

Fokus Analytik

NEWSLETTER DER RD&I ANALYTICS

NOVEMBER 2022

ANALYTIK VON BIOMOLEKÜLEN UND POLYMEREN –

MALDI-TOF-Massenspektrometrie

➔ Mit seinen Laboren in Hanau, Marl, Darmstadt und Shanghai bietet die Analytik von Evonik hochwertige quantitative und qualitative Analysen mittels organischer Massenspektrometrie (MS). Dabei stehen unseren Experten und Expertinnen in Kopplung mit Gas- und Flüssigchromatographie sowohl nieder- auflösende als auch hochauflösende Massenspektrometer zur Verfügung.

Seit Ende 2021 gibt es zusätzlich im MS-Labor in Hanau auch ein MALDI-TOF-Massenspektrometer für Ihre Fragestellungen im Bereich der Polymere und Biomoleküle.

Durch die dort eingesetzte Ionisierungstechnik in Verbindung mit der Massenbestimmung im Flugzeit-Massenspektrometer eröffnen sich neue Möglichkeiten zur Untersuchung von großen Molekülen z.B. intakte Proteine und/oder Polymerverteilungen bis ca. 100 kDa.



Abbildung 1: Metallträger (Target) bereit für die Matrixpräparation

DAS PRINZIP

MALDI steht für „Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung“ und TOF für „time of flight“, also die Flugzeit der freigesetzten Ionen. Bei diesem Messverfahren wird die Probe zunächst zusammen mit einer Hilfs-Matrix auf einem Träger (Target) kristallisiert (siehe Abbildung 1). Die Hilfs-Matrix ist zum einen in der Lage UV-Licht zu absorbieren und dessen Energie auf die Probe zu übertragen und hat zum anderen die Aufgabe elektrische Ladungen zu übertragen (z.B. durch Protonierung).

Zur Analyse wird die Trägerplatte mit der präparierten Probe in das Gerät geschleust und mit einem UV-Laser beschossen. Die Matrix wird dadurch verdampft, die Energie des Lasers an die Probe weitergegeben, die Probe ionisiert und in die Gasphase befördert (siehe Abbildung 2).

Die Molekülonen werden nun in einem elektrischen Feld beschleunigt und treffen nach einer Flugstrecke von ca. 1,5 m auf den Detektor.

Durch die Messung der Flugzeit zwischen Laserpuls und dem Detektorauschlag kann das Molekulargewicht bestimmt werden: größere Moleküle fliegen langsamer und sind entsprechend länger unterwegs als kleinere Moleküle (siehe Abbildung 3).

DIE VORTEILE DER HILFS-MATRIX:

Ein großer Vorteil der MALDI-TOF-MS ist die sehr schonende Ionisierung und Freisetzung der Moleküle durch die indirekte Energieweitergabe durch die Hilfsmatrix. Die Matrix kann entsprechend der chemischen Eigenschaften der Probe ausgewählt werden. Dadurch lassen sich auch Moleküle, die auf andere Weise nicht ionisierbar sind, analysieren.

Dabei erzeugt die schonende Art der Ionisierung meist nur eine geringe Anzahl von Ladungen – in der Regel werden auch große Moleküle noch als einfach geladene Moleküle detektiert, was die Auswertung der Massenspektren stark vereinfacht. Dies ist insbesondere ein Vorteil bei Molekülen, die eine Synthese- und/oder Rohstoff-bedingte Polymerverteilung mit sich bringen. Mit Elektrospray-Ionisation (ESI) können solche Spektren aufgrund der zusätzlichen Überlagerung verschiedener Ladungszustände praktisch nicht mehr ausgewertet werden.

PRINZIP MALDI-TOF

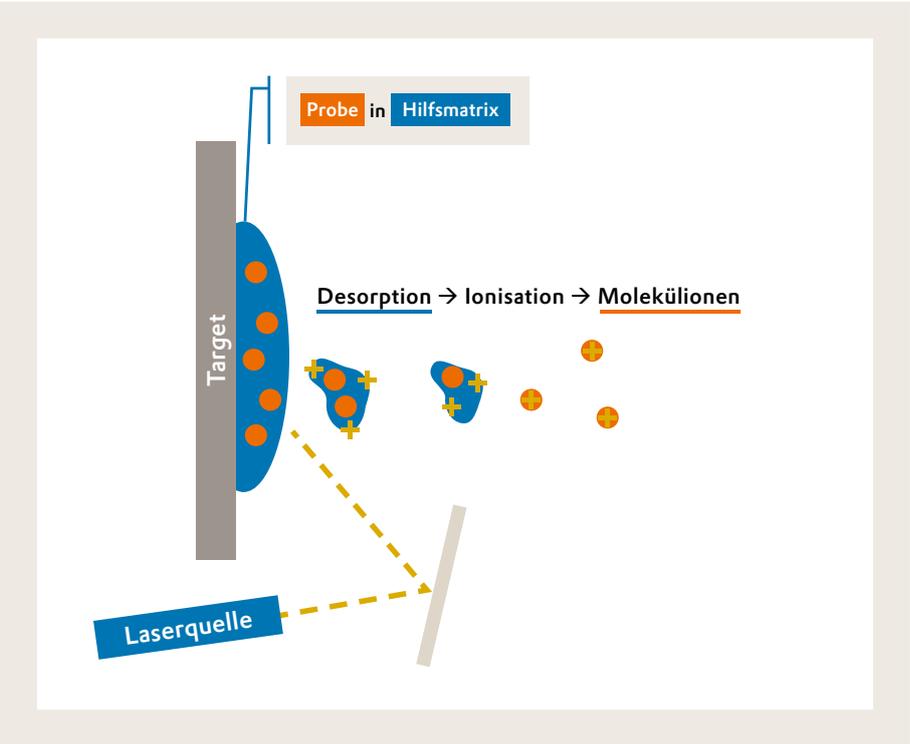


Abbildung 2: Prinzip des Ionisierungsvorgangs von Molekülen in der Probenmatrix beim MALDI-TOF

Bei MALDI bleiben die Massenspektren übersichtlich und eine Polymerverteilung kann als solches aufgezeigt werden (siehe Abbildungen 4).

DER GEEIGNETE MESSMODUS:

Je nach Fragestellung kann

- im Linearen Modus („unbegrenzte“ Messzeit = Erfassung aller Ionen, auch mit sehr hohem Molekulargewicht) mit geringerer Auflösung oder

- im Reflektor Modus (begrenzte Messzeit = nicht alle Ionen werden erfasst) mit einer höheren Auflösung aufgrund der längeren Flugstrecke gemessen werden.

So kann z.B. bei kleineren Molekulargewichten bis ca. 5 kDa und ausreichend protonierbaren Positionen eine Massengenauigkeit von bis zu 10 ppm erreicht werden. Die Wahl des Modus hängt somit auch von den Proben und deren Zielmolekulargewicht ab.

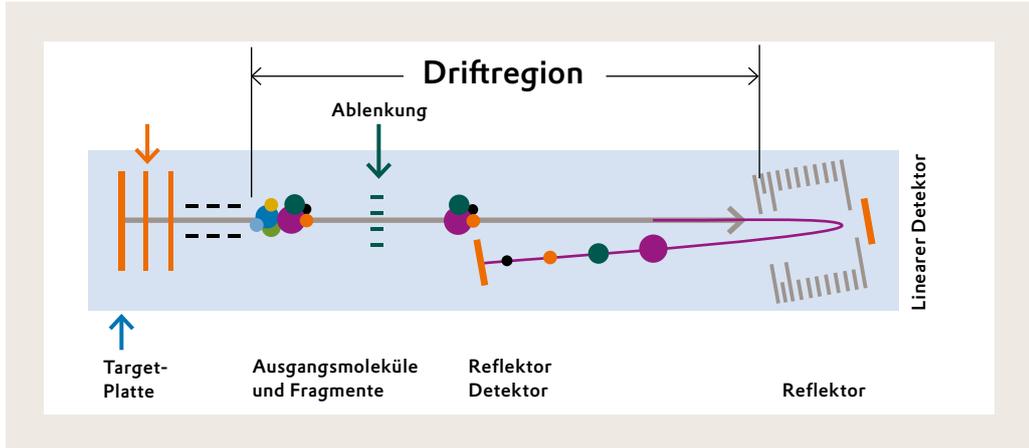


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ionenauffrennung im MALDI-TOF-MS aufgrund der unterschiedlich langen Flugzeit.

GENERELLER EINSATZ DER ANALYSENTECHNIK:

Peptide/Proteine

In erste Linie wird die Technik mit der Analyse von Peptiden und Proteinen in Verbindung gebracht. Inzwischen überwiegen im Routinebetrieb Applikationen wie die Identifizierung von Krankheitserregern in Krankenhäusern.

Hier kommt die hohe Geschwindigkeit zum Tragen, mit der die Proben im Screeningverfahren mit sehr kurzen Analysenzeiten untersucht werden können.

Dabei werden nur geringste Probenmengen im fmol-Bereich benötigt (z.B. aus Protein-Verdau von Spots aus 2D-Gelen). Bekannt ist hier zum Beispiel das automatisierte „High Throughput Peptide Mapping“ in Proteom-Anwendungen, in dem über die Einfachladung im „Fingerprintbereich“ eine schnelle Datenbankanalyse und Zuordnung möglich ist.

Polymere

Der schonende Ionisierungsvorgang macht diese Technik insbesondere auch für die Analyse von Polymeren (z.B.

Polyethylenglykole, organomodifizierte Polydimethylsiloxane) interessant. Die Polymerketten werden nicht fragmentiert und können als Ganzes analysiert werden. Auf diese Weise sind Molekulargewichte bis über 100 kDalton messbar.

In Abhängigkeit von der mittleren Molekulargewichtsverteilung können dabei die Polymere selbst bzw. deren Modifikationen auch in Mischungen (siehe Beispiel Polyethylenglykol, Abb. 4) bis zu einem Molekulargewicht von ca. 20 kDalton noch identifiziert werden.

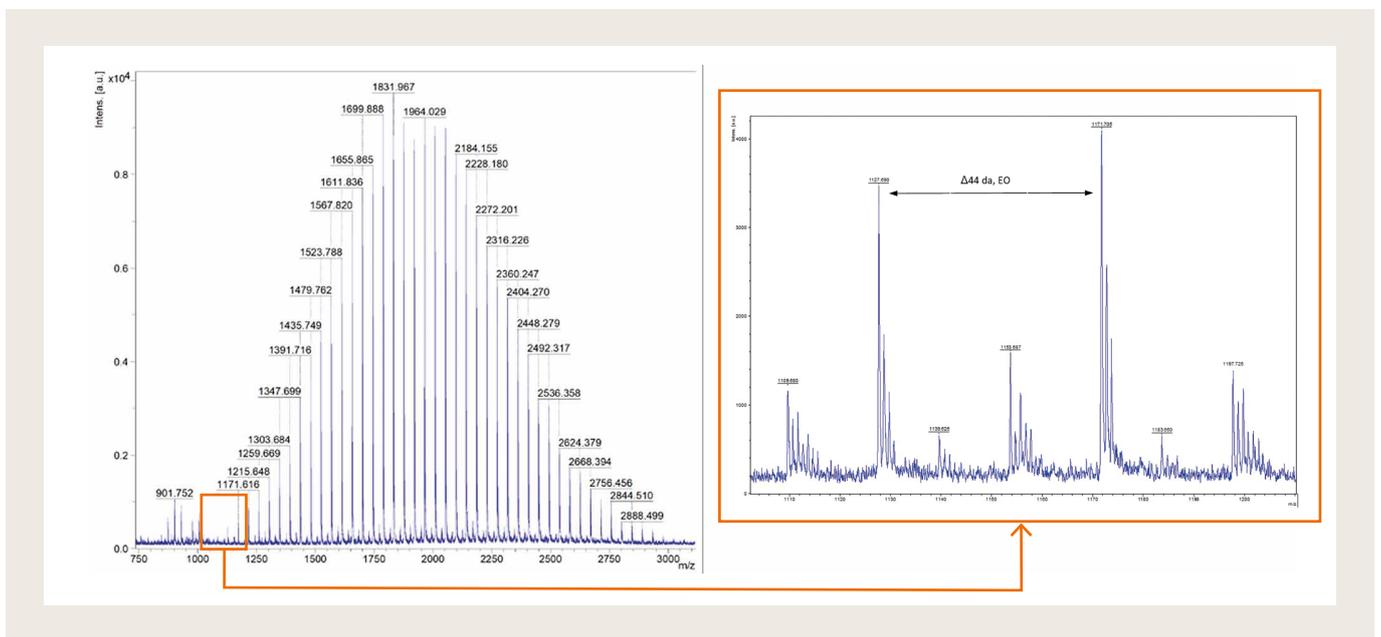


Abbildung 4: Beispiel für ein MALDI-TOF Massenspektrum eines Polyethylenglykols mit hoher Auflösung. Übersichtsspektrum auf der linken Seite und beispielhafte Ausschnittvergrößerung auf der rechten Seite.

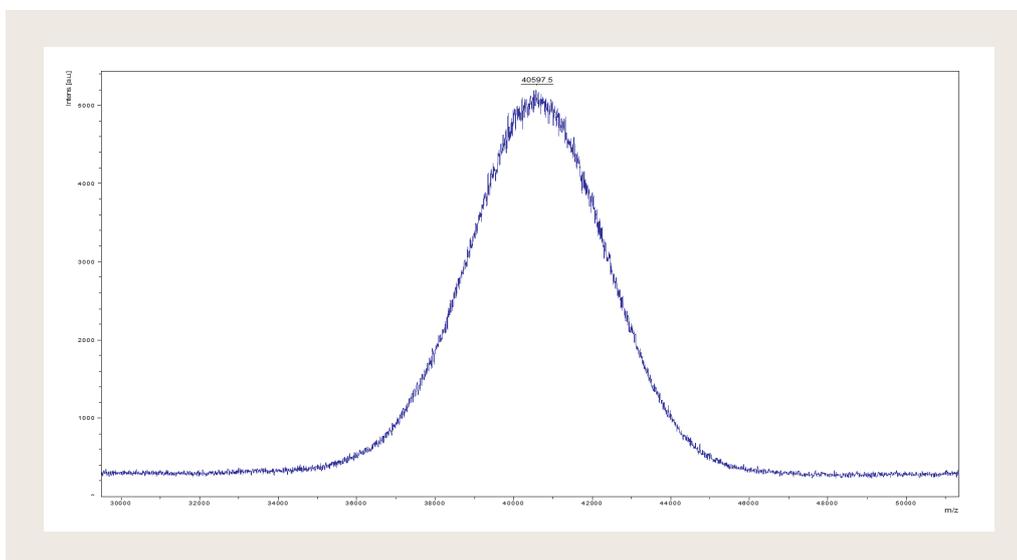


Abbildung 5: Darstellung des MS-Signals eines Polymers bei niedriger Auflösung

Bei Molekulargewichten von größer ca. 20 kDalton erhält man bei abnehmender Auflösung den aus der Gelpermeationschromatographie (GPC) bekannten Kurvenverlauf. Bei sich immer stärker überlagernden Signalen der Polymerverteilung kann dann nur noch die mittlere Molmasse (siehe Abbildung 5) ermittelt werden.

Da Polymere insbesondere im Pharmakumfeld eine zunehmend größere Rolle spielen, wurde speziell für diesen Qualitätsstatus das Gerät unter GMP (Good Manufacturing Practice) qualifiziert. Somit kann die Analytik nach einer entsprechenden produktspezifischen Methodenentwicklung und Methodenvalidierung für den Pharmabereich auch unter GMP angeboten werden.

Das MALDI-TOF-MS ergänzt unser Angebot in der Massenspektrometrie um einen wichtigen Baustein und ermöglicht die Lösung schwieriger Fragestellungen im Bereich der Analyse großer Moleküle. Dabei zeichnet sich die Technik unter anderem durch Ihre Variabilität bei der Probenvorbereitung, die gute Ionisierbarkeit von schlecht ionisierbaren Molekülen und die kurzen Messzeiten aus.

Als weiterer Vorteil ist der äußerst geringe Bedarf an Probenmenge zu nennen, was diese Technik insbesondere für Proben aus Forschung und Entwicklung interessant macht.

Das Team der Massenspektrometrie in Hanau unter der Leitung von Dr. Jürgen Volz freut sich auf Ihre Fragestellungen.

IMPRESSUM

**Evonik Operations GmbH
RD&I Analytics**

Standort Darmstadt
Kirschenallee
64293 Darmstadt

Standort Hanau
Rodenbacher Chaussee 4
63457 Hanau

Standort Marl
Paul-Baumann-Str. 1
45772 Marl

Evonik (SEA) Pte Ltd
21 Biopolis Road Nucleos Tower A (South)
Level 1M Unit #01-35
Singapore 138567, Singapore

Evonik (SHA) IM Co., Ltd.
68 Chundong Road,
Xinzhuang Industry Park,
Shanghai 201108, China
<https://analytik.evonik.de/>

Kontakt:
juergen.volz@evonik.com

Verantwortlicher:
Dr. Matthias Janik

Bilder: Evonik, Geräte-Manual von Bruker Daltonics

Stand der Information:
November 2022