

Identifikation von Stoffklassen in der Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie

von Eberhard Hilf, Wilfried Tuszynski, Jakob Curdes, Frank Hillmann, Beate Curdes, Hans Barth



Probeneinführung am PDMS-Spektrometer

In unseren Arbeitsgruppen wird an einem relativ neuen massenspektrometrischen Verfahren geforscht, das besonders geeignet ist zur Analyse von Stoffen oder Stoffgemischen, die sich aus größeren Molekülen zusammensetzen. Wir stellen hier erste in Oldenburg gewonnene Ergebnisse von Messungen an Roh- bzw. Motorölen vor. Um die komplizierten Spektren den Proben zuzuordnen zu können, haben wir ein "intelligentes Identifikationsverfahren" (semilokale Ähnlichkeitsfilter) entwickelt und an diesen Proben getestet.

Das technische Verfahren

Die Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PDMS) ist ein Verfahren, bei dem eine zu untersuchende feste Probe mit schnellen (ca. 10.000 km pro Sekunde), schweren atomaren Ionen bestrahlt wird, um von ihrer Oberfläche vor allem intakte Moleküle in elektrisch geladener Form abzulösen. Diese Ablö-

sung von der Probenoberfläche (Desorption) ist vergleichsweise explosionsartig, denn die Zeit, die diese schnellen Ionen zum Durchfliegen der üblicherweise verwendeten Proben (Dicke: 1 bis 2 Mikrometer) benötigen, beträgt ca. 100 Femtosekunden. Das ist eine extrem kurze Zeit, sie ist kleiner als der millionste Bruchteil einer Millionstelsekunde. Eine große Anzahl von Elektronen in der Probe nimmt in dieser kurzen Zeit Energie vom durchfliegenden Ion auf und setzt sie dann kollektiv wieder frei. In dieser kollektiven und schockartigen Energiefreisetzung liegt die Besonderheit des Verfahrens. Ein vergleichsweise hoher Prozentsatz der Moleküle, die dadurch von der Probenoberfläche abgelöst werden, bleibt deshalb intakt. So eignet sich das Verfahren besonders zum Nachweis großer, organischer Moleküle, von denen mit vielen anderen Verfahren oft nur Molekülfragmente nachgewiesen werden können. Wir wollen deshalb dieses Verfahren auch für die Klassifikation von Stoffgemischen einsetzen.

Ein Teil der von der Probenoberfläche abgelösten Moleküle ist elektrisch geladen, d.h. sie sind ionisiert. Als Ionen können sie mit einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend je nach ihrer Flugzeit über eine feste Strecke mit Detektoren registriert werden. Wenn man diese Flugzeiten nun in die zugehörigen molekularen Massen umrechnet und alle Ereignisse mit der gleichen Flugzeit - und somit der gleichen Masse - summiert, erhält man ein Massenspektrum.

Ein Beispiel für ein solches PDMS-Massenspektrum ist in der ersten Abbildung dargestellt. Es handelt sich um ein Massenspektrum von β -Carotin, einem in Pflanzen, Algen oder Bakterien häufig vorkommenden Photosynthese-Pigment. Deutlich ist in diesem Spektrum der Molekülpeak bei einer Masse von 537 atomaren Einheiten zu erkennen. Das bedeutet, daß das

Abstract

The method of Plasma Desorption Mass Spectrometry is shown to be useful to identify samples of characteristic but unknown mixtures of chemical substances such as used motor oils. The experiments are performed with a new spectrometer at the University of Oldenburg. Due to the rather complex spectra an intelligent identification algorithm is necessary and has been developed. First tests in application to a set of crude oils are presented.

Molekulargewicht dieser Substanz 536 Dalton beträgt und das Molekülion durch Anlagerung eines Wasserstoffatoms entstanden ist. Die Gruppe von Linien im unteren Massenbereich des Spektrums ist Molekülfragmenten zuzuordnen, die in unmittelbarer Umgebung der Spur des schnellen, schweren Ions entstehen.

Die PDMS in Oldenburg

Seit 1989 besteht eine hervorragend funktionierende, interdisziplinäre Zusammenarbeit auf dem Gebiet der PDMS. An dieser Zusammenarbeit sind theoretische Physiker, experimentel-

le Physiker und Chemiker (Prof. Dr. Jürgen Metzger mit seiner Gruppe) beteiligt. Der Erfolg ist in zahlreichen Veröffentlichungen, Konferenzbeiträgen und durch die Ausrichtung mehrerer internationaler Konferenzen dokumentiert.

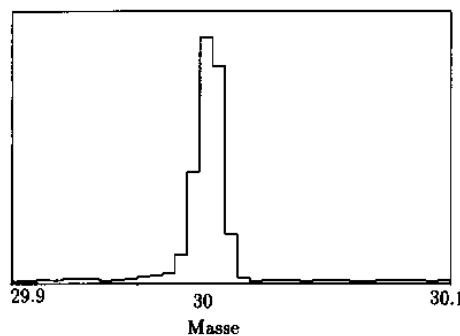
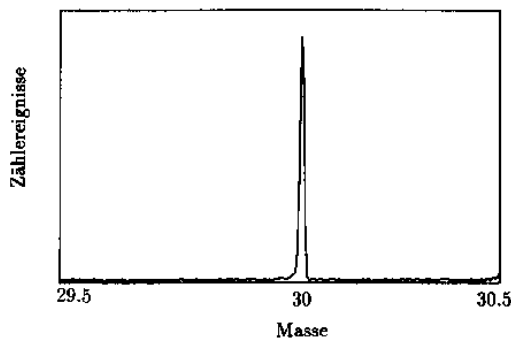
Das 1989 in Zusammenarbeit mit der Technischen Hochschule Darmstadt gebaute PDMS-Spektrometer ist seit seiner Fertigstellung ununterbrochen im Einsatz für Grundlagenforschung und für angewandte Fragestellungen. Im Grundlagenbereich interessiert uns vor allem eine weitere genaue Aufklärung des zur Ablösung und zur Ionisierung führenden Prozesses. Das führt z.B. zur theoretischen Modellierung oder Simulation des gesamten physikalischen Vorgangs, aber auch zur Erprobung konkreter Prozeduren in der Probenpräparation. Im angewandten Bereich wurde die PDMS z.B. erfolgreich zur Analyse von Photosynthese-Pigmenten und deren Abbauprodukten in Watt-sedimenten eingesetzt. Zur Zeit laufen in Oldenburg auch Versuche, in denen anstelle der schnellen, schweren Ionen kurze Laserpulse zur Anregung in den Proben verwendet werden. Dieses Verfahren ist dann sehr erfolgreich, wenn die Probensubstanz bei der Präparation in einem Material eingebettet wird, das geeignete chemische und physikalische Eigenschaften besitzt.

Die Präparation von PDMS-Proben

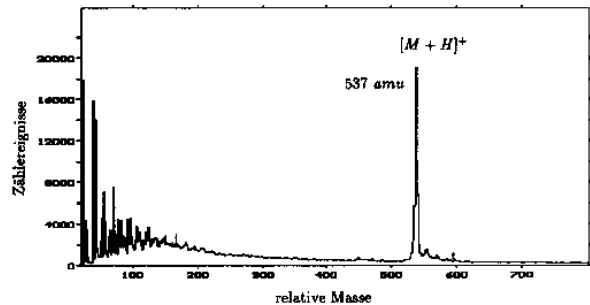
Die Probensubstanzen werden üblicherweise auf einer 1 bis 2 Mikrometer dünnen Folie aufgebracht, damit die schnellen, schweren Ionen die Probe durchdringen können. Die einfachste Art des Aufbringens ist das Eintrocknen eines kleinen Tropfens, in dem die Probensubstanz gelöst ist. Für viele angewandte Fragestellungen ist diese Präparationsart ausreichend. Bei der Analyse von größeren Molekülen oder von Stoffgemischen müssen die einzelnen Moleküle möglichst isoliert voneinander aufgebracht werden. Dazu eignet sich z.B. eine Präparation durch Adsorption, d.h. durch eine Anlagerung an einer Lösung auf eine feste Oberfläche im thermischen Gleichgewicht. Als feste Oberfläche hat sich bei der Analyse von Proteinen und Peptiden ein dünner Nitrocellulose-Film als sehr erfolgreich erwiesen. Dieses Material kann mit der Elektrospray-Methode auf die Probenfolie in gewünschter Schichtdicke aufgebracht werden und bindet wegen seiner Oberflächeneigenschaften diese Substanzklasse ausreichend fest. Bei der Vermessung der verschiedenen Öle wurde ebenfalls dieses Material als Substrat verwendet.

Das Auswertungsverfahren

Als Ausgang der Analyse sind Flugzeitspektren wie in der Abbildung oben, die typischerweise aus 65.000 Einzelzählen (Kanälen) bestehen (siehe Abb. unten).



Ein Peak des obigen Spektrums in 2 Auflösungen dargestellt



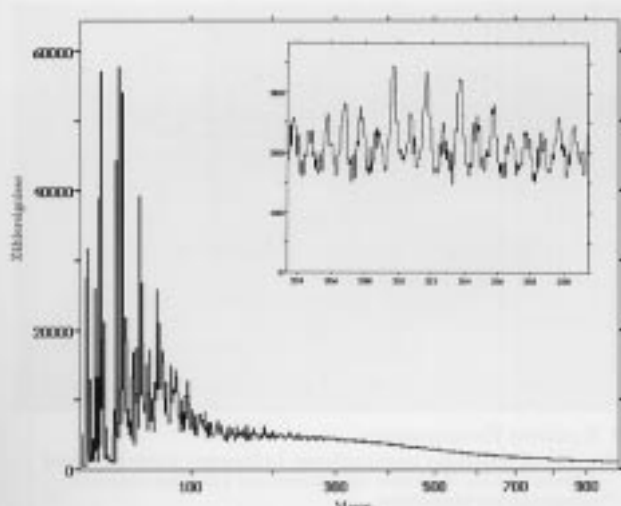
Positives PDMS-Spektrum von β -Carotin. Das Molekülion sieht man bei 537 atomaren Masseneinheiten. Das Ion wurde durch die Anlagerung eines geladenen Wasserstoffatoms erzeugt.

In einem ersten Schritt muß nun die Information über die tatsächlich auftretenden Massen aus diesem umfangreichen Spektrum extrahiert werden, also eine Liste mit auftretenden Massenzahlen und ihren Häufigkeiten erstellt werden. Hierfür haben wir einen schnellen Auswahl- und Integrationsalgorithmus entwickelt. So wird die Information von 65.000 Zahlen auf ca. 1000 verdichtet.

In einem zweiten Schritt wird nun nach bestimmten Regeln festgelegt, welche Massenlinien in diesem Spektrum „wichtig“ sind. Es handelt sich hier um mehrere meist semilokal wirkende Filter, die im wesentlichen das Flächenverhältnis eines Peaks zu seiner „Umgebung“ bewerten. Als „Umgebung“ kann man z.B. das gesamte Spektrum nehmen, dann werden alle Peaks, deren Fläche größer ist als der Mittelwert der Flächen aller Peaks im Spektrum, als „wichtig“ gekennzeichnet und somit zur Klassifizierung herangezogen. Wieviele Peaks auf diese Weise ausgewählt werden, hängt sehr von der Komplexität der Probe ab. Im Fall der obigen Probe sind es ca. 100, bei einem Rohöl etwa 400, also in jedem Falle deutlich mehr, als man mit dem Auge auswählen könnte.

Die Identifikation eines komplexen Systems wird umso sicherer, je mehr relevante Merkmale man verwendet, -wie ein Fingerabdruck. Es ergibt sich jetzt eine Liste von im Spektrum vorkommenden Massen, die wir als charakteristisch für die jeweilige Substanz (bei einem bestimmten Präparationsverfahren und einer bestimmten Meßvorschrift) ansehen.

Um nun das Massenspektrum einer unbekannt Substanz identifizieren zu können, muß eine Datenbank erstellt werden, die Informationen über bekannte Stoffe und Stoffklassen enthält. Nun kann man ein unbekanntes Spektrum mit den einzelnen Instanzen der Datenbank vergleichen. Solche numerischen Vergleichsmethoden sind aus der Mathematik als Ähnlichkeits-



Massenspektrum einer Roböls (Arabian Heavy Oil). Im kleinen Bild ist ein typischer Ausschnitt des Spektrums gezeigt; man erkennt, daß fast jede Masse vertreten ist.

maße bekannt; wir verwenden hier ein an die Verhältnisse von komplexen Massenspektren angepaßtes Maß. Es berücksichtigt z.B., daß die Zahl der gemessenen Ionen pro Zeiteinheit nicht negativ werden kann, es also keine negativen Beiträge geben darf.

Ein Beispiel: Identifikation von Ölen

Ein besonders interessantes Problem sind die technisch verwendeten Öle - sie enthalten besonders viele und oft auch schwere Moleküle, was ihre Identifikation relativ schwierig macht.

Wir haben uns einige technische Öle und Roböle als Testfeld genommen, um Verfahren zur Identifikation von solchen komplexen Proben zu entwickeln und zu erproben. Die Roböle gelten als besonders hartnäckig, weil in ihnen fast alle Massen vorkommen. Daher wird in der Literatur bei ihnen ein anderes Verfahren eingeschlagen: einige bekannte Biomarker, die genügend leicht sind, um mit bekannten chemischen Trennungsmethoden abgetrennt und nachgewiesen werden zu können.

In unserem Verfahren werden diese Informationen, sofern sie im "reduzierten Spektrum" noch enthalten sind, sozusagen implizit verwendet, d.h. ohne daß eine Kenntnis über als Marker geeignete Substanzen gefordert ist, allerdings somit auch ohne eine gegenüber anderen Informationen besondere Bewertung.

Es standen uns 7 verschiedene Öle, Roböle und Motorenöle, zur Verfügung. Diese Öle wurden mit einem Lösungsmittel stark verdünnt und auf einen beschichteten Probenträger aufge-

tragen. Von diesen Proben wurden dann mit unserem Spektrometer OLDA-1 Massenspektren erstellt. Wir erhielten ca. 50 Massenspektren von den 7 Ölen.

Von diesen wurde dann ungefähr die Hälfte in eine Datenbank eingespeist, die andere Hälfte wurde als unbekannt angenommen. Die Untersuchung dieser unbekanntesten Öle mittels der Datenbank ergab folgendes Ergebnis:

18 Spektren wurden korrekt identifiziert,
2 Spektren wurden einer falschen Substanz zugeordnet,
5 Spektren konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.
Eine Überprüfung der Fehleinordnungen ergab, daß sich diese auf bestimmte Probleme bei der Präparation und der Auswertung zurückführen ließen. Abgesehen davon ist die Datenbank noch zu klein. Dieser Mangel wird in nächster Zeit behoben werden, indem weitere Ölspektren gemessen werden.

Ausblick

Die Kombination Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie mit intelligenter numerischer Auswertung stellt ein leistungsfähiges Instrument zur Untersuchung auch komplexer Proben dar. Die Perfektionierung der eingesetzten numerischen Methoden lohnt sich, vor allem im Blick auf die umfangreichen Möglichkeiten im Bereich der Identifikation von Proben aus dem Umweltbereich.

* * * * *

Die AutorInnen



Prof. Dr. Eberhard R. Hilf (58) wurde nach Professuren an der TH Darmstadt und der Universität Düsseldorf 1985 als theoretischer Physiker an die Universität Oldenburg berufen. Zu seiner Arbeitsgruppe gehören der Doktorand Hans Barth und die DiplomandInnen Beate Curdes und Jacob Curdes. Die experimentellen Arbeiten wurden in der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik von Frank Hillmann (33) und Dr. Wilfried Tuszyński (50) durchgeführt.