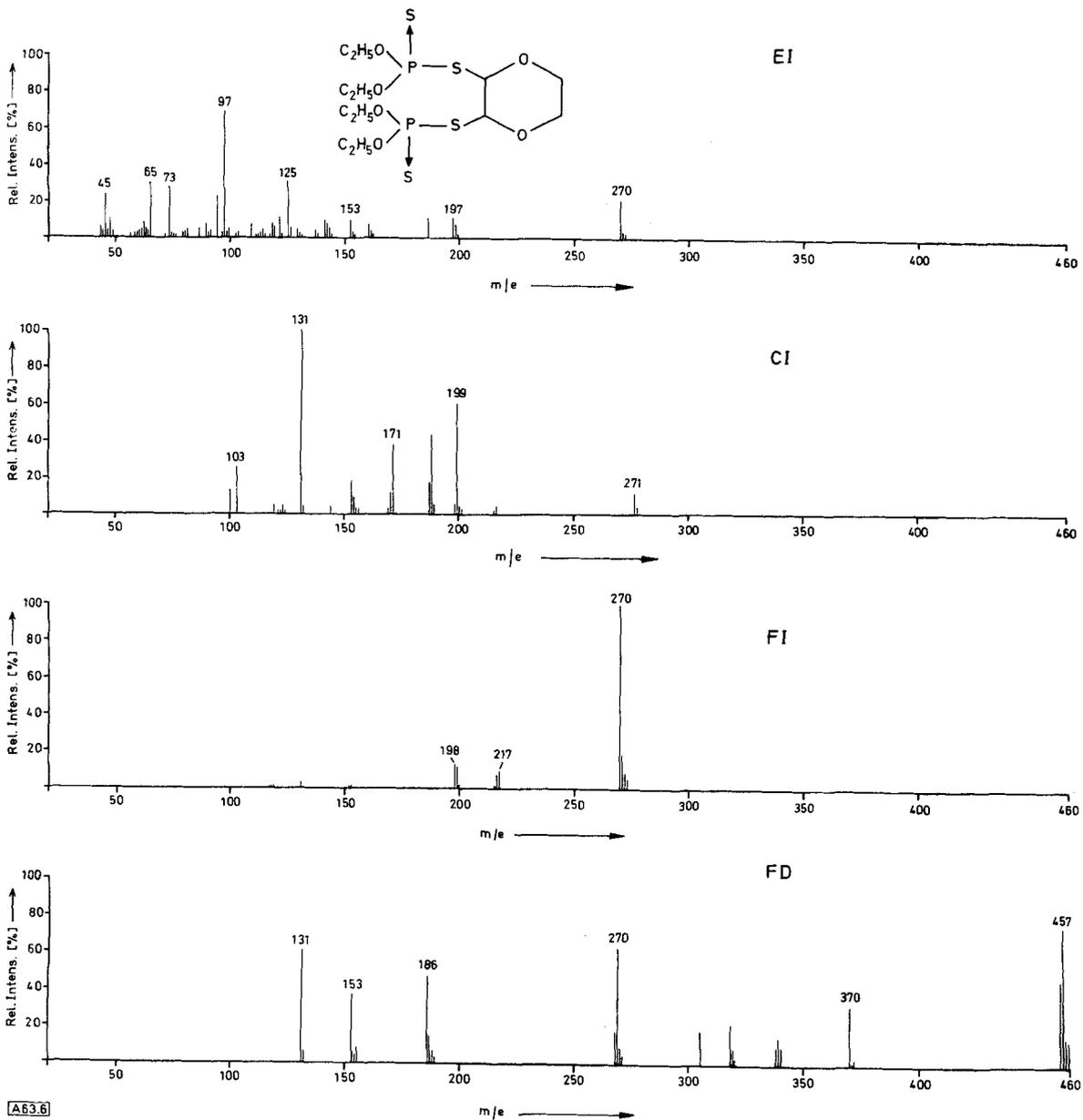
Besonders deutlich werden die Eigenschaften der FD-Methode beim Vergleich der EI-, CI-, FI- und FD-Spektren einiger Pestizide wie Delnav, Phosphamidon und Temik. Fales et al.^[36] konnten zeigen, daß in der Tat der entscheidende Vorzug der Felddesorption in der vergleichsweise geringen thermischen Belastung liegt. In Abb. 6 sind die EI-, CI-, FI-

und FD-Spektren von Delnav einander gegenübergestellt^[36]. Man sieht auf den ersten Blick, daß im hohen Massenbereich bei allen Ionisierungsmethoden ein Signal bei $m/e = 270$ (271 bei CI) registriert wird [für den Prozeß $(M - (EtO)PS_2H)^+$]. Das Molekülion wird *nur* im FD-Massenspektrum nachgewiesen, und zwar als Basissignal des Spektrums.

6.2. Analyse von Pestizid-Abbauprodukten

Warum ist die FD-Massenspektrometrie im besonderen Maße für die Untersuchung von Metaboliten geeignet?

1. Erfahrungsgemäß werden die Ausgangsverbindungen – Pestizide wie auch Arzneimittel – im Stoffwechsel in stärker polare Substanzen umgewandelt (z. B. bei höheren Organismen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit). Dabei verringert sich die Flüchtigkeit (Verdampfbarkeit des intakten Moleküls). Mit zunehmender Metabolisierung werden die Stammsubstanzen daher ungeeigneter für die direkte Untersuchung in der Kombination Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Eine Kopplung oder Kombination von Flüssigkeitschromato-



A63.6

Abb. 6. EI-, CI-, FI- und FD-Massenspektrum von Delnav (Dioxathion) [36].

graphie und FD-Massenspektrometrie bietet sich jedoch geradezu an.

Abbauprodukte von Pestiziden, die Carboxygruppen tragen, z. B. Hexachlor-5-norbornen-2,3-dicarbonsäure^[27] (aus Isodrin), Kelevansäure^[39] (aus Kelevan), Photoaldrindicarbonsäure^[28] (aus Aldrin) und 2,2-Bis(*p*-chlorphenyl)essigsäure^[28] (aus *p,p'*-DDT), sind vergleichend durch EI- und FD-Massenspektrometrie untersucht worden. Ebenso wurden Metaboliten gemessen, die Hydroxygruppen enthalten, z. B. 2,2-Bis(*p*-chlorphenyl)äthanol^[28], 1-Hydroxychlordein^[39], Aldrin-4,5-*cis/trans*-diol^[27] und das in Abb. 7 gezeigte Isodrin-4,5-*cis*-diol. Dieses FD-Spektrum verdeutlicht in besonderem Maße die geringe thermische Belastung bei Felddesorption. Trotz der relativ hohen Intensität des Ionenstromes, der für die erhaltene Hochauflösung von ca. 28 500 (10 % Taldefinition) notwendig ist, wird der naheliegende thermische Prozeß der Wasserabspaltung nicht beobachtet. Darüber hinaus ist es wichtig zu zeigen, daß die Felddesorption bei photographischem Nachweis Werte für das Auflösungsvermögen liefert, die durchaus in der Größenordnung anderer Methoden liegen. Das verwendete CEC21-110B-Massenspektrometer ergab für EI mit der kommerziellen Ionenquelle ein Auflösungsvermögen von ca. 32 000 und für FI mit einer speziellen Ionenquelle ca. 30 000^[7].

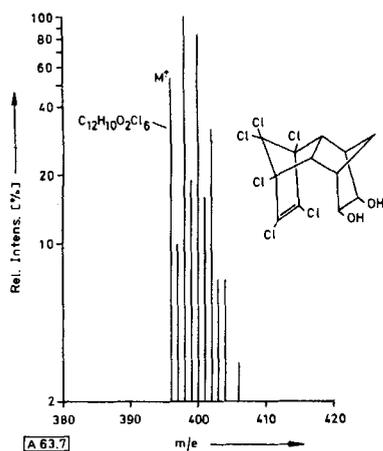


Abb. 7. FD-Massenspektrum von Isodrin-4,5-*cis*-diol [27].

2. Da die Abbauprodukte vom lebenden Organismus durchweg in sehr kleinen Mengen produziert werden, kommt der Nachweisempfindlichkeit eine entscheidende Bedeutung zu. Der Arbeitsbereich der FD-Massenspektrometrie liegt zur Zeit bei 10^{-6} – 10^{-11} g. Es muß jedoch nachdrücklich betont werden, daß sich diese Angaben auf die Substanzmengen beziehen, die adsorbiert auf der Oberfläche des FD-Emitters vorliegen. Zwar kommen andere massenspektrometrische Methoden ebenfalls mit den angegebenen Substanzmengen aus, bei der Felddesorption entfällt jedoch die Notwendigkeit der Derivatisierung. (Zur Nachweisempfindlichkeit siehe Abschnitt 2.)

3. Die Analysenproben, die bei Metabolismus-Untersuchungen anfallen, sind fast ausnahmslos Mischungen, zu deren Analyse die Feldionisation bekanntlich besonders gut geeignet ist^[1, 37, 38]. Auch die Felddesorption läßt sich zur qualitativen Gemischanalyse heranziehen.

In der Praxis verwendete Pestizide bestehen oft aus mehreren Wirkstoffen. Zum Beispiel wird das Akarizid Tetradifon (technisch, 13 %) zusammen mit dem Insektizid Carbaryl (50 %)

verwendet^[4]. In Abb. 8a ist das FD-Spektrum von Tetradifon gezeigt. Die relativ flüchtige Substanz ergibt nur die Molekülionengruppe und ein Signal bei $m/e=177$ für M^{2+} . Das FD-Spektrum von Carbaryl (Abb. 8b) zeigt als Basissignal ebenfalls das Molekülion und einige struktursignifikante Fragmente bei $m/e=143$, 101, 58 und 45^[41]. Zum Vergleich sei erwähnt, daß das M^+ -Ion im EI-Spektrum mit weniger als 5%, im FI-Spektrum (40°C Quelltemperatur) immerhin schon mit 50 % relativer Intensität erscheint^[24]. Registriert man das FD-Spektrum der oben beschriebenen Wirkstoff-Mischung integrierend mit der Photoplatte zwischen 0 und 30 mA Emitter-Heizstrom während 12 min Belichtungszeit, so ergibt sich bei einem Auflösungsvermögen von etwa 10 000 das in Abb. 8c abgebildete Spektrum. Man erkennt sofort, daß es sich ungefähr additiv aus den FD-Spektren der Einzelverbindungen zusammensetzt. Allerdings muß man mit Reaktionen der Einzelkomponenten miteinander und mit der Emitter-Oberfläche rechnen, wie spätere Untersuchungen von Mischungen organischer^[41] und anorganischer^[71] Salze zeigten. Nach Eichung der FD-Spektren mit abgestuften Konzentrationen von Carbaryl und Tetradifon kann man die Zusammensetzung des Gemisches abschätzen (hier 4:1)^[41]. Die qualitative Über-

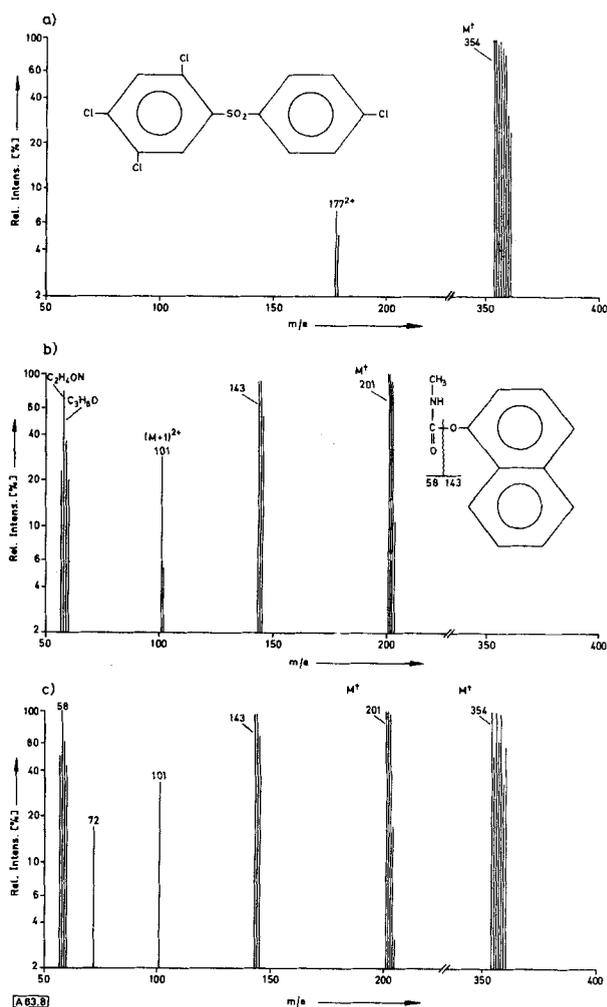


Abb. 8. a) FD-Massenspektrum von Tetradifon [41]; b) FD-Massenspektrum von Carbaryl [41]; c) FD-Massenspektrum einer Wirkstoffmischung mit 14 % Tetradifon und 50 % Carbaryl. Lösungsmittel Aceton. Photographische Registrierung, Belichtungszeit 10 min, optimaler Emitter-Heizstrom 14 mA [41].

[*] Wir danken Herrn Dr. Schinkel von der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig für diese Wirkstoff-Mischung.

einstimmung der FD-Spektren mit der Zusammensetzung von Gemischen bestätigten *Rinehart et al.*^[42] an komplex zusammengesetzten Antibiotica, *Adlercreutz et al.*^[43] an Steroid-Konjugaten, *Games et al.*^[34] an Rohextrakten von Gallensäuren und kürzlich *Schulten* und *Schurath* an komplex zusammengesetzten Aerosolen^[72].

4. Pestizide und Arzneimittel werden häufig als Konjugate mit Aminosäuren, Peptiden, Zuckern und Zuckerderivaten, organischen und anorganischen Säuren usw. ausgeschieden. Anhand von Modellverbindungen wurde gezeigt, daß die FD-Massenspektrometrie gerade für derartige analytische Probleme sehr geeignet ist. Zu diesem Punkt wurden die bisher umfangreichsten Untersuchungen mit FD-Untersuchungen bekannt^[44] (siehe Abschnitt 6.3 bis 6.6).

6.3. Analyse von Zuckern und Zuckerderivaten

6.3.1. Oligosaccharide

Die erste FD-massenspektrometrisch gemessene Substanz war das Monosaccharid D-Glucose^[2]; über das FD-Spektrum des Disaccharids Cellobiose haben *Krone* und *Beckey*^[45] berichtet. In Abb. 9 ist das FD-Spektrum eines Triaminotrisaccharids gezeigt^[7]. Obwohl diese Verbindung sieben freie Hydroxy- und drei freie Aminofunktionen enthält, liefert das

kationisierte (protonierte) Molekül das Basissignal des Spektrums. Das Signal mit der zweithöchsten relativen Intensität bei $m/e = 324$ kann wiederum einem direkten Bindungsbruch zugeordnet werden. Strukturverwandte Oligosaccharide mit antibiotischer Wirkung wie Gentamycin und Tobramycin ergaben ebenfalls hohe Molekülintensitäten und Bindungsbrüche am glykosidischen Sauerstoff. *Rinehart et al.*^[42] haben die FD-Spektren einer Reihe von Antibiotica aufgenommen. Neomycin, Streptolydigin und Novobiocin, die im EI- und CI-Spektrum keine Molekülionen ergaben, zeigten im FD-Spektrum bei T^* das Molekulargewicht als Basissignal. Dar-

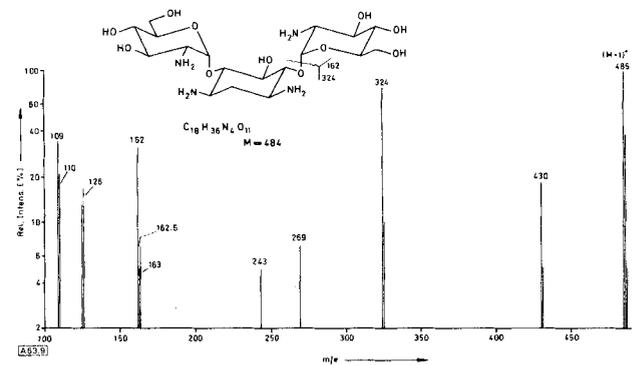


Abb. 9. FD-Massenspektrum eines Triaminotrisaccharids.

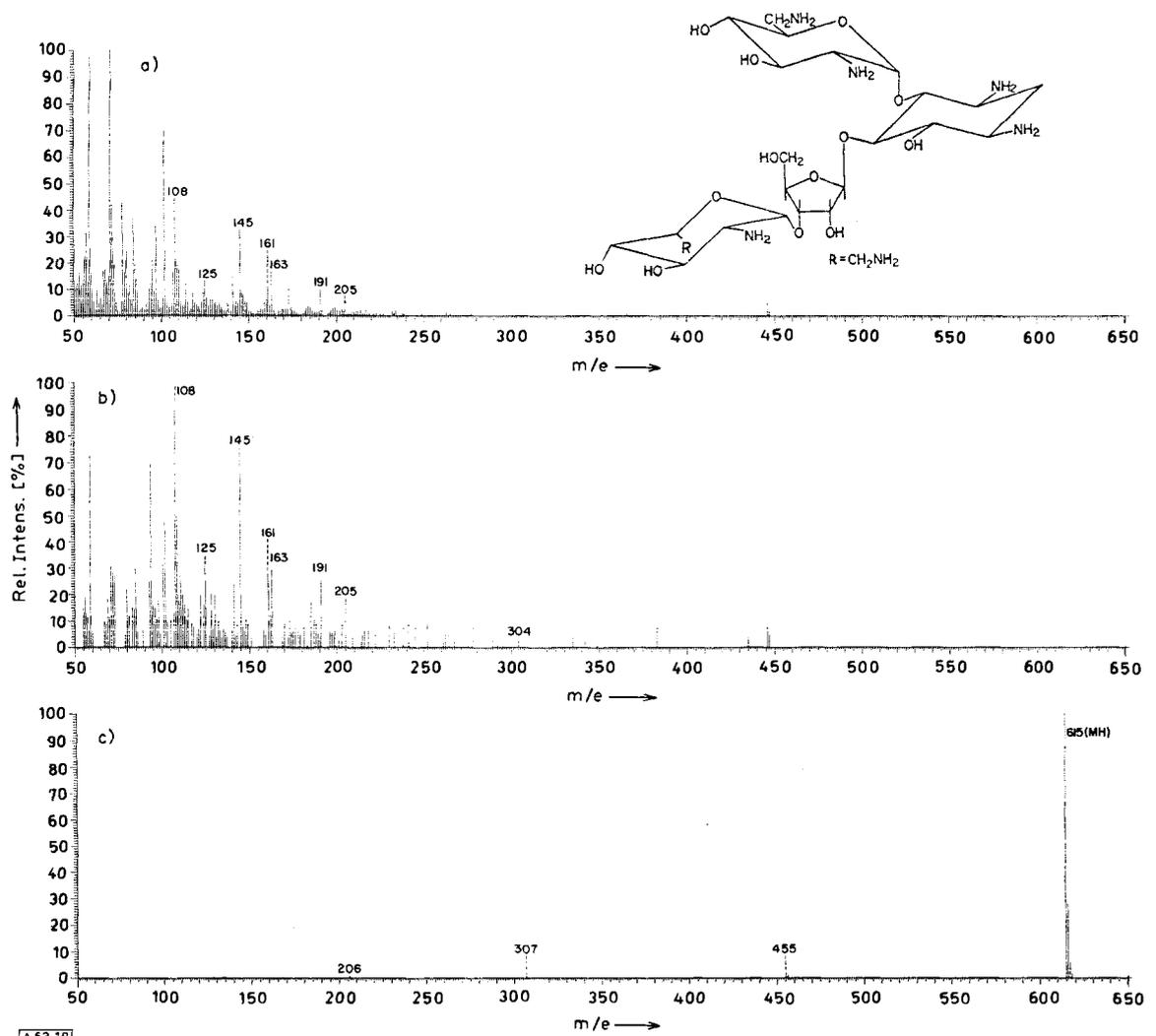


Abb. 10. a) EI-Massenspektrum von Neomycin B, 70 eV Elektronenenergie; b) EI-Massenspektrum von Neomycin B, 18 eV Elektronenenergie; c) FD-Massenspektrum von Neomycin B [42].

über hinaus liefert die Felddesorption qualitative Hinweise auf die Zusammensetzung komplizierter Antibiotica, wie am Beispiel von Streptovaricin, Filipin und Dermostatin gezeigt wurde.

In Abb. 10a ist das 70-eV-EI- und in Abb. 10b das 18-eV-EI-Spektrum von underivatisiertem Neomycin B dargestellt. Die Spektren enden im höheren Massenbereich bei $m/e=446/447$. Ein Ion dieser Masse erscheint erstaunlicherweise im FD-Spektrum (Abb. 10c) nicht, sondern nur relativ schwache Fragmente bei $m/e=206, 307$ und 455 , während das $(M+H)^+$ -Ion ($m/e=615$) 75% des gesamten Ionenstromes ausmacht. Um ein Massenspektrum dieser Verbindung mit EI und direktem Einlaß zu erhalten, war es notwendig, das Hexa-*N*-acetyl-heptakis(*O*-trimethylsilyl)derivat herzustellen^[46]. Dies ist schwierig, und außerdem wird die derivatisierte Substanz durch die Schutzgruppen weit über doppelt so schwer und gerät damit in den Grenzbereich konventioneller Massenspektrometer.

6.3.2. Glykoside

Für alle spektroskopischen Methoden gilt eine annähernd umgekehrte Proportionalität von Signalintensität und Auflösung. Wegen der relativ kleinen Ionenströme bei der Felddesorption werden bei hochauflösenden Messungen hohe Anforderungen an die Transmission des Massenspektrometers und die Qualität der verwendeten Emitter gestellt (siehe Abschnitt 3). Als Vorteile der Hochauflösung ergeben sich: Die genaue Bestimmung des Molekulargewichtes und damit der Bruttoformel sowie wichtige Hinweise bei der Interpretation der Fragmente. Die Hochauflösungsdaten einiger Arylglykoside und von Glykosiden des Cumarin- und Flavon-Typs sind kürzlich veröffentlicht worden^[47]. In Abb. 11 ist das hochaufgelöste FD-Spektrum von Hesperidin gezeigt. Hier wird außerdem der Aspekt der Stabilisierung des Molekülions durch Kationisierung klar verdeutlicht. Zwar ist M^+ bei $m/e=610$ erkennbar, doch – für FD ungewöhnlich – unter 20% relativer Intensität. Dagegen erscheint die Anlagerung von Na^+ als Basissignal. Die Natrium-Ionen stammen aus den unvermeidlichen Beimengungen der Naturstoffextrakte (z. B. nach Säulen chromatographie), aber bei höheren Emitter-Heizströmen auch aus Verunreinigungen des Emitters. Auf die Nützlichkeit dieser $(M+Na)^+$ und $(M+K)^+$ -Signale für die Unterscheidung von M^+ - und $(M+H)^+$ -Ionen unbekannter Verbindungen sei hingewiesen^[48]. Da die Hochauflösung die Elementarzusammensetzung der Fragmente ergibt, kann $m/e=302.079$

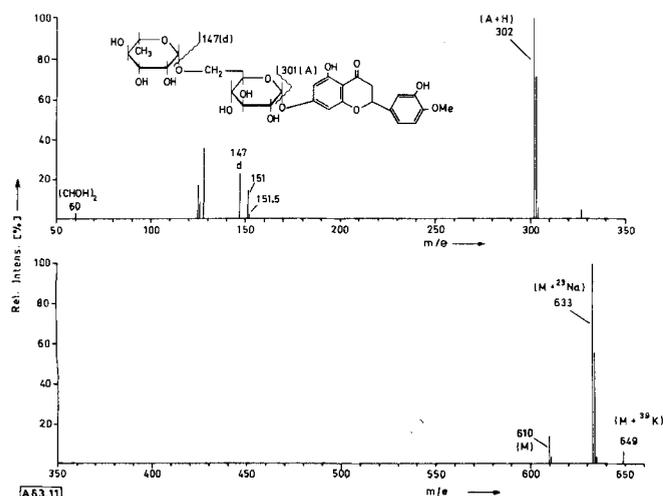


Abb. 11. FD-Massenspektrum von Hesperidin [47].

als $(A+H)^+$, $m/e=147.066$ als direkter Bindungsbruch am glykosidischen Sauerstoff der endständigen Zuckereinheit interpretiert werden. Das Aglykon erscheint auch als doppelt geladenes Ion bei $m/e=151.040$. Das EI-Spektrum des freien Hesperidins ergibt ein Signal für das Aglykon ($m/e=302$) mit 76% relativer Intensität, das Basissignal liegt bei $m/e=137$. Das Molekülion bei $m/e=610$ ist nicht nachweisbar.

α - und β -verknüpfte Glykoside mit aromatischem Aglykon, die als Testsubstanzen zum Enzymnachweis (Substrate für Glucosidasen) benutzt werden, zeigten deutlich verschiedene FD-Spektren. Der Vergleich mit den EI- und FI-Spektren ergab, daß die FD-Spektren am einfachsten sind und die größten Unterschiede für die Stereoisomeren aufweisen^[49].

6.3.3. Glucuronide

Steroidglucuronide sind für die Hormonexkretion äußerst wichtig. Abb. 12 zeigt das hochaufgelöste FD-Spektrum des Testosteronglucuronids. Die Arbeiten von Adlercreutz et al.^[43] führen über Untersuchungen an Modellschubstanzen hinaus und stellen die Felddesorption in die Dienste der klinischen Chemie und Medizin. So gelang es, aus dem Urin von Schwangeren isoliertes Östrial-16-glucuronid FD-massenspektroskopisch mit hoher Molekülionenintensität nachzuweisen. Dieser Nachweis wurde ohne Derivatisierung bei niedriger Auflösung ($m/\Delta m=500-600$) durchgeführt und durch die FD-Messung synthetischer Standardverbindungen gestützt.

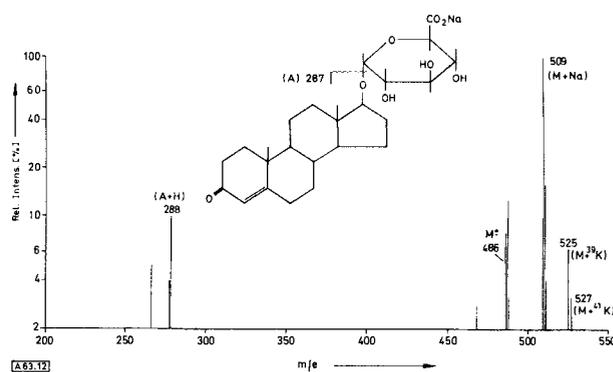


Abb. 12. FD-Massenspektrum von Testosteronglucuronid (Natriumsalz) [47].

6.3.4. Nucleoside und Nucleotide

Diese Verbindungen kommen einerseits als Konjugatbildner in Betracht oder nehmen an metabolischen Prozessen teil und sind daher underivatisiert für die FD-Analyse interessant. Andererseits wird eine große Zahl modifizierter, biologisch aktiver Nucleoside synthetisiert^[50]; die FD-Spektren dürften den Strukturbeweis erleichtern. Als Modellverbindungen wurden die wichtigsten Nucleoside, die als Bestandteile der RNA und DNA vorkommen, mit FI^[51] und FD^[22] gemessen. Mit Ausnahme des Guanosins reichen die Molekülionenintensitäten im FI-Spektrum aus, um die underivatisierten Verbindungen zu identifizieren. Die in^[51] angegebene Temperatur für das Direkteinlaß-System (250°C) führt offenbar zu thermischer Zersetzung des Guanosinmoleküls vor der Überführung in die Gasphase ($F_p=240^\circ\text{C}$ (Zers.)). Das FD-Spektrum^[22] von Guanosin wurde oberhalb von T^* bei 18–20 mA aufgenommen in der Absicht, die für die Struktur wichtigen komplementären Fragmente für den Zuckerteil (S) und den Basenteil (B) des Moleküls zu erhalten; das Molekülion

erscheint dann mit ca. 20 % relativer Intensität. In der gleichen Arbeit wird auch der starke Einfluß des Lösungsmittels bei FD diskutiert.

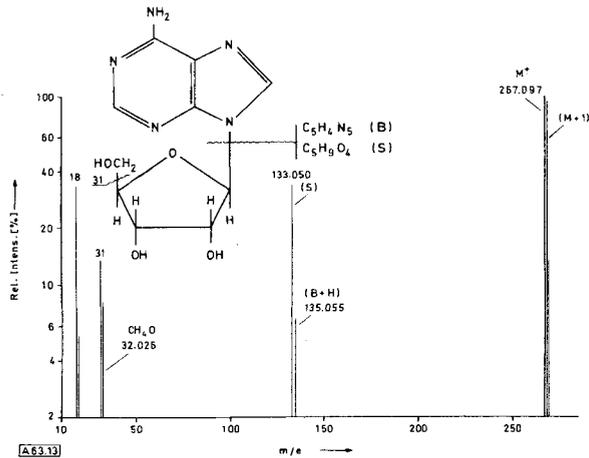


Abb. 13. FD-Massenspektrum von Adenosin [22].

In Abb. 13 ist das hochaufgelöste FD-Spektrum von Adenosin dargestellt. Kennzeichnend sind die Signale für $(B+H)^+$ bei $m/e=135.055$ und für (S) bei $m/e=133.050$ neben den Basissignalen für M^+ und $(M+H)^+$ (Emitter-Heizstrom 20 mA). Als erstes freies Nucleotid wurde 5'-Adenosinmonophosphat mit der FD-Massenspektrometrie als intaktes Moleküllion $(M+H)^+$ (73% rel. Int.) nachgewiesen^[22] (Abb. 14). Der Bindungsbruch zwischen dem Phosphorsäureteil und dem Nucleosid (N) Adenosin wird mit 29% relativer Intensität bei $m/e=267.097$ registriert. Die übrigen Fragmente ergeben wie beim Nucleosid intensive Massenslinien für $(S)^+$ und $(B+H)^+$. Die relativ schwachen Signale bei $m/e=60.021$ $(CHOH)_2^+$ und 61.029 $((CHOH)_2+H)^+$ liefern den Hinweis, daß es sich um ein Ribosid handelt. Bei Emmitter-Heizströmen weit oberhalb T^* , z. B. bis zu 50 mA, wird bei $m/e=98.985$

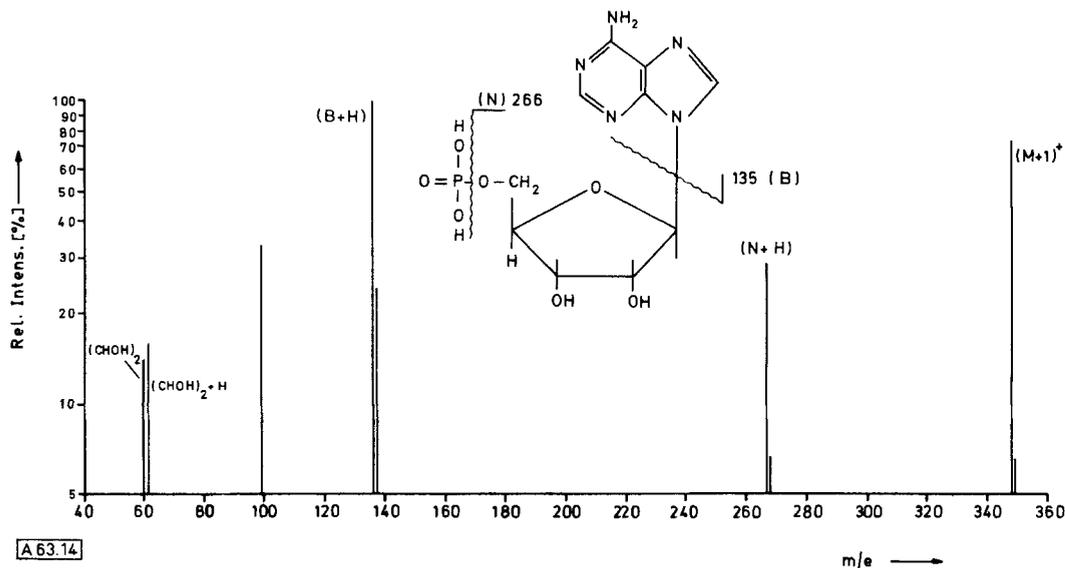


Abb. 14. FD-Massenspektrum von Adenosinmonophosphat [22].

protonierte Orthophosphorsäure nachgewiesen. Auch andere freie Nucleotide wie 5'-Thymin-, 5'-Desoxycytidin- und 5'-Desoxyguanosinmonophosphat ergeben ähnliche FD-Spektren.

6.3.5. Vitamine

In Verbindung mit den Problemen beim Nachweis mutagener Verbindungen waren die 70-eV- und 12-eV-EI-Spektren und das hochaufgelöste FD-Spektrum von Vitamin C (Ascorbinsäure) aufgenommen worden^[28]. Die Intensität des M^+ -Ions im EI-Spektrum lag bei dieser Untersuchung unter 10% relativer Intensität. Das Basissignal im FD-Spektrum wird durch die Moleküllionengruppe M^+ und $(M+H)^+$ gebildet, wenn das Spektrum bei T^* aufgenommen wird. In jüngster Zeit ist über die Charakterisierung mehrerer B-Vitamine berichtet worden^[52].

6.3.6. Natriumsalze von Desoxyfluor-D-glucose-6-phosphaten

Am Ende dieser Liste von Verbindungen mit zunehmender Polarität stehen die Alkalimetallsalze von Zuckerphosphaten. Die hochaufgelösten FD-Spektren dieser Substanzen^[53] ergeben $(M+H)^+$ als Basissignal, zeigen aber auch Produkte, die durch Austausch von Na^+ gegen H^+ , Wassereliminierung und pyrolytische Prozesse entstanden sind. Da diese Salze in einem engen Zeit- und Heizstrom-Intervall desorbieren, konnten sie nur photographisch registriert werden. Teerartige Rückstände, die sich auf dem FD-Emitter abscheiden (0–50 mA Heizstrom, 10 min Belichtungszeit), setzen dessen Emissionseigenschaften stark herab.

6.4. Analyse von Aminosäuren

Eine Reihe der biologisch wichtigen α -Aminosäuren wurden von Winkler und Beckey FD-massenspektroskopisch untersucht^[54]. Die FD-Spektren zeigen generell das Moleküllion oder Quasimoleküllion mit hoher relativer Intensität. Dies gilt auch für Arginin und Cystin, während diese Ionen mit EI, CI und FI nicht nachweisbar sind. In Abb. 15 ist das FD-Spektrum von Arginin dargestellt. Das $(M+H)^+$ -Ion erscheint mit 30% relativer Intensität, das Basissignal des Spek-

trums bei $m/e=158$ wird durch den Ammoniakverlust aus dem protonierten Molekül gekennzeichnet $[(M+H)-NH_3]^+$. Außerdem bricht die Bindung zwischen dem Guanidinrest und C^5 ; dies führt zu $m/e=116$ und $m/e=117$. Häufig erhält

man bei den α -Aminosäuren (z. B. Glu, Val, Pro, Ser und Cys) ein Signal bei $(M-45)$, welches als $[(M+H)-COOH_2]^+$ gedeutet werden kann.

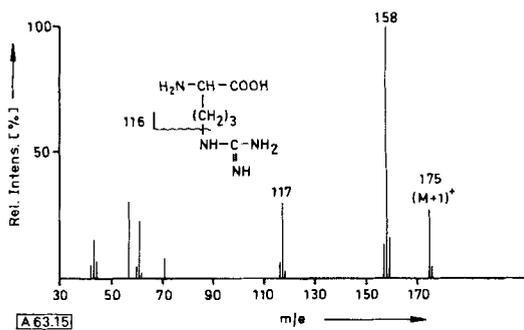


Abb. 15. FD-Massenspektrum von Arginin [54].

6.5. Analyse von Peptiden

Am Beispiel des einfachsten Dipeptids, Glycyl-glycin^[55], wurde zuerst gezeigt, daß underivatisierte Peptide mit Felddesorption komplette Massenspektren ergeben, in denen die Molekülonen (bei 18–24 mA Emitter-Heizstrom) das Basissignal bilden. In einer folgenden FD-Arbeit gelang es *Winkler* und *Beckey*^[56], partiell geschützte und freie Oligopeptide mit drei bis neun Aminosäureeinheiten (z. B. auch Arginin und Histidin) nicht nur mit hohen Molekülonen-Intensitäten, sondern auch mit Teilinformationen über die Sequenz zu registrieren. Als Beispiel sei das FD-Spektrum von Ac-Gly-Arg-Arg-Gly-OMe in Abb. 16 wiedergegeben. Obwohl das N-terminale

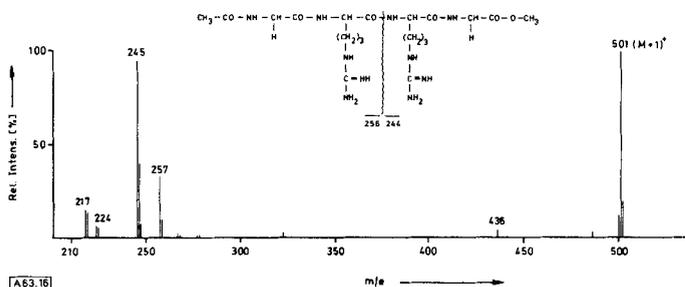


Abb. 16. FD-Massenspektrum von Ac-Gly-Arg-Arg-Gly-OMe [56].

Ende des Tetrapeptids acetyliert ist und die C-terminale Carboxygruppe methyliert, ist die Basisintensität des $(M+H)^+$ -Ions bei $m/e=501$ das herausragende Kennzeichen des Spektrums, denn das Peptid enthält u. a. zwei ungeschützte Arg-Teile, die die Flüchtigkeit stark herabsetzen. Der direkte Bindungsbruch (mit Wasserstoffübertragung) in der Mitte des Moleküls führt zu zwei sequenzspezifischen Fragmenten. Wie schon in Abschnitt 6.1.2 erläutert, erhält man aus dem Molekülion und den komplementären Signalen bei $m/e=256$ und $m/e=244$ relativ einfach interpretierbare Informationen über die Struktur. Allerdings muß man einschränkend sagen, daß in diesem Fall nur die zusätzlichen Daten aus den EI-Spektren die Identität der Aminosäuren und ihre Verknüpfung erkennen lassen. Wenn also die vollständige Sequenz bestimmt werden soll, dürfte eine Kombination von EI-, CI- und FD-Spektroskopie die größten Aussichten auf Erfolg haben. In jüngster Zeit gelang allerdings nur mit FD eine so starke Fragmentierung des Peptidgerüsts, daß die komplette Sequenzierung eines ungeschützten Tri- und Nonapeptids diskutiert werden kann-

te^[57]. Der Versuch, erheblich oberhalb von T^* durch höhere Emitter-Heizströme thermisch-/feldinduziert Fragmente zu erzeugen, führt dagegen überwiegend zu Pyrolyseprodukten und nicht zu Sequenzfragmenten.

6.6. Analyse von Arzneimitteln und Arzneimittelmetaboliten

Die FD-Untersuchungen von Krebsmedikamenten bilden seit 1971 einen Schwerpunkt in der Erprobung der FD-Methode^[58]. Von Propan- und Butansultamen (Antitumor-Effekt gegen Ehrlich-Ascites-Tumoren) wurden EI- und FD-Spektren aufgenommen^[23]. Die FD-Spektren wiesen fünf allgemeine Aspekte auf:

Hohe Intensität der Molekülonen, Bildung der meisten Fragmente in einem Schritt, Abspaltung von Neutralverbindungen (H_2O , NH_3 , $HCOOH$) aus dem protonierten Molekül, Bildung von Fragmenten durch direkte Bindungsbrüche und Erzeugung doppelt geladener Ionen.

Über Modellverbindungen wie z. B. medizinische Carbamate^[40] hinaus in Richtung auf die Lösung „echter“ analytischer Probleme mit der Felddesorption gehen die Arbeiten über Cyclophosphamid (1) (Endoxan) und dessen Metaboliten^[59]. Einzelkomponenten können demnach nicht nur in Mischungen von Ausgangsverbindungen (wie in Abschnitt 6.2), sondern auch in Mischungen von Ausgangsverbindungen und Metaboliten mit hochaufgelösten FD-Spektren identifiziert werden. In Abb. 17 ist ein Ausschnitt des FD-Spektrums einer Mischung von Cyclophosphamid (1) und drei seiner wichtigsten Metaboliten (2), (3) und (4) gezeigt. Obwohl diese Verbindungen in einem breiten Polaritätsbereich liegen – (4) wurde als Cyclohexylammoniumsalz stabilisiert – erscheinen die Molekülonen aller Komponenten mit hoher relativer Intensität. Auch in Extrakten von Körperflüssigkeiten konnten (nach Dünnschichtchromatographie) Abbauprodukte des Cyclophosphamids nachgewiesen werden. Allerdings ergaben sich „elektronenstoß-ähnliche“, linienreiche FD-Spektren aufgrund der mitgeschleppten Verunreinigungen. Ohne zusätzliche Informationen über die gesuchte Verbindung ist die Interpretation dieser Spektren sehr schwierig.

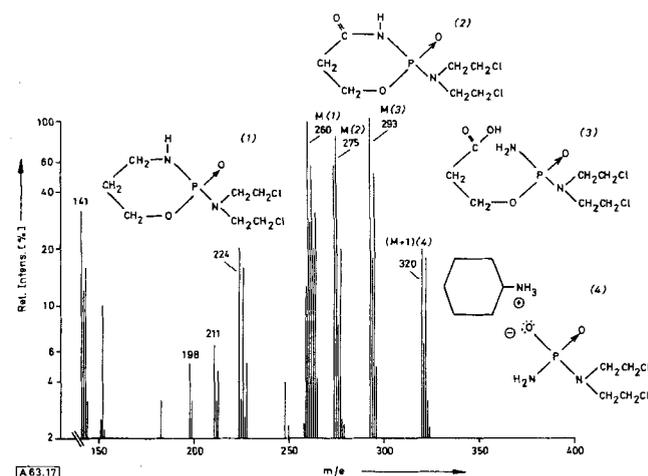


Abb. 17. FD-Massenspektrum einer Mischung von Cyclophosphamid (1) und drei seiner wichtigsten Metaboliten (2), (3) und (4) [59].

Ein häufig angewendetes immunsuppressives Medikament ist Azathioprin (Imuran). Das EI-Spektrum der Verbindung ist in Abb. 18a gezeigt^[60]. Die relative Intensität des Molekül-

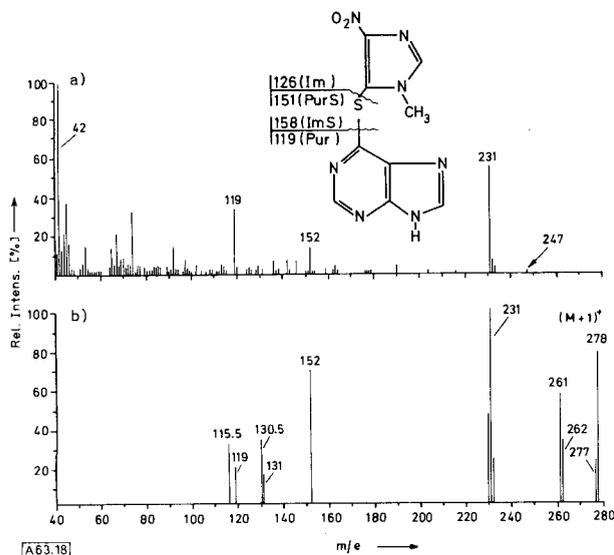


Abb. 18. a) EI-Massenspektrum von Azathioprin (Imuran), 70 eV Elektronenenergie; b) FD-Massenspektrum von Azathioprin, Emitter-Heizstrom $T^* = 25 \text{ mA}$ [60].

ions liegt unter 1%. Das FD-Spektrum bei T^* (22 mA) zeigt ausschließlich das $(M+1)$ -Ion. Bei Heizströmen von $>T^*$ ergibt sich das FD-Spektrum in Abb. 18b. Es wird deutlich, daß die Signale im höheren Massenbereich des EI- und FD-Spektrums bei 25 mA übereinstimmen (z. B. $m/e = 231, 152, 119$). Offenbar wird hier der überwiegend thermische Zerfall des Azathioprin-Moleküls bei EI durch die thermisch-/feldinduzierte Fragmentierung bei FD simuliert. Man findet bei Hochauflösungsmessungen mit EI und mit FD die gleiche Elementzusammensetzung der Ionen.

Wichtiger ist in diesem Zusammenhang ein Metabolit des Azathioprins, und zwar ein Glutathionyl-Konjugat. Das EI-Spektrum in Abb. 19a ist vorwiegend durch pyrolytischen Zerfall des Moleküls gekennzeichnet. Bei T^* (24 mA) ergibt das FD-Spektrum wiederum nur das $(M+1)$ -Ion. Oberhalb von T^* läßt sich in einem sehr engen Heizstrom-Intervall eine Fragmentierung induzieren (Abb. 19b).

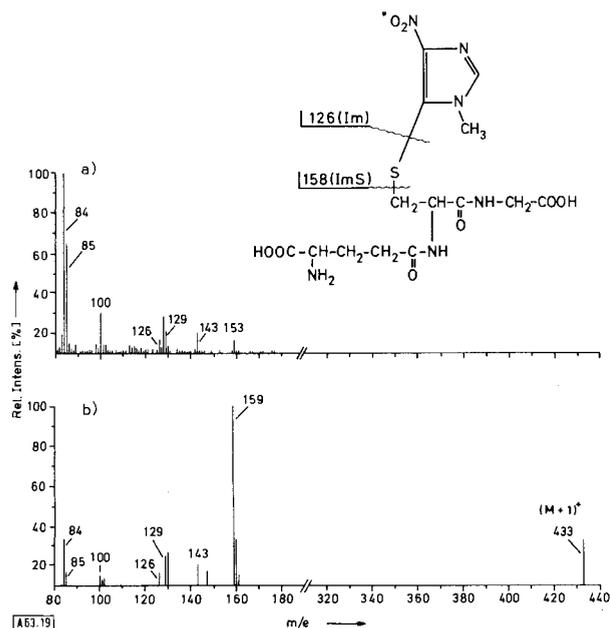


Abb. 19. a) EI-Massenspektrum von 1-Methyl-4-nitro-5-(S-glutathionyl)imidazol, 70 eV Elektronenenergie [60]; b) FD-Massenspektrum dieser Verbindung bei 27 mA Emitter-Heizstrom ($>T^*$) [60].

Um die Möglichkeiten der Felddesorption beim Nachweis von Metaboliten zu erkunden, wurde eine Probe aus dem Urin einer Ratte isoliert, der oral Azathioprin verabreicht worden war. Nach Säulenchromatographie und Reinigung durch Papierchromatographie konnte ein Cysteinyl-Konjugat im FD-Spektrum identifiziert werden^[60].

7. Vor- und Nachteile der FD-Methode im Vergleich zu anderen Ionisierungsmethoden

Die FD-Methode soll mit anderen Ionisierungsarten verglichen werden, die ebenfalls als „schonend“ betrachtet werden, wie CI, FI und EI bei niedrigen Elektronenenergien. Die FD-Methode ist zur *qualitativen* Analyse komplizierter Substanzgemische sehr gut, z. Zt. zur *quantitativen* Analyse von Mischungen jedoch noch nicht geeignet. Für jede Komponente der Mischung ist – wie in Abschnitt 4 dargelegt – eine Temperatur T^* der Feldanode optimal. Bei konstanter Anodentemperatur sind daher die FD-Ionenstromsignale mit Sicherheit nicht den Molenbrüchen der Komponenten einer Substanzmischung in Lösung proportional. Auch bei Einführung eines variablen Temperaturprogramms für die Feldanode dürfte man in Zukunft kaum eine derartige Proportionalität herstellen können. Die Ionenintensität einer Substanz hängt in zu komplizierter Weise von der Struktur und den chemischen Eigenschaften der organischen Mikronadeln auf der Emitteroberfläche ab, ferner von den Konzentrationen der Mischungspartner, der Dicke der auf den Mikronadeln abgelagerten Probenschicht, vom Lösungsmittel und anderen Parametern (z. B. von der Verweilzeit der Probe auf der Feldanode während der Felddesorption).

Die Stärke der FD-Methode liegt zweifellos auf dem Gebiete der qualitativen Analyse thermisch empfindlicher Substanzen. Es muß jedoch betont werden, daß das FD-Spektrum einer Substanz beim heutigen Stand der Technik schlechter reproduzierbar als ein CI- oder FI-Spektrum ist. Dieser Gesichtspunkt ist aber im allgemeinen von geringer Bedeutung, weil die FD-Methode in den Fällen angewendet wird, in denen Proben aufgrund ihrer Schwerflüchtigkeit weder bei CI und FI noch bei EI eindeutig identifizierbare Molekülionen liefern. Unter diesen Voraussetzungen ist die Kombination von FD mit EI und/oder CI optimal. Ein großer Vorzug der FD-Methode besteht darin, daß derartige, oft nur in Pikogramm-Mengen vorliegende Substanzen nicht zur Erhöhung der Flüchtigkeit chemisch behandelt werden müssen. Ein Anwendungsschwerpunkt der FD-Methode liegt daher bei der *Analyse sehr kleiner Mengen stark polarer, underivatisierter Substanzen*.

Ein Vorteil der Elektronenstoßmethode ist die Fülle strukturspezifischer Molekülfragmente, die im Massenspektrum gefunden werden. In den etwa 30 Jahren seit der Ausarbeitung der EI-Methode hat sich ein Erfahrungsmaterial größten Ausmaßes angesammelt, das sich in umfangreichen Spektrenkatalogen und in zahlreichen empirischen Regeln für die Fragmentierung niedergeschlagen hat.

Die von *Munson* und *Field*^[61] eingeführte Methode der chemischen Ionisation wird erst seit etwa vier Jahren in einer größeren Zahl von Laboratorien angewendet, während die FD-Methode erst seit drei Jahren systematisch getestet und fast ausschließlich durch die Bonner Arbeitsgruppe weiterentwickelt wurde. Dennoch zeichnen sich bereits jetzt zahlreiche spezifische Anwendungsmöglichkeiten ab.

8. Ausblick

8.1. FD-Quadrupol-Massenspektrometer

Ein Gebiet, das sich noch im Anfangsstadium der Entwicklung befindet, das aber auf speziellen Sektoren der FD-Massenspektrometrie an Bedeutung gewinnen könnte, ist die FD-Quadrupol-Massenspektrometrie. In Abschnitt 5 wurde auf die Bedeutung eines schnellen Massenscans für den Fall der elektrischen Ionenregistrierung hingewiesen.

Das Quadrupol-Massenspektrometer (QMS) bietet sich für die FD-Technik bei niedrigem Auflösungsvermögen (< 500) aus folgenden Gründen an^[62]:

1. Die Geschwindigkeit des Massenscans kann größenordnungsmäßig 1000 Masseneinheiten pro Sekunde erreichen.

2. Die Intensität der Ionenströme und das Auflösungsvermögen sind nahezu unabhängig von der Energie der in das QMS eintretenden Ionen (die maximale Energie liegt bei EI bei etwa 5–10 eV).

3. Das Produkt aus Transmission (T) und Auflösungsvermögen (A) ist im unteren Massenbereich nahezu konstant^[63] (die Transmission ist definiert als das Verhältnis des an der ersten Dynode des SEV-Ionendetektors gemessenen Stromes zu dem von der Feldanode emittierten Totalionenstrom). Das Verhältnis T/A ist am QMS elektronisch einstellbar. Man kann daher je nach Wunsch einen großen Massenbereich bei großer Transmission und niedrigem Auflösungsvermögen einstellen und sich somit einen raschen Überblick über das FD-Massenspektrum verschaffen, oder das Auflösungsvermögen erhöhen, um z. B. die Molekülionengruppe genauer zu analysieren.

Die hohe Registriergeschwindigkeit des QMS ermöglicht es, den Aufnahmevorgang des FD-Massenspektrums dem spezifischen Desorptionsverhalten der zu analysierenden Substanz anzupassen. Dies ist wichtig für die Untersuchung der grundlegenden Phänomene des FD-Vorgangs sowie für die analytische Anwendung der FD-Methode. Als Beispiel sei der rasche Nachweis bestimmter Komponenten aus Substanzgemischen erwähnt, wie sie in der chemischen Synthese von Verbindungen und bei Extraktionsmethoden in der Biochemie anfallen^[64].

8.2. Pyrolyse-Massenspektrometrie

Einige der wichtigsten biologisch aktiven Verbindungen (Polysaccharide, Polynucleotide und Polypeptide) sind Moleküle mit sehr hohem Molekulargewicht (> 20000). Der kontrollierte thermische Abbau und die Identifizierung der Bausteine mit massenspektrometrischen Methoden ist in zweierlei Hinsicht aussichtsreich: 1. Die schnelle, exakt reproduzierbare Analyse der Pyrolyseprodukte, z. B. mit einer Kombination aus Curiepunkt-Pyrolisator, Quadrupol-MS und Datensystem, führt zu „fingerprint“-Spektren^[65]. Die sichere Identifizierung bekannter Polymere ist mit diesem System (durch Spektrenvergleich) möglich. 2. Der Nachweis möglichst großer, ionisierter Primärbruchstücke im Massenspektrum ergibt Hinweise auf die Zusammensetzung und den Bau von bekannten und unbekanntem Polymeren. Die Pyrolyse-Feld-desorption ist wegen des sehr kleinen Probenverbrauchs ($\approx 10^{-8}$ g), der sehr dichten zeitlichen und räumlichen Aufeinanderfolge von Pyrolyse und Ionisation und der schonenden Ionisierung für die Untersuchungen von Biopolymeren^[21, 66] und technischen Polymerisationsprodukten geeignet.

Es muß betont werden, daß die Pyrolyse-Feld-desorption erfolversprechend nur dann eingesetzt werden kann, wenn zwei grundsätzliche Voraussetzungen erfüllt werden. Zum einen werden die höchsten Ansprüche an das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers gestellt. Ohne ausgezeichnete Werte für das Auflösungsvermögen (> 30000) läßt sich die elementare Zusammensetzung der Signale mit steigender Massenzahl zunehmend schwieriger zuordnen. Zum andern ist die Auswertung der außerordentlich komplizierten Spektren der erhaltenen Vielkomponentengemische nur durchführbar, wenn eine elektronische Datenverarbeitung zur Verfügung steht.

8.3. Flüssigkeitschromatographie-Feld-desorption

Man spricht von der Kopplung der Gaschromatographen an das Massenspektrometer als der erfolgreichsten massenspektrometrischen Kombination. Diesem System sind aber nur solche Verbindungen zugänglich, die von vornherein flüchtig genug sind oder die durch chemische Vorbehandlung, also Derivatisierung, diese Flüchtigkeit erhielten. Angesichts der raschen Fortschritte in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie und der Möglichkeiten der Feld-desorption, die Verdampfung der Analysenprobe zu umgehen, liegt die Kombination beider Methoden auf der Hand. Erste Versuche in dieser Richtung wurden mit einer „off-line“-Technik unternommen^[67]. Das Eluat des Flüssigkeitschromatographen wurde gesammelt, auf dem Emittor konzentriert und mit FD gemessen. Das FD-Massenspektrometer erfüllt in diesem Fall die Funktion eines (zweiten) molekülspezifischen Detektors^[68]. Es bleibt abzuwarten, ob die großen Anstrengungen in Richtung einer „on-line“-Technik^[69] zur Lösung der enormen technischen Probleme, speziell bei hochpolaren Substanzen, führen und ob die analytischen Aussagen dieser direkten Kopplung den hohen apparativen Aufwand rechtfertigen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Fonds der Chemischen Industrie für die großzügige finanzielle Unterstützung unserer Arbeiten.

Eingegangen am 25. November 1974 [A 63]

- [1] H. D. Beckey, *Angew. Chem.* 81, 662 (1969); *Angew. Chem. internat. Edit.* 8, 623 (1969).
- [2] H. D. Beckey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 2, 500 (1969).
- [3] E. W. Müller, *Phys. Rev.* 102, 618 (1956).
- [4] R. Gomer, *J. Chem. Phys.* 31, 341 (1959).
- [5] H. D. Beckey: *Field Ionization Mass Spectrometry*. Pergamon, Oxford 1971.
- [6] H. D. Beckey, A. Heindrichs u. H. U. Winkler, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 3, App. 9–11 (1970).
- [7] H.-R. Schulten, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [8] H. D. Beckey, J. Dahmen u. H. Knöppel, *Z. Naturforsch.* 21a, 142 (1966).
- [9] I. V. Goldenfeld u. V. A. Nazarenko, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 5, 197 (1970).
- [10] E. W. Müller u. T. T. Tsong: *Field Ion Microscopy*. Elsevier, New York 1969.
- [11] R. Ajeian, H. D. Beckey, A. Maas u. U. Nitschke, *Appl. Phys.* 6, 111 (1975).
- [12] F. W. Röllgen, Bonn, persönliche Mitteilung.
- [13] H. D. Beckey, S. Bloching, M. D. Migahed, E. Ochterbeck u. H.-R. Schulten, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 8, 1969 (1972).
- [14] H. D. Beckey, A. Heindrichs, E. Hilt, M. D. Migahed, H.-R. Schulten u. H. U. Winkler, *Messtechnik* 78, 196 (1971).
- [15] H.-R. Schulten u. H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 6, 895 (1972); *Messtechnik* 81, 121 (1973).
- [16] M. D. Migahed, Dissertation, Universität Bonn 1970; M. D. Migahed u. H. D. Beckey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 7, 1 (1971).
- [17] H. D. Beckey, E. Hilt u. H.-R. Schulten, *J. Sci. Instrum.* 6, 1043 (1973).

- [18] D. G. Barofsky u. E. Barofsky, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 14, 3 (1974).
- [19] H. U. Winkler u. H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 7, 1007 (1973).
- [20] H. U. Winkler u. B. Linden, Bonn, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [21] H.-R. Schulten, H. D. Beckey, A. J. H. Boerboom u. H. L. C. Meuzelaar, *Anal. Chem.* 45, 2358 (1973).
- [22] H.-R. Schulten u. H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 7, 861 (1973).
- [23] H.-R. Schulten, H. D. Beckey, G. Eckhardt u. S. H. Doss, *Tetrahedron* 29, 3861 (1973).
- [24] J. N. Damico, R. P. Barron u. J. A. Sphon, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 2, 161 (1969).
- [25] J. N. Damico, R. P. Barron u. J. M. Ruth, *Org. Mass Spectrom.* 1, 331 (1968).
- [26] H.-R. Schulten, Research Conference on Pesticide Metabolites - Enzymology, Isolation and Characterization. Fargo, N. Dak. (USA), Juni 1972.
- [27] H.-R. Schulten u. H. D. Beckey, *J. Agr. Food Chem.* 21, 372 (1973).
- [28] H.-R. Schulten, Research Conference on New Methodology in Ecological Chemistry. Susono City (Japan), Nov. 1973; siehe dazu F. Coulston, F. Korte u. M. Goto: New Methods in Environmental Chemistry and Toxicology. International Academic Printing Co., Tokyo 1973, S. 31 ff.
- [29] J. A. Sphon u. J. N. Damico, *Org. Mass Spectrom.* 3, 51 (1970).
- [30] F. W. Röllgen u. H. D. Beckey, *Surface Sci.* 23, 69 (1970).
- [31] F. W. Röllgen u. H. D. Beckey, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 75, 988 (1971).
- [32] R. W. Röllgen u. H. D. Beckey, *Z. Naturforsch.* 29a, 230 (1974).
- [33] D. E. Games, M. P. Games, A. H. Jackson, A. H. Olavesen, M. Rossiter u. P. J. Winterburn, *Tetrahedron Lett.* 1974, 2377.
- [34] D. E. Games, A. H. Jackson u. M. Rossiter, *Biomed. Mass Spectrom.*, im Druck.
- [35] H.-R. Schulten u. H. D. Beckey, *Advan. Mass Spectrom.* 6, 499 (1974).
- [36] H. M. Fales, G. W. A. Milne, H. U. Winkler, H. D. Beckey, J. N. Damico u. R. Barron, *Anal. Chem.* 47, 207 (1975).
- [37] J. B. Forehand u. W. F. Kuhn, *Anal. Chem.* 42, 1839 (1970).
- [38] H.-R. Schulten, H. D. Beckey, A. J. H. Boerboom u. H. L. C. Meuzelaar, *Anal. Chem.* 45, 191 (1973).
- [39] H.-R. Schulten, H. Prinz, H. D. Beckey, W. Tomberg, W. Klein u. F. Korte, *Chemosphere* 2, 23 (1973).
- [40] D. J. Rouse u. D. A. Brent, *Biomed. Mass Spectrom.* 1, 256 (1974).
- [41] H.-R. Schulten, *J. Agr. Food Chem.*, im Druck.
- [42] K. L. Rinehart, Jr., J. C. Cook, Jr., K. H. Maurer u. U. Rapp, *J. Antibiot.* 27, 1 (1974).
- [43] H. Adlercreutz, B. Soltmann u. M. J. Tikkanen, *J. Steroid Biochem.* 5, 163 (1964).
- [44] H.-R. Schulten, Proc. 2nd International Symposium on Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine. Mailand, Juni 1974, im Druck.
- [45] H. Krone u. H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 2, 427 (1969).
- [46] W. T. Shier, K. L. Rinehart, Jr. u. D. Gottlieb, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 198 (1969).
- [47] H.-R. Schulten u. D. E. Games, *Biomed. Mass Spectrom.* 1, 120 (1974).
- [48] H.-R. Schulten u. H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 9, 1154 (1974).
- [49] W. D. Lehmann, H.-R. Schulten u. H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 7, 1103 (1973).
- [50] A. Bloch in E. J. Ariens: *Medicinal Chemistry*. Academic Press, New York 1973, Bd. 4, S. 286.
- [51] P. Brown, G. R. Pettii u. R. K. Robins, *Org. Mass Spectrom.* 2, 521 (1969).
- [52] M. C. Sammons, M. M. Bursey u. D. A. Brent, *Biomed. Mass Spectrom.* 1, 169 (1974).
- [53] H.-R. Schulten, H. D. Beckey, E. M. Bessel, A. B. Foster, M. Jarman u. J. H. Westwood, *J. C. S. Chem. Comm.* 1973, 416.
- [54] H. U. Winkler u. H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 6, 655 (1972).
- [55] H. D. Beckey, G. Hoffmann, K. H. Maurer u. H. U. Winkler, *Advan. Mass Spectrom.* 5, 626 (1971).
- [56] H. U. Winkler u. H. D. Beckey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 391 (1972).
- [57] S. Asante-Poku, G. W. Wood u. D. E. Schmidt, Jr., *Biomed. Mass Spectrom.*, im Druck.
- [58] H. D. Beckey, H.-R. Schulten u. H. U. Winkler, Proc. 18th Field Emission Symposium. Eindhoven, Aug. 1971, S. 81 ff.
- [59] H.-R. Schulten, *Biomed. Mass Spectrom.* 1, 223 (1974).
- [60] D. A. Brent, P. De Miranda u. H.-R. Schulten, *J. Pharm. Sci.* 63, 1370 (1974).
- [61] M. S. B. Munson u. F. H. Field, *J. Amer. Chem. Soc.* 88, 2621 (1966).
- [62] H. J. Heinen, Ch. Hötzel u. H. D. Beckey, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 13, 55 (1974).
- [63] W. Paul, H. P. Reinhard u. U. v. Zahn, *Z. Phys.* 152, 143 (1958).
- [64] H. H. Gierlich, H. J. Heinen u. H. D. Beckey, *Biomed. Mass Spectrom.*, im Druck.
- [65] H. L. C. Meuzelaar u. P. G. Kistemaker, *Anal. Chem.* 45, 587 (1973); H. L. C. Meuzelaar, M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker u. J. Kistemaker, *ibid.* 45, 1546 (1973).
- [66] H.-R. Schulten in C. G. Heden u. T. Illeni: *New Approaches to the Identification of Microorganisms*. Wiley, New York 1974, S. 117.
- [67] H.-R. Schulten u. H. D. Beckey, *J. Chromatogr.* 83, 315 (1973).
- [68] H. D. Beckey u. H.-R. Schulten, *Z. Anal. Chem.* 273, 345 (1975).
- [69] P. Arpino, M. A. Baldwin u. F. W. McLafferty, *Biomed. Mass Spectrom.* 1, 80 (1974), und dort zit. Lit.
- [70] F. W. Röllgen u. H.-R. Schulten, *Org. Mass Spectrom.*, im Druck.
- [71] H.-R. Schulten u. U. Schurath, *Atmos. Env.*, im Druck.
- [72] H.-R. Schulten u. U. Schurath, *J. Phys. Chem.* 79, 51 (1975).