



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 47 895 B4** 2004.08.26

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **102 47 895.3**
(22) Anmeldetag: **14.10.2002**
(43) Offenlegungstag: **06.05.2004**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **26.08.2004**

(51) Int Cl.7: **H01J 49/40**
H01J 49/02

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

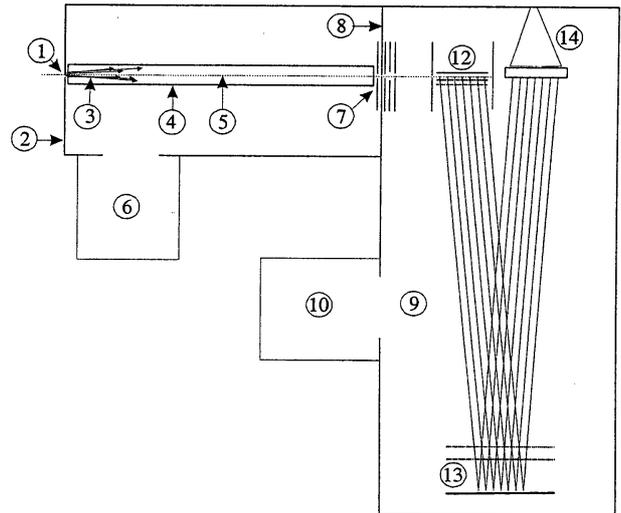
(71) Patentinhaber:
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

(72) Erfinder:
Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 694 25 588 T2
US 63 73 052 B1
US 62 85 027 B1

(54) Bezeichnung: **Hoher Nutzgrad für hochauflösende Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur präzisen Massenbestimmung von Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss, mit einem Pulser, einem Ionendetektor und einer Messeinrichtung für die Ionenströme am Detektor, dadurch gekennzeichnet, dass
(a) die Messeinrichtung die Ionenstromsignale am Detektor ohne Rücksicht auf die Laufzeit der Ionen zyklisch misst und in einen Speicher addiert,
(b) die Ionen im Pulser synchron zu den Messzyklen ausgespült werden,
(c) die Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer der vorausgegangenen Ausspülungen durch ihre jeweilige Breite auf der Massenskala bestimmt wird, und
(d) aus dieser Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer Ausspülung die präzise Flugzeit und aus ihr die präzise spezifische Masse der Ionen bestimmt wird.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Verfahren zur präzisen Massenbestimmung von Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss, mit einem Pulser, einem Ionendetektor und einer Messeinrichtung für die Ionenströme am Detektor gemäß dem Oberbegriff der Patentansprüche 1 bis 4.

Stand der Technik

[0002] Flugzeitmassenspektrometer der genannten Art und ein Verfahren zur präzisen Massenbestimmung von Ionen in einem solchen Flugzeitmassenspektrometer sind aus der US 6,373,052 B1 bekannt.

[0003] Für die massenspektrometrische Messung der Masse großer Moleküle, wie sie insbesondere in der Biochemie vorkommen, eignet sich wegen beschränkter Massenbereiche anderer Massenspektrometer kein anderes Spektrometer besser als ein Flugzeitmassenspektrometer. Flugzeitmassenspektrometer werden häufig durch TOF oder TOF-MS abgekürzt, von englisch "Time-Of-Flight Mass Spectrometer".

[0004] Es haben sich zwei verschiedene Arten von Flugzeitmassenspektrometern entwickelt. Die erste Art umfasst Flugzeitmassenspektrometer für die Messung pulsförmig in einem winzigen Volumen erzeugter und axial in die Flugstrecke hinein beschleunigter Ionen, beispielsweise mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption, abgekürzt MALDI, einer für die Ionisierung großer Moleküle geeigneten Ionisierungsmethode.

[0005] Die zweite Art umfasst Flugzeitmassenspektrometer für den kontinuierlichen Einschuss eines Ionenstrahls, von dem dann ein Abschnitt quer zur Einschussrichtung in einem "Pulser" ausgepulst und als zur Flugrichtung querliegendes, linear ausgedehntes Ionenbündel durch das Massenspektrometer fliegen gelassen wird, wie es in **Abb. 1** als Prinzipbild dargestellt ist. Es wird also ein bandförmiger Ionenstrahl erzeugt, in dem die Ionen einer Art, also eines Verhältnisses von Masse zu Ladung, eine querliegende Front bilden. Diese zweite Art von Flugzeitmassenspektrometern wird kurz als "Orthogonal-Flugzeitmassenspektrometer" (OTOF) bezeichnet; sie wird vorzugsweise in Verbindung mit vakuumexterner Ionisierung verwendet. Die meistverwendete Ionisierungsart hierfür ist das Elektrosprühen (ESI). Das Elektrosprühen ist ebenfalls für die Ionisierung großer Moleküle geeignet. Es können aber auch andere Ionisierungsarten wie beispielsweise chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI), Photoionisierung bei Atmosphärendruck (APPI) oder matrixunterstützte Laserdesorption an Atmosphärendruck (AP-MALDI) eingesetzt werden. Auch vakuum-intern erzeugte Ionen können verwendet werden. Die Ionen können vor Eintritt in das OTOF auch noch in entsprechenden Einrichtungen selektiert und fragmen-

tiert werden, um die Substanzen durch ihre Fragmente besser zu charakterisieren.

[0006] In dieser zweiten Art von Flugzeitmassenspektrometern wird durch eine sehr hohe Zahl an Pulsvorgängen pro Zeiteinheit (bis zu 20000 Pulsungen pro Sekunde) eine hohe Zahl an Spektren mit jeweils relativ geringer Anzahl an Ionen erzeugt, um die Ionen des kontinuierlichen Ionenstrahls möglichst gut auszunutzen.

[0007] Für die Aufnahme der Ionenströme in diesen Orthogonal-Flugzeitspektrometern werden so genannte Kanalplatten-Sekundärelektronenvervielfacher eingesetzt, deren durch die Ionen ausgelösten Einzelpulse in den meisten der heute kommerziell erhältlichen Geräte durch Ereigniszähler mit Digitalisierung der Ereigniszeit (TDC = time to digital converter) registriert werden. Diese Technik hat aber pro Einzelspektrum einen nur sehr geringen dynamischen Messbereich der Größe 1, dieser kann nur durch eine hohe Anzahl addierter Einzelspektren erhöht werden. Der dynamische Messbereich ist definiert als Quotient aus dem höchsten, an der Sättigungsgrenze noch gerade unverzerrt aufgenommenen Ionensignal zum kleinsten, sich aus dem Untergrundrauschen mit genügender Sicherheit heraushebenden Signal. Wegen des beschränkten dynamischen Messbereichs der TDC-Technik werden daher in Neuentwicklungen inzwischen schnelle Transientenrekorder eingesetzt. Die schnellen Transientenrekorder digitalisieren die verstärkten Ionenströme in einem Takt von ein bis vier Gigahertz in Analog-zu-Digital-Wandlern mit einer Signalauflösung von maximal acht bit. Damit hat das Einzelspektrum bereits einen dynamischen Messbereich von etwa zwei Zehnerpotenzen; es werden dabei ebenfalls sehr viele Einzelspektren aufaddiert, um zu höherem dynamischen Messbereich zu kommen.

[0008] Wenn man einen TDC benutzt, erhält man in einer Sekunde bei 20 000 Pulsungen pro Sekunde ein Spektrum mit einem dynamischen Messbereich von 20 000. Verwendet man dagegen einen ADC mit einem dynamischen Messbereich von 50, so steigt der dynamische Messbereich auf etwa 1 000 000. Die Verwendung von ADCs setzt aber durch die Signalverschmierung der Elektronenlawine in der Kanalplatte die Massenauflösung leicht herab, zumal, wenn durch gute Fokussierungen eine Ionenstromsignalfrequenz von nur etwa zwei Nanosekunden erzielt wird.

[0009] Die Verwendung von ADCs in Flugzeitmassenspektrometern mit orthogonalem Ioneneinschuss ist dabei keineswegs neu, sondern bereits in DE 694 25 588 T2 (EP 0 746 403 B1; PCT/US94/06892) beschrieben, wobei in dieser Patentschrift besondere Verfahren und Einrichtungen zur Begrenzung der Ionenmessung auf die Ionensignalgruppen beansprucht werden, um Speicherplatz und insbesondere Auslesezeit der so aufgenommenen Summenspektren zu sparen.

[0010] Wie in allen Massenspektrometern kann

man in einem Flugzeitmassenspektrometer immer nur das Verhältnis aus Masse m des Ions zur Anzahl z von Elementarladungen bestimmen, die das Ion trägt. Wenn im Folgenden von „spezifischer Masse“ oder kurz einfach nur von „Masse“ gesprochen wird, so ist damit immer das Verhältnis m/z gemeint. Soll mit „Masse“ im Folgenden ausnahmsweise die physikalische Dimension der Masse verstanden werden, so wird eigens von Molekularmasse gesprochen. Die Einheit der Molekularmasse m ist die vereinheitlichte atomare Masseneinheit, abgekürzt u , meist einfach als „Masseneinheit“ oder „atomare Masseneinheit“ bezeichnet. In der Biochemie und Molekularbiologie wird häufig die eigentlich veraltete Einheit Dalton („Da“) verwendet. Die Einheit der spezifischen Masse m/z ist „Masseneinheit pro Elementarladung“ oder „Dalton pro Elementarladung“.

[0011] Durch Elektrosprühen werden Ionen gebildet, deren spezifische Masse m/z den Wert von etwa 5000 atomaren Masseneinheiten pro Elementarladung kaum je übersteigt. Das bedeutet nicht, dass nur Ionen von Molekülen einer Molekularmasse von maximal 5000 Masseneinheiten ionisiert werden können; Moleküle größerer Molekularmasse werden nur entsprechend häufiger geladen, so dass ihre spezifische Masse m/z in diesen Bereich fällt. Ionen eines Moleküls mit 50 Kilodalton haben eine breite Ladungsverteilung z von etwa 10 bis 50 elementaren Ladungen.

[0012] Wie in **Abb. 1** dargestellt, werden die Ionen im Pulser quer zu ihrer Einschussrichtung, der x -Richtung, beschleunigt und verlassen den Pulser durch Schlitze in Schlitzenblenden. Die Beschleunigungsrichtung nennen wir die y -Richtung. Die Ionen haben nach ihrer Beschleunigung jedoch eine Richtung, die zwischen der y -Richtung und der x -Richtung liegt, da sie ihre ursprüngliche Geschwindigkeit in x -Richtung ungestört beibehalten. Der Winkel zur y -Richtung beträgt $\alpha = \arctan$

$$\sqrt{(E_x/E_y)}$$

, wenn E_x die kinetische Energie der Ionen im Primärstrahl in x -Richtung und E_y die Energie der Ionen nach Beschleunigung in y -Richtung ist. Die Richtung, in der die Ionen nach dem Auspulsen fliegen, ist unabhängig von der Masse der Ionen.

[0013] Die Ionen, die den Pulser verlassen haben, bilden jetzt ein breites Band, wobei sich Ionen einer Sorte (einer spezifischen Masse m/z) jeweils in einer Front befinden, die die Breite des Strahles im Pulser hat. Leichte Ionen fliegen schneller, schwere langsamer, jedoch alle in gleicher Richtung, abgesehen von eventuell auftretenden leichten Richtungsunterschieden, die von leicht unterschiedlichen kinetischen Energien E_x der Ionen beim Einschuss in den Pulser herrühren können. Die feldfreie Flugstrecke muß ganz vom Beschleunigungspotential umgeben sein, um die Ionen in ihrem Flug nicht zu stören.

[0014] Die Ionen gleicher spezifischer Masse, die sich in verschiedenen Orten des Strahlquerschnitts

befinden und daher verschiedene Wegstrecken bis zum Detektor vor sich haben, können in Bezug auf ihre verschiedenen Startorte zeitfokussiert werden, indem beim Einschalten der Auspulsspannung das Feld im Pulser gerade so gewählt wird, dass die am weitesten entfernten Ionen eine etwas höhere Beschleunigungsenergie mitbekommen, die sie befähigt, die vorausfliegenden Ionen in einem Startortfokuspunkt wieder einzuholen. Die Lage des Startortfokuspunkts ist durch die Auspulsfeldstärke im Pulser frei wählbar.

[0015] Zur Erzielung eines hohen Auflösungsvermögens wird das Massenspektrometer mit einem energiefokussierenden Reflektor ausgestattet, der den ausgepulsten Ionenstrahl in seiner ganzen Breite zum Ionendetektor hin reflektiert und dabei Ionen gleicher Masse, jedoch leicht verschiedener kinetischer Anfangsenergie in y -Richtung genau auf den breitflächigen Detektor zeitfokussiert. Es können auch mehrere Reflektoren verwendet werden.

[0016] Die Ionen fliegen aus dem (letzten) Reflektor auf einen Detektor zu, der ebenso breit sein muss wie der Ionenstrahl, um alle ankommenden Ionen messen zu können. Auch der Detektor muss parallel zur x -Richtung ausgerichtet sein, wie in **Abb. 1** wiedergegeben, um die Front der fliegenden Ionen einer Masse auch zeitgleich zu detektieren.

[0017] In den Pulser wird normalerweise ein kontinuierlicher Ionenstrom in Form eines feinen Ionenstrahls in x -Richtung eingeschossen. Die Ionengeschwindigkeit in x -Richtung wird in der Folge trotz der dazu senkrechten Ablenkung nicht verändert. Nach der seitlichen Ablenkung in y -Richtung und der Reflektion im Reflektor erreichen die Ionen den Detektor also in der gleichen Zeit, die sie benötigt hätten, ohne die seitliche Ablenkung im Pulser durch einen Geradeausflug den Detektor zu erreichen (sie würden dann allerdings nicht auf den Detektor auftreffen, da sie parallel zu seiner Oberfläche fliegen).

[0018] Die neuerliche Füllung des Pulsers nach seiner Leerung beginnt sofort, wenn die Ionen den Pulser verlassen haben. Sind die Ionen der schwersten Masse so weit geflogen, dass sie am Detektor angekommen wären, wenn der Durchgang zum Detektor frei wäre, so ist nicht nur der Pulser wieder mit den schwersten Ionen gefüllt, sondern es würde auch der Zwischenraum zwischen Pulser und Detektor mit Ionen gefüllt sein. Es können aber nur diejenigen Ionen nachgewiesen werden, die sich zu diesem Zeitpunkt des nächsten Auspulsens im Pulser befinden. Die Ionen im Zwischenraum zwischen Pulser und Detektor sind für die Analyse verloren. Man sieht hieran, dass es für eine hohe Ausnutzung des Ionenstrahls notwendig ist, die Geometrie des Flugzeitmassenspektrometers so zu wählen, dass sich bei paralleler Anordnung von Reflektor und Detektor zum Pulser der Detektor möglichst nahe am Pulser befindet.

[0019] Das Auflösungsvermögen R und die Massengenauigkeit eines Flugzeitmassenspektrometers sind proportional zur Fluglänge. Man kann also das

Auflösungsvermögen erhöhen, indem man ein sehr langes Flugrohr wählt oder Mehrfachreflektionen durch mehrere Reflektoren einführt. Beispielsweise kann man mit einer Flugstrecke von anderthalb Metern eine Massenauflösung von etwa $R = m/\Delta m = 10000$, mit etwa sechs Metern eine Massenauflösung von $R = m/\Delta m = 40000$ erreichen (d m ist dabei die Linienbreite des Ionensignals in halber Maximalhöhe, gemessen in Masseneinheiten). Eine lange Fluglänge bedeutet aber, dass man bei gleicher Beschleunigungsspannung den Pulsertakt erniedrigen muss, um alle Ionen zum Detektor gelangen zu lassen, bevor die nächste Pulsung stattfindet. Das bedeutet aber wiederum, dass man nur wenige Ionen des Ionenstroms für die Messung ausnutzt.

[0020] Eine bekannte Lösung für einen hohen Nutzgrad an Ionen bei hohem Auflösungsvermögen durch eine lange Flugstrecke ist die Zwischenspeicherung der Ionen in einer speichernden Ionenleiteinrichtung, beispielsweise einem Ionenführungsexapod. Eine Zwischenspeicherung in einem Quadrupol, das auch für Selektierungen und Fragmentierungen verwendet werden kann, ist in US 6,285,027 B1 (I. Chernushevich und B. Thomson) beschrieben. Die Ionen können hier durch bekannte Maßnahmen gespeichert und dann bei Bedarf zur Füllung des Pulsers ausgetrieben werden. Diese Lösung hat aber den Nachteil, dass der dynamische Messbereich wegen der Sättigungsgrenze des Detektors einerseits und der herabgesetzten Spektrenaufnahmefrequenz andererseits stark eingeschränkt wird. Man kann nur soviel Ionen sammeln, wie durch die Sättigungsgrenze vorgegeben ist. Die heute verwendeten schnellen Transientenrekorder mit einem, zwei oder vier Gigahertz haben einen Analog-zu-Digital-Wandler von nur acht bit Signalauflösung, also 256 Zählheiten, wobei bei hoher Datendigitalisierungsrate die Signalauflösung bereits auf 5 bis 7 bit eingeschränkt ist. Der dynamische Messbereich des Einzelspektrums ist also nur in der Größenordnung von etwa 50, zumal die einzelnen Ionen bereits einige Zählheiten erreichen müssen, um aus dem Rauschen erkannt zu werden. Die Sättigungsgrenze darf in keinem der Einzelspektren überschritten werden. Eine hoher dynamischer Messbereich kann somit nur über die Addition einer großen Anzahl von Spektren erreicht werden. Beispielsweise sind für einen anzustrebenden dynamischen Messbereich von 100 000, wie sie von anderen Arten der Massenspektrometrie leicht geliefert wird, mindestens 2000 Spektren zu addieren. Wird aber für die lange Flugstrecke die Anzahl von Spektren pro Zeiteinheit vermindert, so vermindert sich der dynamische Messbereich in gleicher Weise. Werden statt des hier erwähnten Analog-zu-Digital-Wandlers (ADC) nur so genannte Ereigniszeit-zu-Digital-Wandler (TDC) benutzt, wie bei den derzeitigen kommerziellen OTOFs üblich, so gehen weitere ein bis zwei Zehnerpotenzen an dynamischem Messbereich verloren, die über eine höhere Zahl an Spektrenadditionen wettgemacht werden müssen.

[0021] Es besteht also ein bisher unauflösbares Dilemma: Eine höhere Massenauflösung durch eine lange Flugstrecke bedeutet für ein OTOF herkömmlicher Technik auch immer eine geringere Empfindlichkeit oder einen geringeren dynamischen Messbereich.

Aufgabenstellung

[0022] Es ist die Aufgabe der Erfindung, bei einem hohen Auflösungsvermögen gleichzeitig eine hohe Ausnutzung der Ionen des Ionenstrahls und einen hohen dynamischen Messbereich zu erzielen.

[0023] Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen 1 bis 4 angegebenen Maßnahmen gelöst.

[0024] Es ist die Grundidee der Erfindung, die Messeinrichtung (also den TDC einschließlich seiner Steuerelektronik und seinem Digital Speicher oder den Transientenrekorder mit seinem ADC und seinem Speicher) eines hochauflösenden Flugzeitmassenspektrometers mit orthogonalem Ioneneinschuss ohne jede Pause laufen zu lassen, eine addierende Einspeicherung der Messwerte ohne Rücksicht auf die Flugzeit der Ionen zyklisch mit einer hohen Zyklusfrequenz in einen Abschnitt des Speichers vorzunehmen, bei jedem Zyklusbeginn den Ionenstrom synchron auszupulsen (das Spektrum der Ionen somit über mehrere Messzyklen hinweg zu verteilen und aufzunehmen), und die Zugehörigkeit der Ionen zu einem bestimmten Startpuls (zu „ihrem“ Startpuls) durch die Form der Ionensignale, insbesondere ihre Breite, durch die Form einer Ionensignalgruppe, die durch die Isotopie erzeugt wird, durch eine Geschwindigkeitsanalyse der Ionen, oder zusätzlich durch das Muster der mehrfach geladenen Ionen zu bestimmen. Mit dem Wissen der Zugehörigkeit zum n -ten Messzyklus nach dem Startpuls ist die exakte Flugzeit berechenbar, und aus der Flugzeit kann die exakte spezifische Masse m/z ermittelt werden.

[0025] Die Grundidee ist in den Ansprüchen 1 bis 4 näher dargelegt.

[0026] Zur Vermeidung eines Jitters ist es zweckmäßig, den Pulser durch die Messeinrichtung exakt synchron zu den Einspeicherzyklen steuern zu lassen.

[0027] Die Breite der Ionensignale, gemessen als Flugzeitbreite Δt in halber Höhe des Signals, steigt theoretisch linear mit der Flugzeit an: $\Delta t = t/2R$, wobei R die theoretisch über das Spektrum konstante Massenauflösung $R = m/\Delta m$ ist. In der Praxis kommt jedoch (in pythagoräischer Addition) noch ein konstanter Zeitbetrag hinzu, der von einer Verbreiterung des Signals durch den Detektor stammt, und der sich besonders bei leichten und daher schnellen Ionen bemerkbar macht. Wie in **Abb. 2** zu sehen, gibt es eine eindeutige Beziehung zwischen der Signalbreite und der spezifischen Masse, die zur groben Bestimmung der Masse verwendet werden kann. Die Signalbreite Δt kann für solche Signale, die gut aus dem Unter-

grundrauschen herausragen, auf etwa 5% (und besser) bestimmt werden; damit kann sehr einfach bestimmt werden, ob ein Ion im ersten, zweiten, dritten oder einem noch höheren Messzyklus nach dem Startpuls den Detektor erreicht hat. Daraus wiederum ergibt sich die genaue Flugzeit und damit wieder die präzise spezifische Masse des Ions.

[0028] Es gibt aber noch weitere Wege, die ungefähre Masse zu bestimmen. Einer dieser Wege führt über die Isotopie der Ionen. Für organische Ionen, die keine Halogene enthalten (beispielsweise alle gängigen Biomoleküle), ist die Verteilung auf die verschiedenen Isotopenmassen eines Moleküls praktisch nur durch die Isotopie des Kohlenstoffs gegeben.

Abb. 3 zeigt die Isotopenverteilungen für einfach geladene organische Ionen am Ende des ersten, des zweiten, des dritten, des vierten und des fünften Messzyklus. Es wurde hierbei angenommen, dass die Enden der Messzyklen durch die Massen 200, 800, 1800, 3200 und 5000 Dalton gegeben sind. Diese Zahlen spiegeln die quadratische Abhängigkeit der Masse von der Flugzeit wieder: es handelt sich um einmal, viermal, neunmal, sechzehnmal und fünfundzwanzigmal 200 Dalton.

[0029] Aus dem Isotopenverteilungsmuster einer Liniengruppe lässt sich also nach Regeln, die dem Fachmann bekannt sind, ebenfalls grob die Molekularmasse der Ionen bestimmen. Das Muster kann aber zu einfach oder mehrfach geladenen Ionen gehören; es muss also noch die Ladung der Ionen bestimmt werden, um zu der spezifischen Masse der Ionen zu gelangen. Die Ladung lässt sich aber aus dem Abstand der Linien innerhalb der Liniengruppe ermitteln: Entspricht der Abstand einer vollen Masseneinheit, so handelt es sich um einfach geladene Ionen; entspricht er einer halben Masse, so handelt es sich um doppelt geladene Ionen, und so weiter. Für sehr hohe Ladungszustände, wie sie durch Elektrosprüh-Ionisierung sehr schwerer Analytmoleküle auftreten, muss eine sehr hohe Massenauflösung vorliegen, damit diese Isotopenlinien voneinander getrennt sind; es ist aber diese Endung gerade für Flugzeit-spektrometer sehr hoher Massenauflösung zugeschnitten.

[0030] Aber auch für Ionen sehr schwerer Molekularmassen, die ein Profil der Isotopengruppe ohne Isotopenauflösung zeigen, kann man aus der Breite des Gruppensignals sehr grob auf die spezifische Masse schließen, wie durch **Abb. 4** illustriert. Diese Grobbestimmung der Masse kann durch eine Analyse der Gruppen verschiedener Ladungszustände noch erhärtet werden, da für sehr schwere Moleküle immer eine breite Verteilung der Ionen vieler Ladungszustände z , $z+1$, $z+2$, $z+3$ und so weiter vorliegt. Die Analyse des Spektrums auf Ionensignale hin, die (bis auf ihre verschiedenen Protonierung) gleiche spezifische Masse, aber verschiedene Ionenladung haben, ist eine zusätzliche, bereits viel feinere Absicherung der Grobbestimmung der spezifischen Masse.

[0031] Eine weitere Möglichkeit zur groben Bestimmung der spezifischen Masse der Ionen besteht in einer Geschwindigkeitsanalyse der am Detektor ankommenden Ionen, beispielsweise, indem der Detektor nur einen Teil der Ionen vom Ionenstrahl abgreift und der restliche Teil der Ionen in einem zweiten, in der Fluglänge versetzten Detektor gemessen wird. Ein Vergleich der Spektren beider Detektoren ergibt die Geschwindigkeit der jeweiligen Ionen, und daraus lässt sich sofort die grobe spezifische Masse bestimmen. Die Höchstauflösung braucht dabei nur für einen der beiden Detektoren eingestellt sein.

[0032] Aus der Grobbestimmung der Masse ergibt sich jeweils, im wievielten Zyklus nach dem Start der Ionen diese den Detektor erreicht haben. Daraus kann die präzise Flugzeit und damit die präzise Masse bestimmt werden.

[0033] Bei Überlappungen von zwei oder mehr isotopenaufgelösten Signalgruppen kann man durch mathematische Methoden eine Auflösung der Überlappung vornehmen; doch hat diese Methode ihre Grenzen. Die Erfindung ist besonders auf eine hohe Massenauflösung im Spektrum zugeschnitten, bei der nur relativ wenige Überlappungen von Signalen auftreten. Die Erfindung setzt zur Vermeidung von zu vielen Überlappungen auch verhältnismäßig „saubere“ Spektren voraus, also Spektren aus Ionen nur mäßig vielen gleichzeitig vorhandener Substanzen. Die Erfindung ist somit ideal geeignet für hochauflösende Spektrenaufnahmen von Substanzen, die durch vorgeschaltete Trennverfahren getrennt wurden, beispielsweise durch Flüssigkeitschromatographie oder Kapillarelektrophorese.

Ausführungsbeispiel

[0034] **Abb. 1** zeigt ein Prinzipschema eines Flugzeitmassenspektrometers mit orthogonalem Ionen-einschuss. Durch eine Öffnung (1) einer Vakuumkammer (2) tritt ein Bündel (3) von Ionen verschiedener Anfangsenergien und Anfangsrichtungen in ein Ionenleitsystem (4) ein, das sich in einer gasdichten Hülle befindet. Gleichzeitig tritt auch Dämpfungsgas mit in das Ionenleitsystem ein. Im Gas werden die eintretenden Ionen durch Stöße abgebremst. Da im Ionenleitsystem ein Pseudopotential für die Ionen herrscht, das in der Achse (5) am geringsten ist, sammeln sich die Ionen in der Achse (5). Die Ionen breiten sich in der Achse (5) bis zum Ende des Ionenleitsystems (4) aus. Das Gas aus dem Ionenleitsystem wird durch die Vakuumpumpe (6) an der Vakuumkammer (2) abgepumpt.

[0035] Am Ende des Ionenleitsystems (4) befindet sich das Ziehliniensystem (7). Eine Lochblende dieses Ziehliniensystems ist in die Wand (8) zwischen Vakuumkammer (2) für das Ionenleitsystem (4) und Vakuumkammer (9) für das Flugzeitmassenspektrometer integriert. Letztere wird durch eine Vakuumpumpe (10) bepumpt. Das Ziehliniensystem (7) be-

steht in diesem Prinzipbild aus fünf Lochblenden; es zieht die Ionen aus dem Ionenleitsystem (4) heraus und formt einen feinen Ionenstrahl mit geringem Phasenvolumen, der in den Pulser (12) fokussiert wird. Der Ionenstrahl wird in x-Richtung in den Pulser eingeschossen. Ist der Pulser mit durchfliegenden Ionen der bevorzugt untersuchten Masse gefüllt, so treibt ein kurzer Spannungspuls ein breites Paket an Ionen quer zur bisherigen Flugrichtung in y-Richtung aus und bildet einen breiten Ionenstrahl, der in einem Reflektor (13) reflektiert und von einem Ionendetektor (14) zeitlich hochaufgelöst gemessen wird. Im Ionendetektor (14) wird das Ionensignal, das in einem Sekundärelektronenverstärker in Form einer doppelten Vielkanalplatte verstärkt wird, kapazitiv auf einen 50- Ω -Konus übertragen. Das so bereits verstärkte Signal wird über ein 50- Ω -Kabel an einen Verstärker weitergegeben. Der 50- Ω -Konus dient dazu, das Kabel eingangsseitig abzuschließen, so dass hier keine Signalreflexionen stattfinden können.

[0036] Reflektor (13) und Detektor (14) sind in diesem Prinzipbild exakt parallel zur x-Richtung der in den Pulser eingeschossenen Ionen ausgerichtet. Der Abstand zwischen Detektor (14) und Pulser (12) bestimmt den maximalen Ausnutzungsgrad für Ionen aus dem feinen Ionenstrahl.

[0037] **Abb. 2** zeigt die Zunahme der Linienbreiten für Ionensignale, die im ersten Messzyklus oder nach einmaligem, zweimaligem oder n-maligem Durchlaufen der Messzykluszeit im darauffolgenden Messzyklus gemessen werden. Die Linienbreiten Δt sind in halber Maximalhöhe der Ionenstromsignale zu messen und hier für eine Auflösung von $R = 20\,000$ in Nanosekunden dargestellt. Aus diesem Diagramm kann aus der gemessenen Linienbreite sofort bestimmt werden, wieviele Messzyklen das Ion im Flugzeitmassenspektrometer bereits unterwegs ist. Aus dieser Kenntnis kann dann sofort die präzise Flugzeit seit zugehörigem Startpuls, und aus dieser die präzise Masse der Ionen bestimmt werden.

[0038] **Abb. 3** zeigt die Isotopenmuster von einfach geladenen bioorganischen Ionen am Ende des ersten, zweiten, oder n-ten Messzyklus. Es ist hier die Fluglänge des Spektrometers so lang gewählt worden, dass am Ende des ersten Messzyklus die Ionen der spezifischen Masse **200** atomare Masseneinheiten pro Elementarladung den Detektor erreichen. Am Ende des zweiten Messzyklus kommen dann Ionen der Masse 800 Masseneinheiten an; nach dem dritten Messzyklus Ionen der Masse 1800 Masseneinheiten, dann Ionen der Masse 3200 Masseneinheiten und schließlich nach dem fünften Messzyklus Ionen der Masse 5000 Masseneinheiten pro Elementarladung. Aus diesen Isotopenmustern lässt sich sofort die ungefähre Molekularmasse bestimmen. Für mehrfach geladene Ionen, also Ionen einer anderen spezifischen Masse, tritt natürlich das gleiche Isotopenmuster auf. Es muss daher zur Bestimmung der spezifischen Masse auch der Abstand der Signallinien innerhalb der Isotopengruppe hinzugezogen wer-

den.

[0039] **Abb. 4** zeigt die Verbreiterung der Isotopengruppe mit steigender Molekularmasse. Bei vielfacher Ladung dieser Isotopengruppe nimmt auch die Breite dieser Isotopengruppe entsprechend ab; die Breite ist also ein direktes Maß für die spezifische Masse der Ionen. Man kann für die Breite der Isotopengruppen eine analoge Kalibrierkurve aufstellen zu der in **Abb. 2** gezeigten Kalibrierkurve für Einzel-signalbreiten. Diese Grobbestimmung der Masse ist aber sehr unsicher und bedarf der Absicherung.

[0040] Wie oben beschrieben, ist es die Grundidee der Erfindung, die Messeinrichtung eines Flugzeitmassenspektrometers mit orthogonalem Ioneneinschuss ohne Rücksicht auf die Flugzeit der Ionen zyklisch in einer hohen Zyklusfrequenz laufen zu lassen, den Ionenstrom synchron zu den Messzyklen auszupulsen, und die Zugehörigkeit der Ionen zu „ihrem“ Startpuls durch die Form der Ionenstromsignale, die Form einer Ionenstromsignalgruppe oder die Geschwindigkeit der Ionen zu bestimmen. Mit dem Wissen der Zugehörigkeit zum n-ten Messzyklus nach dem Startpuls ist die exakte Flugzeit berechenbar, und aus der Flugzeit kann die exakte spezifische Masse m/z ermittelt werden.

[0041] Da die Messeinrichtung ihre eigene Steuereuhr besitzt, ist es zur Vermeidung eines Jitters zweckmäßig, den Pulser exakt synchron zu den Messzyklen durch die Messeinrichtung selbst steuern zu lassen, und nicht eine externe Uhr zur Steuerung der Messeinrichtung und des Pulsers zu verwenden.

[0042] Die Erfindung ist besonders wirksam, wenn es sich um hoch- bis höchstauflösende Flugzeitmassenspektrometrie handelt, weil dann die Ionensignale schmal und weit voneinander entfernt sind. Überlappungen von Ionensignalen kommen kaum vor, zumal, wenn eine Substanztrennung wie beispielsweise Flüssigkeitschromatographie oder Kapillarelektrophorese vorgeschaltet sind.

[0043] In der Regel wird eine vorbestimmte, hohe Anzahl von Messzyklen durchlaufen, beispielsweise, bis eine Zeit von einer Zehntel Sekunde abgelaufen ist. So erhält man zehn Summenspektren pro Sekunde, die bei einer Messzyklusrate von 20 Kilohertz jeweils 2000 Einzelspektren umfassen. Die Messwerte der Zyklen werden addierend gespeichert, und die Bestimmung der Form der Ionenstromsignale oder der Ionenstromsignalgruppe, also der Isotopengruppe, wird an dem so erlangten Summenspektrum durchgeführt. Der dynamische Messbereich beträgt in jedem Summenspektrum etwa 100 000.

[0044] Am einfachsten ist die Bestimmung der ungefähren spezifischen Masse für ein Ionenstromsignal aus der Halbwertsbreite Δt dieses Ionenstromsignals. Wie in **Abb. 2** gezeigt, gibt es eine eindeutige Beziehung zwischen der Signalbreite und der spezifischen Masse, die in sehr einfacher Weise zur gegebenen Bestimmung der Masse verwendet werden kann. Die Signalbreite Δt kann für solche Signale, die gut aus dem Untergrund rauschen herausragen, auf etwa 5%

(und besser) bestimmt werden. Es kann so sehr einfach bestimmt werden, ob eine Ionensorte im ersten, zweiten, dritten oder einem noch höheren Messzyklus nach dem Startpuls den Detektor erreicht hat. Daraus wiederum ergibt sich die genaue Flugzeit und damit wieder die präzise spezifische Masse der Ionensorte.

[0045] So kann beispielsweise bei sechs Meter Fluglänge, die sich entweder durch ein langes Flugrohr oder durch mehrfache Reflektionen, aber auch durch teils kreisförmige Bahnen erzeugen lässt, und einer Beschleunigungsspannung von zehn Kilovolt eine Auflösung von etwa $R = 40\,000$ erhalten werden. Ionen der spezifischen Masse 200 Dalton pro Elementarladung erreichen nach 64 Mikrosekunden den Ionendetektor. Wird ein Transientenrekorder mit vier Gigahertz Wandlungsrate verwendet, so entspricht das gerade $2^{18} \approx 256\,000$ Messwerten in 64 Mikrosekunden. Zyklische Speicherungen lassen sich besonders gut mit Speicheradressabschnitten einrichten, die vollen Zweierpotenzen entsprechen. Es kann hier also besonders gut ein erfindungsgemäßer Messzyklus von 64 Mikrosekunden mit 2^{18} Speicherzellen eingerichtet werden. Die theoretische Signalhalbwertsbreite für das Ionensignal der spezifischen Masse 200 Dalton pro Elementarladung beträgt dann $\Delta t = 0,8$ Nanosekunden; die Linienbreite ist aber wegen der additiven Detektorzeit größer, wie in **Abb. 2** dargestellt. Die Zyklusfrequenz beträgt dann 15,625 Kilohertz. Ein Summenspektrum von einem Zehntel Sekunden Aufnahmedauer enthält dann 1562 Einzelspektren in ebenso vielen Messzyklen, obwohl sich die Spektren jeweils über mehrere Zyklen hinziehen. Wird für ein Einzelspektrum ein dynamischer Messbereich von 60 angenommen, so ergibt sich insgesamt eine Messdynamik von etwa 10^5 für ein Spektrum mit einem Zehntel Sekunde Aufnahmedauer, ein sehr guter Wert.

[0046] Als anderes Beispiel kann man auch ein Massenspektrometer mit vier Meter Flugstrecke, einem Transientenrekorder von zwei Gigahertz, einer Beschleunigungsspannung von 18 Kilovolt und einem Aufnahmezyklus von 31,25 Kilohertz betreiben. Das Spektrum besteht dann nur aus $2^{16} \approx 64\,000$ Messwerten. Der dynamische Messumfang ist hier noch höher, die Massenauflösung dagegen geringer.

[0047] Die Isotopie der organischen Moleküle bildet einen zweiten Weg, die ungefähre Masse zu bestimmen. Wenn organische Ionen keine Halogene enthalten, wie es beispielsweise für alle gängigen Biomoleküle der Fall ist, ist die Verteilung auf die verschiedenen Isotopenmassen eines Moleküls praktisch nur durch die Isotopie des Kohlenstoffs gegeben. Die Isotopie des Kohlenstoffs bildet charakteristische Isotopenmuster für große organische Moleküle, aus denen die Molekülmasse grob bestimmt werden kann.

[0048] **Abb. 3** zeigt die Isotopenverteilungen für einfach geladene Ionen, deren Masse eine Flugzeit jeweils so ergibt, dass sie am Ende des ersten, des zweiten, des dritten, des vierten und des fünften

Messzyklus am Ionendetektor ankommen. Die Fluglänge des Spektrometers wurde dabei so gewählt, dass am Ende des ersten Messzyklus einfach geladene Ionen der Masse 200 Dalton am Detektor ankommen. An den Enden der nächsten Messzyklen kommen dann einfach geladene Ionen der Massen 800, 1800, 3200 und 5000 Dalton am Detektor an. Diese Zahlen kommen durch die quadratische Abhängigkeit der Masse von der Flugzeit zustande: es handelt sich dabei um viermal, neunmal, sechszehnmal und fünfundsiebzigmal 200 Dalton.

[0049] Aus dem gemessenen Isotopenverteilungsmuster einer Liniengruppe lässt sich also ebenfalls grob die Molekülmasse der Ionen bestimmen.

[0050] Das Muster kann aber zu einfach oder mehrfach geladenen Ionen gehören; es muss also noch die Ladung der Ionen bestimmt werden, um zu der spezifischen Masse der Ionen zu gelangen. Die Ladung lässt sich aber aus dem Abstand der Linien innerhalb der Liniengruppe ermitteln:

Entspricht der Abstand einer vollen Masseneinheit, so handelt es sich um einfach geladene Ionen; entspricht er einer halben Masse, so handelt es sich um doppelt geladene Ionen, und so weiter.

[0051] Neben der Einzelsignalanalyse und der Isotopengruppensignalanalyse gibt es eine dritte Möglichkeit zur groben Bestimmung der spezifischen Masse der Ionen durch eine Geschwindigkeitsanalyse der am Detektor ankommenden Ionen. Diese kann beispielsweise an den Spektren eines Doppeldetektors vorgenommen werden. Greift ein Detektor nur einen Teil der Ionen vom Ionenstrahl ab und wird der restliche Teil der Ionen in einem zweiten, in der Fluglänge versetzten Detektor gemessen, so kann aus einem Vergleich der Spektren beider Detektoren die Geschwindigkeit der jeweiligen Ionen bestimmt werden. Aus der Geschwindigkeit lässt sich die spezifische Masse genügend gut abschätzen, um eine Zuordnung der Ionen zu einer vorhergehenden Auspulsung vornehmen zu können. Die Höchstauflösung braucht dabei nur für einen der beiden Detektoren eingestellt werden.

[0052] Da durch Elektrosprühen kaum Ionen einer größeren spezifischen Masse als 5000 Dalton pro Elementarladung gebildet werden, ist eine Kalibrierung der Ionenstromsignalbreiten über die in **Abb. 3** hinaus gezeigten Bereiche kaum notwendig, jedoch leicht herzustellen.

[0053] Für hohe Ladungszustände, wie sie durch Elektrosprüh-Ionisierung schwerer Analytmoleküle auftreten, sollte eine sehr hohe Massenauflösung vorliegen, damit diese Isotopenlinien auch voneinander getrennt sind; es ist aber diese Erfindung gerade für Flugzeitspektrometer sehr hoher Massenauflösung zugeschnitten.

[0054] Aber auch für Ionen mit sehr schweren Molekülmassen, die ein Profil der Isotopengruppe ohne Isotopenauflösung zeigen, kann man aus der Breite des Signals sehr grob auf die spezifische Masse schließen, wie aus **Abb. 4** zu ersehen ist. Eine so

grob bestimmte Masse kann durch eine Analyse der Gruppen verschiedener Ladungszustände noch erhärtet werden, da für sehr schwere Moleküle immer eine breite Verteilung der Ionen vieler Ladungszustände vorliegt. Die Verwendung der Muster verschiedener Ladungszustände unter Berücksichtigung der steigenden Anzahlen an Protonen mit höheren Ladungszuständen für die Bestimmung der Masse ist dem Fachmann bekannt.

[0055] Bei Überlappungen von Signalgruppen kann man durch mathematische Methoden eine Auflösung der Überlappung vornehmen; doch hat diese Methode ihre Grenzen. Die Erfindung ist besonders auf eine hohe Massenauflösung im Spektrum zugeschnitten, bei der nur relativ wenige Überlappungen von Signalen auftreten. Die Erfindung setzt zur Vermeidung von zu vielen Überlappungen auch verhältnismäßig „saubere“ Spektren voraus, also Spektren aus Ionen nur relativ wenigen gleichzeitig vorhandener Substanzen. Die Erfindung ist somit ideal geeignet für hochauflösende Spektrenaufnahmen von Substanzen, die durch vorgeschaltete Trennverfahren getrennt wurden, beispielsweise durch Flüssigkeitschromatographie oder Kapillarelektrophorese.

[0056] Die zyklische Aufnahme nach dieser Erfindung setzt voraus, dass vom Pulser keine Störsignale auf den Detektor überkoppeln. Das ist in der Praxis schwierig zu erreichen und für Spektrometer nach bisheriger Betriebsweise auch ohne großen Belang, wenn nicht die ganz leichten Ionen ebenfalls gemessen werden sollen. Um zu erreichen, dass keine Überkopplung stattfindet, müssen sowohl Pulser wie auch Detektor möglichst gut abgeschirmt werden. Bei Orthogonal-Flugzeitmassenspektrometern bisheriger Bauart ist das schwierig zu erreichen, weil, wie auch **Abb. 1** zeigt, Pulser und Detektor nahe zueinander angeordnet sind. Für höchstauflösende Massenspektrometer mit langer Flugstrecke lassen sich aber Pulser und Detektor durch entsprechende Verwendung von Reflektoren weit voneinander entfernen, so dass das Problem auch elektronisch lösbar wird. Schwache Reste der Überkopplung lassen sich auch in bekannter Weise von den Summenspektren abziehen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur präzisen Massenbestimmung von Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss, mit einem Pulser, einem Ionendetektor und einer Messeinrichtung für die Ionenströme am Detektor,

dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) die Messeinrichtung die Ionenstromsignale am Detektor ohne Rücksicht auf die Laufzeit der Ionen zyklisch misst und in einen Speicher addiert,
- (b) die Ionen im Pulser synchron zu den Messzyklen ausgepulst werden,
- (c) die Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer der vorausgegangenen Auspulsungen

durch ihre jeweilige Breite auf der Massenskala bestimmt wird, und

(d) aus dieser Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer Auspulsung die präzise Flugzeit und aus ihr die präzise spezifische Masse der Ionen bestimmt wird.

2. Verfahren zur präzisen Massenbestimmung von Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss, mit einem Pulser, einem Ionendetektor und einer Messeinrichtung für die Ionenströme am Detektor, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) die Messeinrichtung die Ionenstromsignale am Detektor ohne Rücksicht auf die Laufzeit der Ionen zyklisch misst und in einen Speicher addiert,
- (b) die Ionen im Pulser synchron zu den Messzyklen ausgepulst werden,
- (c) die Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer der vorausgegangenen Auspulsungen bei Isotopenauflösung durch die Isotopenverteilung und durch die Abstände der Ionenstromsignale innerhalb der Ionenstromsignalgruppe bestimmt wird, und
- (d) aus dieser Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer Auspulsung die präzise Flugzeit und aus ihr die präzise spezifische Masse der Ionen bestimmt wird.

3. Verfahren zur präzisen Massenbestimmung von Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss, mit einem Pulser, einem Ionendetektor und einer Messeinrichtung für die Ionenströme am Detektor, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) die Messeinrichtung die Ionenstromsignale am Detektor ohne Rücksicht auf die Laufzeit der Ionen zyklisch misst und in einen Speicher addiert,
- (b) die Ionen im Pulser synchron zu den Messzyklen ausgepulst werden,
- (c) die Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer der vorausgegangenen Auspulsungen ohne Isotopenauflösung durch die Breite der Ionenstromsignalgruppe und durch die Muster der Ionenstromsignalgruppen verschiedener Ladungszustände bestimmt wird, und
- (d) aus dieser Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer Auspulsung die präzise Flugzeit und aus ihr die präzise spezifische Masse der Ionen bestimmt wird.

4. Verfahren zur präzisen Massenbestimmung von Ionen in einem Flugzeitmassenspektrometer mit orthogonalem Ioneneinschuss, mit einem Pulser, einem Ionendetektor und einer Messeinrichtung für die Ionenströme am Detektor, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) die Messeinrichtung die Ionenstromsignale am Detektor ohne Rücksicht auf die Laufzeit der Ionen zyklisch misst und in einen Speicher addiert,
- (b) die Ionen im Pulser synchron zu den Messzyklen

ausgepulst werden,

(c) die Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer der vorausgegangenen Auspulsungen durch eine Geschwindigkeitsanalyse der Ionen bestimmt wird, wobei die Geschwindigkeitsanalyse anhand zweier Spektren vorgenommen wird, die mit zwei Detektoren nach verschiedenen langen Flugstrecken der Ionen erhalten werden, und

(d) aus dieser Zugehörigkeit der gemessenen Ionenstromsignale zu einer Auspulsung die präzise Flugzeit und aus ihr die präzise spezifische Masse der Ionen bestimmt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Pulser des Flugzeitmassenspektrometers durch die Messeinrichtung gesteuert wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

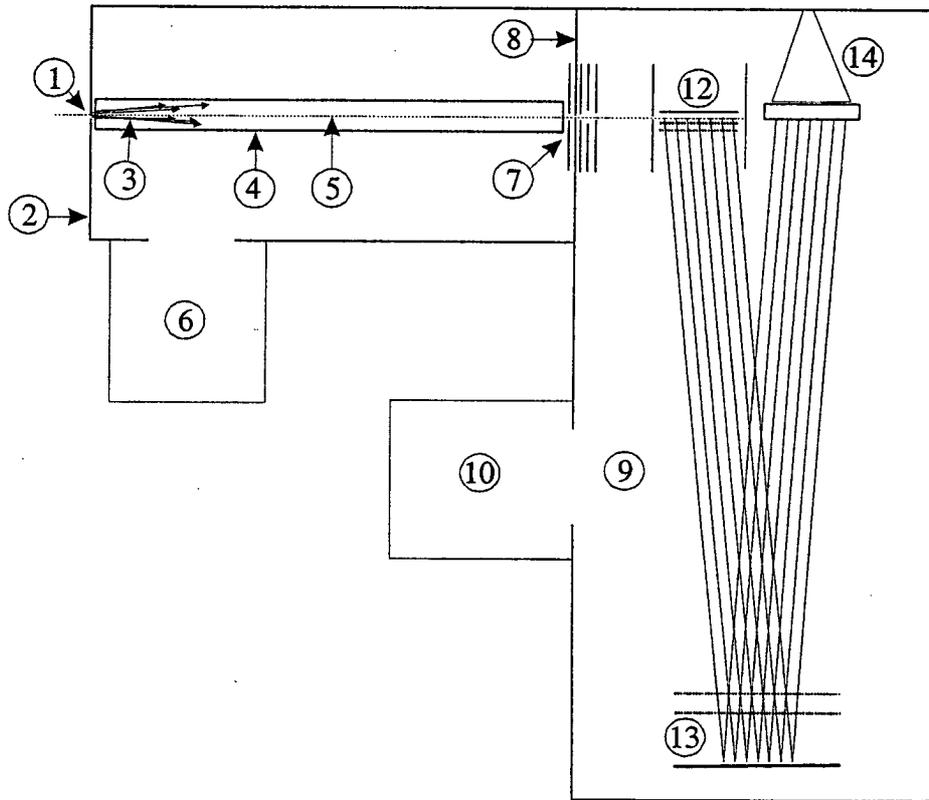


Abbildung 1

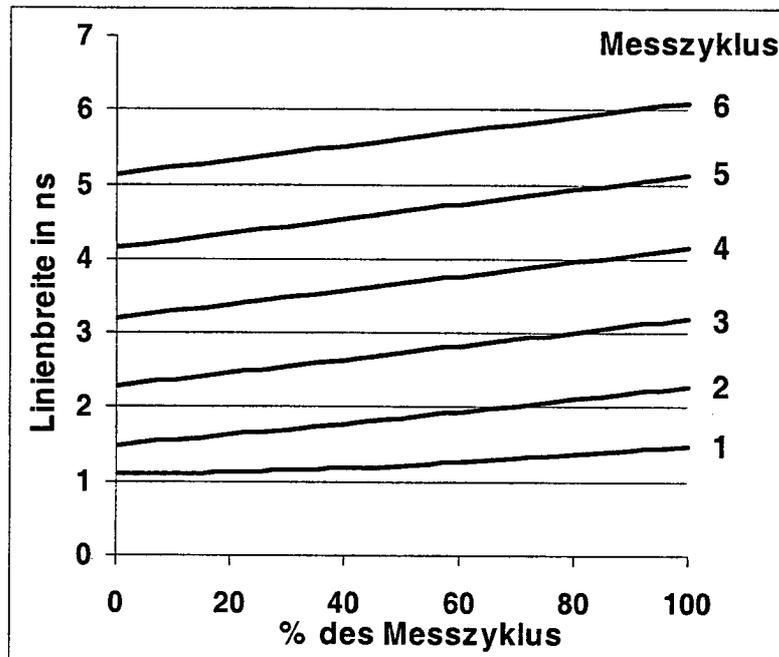


Abbildung 2

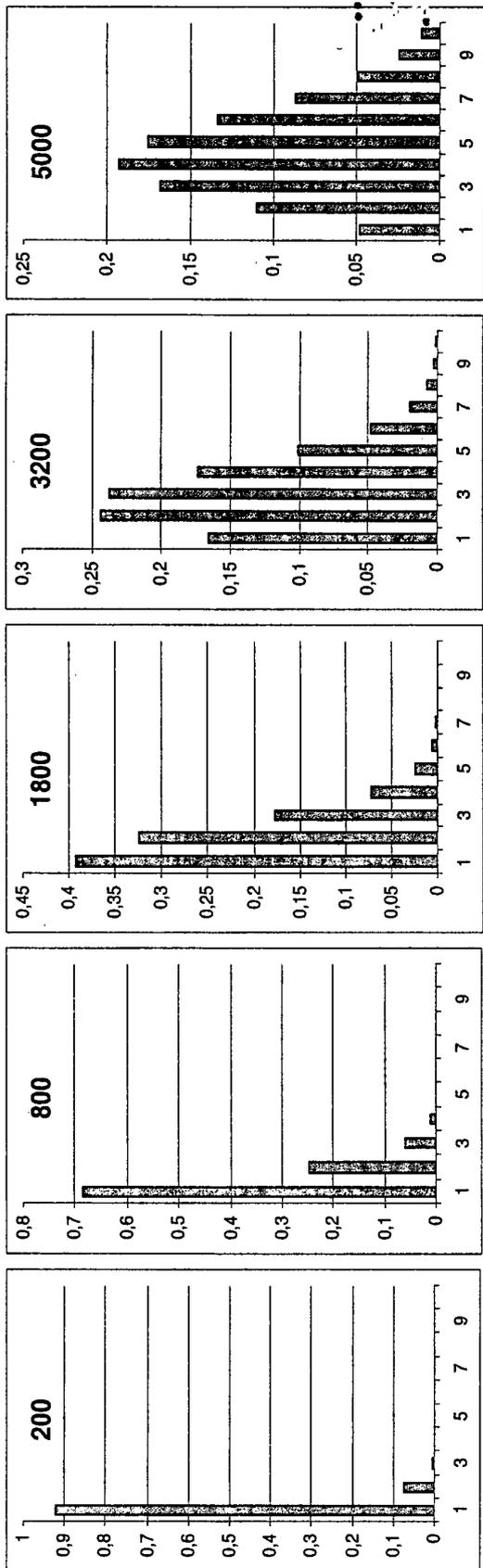


Abbildung 3

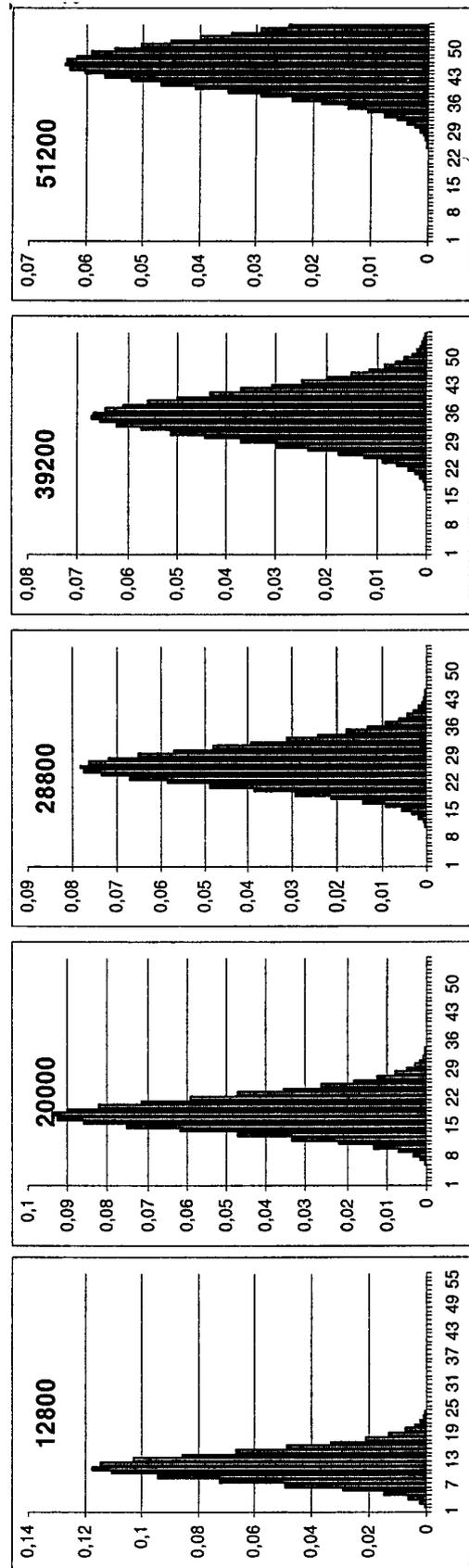


Abbildung 4