

Schnelle TOF-Massenspektrometrie

Hadamard-Transformations-Flugzeitmassenspektrometrie: gesteigerte Signalintensität bei gleicher Messzeit

Richard N. Zare,* Facundo M. Fernández und Joel R. Kimmel

Stichwörter:

Analytische Methoden · Hadamard-Transformation ·
Massenspektrometrie · Signal-Multiplexing

Die Hadamard-Transformations-Flugzeit(HT-TOF)-Massenspektrometrie ist eine massenspektrometrische Methode, die kontinuierlich strahlende Ionenquellen mit der Puls-Technik von Flugzeitmessungen kombiniert. Anders als die konventionelle TOF-Massenspektrometrie hat die Hadamard-Transformations-Methode einen Auslastungszyklus von 50 % mit der Möglichkeit zur Erweiterung auf 100 %. Da es sich um ein Multiplex-Verfahren handelt, ist das erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis bedeutend höher als bei der konventionellen TOF-Massenspektrometrie. Der vorliegende Kurzaufsatz stellt die grundlegenden Prinzipien der HT-TOF-Massenspektrometrie, des hohen Auslastungszyklus und des Signal-Rausch-Verhältnisses vor. Diese Vorteile eröffnen eine Spektrenaufnahmegeschwindigkeit, die schneller ist als die von vergleichbaren Geräten: Detektoren für Hochgeschwindigkeits-Trennungen sind somit in greifbare Nähe gerückt.

1. Einleitung

Ein Massenspektrometer ist ein Gerät zur Bestimmung von Molekülmassen. Zunächst werden ungeladene Moleküle in positiv oder negativ geladene Ionen umgewandelt, die anschließend ein bekanntes elektrisches oder magnetisches Feld durchqueren. Die Bewegung des Ions in diesem Feld hängt von seiner Masse und Ladung ab. Demzufolge ermöglicht die Analyse der Ionenbewegung die Bestimmung des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z), und somit der Molekülmasse. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Massenspektrometer. Die bei weitem einfachste und kostengünstigste Methode ist die Flugzeitmassenspektrometrie (TOF-MS), bei der Ionen unterschiedlicher Masse denselben Potentialabfall erfahren, und damit Ionen mit derselben

kinetischen Energie aber unterschiedlicher Geschwindigkeit erzeugt werden. Nach der Beschleunigung wird die Flugzeit eines Ions über eine vorgegebene Distanz zwischen dem Ausgangspunkt und dem Ionendetektor bestimmt. Hierbei ist das Quadrat der Flugzeit t direkt proportional zum m/z -

Verhältnis des Ions. Wir beschreiben hier eine neuartige Methode der TOF-Massenspektrometrie, die mit hoher Effizienz die schnelle Aufnahme von Massenspektren ermöglicht.

Die TOF-MS verwendet eine gepulste Ionenquelle – es entstehen einzelne Ionenpakete. Bei der konventionellen Vorgehensweise wartet das System jedes Mal solange, bis alle Ionen eines Pakets den Detektor erreicht haben, bevor das nächste Ionenpaket erzeugt wird. Dieses Impuls-Verfahren führt zu Komplikationen, wenn ein TOF-Massenspektrometer mit einer kontinuierlichen Ionenquelle gekoppelt wird. Eine solche Kopplung wird häufig durch einen orthogonalen Extraktionsvorgang erreicht, bei dem ein Ionenpaket mit einem Winkel von 90° aus einem kontinuierlichen Ionenstrom in Richtung des Ionendetektors gestoßen wird. Wegen des Zeitverlusts zwischen den einzelnen Extraktionen der Ionenpakete beträgt der Auslastungszyklus bei einem Instrument mit orthogonaler Extraktion normalerweise 5 bis 15 %. Dies bedeutet, dass bis zu 95 % der in einem Ionenstrom enthaltenen Information verloren geht. Im Gegensatz dazu beschreiben wir hier ein kontinuierliches Modulations-/Demodulationsschema, das im Durchschnitt die Detektion der

[*] Prof. R. N. Zare, Dr. F. M. Fernández, J. R. Kimmel
Department of Chemistry
Stanford University
Stanford, CA 94305-5080 (USA)
Fax: (+1) 650-723-9262
E-mail: zare@stanford.edu

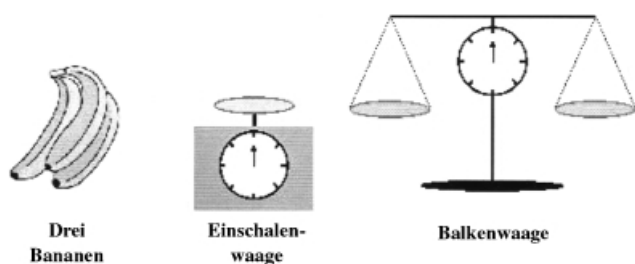


Abbildung 1. Wiegen von drei Bananen mit zwei unterschiedlichen Waagen.

Hälfte aller Ionen des Ionenstroms zulässt. Somit ergibt sich eine Auslastung von 50 %. Zudem können über 250 Massenspektren pro Sekunde gesammelt werden, da der Ionenstrahl mit einer Frequenz von 10 bis 20 MHz moduliert wird. Die hohe Abtastrate und die Hochleistungsendektion gestatten die Kombination einer solchen TOF-MS-Variante mit sehr schnellen chromatographischen und elektrophoretischen Trennmethode vor der Ionisierung; dies eröffnet einen großen dynamischen Bereich und eine enorme Leistungsfähigkeit im Hinblick auf die Trenn-, Detektions- und Quantifizierungsmöglichkeiten komplexer Substanzgemische.

Um die Problematik zu verdeutlichen, wollen wir ein sehr einfaches Beispiel heranziehen: das Wiegen von drei Bananen mit einem geringen Massenunterschied. Dieses Beispiel scheint auf den ersten Blick trivial zu sein, führt aber zu einem tieferen Verständnis des Wägeprozesses. Angenommen unsere Wägevorrichtung ist eine Einschalenwaage (Abbildung 1), die für die Messung eine Sekunde benötigt und deren Ansprechverhalten eine Unsicherheit hat, die mit der Quadratwurzel des Signals – also mit der Quadratwurzel der Masse – einhergeht. Welche Vorgehensweise ist nun die beste, um das Gewicht der einzelnen Bananen exakt zu bestimmen?

Auf den ersten Blick scheint die Antwort auf der Hand zu liegen. Jede Banane wird auf die Waagschale gelegt und einzeln eine Sekunde lang gewogen. Bei näherer Betrachtung kommt man jedoch zu der Erkenntnis, dass es besser ist, die Bananen zusammen als drei verschiedene Paare zu wiegen und anschließend jeweils das Gewicht eines Paares von dem der anderen zu subtrahieren, um das Gewicht jeder einzelnen der drei Bananen zu bestimmen. Die zweite Methode liefert das gleiche Ergebnis, jedoch mit einer höheren Genauigkeit. Warum? Die Einschalenwaage benötigt die gleiche Zeit zum Wiegen mehrerer Bananen. Ähnlich wie in diesem Wägebeispiel suchen wir nach einem Signal-Multiplex-Schema für die TOF-MS, um mehr Zeit zum Detektieren der Ionen im Ionenstrom zur Verfügung zu haben.

Im Folgenden wollen wir uns der Herausforderung stellen, eine optimale Wägestrategie für die drei Bananen zu finden, indem wir die Einschalenwaage durch eine Balkenwaage ersetzen (Abbildung 1). Die beste Wägeprozedur für eine solche Waage ist, eine Banane auf die eine Seite und die beiden anderen auf die andere Seite zu legen. Der Wägevorgang wird noch zweimal wiederholt, wobei jedes Mal eine andere Banane als Gegengewicht gewählt wird. Die Balkenwaage ist der Einschalenwaage überlegen, da mit zwei Schalen alle drei Bananen gleichzeitig gewogen werden können und somit die Qualität der Information besser ist.



Richard N. Zare promovierte an der Harvard University (BA in Chemistry und Physics, 1961; Ph.D. in Chemical Physics, 1964) und war Professor am Massachusetts Institute of Technology (1965), an der University of Colorado (1966–1969), und an der Columbia University (1970–1977) bevor er 1977 einen Ruf an die Stanford University annahm. Er erhielt zahlreiche Auszeichnungen und Ehrendoktorwürden und ist Autor und Coautor von mehr als 650 Publikationen.



Facundo M. Fernández wurde 1970 in Buenos Aires, Argentinien, geboren. Im Jahr 1995 erhielt er seinen MSc in Chemie vom College of Exact and Natural Sciences und 1999 seinen Ph.D. in Analytischer Chemie von der Buenos Aires University. Er schloss sich im Jahr 2000 der Arbeitsgruppe von Richard N. Zare an der Stanford University an. Seit 2002 ist er Mitglied der Arbeitsgruppe von Vicky Wysocki an der University of Arizona.



Joel R. Kimmel erhielt 1999 seinen BS in Chemie von der Colorado State University in Fort Collins, CO. Zurzeit forscht er als Doktorand unter der Anleitung von Richard N. Zare an der Stanford University, wo er sich mit der Entwicklung von Hadamard-Transformations-Flugzeit-Massenspektrometern beschäftigt.

Übertragen auf die TOF-MS bedeutet dies, dass der Auslastungszyklus von 50 auf 100 % erhöht wird. Aber zunächst zeigen wir, wie man eine Auslastung von 50 % erreichen kann.

Die konventionelle TOF-MS entspricht der Einschalen-Wägemethode, bei der jede Banane einzeln gewogen wird. Die Ionenquelle wird mit einer konstanten Geschwindigkeit gepulst, wodurch nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zu einem gegebenen Zeitintervall am Detektor auftreten. Wie die Bananen können auch Ionen moduliert und detektiert werden, sodass die Messung in jedem einzelnen Zeitintervall Informationen über alle m/z -Verhältnisse liefern. Dies wird durch das Ein- und Ausschalten eines kontinuierlichen Ionenstrahls mithilfe eines Gitters erreicht. Die Modulation erfolgt so schnell, dass sich stets mehrere Ionenpakete in der Flugkammer befinden. Unterschiede in der Ionenfluggeschwindigkeit führen dazu, dass sich Pakete während des Flugs überlappen und der Detektor mehrere m/z -Verhältnisse registriert. Die Interpretation des Signals erfordert die Kenntnis der Gittermodulationssequenz. Das Ionengitter wird mit einer vorgegebenen Impulssequenz ein- und ausgeschaltet, die binär durch „0“ und „1“ beschrieben werden kann. Enthält die Sequenz eine „1“, dann wird ein

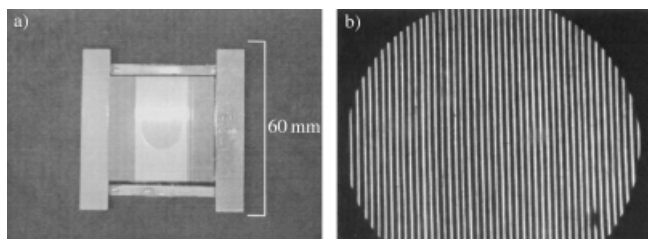


Abbildung 2. a) Fein strukturiertes Bradbury-Nielsen-Gitter (Vorderansicht, 100 µm Abstand) und b) vergrößerter Ausschnitt der optischen Blende mit den beiden überlappenden Drahtsätzen.

Ionenpaket in Richtung des Detektors gestoßen, bei einer „0“ werden die Ionen abgelenkt und erreichen somit den Detektor nicht. Die beste Modulationssequenz besteht aus einer gleichen Anzahl von Einsen und Nullen, ein Detektor hat somit eine Auslastung von 50 %.

Durch die Verwendung eines Bradbury-Nielsen-Gitters (BNG) können die „Ein-/Aus-Impulse“ zeitlich und räumlich präzise erzeugt werden (Abbildung 2).^[1,2] Ein BNG besteht aus zwei elektrisch isolierten äquidistanten Drahtsätzen, die in einer Ebene liegen, aber deren Spannung abwechselnd positiv und negativ ist. Wenn keine Spannung an das Gitter angelegt ist, wird die Flugbahn des Ionenstrahls durch das BNG nicht beeinflusst. Um den Strahl abzulenken, werden gleich große Spannungen unterschiedlicher Polarität an die beiden Drahtsätze angelegt – der Ionenstrahl trifft somit nicht auf den Detektor. Um von den geladenen Drähten abgelenkt zu werden, müssen die Ionen einen Abstand zum Gitter haben, der ungefähr demjenigen zwischen den geladenen Drähten entspricht. Es ist folglich möglich, den Ionenstrahl zu kontrollieren und ihn an einem exakt lokalisierten Startpunkt ein- und auszuschalten.

Brock et al.^[3,4] haben als Erste den Einsatz eines BNG für die axiale Modulation eines Ionenstrahls mit einer wohldefinierten Pseudozufallssequenz von Impulsen beschrieben, die Ionen durchlässt oder ablenkt. Dieses BNG kann zum Teilen von Ionenpaketen in unterschiedliche Längen eingesetzt werden. Die Ionen in diesen Paketen bewegen sich ausgehend vom BNG mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Flugkammer zum Ionendetektor, wobei die Flugzeiten typischerweise im Bereich von einigen hundert Mikrosekunden liegen. Am BNG ist die zeitliche Ausdehnung eines Ionenpakets und das Intervall zwischen den aufeinander folgenden Ionenpaketen um drei Zehnerpotenzen kleiner als ihre Flugzeiten (ns gegenüber µs). Folglich überholen schnellere Ionen in einem Paket langsamere Ionen eines vorausgegangenen Pakets, was zu einer Überlappung und Durchdringung der Ionenpakete während ihres Flugs durch die Flugkammer führt. Die Antwort des Detektors scheint nur aus einem Rauschen zu bestehen (Abbildung 3a), aber diese Einschätzung ist falsch. Tatsächlich besteht das Detektorsignal aus einer Vielzahl herkömmlicher, überlagerter TOF-Massenspektren, die entsprechend der binären Pseudozufallsmodulationssequenz zeitlich verschoben sind. Das TOF-Massenspektrum kann durch Demodulation des Detektorsignals mithilfe der bekannten verwendeten Sequenz extrahiert werden (Abbildung 3b). Die Demodulation entspricht mathematisch einer inversen Hadamard-Transformation;

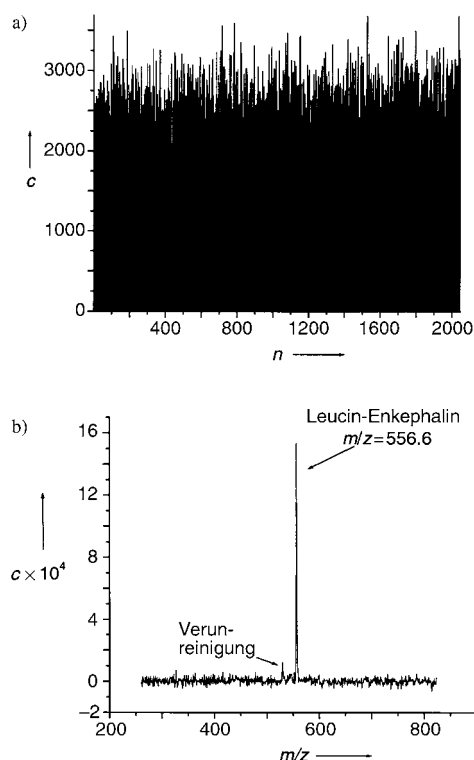


Abbildung 3. ESI-HT-TOF-Massenspektrum von 1.4 pmol Leucin-Enkephalin (1 +) in Methanol/Wasser/Essigsäure (50:50:1). Die Messzeit betrug 2 s. a) Rohdaten (überlagerte Spektren; Konvolution). b) Entfaltetes Massenspektrum (Dekonvolution), das in einem niedrigen Auflösungsmodus erhalten wurde.^[19] Die Pseudozufallsbinärsequenz bestand aus $(2^{11}-1) = 2047$ Elementen mit jeweils 100 ns Zeitintervall. c = Signaleinheiten, n = Speichernummer.

daher wird dieses Verfahren als Hadamard-Transformations-Flugzeitmassenspektrometrie (HT-TOF-MS) bezeichnet. Unter idealen Bedingungen, d.h., die genaue Modulationssequenz für die Ionen ist bekannt, erhält man aus der Transformation ein unverzerrtes Massenspektrum.

Die Hadamard-Transformation gehört zur gleichen Familie von Transformationen wie die bekanntere Fourier-Transformation.^[5] Bei der Fourier-Transformation werden die Basisfunktionen dazu verwendet, die Signalfunktion in der Zeitdomäne als eine unendliche Reihe von Sinus- und Cosinus-Funktionen auszudrücken. Hingegen wird bei der Hadamard-Transformation eine endliche Reihe binärer Elemente als Basissatz verwendet. Dies hat zur Folge, dass die Hadamard-Transformation bedeutend schneller zu berechnen ist und nicht unter Kantenglättungseffekten leidet (ein Vorgang, bei dem das Signal verzerrt wird, da die Messzeit nicht ausreichend hoch ist, um die Signalmerkmale zu erfassen). Hadamard-Transformationen werden bei vielen Analysemethoden verwendet, beispielsweise bei der Raman-Spektroskopie,^[6] der Kapillarelektrophorese^[7,8] und der Fourier-Transformations (FT)-Massenspektrometrie.^[9] Generell sind sie für jedes Phänomen anwendbar, das als eine Reihe von Ein-/Aus-Signalen interpretiert werden kann. Da die Verwendung von Hadamard-Transformationen eher ungewohnt ist, soll sie hier an einem einfachen Beispiel näher erläutert werden. Im Anschluss daran zeigen wir die Anwendung der HT-TOF-MS zur Analyse einer Peptidmischung

– eine Anwendung, die die Leistungsfähigkeit von verschiedenen Trennmethode in Kombination mit der HT-TOF-MS veranschaulicht.

2. Die Grundlagen der HT-TOF-Massenspektrometrie

Die Grundlagen der HT-TOF-MS möchten wir an einem einfachen Modell erklären. Hierfür benötigen wir zuerst ein TOF-Spektrum: Die virtuelle Probe ist eine wässrige Lösung, die ein Peptid P (Molekulargewicht (MG) = 1620 Da) und ein Protein enthält, beispielsweise eine Protease (MG = 56000 Da). Eine Methode zur Erzeugung von Ionen in der Gasphase ist die Elektrosprayionisation (ESI). Bei der ESI wird die Probe durch eine Nadel versprüht, an der eine hohe Spannung anliegt.^[10] Das elektrische Feld bewirkt die Bildung von fein verteilten geladenen Tröpfchen. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels nimmt die Ladungsdichte der Tröpfchen zu und führt zu einer Coulomb-Explosion, wodurch noch kleinere Tröpfchen entstehen. Mehrfaches Verdampfen und Zerstäuben führt zur Bildung eines Strahls „nackter“ positiv geladener Ionen in der Gasphase. Verbindungen wie Peptide und Proteine sind häufig mehrfach geladen. Ihr Signal im TOF-Spektrum erscheint somit bei einem niedrigeren m/z -Verhältnis als das des entsprechenden einfach geladenen Moleküliens.

Um das TOF-Spektrum einer virtuellen Probe in einem konventionellen TOF-Massenspektrometer aufzunehmen, muss das BNG für ein vorgegebenes Zeitintervall (wenige hundert Nanosekunden) geöffnet und danach wieder geschlossen werden. Die Ionen des Pakets, die das geöffnete, d. h. ungeladene, Gitter passiert haben, fliegen durch die Flugkammer und werden mit der jeweiligen Ankunftszeit am Detektor registriert. Ionen, die am geladenen Gitter ankommen, werden abgelenkt und erreichen den Detektor nicht. Die Signale werden normalerweise in Zeitintervallen, die wenige Nanosekunden umfassen, mit einem Zeit-Digital-Konverter erfasst. Jedoch wurden, um die Rechnungen zu vereinfachen und die Größe der benötigten Hadamard-Matrix zu reduzieren, diese Zeitintervalle in unserem Beispiel um ein Vielfaches vergrößert. Bei einem angenommenen elektrischen Feld von 10 kV und einer 50 cm langen Flugstrecke liegen die Flugzeiten der Komponenten unserer Probenmischung bei 1.56 μs für $\text{H}_2\text{O}^+(1+)$, bei 10.24 μs für Substanz P $(2+)$ und bei $(10+)$ 26.94 μs für die Protease. Um ein vollständiges Massenspektrum aufzunehmen, haben wir das Datenakquisitionssystem so gewählt, dass die Signalmessung in sieben Zeitintervallen mit einer Breite von 5 μs erfolgt. Diese Anordnung ist ausreichend, um eine maximale Flugzeit von 35 μs zu registrieren, was einer maximalen Masse von 9560 Da entspricht.

Das zu erwartende, virtuelle Spektrum ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Intensität eines jeden Signals entspricht dem Vorkommen dieser Komponente in der Lösung, multipliziert mit der jeweiligen Ionisierungswahrscheinlichkeit. Willkürlich wurde ein Verhältnis von 3:2:1 für die Signalfächen angenommen. Die Lösungsmittelsignale spiegeln lediglich die Menge an Ladung wider, die durch ionisierte Solvensmole-

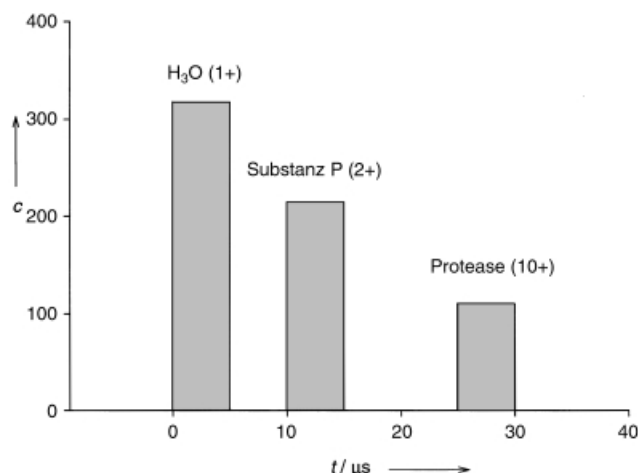


Abbildung 4. TOF-Massenspektrum, das für das Peptidmodell verwendet wurde. c = Signaleinheiten, t = Flugzeit.

küle transportiert wird,^[11] und enthalten gewöhnlich keinerlei analytische Informationen. Jedes Signal des in Abbildung 4 dargestellte Massenspektrums hat ein Hintergrundrauschen, das proportional zur Quadratwurzel der Ionenintensität ist.^[12] Im speziellen Fall der Protease wurde ein Rauschniveau von 10 Signaleinheiten pro Zeitintervall ($\sqrt{100} = 10$) gewählt. Somit ist das Signal-Rausch-Verhältnis für das Protease-Signal $100/10 = 10$. Zeitintervalle, die keine Signale enthalten, weisen nur das Hintergrundrauschen auf.

Danach führen wir das gleiche Experiment unter Verwendung des Hadamard-Multiplex-Verfahrens durch. Eine Hadamard Matrix H_n , n -ter Ordnung, besteht aus den Elementen +1 und -1. Das Skalarprodukt zweier beliebiger verschiedener Zeilen oder Spalten dieser Matrix ist null.^[13] Wie zuvor erwähnt, wird ein Massenspektrometer dazu verwendet die Molekülmasse zu bestimmen. Um die $(+1)$ - und (-1) -Zustände in einer Hadamard-Matrix aufnehmen zu können, benötigt man ein Spektrometer, das mit zwei Detektoren ausgestattet ist – in Analogie zur Balkenwaage in unserem Beispiel mit den drei Bananen. Das Hadamard-Multiplex-Verfahren kann jedoch auch mit nur einem Detektor durchgeführt werden, vorausgesetzt man verwendet eine Hadamard-Matrix, die nur die Elemente +1 und 0 enthält. Solche Matrizen, die auch als Simplex-Matrizen bezeichnet werden, können leicht aus Hadamard-Matrizen abgeleitet werden.^[13] Die Verwendung einer Simplex-Matrix ist vergleichbar mit dem Wiegen eines Bunds Bananen mit einer Einschalenwaage. Wie beim konventionellen TOF-Massenspektrum muss auch beim Multiplex-Verfahren eine maximale Flugzeit von 35 μs in sieben Zeitintervallen untergebracht werden. Es wird daher eine Simplex-Matrix vom Typ (7,7) benötigt (Abbildung 5).

Welche Bedeutung hat diese Matrix? Ihre erste Reihe enthält die Folge der Spannungsimpulse, die an das Ionengitter im Abstand von 5 μs gesendet werden. Eine Sequenz von „1 1 1 0 1 0 0“ bedeutet, dass der

$$S = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

Abbildung 5. Simplex-Matrix vom Typ (7,7), die für das Peptidmodell verwendet wurde.

Zustand des Ionenstrahls „an, an, an, aus, an, aus, aus“ ist. Das zweite in die Flugkammer eintretende Ionenpaket folgt unmittelbar dem ersten. Folglich wird ein wesentlich komplexeres Signal erhalten als dies bei der konventionellen TOF-MS der Fall ist. Mathematisch wird das Spektrum eines HT-TOF-Massenspektrometers erhalten, indem man die TOF-Verteilung, die als ein Spaltenvektor mit sieben Elementen betrachtet werden kann, erst mit der 7×7 -Simplex-Matrix multipliziert und anschließend einen Rausch-Spaltenvektor mit sieben Elementen addiert. Der erhaltene Vektor zeigt Treffer verschiedener Verbindungen im gleichen Zeitintervall. So kann beispielsweise das letzte Element des modulierten Spektrums durch Multiplikation der fünften Reihe der Simplex-Matrix mit dem TOF-Spektrum erhalten werden. Der berechnete Wert von 449 enthält Beiträge von Protease und H_3O^+ , die während des ersten und fünften Zeitintervalls in die Flugkammer eintraten, sowie Hintergrundrauschen. Das Rauschen ist größer als in einem herkömmlichen TOF-Spektrum (49 gegenüber zehn Signaleinheiten). Da wir vier Ionenpakete analysiert haben, ist das Gesamtsignal größer; das Rauschen steigt entsprechend der Signalintensität ($\sqrt{2400} \approx 49$). Aus Gründen, die erst später erörtert werden sollen, erhält man jedoch mit dem Multiplex-Verfahren eine Verbesserung des gesamten Signal-Rausch-Verhältnisses. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der Faltung (Konvolution) von Abbildung 6. Abbildung 3a ist zu Abbildung 7 äquivalent, jedoch wurde hier eine Matrix vom Typ (8191,8191) verwendet.

Eine Entfaltung (Dekonvolution) des TOF-Spektrums wird durch Multiplizieren des experimentellen Vektors mit

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 300 \\ 0 \\ 200 \\ 0 \\ 0 \\ 100 \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 549 \\ 349 \\ 649 \\ 149 \\ 449 \\ 249 \\ 349 \end{bmatrix}$$

Abbildung 6. Matrix-Darstellung der Hadamard-Konvolution.

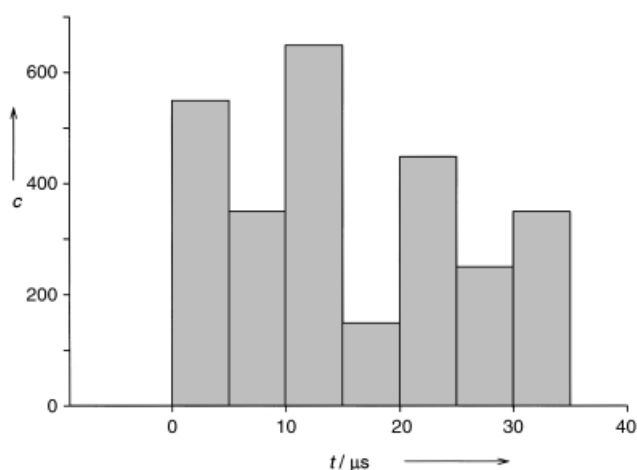


Abbildung 7. TOF-Massenspektrum des Peptidmodells nach der Konvolution mit der Simplex-Matrix, die aus der Hadamard-Matrix hergeleitet wurde. c = Signaleinheiten, t = Flugzeit.

der inversen Simplex-Matrix erhalten (Abbildung 8). Diese Multiplikation kann in Echtzeit durchgeführt werden, da die inverse Matrix nur einmal berechnet werden muss und im Computer gespeichert werden kann. Darüber hinaus erfordert der Inversionsprozess lediglich Additionen und Subtraktionen.

Welche Vorteile bietet das Hadamard-Multiplex-Verfahren? Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse eines konventionellen TOF- und eines HT-TOF-Experiments. Wir können sehen, dass das Rauschen des Protease-Signals im HT-TOF-Massenspektrum größer ist (12.25 Signaleinheiten/Zeitintervall) als das Rauschen im konventionellen TOF-Massenspektrum (10 Signaleinheiten/Zeitintervall), aber kleiner als das Rauschen des H_3O^+ -Signals (17 Signaleinheiten/Zeitintervall). Während bei der HT-TOF-MS das Signal-Rausch-Verhältnis für das Protease-Signal 8.2 und für das H_3O^+ -Signal 24.5 ist, liegt das Signal-Rausch-Verhältnis bei der konventionellen TOF-MS bei 10 bzw. 17.3. Auf den ersten Blick scheint das Hadamard-Multiplex-Verfahren keinen deutlichen Vorteil zu bieten, aber diese Schlussfolgerung berücksichtigt nicht die Korrelation des Signal-Rausch-Verhältnisses mit der Sequenzlänge bei gleicher Auflösung. Das Signal-Rausch-Verhältnis hängt nachweislich von der Quadratwurzel der Matrixgröße ab.^[12] Wird eine größere Matrix anstelle der 7×7 -Matrix verwendet, ist ein signifikanter Anstieg des Signal-Rausch-Verhältnisses zu erwarten.

In vielen Experimenten verwenden wir eine Sequenzlänge von $N = (2^{13} - 1) = 8191$. Nach den Arbeiten von Wilhelmi et al.,^[14] liegt die zu erwartende maximale Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses für eine 8191×8191 -Matrix je nach Hintergrundrauschen zwischen $\sqrt{(8191/2)} = 64$ und $\sqrt{8191/2} = 45$. Das Signal-Rausch-Verhältnis hängt auch von der Komplexität des Spektrums ab,

$$\frac{1}{4} \times \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ -1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 & 1 & -1 & 1 & -1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 500 \\ 300 \\ 600 \\ 100 \\ 400 \\ 200 \\ 300 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \\ 49 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 312.25 \\ 12.25 \\ 212.25 \\ 12.25 \\ 12.25 \\ 112.25 \\ 12.25 \end{bmatrix}$$

Abbildung 8. Hadamard-Dekonvolution. Der Rausch-Vektor wurde zur Veranschaulichung separat dargestellt.

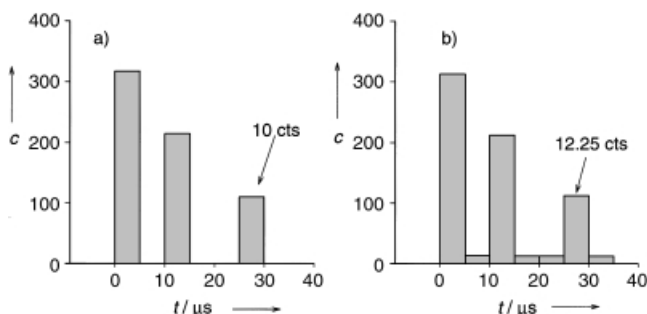


Abbildung 9. Signal-Rausch-Verhältnis erhalten aus a) dem konventionellen TOF-Massenspektrum und b) dem entfalteten HT-TOF-Spektrum des Peptidmodells. $N = 7$, c = Signaleinheiten, t = Flugzeit, cts = Signaleinheit pro Zeitintervall.

wobei die besten Ergebnisse für Spektren mit wenigen, aber sehr starken Signalen erhalten werden. Experimente in unserem Labor haben gezeigt, dass die tatsächliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses in Übereinstimmung mit diesen theoretischen Überlegungen ist.^[12]

3. Anwendungen und Ausblick

Der größte Vorteil, den die Anwendung des Multiplex-Verfahrens in der TOF-MS bietet, ist die höhere Empfindlichkeit und die damit einhergehende niedrigere Nachweisgrenzen. Das verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht eine höhere Spektrenaufnahmegeschwindigkeit. Wird anstelle eines kontinuierlichen Ionenstrahls konstanter Zusammensetzung das Eluat einer Kapillartrennmethode verwendet, die direkt an die ESI-Quelle des HT-TOF-Massenspektrometers gekoppelt ist, steht man vor der Herausforderung, einen Ionenstrahl mit schnell wechselnder Zusammensetzung analysieren zu müssen. Die Empfindlichkeit moderner TOF-Massenspektrometer setzt voraus, dass mehrere Spektren gemittelt werden, um ein einzelnes Spektrum mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Diese Tatsache begrenzt die Spektrenaufnahmegeschwindigkeit des Massenspektrometers. Werden die Signalbreiten der eluierten Verbindungen schmaler – wie bei Mikrochiptrennungen,^[15] bei schnellen gaschromatographischen Trennungen^[16] oder bei der ultraschnellen Kapillarelektrophorese^[17] – kann der massensensitive Detektor unter Umständen mit der Trenngeschwindigkeit nicht Schritt halten. Man erhält dann drastisch verzerrte Signale.^[18] Dank des verbesserten Signal-Rausch-Verhältnisses ermöglicht die HT-TOF-MS eine schnellere Spektrenaufnahmegeschwindigkeit als gewöhnliche TOF-Massenspektrometer und ist dadurch als Detektor für sehr schnelle Kapillar- und andere Trennverfahren prädestiniert.

Kürzlich konnten wir das HT-TOF-Massenspektrometer als Detektor bei einer kapillarelektrophoretischen Trennung von neun Peptiden einsetzen.^[19] Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Hierbei haben wir Spektren aufgenommen, die Signale mit einer Breite von wenigen hundert Millisekunden enthalten, und erreichten eine maximale Spektrenaufnahmegeschwindigkeit von 277 Massenspektren pro Sekunde – das ist beinahe 3.5 Mal schneller als beim besten konventionellen Instrument mit dem gleichen Massenbereich.

An diesem Punkt kommt die Frage auf, ob die Sättigung zu einem Problem werden kann, wenn so viele Ionenpakete am Detektor zum praktisch gleichen Zeitpunkt zusammenfallen. Für Peptide konnten wir ein lineares Verhalten des Detektors im Bereich von 10 bis 200 μM bestimmen, was schließen lässt, dass eine Sättigung nicht eintritt. Signale der Lösungsmittel und Pufferkomponenten konnten durch eine effiziente Entfernung des Lösungsmittels in der ESI-Quelle reduziert werden; damit lassen sich ungewollte Signale minimieren und die Sättigung des Detektors vermeiden.

Obwohl das Erreichen eines Auslastungszyklus von 50 % ein großer Schritt in die Richtung einer hocheffizienten TOF-MS ist, kann die Hadamard-Transformation noch zusätzliche

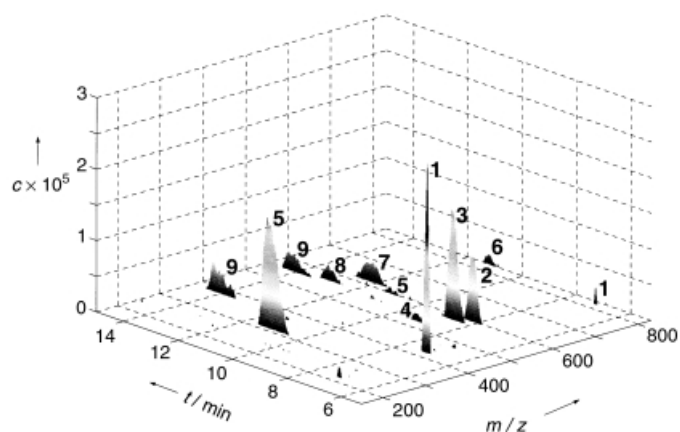


Abbildung 10. Trennung von neun Peptiden mit druckunterstützter Kapillarelektrophorese und ESI-HT-TOF-MS. Peptidzuordnung: 1: Bombesin, 2: Bradykinin (Fragment 1–5), 3: Leucin-Enkephalin, 4: Oxytocin, 5: Methionin-Enkephalin, 6: Substanz P, 7: Human-luteinisierendes Releasehormon, 8: Arg8-Vasopressin, und 9: Bradykinin. c = Signaleinheiten, t = Elutionszeit.

Vorteile bieten. Durch den Einbau eines ortsempfindlichen Detektors, der sowohl die abgelenkten als auch die nichtabgelenkten Ionenstrahlen an ihren unterschiedlichen Orten detektieren kann, wäre es möglich, Hadamard-Matrizen anstelle von Simplex-Matrizen für den Dekonvolutionsprozess zu verwenden.

Der Vergleich des Zwei-Detektoren-Experiments mit dem Wiegen der Bananen mit einer Balkenwaage ist nicht exakt, aber sowohl für die Bananen als auch für die Ionen ist der Vorteil klar: Keine Spezies bleibt ungewogen. Bei dieser Detektion würde das Signal-Rausch-Verhältnis um 40 % zunehmen,^[13] der Auslastungszyklus auf 100 % steigen und letztlich die Spektrenaufnahmegeschwindigkeit des Massenspektrometers steigen. Obgleich ortsempfindliche Ionendetektoren auf der Basis von Widerstandsanoden schon erhältlich sind,^[20,21] ist eine hochauflösende (x,y)-Information für die Einführung einer vollständigen Hadamard-Kodierung nicht notwendig. Stattdessen kann ein konventioneller Multikanalplatten(MCP)-Detektor mit einer zweigeteilten Anode verwendet werden. Eine schematische Darstellung einer solchen Anode ist in Abbildung 11 gezeigt. Ein modifiziertes HT-TOF-Massenspektrometer, das die gesamte Hadamard-Kodierung verwendet, wird zurzeit in unserem Labor entwickelt.

Um das ganze Potential der HT-TOF-MS einschätzen zu können, müssen wir eine Antwort auf die folgende Frage geben: Wieviele verschiedene Signale können bei einer chemischen Analyse bestimmt werden, die eine schnelle Kapillartrennmethode (z.B. Gaschromatographie) mit der massenspektrometrischen HT-TOF-Detektion verbindet? Stellen wir uns vor, ein Signal hat eine Halbwertsbreite von 200 ms und die Trennung der Analytmischung ist nach 400 s erreicht, dann können in diesem Zeitraum zwischen 2000 (Maximum) und 740 (37 %, gemäß statistischen Überlegungen^{[22])} Signalen aufgenommen werden. Das HT-TOF-Massenspektrometer kann leicht eine Auflösung von 1000 haben und einen Massenbereich von bis zu 5000 m/z aufweisen,^[23]

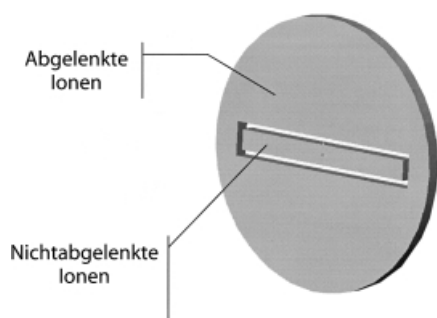


Abbildung 11. Strukturierte Anode des ortsempfindlichen MCP-Detektors. Das mittlere Rechteck detektiert den nicht abgelenkten Teil des Ionenstrahls, während die umgebende Fläche den abgelenkten Teil registriert.

d.h., mehr als 1000 verschiedene Komponenten, die mit derselben Retentionszeit eluieren, können unterschieden werden. Diese Angabe hängt von der Zahl der Isotopomeren und geladenen Spezies ab, die pro Analyt durch die ESI entstehen. Nach einer konservativen Schätzung können etwa eine Million verschiedener Komponenten in diesem zweidimensionalen Format detektiert werden. Bestimmte andere Arten der Massenspektrometrie bieten eine höhere Auflösung, aber dieser Gewinn an Auflösung geht zu Lasten der Akquisitionszeit. Um ein chromatographisches Signal mit einer Breite von 100 ms aufzunehmen, ist eine Spektrenaufnahmegeschwindigkeit von mindestens 100 Massenspektren pro Sekunde notwendig, wenn man annimmt, dass zehn Punkte zur Definition des Signals notwendig sind.

Auf dem Weg zu schnelleren und komplexeren Trennungen wird der Bedarf für Massenspektrometer mit einer moderaten Auflösung und hoher Aufnahmegeschwindigkeit immer dringender. Die Methode der HT-TOF-MS, gekoppelt an eine schnelle Trennmethode, nähert sich der zweidimensionalen Gelelektrophorese bezogen auf die erreichbare Auflösung verschiedener Komponenten in einer Mischung – aber mit dem bedeuteten Vorteil eines wesentlich höheren Probendurchsatzes und wesentlich besseren Möglichkeiten zur Identifizierung der einzelnen Komponenten.

Die Autoren danken dem U.S. Air Force Office of Scientific Research für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 6. Mai 2002 [M1572]

- [1] N. E. Bradbury, R. A. Nielsen, *Phys. Rev.* **1936**, *49*, 388–393.
- [2] R. Weinkauff, K. Walter, C. Weickhart, U. Boesl, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch. A* **1989**, *44*, 1219–1225.
- [3] A. Brock, N. Rodriguez, R. N. Zare, *Rev. Sci. Instrum.* **2000**, *71*, 1306–1318.
- [4] A. Brock, N. Rodriguez, R. N. Zare, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3735–3741.
- [5] A. G. Marshall, *Fourier, Hadamard, and Hilbert Transforms in Chemistry*, Plenum, New York, **1982**.
- [6] D. C. Tilotta, R. D. Freeman, W. G. Fateley, *Appl. Spectrosc.* **1987**, *41*, 1280–1287.
- [7] T. Kaneta, Y. Yamaguchi, T. Imasaka, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5444–5446.
- [8] T. Kaneta, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 540A–547A.
- [9] E. R. Williams, S. Y. Loh, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 698–703.
- [10] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 972A–986A.
- [11] A. D. Smith, M. Moini, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 240–246.
- [12] F. M. Fernandez, J. M. Vadiello, F. Engelke, J. R. Kimmel, R. N. Zare, N. Rodriguez, M. Wetterhall, K. Markides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 1302–1311.
- [13] M. D. Harwit, N. J. Sloane, *Hadamard Transform Optics*, Academic Press, London, **1979**.
- [14] G. Wilhelmi, F. Gompf, *Nucl. Instrum. Methods* **1970**, *81*, 36–44.
- [15] F. von Heeren, E. Verpoorte, A. Manz, W. Thormann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2044–2053.
- [16] C. Leonard, A. Grall, R. Sacks, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2123–2129.
- [17] C. A. Monnig, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 802–807.
- [18] J. F. Banks, T. Dresch, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1480–1485.
- [19] F. M. Fernandez, J. M. Vadiello, J. R. Kimmel, M. Wetterhall, K. E. Markides, N. Rodriguez, R. N. Zare, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1611–1617.
- [20] T. Mizogawa, H. Shiromaru, M. Sato, Y. Ito, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *215*, 141–149.
- [21] F. A. Rajgara, D. Mathur, T. Nishide, T. Kitamura, H. Shiromaru, Y. Achiba, N. Kobayashi, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *215*, 151–162.
- [22] J. M. Davis, J. Calvin Giddings, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 418–424.
- [23] Die Auflösung des HT-TOF-Massenspektrometers wird hauptsächlich durch die Modulationsfrequenz des BNG bestimmt. Anders als bei konventionellen TOF-Massenspektrometern spielen die Detektoransprechzeit und die Digitalisierungsgeschwindigkeit eine untergeordnete Rolle. Beispielsweise konnte eine Auflösung $\Delta m/m$ von 2000 bei einem m/z -Verhältnis von 1000 bei 25 MHz erreicht werden, sobald die Modulation bei gegebener Frequenz stabil gehalten wurde. Der Massenbereich eines HT-TOF-Massenspektrometers korreliert mit der Sequenzlänge und dem Massenausschluss des BNG. Für eine detailliertere Diskussion dieser Thematik siehe Lit. [12].