

Massenspektrometrische Untersuchungen, III *

MASSENSPEKTREN
VON FREIEN UND *N*-ACETYLIERTEN AMINOSÄUREN

von KURT HEYNS und HANS-FRIEDRICH GRÜTZMACHER

Aus dem Chemischen Staatsinstitut der Universität Hamburg,

Institut für Organische Chemie

Eingegangen am 16. November 1962

Die Massenspektren von Aminosäuren und von *N*-Acetyl-aminosäuren werden angegeben und diskutiert. Der Abbau der Aminosäuren und ihrer Derivate durch Elektronenbeschuß im Massenspektrometer läßt sich durch vier allgemeine Reaktionen deuten.

Über die Massenspektren einiger Aminosäure- und Peptid-Derivate ist bereits berichtet worden¹⁻³). Die übliche Aufnahmetechnik, bei der die Meßprobe in einem Vorratsbehälter verdampft wird und von dort über eine Düse in die Ionisationskammer des Massenspektrometers strömt, setzt voraus, daß die Meßprobe bei 150° einen Dampfdruck von ca. 10⁻² Torr besitzt. Diese Bedingung wird jedoch oft nicht mehr erfüllt. Deshalb haben wir die Aufnahmetechnik geändert⁴). Umgeht man den Vorratsbehälter mit Einlaßdüse und führt die Substanz direkt in die Ionisationskammer ein, so sind alle Substanzen meßbar, die bei 100–250° einen Dampfdruck von mindestens 10⁻⁷ Torr besitzen. Fast alle Aminosäuren und auch einfache Peptide sublimieren unzersetzt schon bei 0.3 Torr und Temperaturen um 200°⁵).

Wir beschreiben hier die mit dieser Methode erhaltenen Massenspektren der freien Aminosäuren (Tab. 1) und ihrer *N*-Acetyl-Derivate (Abb. 1–5). In beiden Fällen beziehen sich die Angaben auf die Intensität des Haupt-Ions = 100%. Da *D*- und *L*-Aminosäuren gleiche Massenspektren liefern, wurden außer *L*-Prolin, *L*-Hydroxyprolin, *L*-Histidin und *L*-Cystein bei den Untersuchungen *DL*-Aminosäuren verwendet.

Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Hydroxyprolin, Threonin, Lysin und Cystein sind schon bei ca. 100° unzersetzt flüchtig. Bei Methionin tritt vermutlich schon eine thermische Wasserabspaltung ein. Das entsprechende Ion

* II. Mitteilung: K. HEYNS und H. SCHARMANN, Liebigs Ann. Chem. 677, 183 (1963), voranstehend.

1) K. HEYNS und H.-F. GRÜTZMACHER, Z. Naturforsch. 16b, 293 (1961).

2) K. BIEMANN, J. SEIBL und F. GAPP, J. Amer. chem. Soc. 83, 3795 (1961).

3) E. STENHAGEN, Z. analyt. Chem. 181, 462 (1961).

4) K. HEYNS und H.-F. GRÜTZMACHER, Angew. Chem. 74, 387 (1962).

5) D. GROSS und G. GRODSKY, J. Amer. chem. Soc. 77, 1678 (1955).

Tabelle 1. Massenspektren der freien Aminosäuren *)

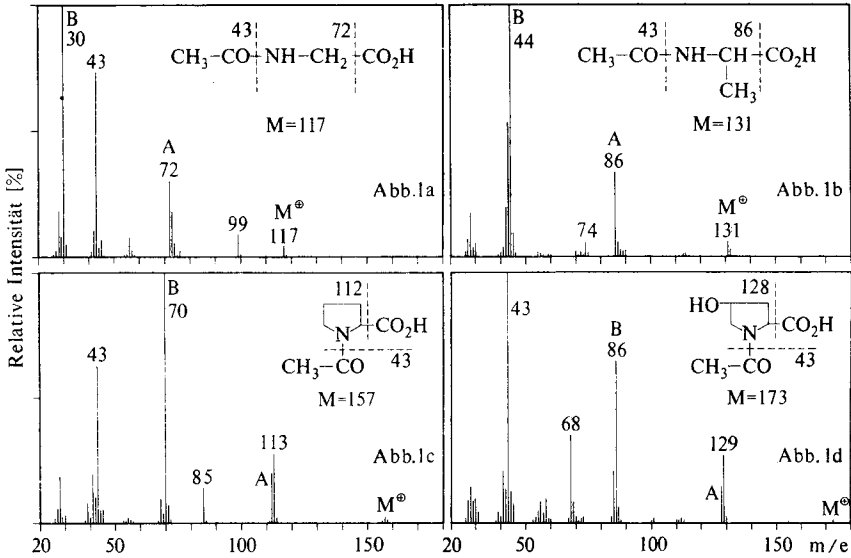
MZ	Relative Intensität [%]								
	Gly	Ala	Val	Leu	iLeu	Pro	HOPro	Phe	Tyr
M	4.5 ^{e)}	0.1	0.1	0.6	0.2	1.0	—	7.9	6.0
M-17	—	—	0.5	1.0	0.8	0.1	—	1.0	—
M-18	0.3	—	0.3	0.7	—	0.3	1.4	1.1	—
M-44	1.8	4.7	5.3	6.6	7.1	6.2	10.5	11.3	0.8
M-45	100 ^{h)}	100	100	100	100	100	100	90.4	1.2
M-46	5.5	4.0	0.5	1.0	0.9	5.1	3.0	6.3	4.1
M-74	—	—	8.0	11.2 ^{g)}	37.8 ^{g)}	0.5	11.2 ^{g)}	100	100
75	4.5	—	11.0	5.9	34.2	—	2.3	3.5	4.5
74	0.5	2.0	28.6	31.2	32.7	0.7	2.0	55.0	10.2
57	0.3	0.2	26.7	11.2	37.8	0.6	11.2	1.1	13.1
45	3.1	4.7	6.4	6.4	3.4	2.9	6.9	3.9	5.6
30	100	1.1	15.8	—	—	4.5	14.0	10.5	17.0

MZ	Relative Intensität [%]								
	Try	His ^{a)}	Lys	Glu ^{b)}	Asp ^{c)}	Ser	Thr	Cys	Met ^{d)}
M	4.0	2.1	0.8	6.9	—	—	—	5.4	17.7
M-17	—	3.6	6.6	—	—	—	—	—	2.7
M-18	—	0.7	2.7	—	0.8	1.8	1.3	—	5.0—30.0
M-44	1.4	4.0	—	7.1	1.5	3.3	96.0 ^{e)}	3.6	1.0
M-45	1.7	18.5	3.6	100	12.9	100	30.7 ^{f)}	100	16.6
M-46	2.1	13.4	4.6	3.4	2.9	3.0	0.7	49.8 ^{e)}	0.8
M-74	100	44.3	39.2	12.3	1.0	17.6	29.8	12.6	37.2 ^{e)}
75	2.5	1.0	1.9	—	1.6	36.7	96.0	49.8	37.2
74	2.0	3.7	8.2	1.5	6.2	37.0	30.7	91.5	23.1
57	6.8	7.1	8.2	3.0	5.1	26.4	100	28.8	16.4
45	16.2	7.1	3.8	8.5	11.8	25.0	30.7	14.6	14.8
30	8.0	8.5	100	3.2	14.1	41.9	23.7	5.9	13.4

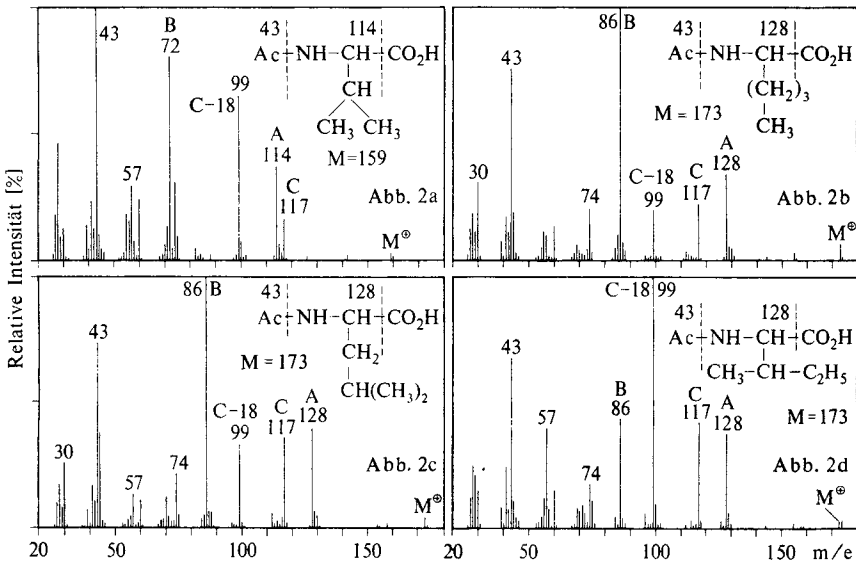
a) Verunreinigt mit Hydrochlorid, m/e 82 \cong 100%. b) Pyrrolidon- α -carbonsäure. c) m/e 44 \cong 100%.
d) m/e 61 \cong 100%. e) entspr. m/e = 75. f) entspr. m/e = 74. g) entspr. m/e = 57. h) entspr. m/e = 30.

M-18 *) zeigt bei längerem Aufenthalt des Methionins in der Ionenquelle einen starken Intensitätsanstieg. Glutaminsäure geht unter Wasserabspaltung in Pyrrolidon- α -carbonsäure über. Da Glutaminsäure schwerer flüchtig ist als Pyrrolidon- α -carbonsäure, erhält man nur das Massenspektrum letzterer Verbindung. Tyrosin, Tryptophan, Histidin, Asparaginsäure und Serin sind erst bei ca. 150° hinreichend flüchtig. Arginin gab kein brauchbares Massenspektrum.

*) M = Molekulargewicht, MZ = Massenzahl.

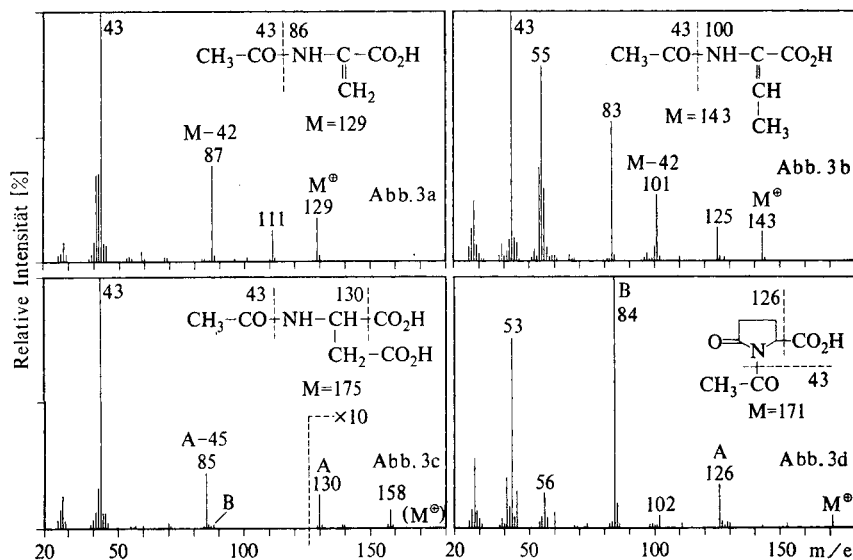


Abbildungen 1 a – d. Massenspektren von *N*-Acetyl-glycin (Abb. 1 a), *N*-Acetyl-alanin (Abb. 1 b), *N*-Acetyl-prolin (Abb. 1 c), *N*-Acetyl-hydroxyprolin (Abb. 1 d). Relative Intensität in % der Intensität des häufigsten Ions



Abbildungen 2 a – d. Massenspektren von *N*-Acetyl-valin (Abb. 2 a), *N*-Acetyl-norleucin (Abb. 2 b), *N*-Acetyl-leucin (Abb. 2 c), *N*-Acetyl-isoleucin (Abb. 2 d). Relative Intensität in % der Intensität des häufigsten Ions. Ac = Acetyl

Erwartungsgemäß waren die *N*-Acetyl-aminosäuren wesentlich leichter flüchtig als die Aminosäuren. *N*-Acetyl-methionin ist schon so flüchtig, daß es nur an Kieselgel adsorbiert gemessen werden konnte. Unter diesen Bedingungen ist die thermische Wasserabspaltung praktisch vollständig; das Molekül-Ion tritt nur noch in Spuren auf. Aus *N*-Acetyl-glutaminsäure lassen sich zwar bei vorsichtigem Arbeiten Ionen erhalten, die der *N*-Acetyl-glutaminsäure zugeordnet werden können, nach kurzer

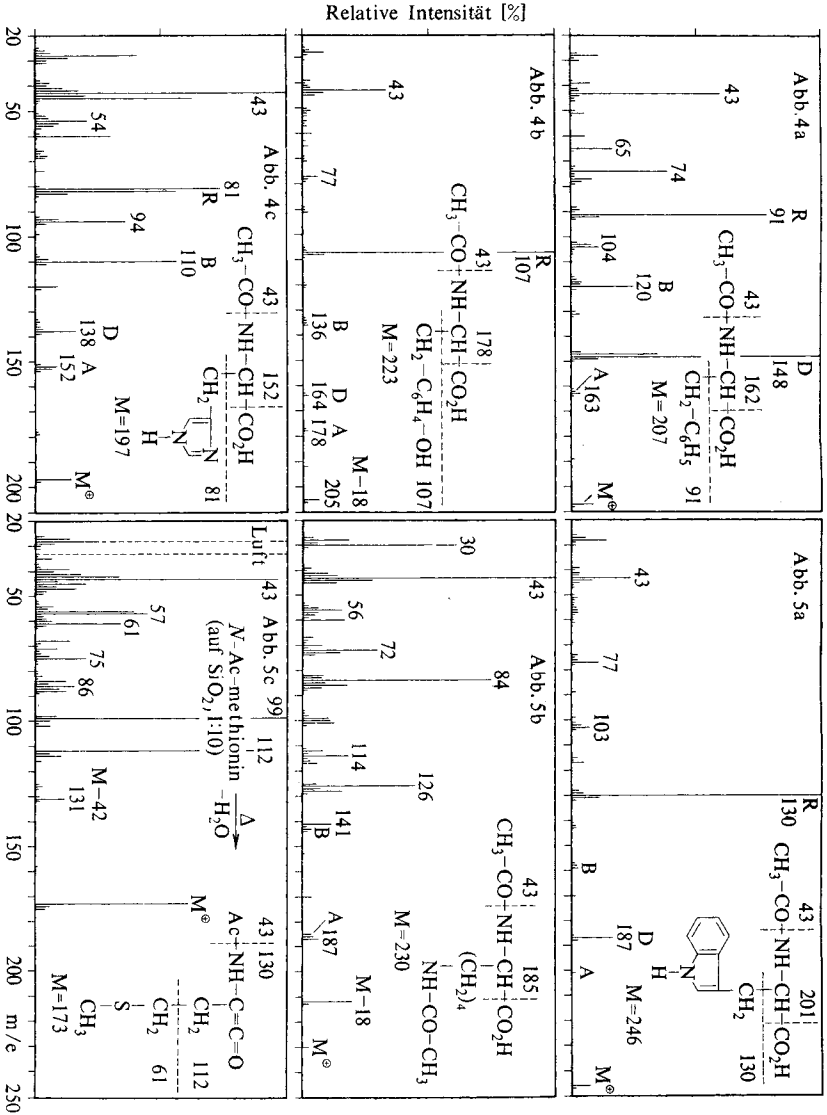


Abbildungen 3 a – d. Massenspektren von α -Acetamino-acrylsäure (Abb. 3 a), α -Acetamino-crotonsäure (Abb. 3 b), *N*-Acetyl-pyrrolidon- α -carbonsäure (Abb. 3 c), *N*-Acetyl-asparaginsäure (Abb. 3 d). Relative Intensität in % der Intensität des häufigsten Ions

Verweilzeit der Meßprobe in der Ionenquelle erhält man jedoch praktisch nur das Massenspektrum der *N*-Acetyl-pyrrolidon- α -carbonsäure. Wie freies Arginin ist auch *N* ^{α} -Acetyl-arginin nicht unzerstört flüchtig. Serin und Threonin bilden schon bei der Acetylierung mit Acetanhydrid in Eisessig α -Acetamino-acrylsäure und α -Acetamino-crotonsäure.

DISKUSSION DER MASSENSPEKTREN

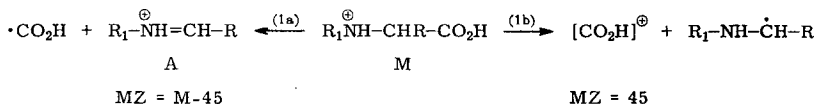
Das Molekül-Ion ist bei freien Aminosäuren nur in Sonderfällen leicht nachzuweisen (aromatische Seitenkette, Ringstruktur oder Heteroatom in der Seitenkette). Bei hohem Partialdruck der Aminosäuren in der Ionenquelle kann ein Ion der Masse $M+1$ auftreten, das durch intermolekulare Wasserstoffübertragung entsteht. Neben diesen Ionen beobachtet man Ionen bei $M-17$ und $M-18$, die durch Verlust von OH , NH_3 und H_2O entstanden sind. Ihre Intensität ist ebenfalls gering. Eine Ausnahme bildet Methionin, bei dem aber die Wasserabspaltung thermisch erfolgt.



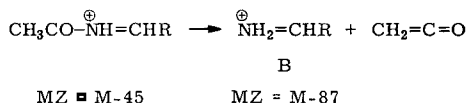
Abbildungen 4a-c und 5a-c. Massenspektren von *N*-Acetyl-phenylalanin (Abb. 4a), *N*-Acetyl-tyrosin (Abb. 4b), *N*-Acetyl-histidin (Abb. 4c), *N*-Acetyl-tryptophan (Abb. 5a), *N*-Acetyl-lysine (Abb. 5b) und *N*-Acetyl-methionin (Abb. 5c). — Relative Intensität in % der Intensität des häufigsten Ions

Die Ionen M, M-17 und M-18 treten mit einer ähnlichen Intensitätsverteilung auch in den Massenspektren der *N*-Acetyl-aminosäuren auf. Für die Entstehung der wichtigsten Ionen lassen sich vier allgemeine Spaltreaktionen ableiten.

1) Die wichtigste dieser Reaktionen ist die *Abspaltung der Carboxylgruppe* ($R_1 = H$ und $R_1 = CO \cdot CH_3$):

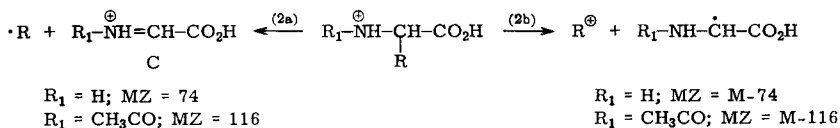


Die bevorzugte Spaltung einer Bindung in β -Stellung zur Aminogruppe findet man auch in den Massenspektren aliphatischer Amine. Die Ladung verbleibt vorwiegend bei dem N-haltigen Fragment, das im folgenden als Amin-Fragment bezeichnet wird. Bei freien einfachen Aminosäuren und deren Estern²⁾ wird durch diese Reaktion fast immer das Haupt-Ion gebildet. Bei Formyl-¹⁾ und Trifluoracetyl-aminosäuremethylestern³⁾ sowie bei Acetyl- und Trifluoracetyl-aminosäuren tritt die gleiche Spaltung ein. Bei den formylierten und acetylierten Aminosäuren schließt sich eine Eliminierung von CO bzw. Keten an:



Dieser Übergang kann durch entsprechende metastabile Ionen nachgewiesen werden. *N*-Acetyl-aminosäuren und freie Aminosäuren liefern daher häufig das gleiche Haupt-Ion. Bei den Trifluoracetyl-aminosäuren tritt diese Folgereaktion, die hier zu einem *N*-Fluoramin-Ion führen würde, nicht ein; stattdessen beobachtet man mit geringer Intensität ein Ion der Masse $NH^{\oplus}=C-R$.

2) Es tritt ebenfalls Bruch einer Bindung in β -Stellung zur Aminogruppe ein, jedoch wird die *Seitenkette R abgespalten*:

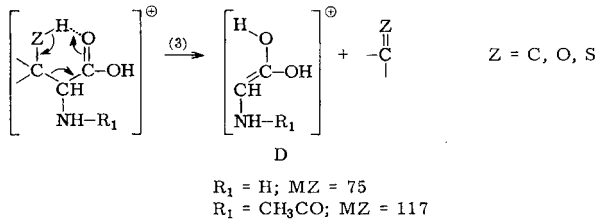


In Analogie zu den Massenspektren der Aminosäureäthylester, in denen ein Ion der Masse 102 auftritt²⁾, besitzt das Ion der Masse 74 in den Massenspektren der freien Aminosäuren beträchtliche Intensität. Dagegen ist die Intensität des entsprechenden Ions der Masse 116 bei *N*-Acetyl-aminosäuren gering. Ein Ion der Masse 74 tritt jedoch auch in den Massenspektren der *N*-Acetyl-aminosäuren auf. Vermutlich wird bei diesen als Folgereaktion ebenfalls schnell Keten eliminiert.

Die Abspaltung der Seitenkette besitzt dann große Bedeutung, wenn die positive Ladung in dem „Seitenketten-Fragment“ stabilisiert werden kann. So kann die hohe Intensität der Ionen M-74 bzw. M-116 beim Valin und Isoleucin durch die Bildung stabiler tertiärer Carbeniumionen durch die Seitenkette erklärt werden. Besonders gut kann eine positive Ladung von Benzylstrukturen stabilisiert werden. Diesen Ionen kommt wahrscheinlich eine Tropyliumstruktur zu⁶⁾. Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin, die alle eine benzylähnliche Seitenkette besitzen, liefern auf diese Weise intensive Peaks.

Bei den beiden übrigen allgemeinen Spaltungen werden die Ionen durch Umlagerung aus dem Molekül-Ion gebildet. In beiden Fällen findet wahrscheinlich in einem cyclischen Übergangszustand eine Übertragung eines Wasserstoffatoms auf eine Carbonylgruppe statt. Solche Reaktionen sind aus den Massenspektren anderer Carbonylverbindungen bekannt⁷⁾.

3) Es wird aus der γ -Stellung ein H-Atom auf die Carboxylgruppe der Aminosäure übertragen und die *Seitenkette als ungesättigtes Fragment eliminiert*:

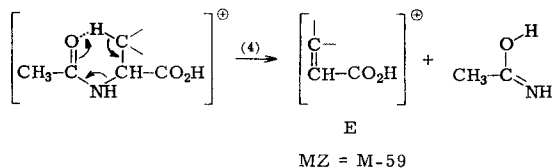


Anschließend erfolgt Abspaltung von H₂O, wodurch die Ionen 57 aus Aminosäuren und 99 aus *N*-Acetyl-aminosäuren gebildet werden. Diese Reaktionsfolge läßt sich durch metastabile Ionen beweisen. Dabei ist die Anwesenheit eines H-Atoms in γ -Stellung in geeigneter sterischer Lage notwendig, so daß diese Art der Spaltung beim Alanin, den cyclischen und aromatischen Aminosäuren *nicht* auftritt. Da die Reaktion durch die Anzahl der H-Atome in γ -Stellung und die Stabilität des ungesättigten neutralen Fragments begünstigt wird, erfolgt sie beim Valin, Isoleucin und Threonin besonders häufig. Merkwürdig ist, daß diese Spaltung bei den Aminosäureäthylestern nicht gefunden wurde, im Gegensatz zu den freien Aminosäuren, bei denen die so gebildeten Ionen eine beträchtliche Intensität erreichen können. In den *N*-Formyl- und *N*-Acetyl-aminosäuren ist diese Spaltung gegenüber den Verbindungen mit freier NH₂-Gruppe bevorzugt. So bildet sowohl *N*-Acetyl-isoleucin als auch *N*-Formyl-isoleucinmethylester durch diese Reaktionsfolge sein Haupt-Ion und kann so eindeutig von dem entsprechenden Leucinderivat unterschieden werden.

⁶⁾ S. MEYERSON, J. D. MCCOLLUM und P. N. RYLANDER, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1401 (1961).

⁷⁾ J. H. BEYNON, *Mass Spectrometry and its Application to Organic Chemistry*, Elsevier Publ. Comp., New York 1960.

4) Bei den *N*-Acyl-aminosäuren erfolgt *Eliminierung eines Säureamid-Moleküls*. Da bei freier NH_2 -Gruppe die entsprechende Reaktion (Abspaltung von NH_3) kaum auftritt, ist es naheliegend, auch hier einen cyclischen Übergangszustand anzunehmen:

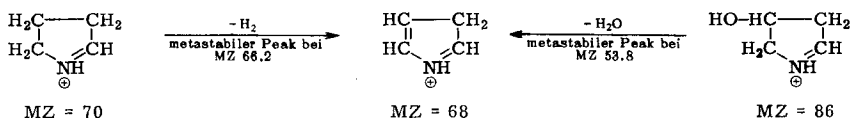


Diese Reaktion ist nur dann von Bedeutung, wenn die neu gebildete Doppelbindung mit einem aromatischen Kern in Konjugation steht. Beim *N*-Acetyl-phenylalanin und beim *N*-Formyl-phenylalaninmethylester wird das Haupt-Ion auf diese Weise gebildet. Die Intensität des Ions M-59 beträgt beim N^α -Acetyl-tryptophan und -histidin jeweils ca. 16%, beim *N*-Acetyl-tyrosin nur noch 2.5%. Hier überwiegt Reaktion 2b.

Der Eliminierung des Amidmoleküls schließt sich eine Abspaltung von OH, CO_2 oder CO_2H zu den Ionen M-76, M-103 und M-104 an. Auch diese Ionen sind nur bei den aromatischen Aminosäuren charakteristisch.

Die übrigen Ionen in den Massenspektren der Aminosäuren und *N*-Acetyl-aminosäuren lassen sich nicht durch allgemeine Spaltungsschemata erfassen. Wie bei den meisten Verbindungen mit einer CO_2H -Gruppe tritt auch hier ein Ion der Masse 45 mit mäßiger Intensität auf (Reaktion 1b). Die *N*-Acetyl-aminosäuren geben wie alle Verbindungen mit einer CH_3CO -Gruppe einen intensiven Peak bei 43. Wenn noch andere Ionen der Masse 43 gebildet werden können, so wird diese Masse zum stärksten Peak, z. B. beim *N*-Acetyl-valin (Seitenkette C_3H_7), -lysin (2 *N*-Acetyl-Gruppen), -hydroxyprolin, -histidin und der *N*-Acetyl-asparaginsäure.

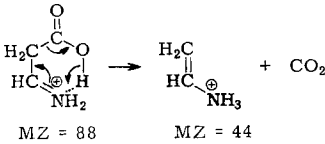
Die für die einzelnen Aminosäuren typischen Ionen entstehen durch Spaltungen in der Seitenkette. So treten bei Prolin und Hydroxyprolin Ionen der Masse 68 auf, denen folgende Struktur zugeschrieben werden kann:



Ein weiterer charakteristischer Peak in den Massenspektren der Acetylderivate dieser cyclischen Iminosäuren tritt bei 85 auf. Dieses Ion ($\text{CH}_3\text{CO}-\text{NC}_2\text{H}_4$) entsteht aus dem Ion M-45 bzw. M-44 durch Verlust eines C_2 -Bruchstückes.

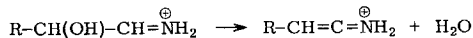
Asparaginsäure zeigt einen intensiven Peak bei 44, das „Amin-Fragment“ tritt mit ca. 13% relativer Intensität stark zurück. Daneben beobachtet man bei Massen über

45 nur noch, mit 18% relativer Intensität, die Masse 55; alle übrigen Ionen sind wenig intensiv und wenig charakteristisch. Offensichtlich werden beide Carboxylgruppen leicht abgespalten, wobei für die Abspaltung der β -CO₂H-Gruppe ein cyclischer Mechanismus vorgeschlagen wurde²⁾.

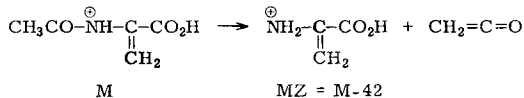


Mit dieser Vorstellung stimmt überein, daß bei *N*-Acetyl-asparaginsäure neben dem Haupt-Ion mit der Masse 43 nur noch ein Ion mit der Masse 85 (rel. Intensität 22%) stärker auftritt. Da die Basizität des Amid-N gering und der cyclische Mechanismus daher benachteiligt ist, werden beide CO₂H-Gruppen abgespalten. Eliminierung von Keten führt dann zu einem Ion der Masse 43. Da diese Masse auch vom Acetyl-Ion belegt wird, beherrscht dieser Peak das Massenspektrum der *N*-Acetyl-asparaginsäure.

Serin und Threonin weisen starke Peaks bei 42 bzw. 57 auf. Diese Ionen entstehen durch Wasserabspaltung aus dem „Amin-Fragment“:



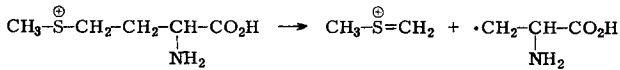
Eine Abspaltung von Wasser erfolgt bereits bei der Acetylierung von Serin und Threonin. Da in der entstandenen α -Acetamino-acrylsäure bzw. -crotonsäure die Carboxylgruppe an einer Doppelbindung sitzt, wird sie bei Elektronenstoß nicht abgespalten. Statt dessen tritt bereits aus dem Molekül-Ion Eliminierung des Acetylrestes als Keten ein. Diese Reaktion ist typisch für acetylierte Enamine:



Auch aus dem entstehenden Ion M-42 wird eher H₂O, ein Bruchstück der Masse 44 (CO₂) oder 46 (CO₂+H₂?) abgespalten als die CO₂H-Gruppe.

Im Gegensatz zum Sauerstoffatom in der Seitenkette des Serins und Threonins kann eine positive Ladung durch das N-Atom in der Seitenkette des Lysins und das S-Atom der Seitenketten von Cystein und Methionin gut stabilisiert werden. Neben den „normalen“ Spaltreaktionen treten daher in den Massenspektren dieser Aminosäuren häufig Ionen auf, deren Bildung durch das Heteroatom der Seitenkette bestimmt wird. Bei den freien Aminosäuren handelt es sich um die gleichen Ionen, die auch in den Massenspektren der Aminosäureäthylester beobachtet wurden²⁾. So zeigt freies¹ Lysin hohe Peaks bei den Massen 30 (Haupt-Ion, H₂N⁺=CH₂), 56 und 84. Charakteristisch für Cystein sind die Ionen der Masse 47 (CH₂=⁺SH) und 59 (S⁺C₂H₃). Letzteres entsteht durch Eliminierung von NH₃ aus dem „Amin-Fragment“. Beim

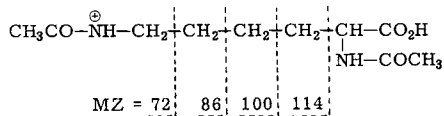
Methionin wird das Haupt-Ion (Masse 61) durch Bruch der Bindung in β -Stellung zum S-Atom gebildet:



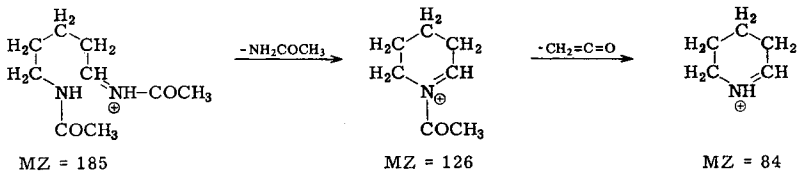
MZ = 61

Daneben beobachtet man eine Eliminierung von CH_3SH aus dem Molekül-Ion und dem Amin-Fragment zu Ionen der Massen 101 und 56.

Die Anwesenheit einer zweiten Amidgruppe in $N^\alpha.N^\epsilon$ -Diacetyl-lysin führt zu zahlreichen neuen Peaks. Das Haupt-Ion hat die Masse 43, das Ion $\text{CH}_2=\text{NH}_2$ mit der Masse 30 tritt ebenfalls stark auf. Daneben findet man Ionen der Massen 72, 86, 100 und 114, die wie folgt entstehen:

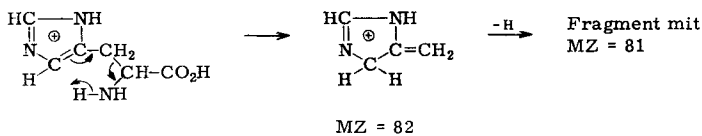


Auch Ionen der Masse 84 (intensiv) und 126 treten auf. In Analogie zu den Lysin-derivaten mit freier NH_2 -Gruppe²⁾ kann diesen Ionen eine cyclische Struktur zugeschrieben werden:



Da die freien und *N*-acetylierten aromatischen Aminosäuren häufig Ionen nach Reaktion (2b) bilden, beobachtet man auch Ionen, die durch weiteren Zerfall der Seitenketten-Fragmente entstehen, z. B. solche der Masse 77.

Histidin und *N*-Acetyl-histidin zeigen einen auffallenden Unterschied. Der Hauptpeak des Histidins liegt ebenso wie der des Äthylesters bei 82. In beiden Fällen wird kein einfaches „Seitenketten-Fragment“ gebildet, sondern zusätzlich ein H-Atom in die Seitenkette eingebaut. Für diesen Einbau wurde folgender Mechanismus vorgeschlagen²⁾:



Der Verlust eines H-Atoms aus dem Ion $m/e = 82$ wird durch einen metastabilen Peak bei $m/e = 80$ angezeigt. Diesen findet man auch beim *N*-Acetyl-histidin, hier bildet jedoch das Ion der Masse 81 den Hauptpeak. Wahrscheinlich wird in diesem Fall die einfache Abspaltung der Seitenkette bevorzugt.

Dem BUNDESMINISTER FÜR ATOMKERNENERGIE danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

N-Acetyl-aminosäuren: 0.1 mMol der Aminosäuren werden in 20–50 ccm Eisessig gelöst bzw. suspendiert und 0.2 mMol Acetanhydrid zugesetzt. Nach Stehenlassen über Nacht oder Erwärmen auf dem Wasserbad wird auf Vollständigkeit der Acetylierung mit Ninhydrin geprüft und i. Vak. bei 40° eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mit wenig Wasser versetzt und eingedampft und aus Wasser-Aceton, absol. Methanol, Methanol-Äther oder Essigester umkristallisiert.

Massenspektren: Sie wurden mit einem ATLAS-CH4-Massenspektrometer bei 70 eV aufgenommen. Das Gerät war mit einer Vakuumschleuse und der Festkörperionenquelle TO4 ausgerüstet. Die Meßprobe wurde in ein Schmelzpunktröhrchen von ca. 1 mm Durchmesser gefüllt und das Röhrchen über einer Mikroflamme zu einer feinen Kapillare ausgezogen. Dieses Verfahren hat sich im Vergleich zu den ursprünglich für die Substanzaufnahme vorgesehenen Graphittiegelchen bewährt. — Das jetzt ca. 1 cm lange Röhrchen wird in die austauschbare Ionisationskammer der TO4-Ionenquelle eingesetzt und mit Hilfe der Vakuumschleuse in die Ionenquelle eingefahren. Man wartet, bis der Dampfdruck der Substanz in der Ionenquelle für die Aufnahme eines intensiven Massenspektrums genügend groß ist, wobei die Verdampfung der Meßprobe durch schnelles Durchfahren der Massenbereiche des Massenspektrums kontrolliert wird. Da die Temperatur der TO4-Ionenquelle nicht geregelt wird, ändert sich infolge von Temperaturschwankungen auch der Dampfdruck der Meßproben während der Aufnahme. Der Hauptpeak oder ein anderer für die Substanz charakteristischer Peak wurde daher fest eingestellt und mit Hilfe eines Massenprogrammwählers vor, während und nach der Aufnahme des Spektrums wiederholt gemessen. Durch Verbinden der Spitzen dieses „Bezugs-peaks“ erhält man eine Kurve, die den Konzentrationsverlauf der Meßprobe in der Gasphase der Ionenquelle wiedergibt. Bei der Auswertung des Spektrums wird die Intensität der Ionen auf diese Kurve bezogen. Zur Kontrolle wurden von einer Meßprobe jeweils drei Massenspektren in Abständen von ca. 20 Min. aufgenommen. Die Intensität der einzelnen Ionen schwankte um ca. $\pm 10\%$.

Für die Aufnahme eines Massenspektrums benötigt man nur einige γ Substanz. So kleine Mengen lassen sich jedoch schlecht handhaben, so daß man besser ca. 1 mg einsetzt. Wenn weniger Substanz zur Verfügung steht, kann sie mit einem inerten Träger vermischt werden. Kieselgel⁴⁾ kann bei Verbindungen mit OH-Gruppen die thermische Wasserabspaltung katalysieren.