

Massenspektrometrie

Target-Screening und Non-Target-Screening



► Angelina Taichrib, Hochschule Aalen



► Prof. Dr. Dirk Flottmann, Hochschule Aalen



► Dr. Wolfram Seitz,
Zweckverband Landeswasserversorgung



► Dr. Wolfgang Schulz,
Zweckverband Landeswasserversorgung

Die Verfügbarkeit von Massenanalytoren in Kopplung mit unterschiedlichen chromatographischen Trenntechniken hat in dem letzten Jahrzehnt eine enorme Entwicklung erfahren. Besonders die Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie etabliert sich zunehmend in der Routineanalytik von organischen Spurenstoffen in Wasser und anderen Umweltmatrices. Aufgrund der Leistungsfähigkeit der Geräte werden vom Anwender neben dem Nachweis und der Quantifizierung vorgegebener Substanzen (Target-Analytik bzw. Target-Screening) auch zunehmend die Antwort auf die Frage welche weiteren Substanzen sind denn auch noch vorhanden (Non-Target-Screening) gefordert. Der vorliegende Beitrag soll die Unterschiede in der Aufgabenstellung des Target- und Non-Target-Screenings und die Möglichkeiten und Grenzen der verschiedenen kommerziell erhältlichen massenspektrometrischen Techniken zur Lösung dieser Fragestellungen aufzeigen.

Die Methode des Target-Screenings umfasst das spezifische Fragen bzw. Suchen nach vorgegebenen Analyten. Um das Prinzip zu veranschaulichen stellt man sich eine „Black Box“ vor. Zur Ermittlung des Inhaltes werden durch das Analysensystem gezielte Fragen an die „Black Box“ gestellt: Beispielsweise sind „Äpfel“ in der Box?, sind „Karotten“ in der Box? oder sind „Trauben“ in der Box? Alle diese Fragen werden mit ja oder nein beantwortet. Im vorliegenden Beispiel sind somit „Trauben“ (Analyt) als Boxinhalt nachgewiesen. In Abbildung 1 ist diese Vorgehensweise schematisch dargestellt. Die roten Pfeile auf die „Black Box“ (Probe) stellen die Fragen dar und rechts sind die Antworten auf diese Fragen mit ja/nein angegeben. Es ist offensichtlich, dass hierbei nur Substanzen erkannt werden, nach denen gefragt wird.

Die Methode des Non-Target-Screenings stellt dagegen die Frage: Was ist in der Box (Probe) enthalten? Die Antwort des Analysensystems ist die gesamte Information über den Box-Inhalt. Allerdings lautet die Antwort nicht, in der Box sind „Trauben“ enthalten, sondern die Information liegt in verschlüsselter Form (beispielsweise als Massenspektrum) vor. Dies ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Der rote Kreis soll den Blick auf den gesamten Inhalt der Box symbolisieren. Er zeigt aber auch, dass nicht die gesamte Box abgedeckt ist (es werden nur Substanzen detektiert, die mit der Methode erfassbar sind).

Das verschlüsselte Ergebnis ist als Buchstabentabelle in Abbildung 2 dargestellt und muss entschlüsselt (ausgewertet) werden.

Bei der Übertragung dieser Vorstellung auf die Massenspektrometrie entspricht die Aufnahme des gesamten Inhalts der Box der Detektion des Totalionenstromes (TIC), welcher die gesamte Analyseninformation enthält. Dieser TIC wird anschließend ausgewertet beispielsweise durch die Extraktion bestimmter Massen (EIC). In Abbildung 3 wird dies verdeutlicht.

Der große Vorteil dieser Methodik liegt darin, dass zunächst keine Informationen hinsichtlich der Probenbestandteile vorliegen müssen. Nach Aufnahme des TIC und dessen Speicherung können die analytischen Signale weiterverarbeitet werden, so dass gezielt nach weiteren Substanzen oder Metaboliten später gesucht werden kann. Dies ist in Abbildung 4 dargestellt, in der zunächst im EIC der Analyt „Weintrauben“ identifiziert wurde und anschließend auch nach dessen Metaboliten „Wein“ in diesem TIC gesucht werden kann. Dieses ist bei der Target-Analytik nicht mehr möglich.

Im Folgenden werden die am häufigsten in der Routineanalytik eingesetzten Massenanalytoren hinsichtlich ihrer Anwendung beim Target- und Non-Target-Screening verglichen. Allgemeine Eigenschaften der Massenanalytoren und deren wichtigsten analytischen Leistungsparameter sind in Tabelle 1 gegenübergestellt.

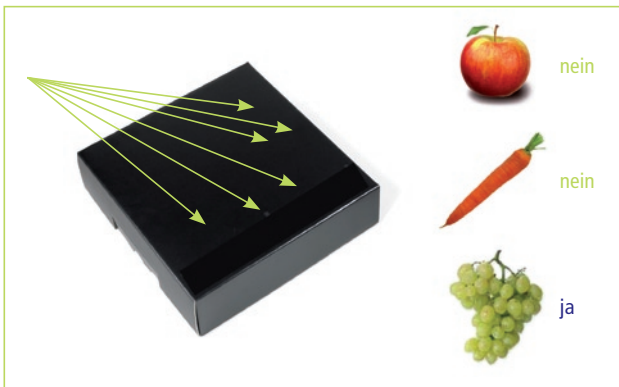


Abb. 1: Schematische Darstellung des Target-Screenings. Zur Ermittlung des Inhaltes der „Black Box“ (Probe) werden gezielte Fragen (Pfeile) nach möglichen Inhaltsstoffen gestellt. Befindet sich in der Box ein „Apfel“? Das Analysengerät beantwortet diese Fragen mit ja oder nein.

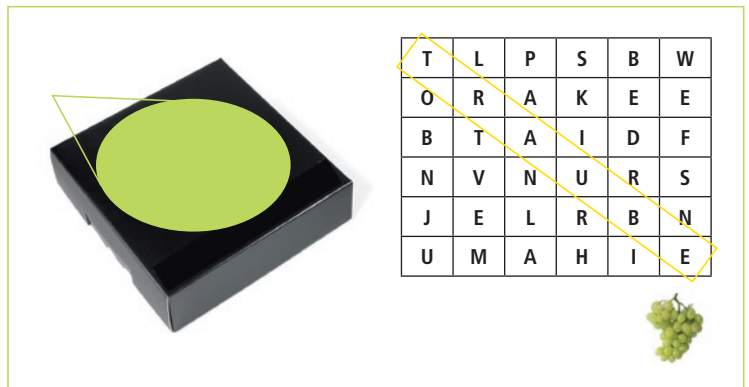


Abb. 2: Schematische Darstellung des Non-Target-Screenings. Zur Ermittlung des Inhaltes der „Black Box“ (Probe) wird die Frage gestellt: Was ist in der Probe? Dies wird durch den Kreis symbolisiert. Die Antwort auf diese Frage ist „verschlüsselt“. Hier dargestellt durch die Buchstabenmatrix. Diese muss entschlüsselt (ausgewertet) werden (gelbe Maske).

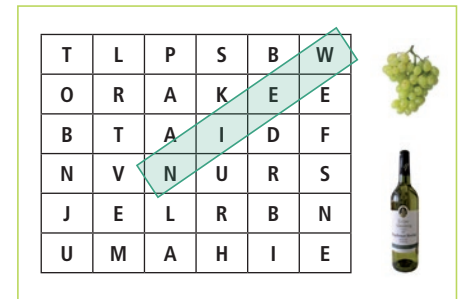
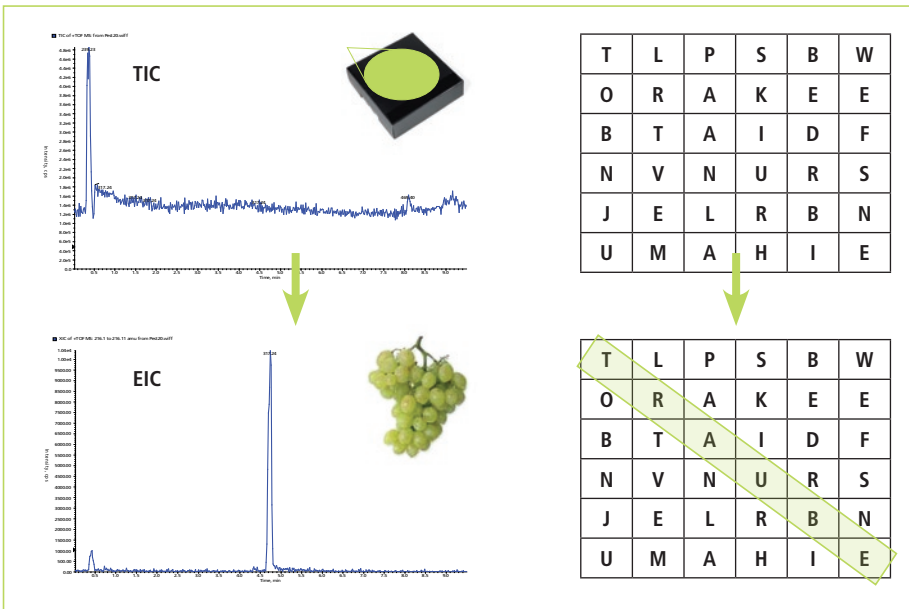
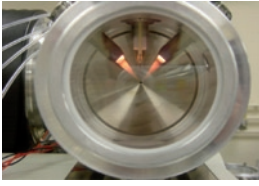
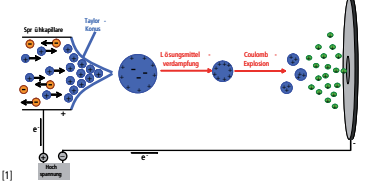


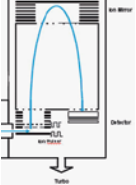
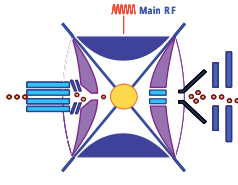
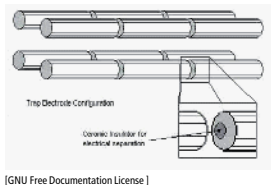
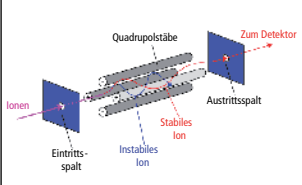


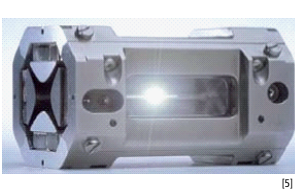

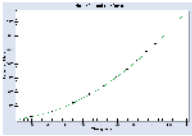
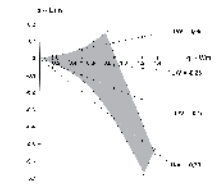
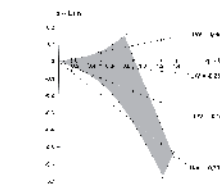
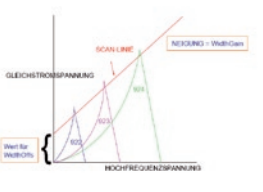
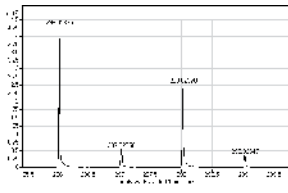
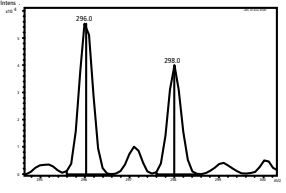
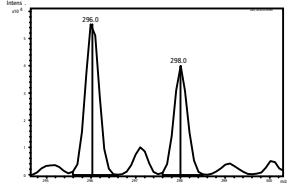
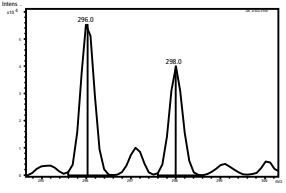


Abb. 4: Suche nach weiteren Substanzen, beispielsweise Metabolite von „Trauben“

Abb. 3: Durch Extraktion einer bestimmten Masse (charakteristisch für den Analyt) erhält man aus dem Totalionenstromchromatogramm (TIC) ein extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC). Der chromatographische Peak ist dann ein Indiz für die Verbindung (Traube).

Abb. 5: Übersicht

	Time-of-Flight	Ion Trap	Linear Ion Trap	Quadrupole
Ionenquelle: Electrospray Ionisation				
Schema				
Abbildung				
Funktionsweise	<ul style="list-style-type: none"> Trennung der Ionen aufgrund unterschiedlicher Flugzeiten Zugrunde liegende Gleichungen: $E_{\text{el}} = e \cdot z \cdot U = \frac{1}{2} \cdot m_1 \cdot v^2$ $t = s \cdot \sqrt{\frac{m_1}{2 \cdot z \cdot e \cdot U}} \quad \text{mit } v = \frac{s}{t}$ Kalibrierfunktion:  	<ul style="list-style-type: none"> Dreidimensionales Hochfrequenzfeld Einfang von Ionen Destabilisierung der Bahnen von Ionen mit bestimmten m/z - Werten durch Änderung der Frequenz => Auslass dieser Ionen Stabilitätsdiagramm:  	<ul style="list-style-type: none"> Zweidimensionales Hochfrequenzfeld Einfang von Ionen Destabilisierung der Bahnen von Ionen mit bestimmten m/z - Werten durch Änderung der Frequenz => Auslass dieser Ionen Stabilitätsdiagramm:  	<ul style="list-style-type: none"> Lineares Hochfrequenzfeld Trennung der Ionen durch Änderung der Frequenz und folgende Anregung von Ionen bestimmter m/z - Werte auf stabile Bahnen Stabilitätsdiagramm: 
	TOF	IT	LIT	Q
MS-Modi	Scan	Scan, MS ⁿ mit n > 6	Scan, MS ²	Scan, SIM
Auflösung [Herstellerangaben]	5000–20000	1000–5000	1000–5000	1000–2000
Massenspektrum				
Massengenauigkeit	Hoch (< 5 ppm)	Niedrig	Niedrig	niedrig
Massenbereich	Theor. Unbeschränkt	Bis 3000 amu	Bis 3000 amu	Bis 4000 amu

Quellen für Abbildungen: [1] Turbo Ion Spray™, Applied Biosystems [2] Elektrospray, Agilent Technologies [3] Time-of-Flight, Agilent Technologies [4] Ion Trap, Thermo Fisher Scientific [5] Linear Ion Trap, Thermo Fisher Scientific [6] Quadrupole, Applied Biosystems

Flugzeitmassenspektrometer (Time-of-Flight, TOF)

Das Flugzeitmassenspektrometer bewirkt eine Auftrennung von Ionen unterschiedlicher m/z-Verhältnisse nach der Flugzeit, die sie für das Zurücklegen einer feldfreien Flugstrecke festgelegter

Länge benötigen. Die größten Vorteile eines TOF sind die Verfügbarkeit eines gesamten Massenspektrums (Full Scan) innerhalb einiger zehn Mikrosekunden und die hohe Empfindlichkeit im Full-Scan-Modus aufgrund großer Transmission für Ionen. Des Weiteren erlaubt ein Flugzeitmassenspektrometer, trotz des vergleichsweise einfachen

Aufbaus und der geringeren Kosten, eine exakte Massenbestimmung in einem theoretisch unbeschränkten Massenbereich, so dass auf diesem Wege die Angabe einer Summenformel möglich ist. Das TOF allein ermöglicht also ein Non-Target-Screening, so dass auch beispielsweise Metabolite im nachhinein identifiziert werden können.

Quadrupol-Massenspektrometer

Ein Quadrupol-Massenspektrometer (Q) besteht aus vier quadratisch angeordneten hyperbolischen oder zylindrischen Elektroden. An den jeweils gegenüberliegenden Stäben liegt sowohl Gleichspannung (Direct Current, DC) gleicher Polarität als auch um 180° phasenverschobene Wechselspannung (Radio Frequency, RF) an, wodurch ein zweidimensionales Quadrupolfeld erzeugt wird. Das Trennprinzip beruht auf der Ionenablenkung im elektrischen Feld. Durch periodische Änderung der Stärke der Gleich- und Wechselspannung werden entsprechend dem DC/RF-Verhältnis unterschiedlich starke Quadrupolfelder erzeugt, die nur eine Ionenart mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zu einer stabilen, oszillierenden Bahn anregen. Alle anderen Ionen beschreiben eine instabile Flugbahn und werden in Richtung der Stäbe abgelenkt und dort entladen. Dieser Teil der gebildeten Ionen geht der Detektion verloren. Die Änderung von DC und RF bei konstantem Verhältnis ermöglicht die Aufnahme eines gesamten Massenspektrums.

Eine Steigerung der Selektivität und Empfindlichkeit eines einfachen Quadrupols wird bei der Durchführung von Analysen im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) erreicht. Dabei werden Gleich- und Wechselspannung während der gesamten Analyse so eingestellt, dass nur das zu detektierende Ion den Quadrupol passieren kann. Ein Quadrupol im SIM-Modus ist ein Massenanalysator für Target-Screening, während im Scan-Modus ein Non-Target-Screening durchgeführt werden kann. Ein Quadrupol-Massenanalysator wird in vielen Systemen zur Fokussierung von Ionen und mit erhöhtem Gasdruck als Kollisionszelle eingesetzt.

3D-Ionenfalle (3D-IT)

Die dreidimensionale Ionenfalle (Ion Trap, IT) ermöglicht den Einfang von Ionen innerhalb festgelegter Grenzen und besteht aus einer zur Mitte hin verjüngten Ringelektrode und zwei hyperbolischen Endkappen.

Das der IT zugrunde liegende Prinzip beruht auf der Erzeugung von stabilen Bewegungsbereichen für Ionen innerhalb des gewünschten m/z -Bereichs und Entfernung unerwünschter Ionen durch Kollisionen mit der Wand oder durch axialen Auslass aufgrund ihrer instabilen Bahnen.

Da die Ionen beim Eintritt in die IT genügend kinetische Energie besitzen um auf der gegenüberliegenden Seite wieder austreten zu können, müssen sie durch den Einsatz eines geringen Gasdrucks (Helium) in der IT verlangsamt werden, so dass sie mit Hilfe des Wechselfeldes in der IT gehalten werden können. Das Wechsel-

feld, das durch die angelegten RF- und DC-Potenziale zwischen den Endkappen und der Ringelektrode erzeugt wird, ähnelt anschaulich einem rotierenden Sattel wodurch die Ionen eingefangen werden.

Für den Austritt der auf diese Weise akkumulierten Ionen existieren zwei Modi. Im massenselektiven Instabilitätsmodus werden die Bewegungsbahnen durch kontinuierliche Erhöhung der an der Ringelektrode anliegenden Wechselspannung destabilisiert, das den Austritt der Ionen in aufsteigender Reihenfolge ihrer m/z -Werte bewirkt (Scan). Der zweite Modus beruht auf der Resonanz von Ionen mit bestimmten Frequenzen. Dabei wird an die Endkappen ein zweites Wechselfeld angelegt. Die Frequenz dieser Wechselspannung wird solange erhöht, bis das gewünschte Ion mit dieser Frequenz in Resonanz tritt und so aus der Ionenfalle austritt. Der Nachteil einer 3D-IT besteht darin, dass die Anzahl der zu akkumulierenden Ionen begrenzt ist und durch Überschreitung dieser Grenzen Raumladungseffekte auftreten können, die die gesamte Leistung der Ionenfalle beeinträchtigen.

Die Möglichkeit der mehrfachen Fragmentierung (MS^n) in einer Ionenfalle stellt einen entscheidenden Vorteil dar, wodurch Strukturanalysen durchgeführt werden können. Dies macht die IT zu einem gewissen Teil der Analytik von unbekanntem Substanzen zugänglich. Das zu fragmentierende Ion wird durch den Auslass aller anderen Ionen in der IT isoliert und durch Energiezufuhr in Form einer Potenzialerhöhung zu Zusammenstößen mit He-Atomen angeregt. Nach Akkumulation der dadurch entstandenen Fragmente kann ein Scan der Produktionen durchgeführt werden. Dieser Prozess der Isolierung und Fragmentierung lässt sich theoretisch beliebig oft durchführen. In der Praxis wird jedoch maximal ein MS^6 erzeugt.

Die Ionenfalle erzeugt Massenspektren der gesamten Probe, besitzt jedoch im Scan-Modus eine größere Empfindlichkeit als der Quadrupol und ist somit leistungsfähiger. Doch vor allem die Möglichkeit, MS/MS -Experimente zur Strukturaufklärung durchzuführen macht die 3D-IT zu einem empfindlichen Werkzeug der Target-Analytik.

Lineare Ionenfalle (LIT)

Der Aufbau einer linearen Ionenfalle (Linear Ion Trap, LIT) ähnelt dem eines Quadrupols, die Funktionsweise jedoch der einer 3D-Ionenfalle.

Das an das vordere und hintere Ende der LIT anliegende höhere Potenzial und die Betriebsweise im RF-only-Modus ermöglichen den Einfang von Ionen und unterscheiden die LIT von einem Quadrupol. Im Gegensatz zu einer dreidimensionalen Ionenfalle wird jedoch nur ein zweidimensi-

onales Hochfrequenzfeld erzeugt in dem sich die Ionen auf einer axialen Bahn bewegen. Der Auslass der akkumulierten Ionen kann sowohl axial als auch radial durch Löcher in den Quadrupolstäben durchgeführt werden, wodurch der gleichzeitige Einsatz von zwei Detektoren ermöglicht wird. Diese Besonderheit der LIT führt zu einer Empfindlichkeitssteigerung im Vergleich zur 3D-IT. Des Weiteren können aufgrund des größeren Volumens mehr Ionen eingefangen werden und aufgrund der besseren Verteilung entlang einer zentralen Achse (anstatt Fokussierung in einem Punkt) treten kaum Raumladungseffekte auf. Eine LIT ist somit aus verschiedenen Gründen leistungsfähiger als eine 3D-IT, verfügt jedoch nicht über die Möglichkeit, öfter als ein Mal Fragmentierungen durchzuführen. Der Einsatz einer einzelnen LIT wird nicht praktiziert. Vielmehr wird diese als Q3 in einem Tripel-Quadrupol-System (QqQ) betrieben, wo sie sowohl als Ionenfalle als auch als Ionenfilter agieren kann. Der Einsatz einer LIT in einem QqQ erhöht die Empfindlichkeit dieses Systems und ermöglicht zusätzliche Anwendungsmodi, vornehmlich der Target-Analytik.

Zusammenfassung

Die vier beschriebenen Massenanalytoren besitzen unterschiedliche Merkmale und Funktionsweisen, und kommen dementsprechend für verschiedene Aufgabenstellungen in der Analytik zum Einsatz. Für das Screening nach bekannten aber auch unbekannte Substanzen in Wasser und anderen Umweltmatrices sind das Flugzeitmassenspektrometer aufgrund der exakten Massenbestimmung sowie die 3D-Ionenfalle aufgrund der Möglichkeit von mehrstufigen Massenspektren besonders geeignet.

Die Anwendung eines Quadrupol-Massenspektrometers beschränkt sich meist auf den Bereich der Target-Analytik. Besondere Stärke zeigt die Quadrupol-Technologie hier als Triple-Quadrupol-System, welches in der LC-MS-Analytik aufgrund seiner hohen Nachweisstärke eingesetzt wird. Kombinationen mit einer linearen Ionenfalle ermöglichen weitere interessante Scan-Modi mit der Möglichkeit zur Empfindlichkeitssteigerung und der Durchführung eines weiteren MS/MS-Experimentes.

Der einzelne Quadrupol findet Anwendung in der GC-MS, da bei dieser Analysenmethode aufgrund der harten Ionisierung Fragmente der zu untersuchenden Substanz bereits in der Ionenquelle gebildet werden. Eine weitere Fragmentierung der gebildeten Ionen im Massenanalysator ist daher i. d. R. nicht erforderlich.

► KONTAKT

Dr. Wolfgang Schulz

Dr. Wolfram Seitz

Zweckverband Landeswasserversorgung,
Betriebs- und Forschungslaboratorium, Langenau

Tel.: 07345/9638-2291

Fax: 07345/9638-2290

schulz.w@lw-online.de

Prof. Dr. Dirk Flottmann

Angelina Taichrib

Fakultät Chemie

Hochschule Aalen

Tel.: 07345/576-2449

dirk.flottmann@htw-aalen.de