

Molekülgenaue Detektivarbeit

Non-Target Screening, Suspected-Target Screening und Target Screening –
von Technologien und Philosophien, von Datenbanken und vom Handwerk

PD Dr. Thomas Letzel
Analytische Forschungsgruppe am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft
der Technischen Universität München

Die drei Ausdrücke im Titel ebenso wie „Known Unknowns“ und „Unknown Unknowns“ sind eingedeutschte Schlagwörter, die derzeit die analytische Wasserszene durcheinanderwirbeln. Die Vorgehensweise in der Nutzung eben dieser Technologien ist jedoch häufig noch nicht einheitlich. Dieser Artikel versucht nun, etwas Ordnung in die Vielzahl unterschiedlicher Begrifflichkeiten und Ansätze zu bringen. Gleichzeitig wird von pragmatischen Anwendungen berichtet.

Non-Target Screening, Suspected-Target Screening und Target Screening ebenso wie „Known Unknowns“ und „Unknown Unknowns“ sind eingedeutschte Schlagwörter, die derzeit ein zunehmendes Interesse in der analytischen Untersuchung von Wasser erfahren. Die Suche nach unbekanntem oder erwarteten Molekülen in der Matrix Wasser brachte neue instrumentelle Technologien und analytische Strategien hervor. Ein Großteil basiert auf flüssigchromatografischer Trennung (LC) mit atmosphärendruckionisations (API)-gekoppelter massenspektrometrischer Detektion (MS) und ist technologisch sehr gut ausgereift.

Analytisches Screening (mittels LC-API-MS): Was ist das?

Betrachten wir zuerst einmal ganz unwissenschaftlich (aber ganz wissenschaftlich zitiert [1]), was die öffentliche Plattform Wikipedia zum Begriff „Screening“ beizusteuern hat. Hier wird das Wort Screening zwar vorwiegend medizinisch benutzt und auch die Ergebnisse von Screening-Studien sind medizinischen Ursprungs. Allerdings findet man auch einen Satz der allgemeineren Definition: „Unter einem Screening (englisch für: Durchsiebung, Rasterung, Selektion, Durchleuchten) versteht man ein systematisches Testverfahren, das eingesetzt wird, um innerhalb eines definierten Prüfbereichs – dieser besteht meist aus einer großen Anzahl von Proben oder Personen – bestimmte Eigenschaften der Prüfobjekte zu identifizieren. Ein Screening ist somit ein auf bestimmte Kriterien ausgerichteter orientierender Siebtest.“ [1]

Beziehen wir diese Definition nun auf das derzeit sehr populäre Screening-Gebiet der analytischen Chemie in der Wasseruntersuchung, so könnte sie heißen: „Unter einem LC-API-MS-Screening versteht man ein systematisches analytisches Testverfahren, das eingesetzt wird, um innerhalb der Matrix Wasser die beinhalteten organischen

Moleküle zu erkennen, physiko-chemisch zu charakterisieren und mengenmäßig zu bestimmen. Dieser Siebtest ist somit auf das Kriterium der Bestimmung von organischen Wasserinhaltsstoffen ausgerichtet.“

Wichtig ist hierbei die Tatsache, dass Screening eine klar ausgerichtete, aber auch limitierende Anwendung darstellt. So sagt dieses „Screening auf organische Wasserinhaltsstoffe“ weder etwas über andere Bestandteile wie Mikroorganismen oder anorganische Substanzen aus noch gibt es Hinweise auf Toxikologie oder biologische Funktionalität. Hierzu sind weitere analytische Screeningtechnologien notwendig, die im besten Falle mit dieser koppelbar sind [2].

Hier kollidieren wir nun also auch zum ersten Mal mit der Begrifflichkeit des „Non-Target Screenings“, das eben trotz des Namens immer auch eine „gerichtete Analyse“ darstellen muss.

Deshalb kann es im eigentlichen Sinne kein „Non-Target Screening“ geben.

Ist der Artikel somit am Ende? Wie man am nachfolgenden Text sehen kann: Nein, ist er nicht!

Sehen wir uns zunächst einmal Abbildung 1 an, die versucht, eine Einordnung der Begrifflichkeiten anschaulich darzustellen. Denn auch, wenn man nicht ganz ungerichtet analysieren kann, so gibt es doch die Möglichkeit, diese Tests ohne vorheriges Ziel durchzuführen. Das Ergebnis sind zwei Arten von ungezielt detektierten Zielmolekülen, die sog. „Unknown Unknowns“ und die „Known Unknowns“.

Die Klasse der „Unknown Unknowns“ ist mit keiner der derzeitigen zur Verfügung stehenden Auswertemöglichkeiten eindeutig identifizierbar und auch keinen bekannten Molekülen zuzuordnen. Man hat hier nur die Möglichkeit der Strukturermittlung durch Ähnlichkeitsvergleiche mit bekannten Molekülen wie zum Beispiel über die Hydrophobizität, der Molekularmasse oder dem massenspektrometrischen Fragmentierungsmuster.

The Formula for Success in Business and Research



Erleben Sie die BIOTECHNICA 2013!

Europas Branchentreff Nr. 1 für Biotechnologie, Life Sciences und Labortechnik

Drei von vielen guten Gründen für Ihren Besuch:

- Entdecken Sie an drei Messetagen die konzentrierte Branchenvielfalt der Biotechnologie.
- Überzeugen Sie sich von Neuentwicklungen und richtungweisenden Trends auf den Marktplätzen BioServices, Innovation in Food, Industrial Biotechnology und Personalized Medicine Technologies.
- Knüpfen Sie neue Businesskontakte und erweitern Sie Ihr Netzwerk.

Alle Infos und Tickets:
www.biotechnica.de/de/tickets



Hannover
8.-10. Oktober 2013



Thomas Letzel, geb. 1970, studierte Chemie (1992–1998) an der TU München sowie der LMU München und promovierte 2001 mit einem umweltanalytischen Thema an der TU München und absolvierte im Anschluss einen zweijährigen Postdoc-Aufenthalt an der Vrije Universiteit Amsterdam. 2009 habilitierte er sich an der TU München, wo er seither als Privatdozent lehrt und forscht. Er ist Leiter der analytischen Forschungsgruppe am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft und ist in dieser Funktion auch Projektverantwortlicher der TUM im BMBF-Projekt RISK-IDENT. Er entwickelte bisher in verschiedenen naturwissenschaftlichen Disziplinen neue analytische Plattformen und Strategien zum Nachweis, zur Identifikation und zur Bestimmung funktioneller Eigenschaften von organischen Molekülen aus komplexen Mischungen. Die Ergebnisse spiegeln sich in seinen bisher mehr als 50 wissenschaftlichen Publikationen und 2 Büchern wider.

Die Klasse der „Known Unknowns“ wurde kürzlich von J.L. Little et al. sehr schön beschrieben mit „Known Unknowns – that is, species known in the chemical literature or MS reference databases, but unknown to the investigator.“ [3]. In dieser Definition verbirgt sich ein weiteres Dilemma des Non-Target Screenings, denn „unge richtet“ heißt nicht zwingend auch „unbekannt“. Non-Target Screening nutzt also häufig schnell den gleichen Weg wie das „Suspected-Target Screening“, das mithilfe analytischer und chemischer Datenbanken sowie Vorhersagemodulen die Identifizierung erwarteter Moleküle realisiert. Das eigentliche Suspected-Target Screening startet jedoch mit einer Liste von zu erwartenden Substanzen und kann auch darauf spezifisch ausgerichtet sein.

Diesem Ansatz und dem der „Known Unknowns“ ist gemein, dass zunächst keine

realen Referenzsubstanzen vorliegen, die Substanzen aber über Stoffdatenbanken, chemische Datenbanken, analytische bzw. massenspektrometrische Datenbanken und/oder den Abgleich mit In-silico-Vorhersagen identifiziert werden können.

Führt diese Suche bzw. Interpretation zum Erfolg, so kann eine entsprechende reale Referenzsubstanz synthetisiert und genutzt werden. Diese eindeutige Identifizierung und die weiter gehende Nutzung nennt man dann konsequenterweise auch „Target Screening“, die bei Verwendung von isotopenmarkierten Referenzmaterialien die quantitative Analyse beinhaltet.

Non-Target Screening: Möglichkeiten einer analytischen Technologie

Benutzen wir den Non-Target Screening-Ansatz im Text nun konsequenterweise als Technikansatz und weniger nach Definition, so können wir guter Dinge weitermachen:

Bei diesem Ansatz handelt es sich typischerweise um eine Wasseranalyse mit a) Probenahme, b) Probenvorbereitung, c) flüssigchromatografischer Trennung, d) Ionisation und Ionentransfer der enthaltenen Analyten und e) massenspektrometrischer

Detektion derselben (eventuell inkl. Strukturbestimmung mittels Tandem-MS).

Hierbei sind nun ganz klar zielgerichtete und Analyt-fokussierende Methoden im Einsatz (auch wenn man diese gerne möglichst universell hält, um dem Namen gerechter zu werden):

a) Probenahme

Die Probenahme wird typischerweise mit verschiedenen Probenahmeeinrichtungen (z.B. Kelle oder Schlauch) durchgeführt, die Probe anschließend in Probenahmegefäße überführt und mit Chemikalien oder durch Lagerung im gefrorenen Zustand stabilisiert. Sämtliche Schritte können unsere Probe verfälschen, z.B. durch Verluste, Anreicherung und Veränderung der organischen Moleküle. Hier ist eine ebenso korrekte praktische Probenahme wie auch eine einwandfreie statistische Probenahme sicherzustellen. Bei Letzterer spielen sowohl die Probenahmegergend als auch die Probenahmedauer (z.B. kurze Probeintervalle [4] oder 24 h Mischprobe [5]) eine ganz wichtige Rolle.

b) Probenvorbereitung

Die beste Probenvorbereitung ist natürlich keine Probenvorbereitung!

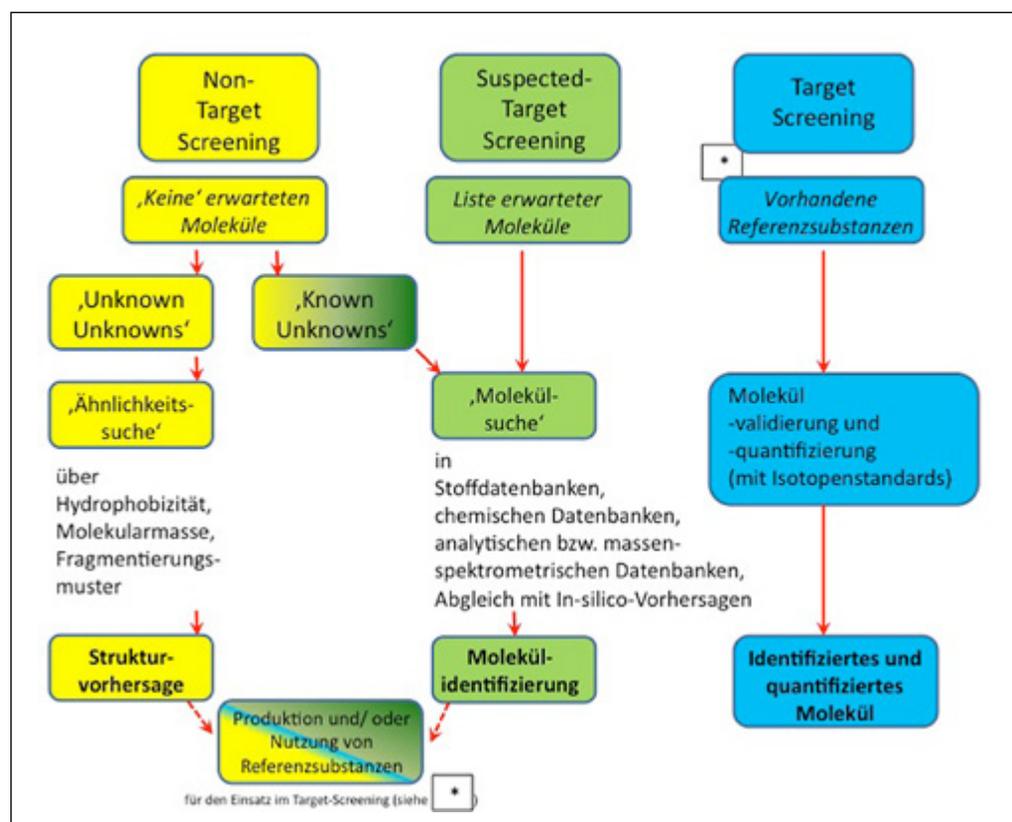


Abb. 1 Überblick und Details zur Nutzung analytischer Strategien in der Wasseranalytik.

wasseranalytik

Da dies häufig nicht möglich ist, versucht man, mit einer Vielzahl von An- und Abreicherungsverfahren die gewünschten Analyten (durch Anreicherung) von den ungewollten Matrixmolekülen (durch deren Abreicherung) abzutrennen. Am weitesten verbreitet sind dabei die so genannten Festphasenextraktionen (d.h. Solid Phase Extraction (SPE); z.B. mittels online-SPE [5,6] und high polarity value SPE [6]), in der – wie in der Probentrennung – überwiegend chromatografisches Material eingesetzt wird.

c) Probentrennung

Klassischerweise wird zur Trennung organischer Analyten im Wasser die Umkehrphasen-Flüssigchromatografie (auch RP-HPLC) mit C18-Phasen oder anderen unpolaren bis mittelpolaren stationären Phasen eingesetzt. Dies hat sich in jüngster Zeit verstärkt etabliert, da diese Trennung sehr gut mit massenspektrometrischer Detektion koppelbar ist. Hierfür sei auch auf die nachfolgenden Abschnitte verwiesen. Ein derzeit abgeschlossener Ringversuch zur Normierung der erhaltenen Retentionszeiten erleichtert wiederum die Übertragbarkeit der Ergeb-

nisse zwischen Laboratorien [7], womit analytische Daten leichter abgleichbar werden.

Seit einiger Zeit nimmt auch die Zahl der Anwender der so genannten Hydrophilen Interaktions-Flüssigchromatografie (HILIC) zu. Dies liegt zum einen an ihrer ebenfalls exzellenten Koppelbarkeit an die MS und zum anderen an ihrer Eigenschaft, polare Moleküle trennen zu können. Eine ganz aktuelle Anwendung mit der RPLC-HILIC-MS-Kopplung [8] lässt sogar auf den verstärkten Einsatz der Chromatografie im erweiterten Polaritätsbereich (z.B. logP -5 bis logP +5) hoffen. Dieser Wert spiegelt u.a. die Hydrophobizität wider, die in den vergangenen Jahrzehnten sehr variabel charakterisiert wurde [9].

Somit können die Trenneigenschaften von organischen Molekülen als spezifische physiko-chemische Kenngröße zur Charakterisierung der einzelnen Moleküle herangezogen werden.

d) Ionisation und Ionentransfer

Moleküle müssen nach der Trennung ionisch in die Gasphase transferiert werden, damit diese ins Massenspektrometer gelangen

können. Dabei ist vor allem auf die Natur der Moleküle (z.B. deren funktionelle Gruppen) selbst zu achten, aber auch auf die Eigenschaften der mobilen Phase (z.B. signalbeeinflussende Matrixeffekte oder pH-Werte). Letztlich kommen überwiegend Ionenquellen unterschiedlicher Eigenschaften (z.B. API-Techniken, wie ESI, APCI und APPI) in positiver und/oder negativer Ionisation zum Einsatz [9,10].

Die wichtiger werdende Technologie der Ionenmobilität ermöglicht eine weitere unabhängige Trennung der Moleküle (nach Eintritt in das Massenspektrometer) und ist von der Geometrie der Moleküle getrieben [11].

e) Massenspektrometrische Detektion (inkl. Strukturanalyse durch Tandem-MS)

Die massenspektrometrische Detektion kann sehr variabel eingesetzt sein, sowohl in der Art der Anwendung, aber vor allem auch in der Art der Instrumente. Für eine detaillierte Abhandlung der massenspektrometrischen Möglichkeiten sei auf bestehende Literatur verwiesen (u.a. [9,10]).

Einige Fragen sind hier allerdings von besonderer Bedeutung: Welcher Detektions-

Monster-Power für die Sauberkeit

Wir sind die Profis für Reinigung und Sterilisation in Pharma, Forschung und Labor.

Der PH 810 setzt neue Maßstäbe für Wirtschaftlichkeit, Sicherheit und Qualität in Apotheken und in der Pharmaindustrie.

- **GMP- und FDA-konforme Reinigung**
- **Bis zu 20 % Ressourceneinsparung pro Charge**
- **Partikelfreie Reinigung von Glaswaren und Pharmaequipment**
- **An die Kundenbedürfnisse abgestimmte Aufnahmewägen**
- **Geringe Geräteabmessungen – B x H= 100 x 210 cm**

Belimed Deutschland GmbH, Edisonstraße 7a, 84453 Mühldorf am Inn
Tel. +49 8631 9896-521, patrick.werner@belimed.de, www.belimed.com



Belimed
Infection Control

modus, welcher Detektionsbereich, akkurat, interner Standard, Neutralisationseffekte, Isotopenshift [12], Adduktbildung, welche Empfindlichkeit, In-source-Fragmentierung, Tandem-MS, signifikante Fragmente, welche Dissoziationstechnologien, welche analytische Auswertesoftware usw.?

Mit Kombinationen dieser analytischen Methoden kann man nun mehr oder weniger „Non-targeted“ messen. Allerdings können die gewonnenen Daten häufig – wie im Folgenden zu sehen – gut weiter verarbeitet werden.

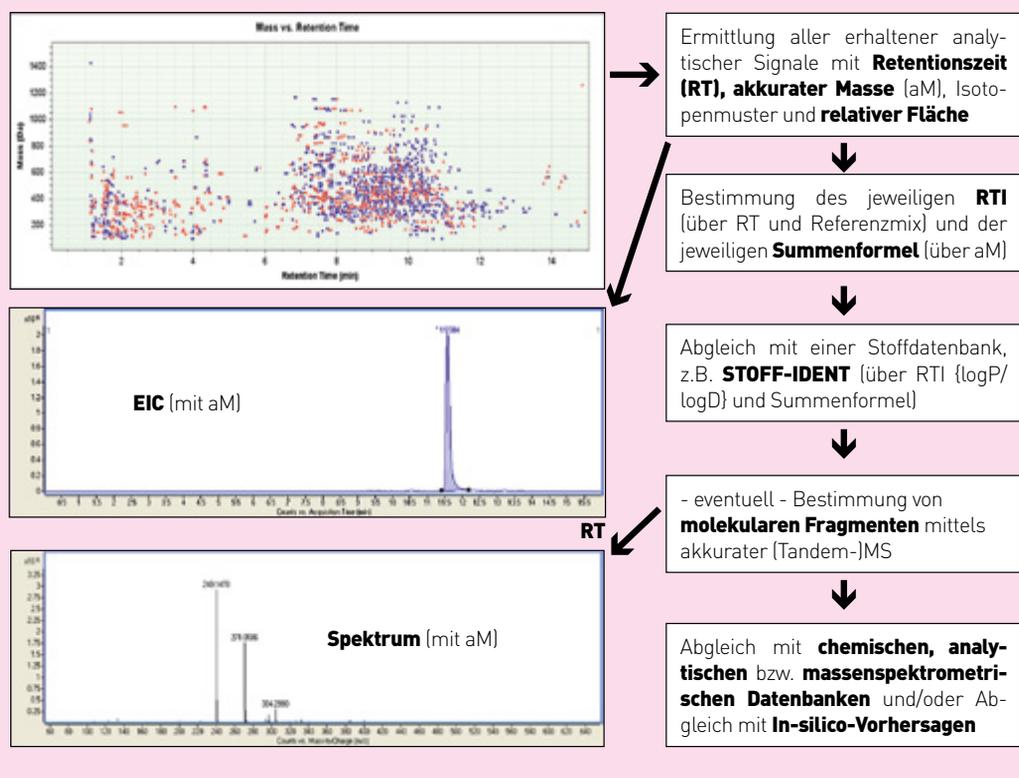
Suspected-Target Screening: Möglichkeiten unterschiedlicher Datenbanken

Das Suspected-Target Screening startet typischerweise mit einer Liste zu messender (da erwarteter) Analyten. Die Ergebnisse dieser Messungen werden im Weiteren der „Molekülsuche“ (siehe Abb. 1) unterzogen, denn ebenso wie bei den „Known Unknowns“ sind die meisten Moleküle in den Datenbanken [13] hinterlegt (aber konkret im Labor nicht als Referenzsubstanz vorhanden). So können die „Suspected Targets“ und die „Known Unknowns“ mit Stoffdatenbanken (wie STOFF-IDENT), chemischen Datenbanken (wie Chemspider oder Chemicalize), analytischen bzw. massenspektrometrischen Datenbanken (wie DAIOS, MassBank, lokalen Datenbanken [5,6,14] oder kommerzielle MS-Spektren-Datenbanken [15]) sowie im Abgleich mit In-silico-Vorhersagen (wie der UM-BDD, EPI Suite™, Filter für MS-Ähnlichkeitsbäume [16] oder MetFrag) weiter charakterisiert werden. Ergeben diese Datenbanken nun eindeutige Ergebnisse, so kann der Anwender die entsprechenden Substanzen besorgen (oder synthetisieren) und diese anschließend im Target Screening verwenden (siehe * in Abb. 1).

Target Screening: Möglichkeiten des LC-API-MS-„Handwerks“

Identifizierungen aus dem Non-Target und dem Suspected-Target Screening führen zur Nutzung von Referenzsubstanzen (siehe oben und * in Abb. 1) sowie deren Einsatz im Target Screening. Mit der Verwendung isotonenmarkierter Referenzsubstanzen ist auch eine gleichzeitige quantitative Analyse vieler Moleküle möglich

Abb. 2 a) „Known Unknowns“ (über Suspected-Target-Screening-Pathway)



(Beispiele sind 72 Analyten mittels „MRM“ [5] und 88 Analyten mittels „SRM“ [6]).

Anwendung unterschiedlicher Screening-Strategien im Wasser

a) Nutzung klassisch gewonnener Non-Target Screening-Daten

Ein pragmatischer Weg der Nutzung von Ergebnissen aus dem Non-Target Screening ist der direkte Vergleich von analytischen RT-MW-Plots (Retentionszeit (RT) gegen Molekularmasse MW) zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe auch Abb. 2a –links oben-), erhalten mit LC-API-MS.[4] Hierbei wird nicht nach Identifikation einzelner Analyten gestrebt, sondern durch so genanntes „Imaging“ die Analysen verglichen und nur auf Unterschiede geachtet.

b) Einsatz des Suspected-Target Screening Pfades für „Know Unknowns“ (mit Daten von akkurat messenden MS)

Die Nutzung von LC-QqToF [14] und Orbitrap-MS [17] (Gleiches gilt für FTICR-MS und IT-ToF-MS) im Non-Target Screening ergibt die oben erwähnten RT-MW-Plots mit akkuraten Massen (d.h. Summenformeln) für die jeweiligen Moleküle. Somit können diese der Molekülsuche unterzogen und über Datenbanken als „Known Unknowns“ charakterisiert werden (siehe Abb. 2a).

Moleküle, die über diesen Weg nicht identifiziert bzw. zugeordnet werden können, entsprechen somit den derzeitigen „Unknown Unknowns“ und müssten somit der „Ähnlichkeitssuche“ zugeführt werden (siehe Abb. 1 –links- und [11]).

c) Einsatz des Suspected-Target Screening-Pfades für „Know Unknowns“ (mit Daten von nicht akkurat messenden MS)

Nutzt man die Non-Target Strategie unter Anwendung nicht akkurat messender Massenspektrometer wie bei LC-QqQ (Gleiches gilt für IT und linearIT), so können die Datenbanken – eingeschränkt – ebenso benutzt werden (Abb. 2b). Aufgrund der fehlenden massenspektrometrischen Akkuratizität können in diesem Ansatz zwar keine Summenformeln generiert werden und bei großem massenspektrometrischen Detektionsbereich der Quadrupol-Geräte wird die Empfindlichkeit der Geräte gering. Berücksichtigt man diese Nachteile, so haben diese Geräte trotzdem ihre Berechtigung in diesen Screening-Ansätzen. Dies kommt besonders deshalb zum Tragen, da diese Massenspektrometer wesentlich leichter und billiger zu betreiben sind und deshalb auch sehr verbreitet in analytischen Laboratorien vorzufinden sind. Somit ist es möglich, dass Labore, die typischerweise Target Screening betreiben, ihre Geräte auch für Non-Target-Untersuchungen einsetzen.

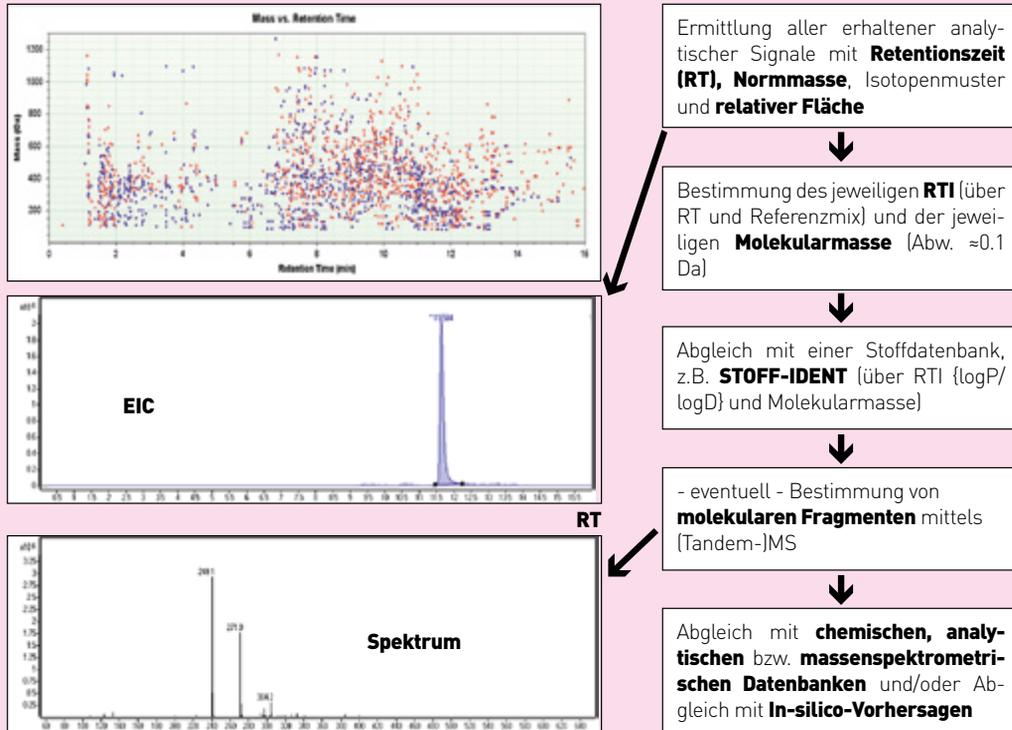
d) Nutzung des Target Screenings

Die bekannten Analyten werden – beispielsweise – mit LC-QqQ-MS und den jeweiligen MRM-Methoden empfindlich nachgewiesen und quantifiziert [5,6].

Fazit

Die Zeit, in der die analytische Chemie als Hilfswissenschaft gesehen wurde, ist nun tatsächlich vorüber. Aufgrund der heute vielfältigen Nutzung der beschriebenen LC-API-MS-Screening-Techniken in vielen ver-

Abb. 2 b) „Known Unknowns“ (über Suspected-Target-Screening-Pathway) mit nicht-akkurat messenden (Tandem-)Massenspektrometern



[13] Zedda, M. & Zwiener, C. (2012), *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2493–2502
 [14] Masiá, A. et al. (2013), *Anal. Chim. Acta* 761, 117–127
 [15] Oberacher H., et al. (2013), *Anal. Chim. Acta*, 770, 121–131
 [16] Jin, Y. et al. (2013), *Anal. Chim. Acta* 768, 111–117
 [17] Bijlsma, L. et al. (2013), *Anal. Chim. Acta* 768, 102–110
 [18] Gomez-Ramos, M.M. et al. (2013), *J. Chromatogr. A*, 1287, 24–37

Dankeschön

Das Forschungsprojekt „RISK-IDENT“ ist ein Verbundvorhaben im Förderschwerpunkt „Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf“ (RiSKWa) des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) mit dem Förderkennzeichen: 02WRS1273. Es sei allen Partnern des RISK-IDENT-Projektes sehr herzlich gedankt für den institutionsübergreifenden Einsatz um die Harmonisierung und Normierung der Wasseranalytik und der Entwicklung von STOFF-IDENT. Ein spezieller Dank geht an Frau Dr. Giorgia Greco, die mit Abbildung 2 zur Übersichtlichkeit des Artikels beigetragen hat. Die analytischen Informationen aus dieser Abbildung wurden im Original übrigens mit anderen Systemen und aus Rotwein gewonnen. Dies ist ein schlagender Beweis, dass die Geräte universell einsetzbar (bzw. darstellbar) sind, man die Quellen der Daten nicht direkt bestimmen kann und wir ehrlich sind ;-).

schiedenen Disziplinen (wie z. B. in Proteomik [9], Metabolomik [16], humanen Proben [15], in Lebensmitteln [18] wie auch im Wein [8]) tritt die Analytik sogar in den Vordergrund. Nun muss allerdings sehr darauf geachtet werden, dass sich der frühere Spieß nicht umdreht und die applikativen Disziplinen nicht in den Hintergrund treten. Man bedenke: Nur eine stark vernetzte Analytik ist eine gute Analytik. Deshalb sind „die Analytiker“ erst dann exzellent, wenn sie auch über den Tellerrand hinaussehen, sich in den anderen Disziplinen zuhause fühlen und mit deren Vertretern eng zusammenarbeiten.

Die Screening-Techniken selbst sind derzeit hoch aktuell. Dieser Aktualität geschuldet sind auch die meisten Zitate dieser Veröffentlichung aus den Jahren

2012/2013. Es ist sicher, dass das Thema im Fokus bleiben wird und sich weitere Arbeiten auch mit dem Screening im Wasser beschäftigen [10]. Nun ist man hierfür und auch für die Screening-Begriffe gewappnet.

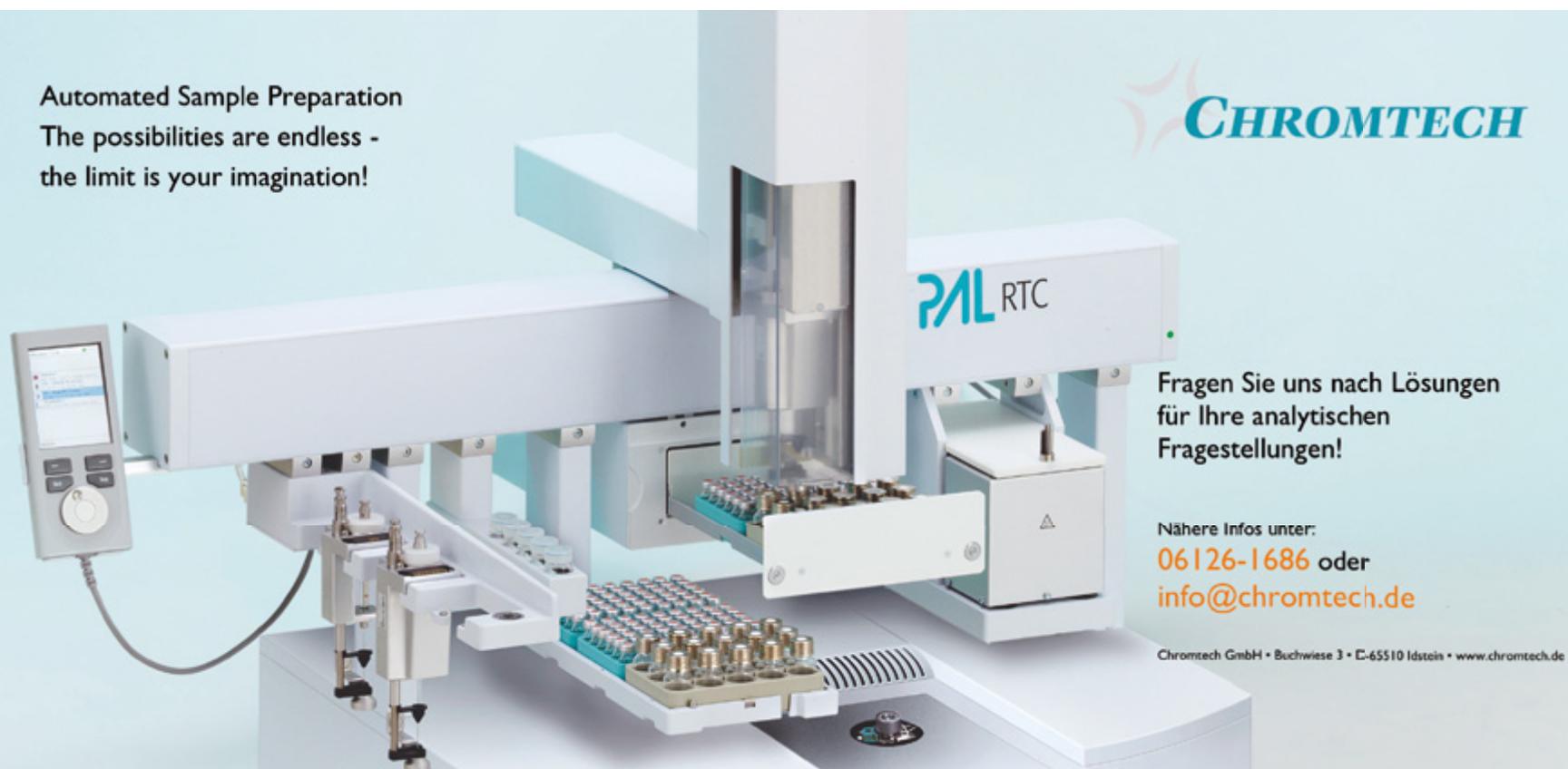
→ t.letzel@tum.de

Foto: ©Photocase.de \Fiebke

Literatur

[1] <http://de.wikipedia.org/wiki/Screening>; zuletzt am 22.04.2013
 [2] Türk, J. (2012), *Labor&More*, 8.12, 46–49
 [3] Little, J.L., et al. (2013), *LCGC Europe* 26 (3), 163–168
 [4] Müller, A. et al. (2011), *Chemosphere* 85, 1211–1219
 [5] Wode, F. et al. (2012), *J. Chromatogr. A* 1270, 118–126
 [6] Huntscha, S. et al. (2012), *J. Chromatogr. A* 1268, 74–83
 [7] http://www.lw-online.de/fileadmin/downloads/aktu_fachbeiträge/Vortrag2_RiskIdent1211_RTI.pdf; zuletzt am 22.04.2013
 [8] Greco, G. et al. (2013), *J. Sep. Sci.* 36 (8), 1279–1388
 [9] Berkemeyer, C. & Letzel, T. (2007), *LC-GC AdS* 2(4), 36–45
 [10] Farré, M. et al. (2012), *J. Chromatogr. A* 1259, 86–99
 [11] Menikaracchi, L. C. (2012), *Anal. Chem.* 84, 9388–9394
 [12] Jobst, K. J. et al. (2013), *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 3289–3297

Automated Sample Preparation
 The possibilities are endless -
 the limit is your imagination!



CHROMTECH

Fragen Sie uns nach Lösungen
 für Ihre analytischen
 Fragestellungen!

Nähere Infos unter:
 06126-1686 oder
info@chromtech.de