

Untersuchungen zur Ablation und Ionenbildung bei
matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation (MALDI)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Matthias Glückmann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt (2001)
(DF 1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Engels

Gutachter: Prof. Dr. Michael Karas, Prof. Dr. Bernhard Spengler

Datum der Disputation: 18. Oktober 2001

Inhalt

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN | VII |
| VERZEICHNIS DER GRÖSSEN | IX |
| VERZEICHNIS DER MASSEINHEITEN UND KONSTANTEN | X |
| | |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| | |
| 2 ALLGEMEINE PRINZIPIEN DER MALDI-MASSENSPEKTROMETRIE | 4 |
| 2.1 Einführung in die Entwicklung der MALDI-Massenspektrometrie | 5 |
| 2.2 MALDI, LDI und SALDI | 6 |
| 2.3 Matrizes und Techniken der Probenpräparation | 7 |
| 2.4 Desorption und Ionisation bei MALDI | 10 |
| 2.4.1 Desorptionsmodelle | 12 |
| 2.4.1.1 Das Vulkanmodell | 12 |
| 2.4.1.2 Überschallstrahl | 13 |
| 2.4.1.3 Das <i>homogenous bottleneck</i> -Modell | 14 |
| 2.4.1.4 Das <i>pressure pulse</i> -Modell | 14 |
| 2.4.1.5 Das <i>breathing sphere</i> -Modell | 15 |
| 2.4.1.6 Weitere Beobachtungen zum Desorptionsphänomen bei MALDI | 17 |
| 2.4.1.7 Einteilung und Bewertung der vorgestellten Desorptionsmodelle | 20 |
| 2.4.2 Ionisationsmechanismen | 21 |
| 2.4.2.1 Beobachtungen bei MALDI-Massenspektren | 21 |
| 2.4.2.2 Photochemische Mechanismen und Disproportionierungsreaktionen | 24 |
| 2.4.2.3 Thermische Ionisation | 26 |
| 2.4.2.4 Protonentransferreaktionen aus angeregten Zuständen der Matrixmoleküle | 27 |
| 2.4.2.5 Kationisierung | 28 |
| 2.4.2.6 Desorption vorgeformter Ionen | 28 |
| 2.4.2.7 Bewertung von Ionenbildungsmechanismen bei MALDI | 28 |
| 2.5 Bestrahlung und Bestrahlungsstärke | 30 |
| 2.6 Startgeschwindigkeit | 34 |
| 2.6.1 Axiale Startgeschwindigkeit | 34 |
| 2.6.2 Methoden zur Bestimmung von v_0 | 35 |
| 2.6.2.1 "Feldfrei-Methode" | 35 |
| 2.6.2.2 "Photoionisations-Methode" | 36 |
| 2.6.2.3 "DE-Methode" | 37 |
| 2.6.2.4 Weitere Methoden | 37 |
| 2.6.2.5 Intensitätsverteilung der Ionen in der Teilchenwolke und andere Verteilungen der Startgeschwindigkeit | 38 |
| | |
| 3 MALDI-FLUGZEITMASSENSPEKTROMETRIE | 40 |
| 3.1 MALDI-Ionenquelle | 41 |
| 3.2 Flugzeitmassenspektrometrie | 41 |
| 3.2.1 Ionennachweis | 44 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.2 | Kalibrierung und Masse/Ladung von Ionen | 44 |
| 3.2.3 | Empfindlichkeit | 47 |
| 3.2.4 | Massenbereich | 48 |
| 3.2.5 | Massenbestimmungsgenauigkeit | 48 |
| 3.2.6 | Auflösungsvermögen | 48 |
| 3.2.7 | Technik der kontinuierlichen und verzögerten Extraktion | 50 |
| 3.2.8 | Fragmentierung bei MALDI Flugzeitmassenspektrometrie | 52 |
| 4 | INSTRUMENTIERUNG UND EXPERIMENTELLES | 54 |
| 4.1 | Flugzeitmassenspektrometer: Voyager DE und Voyager DE PRO | 55 |
| 4.1.1 | Verringerung der Ionenintensität durch Blenden | 60 |
| 4.1.2 | Ionenfokussierung durch <i>guide wire</i> | 61 |
| 4.1.3 | Massenausblendung durch <i>low mass gate</i> | 62 |
| 4.1.4 | Schaltspannung bei verzögerter Extraktion | 62 |
| 4.2 | Substanzen, Probenpräparation und modifizierte Probeneller | 64 |
| 4.2.1 | Substanzen | 65 |
| 4.2.2 | Untersuchungen zum Einbau von Analyten in Matrixkristalle | 65 |
| 4.2.3 | <i>Dried droplet</i> - und Oberflächenpräparation verschiedener Matrices | 66 |
| 4.2.4 | Preßlinge aus fester Matrix- und Analytsubstanz | 67 |
| 4.2.5 | Präparation von MALDI-Proben mittels nano-Elektrospray | 68 |
| 4.2.6 | Messungen der winkelabhängigen Startgeschwindigkeitsverteilung | 69 |
| 5 | ERGEBNISSE ZUR STARTGESCHWINDIGKEIT VON IONEN BEI MALDI | 71 |
| 5.1 | Methode zur Bestimmung der initialen Geschwindigkeit | 73 |
| 5.1.1 | Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit | 73 |
| 5.1.1.1 | Flugzeitgleichung für den Fall der zweistufigen Ionenquelle | 73 |
| 5.1.1.2 | Lineare Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit | 77 |
| 5.1.2 | Startgeschwindigkeitsbestimmung aus experimentellen Wertepaaren von Flugzeit und Verzögerungszeit | 81 |
| 5.1.2.1 | Bestimmung von v_0 mit einer Näherungsformel | 82 |
| 5.1.2.2 | Bestimmung von v_0 durch numerische Anpassung | 83 |
| 5.1.2.3 | Vergleich der numerischen Anpassung mit der Näherungsformel | 84 |
| 5.1.3 | Initiale Geschwindigkeit: Vergleich der Massenspektrometer Voyager RP DE und DE PRO | 87 |
| 5.2 | Meßergebnisse der Startgeschwindigkeit | 91 |
| 5.2.1 | Vergleich der Messungen der Startgeschwindigkeit verschiedener Peptid- und Proteinionen | 91 |
| 5.2.1.1 | Massenabhängigkeit und Ionenpolarität: Vergleich der Messungen der Startgeschwindigkeit verschiedener einfachgeladener Ionen | 92 |
| 5.2.1.2 | Untersuchungen zur Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit vom Desortionsort bei DHB/ <i>dried droplet</i> -Präparationen | 96 |
| 5.2.1.3 | Untersuchungen zur Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit vom Ladungszustand | 97 |
| 5.2.1.4 | Messung von v_0 bei Zusatz verschiedener Additive zur Matrix DHB | 97 |
| 5.2.1.5 | Verteilung der axialen Startgeschwindigkeit für Insulin | 100 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 5.2.2 | Ergebnisse der Messungen von v_0 verschiedener Zucker | 105 |
| 5.2.2.1 | Untersuchungen zu v_0 bei einer CMBT/DHB-Präparation | 105 |
| 5.2.2.2 | Einschub: Präparation von Insulin/DHB auf CMBT-Unterlage | 106 |
| 5.2.2.3 | Ergebnisse zur Chitotetraose | 106 |
| 5.2.2.4 | Startgeschwindigkeiten von Maltotetraose | 110 |
| 5.2.2.5 | Startgeschwindigkeiten von komplexen Zuckern aus Humanmilch | 110 |
| 5.2.3 | Startgeschwindigkeit von Matrixionen | 112 |
| 5.3 | Diskussion (Teil I): Ergebnisse der Startgeschwindigkeit | 115 |
| 6 | DESORPTION UND IONISATION BEI MALDI: "CLUSTER-MODELL" | 119 |
| 6.1 | Matrix-Analyttestkörper | 121 |
| 6.2 | Desorptionereignis: Bildung von geladenen Clustern | 122 |
| 6.3 | Freisetzung von Ionen in der Gasphase | 126 |
| 6.4 | Diskussion (Teil II): Desorptions-/Ionisationsmodell | 134 |
| 7 | WEITERE ERGEBNISSE | 137 |
| 7.1 | Alternative Präparationstechniken und Startgeschwindigkeit | 139 |
| 7.1.1 | Einbauverhalten verschiedener DHB-Isomere | 141 |
| 7.1.2 | Untersuchungen zum Analyteinbau in Kristalle der Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure | 141 |
| 7.1.3 | Untersuchungen zu Preßlingen aus fester Matrix- und Analytsubstanz | 144 |
| 7.1.4 | Präparation von Analytlösung auf Matrixpreßlinge | 148 |
| 7.1.5 | Nano-Elektrospraypräparation von Analyten auf Matrixoberflächen | 149 |
| 7.1.6 | Vergleich der Startgeschwindigkeit von LDI- und MALDI-Ionen am Beispiel Gramacidin S | 151 |
| 7.2 | Diskussion (Teil III): Querverbindungen - Alternative Präparationstechniken und Startgeschwindigkeit | 153 |
| 7.3 | Winkelabhängige Verteilung der Startgeschwindigkeit | 155 |
| 7.4 | Startgeschwindigkeit und Fragmentierung | 164 |
| 7.5 | Diskussion (Teil IV): Querverbindungen – Fragmentierung, Startgeschwindigkeit und winkelabhängige Verteilung von v_0 | 166 |
| 8 | ERWEITERUNG DES "CLUSTER-MODELLS" | 170 |
| 9 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 175 |
| 10 | ANHANG | 178 |
| 10.1 | Substanzen und Probenpräparation | 179 |
| 10.2 | Programme | 185 |
| 10.3 | Ergebnisse der Startgeschwindigkeit verschiedener Ionen | 190 |
| 11 | LITERATUR | 198 |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-----------|--|
| 3-HPA | 3-Hydroxy-picolinsäure |
| 4-HBA | 4-Hydroxy-benzoesäure |
| ATT | 2-Aza-thiothymin |
| ATW | Lösungsmittel aus 0,1% TFA in Acetonitril/Wasser 1:1 |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CE | <i>continuous extraction</i> |
| CMBT | 5-Chlor-2-mercapto-benzothiazol |
| DAHC | Diammonium-hydrogencitrat |
| DE | <i>delayed extraction</i> |
| DHAP | 2,6-Dihydroxy-acetophenon |
| DHB | 2,5-Dihydroxy-benzoesäure |
| DHBs | super DHB |
| ECD | <i>electron capture dissociation</i> |
| ESPT | <i>excited state proton transfer</i> |
| FAB | <i>fast atom bombardment</i> |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |
| FWHM | <i>full width at half maximum</i> |
| HABA | 2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure |
| HCCA | 4-Hydroxy- α -cyano-zimtsäure |
| HCCA-Amid | 4-Hydroxy- α -cyano-zimtsäureamid |
| HCD | <i>high-current detector</i> |
| HMBA | 2-Hydroxy-5-methoxy-benzoesäure |
| HV | Hochspannungsnetzgerät, engl. <i>high voltage</i> |
| IR | Infrarot |
| ISD | <i>in source decay</i> |
| MALDI | <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i> |
| MCP | <i>micro channel plate</i> |
| MPI | Multiphotonen-Ionisation |
| MS | Massenspektrometrie |
| Nd-YAG | Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| PSD | <i>post source decay</i> |
| SA | Salicylsäure |
| SIMS | Sekundärionenmassenspektrometrie |

| | |
|------|-------------------------------------|
| SINA | Sinapinsäure |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THAP | 2,4,6-Trihydroxy-acetophenon Hydrat |
| TLF | <i>time lag focussing</i> |
| TOF | <i>time of flight</i> |
| UV | Ultraviolett |

Verzeichnis der Größen

| | |
|---------------|--|
| a | Beschleunigung [m/s^2] |
| a_i | Ionenausbeute |
| c | Konzentration [mol/l] |
| d | Durchmesser [m] |
| d_e | Eindringtiefe [nm] |
| E | Energie [J] oder [eV] oder elektrische Feldstärke [V/m] |
| EA | Elektronenaffinität [eV] |
| E_{kin} | kinetische Energie [J] oder [eV] |
| F | Fläche [m^2] |
| f | Brennweite [mm] |
| G | Verhältnis [%] |
| H | Bestrahlung (<i>fluence</i>) [J/m^2] |
| I | Bestrahlungsstärke (<i>irradiance</i>) [W/m^2] |
| IP | Ionisationspotential [eV] |
| m | Bezeichnung für Masse in Kilogramm |
| r | Radius [m] |
| t | Zeit [s] |
| t_{ges} | Gesamtflugzeit [s] |
| U | Spannung [V] |
| v | Geschwindigkeit [m/s] |
| V | Volumen [m^3] |
| v_0 | initiale Geschwindigkeit oder Startgeschwindigkeit [m/s] |
| v_r | radiale Startgeschwindigkeit [m/s] |
| z | Ladungszahl (Vielfaches der Elementarladung q) bzw. Vielfaches der Elementarladung [C] |
| a | Absorptionskoeffizient [$1/\text{cm}$] |
| l | Wellenlänge [nm] |
| $?$ | Strahldivergenz [mrad] |
| J | Winkel [$^\circ$] |
| t | Verzögerungszeit [ns] |
| \mathcal{A} | Durchmesser [m] |

Verzeichnis der Maßeinheiten und Konstanten

| | |
|-------|--|
| C | Coulomb (Elektrizitätsmenge) |
| Da | Dalton ($1 \text{ Da} = 1 \text{ u} = 1,66056 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$) |
| eV | Elektronenvolt (Energie, $1 \text{ eV} = 1,60219 \cdot 10^{-19} \text{ J}$) |
| g | Gramm (Masse) |
| Hz | Hertz (Frequenz) |
| J | Joule (Energie) |
| m | Meter (Längenmaß) |
| mol | Mol (Stoffmenge) |
| N | Newton (Kraft) |
| N_a | Zahl von Avogadro ($6,02205 \cdot 10^{23} \text{ 1/mol}$) |
| Pa | Pascal (Druck) |
| q | Elementarladung ($1,660219 \cdot 10^{-19} \text{ C}$) |
| s | Sekunde (Zeit) |
| Th | Thomson (m/z -Verhältnis) |
| u | atomare Masseneinheit ($1 \text{ u} = 1,66056 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$) |
| V | Volt (elektrische Spannung) |
| W | Watt (physikalische Leistung) |

Kapitel 1

Einleitung

1 Einleitung

Seit der Einführung der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI, *matrix assisted laser desorption/ionization*) zwischen 1985 und 1988 [Kar85], [Kar87], [Kar88] hat die MALDI gemeinsam mit der Elektrospray-Ionisation die moderne Massenspektrometrie revolutioniert. Im Gegensatz zur einfachen Laserdesorption, die durch einen hohen Fragmentierungsgrad und damit eingeschränkten Massenbereich der Analytionen gekennzeichnet ist, erlaubt die matrixunterstützte Laserdesorption eine schonende, d.h. weiche, Desorption und Ionisation nichtflüchtiger und thermisch labiler Biomoleküle. Aufgrund der anwendungsorientierten Forschung weitet sich die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation auf viele Zweige der Analytik aus. Heute werden mit dieser Methode im wesentlichen Biomoleküle wie Peptide, Proteine, Kohlenhydrate und Oligonukleotide, aber auch synthetische Polymere untersucht.

Aufgrund des Laserimpulses wird bei MALDI aus der kondensierten Phase von Matrix und Analytsubstanz eine Wolke aus Neutralteilchen und Ionen innerhalb der Ionenquelle freigesetzt. In der Massenspektrometrie wird die Trennung von Ionen im elektrischen oder magnetischen Feld zur experimentellen Bestimmung des Verhältnisses von Masse zu Ladung der Ionen benutzt. Bei der Flugzeitmassenspektrometrie durchlaufen die Ionen nach Aufnahme von kinetischer Energie in der Ionenquelle eine feldfreie Driftstrecke, werden dort aufgetrennt und nach einer Flugzeit am Detektor nachgewiesen. Die Kombination der gepulsten Laserionenquelle mit der Flugzeitmassenspektrometrie hat der modernen Analytik einen nahezu unbegrenzten Massenbereich zugänglich gemacht.

Die breite Anwendung der MALDI-Massenspektrometrie in der Bioanalytik steht jedoch im Gegensatz zum bislang limitierten Verständnis des zugrundeliegenden Desorptions- und Ionisationsprozesses. Für die Weiterentwicklung und die Optimierung des MALDI-Verfahrens ist die genaue Kenntnis der elementaren Prozesse der Überführung der Teilchen in die Gasphase (Desorption) sowie die Ionenbildung und deren Auswirkung auf die Massenbestimmung von großer Relevanz, um zum Beispiel die unzureichende Auflösung für Ionen hoher Masse zu erklären oder instrumentelle oder präparative Verfahren zu optimieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des Desorptions- und Ionisationsprozesses bei MALDI. Ziel dieser Arbeit ist es, ein erhöhtes Verständnis der Matrixfunktion und der Prozesse bei MALDI herbeizuführen sowie neue Kriterien zu entwickeln, die das Auffinden von Matrixsubstanzen erleichtern. Die wesentlichen Untersuchungen zu den Prozessen bei MALDI erfolgten bisher getrennt nach Einbau von Analytmolekülen in Matrixkristalle, Ionisationsmechanismen und Desorptionsmodellen. Hierbei wurden eher phänomenologische Modelle des Desorptionsprozesses, aber auch eine große Zahl verschiedener Ionisationsmechanismen diskutiert und publiziert. Bisher wurde der Desorptions- und Ionisationsprozesses bei MALDI jedoch nicht umfassend beschrieben, da genaue Parameter zur Charakterisierung fehlten. Einige Modelle der Desorption konzentrieren sich auf die Zusammenhänge mit der Bestrahlung oder Bestrahlungsstärke, d.h. den Energieeintrag des Lasers auf die Probenoberfläche. Aufgrund

schlecht definierter Fokussierungsbedingungen sind hierbei jedoch stark variierende experimentelle Werte in der Literatur beschrieben.

Ein wesentliches Problem bei der Untersuchung von Ionenbildungsmechanismen für MALDI ist die Tatsache, daß verschiedene experimentelle Parameter die beobachteten Massenspektren stark beeinflussen. Parameter, wie Laserwellenlänge oder Laserbestrahlung, sind hierbei zu nennen, aber auch die Nachweisempfindlichkeit von Ionen. Weiterhin ist keiner der bisher beschriebenen Ionenbildungsmechanismen dazu geeignet, alle in MALDI-Massenspektren beobachteten Ionen zu erklären, da die primären Ionenbildungsmechanismen von Sekundärreaktionen innerhalb der durch den Laserimpuls desorbierten Teilchenwolke verdeckt werden.

Einen Neuanatz zur Charakterisierung des Desorptions- und Ionisationsprozesses bei MALDI bietet die initiale axiale Geschwindigkeit (Startgeschwindigkeit) von Ionen. Informationen über die initialen kinetischen Parameter von Analyt- und Matrixionen erlauben eine Beurteilung der zugrundeliegenden Prozesse. Aus den Ergebnissen der initialen Geschwindigkeit erfolgt die Entwicklung eines einfachen Desorptions- und Ionisationsmodells für MALDI.

Die vorliegende Arbeit ist in elf Kapitel gegliedert. Nach der Einleitung in Kapitel 1 und einem Überblick über die Prinzipien der MALDI-Massenspektrometrie in Kapitel 2 mit "traditioneller" Trennung von Desorption und Ionisation wird in Kapitel 3 eine Einführung zur MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie gegeben. In Kapitel 4 erfolgt eine Beschreibung der instrumentellen Parameter sowie der Präparationstechniken. Im Anschluß daran werden in Kapitel 5 die Ergebnisse zur Untersuchung der Startgeschwindigkeit von Ionen beschrieben. Aus verschiedenen "historischen" Desorptionsmodellen und Ionisationsmechanismen (siehe Kapitel 2) sowie den in Kapitel 5 dargestellten Ergebnissen erfolgt die Entwicklung eines einfachen Desorptions- und Ionisationsmodells in Kapitel 6. In Kapitel 7 erfolgt eine Ausweitung der experimentellen Untersuchungen, die sich zum Beispiel mit verschiedenen alternativen Präparationstechniken beschäftigen. Ergebnisse zur winkelabhängigen Verteilung der initialen Geschwindigkeit werden ebenfalls vorgestellt. In Kapitel 8 wird das Modell der Desorption und Ionisation aus Kapitel 6 erweitert und anhand verschiedener einfacher experimenteller Ergebnisse beurteilt. Im Kapitel 9 erfolgt eine Zusammenfassung der Arbeit sowie ein Ausblick. Kapitel 10 beinhaltet den Anhang mit verschiedenen Programmen zur Berechnung von Flugzeiten etc. sowie eine tabellarische Zusammenstellung der in dieser Arbeit eingesetzten Präparationsmethoden und Substanzen sowie der wesentlichen Ergebnisse der Startgeschwindigkeit verschiedener Ionen. Kapitel 11 enthält Literatur und Veröffentlichungen zu dieser Arbeit.

Kapitel 2

Prinzipien der
MALDI-Massenspektrometrie
Einführung in die Entwicklung der MALDI
MALDI, LDI und SALDI
Desorption und Ionisation
Laserbestrahlung und Startgeschwindigkeit

2 Allgemeine Prinzipien der MALDI-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung von polaren, thermisch labilen Substanzen macht es erforderlich, die Analyte aus der kondensierten Phase möglichst schonend, d.h. unter geringer Fragmentierung, zu desorbieren. Eine geeignete Methode ist die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation. Die MALDI-Massenspektrometrie ist seit der Entwicklung durch Hillenkamp und Karas [Kar85], [Kar87], [Kar88] eine Standardanalysemethode in der Biochemie (siehe Kapitel 2.2). Die Methode bietet die Möglichkeit zur Bestimmung der absoluten Molmasse von Biopolymeren und anderen Analyten bis in den Bereich von 1.000.000 Dalton (siehe Kapitel 3). Zudem können selbst komplexe Substanzgemische untersucht werden. Nach einer Einführung in die Entwicklung der MALDI-Massenspektrometrie (siehe Kapitel 2.1) und Vergleich zu anderen Techniken der Desorption und Ionisation in Kapitel 2.2 werden in Kapitel 2.3 verschiedene Matrices und Techniken der Probenpräparation vorgestellt. In Kapitel 2.4 wird ein Überblick über Desorption und Ionisation bei MALDI gegeben. In Kapitel 2.5 und 2.6 werden Parameter, die eine Beurteilung des MALDI-Prozesses erlauben, beschrieben. Hierbei wird in Kapitel 2.5 zuerst auf die Bestrahlung und Bestrahlungsstärke und anschließend in Kapitel 2.6 auf die Startgeschwindigkeit von Teilchen als wesentliche Größe zur Charakterisierung der Prozesse bei MALDI eingegangen.

2.1 Einführung in die Entwicklung der MALDI-Massenspektrometrie

Die historische Entwicklung, die zu MALDI führte, begann mit der Einführung der Plasma-Desorption durch McFarlane und Torgesson [Mcf76]. Bei dieser Technik wird eine feste Probe aus eingetrockneter Analytlösung auf einem dünnen Metallfilm präpariert, in eine Vakuumkammer überführt und mit hochenergetischen Ionen (ca. 100 MeV) aus spontaner Spaltung von ^{252}Cf bestrahlt. Hierbei entstehen Ionen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden können. Zu etwa der gleichen Zeit wurde die Technik der Sekundärionenmassenspektrometrie (SIMS) entwickelt, bei der niedrigenergetische Ionen (ca. 10 keV) zur Bestrahlung fester Proben eingesetzt werden [Ben78]. Problematisch bei dieser Technik ist der schnelle Abtrag der Probe und die durch die Bestrahlung beschädigte Oberflächenschicht, so daß man kein statisches Ionensignal erhalten kann. 1981 gelang durch die Einführung von viskosen, flüssigen Proben eine Verbesserung der Technik [Bar81], da in der Flüssigkeit im Gegensatz zu festen Proben ständig eine neue Oberfläche zur Erzeugung von Ionen zur Verfügung steht. Diese Technik wird *fast atom bombardment* (FAB) genannt, da man davon ausgegangen ist, daß neutrale Atome zur Desorption notwendig sind. Die Kombination mit verschiedenen Massenanalysatoren führte zu einer weiten Verbreitung von FAB.

Laserdesorptions-Ionenquellen zeigen einen zu SIMS-Quellen vergleichbaren Aufbau, allerdings wird die Oberfläche mit Photonen anstelle von Primärlonen bestrahlt. Mit Laserdesorption/Ionisation (LDI) gelang die Analyse von Biomolekülen bis zur Masse einiger

1000 Da [Hil83], allerdings ist damit ein hoher Grad an Fragmentationen verbunden.¹ Eine Weiterentwicklung der bisherigen Laserdesorption, bei der aufgrund der geringen Absorption bei der eingestrahlten Laserwellenlänge nur ein geringer Teil der Laserenergie in der Probe selbst absorbiert wird, ist die matrixunterstützte Laserdesorption, deren Entwicklung im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

2.2 MALDI, LDI und SALDI

Der Begriff *matrix-assisted laser desorption/ionization* wurde bereits 1985 eingeführt [Kar85]. In dieser ersten Publikation zu MALDI wurde die Matrix Tryptophan eingesetzt, um eine „Kodesorption“ der bei dieser Laserwellenlänge nicht absorbierenden Substanz (Alanin) zu erreichen [Kar85]. Der Begriff Matrix wurde bereits in der Laserdesorption/Ionisation (LDI) für NH₄Cl verwendet [Dav83], [Pac85]. Die Funktion der Matrix Ammoniumchlorid unterscheidet sich jedoch stark von den Matrices, die man bei MALDI einsetzt, zum einen in ihren Eigenschaften, zum anderen in der Fähigkeit, große Biomoleküle zu desorbieren. Die Methode, ultrafeines, nicht absorbierendes Material mit einer flüssigen Matrix zu mischen, machte 1988 die Analyse von Proteinen und Polymeren mit einer Masse größer als m/z 100.000 möglich [Tan88]. Die Abkürzung SALDI für *surface assisted laser desorption/ionization* wurde hierbei von Sunner eingeführt, um diese Technik von MALDI abzugrenzen.²

Üblicherweise werden bei MALDI die Matrixsubstanzen im 10000 bis 100000-fachen molaren Überschuß eingesetzt. Hierbei finden 10 - 100 mM Matrixlösungen Verwendung (siehe Kapitel 2.3). Die Matrix-Analytprobe wird mit einem Laserimpuls bestrahlt, und die dabei erzeugten Ionen werden im Massenspektrometer nachgewiesen.

Die Präparation der Matrix Nikotinsäure mit dem Analyten aus wässriger Lösung machte erstmals eine Untersuchung hochmolekularer Biomoleküle mittels MALDI möglich [Kar88]. Die feste Matrix Nikotinsäure zeigte bei der Analyse hochmolekularer Biomoleküle eine wesentlich verbesserte Sensitivität gegenüber den Ergebnissen von Tanaka [Tan88]. Matrices wie Sinapinsäure (SINA), Ferulasäure [Bea89a], [Bea89] 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [Str91] oder 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure (HCCA) [Bea92] wurden in den folgenden Jahren gefunden. Eine neue Möglichkeit bietet die matrixfreie Strategie der Desorption von porösem Silizium [Wei99].

Trotz großer Fortschritte im Verständnis der Prozesse bei MALDI kann die weitgehend empirische Suche nach geeigneten Matrixsubstanzen kaum als abgeschlossen betrachtet

¹ Bei der Kopplung eines gepulsten frequenzverdoppelten Rubinlasers ($\lambda = 347$ nm) konnten bereits vorher Ionensignale verschiedener Metallkationen und der sie umgebenden organischen Polymermatrix bis zu einer Masse von 70 Da festgestellt werden [Hil75]. Weiterhin wurden mittels eines gepulsten TEA-CO₂-Lasers Peptide und Oligosaccharide bis zu einer Masse von ca. 1200 Da desorbiert und nachgewiesen [Pos78].

² In flüssige Matrices wie Glycerol werden Feststoffe wie ultrafeines Cobalt-Pulver mit 30 nm Durchmesser [Tan88] oder Graphitpulver [Sun95], [Dal96] eingebracht. Weiterhin finden K₄[Fe(CN)₆] + Glycerol [Zöl97], Titanitrid, Metalle und Oxide in Glycerol [Sch99] Verwendung. Der Zusatz von stark absorbierenden Substanzen wie Rhodamin 6G oder 1,4-Diphenyl-1,3-butadien erlaubt auch die Nutzung von z.B. Glycerol bei einer Laserwellenlänge von $\lambda = 337$ nm [Cor93].

werden.³ Ein wichtiges Ziel ist es daher, die Funktion der Matrix besser zu verstehen und Kriterien zu entwickeln, die eine Matrixauswahl erleichtern, da seit der Einführung von MALDI die Zahl der Substanzen, die als Matrix zur Verfügung stehen, und auch die Zahl der analysierbaren Substanzen stark gewachsen sind.

Kriterien zum Auffinden einer Matrix sind:

- Vakuumstabilität (geringe Sublimation im Vakuum)
- Absorption der eingestrahlten Laserwellenlänge⁴
- Kristallisation im Analyt-/Matrixgemisch⁵
- Vielseitige Anwendbarkeit bei verschiedenen Substanzklassen
- Geringe Signalintensität von Addukten
- Toleranz gegenüber Verunreinigungen

Zusätzlich von Bedeutung ist die Unterscheidung zwischen schonenden (bzw. weichen) und harten Matrizes. Hierbei können schonende Matrizes zur Desorption von labilen Biomolekülen eingesetzt und harte Matrizes zur Fragmentationsanalyse mittels *post source decay* (siehe Kapitel 3.2.8) genutzt werden [Bah97], [Spe97].

2.3 Matrizes und Techniken der Probenpräparation

Für verschiedene Klassen von Analyten werden unterschiedliche Präparationstechniken und Matrizes eingesetzt. Dieses Kapitel stellt einige der Techniken zur Präparation von MALDI-Proben sowie die Entwicklung der Präparationstechniken vor. In Kapitel 4.2 erfolgt eine Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Probenpräparationstechniken.

In einer der ersten Publikationen zu MALDI werden Nikotinsäure und Analyt in wässriger Lösung aufgebracht und mit einem frequenzvervierfachen Nd-YAG-Laser bestrahlt [Kar88]. Lösungsmittelgemische wie zum Beispiel 30% Acetonitril in 0.1% Trifluoressigsäure [Bea89] oder Ethanol/TFA 0.1% (1:10) [Gus95b] werden später eingesetzt.

Die Originalpräparation verläuft wie folgt: Man mischt Protein und Matrixlösung und trocknet den Tropfen auf einem Metallprobenträger ein [Kar88].^{6,7} Problematisch bei dieser

³ Das Auffinden von geeigneten Matrizes ist schwierig, was z.B. eine Untersuchung von 48 möglichen Matrix-Substanzen für die MALDI-Analyse von Oligonukleotiden zeigt, von denen 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) schließlich die besten Ergebnisse lieferte [Wu93].

⁴ Die Festkörperabsorptionsspektren bei den Wellenlängen $\lambda = 337$ nm und $\lambda = 248$ nm für die Matrizes DHB, Ferulasäure, HCCA, SINA und Coumarin 120 sind hierzu untersucht worden [All96]. Zur Absorption von Matrizes siehe auch [All97].

⁵ Untersuchungen von festen Präparationen [Kar88] und von Kristallen verschiedener Matrizes mit Proteinen haben zu dem Ergebnis geführt, daß im Fall von Peptiden und Proteinen die Analytsubstanzen in die Kristalle (siehe hierzu auch Kapitel 7) der Matrix eingebaut werden [Str91], [Bea93], [Dok91], [Cha92], [Kam97]. Untersuchungen der Kristallstruktur verschiedener Matrizes (z.B. 2,5-DHB [Hai82], Ferulasäure [Net88], 2,6-DHB [Gda94] und SINA [Lev81]) zeigten keinen Zusammenhang der Kristallstruktur der Matrix mit dem Einbau von Analytsubstanzen.

Präparationsmethode, die *dried droplet*-Präparation genannt wird, ist die Heterogenität der gesamten Probe und die damit verbundenen schwankenden Ionensignalintensitäten bei der MALDI-massenspektrometrischen Untersuchung, z.B. bei Einsatz der Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Hierbei werden Peptid- und Proteinionen vom grobkristallinen Rand der Präparation detektiert, während ein Ionensignal für Kohlenhydrate im wesentlichen aus dem mikrokristallinen Innern der Präparation erhalten wird. Problematisch ist weiterhin das Auffinden von sogenannten "sweet spots", d.h. Bereichen der Präparation von denen ein Analyt ionensignal hoher Intensität gefunden wird, während von anderen Bereichen nur geringe Ionenintensitäten erhalten werden.

Verschiedene Methoden wurden entwickelt, um das Problem der Inhomogenität der Matrix-Analyt-Präparation zu lösen:

1. **Trocknung der Proben im Vakuum** [Wei93], **schnelles Trocknen im Stickstoffstrom** [Gus95]
2. **Seed layer** [Xia94]: Bei der *seed layer*-Technik [Xia94], [Xia94b] wird eine Matrixschicht DHB, 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure (HCCA) oder 3-Indol(trans)acrylsäure nach dem Standard *dried droplet*-Verfahren aus gesättigter Matrixlösung hergestellt und unter einem Abdeckglas zerkleinert. Die Bruchstücke werden weggewischt. Dann gibt man die Analytlösung zu, woraufhin ein opaquer Film entsteht. Dieser Film wird mit Wasser gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen.
3. **Nicht absorbierende Matrixunterlagen** (*surface enhanced neat desorption*) [Hut93], [Zha96], [Gus95b]: Die Probenunterlage wird durch Aufbringen makromolekularer Unterlagen verändert [Hut93]. Hierbei verwendet man Membranen (z.B. Cellulose) als Unterlage für eine HCCA Matrix, auf deren getrockneter Oberfläche Analytlösung in Wasser aufgebracht wird [Zha96]. Silicagel (Dünnschicht-Chromatographie) und Cellulose dienen ebenso als Matrixunterlagen [Gus95b].
4. **Dünnschichtpräparation oder Oberflächenpräparation** (*thin-layer*) [Vor94]: Auf eine schnellgetrocknete Matrixoberfläche wird die Analytlösung in „matrix-unlöslichem“ Lösungsmittel aufgebracht.⁸
5. **Preßlinge von Matrizes**: Die Analytlösung wird auf Matrixpreßlinge gegeben [Hur94].
6. **Sprayen als Probenpräparationstechnik** [Kös92], [Met93], [Yao95], [Sad98]: Verschiedene Spraytechniken sind zur Probenpräparation eingesetzt worden. Sprayen eines Proben-Aerosols auf ein rotierendes MALDI-Target [Yao95], aeromechanisches

⁶ Hierbei werden typischerweise 1 bis 2 μ l des Gemisches aus Matrix- und Analytlösung auf dem Probeneller eingetrocknet.

⁷ Trocknende Tropfen von MALDI-Matrizes bilden, da benetzende und flüchtige Lösungsmittel eingesetzt werden, üblicherweise ringförmige Kristallränder [Dee97]. Verschiedene Kristallformen werden für verschiedene Präparationen von MALDI-Matrizes beschrieben [Ama97], [Gus95], [Wes95], [Wes95b], [Wes94].

⁸ Typischerweise wird hierbei 1 μ l der Matrixlösung (z.B. HCCA [Bea92], [Vor94] in Aceton) aufgebracht und eingetrocknet. Auf die feinkristalline Oberfläche wird 1 μ l der Analytlösung (in einem Lösungsmittel, in dem die Matrix nur in geringem Maß löslich ist) pipettiert und ebenfalls eingetrocknet.

Sprühen (für die Plasma Desorptionsmassenspektrometrie) [Met93], Aufsprühen von DHB/Zucker/Analyt-Lösung auf den Probenhalter [Kös92] oder Aufsprühen von Matrix mittels Elektrospray (ES) [Sad98], [Xia94b] sind hierbei eingesetzt worden.

7. **Seed-crystal:** Ein Kristall von reiner DHB wird in eine Lösung von gesättigter DHB gegeben, in der der Analyt ebenfalls gelöst enthalten ist [Hur94].
8. **Variation der Lösungsmittel:** Neben einer Variation des pH-Wertes [Coh96] werden zum Beispiel 2-Propanol/Wasser und andere Lösungsmittel [Bör97] zur Präparation eingesetzt.

Neben variablen Präparationstechniken werden auch **Matrixgemische mit anderen Matrizes eingesetzt**. Teilweise ist hierbei nicht die Homogenität der Probenpräparation von Bedeutung, sondern die verbesserten Ergebnisse bei der Analyse von z.B. leicht fragmentierenden Analytsubstanzen. Verschiedene Zusätze zu DHB wie das Benzoessäure-Derivat 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoessäure⁹ verbessern zum Beispiel deren Eigenschaften als Matrix [Kar92], [Kar93].

Weiterhin kommen **Gemische von Matrizes mit Zusätzen** wie Diammoniumhydrogencitrat (DAHC) zu 2,6-Dihydroxyacetophenon (DHAP) [Gor96], [Pit96] 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP) + DAHC [Pie93], [Zhu96] zur Anwendung. Damit werden binäre Mischungen in sehr variablen Kombinationen möglich.¹⁰ Ferner kann durch Zusatz weiterer Stoffe die Zahl der Matrixpräparationsprotokolle erhöht werden (ternäre Gemische)¹¹ [Len98], [Sze98]. Ein Vergleich verschiedener Matrizes [Kra96] oder eine Bewertung einer Präparationstechnik im Vergleich zu in anderen Arbeitsgruppen etablierten Techniken ist schwierig, da die Ergebnisse mit unterschiedlichen technischen Voraussetzungen erreicht werden und die jeweiligen Parameter nicht genau bekannt sind. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, ist es daher von großer Bedeutung, ein standardisiertes Präparationsprotokoll einzusetzen. Im Kapitel 4.2 werden die in dieser Arbeit eingesetzten "Standard"-Präparationsverfahren für MALDI-Proben vorgestellt.

⁹ Die Mischung aus DHB mit 10% 2-Hydroxy-5-methoxy-benzoessäure (HMBA) wird DHBs genannt.

¹⁰ Eine andere Möglichkeit, Alkalimetallkationen gegen das volatile Ammonium auszutauschen, bieten Imidazol, Triethylamin etc. sowie Ionenaustauscher [Sim97]. Weiterhin werden Ammoniumcitrat und Ammoniumtartrat zu verschiedenen Matrizes zugesetzt [Zhu96b]

¹¹ Es werden z.B. ternäre Gemische aus 3-Aminochinolin und Glycerol mit anderen Matrizes eingesetzt [Sze98].

2.4 Desorption und Ionisation bei MALDI

In der Abkürzung MALDI (Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation) ist der Begriff Desorption getrennt vom Begriff Ionisation enthalten. Im Kapitel 2.4.1 werden zuerst einige Desorptionsmodelle und Ergebnisse zum Desorptionsprozeß bei MALDI vorgestellt. Im Kapitel 2.4.2 werden verschiedene Mechanismen der Ionenbildung betrachtet, wobei in Kapitel 2.4.2.1 typische Merkmale von MALDI-Massenspektren zusammengestellt sind.

Der Begriff der Desorption wird als die Erzeugung neutraler Teilchen in der Gasphase, d.h. als Umkehr der Adsorption, verstanden. Bei MALDI steht der Begriff Desorption dagegen für die Freisetzung von Teilchen aus der kondensierten Phase. Der Begriff der Ablation wird ebenfalls eingesetzt, um bei MALDI den unspezifischen Abtrag der Probe durch den Laserimpuls und damit die Überführung der Teilchen in die Gasphase zu beschreiben.

Die Desorption erfolgt aufgrund eines kurzen Laserimpulses hoher Energie. Hierbei wird Material der Matrix und des Analyten abgetragen und in die Gasphase überführt. In Abbildung 2-1 ist die schematische Darstellung des MALDI-Prozesses in der Ionenquelle wiedergegeben. Ein Laserimpuls von der Dauer weniger Nanosekunden wird dazu genutzt, die Probe zu bestrahlen. Um eine geeignete Bestrahlungsstärke von ca. 10^{10} - 10^{12} W/m² zu erreichen, wird der Laserstrahl mit Linsen auf die Probe fokussiert.¹² Die hierbei entstehenden Ionen werden aus der Ionenquelle in den Massenanalysator überführt und nachgewiesen.

¹² Bei Laserdesorptionsexperimenten wird die Bestrahlungsstärke häufig in der Einheit W/cm² angegeben, somit ergibt sich eine Bestrahlungsstärke von 10^6 - 10^8 W/cm².

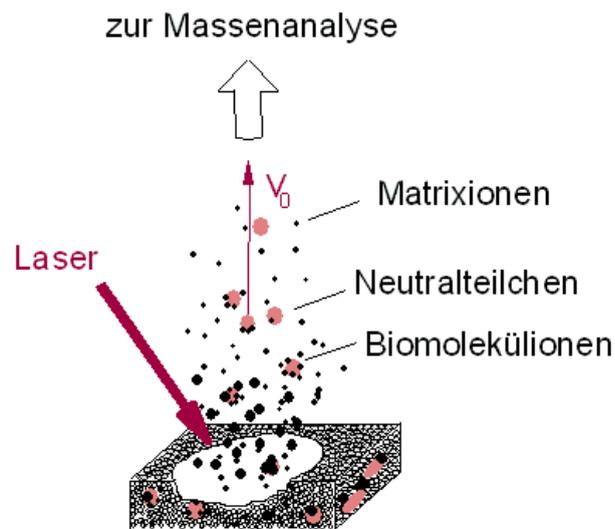


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung des MALDI-Prozesses: Innerhalb der Ionenquelle werden aufgrund des Laserimpulses Biomolekül- und Matrixionen sowie Neutralteilchen aus einer Matrix-/Analytpräparation freigesetzt (nach [Kar93b])

Bei den ersten Publikationen zu MALDI wurde zunächst ein frequenzvervierfacher Nd-YAG-Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 266 \text{ nm}$ ¹³ verwendet [Kar88]. In den folgenden Jahren sind UV-Wellenlängen von frequenzverdreifachtem Nd-YAG-Laser bei $\lambda = 355 \text{ nm}$ ¹⁴ [Bea89a] oder Stickstofflaser bei $\lambda = 337 \text{ nm}$ eingesetzt worden [Hil91].

Verschiedene Messungen mit IR-MALDI erfolgten z.B. mit dem Er-YAG Laser bei $\lambda = 2,94 \text{ }\mu\text{m}$ [Ove90] und mit dem TEA CO₂-Laser bei $\lambda = 10,6 \text{ }\mu\text{m}$ [Ove91]. Weitere interessante Ergebnisse bei IR-Laserwellenlängen sind z.B. bei Einsatz eines optisch parametrischen Oszillator-Lasersystems vorgestellt worden [Niu 98], der eine Variation der Laserwellenlänge erlaubt.

Zur Beurteilung des MALDI-Prozesses stehen verschiedene Parameter zur Verfügung. Zu dem Parameter der Laserbestrahlung (bzw. Laserbestrahlungsstärke) siehe Kapitel 2.5 sowie zur initialen Geschwindigkeit Kapitel 2.6. Weiterhin ist die Matrix bzw. das Präparationsprotokoll von großer Bedeutung, jedoch fehlen hier (siehe Kapitel 2.2) objektive Kriterien zur Beurteilung und Vergleich der Matrices bzw. Präparationsprotokolle.

¹³ Als Matrix diente hierbei Nikotinsäure.

¹⁴ Matrices waren hierbei Sinapinsäure (SINA), Ferulasäure sowie Kaffeesäure.

2.4.1 Desorptionsmodelle

In diesem Kapitel werden verschiedene Desorptionsmodelle vorgestellt. Obwohl die Suche nach einem einzigen Desorptionsmodell für IR- und UV-MALDI attraktiv ist [Che98], [Niu98] beschränkt sich diese Arbeit auf die Desorptions- und Ionisations-Phänomene bei UV-MALDI.

2.4.1.1 Das Vulkanmodell

Ein stark qualitatives und intuitives Modell, das zur Beschreibung des Desorptionsprozesses bei MALDI aufgestellt wurde, ist das sogenannte Vulkanmodell (*volcano-model*), das in Abbildung 2-2 illustriert ist [Hil90]. Durch den Laserimpuls kommt es zur Erwärmung des Materials unterhalb der Probenoberfläche (a). Der durch die Erwärmung entstehende Druck führt zur Aufwölbung (b) und letztendlich zum Zerbrennen der "Kruste", wobei eine Wolke von Material ausgestoßen wird (c).

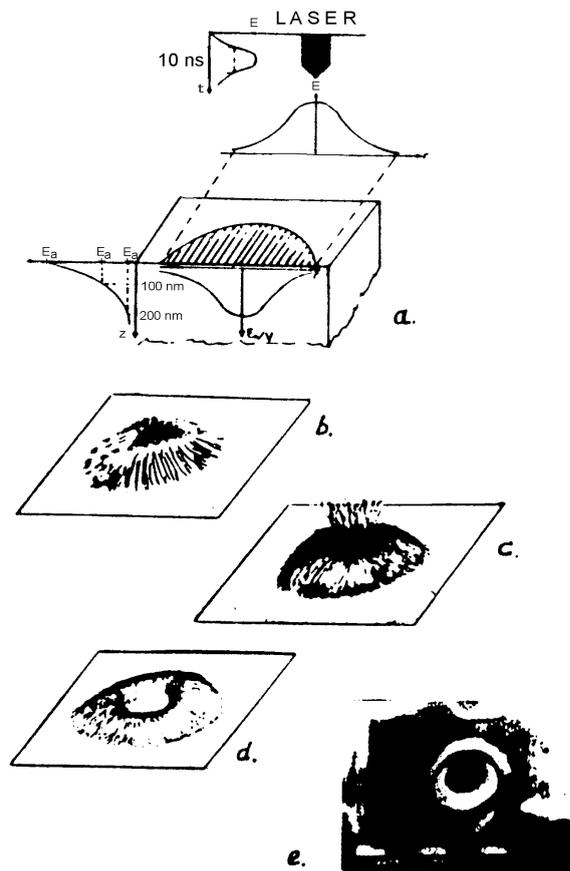


Abbildung 2-2 (aus [Hil90]) Vulkanmodell zur Beschreibung des Desorptionsprozesses bei MALDI

Der zurückbleibende Krater (d und e) konnte hierbei durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden [Hil90], [Kam97]. Durch Abdampfen von Material wird das desorbierte Material gekühlt, bis Analytmoleküle (z.B. Proteine) frei in der Gasphase vorliegen. Die Desintegration des Materials erfolgt hierbei fern des Gleichgewichtes.

2.4.1.2 Überschallstrahl

Die ersten Messungen der initialen Geschwindigkeit führten zur Entwicklung eines weiteren Desorptionsmodells [Bea91]: Durch Anregung des Laserlichtes erfolgt ein schneller Phasenübergang der Matrixmoleküle vom Festkörper zu einer Flüssigkeit unter hohem Druck. Diese Flüssigkeit expandiert adiabatisch in das Vakuum und bildet einen Überschallstrahl (*supersonic jet*), der auch große Moleküle in die Gasphase bringt. Hieraus resultiert die gleiche initiale Geschwindigkeit aller Moleküle innerhalb des Überschallstrahls (*entrainment*¹⁵). Die Messung der radialen Komponente der Startgeschwindigkeit zeigte eine stark asymmetrische Bewegung des Materials (*strongly asymmetric (= forwarded) ejection*) [Ens91].

Der Vergleich der Matrix- und Analytgeschwindigkeiten bestätigte die experimentellen Ergebnisse zur radialen und axialen Geschwindigkeitskomponente [Bök95], [Spe93]. In folgender Abbildung 2-3 ist die experimentelle Ionendichteverteilung eine Mikrosekunde nach dem Laserimpuls gezeigt [Bök95]. Dargestellt wird die Verteilung von DHB-Monomerionen (Mitte), Substanz P (unten) und Alkaliionen (oben) aus einer Substanz P/DHB *dried droplet*-Präparation.

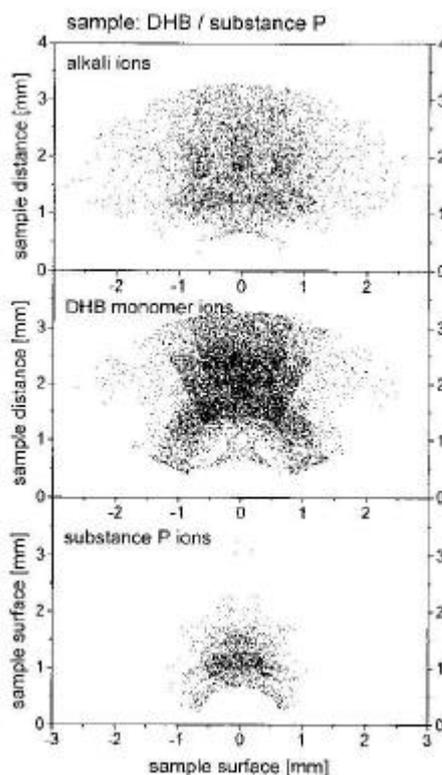


Abbildung 2-3 Ionendichteverteilung 1 ms nach dem Laserimpuls: Dargestellt wird die Verteilung von DHB Monomerionen (Mitte), Substanz P (unten) und Alkaliionen (oben) aus einer Substanz P/DHB *dried droplet*-Präparation [Bök95]

2.4.1.3 Das *homogenous bottleneck-Modell*

Das sogenannte *homogenous bottleneck-Modell* geht von einem starken Temperaturanstieg innerhalb des bestrahlten Materials aus [Ver90b]. Innerhalb dieses Modells wird die an der Oberfläche der Probe absorbierte Laserenergie innerhalb eines "heißen" Volumens im Matrix-/Analytfestkörper gleichmäßig verteilt. Der thermisch induzierte Streß führt zum Zerreißen der Matrix, wobei weiterhin das Entstehen von Clustern aus Analyt- und Matrixmolekülen postuliert wird. Hierbei ist wichtig, daß die Analytmoleküle (Gastmoleküle, *guest molecules*) bei einer kritischen Größe dieses thermisch induzierten Stresses freigesetzt werden, sobald das umgebende Matrixmaterial verdampft [Ver90]. Mit steigender Temperatur erhöht sich die Verdampfungsrate exponentiell und führt bei Molekülkristallen mit niedriger Sublimationstemperatur zur Kühlung. Je schneller der Energieeintrag erfolgt, desto schneller findet die Kühlung aufgrund der Sublimation statt.

Im Sublimationsmodell [Ver90b] verlassen die Moleküle die Oberfläche gemäß der Oberflächentemperatur. Hierbei berechnet sich aus der gemessenen kinetischen Energie der Teilchen eine extrem hohe Temperatur. Problematisch ist somit der Energietransfer von der heißen Matrix zu den labilen Biomolekülen [Ver90b], eine Entkopplung der Temperatur der Gastmoleküle von der der Matrix wird hierbei formuliert (*bottleneck* [Zar87]). Bei tiefer Einbettung in die Matrixkristalle wird in einem erweiterten Modell außerdem eine niedrigere Temperatur der Biomoleküle vorausgesagt [Ben97]. Berechnungen zur Ausdehnung der Teilchenwolke [Ver93] und molekulardynamische Simulationen (Leucine Enkephalin aus der Matrix Nicotinsäure) wurden ausgehend von diesem Modell entwickelt [Wu98], [Ben95].

2.4.1.4 Das *pressure pulse-Modell*

Einen anderen Ansatz verfolgt das *pressure pulse-Modell*. Hier führt eine schnelle thermische Anregung (*thermal spike*) innerhalb eines organischen Festkörpers zu einem Druckimpuls, der zum Ausstoß von Material führt [Joh91]. Große Moleküle auf der Oberfläche werden durch den Impulstransfer in der Druckwelle desorbiert.

¹⁵ Die Begriffe *entrainment* und Matrix wurden zuerst bei Laserdesorption verwendet [Pac85]. Jedoch ist das Wort *entrain* mit "in einen Eisenbahnzug verladen" nur schwer in das Deutsche zu übersetzen.

2.4.1.5 Das *breathing sphere*-Modell

Molekulardynamische Simulationen (siehe Abbildung 2-4) führten zur Aufstellung des *breathing sphere*-Modells, welches einige wesentliche Phänomene des Desorptionsprozesses bei MALDI beschreiben kann [Zhi97], [Zhi98], [Zhi00].

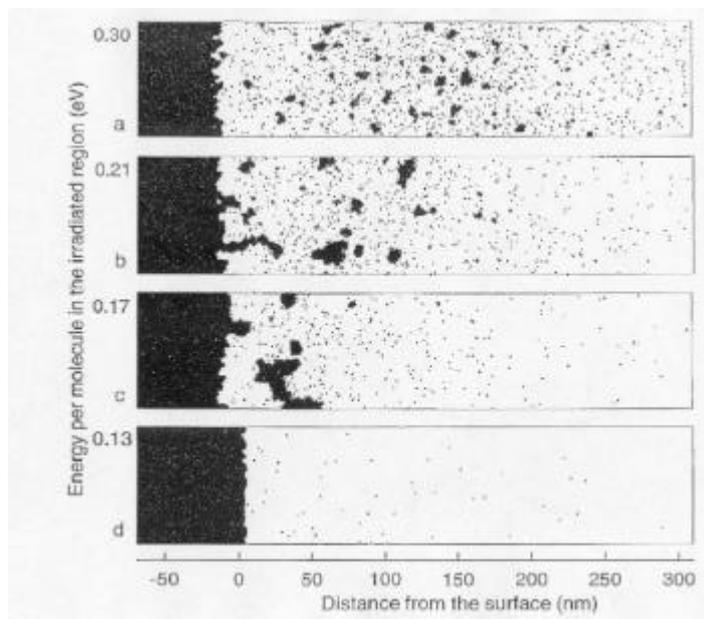


Abbildung 2-4 Ergebnisse der Teilchenwolke nach 500 ps in einer molekulardynamischen Simulation bei verschiedenen pro Molekül eingestrahelten Energien (*breathing sphere* [Zhi97])

Im *breathing sphere*-Modell [Zhi97], [Zhi98], [Zhi00] kommt es aufgrund eines laserinduzierten Druckaufbaus innerhalb der Probe zur sogenannten Phasenexplosion (fern des thermischen Gleichgewichts, *phase explosion*). Der hohe Druck innerhalb der Eindringtiefe relaxiert durch Ausdehnung des angeregten Materials. In der Richtung zum kalten Festkörper hin erzeugt die Expansion eine starke Druckwelle [Zhi97b]. In der Region der Oberfläche erzeugt der Druckgradient Kräfte, die die oberen Materialsichten normal zur Oberfläche beschleunigen (siehe experimentelle Ergebnisse in Kapitel 5 und 7). Bei einer bestimmten Kraft wird das Material zerrissen und abgetragen. Im *breathing sphere*-Modell zur Beschreibung der Laserablation kommt es unterhalb der Schwellbestrahlung (siehe Abbildung 2-5) im wesentlichen zur Verdampfung einzelner Moleküle (*evaporation*), während oberhalb der Schwellbestrahlung eine kollektive Ablation (*ejection, ablation*) des Materials erfolgt. Hierbei wird eine wesentliche Menge an Material der sich ausdehnenden Teilchenwolke (*plume*) in Clustern transportiert [Zhi97]. Die in diesem Modell vorausgesagte schwellbestrahlungsabhängige Desorption von Clustern konnte insbesondere in den Experimenten von [Han99], [Han99b] bestätigt werden. Ebenfalls können die experimentell beobachteten Schwellbestrahlungen bei MALDI in diesem Modell einfach als Schwellbestrahlungen der Desorption von Molekülclustern verstanden werden.

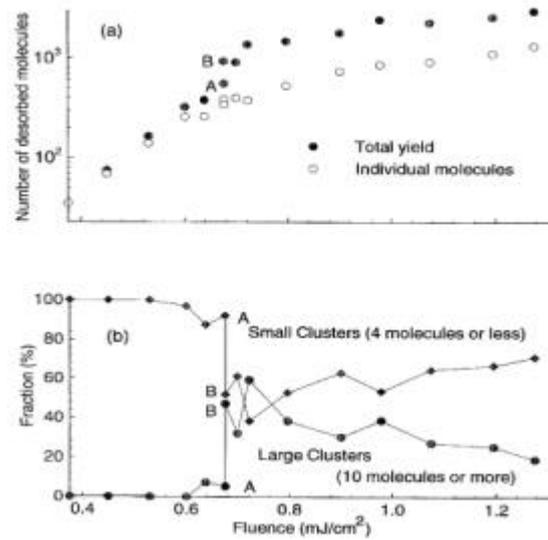


Abbildung 2-5 Molekulardynamische Simulation der Menge an desorbiertem Material (a) und Zusammensetzung der Teilchenwolke in Abhängigkeit von der Bestrahlung (b) (*breathing sphere*-Modell [Zhi97])

Die experimentellen Ergebnisse weiterer Forschungsgruppen werden im folgenden beschrieben.

2.4.1.6 Weitere Beobachtungen zum Desorptionsphänomen bei MALDI

Im folgenden werden Ergebnisse und Beobachtungen zum Desorptionsphänomen bei MALDI vorgestellt. Hierbei werden keine einheitlichen Desorptionsmodelle präsentiert, jedoch sind durch einige weiterführende Ergebnisse Rückschlüsse auf das Desorptionsphänomen bei MALDI möglich.

Ein wichtiges Ergebnis bei der Analyse von Flugzeitprofilen ist hierbei erwähnenswert. Wird die Form von Analytensignalen untersucht, so kann man daraus auf die ursprüngliche kinetische Energie der Ionen innerhalb der Ionenquelle schließen (siehe hierzu auch Kapitel 5.2.1.5). In Abbildung 2-6 ist ein Ionensignal von aus der Matrix HCCA desorbierten Insulinionen gezeigt [Fou98b], wobei zwei unterschiedliche Startgeschwindigkeiten für Insulin (320 m/s und 70 m/s, "DE-Methode", siehe Kapitel 2.6.2.3) aus der Matrix HCCA bestimmt worden sind.

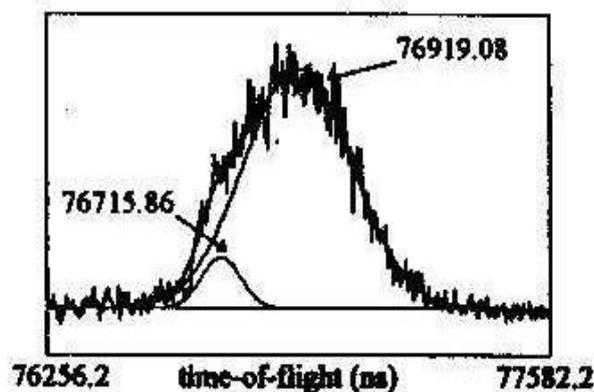


Abbildung 2-6 Zwei Geschwindigkeiten für Insulin (320 m/s und 70 m/s, "DE-Methode") aus der Matrix HCCA [Fou98b] deuten auf die Existenz von mehreren Komponenten der initialen Geschwindigkeit von Analytationen beim MALDI-Prozess hin

Die Untersuchung der kinetischen Energie von Ionen unterstützt ein Mehrkomponentenmodell für MALDI [Kin97]¹⁶, [Whi92], [Whi91], [Pur99]¹⁷. Die Matrix 3-HPA zeigt in der Präparation aus Wasser eine große Streuung der Startgeschwindigkeiten von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$, was evtl. auf zwei Geschwindigkeitskomponenten zurückzuführen sein könnte. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch DHB mit dem Zusatz Bernsteinsäure, wo ebenfalls eine langsame und eine schnelle Komponente detektiert werden konnten¹⁸ (siehe Abbildung 2-7).

¹⁶ Die Analyse von Flugzeitspektren von Lysozym-Analytclusterionen zeigt eine *entrainment velocity* von $v_0 = 880$ m/s (aus asymmetrischen Ionensignalformen) [Kin97].

¹⁷ Weiterhin konnten eine schnelle Komponente mit ca. $v_0 = 1000$ m/s und eine langsame Komponente mit ca. $v_0 = 500$ m/s bei der Untersuchung der Dynamik der Teilchenwolke mit laserinduzierter Fluoreszenz bestimmt werden [Pur98].

¹⁸ Die mittleren Startgeschwindigkeiten verschiedener Experimente liegen bei $v_0 = 741 \pm 23$ m/s, die bei anderen Experimenten bei 367 ± 49 m/s. Der Mittelwert aller Experimente liegt bei $v_0 = 475 \pm 170$ m/s [Glü97], [Glü99b].

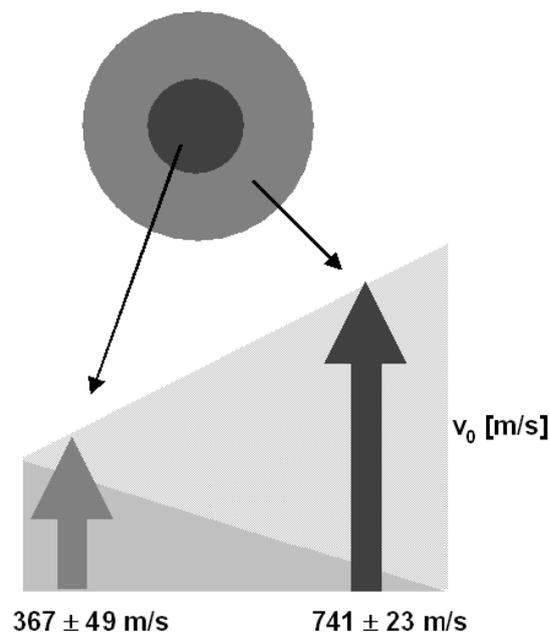


Abbildung 2-7 Startgeschwindigkeiten von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ aus DHB mit dem Zusatz von Bernsteinsäure ($G = 89\%$, $U_{ges} = 25\text{ kV}$, $l = 337\text{ nm}$, Voyager DE)

Die experimentellen Ergebnisse lassen ein einfaches Desorptionsmodell nicht zu. Prinzipiell ist somit ein Desorptionsmodell, in dem verschiedene Desorptionskomponenten mit verschiedenen Desorptionsgeschwindigkeiten auftreten, zu formulieren [Glü00b].

Einen Ansatz zur Beschreibung verschiedener Komponenten im MALDI-Prozeß bieten Cluster von Matrixmolekülen mit Analytteilchen. Obwohl experimentell bei UV-MALDI in den Massenspektren Cluster nicht direkt festzustellen sind, konnte aus den Ergebnissen dieser Arbeit ein einfaches Desorptions-/Ionisationsmodell (siehe Kapitel 6) entwickelt werden [Kar00], welches die Idee der Clusterionisation mit dem Modell der Desorption von Clustern bei erhöhter Laserbestrahlung [Zhi97], [Zhi98], [Zhi00] verbindet.

Cluster können bei MALDI unter den üblichen Bedingungen ohne erhöhten Druck innerhalb der Ionenquelle nicht nachgewiesen werden, sind jedoch bei orthogonaler Flugzeitmassenspektrometrie mit stoßinduzierter Kühlung in der Ionenquelle festzustellen [Kru98]. Bei hohem Gasdruck in der Ionenquelle (wenige Pa bis zu Atmosphärendruck) ist aufgrund der stoßinduzierten Kühlung der Nachweis von Clustern aus Matrixmolekülen mit Analytionen [Ver99] experimentell möglich. Bei einem Druck von ca. 67 Pa innerhalb der Ionenquelle kann ein typisches MALDI-Spektrum gewonnen werden. Wird der Druck weiter erhöht, treten bei ca. 200 Pa Cluster der Matrix mit dem Analyten auf (siehe Abbildung 2-8). Bei erhöhter Stoßenergie der Ionen mit anderen Teilchen zwischen Ionenquelle und Massenspektrometer werden Cluster/Addukte der Matrix mit dem Analyten entfernt.¹⁹

¹⁹ Die hier nachgewiesenen Cluster können entweder durch Rekombination von sekundären Species oder durch direkte Emission im Bereich des Desorptionsortes entstehen.

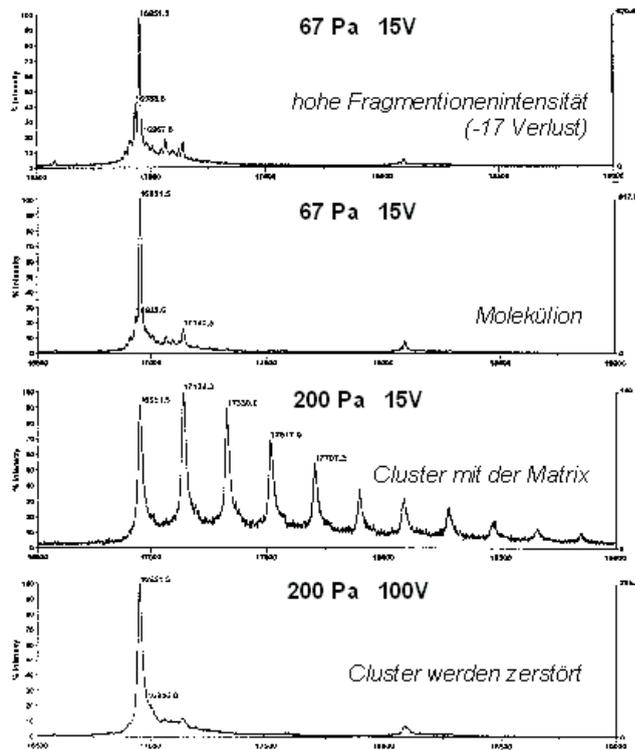


Abbildung 2-8 Bei hohem Gasdruck in der Ionenquelle (wenige Pa bis zu Atmosphärendruck) wird aufgrund der stoßinduzierten Kühlung eine Clusterbildung der Matrix mit dem Analyt festgestellt [Ver99]

Ein experimenteller Nachweis von Clustern der Matrixmoleküle mit Analytmolekülen unterstützt das Modell zur Desorption und Ionisation bei MALDI [Kar00] (siehe Kapitel 6). Ebenso gelang der Nachweis von Partikeln aus Analyt und Matrixmolekülen durch Auffangen auf einer Oberfläche, die mit verschiedenen mikroskopischen Techniken untersucht werden konnte [Han99], [Han97], [Hei99]. Außerdem wurde bei der Untersuchung der Desorptionswolke mit Laserdesorption/Photoionisation die Anwesenheit von Molekülclustern gezeigt [Han99b].

2.4.1.7 Einteilung und Bewertung der vorgestellten Desorptionsmodelle

Neben eher phänomenologischen Modellen, wie dem Vulkanmodell [Hil90], versuchen einige Desorptionsmodelle die physikalischen Grundlagen des Desorptionsprozesses zu beschreiben. Diese Modelle lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

1. Die "quasithermischen" Modelle [Ver90], [Dre95], [Ben95], [Wu98]:
 - Diese Modelle basieren auf einem Phasenübergang bzw. einer Sublimation.
 - Die Temperatur des ablatierten Materials wird innerhalb des Modells angegeben (Arrhenius Ansatz, quasithermische Verdampfung).
 - Diese Modelle beschreiben die Bildung einer heißen Wolke von Matrix- und Analytmolekülen in der Gasphase (teilweise unter Ausbildung eines Molekularstrahls durch Stöße).
2. Die "mechanischen" Modelle: *pressure pulse* [Joh91] oder *phase explosion* [Zhi97]
 - Ein Druckimpuls im Festkörper führt zu Ausstoß von Material.
 - Die eingebrachte Energie wird schnell zu kinetischer Energie umgewandelt und führt zur Expansion der Teilchenwolke.

Die "quasithermischen" Modelle benötigen eine starke Entkopplung der translationalen Temperatur von der internen Energie der Matrix- und der Biomoleküle (*bottleneck*), da die vorhergesagte Temperatur für ein Überleben der Biomoleküle unrealistisch hoch erscheint.²⁰ Die Einführung einer Schwellbestrahlung kann jedoch mit der Annahme einer Verdampfungs- oder Sublimationsenthalpie erklärt werden.

Bei den "mechanischen" Modellen führt die absorbierte Energie zur Ausdehnung des Kristallgitters und dem Aufbau eines hohen hydrodynamischen Druckes, der zu einem explosionsähnlichen Vorgang führt. Hierbei befindet sich das Material fern des thermischen Gleichgewichtes, was die Beschreibung eines Mechanismus zur Entkopplung der thermischen Energie der Biomoleküle von der der Matrixmoleküle unnötig macht.

Die Unterscheidung des steilen Druckanstieges (*pressure pulse*) von einem steilen Temperaturanstieg als Auswirkung der Laseranregung ist jedoch schwierig [Wu98].

²⁰ Für Biomoleküle wird zum Beispiel im *homogenous bottleneck*-Modell eine Temperatur von ca. 500 K, für Matrixmoleküle eine Temperatur von ca. 800 K angenommen [Ver90b].

2.4.2 Ionisationmechanismen

Die bisher beschriebenen Prozesse führen zur Desintegration des Matrix-/Analytfestkörpers und zur Freisetzung der Teilchen in der Gasphase. Zur Ionenbildung sind jedoch weitere Mechanismen notwendig. In Bezug auf Ionisation bei MALDI existiert kein umfassendes Modell, jedoch sind verschiedene Mechanismen der Ionenbildung in der Literatur beschrieben, wie sie z.B. in einem Übersichtsartikel von Zenobi [Zen98] zusammengefaßt sind. Neben protonierten Ionen können in der Praxis zum Beispiel kationisierte, deprotonierte, mehrfachdeprotonierte/kationisierte und auch (positiv- oder negativgeladene) radikalische Ionen im MALDI-Massenspektrum beobachtet werden. Weiterhin treten zum Beispiel Molekülmultimere, Adduktionen, Ionen, die Wasserstoff angelagert, aber auch Wasserstoff abgespalten haben, und Fragmente im MALDI-Massenspektrum auf. Im folgenden Kapitel 2.4.2.1 sind einfache Beobachtungen bei MALDI-Massenspektren beschrieben, bevor verschiedene Ionenbildungsmechanismen für MALDI zusammengefaßt werden.

2.4.2.1 Beobachtungen bei MALDI-Massenspektren

Ein Charakteristikum von MALDI-Spektren ist, daß im wesentlichen einfachgeladene Ionen beobachtet werden. Bei anderen Desorptions-/Ionisationstechniken liegen die Verhältnisse ähnlich [Han89]. In seltenen Fällen (z.B. bei der Matrix HCCA)²¹ ist ein leicht höherer Ladungszustand für Ionen höherer Masse zu beobachten [Bea92], [Juh94].^{22,23}

Die Entstehung von positiv oder negativ geladenen Ionen während des MALDI-Prozesses ist nicht vom Nachweis (d.h. der Polarität der angelegten Spannung) im Massenspektrometer abhängig. Während beim MALDI-Prozeß gleichzeitig positive und negative Ionen entstehen, werden in der Flugzeitmassenspektrometrie nur Ionen einer Polarität registriert.

Peptide/Proteine, die typischerweise aus saurer Lösung²⁴ präpariert werden, lassen sich dennoch in beiden Ionenmodi nachweisen. Hierbei werden im wesentlichen einfachgeladene/deprotonierte oder einfachgeladene/protonierte Analytionen detektiert.²⁵

MALDI-Massenspektren im Positiv- und Negativmodus sind in der Regel nicht komplementär. Im Verhältnis besitzt das Signal des intensivsten Matrixions (bei gleicher

²¹ Höhere Ladungszustände wurden z.B. auch mit Glycerin in der Präparation [Zho95] und auch für IR-MALDI [Ove90], [Ove91] sowie SALDI [Sun95], [Kra98] beobachtet.

²² Eine höhere Ionenintensität der mehrfachgeladenen Ionen wie z.B. $[M+nH]^{n+}$ im Verhältnis zu ihren einfachgeladenen Ionen $[M+H]^+$ kann auch auf die höhere Nachweisempfindlichkeit für Ionen höherer kinetischer Energie zurückgeführt werden.

²³ Zusätzlich wird bei IR-MALDI der Grad der Ionisation aufgrund des im Verhältnis zu UV-MALDI wesentlich erhöhten Materialabtrages bei etwa gleicher Ionenintensität geringer sein [Cra97].

²⁴ Hierbei kann bei den üblichen MALDI-Präparationen mit verschiedenen Matrices immer ein $pH < 7$ gefunden werden. Auch die "neutralen" Matrices THAP und DHAP zeigen in Lösung einen sauren pH-Wert.

²⁵ Bei Präparation mit einer basischen Matrix müßte analog zur Präparation mit saurer Matrix (mit Trifluoressigsäure als Lösungsmittelzusatz) eine starke Base zugesetzt werden. Da jedoch Basen wie NaOH (aufgrund der Metallkationen in Lösung) ungeeignet sind, wäre hier eine andere starke Base notwendig, um während der Präparation eine Protonierung der Matrix zu verhindern.

Laserenergie) im negativen Ionenmodus eine höhere Intensität als im positiven Ionenmodus. Beispielsweise ist für Insulin aus der Matrix DHB (siehe Abbildung 2-9) im Negativmodus die Signalintensität der intensivsten Matrixionen etwa viermal so hoch wie die des Analyten, während im Positivmodus die Signalintensität des intensivsten Matrixions im Verhältnis zu der der Analytionen weniger als doppelt so hoch ist.²⁶

Weiterhin ist bei gleicher Laserenergie und Zahl der Summenspektren die Intensität des Analytionensignals im Negativmodus relativ zum Positivmodus auf ca. 70% vermindert (siehe Abbildung 2-9).

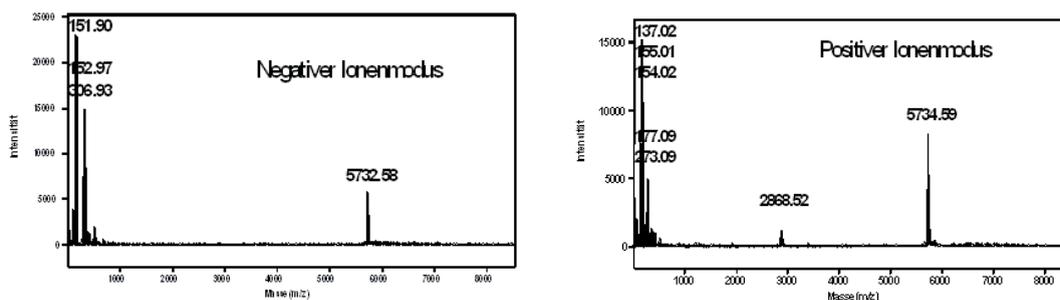


Abbildung 2-9 Vergleich des positiven und negativen Ionenmodus: Reflektor-MALDI-Spektren von Insulin aus der Matrix DHB von der gleichen Probe bei gleicher Laserenergie (Voyager DE PRO, $U_{ges} = 20$ kV; $G = 71$ %, $t = 380$ ns)

Oligonukleotide lassen sich bei MALDI in beiden Ionenpolaritäten als deprotonierte und protonierte Ionen detektieren, auch wenn sie in Lösung deprotoniert vorliegen. Im negativen Ionenmodus erhält man allerdings höhere Signalintensitäten für kleinere Oligonukleotidanalytionen. Um Spektren von hoher Qualität von anionischen Substanzen, wie z.B. Oligonukleotiden, registrieren zu können, ist es notwendig, bei der Probenpräparation Metallkationen gegen Ammonium NH_4^+ auszutauschen [Stu91].

Neutrale Zucker, aber auch Peptide ohne basische oder saure funktionelle Gruppen, werden üblicherweise als kationisierte Analytionen detektiert.

Kationisierung mit zweifachgeladenen Metallkationen Me^{2+} resultiert in der Bildung von einfachgeladenen Ionen²⁷ des Typs $[M-H+Me]^{1+}$ oder $[M-(2n-1)H+nMe]^{1+}$ im Positivionenmodus bzw. den entsprechenden Ionen $[M-3H+Me]^{1-}$ oder $[M-(2n+1)H+nMe]^{1-}$ im Negativionenmodus.²⁸

²⁶ Diese Werte sind experimentell für den negativen und positiven Ionenmodus bei gleicher Laserenergie und Präparation für DHB/Insulin bestimmt worden (Summe über jeweils 10 Spektren).

²⁷ Hierbei werden das Analytmolekül mit M, einfachgeladene Alkalimetallkationen mit Cat^+ , mehrfachgeladene Metallkationen mit Me^{2+} , Matrixteilchen mit T und Anionen mit B^- bezeichnet.

²⁸ Bei der Elektrospray-Ionisation hingegen werden neben dem Ion $[M+Zn-H]^+$ auch Ionen des Typs $[M+Zn]^{2+}$ oder $[M+2Zn]^{4+}$ detektiert [Loo94].

Die Anionisierung durch z.B. Cl⁻, und damit die Bildung von [M+Cl]⁻-Ionen, wie sie bei Elektrosprayionisation zu beobachten ist [Col99]²⁹, wird bei typischen MALDI-Bedingungen nicht festgestellt.³⁰

Radikationen werden bei einigen Matrices für UV-MALDI detektiert. Für die Matrix DHB wird im positiven Ionenmodus neben dem Signal des [T+H]⁺-Ions mit m/z 155 wird auch das Signal T^{•+} mit m/z 154 ermittelt³¹ (siehe Abbildung 2-10).

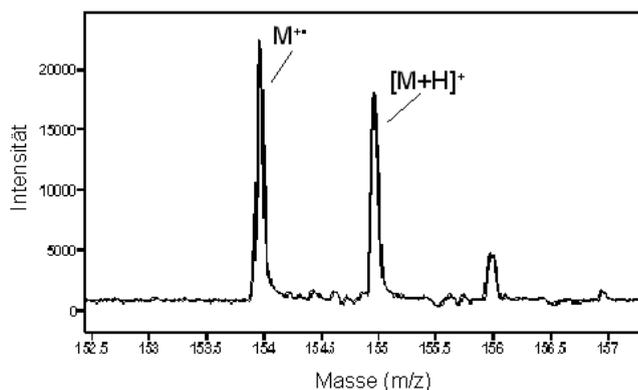


Abbildung 2-10 DHB-Matrixsignale: Neben dem Ion [T+H]⁺ mit m/z 155 wird im Positivionenmodus auch ein Ion T^{•+} mit m/z 154 detektiert (Voyager DE PRO, Reflektormodus, $U_{ges} = 20$ kV, $G = 75$ %)

Auch im negativen Ionenmodus zeigt die Matrix DHB neben dem [T-H]⁻-Ion als eines der wesentlichen Ionensignale auch ein [T-2H]^{•-}.³² Dies weist auf die Bildung von Wasserstoffradikalen hin, die auch experimentell nachgewiesen werden konnten [Sco94].³³ Weiterhin ist in den Spektren im Negativionenmodus ein intensives Signal von Elektronen zu beobachten.

Alle typischen Matrices zeigen entweder HO-, HN- oder HS-Gruppen, dennoch ist die Matrixfunktion nicht korreliert zu in wässriger Lösung sauren Protonen [Kar96], [Mef98], [Gri96]. Mit Hilfe der Derivatisierung von Matrices kann gezeigt werden, daß die Säuregruppe für die Protonierung des Analyten nicht notwendig ist. Die Matrix HCCA-Amid (4-Hydroxy- α -cyanozimtsäureamid) ist eine nichtsaure Matrix, zeigt jedoch der Matrix HCCA

²⁹ Bei der Elektrosprayionisation werden Ionen des Typs [M+Cl]⁻ beobachtet [Col99]; dies beweist ihre prinzipielle Stabilität in der Gasphase.

³⁰ Für den speziellen Fall des Tetrabutylammonium bei binären Matrixgemischen werden Ionen bei MALDI auch durch Anionenlagerung gebildet [Bre98].

³¹ Hierbei ist eine Unterteilung von MALDI-Matrices in drei Gruppen möglich, wobei nach Auftreten von Matrixionen des Typs [T+H]⁺ und [T]^{•+} unterschieden wird [Ehr93]. Die erste Gruppe von Matrices zeigt ein Matrixionensignal [T]^{•+}, in der zweiten Gruppe der Matrices (z.B. HCCA) wird nur ein [T+H]⁺ beobachtet, die dritte Gruppe der Matrices zeigt sowohl ein [T+H]⁺ als auch ein [T]^{•+} Matrixion im Spektrum (z.B. DHB, SINA). Substanzen, die [T+H]⁺-Ionen bilden, sind in der Regel als Matrices besser geeignet als Matrices, die nur Radikale bilden.

³² Mögliche Bildungswege dieses Ions sind entweder über Elektroneneinfang und Dissoziation oder über Oxidation des DHB-Moleküls.

³³ Das Auftreten von Wasserstoffradikalen wurde ebenso für FAB festgestellt [Cla84].

vergleichbare Spektren.³⁴ Insgesamt beweist dies, daß nicht notwendigerweise Carbonsäureprotonen zur Ionisation bei MALDI notwendig sind. Dennoch scheint die Matrixfunktion vom pH-Wert der Matrix-/Analytlösung bei der Präparation abhängig zu sein. Zum Beispiel ist die Funktion der Matrix DHB bei der Präparation auf pH-Werte unterhalb ihres pK_s -Wertes beschränkt, was auf einen Zusammenhang zwischen dem Ladungszustand der Ionen in der Präparation und dem der Ionen in der Gasphase hinweist.

Ein weiteres Charakteristikum von MALDI-Spektren besteht darin, daß unter speziellen Bedingungen, z.B. einer hohen Analytkonzentration und einer niedrigen Laserbestrahlung, MALDI-Massenspektren nur Analytionensignale zeigen [Kar89], [Kno96], [Kno98], [Str91], [Kar87].

Weiterhin werden neben den MALDI-Analytionen auch Fragmentationen in den Massenspektren festgestellt. Hierbei treten entweder prompte oder metastabile Zerfallsvorgänge auf (siehe Kapitel 3.2.8), während bei metastabilem Zerfall im wesentlichen B/Y-Ionen [Spe97] und C/Z-Ionen im Fall der prompten Fragmente auftreten [Bro97b], [Bro96]. Weiterhin ist der Grad der Fragmentierung mehr von der Matrix als von der Laserbestrahlung abhängig.

Die Bildung von einfachgeladenen Analytmultimeren ist eine weitere Beobachtung [Kin97]. Diese "Cluster" werden allerdings, da nur in speziellen Fällen (z.B. Ferulasäure bei hoher Analytkonzentration) beobachtet, im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

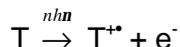
Im folgenden werden kurz einige mögliche Wege der Ionisation bei MALDI beschrieben, wobei die Beurteilung der Ionenbildungsmechanismen in Kapitel 2.4.2.7 erfolgt.

2.4.2.2 Photochemische Mechanismen und Disproportionierungsreaktionen

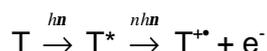
Im Gegensatz zur direkten Laserdesorption (LDI) von Biomolekülen wird bei der Ionisation bei MALDI eine Ionisation der Biomoleküle indirekt über die Matrixmoleküle angenommen. In den ersten Publikationen zu MALDI [Kar88], [Ehr92] wird ein der chemischen Ionisation ähnlicher Prozeß vorgeschlagen, der zu protonierten bzw. deprotonierten Analytmolekülen führt. Als möglicher Schritt der Ionisation wird eine Photoionisation einzelner Matrixmoleküle (aufgrund der spezifischen Absorption in den aromatischen π -Systemen [Kar85] der Matrixmoleküle T) unter Bildung radikalischer Matrixmolekülonen und Photoelektronen postuliert. Die folgenden Mechanismen erklären das experimentelle Auftreten von sowohl Radikalen und Radikationen [Ehr92] sowie Elektronen [Qui94] als auch Photoionisationsprodukten bei MALDI.

³⁴ Das Spektrum der Matrix HCCA-Amid ist dominiert von den Ionen der Zusammensetzung $[T+H]^+$, $[T+Na]^+$, $[T+K]^+$. Folgende Ionen im HCCA-Amid Matrixspektrum sind detektiert worden: $[T+H]^+$ m/z 189, $[T+Na]^+$ m/z 211, $[T+K]^+$ m/z 227, $[2T+H]^+$ m/z 377, $[2T+Na]^+$ m/z 389, $[T-NH_3+H]^+$ m/z 172. Die Matrix HCCA-Amid zeigt ebenso wie die Matrix HCCA kein Signal eines Radikalkations im positiven Ionenmodus. Die Matrixfunktion ist nicht auf die Zersetzung des Amids während des Desorptionsprozesses zurückzuführen.

Photoionisation sollte als resonanter oder nichtresonanter Mehrphotonenprozeß möglich sein. Der einfachste Weg ist hierbei die Multiphotonen-Ionisation (MPI), die direkt zum Matrixradikalkation gemäß folgender Reaktionsgleichung führt (siehe auch Reaktionsweg C in Abbildung 2-11):

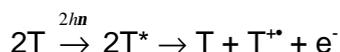


Es kann weiterhin ein sequentieller Mehrphotonenmechanismus (Reaktionsweg B in Abbildung 2-11, dort als Zweiphotonenmechanismus) formuliert werden. Aus dem angeregten Zustand der Matrix werden weitere Photonen absorbiert, so daß ebenfalls ein Matrixradikalkation und ein freies Elektron entstehen:



Da die direkte Photoionisation von einzelnen Matrixmolekülen³⁵ bei typischen Bestrahlungsstärken für UV-MALDI jedoch nicht mit zwei Photonen³⁶ der Wellenlänge $\lambda = 337 \text{ nm}$ möglich ist [Kar98], [Lan98], kann man eine direkte Photoionisation bei MALDI ausschließen [Mef95].³⁷ Die Trennung von positiven und negativen Ionen in der Gasphase am Beispiel von Phenol benötigt ca. 14,65 eV [Jou90]. Somit ist eine Reaktion gemäß $M \rightarrow H^+ + [M-H]^-$ zur primären Ionenbildung ebenfalls nicht möglich, da diese Energie wesentlich größer ist als z.B. die Photonenenergie des N_2 -Lasers.^{38,39}

Ein möglicher Ionisationsweg wäre weiterhin (siehe Prozeß A, *energy pooling*, in Abbildung 2-11):



Dieser Mechanismus wird von vielen Autoren aufgegriffen, da die zugrundeliegenden Prozesse innerhalb eines angeregten "Matrixfestkörpers" möglich erscheinen [Kar93], [Ehr95]. Ergebnisse zur Fluoreszenz von Matrixfestkörpern bestätigen weiterhin den Mechanismus der Reaktion von angeregten Molekülen unter Fluoreszenzlöschung (*exciton annihilation*) [Lue00], [Ehr95].

³⁵ Typische Werte liegen hier bei 9-10 eV zur Photoionisation von einzelnen Matrixmolekülen [Kar98]. Eine Dreiphotonen-Ionisation wäre auch bei für MALDI sehr hohen Bestrahlungsstärken nicht möglich [Kar98].

³⁶ Hierbei kann die Absorption des zweiten Photons aus einem angeregten Zustand des Moleküls (Abbildung 2-11, Weg B [Kar85]) oder durch nicht-resonante Zweiphotonenabsorption (Weg C) erfolgen [Ehr92].

³⁷ Direkte Photoionisation ist ebenso bei den Bestrahlungsstärken von IR-MALDI zu vernachlässigen, dennoch kann auch hier eine große Zahl von Radikalen im Spektrum beobachtet werden [Ehr93].

³⁸ Zwei Stickstofflaser-Photonen besitzen die Energie von 7,36 eV [Kar98].

³⁹ Direkte Photoionisation von gasförmigen Biomolekülen ($\geq 1000 \text{ u}$) erfolgt nur selten, da die bei der Photoionisierung eingekoppelte Energie zu hoch ist und die entstehenden Radikationen eine geringe Stabilität besitzen (siehe [Bec95] und dort enthaltene Literaturzitate).

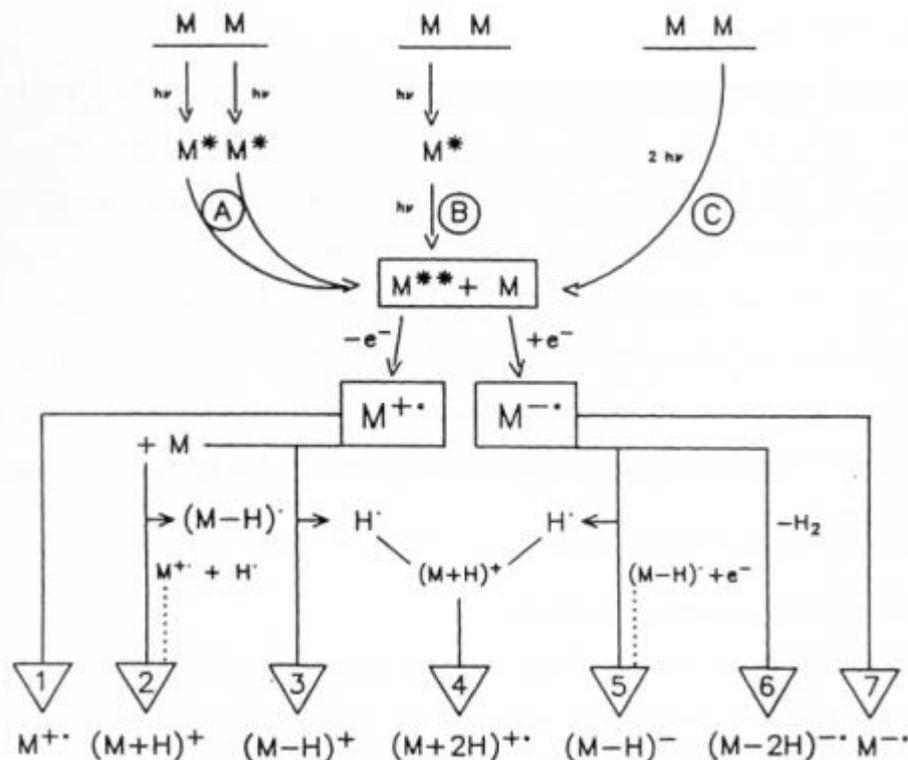
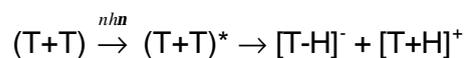


Abbildung 2-11 Ionisationswege bei UV-Laserdesorption [Ehr92]

Die möglichen Reaktionwege bei UV-Laserdesorption nach Ehring beschränken sich auf die Bildung einfachgeladener sowie positiv- oder negativgeladener Quasimolekülionen, wobei die Protonierung bzw. Deprotonierung von Analytteilchen durch radikalische oder protonierte Matrixmolekül- oder Matrixfragmentionen in der Gasphase erfolgt.

Da Matrices sowohl im positiven als auch negativen Ionenmodus Matrixfunktion zeigen, ist ein Disproportionierungsmechanismus gemäß folgendem Mechanismus ebenfalls denkbar [Bre98]:



Da die auftretenden Matrixionenspektren bei MALDI im positiven und negativen Ionenmodus allerdings nicht komplementär sind, kann dieser Mechanismus ausgeschlossen werden.

2.4.2.3 Thermische Ionisation

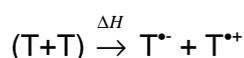
Für SALDI wird ebenfalls ein thermischer Ionisationsmechanismus diskutiert [Zen98]. Da Flüssigkeiten wie Glycerol bei UV-Wellenlängen transparent sind, kann eine Absorption des eingestrahlten Laserimpulses nur in den Partikeln der Suspension erfolgen.

Bei der thermischen Oberflächenionisation kann (bei Annahme des Gleichgewichtes aller Freiheitsgrade) das Verhältnis der Ionendichte zur Dichte der neutralen Teilchen a_i an der Oberfläche durch die Langmuir-Gleichung⁴⁰ beschrieben werden [Lan29], [Zen98]:

$$a_i = C \cdot e^{\left(\frac{EA-IP}{kT}\right)}$$

Hierbei ist C eine Konstante nahe 1, T die absolute Temperatur der Oberfläche und k die Boltzmann-Konstante. Das Verhältnis a_i ist exponentiell abhängig vom Quotienten $(EA-IP)/kT$, d.h. es ist um so größer, je höher die Austrittsarbeit bzw. Elektronenaffinität EA des Oberflächenmaterials und je niedriger die Ionisierungsenergie bzw. das Ionisationspotential IP ist.

Neben der Photoionisation [Ehr92] ist somit ein thermischer Ionisationsmechanismus gemäß folgender Gleichung zu beurteilen:

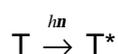


Unter Annahme einer thermischen Ionisation für MALDI kann das Verhältnis der Ionendichte zur Dichte der neutralen Teilchen a_i ebenfalls mit Hilfe der Langmuir-Gleichung beschrieben werden: Bei typischen Temperaturen der desorbierten MALDI-Teilchen von $T = 500$ K [Mow94], [Dre95] und einer Elektronenaffinität der Matrix DHB von $EA \approx 1$ eV [Zen98] sowie dem Ionisationspotential von $IP = 8,05$ eV [Kar98] ist die thermische Ionisation bei MALDI, z.B. von Matrixmolekülen ($a_i \sim 10^{-71}$), allerdings vollkommen auszuschließen.

2.4.2.4 Protonentransferreaktionen aus angeregten Zuständen der Matrixmoleküle

Neben der Bildung von Radikalen werden auch andere primäre Ionenbildungsmechanismen vorgeschlagen, die in Ergänzung zu den in Abbildung 2-11 dargestellten Reaktionswegen zu sehen sind.

Hierbei werden Protonenübertragungsreaktionen aus angeregten Zuständen der Matrixmoleküle (*excited state proton transfer*, ESPT) [Gim97], [Chi93] beschrieben.



Hierbei erfolgt die Ionisation des Analytmoleküls M über den Zwischenschritt der Protonierung eines Matrixmoleküls durch ein angeregtes Matrixmolekül bzw. über die direkte Protonierung eines Analytmoleküls durch ein angeregtes Matrixmolekül. Hierbei geht man davon aus, daß ein einfachangeregtes Molekül eine höhere Acidität besitzt als das Molekül im Grundzustand.

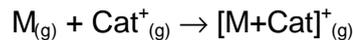
Jedoch zeigen verschiedene Untersuchungen, daß *excited state proton transfer* mit einem Photon bei UV-MALDI ebenfalls nicht möglich ist [Chi93], [Zen98], [Kar98], da die hierzu notwendige Energie ebenfalls größer ist als z.B. die Photonenenergie des N_2 -Lasers.

⁴⁰ Zur Oberflächenionisation siehe Publikationen von Eggert, Saha [Egg19], [Sah21] oder Veröffentlichung von Fujii [Fuj96].

2.4.2.5 Kationisierung

Bei neutralen Kohlenhydraten und auch vielen neutralen Polymeren werden in MALDI-Massenspektren im wesentlichen kationisierte Analytmoleküle detektiert. Die Entstehung kationisierter Quasimoleküle wird für LDI von Spengler [Spe87] über die Bildung von Clustern beschrieben, die neben Analytmolekülen auch Kationen enthalten.

Ein weiterer Mechanismus beruht auf der Kationisierung neutraler Analytmoleküle M in der Gasphase durch Kationen (Cat^+), wie Alkalimetallkation Na^+ oder K^+ , wie z.B. von Wang oder Mowat [Wan93], [Mow97] beschrieben:



2.4.2.6 Desorption vorgeformter Ionen

Ein weiterer Mechanismus zur Bildung von Ionen bei MALDI ist die Desorption von vorgeformten Ionen. Zur Erklärung des Auftretens von ionischen Substanzen oder Komplexen von metallbindenden Proteinen [Nel92], [Leh97], [Leh99] im positiven Ionenmodus erscheint dieser Weg attraktiv. Weiterhin erscheint das Modell der Desorption vorgeformter Ionen bei anionischen Analyten zum Beispiel von Oligonukleotiden denkbar, insbesondere wenn basische Matrices eingesetzt werden [Fit93]. Zum Problem der Ladungstrennung bzw. der Trennung der Analyt- von Gegenionen siehe Kapitel 6.

2.4.2.7 Bewertung von Ionenbildungsmechanismen bei MALDI

Die Mechanismen der Ionenbildung bei MALDI lassen sich prinzipiell in zwei Gruppen einteilen:

1. Primäre Ionenbildungsmechanismen:
 - Freisetzung vorgeformter Ionen
 - Photoionisationsmechanismen (MPI, ESPT, *energy pooling*)
 - Disproportionierungsreaktionen (Protonen- oder Elektronentransfer)
2. Sekundäre Ionenbildungsmechanismen
 - Gasphasenkationisierung
 - Protonentransferreaktionen in der Gasphase
 - Elektronentransferreaktionen

Die sekundären Mechanismen benötigen einen primären Ionisationsschritt. So kann trivialerweise eine Gasphasenkationisierung nur auftreten, wenn ein Kation in der Gasphase vorhanden ist. Eine Kombination der primären und sekundären Mechanismen oder auch verschiedener Mechanismen untereinander ist weiterhin möglich.

Zusammenfassend ist bei den Mechanismen der primären Ionenbildung jedoch nur der Mechanismus des *energy pooling* sowie die Freisetzung vorgeformter Ionen sinnvoll, während alle sekundären Ionisationsmechanismen in Betracht zu ziehen sind.

Einer der wesentlichen Gründe, warum Ionisation bei MALDI schwer verständlich ist, besteht in der Vielzahl der genannten Ionisationsmechanismen. Kein einzelner Mechanismus ist geeignet, alle in MALDI-Massenspektren beobachteten Ionen zu beschreiben. Weiterhin werden die zugrundeliegenden Mechanismen oft von variierenden experimentellen Parametern verdeckt, da verschiedene apparative Aufbauten mit unterschiedlichen Laserwellenlängen, Laserbestrahlungen, Laserimpulsdauern oder Methoden der MALDI-Probenpräparation eingesetzt werden.

Die Zahl der Ionen bei MALDI ist außerdem im Verhältnis zur Zahl der Neutralteilchen (Matrix und Analyt) gering [Pur97]. Bei der Beschreibung von Ionisationsmechanismen ist daher in Betracht zu ziehen, daß die Ionen nur einen geringen Anteil der desorbierten Teilchen ausmachen.

Im folgenden werden einige Parameter beschrieben, die eine Beurteilung des MALDI-Prozesses erlauben.

2.5 Bestrahlung und Bestrahlungsstärke

Die Bestrahlung H (pro Flächeneinheit auftreffende Laserenergie, Energiedichte), die Bestrahlungsstärke I (pro Flächeneinheit in der Laserimpulsdauer auftreffende Laserenergie, Leistungsdichte) sowie die Laserimpulsdauer sind neben der Laserwellenlänge die wichtigsten Laserparameter. Die Einheit der Bestrahlungsstärke (*irradiance*) ist $[\text{W}/\text{m}^2]$ und die der Bestrahlung (*fluence*) $[\text{J}/\text{m}^2]$.⁴¹

Bei MALDI-Messungen stellt der Experimentator in Abhängigkeit von der Matrix unterschiedliche zur Erzeugung von MALDI-Ionen notwendige Schwellbestrahlungen fest. Mit Schwellbestrahlung wird die Bestrahlung bezeichnet, bei der eine hinreichende Zahl von Ionen ein signifikantes Ionensignals im MALDI-Massenspektrum erzeugen. Sie ist abhängig von den Eigenschaften der Matrix (z.B. Absorption), aber auch von Geräteparametern (Nachweiseffizienz der Ionen am Detektor, Ionentransmission zum Detektor, Laserfokussierung etc.). Eine schonende Desorption thermisch labiler Biomoleküle ist häufig nur in einem engen Bereich der Laserbestrahlung oberhalb der Schwellbestrahlung möglich. Weiterhin ist für verschiedene Matrizes und Präparationstechniken eine unterschiedliche absolute Schwellbestrahlung festzustellen. Hierbei zeigt z.B. die Matrix DHB eine wesentlich höhere Schwellbestrahlung als die Matrix HCCA. Da diese Werte auch abhängig von der Präparation variieren, ist es notwendig, während der Messungen die Bestrahlung mittels der Variation der relativen Laserenergie (z.B. über die variable Abschwächung) anzupassen. Es besteht außerdem eine starke Abhängigkeit der Qualität der Spektren von der Bestrahlung in Bezug auf Auflösung und Ionenintensität.

Der Nachweis von mittels eines weiteren Lasers nachionisierten, neutraldesorbierten DHB-Molekülen ist bereits bei niedrigeren Bestrahlungen als für die direkt desorbierten Ionen (siehe Abbildung 2-12) möglich [Spe88], [Dre95], [Ria94]. Weiterhin wird für Matrixionen eine niedrigere Schwellbestrahlung als für Analytionen bestimmt [Dem92].⁴² Oberhalb der Schwellbestrahlung wird bei steigender Bestrahlung ein steiler Anstieg der Ionenintensität festgestellt, wobei sich oberhalb der zwei- bis dreifachen Schwellbestrahlung ein "Abknicken" der Kurven ergibt. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, daß es sich dabei eher um Sekundäreffekte, wie die erhöhte Zahl von Stößen in der dichten Teilchenwolke, als um eine tatsächliche Sättigung der Ionisation handelt.

⁴¹ Bei Laserdesorptionsexperimenten werden die Bestrahlung häufig in $[\text{J}/\text{cm}^2]$ und die Bestrahlungsstärke in $[\text{W}/\text{cm}^2]$ angegeben.

⁴² Hierbei liegt die Schwellbestrahlung der Matrix zum Beispiel bei $84 \text{ J}/\text{m}^2$, die des Analyten bei $133 \text{ J}/\text{m}^2$ (fs-Laser, $I = 248 \text{ nm}$, Ferulasäure) [Dem92].

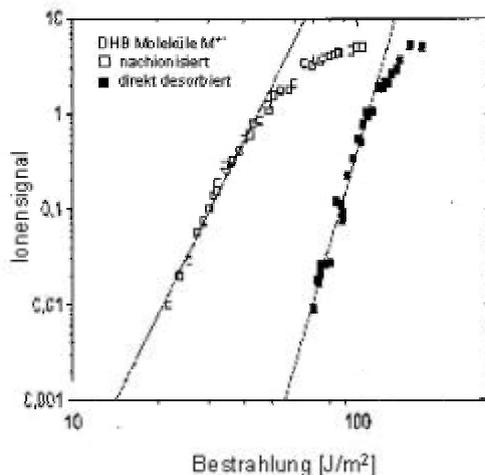


Abbildung 2-12 Ionensignal von photoionisierten neutralen DHB Molekülen M^+ und direkt desorbierten M^+ Ionen als Funktion der Laser Bestrahlung $[J/m^2]$ nach [Dre95]

Untersuchungen zur Laserimpulsdauer zeigten, daß die notwendige Schwellbestrahlung nicht von der Veränderung der Impulsdauer abhängig ist, jedoch bei verkürzter Impulsdauer die Schwellbestrahlungsstärke zunimmt [Kar87], [Dem92], [Dre96].⁴³ Der Desorptionsprozeß ist somit eher von der Energie des Laserimpulses als von der Rate der Einkopplung der Laserenergie abhängig.⁴⁴

In dünnen Schichten der Absorption ist Lichtbrechung vernachlässigbar, und der Energieeintrag wird vom Lambert-Beer'schen Gesetz beschrieben [Hil98].

$$H(z) = H_0 \cdot e^{-a(I)z}$$

Hierbei ist H die Bestrahlung, $a(I)$ der wellenlängenabhängige Absorptionskoeffizient und z die Tiefe innerhalb der Probe. Aus dieser Gleichung läßt sich die Energie pro Volumen $(E_a/V)_z$, die in die Probe eingetragen wird, berechnen:

$$\left(\frac{E_a}{V} \right)_0 = H_0 \cdot a(I) \quad \text{mit} \quad a(I) = c_n \cdot a_n(I)$$

Hierbei ist $a_n(I)$ der molare Absorptionskoeffizient, c_n die molare Konzentration und H_0 die Bestrahlung an der Oberfläche der Probe ($z = 0$).

Für verschiedene UV-Wellenlängen liegt E_a/V an der Ionen-Schwellbestrahlung etwa bei $10^9 J/m^3$.

Die Energie, die pro Matrixmolekül (mit der Avogadroschen Konstante N_A) eingebracht wird, kann daher wie folgt angesetzt werden:

⁴³ Aufgrund der unterschiedlichen Laserwellenlängen ($\lambda = 337 \text{ nm}$, 3 ns Impulsdauer und $\lambda = 496 \text{ nm}$, 560 fs Impulsdauer) sind die Messungen von Demirev [Dem92] nur wenig aussagekräftig.

⁴⁴ Prinzipiell ist für die meisten Laser (Stickstofflaser, Nd-YAG-Laser etc.) die Laserimpulsdauer ein fester instrumenteller Parameter, so daß *fluence* in *irradiance* umgerechnet werden kann.

$$\left(\frac{E_a}{N_a} \right)_0 = H_0 \cdot \frac{a_n(I)}{N_a}$$

Somit ist (bei Einsetzen typischer Parameter) an der Ionen-Schwellbestrahlung eine Energie von ca. 0,3 eV für ein Matrixmolekül in der Oberfläche anzunehmen [Hil98]. Bei gleicher Bestrahlung [J/m^2] ist innerhalb dieses einfachen Modells trotz eventuell verschiedener Fokusbereiche die Energie pro Matrixmolekül identisch.

Bei gleicher Bestrahlung und kleiner bestrahlter Fläche wird die Signalintensität der Ionen verringert, jedoch ergibt sich kein linearer Zusammenhang zwischen Laserfleckgröße und Ionenintensitäten. So kann experimentell bei Übergang des Durchmessers des Laserfokusses von $\bar{A}_1 = 25 \mu\text{m}$ auf $\bar{A}_2 = 200 \mu\text{m}$ eine etwa viermal höhere Schwellbestrahlung (siehe Abbildung 2-13, A und B) beobachtet werden. Trotz der höheren Bestrahlung ist die Intensität des Ionensignals bei der kleineren Fokusbereiche stark vermindert [Dre95].⁴⁵

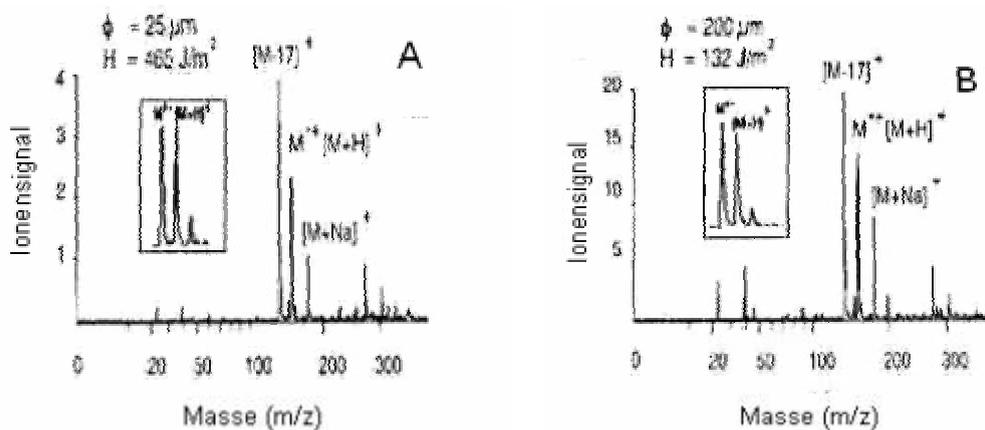


Abbildung 2-13 Ionensignal als Funktion der Laserbestrahlung [J/m^2] in Abhängigkeit vom Laserfleckdurchmesser \bar{A} [mm] nach [Dre95]. In den Spektren ist, abgesehen von der Gesamtionenintensität, keine Abhängigkeit der Spektrenqualität von der Bestrahlung H erkennbar

Hierbei sind drei mögliche Gründe für die Abweichung der lineare Beziehung zwischen Laserfleckgröße und Ionenintensitäten bei konstanter Bestrahlung in Betracht zu ziehen:

1. Die bestrahlte Fläche ist, unter Annahme eines kreisförmigen Strahlprofils $F = \frac{P}{4} \cdot \bar{A}^2$, bei $\bar{A}_1 = 200 \mu\text{m}$ 64 mal so groß wie bei $\bar{A}_2 = 25 \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 2-13, A und B). Eventuell ist die Zahl der Ionen, die pro Fläche erzeugt werden, im Fall der kleineren Fläche zu gering, um eine Detektion zu erlauben.

⁴⁵ Diese Ergebnisse von Dreisewerd [Dre95] stehen im Gegensatz zu [Ria94]. Hier wird bei vergrößerter bestrahlter Fläche und konstanter Bestrahlung [J/m^2] keine verstärkte Molekülionenemission festgestellt, was evtl. auf ein nichthomogenes Strahlprofil zurückzuführen ist.

2. Wird eine Eindringtiefe beim Abklingen der Bestrahlung auf $1/e$ bei UV-MALDI von etwa $d_e = 100 \text{ nm}$ [Hil98] angenommen, so ist die Oberfläche des angeregten Volumens im wesentlichen durch die bestrahlte Fläche F und die Grundfläche zum Probeneller hin (und damit auch gleich der bestrahlten Fläche F) bestimmt. Da für die Randfläche $F_R = p \cdot \varnothing \cdot d_e$ mit $2 \cdot F \gg F_R$ gilt, muß neben der Wärmeableitung eine andere Transportgröße existieren, die einen Energieverlust erklärt.
3. Bei der Einstrahlung mit fokussiertem Laserlicht kommt es zu einer nichtlinearen Absorption und einer Sättigung infolge der Entleerung des absorbierenden Niveaus. Das Lambert-Beer'sche Gesetz der linearen Absorption kann dann nicht mehr angewandt werden.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Bestrahlung und der Ionenintensität sowie evtl. dem Anregungsvolumen, allerdings ist die Bestrahlung (als experimenteller Parameter) nicht direkt mit der Analytanregung oder dem Fragmentierungsgrad der Ionen verknüpft. Aufgrund der schwer definierbaren experimentellen Parameter ist weiterhin der Vergleich der Messung der Laserbestrahlung verschiedener Arbeitsgruppen nicht möglich. Die variierenden Ergebnisse der Laserbestrahlung für "gleiche" Systeme und die obenstehenden Punkte zeigen, daß zwar einige wichtige experimentelle Ergebnisse wie das Auftreten einer Schwellbestrahlung von Bedeutung sind, daß allerdings die absoluten Laserbestrahlungen die in der Literatur angegeben werden, d.h. die absoluten Energiewerte pro bestrahlter Fläche, eine hohe Unsicherheit besitzen.

2.6 Startgeschwindigkeit

Aus dem Desorptions- bzw. Ionisationsprozeß resultiert eine energetische, räumliche und zeitliche Verteilung der Ionen, die sich bei der flugzeitmassenspektrometrischen Untersuchung begrenzend auf die Auflösung und die Genauigkeit bei der Massenbestimmung auswirkt. Eine grundlegende Größe, die sich zur Beschreibung des Desorptionsprozesses bei MALDI eignet, ist die initiale Geschwindigkeit von Ionen. Hierbei kann experimentell eine axiale sowie eine radiale Startgeschwindigkeitskomponente⁴⁶ von Ionen oder Neutralteilchen bestimmt werden.⁴⁷ Die Startgeschwindigkeit von Teilchen wird durch den Desorptionsprozeß bestimmt und ist charakteristisch für ein Matrix- und Analytssystem.

In den folgenden Kapiteln werden Messungen der axialen initialen Geschwindigkeit bei UV-MALDI vorgestellt. Zu Einzelheiten bei initialen Geschwindigkeiten von Ionen bei IR-MALDI siehe Ergebnisse von Berkenkamp [Ber98b].

2.6.1 Axiale Startgeschwindigkeit

Bei interner Kalibrierung [Bea90] werden systematische Abweichungen der linearen Beziehung zwischen t und $(m/z)^{1/2}$ festgestellt [Juh96], [Col96]. Diese Abweichung kann auf eine initiale Geschwindigkeit (axiale Komponente) der MALDI-Ionen zurückgeführt werden. Diese wird *initial velocity*, *ejection velocity*, *intrinsic velocity* oder *desorption velocity* genannt [Wu94], [Ver90b], [Bea91], [Juh97].

Die Laseranregung resultiert in der Ablation einer dünnen Schicht an Material mit einer Ablationstiefe in der Größenordnung einiger Nanometer [Hil90]. Ausgehend von der Bestimmung der Matrix- und Analytioneengeschwindigkeiten wurde die Bildung eines Molekularstrahls von Matrixmolekülen, der die Analytionen "mitreißt", vorgestellt [Bea91]. Die Teilchenwolke expandiert asymmetrisch in einer stark nach vorne, d.h. normal zur Probenoberfläche, gerichteten Bewegung. Die initiale Geschwindigkeit von Ionen ist hierbei eine charakteristische Meßgröße, sie erlaubt Rückschlüsse auf den Desorptionsprozeß bei MALDI.

Vor dem Laserimpuls befinden sich die Teilchen in der festen Matrix-/Analytpräparation, in der desorbierten Teilchenwolke besitzen die Ionen eine Startgeschwindigkeit von $v_0 > 0$ m/s. Die experimentell bestimmte Startgeschwindigkeit ist somit immer ein Durchschnittswert. Weiterhin hängen die experimentellen Werte der axialen Geschwindigkeit von der Methode ihrer Bestimmung ab. Die nach dem Laserimpuls aus der Expansion in einen feldfreien Raum (siehe Kapitel 2.6.2.1) oder aus der Flugzeit unter Annahme einer gleichmäßig

⁴⁶ Die axiale Startgeschwindigkeitskomponente ist parallel zur Achse eines linearen Flugzeitmassenspektrometers, die radiale Komponente ist rechtwinklig zur Achse des Flugzeitmassenspektrometers angeordnet.

⁴⁷ Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff Startgeschwindigkeit oder die Abkürzung v_0 synonym für durchschnittliche axiale Startgeschwindigkeit benutzt. Bei Meßergebnissen zur radialen Geschwindigkeitskomponente wird "radial" explizit erwähnt.

beschleunigten Bewegung berechnete, von Null verschiedene Startgeschwindigkeit (siehe Kapitel 2.6.2.3) zeigt unterschiedliche experimentelle Werte.

Neben den Verbesserungen in der Auflösung und der Massengenauigkeit bei der Flugzeitmassenspektrometrie hat die Technik der verzögerten Extraktion zusätzlich die Bestimmung der initialen axialen Geschwindigkeit v_0 möglich gemacht. Die prinzipielle Technik hierzu wurde 1997 vorgestellt [Juh97]. Die mittels dieser Methode bestimmten Werte können eingesetzt werden, um die Kalibrierung von Flugzeitmassenspektren zu verbessern [Juh97], [Rus97], [Ves98] oder Ionen in der Falle eines Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometers effektiver einzufangen [Kno97].

2.6.2 Methoden zur Bestimmung von v_0

Im folgenden werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Startgeschwindigkeit von Ionen oder Neutralteilchen kurz dargestellt. Weiterhin wird über einige experimentelle Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen berichtet. Verschiedene experimentelle Ansätze sind vorgestellt worden, um die initiale Geschwindigkeit von Ionen zu bestimmen. Diese Methoden, die im wesentlichen die Bestimmung der axialen Komponente der Startgeschwindigkeit (in Richtung der Achse des Flugzeitmassenspektrometers) erlauben, sind in den folgenden Unterkapiteln 2.6.2.1 bis 2.6.2.4 zusammengestellt. In Kapitel 2.6.2.5 werden verschiedene Ergebnisse zur Intensitätsverteilung der Ionen in der Teilchenwolke bei MALDI vorgestellt.

Eine andere wichtige Größe neben der Verteilung der Startgeschwindigkeit (siehe Kapitel 5.2.1.5) ist die radiale Startgeschwindigkeit und ihre Verteilung (siehe hierzu auch Kapitel 7.3). Diese Verteilung wurde z.B. in den Veröffentlichungen [Ens91] und [Spe97] untersucht.⁴⁸ Die radiale Geschwindigkeit zeigt gegenüber der axialen Komponente geringere Werte, was die Hypothese einer Überschallstrahlexpansion unterstützt.

2.6.2.1 "Feldfrei-Methode"

Netze in der Beschleunigungsregion eines linearen Flugzeitmassenspektrometers erlauben die Messung der initialen axialen Ionengeschwindigkeit durch eine Strecke in einem nahezu feldfreien Zustand. Die Gesamtflugzeit eines Ions im Fall des Nullfeldes wird mit der im Fall der kontinuierlichen Extraktion verglichen und daraus die Startgeschwindigkeit bestimmt [Bea91], [Spe93], [Dwo97].

Die ersten Ergebnisse der Messungen der initialen Geschwindigkeit [Bea91] zeigten eine hohe Analyt ionengeschwindigkeit von ca. 750 m/s unabhängig von der Analyt ionenmasse und höhere Werte für Matrixionen.⁴⁹ Diese hohen Werte der Startgeschwindigkeit führten zur Idee einer Überschallstrahlexpansion bei MALDI [Bea91].

⁴⁸ Hierbei ist eine radiale Startgeschwindigkeit v_0 von max. 284 m/s (Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit für Insulin 320 m/s) und axiale Startgeschwindigkeit $v_0 = 1300$ m/s (bei 1300 m/s Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit) bestimmt worden [Ens91].

⁴⁹ Alle Analyte aus der Matrix SINA: Angiotensin II $v_0 = 750$ m/s, Schweine-Insulin $v_0 = 750$ m/s, Superoxid-Dismutase $v_0 = 770$ m/s (alle Verteilung von ca. 500-1000 m/s). Die Matrix zeigt ein $v_0 = 1140$ m/s (Verteilung von v_0 von 500 bis 2000 m/s) [Bea91].

Im Gegensatz zu diesen ersten Ergebnissen konnte mittels dieser Methode für Proteine ein v_0 von etwa 550 m/s (aus SINA), oder 800 m/s (aus DHBs) gemessen werden [Dwo97]. Weiterhin wurde mittels dieser Methode aus der flüssigen Matrix 3-Nitrobenzylalkohol die Startgeschwindigkeit von positiven und negativen Ionen von Cytochrom C bestimmt [Cha94].⁵⁰ Eine etwas veränderte Technik ist die der Messung in einer orthogonalen Konfiguration [Dwo97], [Spe90]⁵¹, [Dwo98]. Hier konnten z.B. Verteilungen der initialen Geschwindigkeit von Ionen aus verschiedenen Matrices⁵² bestimmt werden.⁵³ Diese Technik ist, wie alle Methoden, die feldfreie Strecken einsetzen, stark durch Felddinhomogenitäten beeinflusst. Ionen mit kleinem m/z -Verhältnis werden besonders stark beeinflusst und Unterschiede in der Startgeschwindigkeit von Ionen mit kleinem und großem Verhältnis von Masse zu Ladung sind daher die Folge. Aufgrund von Felddurchgriffen zeigen Ionen kleiner Masse häufig eine höhere Startgeschwindigkeit als Ionen großer Masse. Neuere Ergebnisse, die eine verbesserte Abschirmung des Nullfeldes gegenüber Felddurchgriffen einsetzen, zeigen deutlich verringerte Werte. Hierbei wird, im Gegensatz zu früheren Ergebnissen von z.B. [Bea91], die gleiche Geschwindigkeit für Matrix- und Analytionen von etwa 500 m/s bestimmt [Ver92], [Kin99]⁵⁴.

Die initiale Geschwindigkeit, die in einer orthogonalen Geometrie bestimmt wird, ist typischerweise höher, da bedingt durch die Ionenquellengeometrie nur Ionen, die orthogonal zur Achse des Flugzeitmassenspektrometers desorbiert werden, in die Bestimmung eingehen [Spe93]. Auch in einem modifizierten Massenspektrometer, bei dem die Achse des Flugzeitmassenspektrometers gegenüber der Normalen der Probenoberfläche variiert werden kann, werden schnelle Ionen in der radialen und axialen Startgeschwindigkeit (aufgrund des großen Abstandes zwischen dem Ort der Ionenerzeugung und der Beschleunigungsstrecke) überrepräsentiert. So wird für das DHB-Matrixion m/z 137 ein $v_0 = 1700$ m/s bestimmt [Spe93].

2.6.2.2 "Photoionisations-Methode"

Diese Methode unterscheidet sich stark von den anderen, da sie sich auf die Bestimmung der Geschwindigkeit von desorbierten Neutralteilchen beschränkt. Die Intensität des Signals der nachionisierten Teilchen kann als Funktion der Verzögerungszeit zwischen Laserimpuls

⁵⁰ Cytochrom C zeigt hierbei im positiven Ionenmodus ein $v_0 = 840 \pm 70$ m/s und im negativen Ionenmodus ein $v_0 = 750 \pm 40$ m/s. Die Bestimmung dieser Werte erfolgte hierbei über die Variation der Felder und die Anpassung von experimenteller und simulierter Flugzeit [Cha94].

⁵¹ Tryptophan zeigte hierbei ein $v_0 = 970$ m/s [Spe90]. Hierbei sind die Bedingungen eher mit MALDI als LDI vergleichbar.

⁵² Matrices: DHBs, DHBs Sucrose, HCCA zeigen ein $v_0 = 600$ -1400 m/s (Mittelwert bei ca 900-1000 m/s). Cytochrom C zeigt ein mittleres $v_0 = 1500$ m/s, Insulin, Substanz P und DHBs ein mittleres $v_0 = 1000$ m/s [Dwo97].

⁵³ Ebenso wird in dieser Publikationen festgestellt [Dwo97], daß diese Werte um Faktor Zwei größer sind als bei [Juh97].

⁵⁴ Für Matrix und Analyt $v_0 = 550$ m/s, Matrix 7-Hydroxy-4-methylcoumarin, Analyt Bradykinin (protoniert) [Kin99].

und Photoionisationsimpuls aufgetragen werden, und man erhält daraus die Verteilung der Startgeschwindigkeit⁵⁵ [Spe88]⁵⁶, [Hut91], [Dre94].

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die Neutralteilchen während ihrer Expansion nicht durch Felddurchgriffe und Feldinhomogenitäten beeinflusst werden. Für DHB-Matrixmoleküle konnte z.B. eine mittlere Startgeschwindigkeit von 540 m/s und etwa 350 m/s für Ferulasäure⁵⁷ bestimmt werden [Hut91], [Dre94]. Messungen der Geschwindigkeiten von Analytmolekülen beschränken sich auf kleine, sehr stabile Moleküle (z.B. Gramicidin S).

2.6.2.3 "DE-Methode"

In einem Flugzeitmassenspektrometer, das mit der Technik der verzögerten Extraktion (siehe Kapitel 3.2.7) ausgestattet ist, kann die Startgeschwindigkeit⁵⁸ aus der nahezu linearen Abhängigkeit der Flugzeit t_{ges} von der Verzögerungszeit t mittels einer mathematischen Näherung [Juh97] oder durch eine numerische Anpassung [Glü99b] bestimmt werden. Mittels der "DE-Methode" wurde z.B. die Startgeschwindigkeit von Ionen aus der Matrix Bumetanid⁵⁹ zu $v_0 = 350$ m/s ermittelt [Lav99]. Mit einem ähnlichen Ansatz konnte für Cytochrom C aus großen DHB-Kristallen eine Startgeschwindigkeit von $v_0 = 660$ m/s [Sch96] bestimmt werden.

Allerdings erlaubt diese Methode nur die Messung der axialen Geschwindigkeit derjenigen Ionen, die zum Ionensignal beitragen. Weder Neutralteilchen noch Ionen, deren Signal im Rauschen der Spektren verschwindet, werden berücksichtigt. Auch die Verteilung der initialen Geschwindigkeit läßt sich mit dieser Methode nicht bestimmen. Insgesamt findet man jedoch eine gute Übereinstimmung der Werte dieser Methode mit den Messungen der Photoionisationsmethode.

2.6.2.4 Weitere Methoden

Im folgenden werden alternative Methoden vorgestellt, die zur experimentellen Ermittlung von Startgeschwindigkeiten dienen.

Zum einen läßt sich v_0 aus der Breite eines Ionensignals als Funktion der feldfreien Driftstrecke ermitteln [Ens91]. Problematisch hierbei ist, daß eine Korrelation zwischen Signalbreite und initialer Ionengeschwindigkeit nur eine Abschätzung der initialen Energie erlaubt, die tatsächliche Peakform jedoch im wesentlichen durch Stöße zur Zeit der Beschleunigung, die zu einem Energiedefizit der Teilchen führt, bestimmt wird [Zho92],

⁵⁵ Eine erste Messung von Startgeschwindigkeiten mittels dieser Methode erfolgte für LDI. Hier wurde die Energieverteilungen von Neutralteilchen bestimmt (Tryptophan, Postionisation mit KrF Eximerlaser 248 nm) [Dre90].

⁵⁶ Bestimmung der Startgeschwindigkeit von Tryptophan bei LDI zeigte ein $v_0 = 195$ m/s [Spe88].

⁵⁷ Die Startgeschwindigkeit von verschiedenen Neutralteilchen ist mit dieser Methode bestimmt worden: Ferulasäure zeigte ein $v_0 = 350$ m/s und Gramicidin S ein $v_0 = 350$ m/s (beide zeigten eine Verteilung der Startgeschwindigkeit von 200-500 m/s) [Hut91].

⁵⁸ Die Startgeschwindigkeit v_0 ist in diesem Fall nur eine unter Annahme homogener Felder innerhalb der Ionenquelle aus der Flugzeit errechnete Größe.

⁵⁹ Die Matrix Bumetanide kann ebenso wie HCCA als Matrix zu PSD-Untersuchung eingesetzt werden [Lav99].

[Wu94]. Zum anderen kann eine verzögerungszeitabhängige Reduktion des Ionensignals durch Laserphotodissoziation zur Bestimmung von v_0 herangezogen werden [Pre97], allerdings ließen sich bei dieser Methode aufgrund des experimentellen Aufbaus keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielen.⁶⁰

2.6.2.5 Intensitätsverteilung der Ionen in der Teilchenwolke und andere Verteilungen der Startgeschwindigkeit

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits die winkelabhängige Verteilung von Ionen bei MALDI bestimmt [Spe93], [Aks95], [Bök95], [Zha97], [Aya99], [Pur99]. Die verschiedenen experimentellen Methoden und Ergebnisse werden im folgenden kurz beschrieben.

Durch Verschieben der Ionenquelle gegenüber der Achse eines Flugzeitmassenspektrometers kann eine radiale Intensitätsverteilung von positiven Analytionen aus der Matrix HCCA ermittelt werden [Aks95]. Mittels dieser Methode läßt sich die mittlere radiale Geschwindigkeit v_r von Ionen verschiedener Masse⁶¹ feststellen.

Mit einem speziellen Massenspektrometer, bei dem sich die Achse des Flugzeitmassenspektrometers gegenüber der Normalen der Probenoberfläche variieren läßt, konnte die winkelabhängige Intensitätsverteilung verschiedener Ionen bestimmt werden [Bök95], [Spe93].⁶² Auch wenn die ermittelten Werte die schnellen Ionen gerätebedingt überrepräsentieren,⁶³ sind aussagekräftige Ergebnisse möglich: So zeigt DHB zwei Geschwindigkeiten, eine breite, langsame Geschwindigkeitskomponente mit einem Maximum bei $v_0 = 900$ m/s und eine nach vorne gerichtete, schnelle Geschwindigkeitskomponente mit dem Maximum von $v_0 = 1500$ m/s, die eine Verteilung mit Neigung in Richtung des einfallenden Laserlichtes zeigt.

Weiterhin sind die winkelabhängigen Intensitätsverteilungen von Poly-DL-Alanin und DHB ermittelt worden [Aya99]. Hierbei ließ sich eine winkelabhängige Intensitätsverteilung bestimmen, die mit $\cos^{(2,33)}$ in der Ebene des Laserstrahls und mit $\cos^{(2,03)}$ in der Ebene senkrecht zu der des einfallenden Laserstrahls beschrieben werden kann (zur Anpassung mit einer \cos^n -Funktion siehe Kapitel 7.3). Dabei wurde eine leichte Neigung der Emissionsachse zum Laserstrahl hin festgestellt [Aya99].⁶⁴ Die Autoren haben bei sehr hohen Laserbestrahlungen unter Atmosphärendruck Analyt- und Matrixmoleküle auf in

⁶⁰ Photodissoziation von Rinder-Insulin aus der Matrix Ferulasäure zeigte ein $v_0 = 0$ -2000 m/s [Pre97].

⁶¹ Positiver Ionenmodus: Gonadotropin-Releasing-Hormon (LHRH) $v_r = 470$ m/s, Insulin $v_r = 400$ m/s, Cytochrom C $v_r = 415$ m/s, Trypsin $v_r = 477$ m/s. Für LHRH konnte die gleiche Verteilung für negative Ionen bestimmt werden [Aks95].

⁶² Für DHB-Einkristalle wird für das Matrixion m/z 137 eine Winkelverteilung mit $\cos^{(2,39)}$ bestimmt, bei Präparation aus Lösung eine mit $\cos^{(3,64)}$. Auch wird eine starke Abhängigkeit von v_0 von der Laserenergie beschrieben, wobei bei höheren Laserbestrahlungen Werte bis zu 7400 m/s erreicht werden. Für das Ion mit m/z 273 wird eine eher isotrope Verteilung bestimmt [Spe93].

⁶³ Problematisch hierbei ist die Untersuchung des Bereichs der Geschwindigkeiten der Ionen (mit Werten der Geschwindigkeit der Ionen von minimal 672 m/s bis maximal 2960 m/s) [Bök95].

⁶⁴ Für eine mikrokristalline Präparation kann auch theoretisch eine in Laserrichtung geneigte Verteilung der Desorptionsrichtung erwartet werden, da die bestrahlten Flächen zur Laserrichtung geneigt sind. Von den abgeschatteten Flächen kann hingegen keine Desorption erfolgen [Joh98].

verschiedenen Raumwinkeln um den Desorptionort angeordneten Platten abgeschieden und durch UV-photometrische Untersuchungen die quantitative Bestimmung der Analyte in Abhängigkeit vom Raumwinkel vorgenommen. Eine Unterscheidung zwischen Ionen und Neutralteilchen, wie sie im MALDI-Prozeß desorbiert werden, ist bei diesem Experiment nicht möglich.

Weiterhin ist die Expansion von 3-HPA-Matrix und farbstoffmarkierten Biomolekülen mittels laserinduzierter Fluoreszenz verfolgt worden [Pur99]. Das farbstoffmarkierte Protein zeigt hierbei eine schmale Verteilung, während die Matrixteilchenwolke mit wesentlich höherer radialer Geschwindigkeit expandiert. Matrix und Protein zeigen insgesamt eine vergleichbare axiale Startgeschwindigkeit.

Eine extrem schmale Intensitätsverteilung, die durch eine $\cos^{(28)}$ -Funktion für Peptidionen und $\cos^{(12)}$ -Funktion für Matrixionen beschrieben werden kann, wurde von [Zha97] bestimmt.⁶⁵ Diese Messungen und die innerhalb dieser Arbeit experimentell bestimmten Werte unterstützen das Modell einer Überschallstrahlexpansion bei MALDI [Bea91], [Ens91], [Bök95].⁶⁶

⁶⁵ Diese Messungen wurden mit einem positionssensitiven Detektor durchgeführt. Zusätzlich wurde die Ionenquelle durch eine Serie von Ringelektroden modifiziert, um Feldinhomogenitäten auszugleichen.

⁶⁶ Ein einfaches Bild der translationalen Kühlung in Überschallstrahlen wird z.B. von Campargue [Cam87], [Cam84] gegeben.

Kapitel 3

MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie

3 MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie

Üblicherweise wird bei der Massenspektrometrie zwischen Ionenerzeugung, Massenseparation und Nachweis der Ionen unterschieden. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Beschreibung der Kombination der Flugzeitmassenspektrometrie⁶⁷ mit der MALDI-Ionenquelle.⁶⁸ Der Vorteil der Flugzeitmassenspektrometrie in der Analytik liegt in der hohen Sensitivität, dem großen zugänglichen Massenbereich und den relativ geringen Kosten. Nachteil der Flugzeitmassenspektrometrie ist die limitierte Massenauflösung aufgrund der örtlichen, zeitlichen und energetischen Verteilung der Ionen nach der Ionenerzeugung innerhalb der Ionenquelle (siehe Kapitel 3.2.6).⁶⁹

3.1 MALDI-Ionenquelle

Auf einen Probenhalter (in der Regel mit Metalloberfläche, zum Beispiel aus Stahl oder Gold) wird die Mischung aus Matrix und Analyt präpariert. Für die Analyse verschiedener Substanzen sind hierbei unterschiedliche Präparationstechniken sinnvoll, wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Ein Laserimpuls von der Dauer weniger Nanosekunden wird dazu genutzt, die Probe zu bestrahlen. Aufgrund der unterschiedlichen Laserwellenlängen, die hierbei zum Einsatz kommen, wird zwischen IR-MALDI und UV-MALDI unterschieden. Die hierbei entstehenden Ionen werden aus der MALDI-Ionenquelle in den Massenanalysator überführt und dort nachgewiesen. Im folgenden Kapitel 3.2 wird die Flugzeitmassenspektrometrie in der Kopplung mit der MALDI-Ionenquelle beschrieben.

3.2 Flugzeitmassenspektrometrie

Bei der Flugzeitmassenspektrometrie⁷⁰ werden die innerhalb der Ionenquelle erzeugten Ionen im Massenanalysator nach ihrem Verhältnis m/z von Masse m [kg] zu Ladungszahl z ⁷¹ getrennt und nachgewiesen. Bei der MALDI-Ionenquelle (mit gepulster Ionenerzeugung) bietet sich die Kopplung mit einem Flugzeitmassenspektrometer an, da dieser Massenanalysator den diskontinuierlichen Einlaß von Ionen erfordert. In der Flugzeitmassenspektrometrie gelangen die Ionen nach ihrer Beschleunigung in die feldfreie Driftstrecke und werden nach einer Flugzeit t_{ges} [s] am Detektor nachgewiesen (siehe Unterkapitel 3.2.1). Hierbei werden die Ionen gleichen Verhältnisses aus Masse zu Ladung

⁶⁷ Die Flugzeitmassenspektrometrie wird z.B. von Cotter ausführlich beschrieben [Cot94].

⁶⁸ Zur Kopplung verschiedener Techniken der Flugzeitmassenspektrometrie mit MALDI siehe z.B. [Gui97].

⁶⁹ Neben Flugzeitmassenspektrometrie werden z.B. auch doppelfokussierende Sektorfeldgeräte [Hil91b], Quadrupol-Ionenfallen [Cha93] und Ionen-Zyklotronresonanz-Analysatoren [Cas92], [Cas93] zur Massenanalyse von MALDI-Ionen eingesetzt.

⁷⁰ Das Konzept, Ionen unterschiedlichen Verhältnisses von Masse zu Ladung über Flugzeiten zu trennen, geht auf eine Publikation von Cameron und Eggers zurück [Cam48]. Die Entwicklung von Flugzeitmassenspektrometern wurde in den folgenden Jahren vorangetrieben [Wil55], [Mam72].

⁷¹ Hier: Vielfaches der Elementarladung.

auch mit idealerweise identischen Flugzeiten nachgewiesen, wobei die Messung der Flugzeit mit dem Zeitpunkt des Laserimpulses beginnt.⁷²

Die analytische Beschreibung der Flugzeit im Fall eines linearen Flugzeitmassenspektrometers mit zweistufiger Ionenquelle geht vom vereinfachten Fall homogener Felder aus. Ein Weg, dies zu erreichen, ist der Einsatz von Netzen, die dazu dienen, Räume unterschiedlicher Feldstärken voneinander zu trennen. Von Vorteil ist hierbei die Verringerung von Felddurchgriffen, allerdings wird auch die Ionentransmission verringert und an den Maschen treten Streueffekte auf.

Charakteristische Eigenschaften der Massenanalytoren (bei MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie) werden in den folgenden Unterkapiteln 3.2.2 bis 3.2.5 zusammengefasst.⁷³

Prinzipiell sind bei der Flugzeitmassenspektrometrie der Reflektor- und der Linearmodus zu unterscheiden. Weiterhin sei auf den Fall der orthogonalen Extraktion [Ver94] bei der Flugzeitmassenspektrometrie verwiesen.⁷⁴ Die schematischen Darstellungen der Flugzeitmassenspektrometrie im Linearmodus und Reflektormodus sind in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 gegeben.

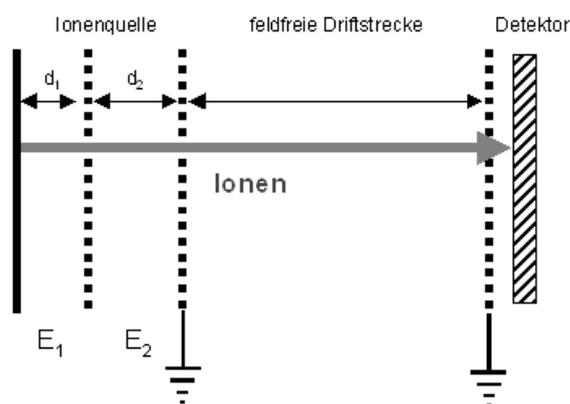


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der Flugzeitmassenspektrometrie im Linearmodus. Nach Beschleunigung in der Ionenquelle gelangen die Ionen nach einer Flugzeit t_{ges} durch die feldfreie Driftstrecke L zum Detektor

⁷² Es existieren zwei Ansätze zur Messung von Flugzeiten. Für Ionenquellen, bei denen eine geringe Zahl von Ionen produziert wird, können einzelne Ionen gezählt werden. Für höhere Ionenzahlen am Detektor wird die Flugzeit über digitale Oszilloskope und Transientenrekorder mit mehr als einer Million Datenpunkten und einer Repetitionsrate größer 1 GHz bestimmt [Sho97].

⁷³ Siehe hierzu z.B. Karas [Kar97].

⁷⁴ Übersichtsartikel hierzu, siehe Guilhaus [Gui00].

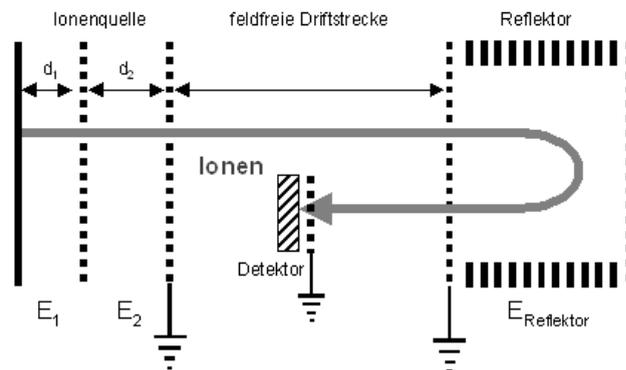


Abbildung 3-2 Schematische Darstellung der Flugzeitmassenspektrometrie im Reflektormodus. Im einstufigen Reflektor werden die Ionen reflektiert und gelangen erst danach zum Detektor

Eine Möglichkeit, die Auflösung bei Flugzeitmassenspektrometrie zu verbessern, bietet der Reflektor [Ali56].⁷⁵ Im Reflektor werden die Ionen in einem elektrostatischen Feld abgebremst und in der Gegenrichtung wieder zurückbeschleunigt, so daß die Driftgeschwindigkeit der Ionen in der feldfreien Driftstrecke mit der Ein- und Austrittsgeschwindigkeit der Ionen im Reflektor im Betrag gleich ist.

Der Einsatz des Reflektors in der Flugzeitmassenspektrometrie ist auf Mamyrin [Mam72], [Mam73], [Mam79] zurückzuführen. Hier wird der Reflektor als System beschrieben, das neben der Verlängerung des Flugweges auch eine Energiefokussierung erreicht. Das von Mamyrin vorgestellte "reflectron" enthielt einen zweistufigen Reflektor⁷⁶, dessen Regionen durch Gitter voneinander getrennt waren.⁷⁷ Diese Bauart verkürzt gegenüber dem einstufigen Reflektor, der später von Tang [Tan88b] beschrieben wurde, die Baulänge [Boe92].

In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Ionen gleicher Masse ist der Umkehrpunkt unterschiedlich. Bei höherer kinetischer Energie dringen die Ionen tiefer ein und verbleiben somit eine längere Zeit im Reflektor. Bei geeigneter Wahl der Abmessungen des Reflektors, der anliegenden Spannungen und der feldfreien Driftstrecke kann ein zeitgleiches Eintreffen von Ionen mit verschiedener Geschwindigkeit am Reflektordetektor dadurch erreicht werden, daß die Differenz der Flugzeit im Reflektor genau durch Unterschiede in der Flugzeit in der Driftstrecke ausgeglichen wird. Obwohl die Ionen vor und nach dem Detektor exakt die gleiche kinetische Energie besitzen, spricht man von Energiekompensation, da Ionen unterschiedlicher Driftgeschwindigkeit aber gleicher Masse zur gleichen Flugzeit den Detektor erreichen. Dieser Effekt, gleiche Ionen zur vorgegebenen Zeit an einem Ort zu fokussieren, wird Zeitfokussierung genannt. Die Energieverteilung kann zwar durch den Reflektor kompensiert werden, es erfolgt allerdings keine Korrektur für die zeitliche

⁷⁵ Übersichtsartikel hierzu siehe z.B. Guilhaus [Gui95].

⁷⁶ In [Mam79] (siehe dort Abbildung 3) wird auch ein *reflectron* vorgestellt, in dem eine einstufige Extraktion direkt in den Reflektor stattfindet. Die verbesserte Transmission bei geringerer Auflösung wird hierbei beschrieben. Dieser Aufbau entspricht prinzipiell dem eines einstufigen Reflektors.

⁷⁷ Zum gitterlosen Reflektor mit verbesserter Transmission, aber weniger genau definierten Feldern, siehe z.B. Grix [Gri88].

Verteilung der Ionen, d.h. der Reflektor bildet bestenfalls die Verteilung der Flugzeit der Ionen am Ortsfokus auf der Oberfläche des Reflektor-Detektors ab.

Mittels des Reflektors kann man daher auch für MALDI-Ionenquellen eine höhere Auflösung erreichen als mit konventioneller "linearer" Flugzeitanalyse [Ves95], [Rus97], [Kau96]⁷⁸, allerdings war vor Einführung der verzögerten Extraktion (siehe Kapitel 3.2.7) der Einsatz des Reflektors auf Ionen mit kleinem m/z -Verhältnis begrenzt.

3.2.1 Ionennachweis

Die Möglichkeit, Ionen mit hohen Massen zu generieren, stellt auch große Anforderungen an die verwendeten Detektoren. Üblicherweise erzeugen Ionen hoher Masse entweder direkt ein Elektronensignal oder sie erzeugen Ionen niedriger Masse an einer Konversionsdynode. Diese Elektronen oder Ionen niedriger Masse werden dazu genutzt, die Kaskade der Elektronenvervielfachung zu starten. Das hierbei entstehende Signal wird weiter verstärkt und mittels eines Transientenrekorders/digitalen Oszilloskops aufgezeichnet [Hil91]. Problematisch ist hierbei die geringe Nachweisempfindlichkeit für Ionen hohen Verhältnisses von Masse zu Ladung, da die Zahl der Sekundärelektronen aufgrund der niedrigen Fluggeschwindigkeit gering ist.

In MALDI-Flugzeitmassenspektrometern werden Ionen typischerweise durch einen Multiplier-Detektor nachgewiesen, wobei heute im wesentlichen Multikanalplatten oder deren Hybriddetektoren eingesetzt werden. In Voyager Massenspektrometern findet zum Beispiel die Kopplung von Multikanalplatten mit schnellem Szintillator und nachgeschaltetem Photomultiplier Anwendung (siehe auch Kapitel 4.1). Bei einem Ionen-zu-Photonen Detektor [Dub97] wird bei Raumtemperatur mit Hilfe von Szintillatoren ein Elektronensignal in einen Photonenstrom umgewandelt, der mit einem Photomultiplier detektiert werden kann. Vorteil ist, daß der Druck am Ort der Detektion hoch sein kann, da eine Trennung von Hochspannungs- und Detektionsteil besteht. Andere Detektoren wie kryogener Teilchendetektor oder Ladungsdetektor besitzen in der MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie nur eine geringe Bedeutung.⁷⁹

3.2.2 Kalibrierung und Masse/Ladung von Ionen

Die Flugzeit eines Ions, definiert als die Zeit zwischen Laserimpuls und dem Ionennachweis am Detektor, dient zur Bestimmung des Verhältnisses von Masse m [kg] zu Ladung z [C] eines Ions (m/z -Verhältnis).

In der Ionenquelle werden die Ionen im elektrischen Feld U beschleunigt. Nach Durchlauf der Beschleunigungsstrecke ist die kinetische Energie der Ionen in erster Näherung durch die

⁷⁸ Zu einer geeigneten Abstimmung von Quellenparametern unter Einsatz eines Reflektors siehe [Gle99] sowie zum zweistufigen Reflektor [Boe92]. Ein Überblick zur Kopplung mit Laserionenquellen wird in [Mam94] gegeben.

⁷⁹ Der kryogene Teilchendetektor [Twe96] mißt die kinetische Energie eines einzelnen Teilchens. Problematisch ist hierbei die Arbeitstemperatur, die bei ca. zwei K liegt und außerdem die geringe Detektionsfläche. Der Ladungsdetektor [Bah96], [Imr95] liefert einen direkten Ionennachweis (Faraday-Becher), aus dem über ein Differentierglied ein konventionelles Massenspektrum erhältlich ist.

Beschleunigungsspannung und die Ladung der Ionen gegeben. Nach der Ionenquelle besitzen die Ionen somit die kinetische Energie E_{kin}

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m v^2 = z \cdot U$$

und die Geschwindigkeit v [m/s]:

$$v = \sqrt{\frac{2 z U}{m}}$$

Im einfachen Fall eines linearen Flugzeitmassenspektrometers werden die Ionen eines m/z -Verhältnisses nach einer Flugstrecke L [m] am Detektor nachgewiesen. Es ergibt sich dann die Gesamtflugzeit t_{ges} [s]:

$$t_{ges} = \frac{L}{v} = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2 z U}} = \frac{L}{\sqrt{2 U}} \cdot \sqrt{m/z} = k \sqrt{m/z} \quad \text{mit } k = \frac{L}{\sqrt{2 U}}$$

Somit ist die Flugzeit eines Ions wie folgt mit dem m/z -Verhältnis eines Ions verknüpft:

$$t_{ges} = k \sqrt{(m/z)}$$

Die Konstante k kann aus der Flugzeit von Ionen bekannter Masse bestimmt werden. Hierbei ist zu beachten, daß die Flugzeit von Ionen tatsächlich nicht proportional zu $\sqrt{(m/z)}$ ist. Da die kinetische Energie der Ionen aufgrund der konstanten Startgeschwindigkeit nicht dem m/z -Verhältnis skaliert, und die Flugzeit der Ionen in der Ionenquelle (während der Verzögerungszeit und der Beschleunigung) ebenfalls zu berücksichtigen ist, besteht zwischen der Flugzeit von Ionen und ihrem m/z -Verhältnis ein komplexer funktioneller Zusammenhang, der in Kapitel 5.1.1.1 hergeleitet wird.

Die Bestimmung der Masse eines Iones wird durch eine Kalibrierung mittels Ionen bekannter Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z erreicht. Hierzu werden zur internen Eichung definierte Eichsubstanzen der Analytmischung zugesetzt. Zur externen Kalibrierung werden die Massen der Eichsubstanzen in einer anderen Probe bestimmt und die Meßwerte auf die unbekannte Probe übertragen. Die Richtigkeit der Bestimmung der Masse, die als Differenz aus experimentell ermittelter und tatsächlicher Masse eines Makromolekülions bestimmt wird, ist direkt von der Kalibrierung der Massenspektren abhängig.

Hierbei ist die sogenannte monoisotopische Masse [u] von der mittlere Masse [Da] von Molekülen zu unterscheiden. Die mittlere Molekülmasse wird normalerweise in der Chemie in stöchiometrischen Berechnungen eingesetzt. Beide lassen sich mit Hilfe von Simulationsprogrammen aus der bekannten Summenformel eines Moleküls berechnen.⁸⁰

In Abbildung 3-3 wird ein simuliertes Ionensignal des Peptids Angiotensin I mit der Aminosäuresequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu als [(Angiotensin I)+H]⁺-Ion dargestellt. Das Molekül Angiotensin [M] hat die Summenformel C₆₂ H₈₉ N₁₇ O₁₄, somit hat das einfachgeladene Ion [M+H]⁺ die Summenformel C₆₂ H₉₀ N₁₇ O₁₄.

⁸⁰ Beispielsweise kann hierzu das Programm IsoPro Version 2.1, Isotopic Abundance Simulator, Tallahassee, FL, USA genutzt werden.

Hierbei kann bei einer Auflösung von $m/Dm = 1000$ (FWHM) die folgende Signalform erhalten werden:

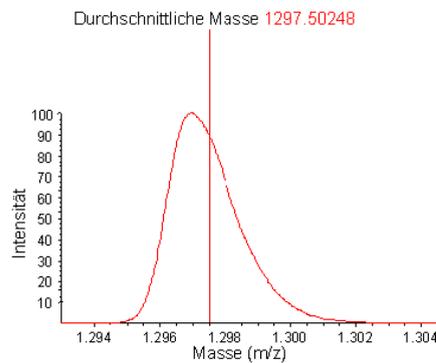


Abbildung 3-3 Simuliertes Ionensignal des Ions [(Angiotensin I)+H]⁺ bei einer Auflösung von $m/Dm = 1000$ (FWHM)

Das Ion [(Angiotensin I)+H]⁺ hat eine durchschnittliche Masse von 1297.50248 Da, wobei das Ionensignal in obenstehender Abbildung aus dem Signal von insgesamt 61 verschiedenen Ionen mit unterschiedlicher Häufigkeit zusammengesetzt ist. Bei einer Auflösung von $m/Dm = 5000$ (FWHM) werden dagegen auch die Ionensignale der Isotope des Angiotensin I aufgelöst (siehe Abbildung 3-4). Man erhält dann folgendes Spektrum, wobei das erste Isotopensignal nur aus dem Signal von Ionen entsteht, die ¹²C, ¹H, ¹⁴N und ¹⁶O enthalten.

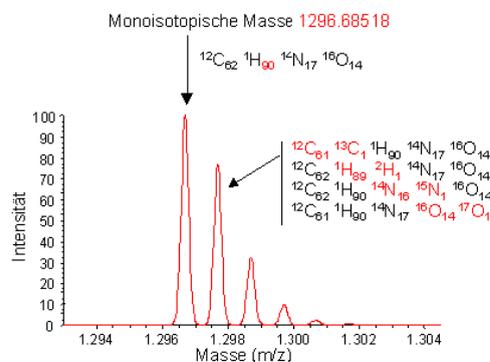


Abbildung 3-4 Simuliertes Ionensignal des Ions [(Angiotensin I)+H]⁺ bei einer Auflösung von $m/Dm = 5000$ (FWHM)

Das zweite Isotopensignal (siehe Abbildung 3-4) setzt sich aus dem Ionensignal von vier Ionen zusammen. Die Multiplizität und die Breite dieses und der anderen Isotopensignale kann aus Tabelle 3-1 entnommen werden.

Tabelle 3-1 Theoretisches Ionensignal von [(Angiotensin I)+H]⁺: Häufigkeit, Breite und Multiplizität von Isotopensignalen

| <i>m/z</i> | Häufigkeit | Breite | Multiplizität |
|------------|------------|---------|---------------|
| 1296.68518 | 0.4519966 | 0.00000 | 1 |
| 1297.68809 | 0.3480248 | 0.00913 | 4 |
| 1298.69085 | 0.1448401 | 0.01632 | 9 |
| 1299.69353 | 0.0426676 | 0.01632 | 12 |
| 1300.69620 | 0.0097303 | 0.01878 | 14 |
| 1301.69888 | 0.0017819 | 0.01791 | 12 |
| 1302.70068 | 0.0002070 | 0.01785 | 7 |
| 1303.70414 | 0.0000206 | 0.00626 | 2 |

Werden Ionensignale von Isotopen getrennt detektiert, erfolgt die Massenkalisierung mittels des monoisotopischen Ionensignals.

Da Ionensignale von Isotopen üblicherweise nur für Ionen mit kleinen *m/z*-Verhältnis beobachtet werden, erfolgt die Massenkalisierung bei breiten, unaufgelösten Ionensignalen über die Zentroide. Problematisch wird dies, wenn sich die Signalform durch nicht auflösbare Beiträge von z.B. Adduktionen (z.B. mit Alkalimetallkationen) oder Modifikationen (Phosphorylierung etc.) verändert. Bei der Kalibrierung über Zentroide ist ebenfalls die unsymmetrische Form der Ionensignale bei der Bestimmung des Zentroids zu beachten.

Üblicherweise wird die Masse einfachgeladener Ionen mit der Einheit Dalton [Da] angegeben, Angaben der Masse in der Einheit Thomson [Th] beziehen sich auf das Verhältnis *m/z* von Masse zu Ladungszahl.⁸¹

3.2.3 Empfindlichkeit

Traditionell wird mit der Empfindlichkeit eine Angabe über den Verbrauch von Analytsubstanz während einer Messung verbunden. Dieser Verbrauch an Analytsubstanz ist im Verhältnis zum Verbrauch bei der Präparation einer MALDI-Probe jedoch vernachlässigbar und schwer zu bestimmen. Häufig wird daher in der MALDI-Massenspektrometrie auch mit Empfindlichkeit die kleinste eingesetzte Menge einer Analytsubstanz bezeichnet, die ein Signal zu Rauschverhältnis von z.B. 10:1 im Massenspektrum liefert.

Untersuchungen und Berechnungen von Strupat zeigen, daß an der Schwellbestrahlung ca. 1-10 Attomol an Analytsubstanz pro UV-Laserimpuls abgetragen werden [Str91]. Ähnliche

⁸¹ Da die Ionen mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis $2m/2q$ zur gleichen Zeit den Detektor erreichen wie die Monomere mit m/q , findet man auf der Abszisse von Massenspektren üblicherweise die Einteilung in Thomson (*m/z*).

Werte konnten mit Hilfe spezieller Präparationstechniken, die ein Aufbringen weniger Attomole an Probensubstanz erlauben, erhalten werden [Vor94], [Jes94].⁸²

3.2.4 Massenbereich

Der Massenbereich ist der m/z -Bereich [Thomson], in dem Analytionen nachgewiesen werden können. Der Massenbereich in der Flugzeitmassenspektrometrie ist theoretisch unbegrenzt. Beispielsweise gelang der Nachweis von Immunglobulin M mit einer Masse über 900000 Da [Nel94], [Nel95] oder 1500000 Da für polydisperse Polymere [Sch96b] mit MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie. Weiterhin lieferte Berkenkamp 1998 mit Nachweis von DNA der Masse 800000 Da mittels IR-MALDI einen interessanten Beitrag zur Analyse von Biomolekülen extrem hoher Massen [Ber98].

3.2.5 Massenbestimmungsgenauigkeit

Die Massengenauigkeit hängt stark von instrumentellen Parametern und von der Präparationstechnik ab [Vor94], [Vor94b]. Die Abweichung Δm (in *parts per million*, [ppm]) ist wie folgt definiert:

$$\Delta t = \frac{m - m_m}{10^6 \cdot m_m}$$

Hierbei ist m_m die über mehrere Experimente gemittelte Masse und m die Masse des Ions in einem weiteren Experiment. Die Massengenauigkeit, die von der Auflösung im Massenspektrum abhängt, beschreibt, wie genau die Masse eines Analytions bestimmt werden kann. Sie liegt bei modernen kommerziellen Flugzeitmassenspektrometern im Bereich weniger ppm. Beispiele sind 100 ppm bis Masse 30000 Da [Bea90] oder < 50 ppm bei der Technik der verzögerten Extraktion in Routinemessungen für Peptide mit Masse < 4000 Da [Whi95], [Rus97].

3.2.6 Auflösungsvermögen

Das Auflösungsvermögen (massenabhängige Signalbreite) eines einzelnen Ionensignals bei MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie kann aus dem Quotienten der Masse des Ions m geteilt durch die Breite des Ionensignals Δm bei halber Signalintensität (FWHM, *full width at half maximum*) bestimmt werden⁸³:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

⁸² Der Inhalt einer einzigen Nervenzelle konnte ebenfalls mit MALDI untersucht werden [Hsi98].

⁸³ Hierbei ist das Auflösungsvermögen (massenabhängige Signalbreite) von der Trennung benachbarter Signale (Massenauflösung) zu unterscheiden. Beide Begriffe werden häufig mit "Auflösung" bezeichnet. Zur Bestimmung der Massenauflösung wird die Massendifferenz Δm zweier unterscheidbarer Ionensignale genutzt [Cha93b]. Zwei sich überlagernde Ionensignale in der Flugzeitmassenspektrometrie gelten üblicherweise dann als getrennt, wenn zwischen den Ionensignalen mit dem Abstand Δm die Intensität mindestens auf 50% des Gesamtionensignals absinkt.

In Abbildung 3-5 ist ein Spektrum von Insulin im Reflektormodus gezeigt. Die Breite des gekennzeichneten Isotopensignals bei halber Intensität beträgt etwa $\Delta m \approx 0,52$ Da. Daraus berechnet sich mit $m \approx 5733,6$ Da für dieses Ionensignal ein Auflösungsvermögen von $m/\Delta m \approx 11000$.

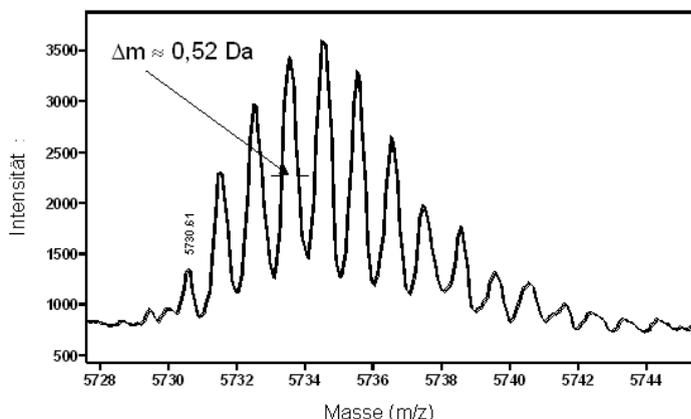


Abbildung 3-5 Spektrum von Insulin (Matrix DHBs, Laser 2300, Voyager RP DE PRO, $U_{ges} = 25$ kV, $t = 300$ ns) im Reflektormodus. Die Auflösung des gekennzeichneten Isotopensignals beträgt $R = m/\Delta m \gg 11000$

Aus dem Zusammenhang der Flugzeit t mit der Masse eines Ions m (hier in Thomson) $m = C \cdot t^2$ folgt die Ableitung $dm/dt = 2 \cdot C \cdot t$ (mit einer Konstanten C). Somit kann die Auflösung als Funktion der Flugzeit eines Ions auch wie folgt dargestellt werden:

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Begrenzend für die Auflösung bei MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie sind die räumliche⁸⁴ und zeitliche⁸⁵ Verteilung sowie die Geschwindigkeitsverteilung der Ionen bei der Ionenerzeugung in der Ionenquelle. Die erreichbare Massenauflösung hängt stark von den Geräteparametern ab. Weiterhin von Bedeutung bei der Massenauflösung sind die Bildung von Addukten mit Matrixmolekülen oder Alkalimetallkationen, ferner die Fragmentierung der Analytione⁸⁶, auch Stöße zwischen Ionen und anderen Teilchen sowie lokale Aufladungseffekte.

Jeder dieser Effekte führt zu einer schwer vorhersagbaren Verteilung der Flugzeit des Ions eines bestimmten m/z -Verhältnisses am Detektor. Die Faltung und Gewichtung dieser

⁸⁴ Eine Startortverteilung Ds ist von großer Bedeutung bei der Erzeugung von Ionen in der Gasphase. Die Verteilung des Startortes x_0 bei MALDI durch vorstehende Kristalle etc. führt nicht zu einer Reduzierung der Endenergie, da das gleiche Potential am Desorptionort angenommen werden muß.

⁸⁵ Die zeitliche Verteilung Dt resultiert z.B. aus der Variation der Laserimpulsdauer (Auflösungsverbesserung kann durch eine höhere Flugzeit z.B. bei erhöhter feldfreier Driftstrecke erreicht werden).

⁸⁶Zum metastabilen Zerfall von Peptiden und Proteinen und der Auswirkung auf die Auflösung siehe z.B. [Spe91].

Verteilungen findet sich in der Form des Ionensignals und in der Auflösung im Massenspektrum wieder. Zur Verbesserung der Auflösung in der Flugzeitmassenspektrometrie (im Gegensatz zur kontinuierlichen Extraktion der Ionen aus der Ionenquelle, siehe Kapitel 3.2.7) wurden verschiedene Techniken vorgestellt, die mittels dynamischer Felder den Einfluß der Geschwindigkeitsverteilung verringern.⁸⁷ Im Kapitel 3.2.7 wird die hierzu eingesetzte Technik der verzögerten Extraktion beschrieben.

3.2.7 Technik der kontinuierlichen und verzögerten Extraktion

Im Fall der kontinuierlichen Extraktion (*continuous extraction*, CE) liegt ein statisches, beschleunigendes Feld vor, das die Ionen sofort (d.h. prompt) nach der Desorption/Ionisation beschleunigt. Um den Effekt der hieraus entstehenden Verteilung der kinetischen Energie der Ionen zu verringern, wird die Driftgeschwindigkeit der Ionen und damit die Beschleunigungsspannung so hoch wie möglich gewählt [Gui95] und somit ihr Anteil an der Gesamtgeschwindigkeit der Ionen verringert.⁸⁸ Bei höherer kinetischer Endenergie der Ionen (z.B. höherer Beschleunigungsspannung) wird die Auflösung erhöht, da die initiale Energieverteilung konstant bleibt.

Die kontinuierlich desorbierten Ionen besitzen aufgrund von Stößen in der dichten Ionen- und Teilchenwolke (*plume*) innerhalb der Ionenquelle eine geringere kinetische Energie als aus der Gesamtspannung theoretisch zu erwarten wäre [Tan88b], [Zho92].⁸⁹ Kollisionen oder die Entstehung von Ionen an Orten höherer Potentiale führen zu Flugzeitunterschieden und damit der Verschlechterung der Auflösung bei prompter Extraktion.

Eine Möglichkeit, die Auswirkung der initialen Verteilung der kinetischen Energie der Ionen zu reduzieren, bietet die verzögerte Extraktion der Ionen, die im folgenden beschrieben wird.

MALDI Massenspektrometrie hat sich in den letzten Jahren als eine leistungsfähige Technik in der Analytik etabliert. Eine der wichtigsten Entwicklungen hierzu stellt die verzögerte Extraktion dar [Bro95], [Ves95].⁹⁰ Der größte Erfolg der verzögerten Extraktion (*delayed*

⁸⁷ Verschiedene Techniken zur Verbesserung der Auflösung in der Flugzeitmassenspektrometrie (dynamische Felder): *space velocity correlation focussing* [Col94], verzögerte Extraktion [Bro95], [Ves95], [Juh96], [Rus97] *post source pulse focussing* (PSPF), mit einer modifizierten Ionenquelle mit einem dritten Netz zum Anlegen einer Spannung [Kin89], [Ioa95], [Amf98] *dynamic field focussing* [Yef89].

⁸⁸ Wird eine Energieverteilung $DE = mvDv$ angenommen (m ist hierbei die Masse des Analytens, v seine Geschwindigkeit und Dv die Breite seiner Geschwindigkeitsverteilung), dann ist nach der Extraktion der Ionen aus der Ionenquelle die Verteilung unverändert: $DE_{initial} = DE_{end}$. Daher ist mit $DE_{end} = mv_{end}Dv_{end}$ und $DE_{initial} = mv_{initial}Dv_{initial}$ dann $v_{initial}Dv_{initial} = v_{end}Dv_{end}$. Somit kann die Auflösung R wie folgt umgeformt werden:

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} = \frac{v_{end}}{2\Delta v_{end}} = \frac{v_{end}}{2\Delta v_{end}} = \frac{v_{end}^2}{2v_{end}\Delta v_{end}} = \frac{E_{end}}{mv_{initial}\Delta v_{initial}} = \frac{E_{end}}{\Delta E_{initial}}$$

Bei höherer kinetischer Endenergie der Ionen (z.B. höherer Beschleunigungsspannung) wird somit die Auflösung erhöht, da die initiale Energieverteilung konstant bleibt.

⁸⁹ Für eine Beschleunigungsspannung von 15 kV bei einem Extraktionsabstand von 1 cm liegt das Energiedefizit für Insulin aus SINA z.B. bei 24 eV [Zho92].

⁹⁰ Die Anwendung der gepulsten Ionenextraktion aus der Quelle wurden bei orthogonaler Extraktion in der TOF-Massenspektrometrie von Spengler und Cotter bereits 1990 zur Messung der Energieverteilung verschiedener Ionen eingesetzt [Spe90].

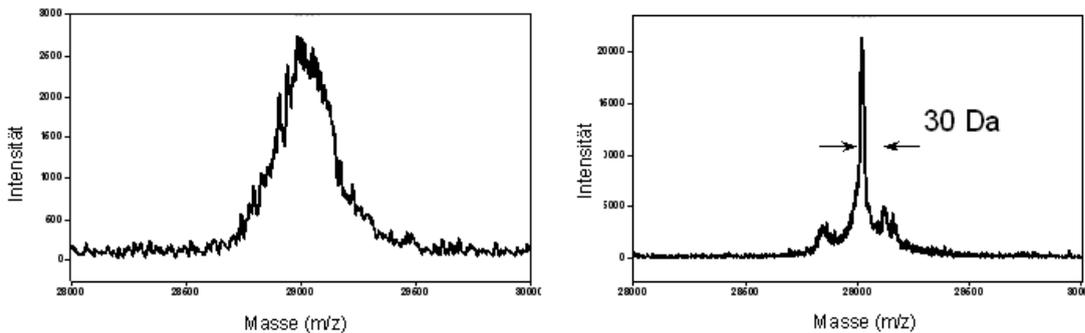
extraction, DE) liegt in der verbesserten Auflösung sowohl im Linearmodus [Col94], [Bro95], [Ves95] als auch im Reflektormodus [Ves95]. Im Linearmodus zeigt der Vergleich zwischen kontinuierlicher Extraktion und verzögerter Extraktion des Proteins Carboanhydrase eine deutliche Verbesserung der Auflösung in den Massenspektren bei weicher verzögerter Extraktion⁹¹ im Vergleich zu kontinuierlicher Extraktion [Bah97]. Im Reflektormodus ist allerdings der metastabile Zerfall von Peptid- und Proteinionen problematisch, so daß der Einsatz des Reflektors in Kombination mit der verzögerten Extraktion im Massenbereich limitiert ist.

Bei der verzögerten Extraktion⁹² erfolgt die Ausbreitung der Ionen nach der Ionenerzeugung innerhalb eines feldfreien Raumes. Hieraus ergibt sich eine mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit v_0 , die sogenannte initiale Geschwindigkeit oder Startgeschwindigkeit der Ionen. Beim Einsatz der verzögerten Extraktion werden aufgrund der geringeren Dichte der Ionenwolke bei der "verspäteten" Extraktion und der damit verbundenen verminderten Stoßaktivierung geringere metastabile Fragmentierungsraten von Analytionen festgestellt [Spe97]. Nach der Verzögerungszeit werden die Ionen im elektrischen Feld beschleunigt. Die Verzögerungszeit und die Extraktionsspannung werden hierbei so gewählt, daß Unterschiede der Startgeschwindigkeit von zwei Ionen, die am gleichen Ort innerhalb der Ionenquelle erzeugt wurden, sich derart ausgleichen, daß diese Teilchen eines m/z -Verhältnisses zur gleichen Flugzeit zum Detektor gelangen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Ionen mit höherer Startgeschwindigkeit (und damit höherer Anfangsenergie) weiter in die erste Strecke der Ionenquelle vorgedrungen sind und somit eine geringere kinetische Energie durch die Extraktionsspannung aufnehmen. Im Sinne der Bezeichnung von [Ves98] wird die Verbesserung der Auflösung durch verzögerte Extraktion Ortsfokussierung genannt. Hierbei liegt der Ort der Fokussierung der Ionen möglichst am Ort der Detektion der Ionen [Gle99].

⁹¹ Bei harter Extraktion wird zwischen Probenzelle und erstem Gitter der Anteil $(1-G)U_{ges}$ mit $G \approx 50 - 75\%$ angelegt, während bei der weichen Extraktion die Beschleunigungsspannung im wesentlichen in der zweiten Ionenstrecke erfolgt.

⁹² Das Prinzip der verzögerten Extraktion (*delayed extraction*, DE) geht zurück auf *time lag focussing* (TLF) von Wiley und McLaren [Wil55]. Die Einführung der verzögerten Extraktion bei MALDI gelang jedoch erst wesentlich später [Bro95], [Ves95].

Abbildung 3-6 Spektren von Carboanhydrase (Matrix DHBs, Laser 2050, Voyager RP DE, $U_{ges} = 25$ kV) im Linearmodus

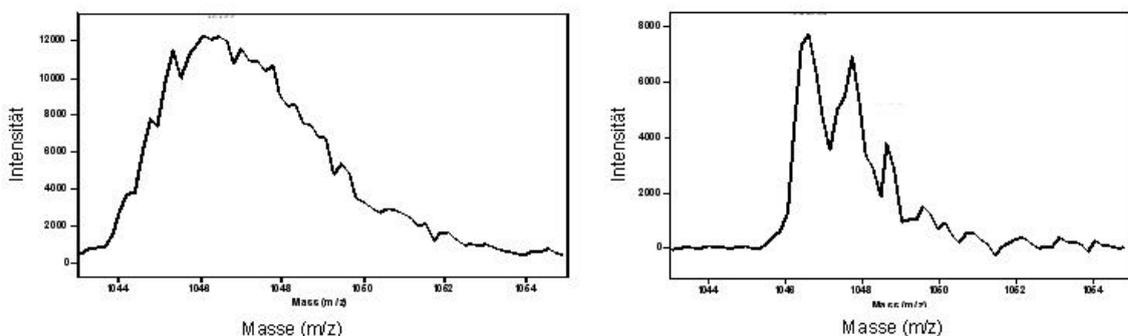


**Fall der kontinuierlichen Extraktion
($G = 94.5\%$)**

**Fall der verzögerten Extraktion
($G = 94.5\%$, $t = 1000$ ns)**

Mit verzögerter Extraktion wird ebenfalls für das Peptid Angiotensin II aus der Matrix DHB im Linearmodus (siehe Abbildung 3-7) eine wesentlich höhere Massenauflösung als bei kontinuierlicher Extraktion erreicht.

Abbildung 3-7 Spektren von Angiotensin II im Linearmodus (Matrix DHB, Laser 1880, Voyager RP DE, $U_{ges} = 20$ kV)



**Fall der kontinuierlichen Extraktion
($G = 94\%$)**

**Fall der verzögerten Extraktion
($G = 93.5\%$, $t = 200$ ns)**

Im wesentlichen wurde das Potential der verzögerten Extraktion für Peptide und Proteine mit Auflösungen jenseits von 10000 (FWHM) für Analyte mit einer Masse von 1000 bis 6000 Da [Whi95], [Edm96], [Ves95] gezeigt. Auflösungsverbesserungen mit der Technik der verzögerten Extraktion wurden auch für größere Peptide und Proteine vorgestellt [Whi95], [Bro95], [Bah97], [Rus97]. Für andere Klassen von Analytsubstanzen, wie Oligonukleotide [Juh96], Polymere [Whi97], [Jac97] oder Glycoproteine [Tsa97], ließen sich mittels der Technik der verzögerten Extraktion ebenfalls bessere Ergebnisse erzielen.

3.2.8 Fragmentierung bei MALDI Flugzeitmassenspektrometrie

Reduziert wird die Auflösung u.a. bei MALDI durch Fragmentierung der MALDI-Ionen, die je nach dem Ort des Zerfalles in solche innerhalb der Ionenquelle (ISD, *in source decay*) oder

solche außerhalb der Ionenquelle, d.h. innerhalb der feldfreien Driftstrecke (PSD, *post source decay*), eingeteilt werden.

Prinzipiell kann MALDI als schonende Desorptionsmethode bezeichnet werden. Jedoch zeigten Spengler und Kaufmann, daß Peptide und Proteine innerhalb der Flugstrecke stark fragmentieren [Spe91], [Spe92], was den Einsatz des Reflektors bei Flugzeitmassenspektrometrie limitiert. Typisch für diese metastabilen Zerfälle ist der Verlust von Wasser oder anderen kleinen Molekülen, der z.B. durch Stöße mit Matrixmolekülen induziert wird. Die geeignete Auswahl der Fragmentationen durch Absenken der Reflektorspannung macht die Detektion und damit die Fragmentationsanalyse möglich. Ein Überblick zur PSD-Technik (*post source decay*) findet sich zum Beispiel in [Spe97]. Im Linearmodus werden PSD-Fragmente jedoch nicht beobachtet, da sie aufgrund der gleichen Geschwindigkeit zur selben Flugzeit wie das Vorläufermolekül zum Detektor gelangen. Im Linearmodus wird dennoch eine Verschlechterung der Auflösung durch PSD-Fragmente beobachtet [Spe91].

Bei kontinuierlicher Ionenextraktion führen prompte, innerhalb der Laseranregungszeit erzeugte Fragmente⁹³ zu zusätzlichen Signalen im Massenspektrum. Bei verzögerter Extraktion werden zusätzlich Fragmentationen, die während der Verzögerungszeit entstehen, detektiert [Bro95b], [Bro97b]. Zerfälle innerhalb der Quelle während der Beschleunigung von Ionen führen zu verstärktem Rauschen und zur Verbreiterung der Analytensignale zu kleineren Flugzeiten hin. Durch Verringerung der Extraktionsfeldstärke kann der Einfluß der Stoßaktivierung, die in einer metastabilen Fragmentierung der Analytensignale resultiert, auf die Auflösung verringert werden (sog. weiche Extraktion) [Bah97]. Zerfallen Moleküle während der Beschleunigung, besteht keine Korrelation ihrer Masse zur Energie. Bei kontinuierlicher Extraktion tragen somit schnelle metastabile Fragmente lediglich zum Rauschen bei.

⁹³ Der Nachweis von prompten Fragmenten erfolgt bei ihrer exakten Masse.

Kapitel 4

Instrumentierung und Experimentelles
MALDI-Flugzeitmassenspektrometer des Typs Voyager
Probenpräparation
modifizierte Probenträger

4 Instrumentierung und Experimentelles

Im folgenden Kapitel 4.1 werden die Flugzeitmassenspektrometer Voyager DE und Voyager DE PRO vorgestellt. Zuerst werden die für die Messungen dieser Arbeit eingesetzten Massenspektrometer kurz beschrieben, bevor einige Meßergebnisse der Startgeschwindigkeit der Geräte verglichen werden. Es werden hierbei nur Messungen gezeigt, die zur Bestimmung der experimentellen Parameter dieser Massenspektrometer notwendig sind. Da das Voyager DE nicht für weitere Messungen zur Verfügung stand, wird ebenfalls ein Vergleich der Ergebnisse des Voyager DE mit den Ergebnissen des Voyager DE PRO gegeben. In Kapitel 5 und 7 sind dann weitere Meßergebnisse zur initialen Geschwindigkeit von Ionen bei MALDI vorgestellt.

Ferner werden in Kapitel 4.2 die Präparation von MALDI-Proben mittels verschiedener Techniken, die innerhalb dieser Arbeit eingesetzt wurden, sowie verschiedene modifizierte MALDI-Probenteller beschrieben.

4.1 Flugzeitmassenspektrometer: Voyager DE und Voyager DE PRO

Für alle massenspektrometrischen Analysen sind kommerzielle Massenspektrometer der Fa. Applied Biosystems⁹⁴, zum einen des Typs Voyager RP DE Biospectrometry⁹⁵ Workstation und zum anderen des Typs Voyager RP DE PRO genutzt worden. DE steht hierbei für verzögerte Extraktion (*delayed extraction*⁹⁶). In folgender Abbildung 4-1 ist ein skizzierter Aufbau eines Voyager Massenspektrometers (Linearmodus) sowie eine Außenansicht dargestellt.

⁹⁴ Applied Biosystems, Framingham, MA, USA.

⁹⁵ Biospectrometry ist ein geschütztes Warenzeichen der Fa. Applied Biosystems. Biospectrometry ist nach [Per96] die Anwendung der Massenspektrometrie im Bereich der Naturwissenschaften. Der Bereich Biospectrometry setzt schnelle chromatographische Techniken, Enzym- und Oberflächenchemie ein und kombiniert diese mit der Massenspektrometrie sowie einer fortschrittlichen Software, um so die biomolekulare Forschung und Datenauswertung zu vereinfachen.

⁹⁶ Delayed Extraction ist ein geschütztes Warenzeichen der Fa. Applied Biosystems. Siehe auch Kapitel 3.2.7.

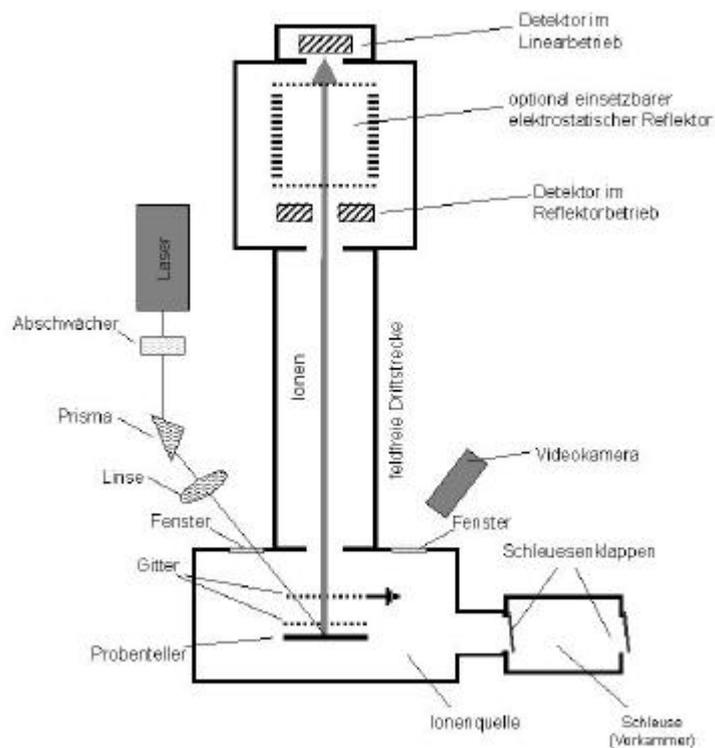


Abbildung 4-1 Skizzierter Aufbau (Linearmodus) und Außenansicht des Voyager DE PRO MALDI-Massenspektrometers nach [Per96]

Am Voyager DE werden im Linear- und Reflektormodus und am Voyager DE PRO im Reflektormodus *dual MCP* zur Detektion der Ionen eingesetzt (*MCP*, *micro channel plate*). Das Voyager RP DE PRO setzt im Linearmodus einen *high-current detector* ein (Kombination aus einem *MCP* und Szintillator mit nachgeschaltetem Photomultiplier, siehe auch Kapitel 3.2.1). In Abbildung 4-2 ist das Prinzip des Ionennachweises dieser beiden Detektoren skizziert.

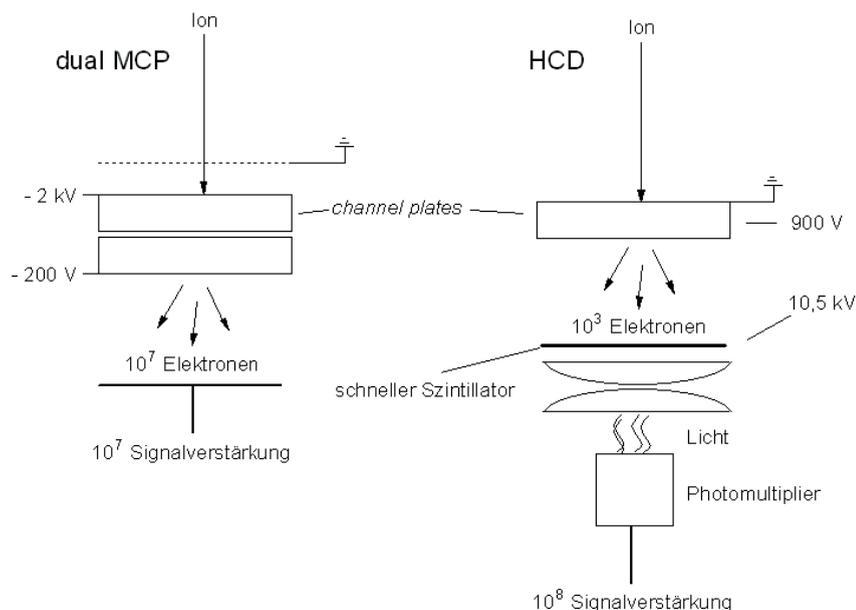


Abbildung 4-2 Prinzip des *high-current detector* (HCD) im Voyager DE PRO und des *dual MCP* im Voyager DE (beide Detektoren im Linearmodus)

Das Voyager RP DE benutzt einen gepulsten Stickstoff-Gas-Laser ($\lambda = 337\text{ nm}$), zusätzlich war das Gerät noch mit einem Nd-YAG-Laser⁹⁷ (frequenzvervierfacht, $\lambda = 266\text{ nm}$) ausgestattet⁹⁸. Der Abstand d_1 zwischen Probenteller und erstem Gitter (sog. Extraktionsabstand) beträgt $d_1 = 2,20\text{ mm}$. Der Abstand d_2 zwischen erstem Gitter und zweitem Gitter (zweite Beschleunigungsstrecke) beträgt $d_2 = 17,4\text{ mm}$, die feldfreie Driftstrecke L im Linearmodus (Betrieb des Geräts ohne Reflektor) wird mit $L = 1,315\text{ m}$ angegeben⁹⁹. Am Voyager RP DE PRO wird ein N_2 -Laser eingesetzt. Die Quellengeometrie ist wie folgt definiert: $d_1 = 2,43\text{ mm}$, $d_2 = 17,4\text{ mm}$ und die feldfreie Driftstrecke $L = 1,281\text{ m}$.

In folgender Abbildung ist eine schematische Darstellung der Geometrie der Ionenquelle in Voyager Massenspektrometern dargestellt.

⁹⁷ Neodym-Yttrium-Aluminium-Granateinkristall

⁹⁸ Es wird hierbei ein Stickstofflaser des Typs VSL-337ND der Fa. LSI Laser Science (Newton, MA, USA) und ein Nd-YAG-Laser des Typs Mini/Lase ML-10 der Fa. New Wave Research (Sunnyvale, CA, USA) eingesetzt. Daten zur Spezifikation der Stickstofflaser finden sich in [Lsi95]. Zu den technischen Daten zum Nd-YAG-Laser (blitzlichtgepumpter, *Q-switched* [Web78], [Dem93] wassergekühlter Nd-YAG-Laser) siehe [New95].

⁹⁹ Die Längen sind den Geräteinitialisierungsparametern der Fa. Applied Biosystems in der Datei voyager.ini entnommen.

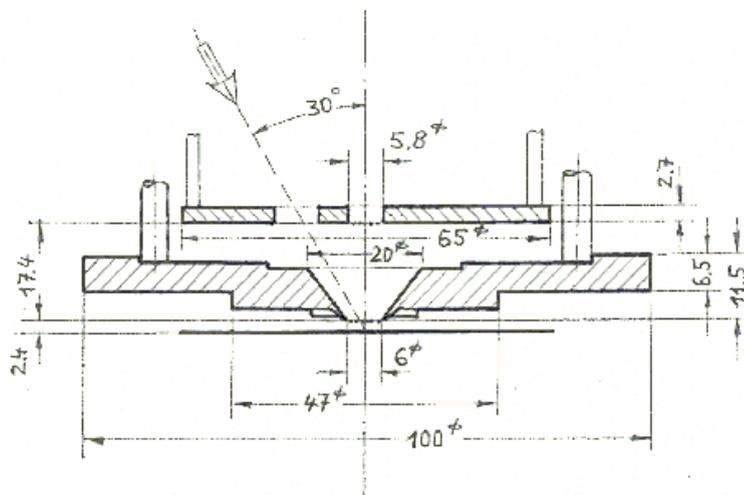


Abbildung 4-3 Schematische Darstellung der Geometrie der Ionenquelle im Voyager Massenspektrometer

Die Laserstrahlen werden unter Verwendung einer jeweils geeigneten Optik durch die Eintrittsfenster der Hauptkammer auf die Probe fokussiert. Mittels variabler Strahlabschwächung läßt sich die Laserenergie exakt auf den gewünschten Wert einstellen. In den folgenden Abschnitten werden die eingesetzten Laser und Laseroptiken genauer beschrieben.

Der Stickstofflaser besitzt eine Pulsdauer von ca. 3 ns und eine Energie von ca. 250 μJ pro Laserimpuls. Die Repetitionsrate des Lasers ist auf 3 Hz eingestellt. Der Laserstrahl der Stickstofflaser wird über eine Prismenanordnung, einen Strahlabschwächer und eine Linse¹⁰⁰ durch das Eintrittsfenster der Hauptkammer auf die Probe fokussiert. Mittels eines computergesteuerten Schrittmotors kann ein die Laserenergie abschwächender Graukeil bewegt werden, hieraus ergibt sich vor dem Eintrittsfenster eine Laserenergie von 1,0 – 12,5 μJ pro Laserimpuls. Im Fall des N_2 -Lasers wird mittels eines Strahlteilers ein Teil des Laserlichtes auf eine Photodiode geführt, die das Startsignal (*trigger out*) der Flugzeitmessung liefert.

Im Fall des Nd-YAG-Lasers wird zuerst mittels eines Abschwächerplättchens die Laserenergie auf ca. 10% der maximalen Gesamtleistung reduziert. Anschließend wird über zwei rechtwinklige Prismen¹⁰¹ nach Durchgang durch eine Irisblende sowie einen variablen Abschwächer der Laserstrahl mittels einer Linse¹⁰² durch ein Eintrittsfenster der Hauptkammer auf die Probe fokussiert. Die Abschwächung erfolgt hierbei computergesteuert mittels eines dielektrisch beschichteten Filters dessen Transmission über die winkelabhängige Reflexion reguliert werden kann. Hieraus ergibt sich vor dem Eintrittsfenster

¹⁰⁰ Brennweite der Linse $f \approx 100$ mm.

¹⁰¹ Prismen der Fa. Melles Griot, 01 PQB 002.

¹⁰² Brennweite der Linse $f = 200$ mm (Fa. Melles Griot, 01 LQP 071).

eine Laserenergie von 3,5 – 135 μJ pro Laserimpuls. Der Nd-YAG-Laser besitzt eine Impulsdauer von ca. 5 ns. Im Fall des Nd-YAG-Lasers findet das Steuerungssignal des Güteschalters als Beginn der Flugzeitmessung Anwendung (*trigger out*), wobei der Laserimpuls etwa 80 ns nach dem Steuerungssignal emittiert wird.

Der Strahl der Laser trifft in einem vorgegebenen Winkel von 30° zur Achse des Flugrohres auf den Probensteller. Für beide Laser ergibt sich eine Laserbestrahlungsstärke (*irradiance*) von etwa 10^{10} - 10^{12} W/m^2 . In Tabelle 4-1 sind einige Daten zur Spezifikation der Laser zusammengefaßt. In allen Messungen ist die Laserenergie so gewählt worden, daß sie gerade oberhalb der Schwellbestrahlung der Analytmolekülonen lag.

Tabelle 4-1 Laserdaten zum Stickstofflaser [Lsi95] sowie Nd-YAG-Laser [New95]

| Lasertyp | Stickstofflaser | Nd-YAG-Laser |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Wellenlänge [nm] | 337 | 266 |
| Spektrale Breite [nm] | 0,1 | 0,1 |
| Impulsenergie [μJ] | > 250 | > 2000 |
| Impulsweite [ns] | 3 | 4-6 |
| Durchschnittliche Wiederholrate [Hz] | 1-20 | 1-20 |
| Strahldivergenz ? [mrad] | < 0,3 | < 1,5 |
| Impulsenergie nach variabler Abschwächung [μJ] | 1-20 | 3,5-135 |
| Brennfleckradius* r [μm] | 50 | 100 |
| Laserbestrahlung (Energiedichte)** [J/m^2] | 100-2300 | 100-3800 |
| Laserbestrahlungsstärke (Leistungsdichte)** [W/m^2] | 10^{10} - 10^{12} | 10^{10} - 10^{12} |

* Abschätzung mit $r = ? f$. Der Stickstofflaser ist nicht fokussiert. **Abschätzung mit einem elliptischen Brennfleck der Fläche $F = p \cdot \cos(30^\circ) \cdot r^2$.

Zum Auftragen der Matrix-/Analytproben dient ein Metallprobenträger, der 100 Probenpositionen mit einem Durchmesser von jeweils ca. 2 mm hat (zu modifizierten Probenstellern siehe Kapitel 4.2). Der Probensteller wird über eine Vakuumschleuse in die Ionenquelle des Massenspektrometers eingeführt. Der Druck in der Probenkammer liegt typischerweise im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-5} Pa. In der Schleusenkammer wird ein Druck von ca. 10^{-1} Pa erreicht. Mittels einer Videokamera ist die Beobachtung der Probe zur Auswahl des bestrahlten Areals bei beiden Massenspektrometern möglich. Mittels zweier Schrittmotoren läßt sich der Probensteller innerhalb der x-y-Richtung (normal zur Achse des Flugrohres und im Abstand d_1 parallel zum ersten Gitter) verschieben.

In beiden Massenspektrometern wird im Betrieb über Pumpen ein Vakuum von bis zu 10^{-6} Pa erreicht.¹⁰³

¹⁰³ Turbopumpe 1 an der Hauptkammer, Turbopumpe 2 an der Detektor- bzw. Reflektorkammer (beide Hochvakuum, beide über Ventile mit der Vorpumpe gekoppelt, Turbopumpen der Fa. Varian Typ V70) sowie einer Vorpumpe (Fa. Balzer) an der Schleusen- bzw. der Probenladekammer (Vorvakuum). Drei Vakuumanzeigen machen eine Kontrolle der Drücke innerhalb des Geräts möglich.

Die Steuerung der Geräte erfolgt über eine auf Microsoft Windows¹⁰⁴ basierende Software.¹⁰⁵ Ein 500 MHz Analog-Digital-Wandler erlaubt die Speicherung und Übertragung der Signale vom Massenspektrometer zum Personalcomputer. Das analoge Detektorsignal wird mit Hilfe eines Transientenrekorders (im Fall des Voyager DE mit einer im Personalcomputer integrierten Transientenrekorderkarte) in ein digitales Signal umgeformt, registriert und einem Zeitpunkt (*trigger out*, Beginn der Flugzeitmessung) zugeordnet. Beim Voyager DE PRO wird ein Transientenrekorder der Firma Tektronix (Zweikanaloszilloskop, TDS 520D) eingesetzt.¹⁰⁶ Nach dem Signal *trigger out* vergeht eine Zeit $t_d = 200 \pm 20$ ns (Triggerelektronik und Photodiodenschaltung) bevor der Transientenrekorder mit der Flugzeitmessung bei $t_{ges} = 0$ ns beginnt (siehe Abbildung 4-4). Bei Einsatz der verzögerten Extraktion ist sowohl am Voyager DE als auch am Voyager DE PRO zur Verzögerungszeit der Softwareeinstellung eine gerätebedingte Verzögerungszeit von $t_d = 200$ ns zu addieren, so daß die tatsächliche minimale Verzögerungszeit jeweils bei $t = t_d$ liegt.

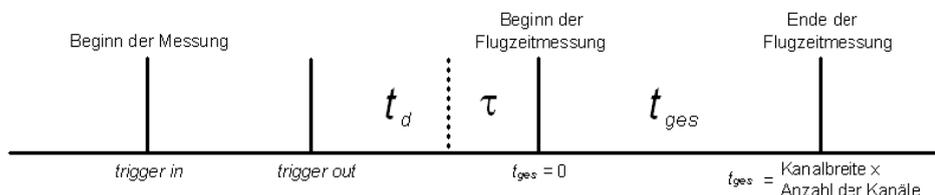


Abbildung 4-4 Schematischer Zeitverlauf der Triggersignale vor Beginn der Flugzeitmessung

Eine Auswertung, Kalibrierung und Verarbeitung der Massenspektren erfolgt mittels der GRAMS-Software.¹⁰⁷

Weiterhin wird in den Massenspektrometern ein *guide wire* als ionenoptisches Bauteil (siehe Kapitel 4.1.2) dazu benutzt, die Ionen innerhalb der feldfreien Driftstrecke zum Detektor zu führen. Weiterhin ist optional ein einstufiger Reflektor (siehe Kapitel 3.2) einsetzbar (siehe Abbildung 4-1).

Mit beiden Massenspektrometern ist die Untersuchung sowohl positiver als auch negativer Ionen möglich. Die Beschleunigungsspannung U_{ges} ist bis maximal 25 Kilovolt frei wählbar (siehe Kapitel 4.1.4).

4.1.1 Verringerung der Ionenintensität durch Blenden

Wichtig für die Bestimmung der winkelabhängigen Verteilung der Startgeschwindigkeit ist die Größe der Blenden, die zwischen dem Ort der Desorption der Teilchen und dem Detektor liegen. Hierbei kann die Größe der Öffnungen im Probenhalter (bei Einsatz eines modifizierten Probenhalters, siehe Kapitel 4.2.6) und den Gittern vernachlässigt werden, da

¹⁰⁴ Microsoft Windows ist eine graphische Benutzeroberfläche der Fa. Microsoft.

¹⁰⁵ Die Software des Typs Voyager Biospectrometry Workstation der Fa. Applied Biosystems steuert alle Gerätefunktionen.

¹⁰⁶ Kanalbreite von 0.5 bis 20 ns, maximal 50 000 Kanäle.

¹⁰⁷ Die GRAMS/386 Software der Fa. Galactic Industries dient zur Auswertung der Spektren.

die Öffnung der Stoßgas-Kollisionszelle¹⁰⁸ (*collision induced dissociation*, CID) nur Ionen in einem geringen Öffnungswinkel von ca. 3° zur Achse des Flugrohres und die Blende am Ende des Flugrohres (nach ca. 1,2 m) nur Ionen in einem Winkel von ca. 1° zum Detektor durchläßt. Aufgrund des *guide wire* ist jedoch zu erwarten, daß im wesentlichen die Öffnung der CID-Zelle die Zahl der Ionen, die zum Detektor gelangen, begrenzt, da der *guide wire* (siehe Kapitel 4.1.2) die Ionen auf einer spiralförmigen Bahn zum Detektor führt.

4.1.2 Ionenfokussierung durch *guide wire*

Innerhalb des Flugrohres der Voyager Massenspektrometer leitet ein elektrisch geladener Draht, ein sog. *guide wire*, die Ionen auf Spiralbahnen zum Detektor. In diesem Kapitel wird gezeigt, daß der *guide wire* keine Wirkung auf die Flugzeit besitzt und daher in der Flugzeitgleichung nicht berücksichtigt werden muß.

Die elektrostatische Kraft auf ein Ion der Geschwindigkeit v , Ladung q und Masse m bei anliegendem elektrischem Feld E ist wie folgt definiert:

$$F = m \cdot a = q \cdot E$$

Die axialen und radialen Komponenten des Feldes ergeben sich nach [Mar95] zu:

$$E_{axial} = 0$$

$$E_{radial} = - \frac{U_{cylinder} - U_{wire}}{r \cdot \ln(r_{wire} / r_{cylinder})}$$

Dabei ist r der Abstand des Ions von der Achse, $U_{cylinder}$ (üblicherweise $U_{cylinder} = 0$ V) ist die Spannung am Flugrohr und U_{wire} die Spannung am *guide wire*. Der *guide wire* besitzt den Durchmesser r_{wire} und das Flugrohr den Durchmesser $r_{cylinder}$.

Dies führt dazu, daß für eine bestimmte Geometrie durch Variation der Spannungsdifferenz zwischen *guide wire* und Zylinder Ionen unterschiedlichster Energie auf den Detektor gelangen. Die Effizienz des *guide wire* ist um so größer, je geringer die kinetische Energie der Ionen ist. Aufgrund der massenunabhängigen initialen Geschwindigkeit der Ionen bei MALDI müssen für Ionen großer Masse somit höhere Spannungen am *guide wire* angelegt werden. Die Spannung am *guide wire* wird bei Voyager Massenspektrometern typischerweise in Prozent der Gesamtbeschleunigungsspannung angegeben. Für Ionen hoher Masse kann eine maximale Spannung von 75 V am *guide wire* angelegt werden. Als Richtwert für eine Optimierung werden für Messungen im Linearmodus 0,05 % der Gesamtspannung $U_{ges} = 25$ kV, d.h. $U_{wire} = 12,5$ V am *guide wire* angelegt. Häufig ist bei hohen Ionenintensitäten (bei hoher Spannung am *guide wire*) eine geringere Auflösung der Analytensignale festzustellen.

¹⁰⁸ Durch Stoßgas in der CID-Zelle können in der Ionenquelle beschleunigte Ionen durch hochenergetische Stöße fragmentiert werden.

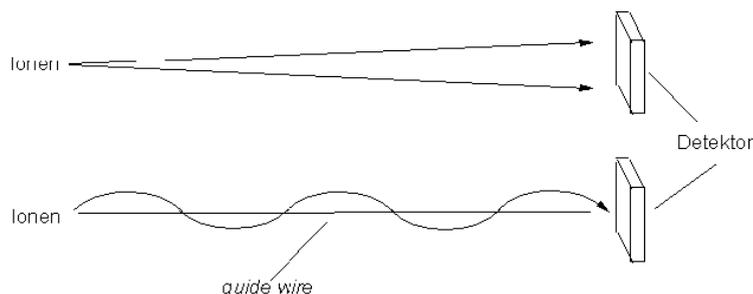


Abbildung 4-5 Skizzierte Funktion des *guide wire* nach [Per96]. Ohne *guide wire* gelangen nur wenige Ionen auf den Detektor, mit Hilfe einer Spannung am *guide wire* werden Ionen auf den Detektor fokussiert

Wichtig ist hierbei, daß durch den *guide wire* keine axiale Beschleunigung auf die Ionen wirkt, so daß auch bei hohen Spannungen am *guide wire* keine Fehler in der Bestimmung der Flugzeit auftreten.

4.1.3 Massenausblendung durch *low mass gate*

Aufgrund der Totzeit von *MCP*-Detektoren wird bei hohen Ionenintensitäten im niedrigen Massenbereich die Detektion von Ionen größerer Masse erschwert. Dies ist zusätzlich zu der mit steigender Masse der Ionen abnehmenden Nachweisempfindlichkeit, die auf die abnehmende Effizienz der Ionen-zu-Elektronenkonversion zurückzuführen ist, problematisch. Als Totzeit wird hierbei die Zeit bezeichnet, die nach dem Auftreten einer Elektronenkaskade zur Regeneration benötigt wird, bevor eine erneute Kaskade ausgelöst werden kann. Um die "Sättigung" mit Ionen geringer Masse (wie zum Beispiel Matrixionen) zu verhindern, können Ionen niedriger Masse ausgeblendet werden (*low mass gate*). Hierbei wird der Detektor verzögert auf die volle Betriebsspannung geschaltet.

Standardmäßig werden für Messungen mit dem Analyten Insulin alle Ionen bis zu m/z 1000 ausgeblendet. Für hochmolekulare Ionen können aber auch Einstellungen bis ca. m/z 10000 sinnvoll sein.

Im Voyager DE PRO wird im Linearmodus ein *high-current detector* (HCD) zur Detektion der Ionen eingesetzt, der gegenüber dem *dual MCP* des Voyager DE (über die Vorteile bei der Detektion von Ionen hoher Masse hinaus) eine wesentlich geringere Abhängigkeit der Ionenintensitäten von der Ionenausblendung durch das *low mass gate* zeigt. Im Vergleich der Detektoren erreicht der *high-current detector* aufgrund des verbesserten Sättigungsverhaltens für Ionen mit m/z über 30.000 eine höhere Auflösung und auch ein verbessertes Verhältnis von Signal zu Rauschen (siehe Abbildung 4-2).

4.1.4 Schaltspannung bei verzögerter Extraktion

In diesem Kapitel sollen einige Details zur Schaltung der verzögerten Extraktion vorgestellt werden.

Die Beschleunigung der Ionen innerhalb der Ionenquelle wird bei den Voyager Massenspektrometern über zwei Hochspannungsnetzgeräte (HV 1 und HV 2) erreicht.

Mittels HV 2 wird eine Spannung von $G \cdot U_{ges}$ am Probensteller und am ersten Gitter aufrecht erhalten.¹⁰⁹ Während der Verzögerungszeit ist somit die Strecke d_1 nahezu feldfrei.¹¹⁰ Am Ende der Verzögerungszeit wird über einen Hochspannungsschalter¹¹¹ am Probensteller eine Spannung in Höhe U_{ges} angelegt. Das zweite Gitter ist geerdet. Bei der Extraktion aus der Strecke d_1 liegt somit eine Spannung von $(1-G) \cdot U_{ges}$ an.

In folgender Abbildung ist eine starke Vereinfachung der DE-Schaltung an den Voyager DE Massenspektrometern gezeigt. Durch den HV-Schalter wird am Probensteller die Spannung von $G \cdot U_{ges}$ (HV 2) auf U_{ges} erhöht (HV 1).

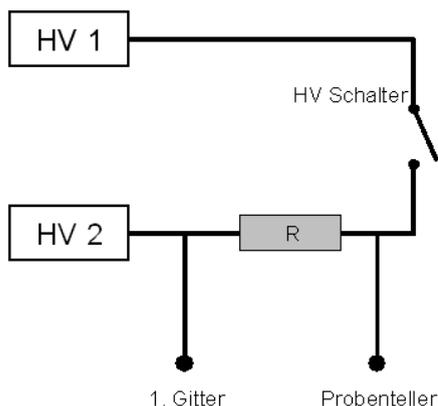


Abbildung 4-6 Stark vereinfachte Darstellung der DE-Schaltung: Durch den HV-Schalter wird am Probensteller die Spannung von $G \cdot U_{ges}$ (HV 2) auf U_{ges} erhöht (HV 1)

In folgender Abbildung ist der theoretische Spannungsverlauf am Probensteller während und nach der Verzögerungszeit t dargestellt.

¹⁰⁹ Eine zeitliche Konstanz der Spannungen an HV 1 und HV 2 ist erst nach einer Zeit von ca. zehn Minuten nach Anschalten der Hochspannungen gegeben.

¹¹⁰ Bei allen Messungen der initialen Geschwindigkeit für verschiedene Matrizes wurden Werte der Verzögerungszeit von 0 bis 1200 ns eingesetzt, da in diesem Bereich das lineare Verhalten von t_{ges} gegen t nicht durch Felddurchgriffe des elektrischen Feldes der zweiten Beschleunigungsstrecke beeinflusst wird. Während der Verzögerungszeit liegt eine geringe negative Beschleunigung von $(1+\alpha)GU$ mit $\alpha \approx -0,0015$ an, um Felddurchgriffe in der Nähe des Probenstellers zu kompensieren. Bei hohen Verzögerungszeiten gelangen die Ionen jedoch näher an das erste Gitter, die Gesamtflugzeit ist dann nicht mehr linear abhängig von t .

¹¹¹ Hochspannungsschalter der Fa. Behlke, Kronberg, Deutschland.

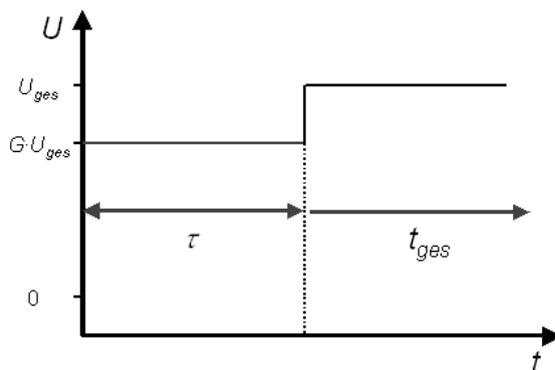


Abbildung 4-7 Theoretischer Spannungsverlauf am Proben-teller bei verzögerter Extraktion. Am ersten Gitter ist immer die Spannung $G \cdot U_{ges}$ angelegt

In der Steuerungssoftware kann das Verhältnis G [%] der Spannungsverteilung zwischen Proben-teller und erstem Gitter eingestellt werden. Das Potential am Proben-teller kann variabel bis $U_{ges} = 25$ kV eingestellt werden. Als Richtwerte für die Optimierung der Auflösung oder der Ionenintensität werden im Linearmodus an Voyager DE PRO und Voyager DE bei einer Gesamtspannung von $U_{ges} = 25$ kV Werte für $G > 90$ % eingestellt. Im Reflektormodus werden bei $U_{ges} = 20$ kV Werte für $G < 75$ % genutzt. Hierbei ist das Verhältnis G und die optimale Verzögerungszeit der Masse der zu untersuchenden Ionen anzupassen.¹¹²

Der Spannungsverlauf (bei der Gesamtspannung $U_{ges} = 5$ kV, und verschiedenen Verhältnissen G)¹¹³ konnte mittels eines Meßkopfes¹¹⁴ und eines 500 MHz Oszilloskops der Fa. LeCroy des Typs 9350A am Proben-teller im Voyager RP DE verfolgt werden. Die Spannung am Proben-teller bei der verzögerten Extraktion bis zum Erreichen der maximalen Spannung bei 25 kV zeigt eine Schaltzeit von etwa 200 ns, was vom theoretischen Spannungsverlauf eines idealen Rechteckimpulses bei der verzögerten Extraktion abweicht. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls mittels einer Messung über Induktion am Voyager DE PRO und Voyager DE bestätigt werden.

4.2 Substanzen, Probenpräparation und modifizierte Proben-teller

In Kapitel 4.2.1 werden Analyt- und Matrixsubstanzen sowie organische Lösungsmittel vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden. In Kapitel 4.2.2 bis 4.2.6 werden Präparationstechniken von MALDI-Präparationen und auch modifizierte Proben-teller beschrieben.

¹¹² Zur Anpassung und Optimierung von Verzögerungszeit und/oder Verhältnis G für Ionen eines m/z -Verhältnisses siehe [Gle99].

¹¹³ Der Wert von $U_{ges} = 5$ kV liegt wesentlich unter den bei den Experimenten eingesetzten Gesamtspannungen von 20 bis 25 kV. Allerdings liegt er deutlich über den von anderen Arbeitsgruppen vorgestellten Werten [Fou00].

¹¹⁴ Meßkopf der Fa. Goerz Elektro, Typ GE 4196.

4.2.1 Substanzen

Organische Lösungsmittel werden jeweils in analytischer Reinheit (siehe hierzu Tabelle 10-6 im Anhang) eingesetzt. Tabellen zu verschiedenen Matrix- und Analytsubstanzen sowie zur Präparation mit verschiedenen Lösungsmitteln finden sich ebenfalls im Anhang.

Alle Substanzen wurden von kommerziellen Anbietern bezogen und (abgesehen von den Matrixsubstanzen 2,4-DHB, 2,6-DHB und DHB, siehe Kapitel 4.2.2) ohne weitere Aufreinigung in den Messungen eingesetzt.

Im folgenden werden kurz einige Präparationstechniken beschrieben, auf die in den jeweiligen Kapiteln im Ergebnisteil eingegangen wird.

4.2.2 Untersuchungen zum Einbau von Analyten in Matrixkristalle

Für Versuche zum Einbau von Analytsubstanzen in Matrixkristalle werden die Matrizes in geeignetem Lösungsmittel (siehe Tabelle 10-1 im Anhang) gelöst und über Faltenfilter mit Aktivkohle filtriert. Aus der Lösung kann bei Raumtemperatur nach einigen Tagen die rekristallisierte Matrixsubstanz gewonnen werden.

Zur Herstellung von großen DHB-Matrixkristallen mit Peptiden/Proteinen wird in der Wärme (bei ca. 40° C) eine Lösung des Analyten (10^{-4} - 10^{-5} mol/l) in 0.1 % Trifluoressigsäure/Wasser, Azetonitril 2:1 (ATW), filtriert über Faltenfilter, mit Matrix gesättigt. Aus dieser Lösung kann bei 4° C nach ca. zwölf Stunden eine große Zahl von quaderförmigen Kristallen von DHB und Analyt gewonnen werden. Kristalle der DHB mit Zuckern werden aus einer mit DHB gesättigten Zuckerlösung (10^{-5} mol/l, Lösungsmittel Wasser) hergestellt. DHB-Kristalle werden direkt ohne Waschen massenspektrometrisch bzw. nach Abspülen mit einigen 100 µl des Lösungsgemisches ATW untersucht (siehe Kapitel 7.1.2). Salze befinden sich an der Oberfläche der DHB-Kristalle und können somit durch einfaches Waschen entfernt werden.

Der zur Messung der Startgeschwindigkeit von Peptid- und Proteinionen eingesetzte große Kristall aus DHB mit dem Analyt Cytochrom C hat eine Größe von ca. 6,8 x 0,5 x 1,6 mm. Zur Messung der Startgeschwindigkeit von [Cytochrom C+H]⁺ von den Kristallflächen werden jeweils die Außenflächen des ursprünglichen Kristalls eingesetzt. Um geeignete Kristalle zu erhalten, die in ihrer Dimension in etwa zu den Vertiefungen im Probensteller passen, werden verschiedene Kristallstücke durch Schnitte parallel zu den Flächen *d/c* und *e/f* hergestellt.¹¹⁵ Die Kristallstücke wurden mittels goldgesputtertem Knetmaterial so in einen vertieften Probensteller eingebettet, daß die Oberfläche mit der ursprünglichen Probenstelleroberfläche übereinstimmt (siehe Abbildung 4-8).

¹¹⁵ Eine leichte Spaltung der Kristalle erfolgt senkrecht zur kurzen Kante des Kristalls, Schnitte parallel zur kurzen Kante gelangen erst nach vielen Versuchen.

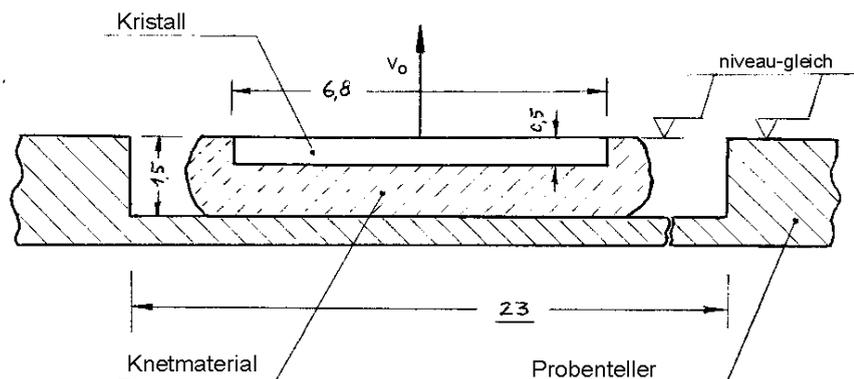


Abbildung 4-8 Einbettung des eingesetzten Cytochrom C/DHB-Kristalls in Knetmaterial im modifizierten Probenhalter

Die Einbettung erfolgt hierbei so, daß die übrigen Flächen des Kristalls von Knetmaterial bedeckt sind und nur die Oberfläche der zu untersuchenden Fläche dem Laserlicht ausgesetzt ist. Dies ist notwendig, um zu verhindern, daß eine Desorption auch von den Seitenflächen des Kristallstückes erfolgt, da die Lasereinstrahlung nicht orthogonal gerichtet ist.

4.2.3 *Dried droplet*- und Oberflächenpräparation verschiedener Matrices

Üblicherweise werden die MALDI Proben nach dem *dried droplet*-Verfahren hergestellt. Auf einem Stahlprobenteller werden vor dem Eintrocknen im kalten Luftstrom von der Matrixlösung 1 μl mit 1 μl der Analytlösung gemischt. Eine weitere Möglichkeit bietet die sog. Oberflächenpräparation, bei der 1 μl der Matrixlösung zuerst aufgegeben und eingetrocknet wird. Die feinkristalline Matrix dient dann als Unterlage zum Auftragen der Analytlösung. Zur Präparation verschiedener Matrices siehe Tabelle 10-1 im Anhang (Kapitel 10). Alle Proben werden im kalten Luftstrom getrocknet. Zum Beispiel werden die Matrices HCCA sowie HCCA-Amid in einer Oberflächenpräparation aus Aceton präpariert.

Zur Präparation von Zuckern wie Chitotetraose, Maltotetraose etc. wurde eine feinkristalline Präparation mit DHB genutzt [Pfe98], [Pfe99]. Kohlenhydrate wurden durch Aufbringen von 1 μl der DHB-Lösung, 1 μl der Analytlösung und 1 μl einer 10 mM NaCl-Lösung präpariert. Zur Präparation von Zuckern werden alle Substanzen in Wasser gelöst. Alle Kohlenhydratpräparationen wurden im kalten Luftstrom schnell getrocknet, so daß eine mikrokristalline Struktur der Probe resultierte.

Für die DHB/CMBT-Präparation [Pfe98], [Pfe99] wird aus 1 μl der CMBT-Lösung im starken Luftstrom schnell eine homogene, weiße Unterlage für die folgende Präparation von Analyt und Matrix hergestellt. Von der wäßrigen DHB- und Analytlösung (siehe Tabelle 10-9 im Anhang) wird jeweils 1 μl aufgegeben und ebenfalls im Luftstrom schnell getrocknet. Im Fall

der Analyse von komplexen Zuckern aus Humanmilch (siehe Kapitel 5.2.2.5) beträgt die Gesamtkonzentration¹¹⁶ der Probe ca. 1 g/l.

Bei Zusatz verschiedener Monosaccharide zur Matrix DHB werden MALDI-Proben in einer einfachen Kokristallisation aus 1 µl der DHB-Lösung (in ATW 30 mg/ml), 1 µl der Zuckerlösung (Monosaccharid als Matrixzusatz, ATW 30 mg/ml) und 1 µl der Analytlösung gefolgt vom Trocknen im leichten Luftstrom hergestellt (siehe Kapitel 5.2.1.4). Für weitere Zusätze zu Matrices siehe Tabelle 10-4 und 10-5 im Anhang.

Für diese herkömmlichen MALDI-Präparationen wird ein Probenhalter mit 100 Probenpositionen (ohne Vertiefungen) eingesetzt.

4.2.4 Preßlinge aus fester Matrix- und Analytsubstanz

Zur Herstellung von Preßlingen aus fester Matrix- und Analytsubstanz werden ca. 10 - 20 mg des Gemisches aus Matrix und Analyt im Mörser fein verrieben und in einer Hochdruckpresse¹¹⁷ bei einem Druck von ca. 10^7 Pa gepreßt. Hierbei entstehen kristalline Preßlinge von geringer mechanischer Stabilität (Durchmesser 8 mm, 1 - 2 mm Dicke).

Alle Analyt-/Matrixpreßlinge werden auf einen modifizierten Probenhalter aufgebracht und massenspektrometrisch untersucht (siehe Kapitel 7.1.3). Die Preßlinge werden jeweils so aufgeklebt, daß ihre Oberfläche mit der ursprünglichen Oberfläche des Probenhalters übereinstimmt. Abbildung 4-9 zeigt eine Darstellung des modifizierten Probenhalters.

¹¹⁶ Gemeint ist die Konzentration, die sich aus der Mischung aller Komponenten ergibt.

¹¹⁷ Hierbei wird eine Hochdruckpresse eingesetzt, vergleichbar mit einer Presse, die für die Herstellung von KBr-Preßlingen für die Infrarotabsorptionsspektroskopie Benutzung findet. Das molare Verhältnis von Analyt zu Matrix beträgt hierbei etwa 10^{-4} .

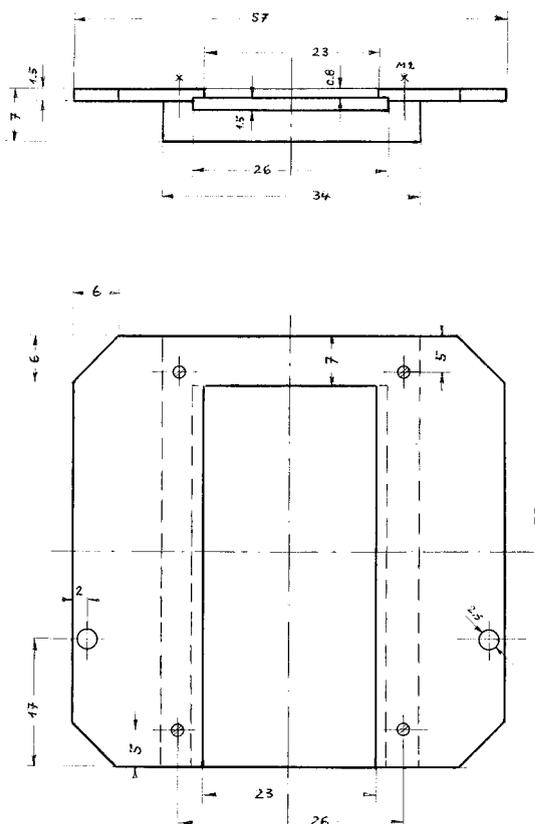


Abbildung 4-9 Darstellung des modifizierten Probenhalters. Einschübe aus verschiedenen Materialien können mittels dieses Probentellers als Probentellermaterial genutzt werden

4.2.5 Präparation von MALDI-Proben mittels nano-Elektrospray

Neben den herkömmlichen Präparationsmethoden (siehe Kapitel 4.2.3) können Analytlösungen auch mittels Elektrospray auf Matrixoberflächen aufgebracht werden.¹¹⁸ Es gelingt bei dieser Präparation mittels nano-Elektrospray bei kleinen Öffnungsdurchmessern der Kapillaren den Analyt lösungsmittelfrei, d.h. "trocken" auf der Matrixoberfläche zu präparieren.¹¹⁹ Hierbei sind als Matrixunterlagen große DHB-Kristalle, *dried droplet*-Präparationen, gepreßte Matrix oder Oberflächenpräparationen genutzt worden (siehe Kapitel 7.1.5 und Tabelle 10-3 im Anhang). In Abbildung 4-10 ist der experimentelle Aufbau dargestellt.

¹¹⁸ Der Einsatz von Elektrospray zur Präparation von Matrixschichten wurde bereits berichtet [Sad98], [Xia94b]. Weiterhin wurden von Thierolf [Thi99] Präparationen von nichtkovalenten Komplexen mittels nano-Elektrospray und Elektrospray untersucht.

¹¹⁹ Untersuchungen des Tröpfchendurchmessers bei nano-Elektrospray in Abhängigkeit vom Kapillarendurchmesser belegen dieses experimentelle Ergebnis (A. Schmidt, Universität Frankfurt, unveröffentlichte Ergebnisse).

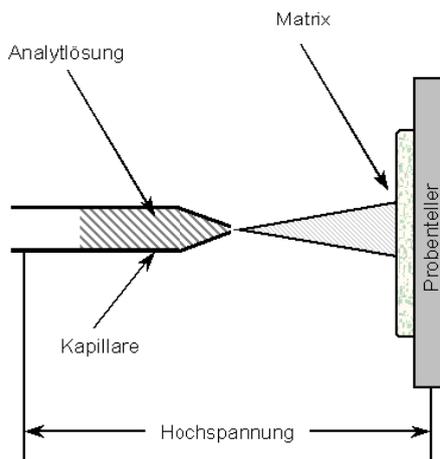


Abbildung 4-10 Experimenteller Aufbau für Präparation von Analytlösungen auf Matrixoberflächen mittels nano-Elektrospray (nach [Thi99])

Von der Analytlösung werden 2 - 2,5 μl bei einer Spannung von ca. 1 kV bei Spraykapillaren (Glas, goldbeschichtet¹²⁰) mit einem Öffnungsdurchmesser der Kapillaren $\varnothing \approx 1,5 \mu\text{m}$ (nano-ESI) versprüht. Hierbei kann ein Stromfluß von einigen Nanoampere gemessen werden. Die Sprühdauer beträgt drei bis fünf Stunden, der Abstand zwischen Öffnung der Spraykapillare und dem MALDI-Probenhalter beträgt 2 – 3 mm. Die so präparierten Proben werden MALDI-massenspektrometrisch untersucht. Für diese Sprühexperimente ist Analytlösung von Insulin in der Konzentration 10^{-5} mol/l in ATW eingesetzt worden. Das Lösen von Zuckern erfolgte in reinem Wasser in einer Konzentration von ca. 10^{-5} mol/l .

4.2.6 Messungen der winkelabhängigen Startgeschwindigkeitsverteilung

Ein modifizierter Probenhalter mit zusätzlichem Gitter erlaubt die Änderung der Normalen der Probenoberfläche gegenüber der Achse des Flugzeitmassenspektrometers in einem nahezu feldfreien Raum. Hierdurch ist im Rahmen dieser Arbeit an diesem Massenspektrometer zum ersten Mal sowohl die Bestimmung der axialen Startgeschwindigkeit als auch der winkelabhängigen Verteilung der Startgeschwindigkeit möglich (siehe Kapitel 7.3). Eine Ansicht des modifizierten Probenhalters zur Messung der Startgeschwindigkeit unter verschiedenen Winkeln ist in Abbildung 4-11 dargestellt.

¹²⁰ Hierbei werden Borosilikatgaskapillaren der Fa. Clark Elektromedical Instr. eingesetzt. Diese werden mit einem Kapillarenzieher des Typs P-97 der Fa. Sutter Instrument ausgezogen, wobei ein für nano-Elektrospray typischer Öffnungsdurchmesser der Kapillaren von $\varnothing \approx 1,5 \mu\text{m}$ erreicht wird.

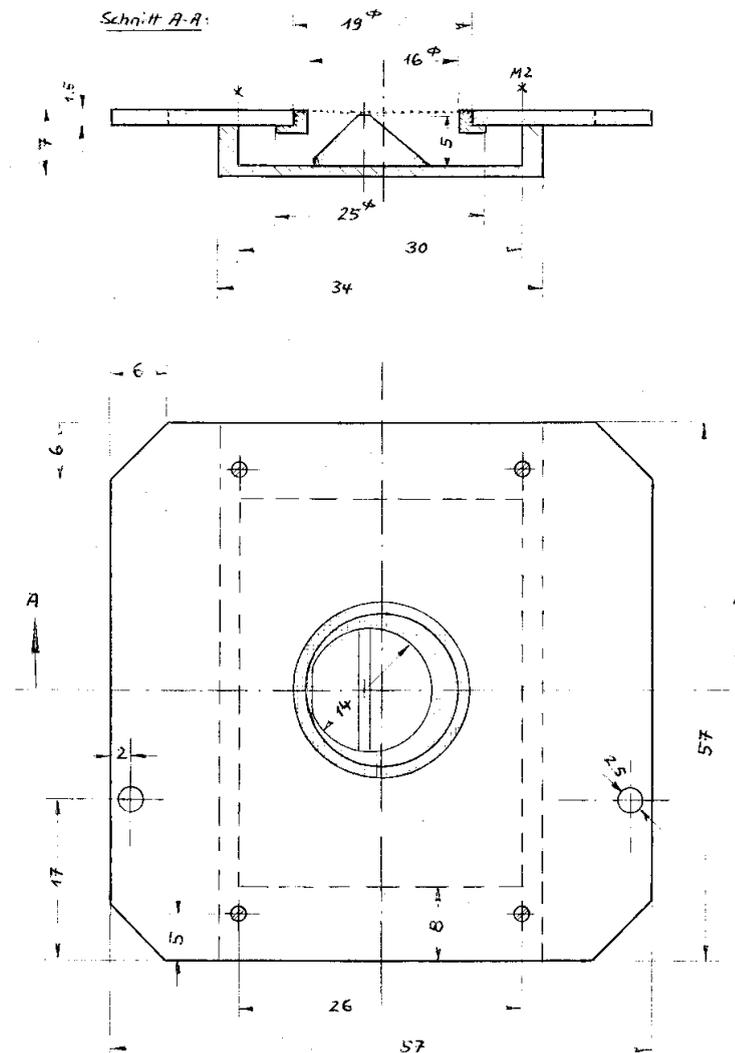


Abbildung 4-11 Modifiziertes Target mit zusätzlichem Netz zur Bestimmung der winkelabhängigen Startgeschwindigkeitsverteilung. Im Probenteller ist ein Aluminiumprobenhalter skizziert, der im Winkel 40° und 45° abgeschrägt ist.

In den modifizierten Probenhalter werden unter verschiedenen Winkeln abgeschrägte Probenhalter aus Aluminium eingelegt (Winkel von 0°, 15°, 30°, 40°, 45°). Diese Aluminiumprobenhalter besitzen einen Durchmesser von 14 mm und eine Höhe von 5 mm. Auf die abgeschrägte Fläche wird die MALDI-Probe präpariert. Für alle Winkel erfolgen die Messungen unter den gleichen experimentellen Bedingungen (z.B. Feldeinstellungen). Ein zusätzliches Netz ist in der Ebene der ursprünglichen Probenhalterfläche gespannt und verhindert Felddurchgriffe und Feldinhomogenitäten bei der Extraktion der Ionen aus der Ionenquelle. Während der Verzögerungszeit t ist der zusätzliche Raum innerhalb des modifizierten Targets nahezu feldfrei. Die MALDI-Probe befindet sich unterhalb der ursprünglichen Probentelleroberfläche unterhalb des in Abbildung 4-11 im Schnitt A-A angedeuteten zusätzlichen Netzes.

Kapitel 5

Startgeschwindigkeit von Ionen bei MALDI

Methode zur Bestimmung der initialen Geschwindigkeit

Ergebnisse zu Peptid- und Proteinionen

Ergebnisse zu Kohlenhydraten

Ergebnisse zu Matrixionen

5 Ergebnisse zur Startgeschwindigkeit von Ionen bei MALDI

Wie in Kapitel 2.5 gezeigt wurde, besteht zwar ein Zusammenhang zwischen der Bestrahlung und der Ionenintensität, allerdings ist die Bestrahlung (als experimenteller Parameter) nicht direkt mit der Anregung oder dem Fragmentierungsgrad der Analytionen verknüpft. Dies kann zum Beispiel bei Experimenten mit verzögerter Extraktion gezeigt werden, wo die Bestrahlung meistens höher gewählt wird als bei kontinuierlicher Extraktion [Bro95], [Ves95]. Auch bei Flugzeitmassenspektrometern mit orthogonaler Extraktion werden höchste Laserenergien zur Desorption/Ionisation eingesetzt, ohne daß der Grad der Fragmentierung direkt mit der Laserbestrahlung korreliert [Kru98]. Die Veränderung der Spektren in Abhängigkeit von der Bestrahlung ist eher ein Ergebnis von sekundären Effekten. Bei erhöhter Bestrahlung gewinnen zum Beispiel Stöße von Molekülen mit Ionen in der sich nach dem Laserimpuls ausdehnenden Teilchenwolke (*plume*) aufgrund einer erhöhten Menge an desorbiertem Material an Bedeutung. Die Größe der Bestrahlung oder Bestrahlungsstärke variiert in Abhängigkeit von den experimentellen Aufbauten verschiedener Arbeitsgruppen sehr stark.¹²¹ Sie ist als experimentelle Größe daher kaum geeignet, den Desorptionsprozeß zu charakterisieren [Ing94], dennoch gibt die Bestimmung der Abhängigkeit der Ionenintensität von der Bestrahlung eine zusätzliche Information zum Desorptionsprozeß.

Im Rahmen der Messungen von Ionenanfangsgeschwindigkeiten konnte festgestellt werden, daß die Bestimmung der initialen Geschwindigkeit von Ionen bei MALDI eher zur Charakterisierung des MALDI-Prozesses geeignet ist als die Laserbestrahlung. Die initiale Geschwindigkeit von Teilchen bei MALDI kann mittels verschiedener Methoden bestimmt werden (siehe Kapitel 2.6) Im Rahmen dieser Arbeit ist eine Methode eingesetzt worden, die aus der Abhängigkeit der Gesamtflugzeit von Ionen von der Verzögerungszeit eine Bestimmung der initialen Geschwindigkeit von Ionen erlaubt (siehe Kapitel 5.1). In Kapitel 5.1.1 wird die Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit untersucht. Hierbei erfolgt in Kapitel 5.1.1.1 eine mathematische Ableitung der Flugzeit eines Ions im Fall eines linearen MALDI-Flugzeitmassenspektrometers mit verzögerter Extraktion (siehe Kapitel 3.2.7). In Kapitel 5.1.2 werden verschiedene Ansätze vorgestellt, um aus experimentellen Werten der Flugzeit bei verschiedenen Verzögerungszeiten die Startgeschwindigkeit zu bestimmen. Nach Vergleich der Ergebnisse der Startgeschwindigkeit bei den Massenspektrometern Voyager DE und Voyager DE PRO in Kapitel 5.1.3, werden in Kapitel 5.2 verschiedene experimentelle Ergebnisse vorgestellt.

¹²¹ Im folgenden werden einige experimentell bestimmte Schwellbestrahlungen gegeben: Ca. 300 J/m² (SINA, $I = 266$ nm) [Ens91], 240 ± 60 J/m² positive Analytionen, 250 ± 60 J/m² negative Analytionen (SINA, $I = 266$ nm) [Yau93]. 312 J/m² (Ferulasäure, $I = 355$ nm) [Qui94], 133 J/m² (fs-laser, $I = 248$ nm, Ferulasäure) 95 J/m² (ns-Laser, $I = 337$ nm, Ferulasäure) für Analyte [Dem92].

5.1 Methode zur Bestimmung der initialen Geschwindigkeit

Zur Bestimmung von initialen Geschwindigkeiten wird die Technik eingesetzt, die auf der "DE-Methode" und damit der verzögerten Extraktion beruht (siehe Kapitel 2.6).

Trotz der Bestimmung von Startgeschwindigkeiten von Ionen mit geringem m/z -Verhältnis (siehe Kapitel 5.1.3) sowie genauer Überprüfung aller erforderlichen experimentellen Parameter, kann ein systematischer Fehler bei der Bestimmung von Meßwerten der Startgeschwindigkeit nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Die relativen Unterschiede der Meßergebnisse, z.B. der Startgeschwindigkeiten für verschiedene Matrizes, behalten dennoch ihre Aussagekraft, falls ein systematischer Fehler eine Verschiebung der absoluten Werte verursachen sollte. Der praktische Nutzen der Bestimmung von Meßwerten der initialen Geschwindigkeit liegt darin, daß die Kalibrierung (siehe Kapitel 3.2.2) beim Einsatz von verzögerter Extraktion in der Flugzeitmassenspektrometrie mittels der Startgeschwindigkeit verbessert werden kann [Juh97], [Glü97]. Die Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit, die mittels der "DE-Methode" nicht bestimmt werden kann, ist aber ein wesentlicher Faktor für die Höhe der Auflösung (siehe Kapitel 3.2.6) [Col94]. In Kapitel 5.1.1 wird die Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit untersucht und in Kapitel 5.1.2 die Methode zur Bestimmung der Startgeschwindigkeit erläutert. In Kapitel 5.2 wird eine Übersicht der Meßergebnisse der Startgeschwindigkeiten gegeben. Weiterhin werden die Resultate verschiedener Messungen miteinander verglichen, um das Verständnis der Ergebnisse zu verbessern. Messungen wurden bei Laserbestrahlungen durchgeführt, die typisch für Experimente bei verzögerter Extraktion sind.

5.1.1 Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit

Die Startgeschwindigkeit von Ionen kann aus der experimentellen Bestimmung der Abhängigkeit der Gesamtflugzeit von der Verzögerungszeit erhalten werden. Die Messung der Startgeschwindigkeit basiert auf der nahezu linearen Abhängigkeit der Gesamtflugzeit (siehe Kapitel 5.1.1.1) von der Verzögerungszeit.

5.1.1.1 Flugzeitgleichung für den Fall der zweistufigen Ionenquelle

Die Extraktion der Ionen aus der Ionenquelle bei der Flugzeitmassenspektrometrie kann zum einen nach einer Verzögerungszeit $t > 0$ s, d.h. mit verzögerter Extraktion, oder zum anderen zur Zeit der Ionenerzeugung $t = 0$ s, d.h. kontinuierlich, erfolgen. In diesem Unterkapitel wird die Bewegung eines Ions in einem Flugzeitmassenspektrometer im Fall einer zweistufigen Ionenquelle mathematisch beschrieben.

Die Bewegung von Ionen der Masse m [kg] und der Ladung z [C]¹²² innerhalb eines elektrischen Feldes setzt sich zusammen aus einer gleichförmigen und einer gleichmäßig beschleunigten Bewegung. Durch den Laserimpuls werden die Ionen an einem

¹²² Die Ladung des Ions z [C] wird hier als Vielfaches der Elementarladung angegeben.

Anfangspunkt x_0 [m] (Abstand vom Probenteller¹²³) mit einer initialen Geschwindigkeit v_0 [m/s] innerhalb der ersten Strecke vom Probenteller zum ersten Gitter erzeugt. Hierbei ist d_1 [m] die Länge der ersten Beschleunigungsstrecke, d_2 [m] die Länge der zweiten Beschleunigungsstrecke, L [m] die Länge der feldfreien Driftstrecke im Flugrohr.

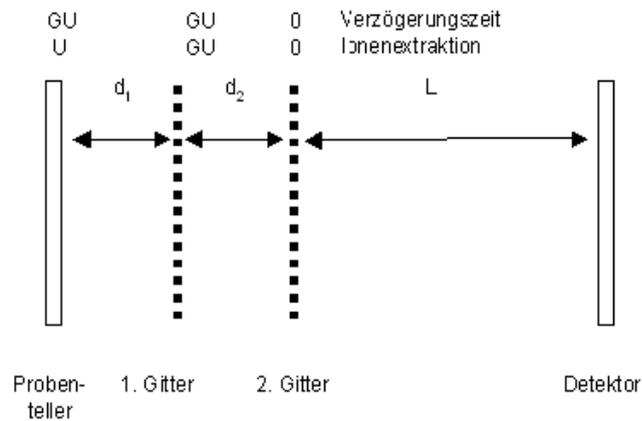


Abbildung 5-1 Schematischer Aufbau: Flugzeitmassenspektrometer mit zweistufiger Ionenquelle im Linearmodus mit Angabe der Spannungen an Probenteller und erstem Gitter während und nach der Verzögerungszeit

Während der Verzögerungszeit (*delay time*, DE-Zeit) t [s] legt das Ion die Strecke x [m] zurück. Hierbei sind drei Fälle zu unterscheiden. Das Ion befindet sich innerhalb der Verzögerungszeit in der Strecke d_1 oder hat diese Strecke bereits verlassen und befindet sich am Ende von t bereits in d_2 oder L . Da nur für den ersten Fall der Ansatz der verzögerten Extraktion Gültigkeit besitzt, ist die maximale Verzögerungszeit so zu wählen, daß die Ionen die Strecke d_1 in dieser Zeit noch nicht verlassen haben.

In der Geometrie einer Ionenquelle, wie sie bei MALDI eingesetzt wird, besteht ein einfacher Zusammenhang zwischen der Startgeschwindigkeit v_0 und der Strecke x mit der Verzögerungszeit t [s] [Col96], [Juh97]:

$$t = \frac{x}{v_0}$$

Am Ende der Verzögerungszeit wird die sogenannte Extraktionsspannung U_1 [V] innerhalb der ersten Strecke der Ionenquelle angelegt.¹²⁴

Zwischen Probenteller und erstem Gitter sowie zwischen erstem und zweitem Gitter werden die Spannungen U_1 [V] und U_2 [V] angelegt. Es besteht zwischen diesen ein Zusammenhang

¹²³ Weiterhin kann auch eine Verteilung des Startortes angenommen werden. MALDI als Oberflächentechnik zeigt jedoch eine geringe Variation des Startortes der Ionen. Prinzipiell befinden sich alle Startorte auf gleichem Potential.

¹²⁴ Aus dem Schalten des elektrischen Feldes innerhalb der ersten Strecke der Ionenquelle resultiert eine Schaltzeit (*rise time*), die zusätzlich in der Flugzeitgleichung berücksichtigt werden kann. Bei konstantem G und U_{ges} ist eine Schaltzeit jedoch in etwa konstant, so daß experimentelle Ergebnisse bei gleichem U_{ges} und G direkt verglichen werden können.

über das Verhältnis G (in [%]), das die Verteilung der Gesamtspannung U_{ges} auf die beiden Stufen der Extraktion angibt.¹²⁵ Hierbei gilt:

$$U_1 + U_2 = U_{ges}$$

$$U_1 = (1 - G) \cdot U_{ges} \quad \text{und} \quad U_2 = G \cdot U_{ges}$$

Somit wirkt auf ein Ion während der Extraktion die Potentialdifferenz $(1-G)U_{ges}$ in der ersten Beschleunigungsstrecke und eine konstante Potentialdifferenz von GU_{ges} in der zweiten Beschleunigungsstrecke. Während der Verzögerungszeit wird ein Nullfeld angenommen. Während der Verzögerungszeit liegt die Spannung U_2 am Probenteller und am ersten Gitter an. Nach der Verzögerungszeit wird am Probenteller die Spannung U_{ges} und am ersten Gitter die Spannung U_2 angelegt. Mit den Spannungen U_1 und U_2 sowie den Strecken d_1 und d_2 werden die elektrischen Feldstärken [V/m] E_1 und E_2 in der ersten und zweiten Beschleunigungsstrecke somit wie folgt definiert:

$$E_1 = \frac{U_1}{d_1} \qquad E_2 = \frac{U_2}{d_2}$$

Daraus ergeben sich für Ionen der Masse m [kg] und der Ladung z [C] die Beschleunigungen [m/s^2] a_1 und a_2 in der ersten und zweiten Stufe der Ionenquelle wie folgt:

$$a_1 = \frac{z \cdot E_1}{m} \qquad a_2 = \frac{z \cdot E_2}{m}$$

Während der Flugzeit t_1 [s] legen die Ionen die Strecke d_1 [m] vom Probenteller bis zum ersten Gitter zurück:

$$d_1 = \frac{a_1}{2} \cdot t_1^2 + v_0 \cdot t_1 + x_0$$

Wird die Starthöhe der Ionen $x_0 = 0$ angenommen, so ergibt sich mit der Beschleunigung a_1 [m/s^2] in der ersten Beschleunigungsstrecke folgender Zusammenhang für die Geschwindigkeit v_1 [m/s]:

$$v_1 = \frac{dd_1}{dt} = a_1 \cdot t_1 + v_0$$

Die Flugzeit t_1 [s] der Ionen vom Probenteller bis zum ersten Gitter ergibt sich daher zu:

$$\frac{z \cdot E_1}{m} \cdot t_1 = v_1 - v_0$$

$$\boxed{t_1 = \frac{(v_1 - v_0) \cdot m}{E_1 \cdot z}}$$

Während der Flugzeit t_2 [s] legen die Ionen die Strecke d_2 [m] vom ersten bis zum zweiten Gitter zurück:

¹²⁵Für die Ableitung von t_{ges} wird der Ladungszustand der Ionen nicht berücksichtigt, da in das

$$d_2 = \frac{a_2}{2} \cdot t_2^2 + v_1 \cdot t_2$$

Mit der Beschleunigung a_2 [m/s²] ergibt sich folgender Zusammenhang für die Geschwindigkeit v_2 [m/s]:

$$v_2 = \frac{dd_2}{dt} = a_2 \cdot t_2 + v_1$$

Die Flugzeit t_2 [s] von Ionen innerhalb der zweiten Beschleunigungsstrecke, d.h. vom ersten Gitter bis zum zweiten Gitter, ergibt sich aus:

$$\frac{z \cdot E_2}{m} \cdot t_2 = v_2 - v_1$$

$$t_2 = \frac{(v_2 - v_1) \cdot m}{E_2 \cdot z}$$

Die Flugzeit t_3 [s] durch die feldfreie Driftstrecke L [m], d.h. vom zweiten Gitter bis zum Detektor, ergibt sich aus:

$$t_3 = \frac{L}{v_2}$$

Die Gesamtflugzeit t_{ges} [s] setzt sich additiv aus den Beiträgen der Flugzeit in den drei Strecken des Flugzeitmassenspektrometers zusammen:

$$t_{ges} = t_1 + t_2 + t_3$$

$$t_{ges} = \frac{(v_1 - v_0) \cdot m}{E_1 \cdot z} + \frac{(v_2 - v_1) \cdot m}{E_2 \cdot z} + \frac{L}{v_2}$$

Wird hierbei $E_{kin0} = \frac{1}{2}mv_0^2$, $E_{kin1} = \frac{1}{2}mv_1^2$ und $E_{kin2} = \frac{1}{2}mv_2^2$ eingesetzt, gelangt man zu folgendem Ergebnis:

$$t_{ges} = \frac{\sqrt{2 \cdot m}}{z} \left[\frac{d_1}{U_1} \cdot (\sqrt{E_{kin1}} - \sqrt{E_{kin0}}) + \frac{d_2}{U_2} \cdot (\sqrt{E_{kin2}} - \sqrt{E_{kin1}}) \right] + L \sqrt{\frac{m}{2 \cdot E_{kin2}}}$$

Endergebnis für t_{ges} nur die Feldstärken innerhalb der Ionenquelle eingehen.

Hierbei ergeben sich die Beiträge der kinetischen Energien zu:

$$E_{kin1} = z \cdot U_1 - \frac{x}{d_1} \cdot z \cdot U_1 + \frac{1}{2} \cdot m \cdot v_o^2$$

$$E_{kin2} = z \cdot U_2 + z \cdot U_1 - \frac{x}{d_1} \cdot z \cdot U_1 + \frac{1}{2} \cdot m \cdot v_o^2$$

$$E_{kin0} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v_o^2$$

Die kinetische Energie $z \cdot q \cdot U_1$, die ein Ion innerhalb der ersten Beschleunigungsstrecke aufnimmt, verringert sich in Abhängigkeit von der Dauer der Verzögerungszeit und der Startgeschwindigkeit v_o um den Betrag $\frac{x}{d_1} \cdot z \cdot U$.

5.1.1.2 Lineare Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit

Im folgenden wird die Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit dargestellt. Mathematisch gesehen entspricht dies einer Reihenentwicklung der Form:

$$t_{ges}(t) \approx a + bt + ct^2 + \dots$$

Die allgemeine Flugzeitgleichung (siehe Kapitel 5.1.1.1) besitzt die Form:

$$t_{ges} = \frac{\sqrt{2 \cdot m}}{z} \left[\frac{d_1}{U_1} \cdot (\sqrt{E_{kin1}} - \sqrt{E_{kin0}}) + \frac{d_2}{U_2} \cdot (\sqrt{E_{kin2}} - \sqrt{E_{kin1}}) \right] + L \sqrt{\frac{m}{2 \cdot E_{kin2}}}$$

Sie ist zusammengesetzt aus der Flugzeit der Ionen t_1 und t_2 in den Strecken d_1 und d_2 in der Ionenquelle und der Flugzeit der Ionen in der feldfreien Driftstrecke L . Hierbei gilt für diese Beiträge der Flugzeit:

$$t_3 = L \sqrt{\frac{m}{2 \cdot E_{kin2}}}$$

$$t_1 + t_2 = \frac{\sqrt{2 \cdot m}}{z} \left[\frac{d_1}{U_1} \cdot (\sqrt{E_{kin1}} - \sqrt{E_{kin0}}) + \frac{d_2}{U_2} \cdot (\sqrt{E_{kin2}} - \sqrt{E_{kin1}}) \right]$$

Da der Beitrag von E_{kin0} wesentlich geringer ist als die kinetischen Energien, die sich aus den Beschleunigungen in den elektrischen Feldern der Ionenquelle ergeben, erfolgt die Reihenentwicklung von E_{kin2} , E_{kin1} und E_{kin0} um $v_0 = 0$:

$$E_{kin2} = E_{kin\%} + \frac{v_0}{1!} \cdot \frac{dE_{kin\%}}{dv_0} + \dots$$

$$E_{kin1} = E_{kin\%} + \frac{v_0}{1!} \cdot \frac{dE_{kin\%}}{dv_0} + \dots$$

$$E_{kin0} = E_{kin\%} + \frac{v_0}{1!} \cdot \frac{dE_{kin\%}}{dv_0} + \dots$$

Mit den Reihenentwicklungen und den partiellen Ableitungen der kinetischen Energien

$$\frac{dE_{kin2}}{dv_0} = -\frac{tU_1z}{d_1} \quad \frac{dE_{kin1}}{dv_0} = -\frac{tU_1z}{d_1} \quad \frac{dE_{kin0}}{dv_0} = mv_0$$

sowie mit $E_{kin\%} = zU_2 + zU_1$ $\frac{dE_{kin\%}}{dv_0} = -\frac{tU_1z}{d_1}$

$$E_{kin\%} = zU_1 \quad \frac{dE_{kin\%}}{dv_0} = -\frac{tU_1z}{d_1}$$

$$E_{kin\%} = 0 \quad \frac{dE_{kin\%}}{dv_0} = 0$$

führt dies zu der Näherung der kinetischen Energien E_{kin0} , E_{kin1} und E_{kin2} :

$$E_{kin2} = zU_2 + zU_1 - \frac{tU_1v_0z}{d_1}$$

$$E_{kin1} = zU_1 - \frac{tU_1v_0z}{d_1}$$

$$E_{kin0} = 0$$

Somit kann t_3 wie folgt umgeformt werden:

$$t_3 = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2}} \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{E_{kin2}}} \right) = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2}} \cdot \left(zU_2 + zU_1 - \frac{tU_1v_0z}{d_1} \right)^{-1/2}$$

$$t_3 = L \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left(1 - t \frac{(1-G)}{d_1} v_0 \right)^{-1/2}$$

Mit der Näherung aus der Reihenentwicklung $\sqrt{\frac{1}{1-x}} \approx 1 + \frac{1}{2}x$ ergibt sich

$$t_3 = L \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left(1 + t \frac{(1-G)}{2d_1} v_0 \right) = (1-G)L \cdot \frac{tv_0}{2d_1} \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}} + L \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}}$$

Die Umformung von t_1 und t_2 ergibt:

$$\begin{aligned} t_1 + t_2 &= \frac{\sqrt{2 \cdot m}}{z} \left[\frac{d_1}{U_1} \cdot (\sqrt{E_{kin1}} - \sqrt{E_{kin0}}) + \frac{d_2}{U_2} \cdot (\sqrt{E_{kin2}} - \sqrt{E_{kin1}}) \right] \\ &= \frac{\sqrt{2 \cdot m}}{z} \left[\frac{d_1}{U_1} \cdot \sqrt{zU_1 - \frac{tU_1zv_0}{d_1}} + \frac{d_2}{U_2} \cdot \sqrt{zU_2 + zU_1 - \frac{tU_1zv_0}{d_1}} - \frac{d_2}{U_2} \cdot \sqrt{zU_1 - \frac{tU_1zv_0}{d_1}} \right] \\ &= \sqrt{\frac{2 \cdot m}{z}} \left[\frac{d_1}{U_1} \cdot \sqrt{U_1 - \frac{tU_1v_0}{d_1}} + \frac{d_2}{U_2} \cdot \sqrt{U_2 + U_1 - \frac{tU_1v_0}{d_1}} - \frac{d_2}{U_2} \cdot \sqrt{U_1 - \frac{tU_1v_0}{d_1}} \right] \end{aligned}$$

Mit $G \cdot U = U_2$ und $(1-G) \cdot U = U_1$ kann diese Gleichung wie folgt umgeschrieben werden:

$$\begin{aligned} t_1 + t_2 &= \sqrt{\frac{2 \cdot m}{zU}} \left[\frac{d_1}{(1-G)\sqrt{U}} \cdot \sqrt{(1-G)U - \frac{t(1-G)Uv_0}{d_1}} + \frac{d_2}{G\sqrt{U}} \cdot \sqrt{GU + (1-G)U - \frac{t(1-G)Uv_0}{d_1}} - \frac{d_2}{G\sqrt{U}} \cdot \sqrt{(1-G)U - \frac{t(1-G)Uv_0}{d_1}} \right] \\ &= \sqrt{\frac{2 \cdot m}{zU}} \left[\frac{d_1}{1-G} \cdot \sqrt{(1-G) - \frac{t(1-G)v_0}{d_1}} + \frac{d_2}{G} \cdot \left(\sqrt{1 - \frac{t(1-G)v_0}{d_1}} - \sqrt{(1-G) - \frac{t(1-G)v_0}{d_1}} \right) \right] \\ &= \sqrt{\frac{2 \cdot m}{zU}} \cdot \left[\frac{d_1}{1-G} \cdot \sqrt{1 - \frac{tv_0}{d_1}} + \frac{d_2}{G} \cdot \left(\sqrt{1 - \frac{t(1-G)v_0}{d_1}} - \sqrt{(1-G) - \frac{t(1-G)v_0}{d_1}} \right) \right] \\ &= \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[\frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} \cdot \sqrt{1 - \frac{tv_0}{d_1}} + \frac{2d_2}{G} \cdot \sqrt{1 - \frac{t(1-G)v_0}{d_1}} - \frac{2d_2}{G} \cdot \sqrt{1 - \frac{tv_0}{d_1}} \cdot \sqrt{1-G} \right] \end{aligned}$$

Unter Anwendung der Näherungsformel $\sqrt{1-x} = 1 - \frac{1}{2}x$ für kleine Werte von x gilt für $t_1 + t_2$:

$$\begin{aligned} t_1 + t_2 &= \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[\frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} \cdot \left(1 - \frac{tv_0}{2d_1} \right) + \frac{2d_2}{G} \cdot \left(1 - \frac{t(1-G)v_0}{2d_1} \right) - \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{G} \cdot \left(1 - \frac{tv_0}{2d_1} \right) \right] \\ &= \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[\frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} \cdot \left(1 - \frac{tv_0}{2d_1} \right) + \frac{2d_2}{G} - \frac{t(1-G)v_0}{2d_1} \cdot \frac{2d_2}{G} - \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{G} - \frac{tv_0}{2d_1} \cdot \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{G} \right] \end{aligned}$$

Mit der Umformung des von d_2 abhängigen Terms durch Erweiterung mit $1 + \sqrt{1-G}$

$$\frac{2d_2}{G} - \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{G} = 2d_2 \frac{1 - (1-G)}{G + G\sqrt{1-G}} = 2d_2 \frac{1}{1 + \sqrt{1-G}}$$

und der Umformung des von der Verzögerungszeit und der Startgeschwindigkeit abhängigen Terms

$$-\left(\frac{t(1-G)v_0}{2d_1} \right) \cdot \frac{2d_2}{G} - \frac{tv_0}{2d_1} \cdot \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{G} = 2d_2 \frac{\sqrt{1-G}}{1 + \sqrt{1-G}} \frac{tv_0}{2d_1}$$

ergibt sich weiterhin:

$$t_1 + t_2 = \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[\frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2}{1+\sqrt{1-G}} - \frac{v_0}{2d_1} \frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{v_0}{2d_1} \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{1+\sqrt{1-G}} \right]$$

Somit resultiert mit $t_{ges} = t_1 + t_2 + t_3$:

$$t_{ges} = \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[\frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} - \frac{v_0}{2d_1} \frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2}{1+\sqrt{1-G}} + \frac{v_0}{2d_1} \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{1+\sqrt{1-G}} \right] + (1-G)L \cdot \frac{v_0}{2d_1} \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}} + L \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}}$$

in der Bezeichnung nach Juhasz [Juh97] wird die Gleichung für t_{ges} wie folgt vereinfacht:

$$\sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[\frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2}{1+\sqrt{1-G}} + L \right] = L_e \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}} \quad \text{mit} \quad \boxed{L_e = \frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2}{1+\sqrt{1-G}} + L}$$

und

$$\sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[(1-G)L - \frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{1+\sqrt{1-G}} \right] \frac{v_0}{2d_1} = \frac{v_0}{2d_1} \cdot h \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}} \quad \text{mit} \quad \boxed{h = (1-G)L - \frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{1+\sqrt{1-G}}}$$

Die Flugzeitgleichung kann daher wie folgt dargestellt werden:

$$t_{ges} = \sqrt{\frac{m}{2zU}} \cdot \left[h \cdot \frac{v_0}{2d_1} + L_e \right]$$

Mit der Steigung $\frac{dt_{ges}}{dt} = h \cdot \frac{v_0}{2d_1} \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}}$ ergibt sich:

$$\frac{dt_{ges}/dt}{t_{ges}} = \frac{\frac{h}{2d_1} \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}}}{\left(\frac{h}{2d_1} + \frac{L_e}{v_0} \right) \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}}} = \frac{\frac{h}{2d_1}}{\frac{h}{2d_1} + \frac{L_e}{v_0} \cdot \frac{h}{2d_1} \cdot \frac{2d_1}{h}} = \frac{1}{1 + \frac{L_e 2d_1}{v_0 h}} \approx \frac{h}{L_e 2d_1} \cdot v_0$$

Die Startgeschwindigkeit v_0 ist somit durch folgenden Ausdruck beschrieben:

$$\boxed{\frac{dt_{ges}/dt}{t_{ges}} \cdot \frac{L_e 2d_1}{h} \approx v_0}$$

Mit Hilfe dieser Gleichung kann bei Kenntnis der nur von den Geräteparametern L , d_1 , d_2 und G abhängigen Konstanten h und L_e aus der experimentellen Steigung die Startgeschwindigkeit berechnet werden.

5.1.2 Startgeschwindigkeitsbestimmung aus experimentellen Wertepaaren von Flugzeit und Verzögerungszeit

Wie im vorangegangenen Unterkapitel dargestellt, ist die Flugzeit eine in etwa lineare Funktion von t und v_0 .¹²⁶ Die Auftragung der Gesamtflugzeit t_{ges} (aus der Flächenmitte, auch Zentroid des Molekülionenpeaks im Flugzeitmassenspektrum) gegen die Verzögerungszeit (DE-Zeit) ergibt eine Gerade mit der Steigung B [ns/ns] und dem y-Achsenabschnitt A [ns]:

$$t_{ges} = A + Bt$$

Im folgenden ist eine repräsentative Darstellung aus experimentellen Wertepaaren der Flugzeit gegen die Verzögerungszeit wiedergegeben.¹²⁷

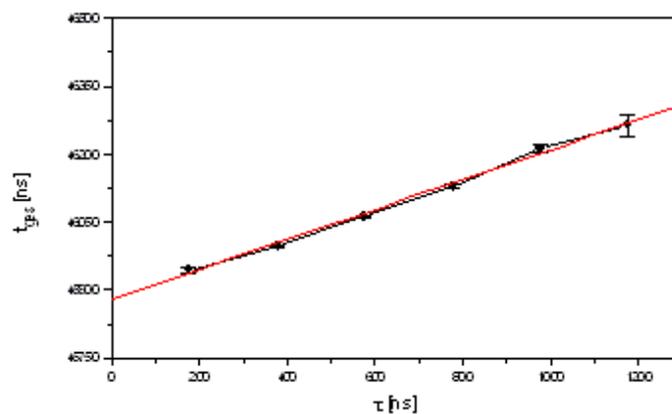


Abbildung 5-2 Flugzeit t_{ges} gegen t beobachtet für die Matrix HCCA-Amid und das Analyt [Insulin+H]⁺. Zusätzlich ist die lineare Regression der Mittelwerte aufgetragen ($G = 92\%$, $U = 25$ kV).¹²⁸

Um eine höhere statistische Signifikanz der Geschwindigkeitsbestimmung zu erreichen, werden sechs Gesamtflugzeiten¹²⁹ zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Aus der Berechnung der Mittelwerte resultieren Fehlerbalken, die jeweils in den Geradendarstellungen¹³⁰ enthalten sind.

¹²⁶ Bei der Bestimmung der Flugzeit ist zu beachten, daß die Ionen während der Verzögerungszeit nicht die erste Beschleunigungsstrecke der Ionenquelle verlassen haben, da sonst ein starkes Abweichen vom nahezu linearen Zusammenhang der Flugzeit von der Verzögerungszeit festzustellen ist.

¹²⁷ Hierbei wird die Verzögerungszeit t um jeweils 200 ns erhöht. Die maximale Verzögerungszeit ist hierbei ca. 1200 ns.

¹²⁸ Mit $d_1 = 2,43$ mm, $d_2 = 17,4$ mm und $L = 1281,5$ mm kann für das oben gegebene Beispiel des [Insulin+H]⁺-Ions aus der Matrix HCCA-Amid bei einer Steigung $dt_{ges}(exp)/dt = 0.33$ ns/ns eine initiale Geschwindigkeit von $v_0 = 495$ m/s bestimmt werden (Voyager DE PRO).

¹²⁹ Hierzu werden die Werte der Flugzeit eines Ions aus der Auswertungssoftware Grams/386 der Fa. Galactic Industries Corporation, USA (bei Voyager DE und Voyager DE PRO) entnommen.

¹³⁰ Es wird Microcal Origin in der Version 3.54 der Fa. Microcal Software, MA, USA eingesetzt.

Die am *guide wire* anliegende Spannung wurde bei Experimenten mit dem Voyager DE in der Softwareeinstellung mit 0.1 % der Gesamtspannung U_{ges} festgelegt, bei Voyager DE PRO sind bei Messungen der Startgeschwindigkeiten bis zu 0.3 % der Gesamtspannung U_{ges} eingestellt worden. Bei diesen Spannungen ist auch bei hohen Verzögerungszeiten immer noch ein ausreichendes Ionensignal detektierbar.

Wird die Steigung $\frac{dt_{ges}(\text{exp})}{dt} \approx B$ und der y-Achsenabschnitt $t_{ges}(\text{exp}, t = 0) \approx A$ der

linearen Regression der experimentellen Wertepaare von Flug- und Verzögerungszeit t_{ges} und t bestimmt, so läßt sich daraus in zwei unterschiedlichen Ansätzen die Startgeschwindigkeit bestimmen, die in den folgenden Kapiteln 5.1.2.1 und 5.1.2.2 vorgestellt werden. Kapitel 5.1.2.3 bringt einen Vergleich der experimentellen Ergebnisse dieser beiden Methoden.

5.1.2.1 Bestimmung von v_0 mit einer Näherungsformel

Mit Kenntnis der Parameter des Flugzeitmassenspektrometers L , d_1 , d_2 and G (und damit der berechneten Größen h und L_e) kann unter Verwendung der experimentell bestimmten

Flugzeit $t_{ges}(\text{exp}; t = 0) \approx A$ und der experimentellen Steigung $\frac{dt_{ges}(\text{exp})}{dt}$ die initiale

Geschwindigkeit aus dem folgenden einfachen Zusammenhang direkt berechnet werden¹³¹ [Juh97] (siehe hierzu Kapitel 5.1.1.2):

$$\frac{B}{A} \approx \frac{\frac{dt_{ges}(\text{exp})}{dt}}{t_{ges}(\text{exp}; t = 0)} \approx \frac{h}{L_e 2d_1} \cdot v_0$$

Die Masse m bzw. Ladung z des Analytens¹³² oder die Spannung U_{ges} werden in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigt, stattdessen wird die experimentelle Flugzeit bei der Verzögerungszeit $t = 0$ ns eingesetzt.¹³³

¹³¹ Wird in die Formel $B/A \approx bv_0$ eingesetzt (mit h [m], L_e [m] und b [1/m] [Juh97]), erhält man mit der Steigung B [ns/ns] und dem y-Achsenabschnitt A [ns] die Einheit 1 m/ns für v_0 . Man muß das Ergebnis daher noch mit dem Faktor 10^9 multiplizieren, um v_0 [m/s] zu erhalten.

¹³² Die Ladung des Ions wird hier mit z [C] als Vielfaches der Elementarladung angegeben.

¹³³ Das m/z -Verhältnis eines Ions wird hierbei nicht eingesetzt. Es wird somit bereits im mathematischen Ansatz nicht zwischen einfachgeladenen und mehrfachgeladenen Ionen bei gleichem m/z -Verhältnis unterschieden.

Hierbei ist:

$$h = (1-G)L - \frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2\sqrt{1-G}}{1+\sqrt{1-G}} \quad \text{und} \quad L_e = \frac{2d_1}{\sqrt{1-G}} + \frac{2d_2}{1+\sqrt{1-G}} + L$$

Mit $b = \frac{h}{L_e 2d_1}$ vereinfacht sich obenstehendes Ergebnis zu:

$$\frac{B}{A} \cdot \frac{1}{b} \approx v_0$$

In folgender Tabelle sind einige Werte für die Größen L_e [m] und h [m] und b [1/m] für verschiedene G [%] zusammengestellt.

Tabelle 5-1 Werte von L_e [m], h [m] und b [1/m] für verschiedene G [%] am Beispiel des Voyager DE Massenspektrometers

| G [%] | h [m] | L_e [m] | b [1/m] |
|---------|---------|-----------|-----------|
| 70 | 0,3989 | 1,3461 | 67,3006 |
| 75 | 0,3317 | 1,3475 | 55,8923 |
| 80 | 0,2640 | 1,3494 | 44,4280 |
| 85 | 0,1957 | 1,3520 | 32,8657 |
| 89 | 0,1401 | 1,3550 | 23,4797 |
| 95 | 0,0524 | 1,3637 | 8,7328 |

Wie man aus den Werten in Tabelle 5-1 erkennen kann, ist die Größe L_e im wesentlichen von der feldfreien Driftlänge $L = 1,315$ m abhängig.

Die Größe h [m] wird weiterhin von $(1-G) \cdot L$ bestimmt, im Fall von $G = 70$ % ist h [m] somit etwa $h \approx 0,3 \cdot L = 0,3945$.

5.1.2.2 Bestimmung von v_0 durch numerische Anpassung

Eine Anpassung der Steigung von t_{ges} gegen t in einer numerischen Anpassung¹³⁴ erlaubt ebenso die Bestimmung der initialen Geschwindigkeit. Hierzu ist die Kenntnis der Parameter

L , d_1 , d_2 , G , U_{ges} und der Steigung $\frac{dt_{ges}(exp)}{dt}$ notwendig. Im Gegensatz zur Methode

der Näherung (siehe Kapitel 5.1.2.1) ist die Kenntnis der Flugzeit des Ions $t_{ges}(exp; t = 0)$ bei der Verzögerungszeit $t = 0$ s nicht notwendig, da die bekannte Ionenmasse und die Ionenladung in die Simulation eingesetzt werden [Glü99]. Dies ist insbesondere bei Einsatz eines modifizierten Probenhalters von Bedeutung (siehe Kapitel 7.3).

¹³⁴ Verschiedene Programme (Borland, Turbo-Pascal 7.0) zur Berechnung siehe Kapitel 10.2.

Im folgenden sind einige Beispielwerte für die numerische Anpassung tabellarisch zusammengestellt.

Tabelle 5-2 Beispiel: Numerische Anpassung der Steigungen von t_{ges} gegen t für [Insulin+H]⁺ ($U = 25$ kV, $G = 92\%$, Voyager DE PRO)

| Experimentelle Steigung t_{ges} gegen t [ns/ns] | Initiale Geschwindigkeit v_0 [m/s] |
|---|--------------------------------------|
| 0,2 | 301 |
| 0,3 | 450 |
| 0,4 | 598 |
| 0,5 | 746 |
| 0,6 | 893 |

Wie man aus den obenstehenden Werten erkennen kann, resultiert im Fall der Geräteparameter des Voyager DE PRO im Fall des [Insulin+H]⁺-Ions ein Unterschied in der Steigung von 0,1 ns/ns in einer Veränderung der initialen Geschwindigkeit um etwa 100 m/s.

5.1.2.3 Vergleich der numerischen Anpassung mit der Näherungsformel

In folgender Tabelle werden die experimentellen Daten für die Variation der Gesamtspannung U_{ges} [kV] bei konstantem $G = 89\%$ mit den Daten aus der numerischen Anpassung (siehe Kapitel 5.1.2.2) und den Ergebnissen der Näherungsformel (siehe Kapitel 5.1.2.1) verglichen. Hierbei bilden experimentelle Ergebnisse die Grundlage, die am Voyager DE gewonnen wurden.

Tabelle 5-3 Ergebnisse der Startgeschwindigkeit aus der numerischen Anpassung im Vergleich mit v_0 aus der Näherungsformel bei Variation von U_{ges} (Voyager DE, $G = 89\%$, Matrix Ferulasäure, [Insulin+H]⁺)

| Experimentelle Werte | | | Numerische Anpassung ¹³⁵ | Näherungsformel | Abweichung in v_0 |
|----------------------|-------------|----------|-------------------------------------|-----------------|---------------------|
| U [kV] | B [ns/ns] | A [ns] | v_0 [m/s] | v_0 [m/s] | [%] |
| 25 | 0,41092 | 46960 | 369 | 373 | 1,1 |
| 24 | 0,53761 | 47904 | 470 | 478 | 1,7 |
| 23 | 0,55324 | 48928 | 474 | 482 | 1,7 |
| 22 | 0,68425 | 49971 | 570 | 583 | 2,2 |
| 21 | 0,65634 | 51148 | 535 | 547 | 2,2 |
| 20 | 0,62947 | 52404 | 502 | 512 | 2,0 |
| 19 | 0,53116 | 53793 | 414 | 421 | 1,7 |
| 18 | 0,59969 | 55225 | 455 | 463 | 1,7 |
| 17 | 0,63227 | 56838 | 465 | 474 | 1,9 |
| 16 | 0,77275 | 58522 | 550 | 562 | 2,1 |
| 15 | 0,66593 | 60459 | 461 | 469 | 1,7 |
| 14 | 0,63114 | 62579 | 423 | 430 | 1,6 |
| 13 | 0,9412 | 64817 | 602 | 618 | 2,6 |
| 12 | 0,88141 | 67504 | 544 | 556 | 2,2 |
| 11 | 0,84724 | 70510 | 501 | 512 | 2,1 |
| 10 | 0,93386 | 73932 | 526 | 538 | 2,2 |

Wie man aus den Daten in Tabelle 5-3 erkennen kann, sind die Abweichungen der Startgeschwindigkeiten, die anhand der beiden unterschiedlichen Ansätze ermittelt wurden, relativ gering. Die Abweichungen liegen bei maximal 2,2 %.

In folgender Tabelle 5-4 werden die experimentell bestimmten Werte für den y-Achsenabschnitt der Funktion t_{ges} gegen t mit den Ergebnissen der numerischen Anpassung verglichen. Die experimentellen Flugzeiten A [ns] für den Fall der prompten Extraktion können hierbei, unter Berücksichtigung der minimalen instrumentellen Verzögerungszeit $t_d = 200$ ns, mit wenigen Promille Abweichung berechnet werden. Die Größe von A [ns] spielt für die Bestimmung von v_0 jedoch im Fall der numerischen Anpassung keine Rolle, da nur die Steigung B [ns/ns] als experimentelle Größe eingesetzt wird.

¹³⁵ Die Werte für A [ns] sind hierbei unter Berücksichtigung der minimalen instrumentellen Verzögerungszeit $t_d = 200$ ns (siehe hierzu Kapitel 4.1) berechnet.

Tabelle 5-4 Vergleich der experimentell bestimmten Werte für A [ns] im Vergleich zur numerischen Anpassung (Voyager DE, $G = 89\%$, Matrix Ferulasäure, [Insulin+H]⁺)

| Experimentelle Werte | | | Numerische Anpassung ¹³⁵ | | Abweichung in A |
|----------------------|-------------|--------------|-------------------------------------|--------------|-------------------|
| U [kV] | B [ns/ns] | A [ns] | B [ns/ns] | A [ns] | [%] |
| 25 | 0,41092 | 46960 | 0,4110 | 46894 | 1,41 |
| 24 | 0,53761 | 47904 | 0,5377 | 47849 | 1,15 |
| 23 | 0,55324 | 48928 | 0,5533 | 48873 | 1,12 |
| 22 | 0,68425 | 49971 | 0,6843 | 49957 | 0,28 |
| 21 | 0,65634 | 51148 | 0,6564 | 51130 | 0,35 |
| 20 | 0,62947 | 52404 | 0,6295 | 52390 | 0,27 |
| 19 | 0,53116 | 53793 | 0,5312 | 53753 | 0,74 |
| 18 | 0,59969 | 55225 | 0,5997 | 55215 | 0,18 |
| 17 | 0,63227 | 56838 | 0,6323 | 56808 | 0,53 |
| 16 | 0,77275 | 58522 | 0,7728 | 58538 | -0,27 |
| 15 | 0,66593 | 60459 | 0,6660 | 60460 | -0,02 |
| 14 | 0,63114 | 62579 | 0,6312 | 62579 | 0 |
| 13 | 0,9412 | 64817 | 0,9412 | 64902 | -1,31 |
| 12 | 0,88141 | 67504 | 0,8815 | 67550 | -0,68 |
| 11 | 0,84724 | 70510 | 0,8472 | 70549 | -0,55 |
| 10 | 0,93386 | 73932 | 0,9339 | 73972 | -0,54 |

In folgender Tabelle 5-5 werden die experimentellen Daten für die Variation des Verhältnisses G [%] bei konstantem $U_{ges} = 25$ kV mit den Daten aus der numerischen Anpassung und den Ergebnissen der Näherung verglichen.

Tabelle 5-5 Ergebnisse für v_0 aus der Näherung im Vergleich zu experimentellen Daten und Ergebnissen aus der numerischen Anpassung (bei Variation des Verhältnisses G) (Voyager DE, $U_{ges} = 25$ kV, Matrix DHB, [Insulin+H]⁺)

| Experimentelle Werte | | | Numerische Anpassung ¹³⁵ | | | Näherungsformel | Abweichung in v_0 |
|----------------------|-----------|--------|-------------------------------------|-----------|--------|-----------------|---------------------|
| G [%] | B [ns/ns] | A [ns] | v_0 [m/s] | B [ns/ns] | A [ns] | v_0 [m/s] | [%] |
| 70 | 2,11493 | 46688 | 623 | 2,1150 | 46687 | 673 | 8,0 |
| 75 | 1,79515 | 46656 | 644 | 1,7952 | 46635 | 688 | 6,8 |
| 80 | 1,31563 | 46698 | 604 | 1,3157 | 46699 | 634 | 5,0 |
| 85 | 0,90497 | 46809 | 569 | 0,9050 | 46785 | 588 | 3,3 |
| 89 | 0,60048 | 46909 | 542 | 0,6005 | 46882 | 545 | 0,6 |
| 95 | 0,20819 | 47213 | 509 | 0,2082 | 47157 | 505 | -0,8 |

Bei Werten von $G > 89$ % ist der Unterschied der Startgeschwindigkeit in Näherung und numerischer Anpassung kleiner als 1%. Bei einer Gesamtspannung von $U_{ges} = 25$ kV und einem Verhältnis $G = 89$ % sind die Unterschiede der Startgeschwindigkeiten aus Näherungsmethode oder Simulationsansatz vernachlässigbar.¹³⁶

Die Bestimmung der Startgeschwindigkeit von Ionen mittels der Näherungsformel ist im Fall einer modifizierten Ionenquelle nicht möglich (siehe Kapitel 7.3), da die Flugzeit bei der Verzögerungszeit $t = 0$ ns (Fall der prompten Extraktion) in die Näherungsformel einzusetzen ist (siehe Kapitel 5.1.2.1), und die Ionen zu diesem Zeitpunkt noch nicht die erste Beschleunigungsstrecke des Massenspektrometers erreicht haben.

5.1.3 Initiale Geschwindigkeit: Vergleich der Massenspektrometer Voyager RP DE und DE PRO

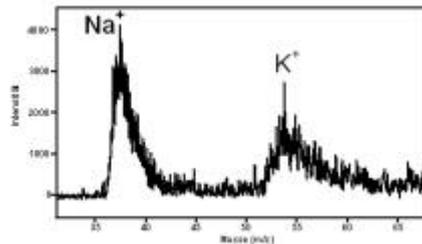
Um zu überprüfen, ob eine unerwartete, auf systematische Fehler hinweisende Beeinflussung der Meßwerte der initialen Geschwindigkeit durch die Spannung U_{ges} oder das Verhältnis G besteht, wurde die Abhängigkeit der Gesamtflugzeit¹³⁷ des Ions [Insulin+H]⁺ von der Verzögerungszeit bei verschiedenen Werten von U_{ges} und G bestimmt.

Da Ionen mit kleinem m/z -Verhältnis von Feldinhomogenitäten innerhalb der Ionenquelle stark beeinflusst werden, kann durch die Überprüfung der linearen Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit (z.B. für Alkalimetallkationen) bestimmt werden, ob während der Verzögerungszeit ein nahezu feldfreier Raum innerhalb der Ionenquelle vorliegt. Daher wurde für verschiedene Ionen, wie Na⁺ und K⁺, der Effekt von Feldern während der Verzögerungszeit untersucht.

¹³⁶ Für das Massenspektrometer Voyager DE PRO sind bei $G = 92$ % und $U_{ges} = 25$ kV die Unterschiede der Startgeschwindigkeiten der beiden Ansätze ebenfalls vernachlässigbar.

¹³⁷ Innerhalb einer Messung ist die Gesamtflugzeit eines Ions, abgesehen von geringen Schwankungen, in etwa konstant. Zur Genauigkeit der internen bzw. externen Kalibrierung mit Voyager Massenspektrometern siehe [Per96].

In folgenden Abbildungen ist ein MALDI-Spektrum der Alkalimetallkationen Na^+ und K^+ aus der Matrix DHB gezeigt. Auch bei hohen Verzögerungszeiten (bis zu $t = 1200$ ns) kann ein Signal der Kationen detektiert werden.



**Abbildung 5-3 Massenspektren von K^+ , Na^+ aus der Matrix DHB bei $t = 1200$ ns
($G = 94,5\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)**

In folgenden Tabellen sind Ergebnisse der Startgeschwindigkeit der Alkalimetallkationen Na^+ und K^+ aus verschiedenen Matrices (MALDI) oder bei direkter Laserdesorption/Ionisation ohne Matrix (LDI) zusammengestellt. Im Fall der MALDI-Untersuchungen sind die Geschwindigkeiten aus Matrix-/Analytgemischen¹³⁸ ermittelt worden, um zu üblicherweise für Peptide und Proteine eingesetzten Präparationsbedingungen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

¹³⁸ Hierfür wurde der Analyt Insulin eingesetzt.

Tabelle 5-6 Startgeschwindigkeiten der Alkaliionen Na^+ und K^+ bei verschiedenen Desorptionsbedingungen (Vergleich LDI und MALDI)
($U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE PRO)

| G [%] | Ion | Desorptionsbedingungen | Zahl der Einzelmessungen | v_0 [m/s] | s [m/s] |
|-------|---------------|------------------------|--------------------------|-------------|-----------|
| 92 | Na^+ | LDI | 4 | 39 | 34 |
| 94 | K^+ | LDI | 1 | 31 | - |
| 92 | Na^+ | MALDI (Matrix DHB) | 4 | 630 | 52 |

Tabelle 5-7 Startgeschwindigkeiten der Alkaliionen Na^+ und K^+ bei verschiedenen Desorptionsbedingungen (Vergleich LDI und MALDI)
($U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE)

| G [%] | Ion | Desorptionsbedingungen | Zahl der Einzelmessungen | v_0 [m/s] | s [m/s] |
|-------|---------------|----------------------------|--------------------------|-------------|-----------|
| 89 | K^+ | LDI | 3 | 3 | 5 |
| 89 | Na^+ | LDI | 7 | 29 | 27 |
| 86 | K^+ | MALDI (Matrix Ferulasäure) | 1 | 475 | - |
| 86 | Na^+ | MALDI (Matrix Ferulasäure) | 1 | 345 | - |
| 89 | K^+ | MALDI (Matrix HCCA) | 2 | 484 | 59 |
| 89 | Na^+ | MALDI (Matrix HCCA) | 1 | 456 | - |
| 89 | K^+ | MALDI (DHB) | 4 | 531 | 115 |

Bei LDI und hohen Werten für G ($G > 85\%$, vergleichbar zu den Ergebnissen für das Voyager DE Massenspektrometer) können auch für das Voyager DE PRO Startgeschwindigkeiten für Na^+ und K^+ nahe Null festgestellt werden.

Die Werte für v_0 der Alkalimetallionen (siehe Tabelle 5-6) weisen auf einen ebenso guten Feldabgleich bei dem Gerät Voyager DE PRO wie bei dem Massenspektrometer Voyager DE hin. Bei beiden Massenspektrometern ist nur ein geringer Effekt eines initialen Restfeldes während der Verzögerungszeit feststellbar. Die Werte der Startgeschwindigkeit des Ions Na^+ aus der Matrix (am Voyager DE PRO bei $G = 92\%$ und am Voyager DE bei $G = 89\%$) sind gegenüber dem Wert für das Ion $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ nur geringfügig erhöht. Während für Na^+ und K^+ etwa die matrixspezifischen initialen Geschwindigkeiten für den MALDI-Fall bestimmt werden können, zeigen die Ergebnisse für den LDI-Fall wesentlich geringere experimentelle Werte von $v_0 \approx 0 \text{ m/s}$ [Glü99]. Dies beweist, daß auch bei höheren Verzögerungszeiten der Felddurchgriff der zweiten Beschleunigungsstrecke in den feldfreien Raum der ersten Strecke vernachlässigt werden kann.¹³⁹ Bereits bei einer geringen Feldstärke innerhalb der

¹³⁹ Bei $G = 95\%$ wird für K^+ aus der Matrix HCCA eine leicht erhöhte Startgeschwindigkeit von $v_0 = 661 \text{ m/s}$ detektiert, was auf einen besseren Feldabgleich bei $G = 89\%$ mit einem $v_0 = 456 \text{ m/s}$ (Voyager DE) hinweist. Jedoch ist der Unterschied in der kinetischen Energie (ca. 0.05 eV) für Ionen größerer Masse (wie z.B. $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$) vernachlässigbar.

ersten Beschleunigungsstrecke wäre eine stark veränderte Startgeschwindigkeit der Analyte mit niedrigem m/z -Verhältnis zu Analytsubstanzen mit hohem m/z -Verhältnis nachweisbar. Läge ein Feld während der Verzögerungszeit an, wäre außerdem ein starkes Abweichen vom linearen Verhalten der Abhängigkeit von t_{ges} vs. t festzustellen.¹⁴⁰

Für beide Massenspektrometer konnte für das Ion $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ keine meßbare experimentelle Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit von G oder U_{ges} gefunden werden. Die Einstellungen $G = 92\%$ und $U_{ges} = 25\text{ kV}$ wurden für die weiteren Messungen am Voyager DE PRO ausgewählt, da bei $U_{ges} = 25\text{ kV}$ eine bessere Auflösung als bei geringeren Gesamtspannungen und bei $G = 92\%$ die besten Ergebnisse für Alkalimetallionen zu erzielen waren. Am Voyager DE wurden die Messungen der Startgeschwindigkeit bei $U_{ges} = 25\text{ kV}$ und $G = 89\%$ durchgeführt (siehe hierzu auch [Glü97]).

Die Werte für die Startgeschwindigkeit v_0 des Ions $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ aus DHB (*dried droplet*-Präparation) am Voyager DE PRO ergaben $v_0 = 564 \pm 62\text{ m/s}$. Dieses Resultat weicht von dem am Voyager DE bestimmten Mittelwert von $v_0 = 543 \pm 40\text{ m/s}$ nur 21 m/s ab.

Insgesamt sind vergleichbare Ergebnisse mit beiden Massenspektrometern bestimmt worden, wie die experimentellen Daten in folgender Tabelle belegen.

Tabelle 5-8 Vergleich Voyager DE PRO und Voyager DE: Startgeschwindigkeiten von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25\text{ kV}$, $l = 337\text{ nm}$, Voyager DE PRO)

| Matrix | Ergebnisse Voyager DE PRO | | | Ergebnisse Voyager DE | | |
|----------------------------|---------------------------|-----------|------------------------|-----------------------|-----------|------------------------|
| | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
| DHB | 564 | 62 | 14 | 543 | 40 | 15 |
| Ferulasäure ¹⁴¹ | 399 | 56 | 5 | 410 | 28 | 13 |

¹⁴⁰ Die Ergebnisse von Juhasz zeigen hingegen für Ionen geringer Masse etwas erhöhte Geschwindigkeiten [Juh97], was eventuell auf ein leicht beschleunigendes Feld innerhalb der Verzögerungszeit in seinem Massenspektrometer hindeutet.

¹⁴¹ Bei Ferulasäure als Matrix treten häufig Multimere bis $n = 5$ des Analyten M mit der allgemeinen Formel $[\text{M}_n+\text{H}]^+$ auf, hierbei zeigen alle Multimere die gleiche initiale Geschwindigkeit wie das $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion.

5.2 Meßergebnisse der Startgeschwindigkeit

In diesem Kapitel werden Ergebnisse der Messungen der Startgeschwindigkeit verschiedener Biomolekülionen vorgestellt. Die Bestimmung der Startgeschwindigkeit erfolgte mittels einer numerischen Anpassung (siehe Kapitel 5.1). Die Messungen sind am Voyager DE sowie Voyager DE PRO-Massenspektrometer durchgeführt worden.

Untersucht wird im folgenden Kapitel der Einfluß verschiedener experimenteller Parameter wie der eingestrahlten Laserwellenlänge auf die Startgeschwindigkeit von Peptid- und Proteinionen (siehe Kapitel 5.2.1). Hierbei wird bei verschiedenen Präparationsbedingungen, Matrizes und Analyten die Abhängigkeit der initialen Geschwindigkeit von Analytionen bestimmt. In Kapitel 5.2.2 werden Ergebnisse der Startgeschwindigkeit verschiedener Kohlenhydrate sowie in Kapitel 5.2.3 von Matrixionen gegeben.

In diesem Kapitel werden zunächst die wesentlichen Meßergebnisse der Startgeschwindigkeiten, die im Rahmen dieser Arbeit sowie der Diplomarbeit [Glü97] am Voyager DE Massenspektrometer gewonnen wurden, zusammengefaßt [Glü98], [Glü98b], [Glü98c], [Glü98d], [Glü98e], [Glü99b]. Da für spätere Messungen das Voyager DE-Massenspektrometer nicht mehr zur Verfügung stand, sind Messungen zu dieser Arbeit ebenfalls am Voyager DE PRO durchgeführt worden. Im Kapitel 5.1.3 sind bereits Ergebnisse der Startgeschwindigkeit verglichen worden, die mit den Massenspektrometern Voyager DE sowie Voyager DE PRO bestimmt wurden.

5.2.1 Vergleich der Messungen der Startgeschwindigkeit verschiedener Peptid- und Proteinionen

In den Kapiteln 5.2.1.1 und 5.2.1.3 werden verschiedene Ergebnisse zur Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit von der Masse und der Ionenpolarität sowie vom Ladungszustand der Analytionen vorgestellt, in Kapitel 5.2.1.2 werden Untersuchungen zur Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit vom Desorptionort bei DHB/*dried droplet*-Präparationen gezeigt. In Kapitel 5.2.1.4 werden die Ergebnisse für Startgeschwindigkeiten von Ionen aus Gemischen von Matrizes mit unterschiedlichen Zusätzen vorgestellt. Hierbei werden zum Beispiel Monosacchariden oder Bernsteinsäure als Zusätze zur Matrix DHB untersucht. In Kapitel 5.2.1.5 werden Ergebnisse zur Verteilung der axialen Startgeschwindigkeit von Insulin aus der Matrix DHB gegeben und mit einer einfachen Simulation verglichen.

5.2.1.1 Massenabhängigkeit und Ionenpolarität: Vergleich der Messungen der Startgeschwindigkeit verschiedener einfachgeladener Ionen

Für das Ion $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei den Wellenlängen von $I = 337 \text{ nm}$ aus verschiedenen Matrices (mit und ohne Additive) konnten folgende Startgeschwindigkeiten bestimmt werden, die in Tabelle 5-9 aufgelistet sind.

Tabelle 5-9 Startgeschwindigkeiten bei Experimenten mit einer Wellenlänge von $I = 337 \text{ nm}$ ($U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, Voyager DE ($G = 89 \%$) und Voyager DE PRO ($G = 92 \%$))

| Matrix + evtl. Zusatz (Lösungsmittel) | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|--|-------------|-----------|---------------------------|
| 3-HPA (Ethanol, Wasser) | 620 | 87 | 6 |
| 3-HPA (Methanol, Wasser) | 522 | 25 | 4 |
| 3-HPA (Wasser) | 444 | 62 | 11 |
| 3-HPA (Wasser) + DAHC | 370 | 20 | 5 |
| 6-Aza-2-thiothymin (ATT) | 315 | 29 | 6 |
| DHAP | 353 | 56 | 10 |
| DHAP + DAHC | 268 | 11 | 6 |
| DHB | 543 | 40 | 15 |
| DHB + Bernsteinsäure | 475 | 170 | 8 |
| DHBs | 565 | 15 | 5 |
| Ferulasäure | 410 | 28 | 13 |
| HABA | 273 | 27 | 6 |
| HCCA | 291 | 51 | 18 |
| HCCA-Amid | 382 | 39 | 4 |
| HMBA | 384 | 54 | 5 |
| SA | 493 | 39 | 5 |
| SA/Bernsteinsäure | 490 | 68 | 4 |
| SINA | 332 | 29 | 7 |
| THAP | 306 | 32 | 13 |
| THAP + DAHC | 201 | 19 | 6 |

Die Startgeschwindigkeit wird, wie deutlich erkennbar ist, von der Matrix beeinflusst. Durch den Zusatz Diammoniumhydrogencitrat (DAHC) verringert sich bei allen untersuchten Matrices die Startgeschwindigkeit von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$.

Als ein Zusatz zu DHB wird 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure eingesetzt. Eine Mischung von 90% DHB mit 10% HMBA (mit DHBs abgekürzt: "super DHB") zeigt im Gegensatz zu reiner DHB ein verbessertes Verhältnis aus dem Analytsignal zum Rauschen sowie eine höhere Startgeschwindigkeit. Aus der Matrix DHBs kann eine Startgeschwindigkeit der Analytionen von $v_0 = 565 \pm 15 \text{ m/s}$ detektiert werden.

Mit reiner Salicylsäure (SA) ist aufgrund der schnellen Sublimation eine Messung nur während der Dauer weniger Minuten möglich. SA mit dem Zusatz Bernsteinsäure hingegen erlaubt bei einem Druck innerhalb der Ionenquelle von ca. 10^{-5} Pa eine Meßdauer von etwa zwei Stunden, danach ist die Salicylsäure verdampft. Insgesamt kann eine hohe Auflösung (Voyager DE PRO, FWHM ca. 15000) für Insulin im Reflektor mit Salicylsäure als Matrix mit dem Additiv Bernsteinsäure erzielt werden.

In der folgenden Tabelle sind die durchschnittlichen Startgeschwindigkeiten bei einer Laserwellenlänge von $\lambda = 266$ nm aufgeführt.

Tabelle 5-10 Startgeschwindigkeiten bei Experimenten mit einer Wellenlänge von $\lambda = 266$ nm ($G = 89$ %, $U_{ges} = 25$ kV, Voyager DE [Glü97])

| Matrix (Lösungsmittel) | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-----------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| 2-Thiohydantoin | 390 | 55 | 7 |
| 3-HPA (Wasser) | 485 | - | 1 |
| 4-Hydroxybenzoesäure, 4-HBA | 452 | 32 | 3 |
| Ferulasäure | 372 | 41 | 8 |
| HCCA | 289 | 13 | 5 |
| SINA | 307 | 37 | 6 |

Bei allen Matrices fällt der Unterschied in der Startgeschwindigkeit bei $\lambda = 337$ nm und $\lambda = 266$ nm Wellenlänge für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ sehr gering aus.¹⁴² Das Fehlen von Messungen für DHB bei $\lambda = 266$ nm ist darauf zurückzuführen, daß mit dieser Matrix bei dieser Wellenlänge im Vergleich zu $\lambda = 337$ nm Spektren geringer Qualität registriert werden können.

Eine Erhöhung der Laserbestrahlung vergrößert die Breite des Ionensignals von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$. Die Verbreiterung ist insbesondere auf der Peakseite zu höheren Zeiten hin erkennbar, während die Flanke zu niedrigeren Flugzeiten hin geringer davon betroffen ist. Da die Bestimmung der Startgeschwindigkeit aus dem Zentroid des Peaks erfolgt, kann bei stark erhöhter Bestrahlung auch eine höhere Startgeschwindigkeit bestimmt werden. Bei typischen Bestrahlungen nahe der Schwellbestrahlung ist jedoch keine Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit von diesem Parameter erkennbar.

Untersucht wurde weiterhin die Auswirkung der Variation der Startgeschwindigkeit von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen präparierten Proben. 3-HPA zeigt in der Präparation aus Wasser eine große Streuung der Startgeschwindigkeiten von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$, was auf eine inhomogene Präparation zurückzuführen ist. Aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen werden unterschiedliche Startgeschwindigkeit von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei dieser Matrix detektiert (siehe Tabelle 5-9).¹⁴³

¹⁴² Für die Matrix HCCA kam Juhasz ebenfalls zu diesem Ergebnis [Juh97].

¹⁴³ Orte hoher Ionensignalintensität werden häufig mit *sweet spots* bezeichnet.

In folgender Abbildung 5-4 sind die Ergebnisse für Insulin den Ergebnissen für Melittin, für die Insulin B-Kette sowie für Carboanhydrase gegenübergestellt (zu den absoluten Werten der Startgeschwindigkeit siehe Tabelle 5-11). Hierbei kann überprüft werden, ob eine Abhängigkeit der Meßwerte der initialen Geschwindigkeit von der Masse oder von der Ionenpolarität der untersuchten Peptid- oder Proteinionen besteht.

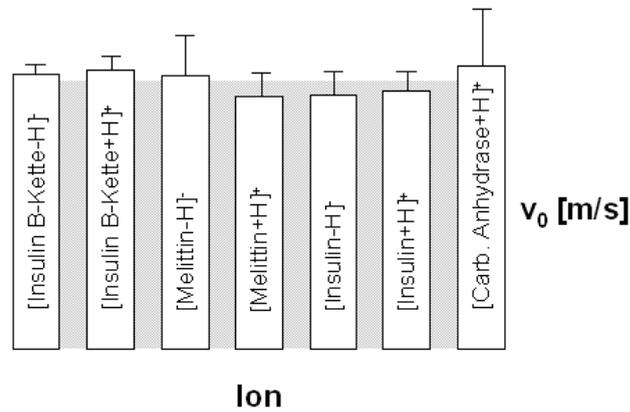


Abbildung 5-4 Messungen der Startgeschwindigkeit verschiedener Ionen aus der Matrix DHB (*dried droplet*-Präparation). Hierbei ist die durchschnittliche Startgeschwindigkeit aller Ionen grau unterlegt ($G = 89\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

Für alle Peptid- oder Proteinionen verschiedenster Masse kann aus einer Matrix eine vergleichbare Startgeschwindigkeit festgestellt werden. So wird für das Ion [Carboanhydrase+H]⁺ mit einer Masse, die ca. fünfmal größer ist als die von Insulin, ebenfalls eine Startgeschwindigkeit von ca. 550 m/s aus der Matrix DHB bestimmt.

In folgender Tabelle 5-11 sind Startgeschwindigkeiten für verschiedene Biomolekülionen im positiven und negativen Ionenmodus aus verschiedenen Matrices zusammengestellt.

Tabelle 5-11 Startgeschwindigkeiten verschiedener Ionen
 ($U_{ges} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE)

| Matrix | Ion | G [%] | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------|----------------------------------|-------|-------------|-----------|------------------------|
| ATT | [Insulin-H] ⁻ | 89 | 322 | 40 | 6 |
| ATT | [Insulin+H] ⁺ | 89 | 315 | 29 | 6 |
| DHB | [Insulin B-Kette-H] ⁻ | 89 | 577 | 20 | 6 |
| DHB | [Insulin B-Kette+H] ⁺ | 89 | 586 | 31 | 6 |
| DHB | [Melittin-H] ⁻ | 89 | 574 | 89 | 5 |
| DHB | [Melittin+H] ⁺ | 92 | 530 | 52 | 8 |
| DHB | [Insulin-H] ⁻ | 89 | 535 | 48 | 8 |
| DHB | [Insulin+H] ⁺ | 89 | 543 | 40 | 15 |
| DHB | [Carboanhydrase+H] ⁺ | 94 | 599 | 119 | 8 |
| Ferulasäure | [Insulin-H] ⁻ | 89 | 350 | 46 | 5 |
| Ferulasäure | [Insulin+H] ⁺ | 89 | 410 | 28 | 13 |
| Ferulasäure | [Melittin-H] ⁻ | 89 | 346 | 72 | 6 |

Bei der Untersuchung der Startgeschwindigkeiten von Biomolekülionen im positiven und negativen Ionenmodus kann experimentell keine Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit vom Ladungszustand der untersuchten Ionen festgestellt werden.

5.2.1.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit vom Desorptionort bei DHB/*dried droplet*-Präparationen

Bei DHB in der *dried droplet*-Präparation entsteht ein grobkristalliner Rand, von dem protonierte Protein- oder Peptidionen mit hoher Signalintensität nachgewiesen werden können.¹⁴⁴ In Abbildung 5-5 ist eine typische DHB-Matrix-Präparation gezeigt, die am Rand und vom Rand ausgehend deutlich eine grobkristalline Struktur aufweist.

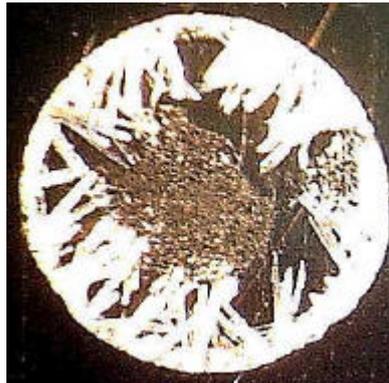


Abbildung 5-5 DHB-Matrixpräparation: Vom Rand der Präparation ausgehend sind deutlich grobkristalline Bereiche erkennbar

Um protonierte Moleküle aus dem Innern detektieren zu können, wird der Analyt in wässriger Lösung auf eine DHB/*dried droplet*-Präparation gegeben und rasch im kalten Luftstrom eingetrocknet. Es ergibt sich eine Art Oberflächenpräparation. Folgende Startgeschwindigkeiten des Ions $[\text{Melittin}+\text{H}]^+$ aus der Matrix DHB konnten bestimmt werden:

Tabelle 5-12 Startgeschwindigkeiten von $[\text{Melittin}+\text{H}]^+$ aus der Matrix DHB in Abhängigkeit vom Desorptionort einer *dried droplet*-Präparation ($G = 89\%$, $U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE)

| Desorptionort | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|---------------|-------------|-----------|------------------------|
| Rand | 530 | 52 | 5 |
| Innen | 433 | 25 | 7 |

Vom Innern, dem mikrokristallinen Bereich der Präparation, wird im Gegensatz zur hohen Startgeschwindigkeit am grobkristallinen Rand eine geringere Startgeschwindigkeit der Analytionen bestimmt. Neben der Matrixabhängigkeit kann somit auch eine Abhängigkeit von der Art der Kristallisation in der Probe detektiert werden (siehe hierzu auch Kapitel 5.2.1.1).

¹⁴⁴ Zur Kristallisation der Matrix DHB bei der *dried droplet*-Präparation siehe [Kar93b].

5.2.1.3 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit vom Ladungszustand

Neben der Überprüfung, inwiefern die Startgeschwindigkeit von der Polarität der Ionen abhängt (siehe Kapitel 5.2.1.1), ist weiterhin untersucht worden, ob die Werte der Startgeschwindigkeit vom Ladungszustand der Peptide oder Proteine abhängig sind. In Tabelle 5-13 sind die experimentell ermittelten Werte der Startgeschwindigkeit für das $[\text{Insulin}+2\text{H}]^{2+}$ -Ion aus verschiedenen Matrices im Vergleich zu den Startgeschwindigkeiten des einfachgeladenen Ions (siehe Tabelle 5-13) zusammengestellt.

Tabelle 5-13 Messungen für $[\text{Insulin}+2\text{H}]^{2+}$ im Vergleich zu Messungen von v_0 für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE

| Matrix | Ion | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------|-----------------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| DHB | $[\text{Insulin}+2\text{H}]^{2+}$ | 565 | - | 1 |
| DHB | $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ | 543 | 40 | 15 |
| Ferulasäure | $[\text{Insulin}+2\text{H}]^{2+}$ | 446 | 112 | 5 |
| Ferulasäure | $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ | 410 | 28 | 13 |
| HCCA | $[\text{Insulin}+2\text{H}]^{2+}$ | 251 | 75 | 5 |
| HCCA | $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ | 291 | 51 | 18 |

Insgesamt ist die Startgeschwindigkeit von Peptiden und Proteinen unabhängig vom Ladungszustand. Alle untersuchten Peptide und Proteine, wie Insulin, Melittin, Insulin B-Kette als positiv-, negativ-, einfach- und zweifachgeladene Ionen, zeigen im Rahmen der experimentellen Fehler die gleiche Startgeschwindigkeit aus einer Matrix [Glü99b].

5.2.1.4 Messung von v_0 bei Zusatz verschiedener Additive zur Matrix DHB

Die Matrix DHB zeichnet sich durch eine hohe Toleranz gegenüber Verunreinigungen wie Salzen und Puffern aus [Str91], [Kar93], [Yao98]. Sowohl die Matrix DHB als auch die Matrix HCCA zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Präparation und hohe Nachweisempfindlichkeit der massenspektrometrischen Analyse von Peptiden und Proteinen und haben sich daher in der Praxis als Standardmatrixsubstanzen durchgesetzt. Ein geringer Fragmentierungsgrad labiler Biomoleküle konnte bei Zusatz von Zuckern wie Fucose oder Fructose zu DHB [Kös92], [Bil93], [Cas93] bzw. von Zuckern zu DHB und Ferulasäure [Gus95] sowie 5-Methoxysalicylsäure zu DHB [Bil93] beobachtet werden. Zum Beispiel wurden Zuckerezsätze zu DHB bei der erfolgreichen Kopplung von MALDI an ein Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer genutzt [Cas92], [Cas93], wo ein geringer Fragmentierungsgrad der Analytionen aufgrund der im Verhältnis zur Flugzeitmassenspektrometrie langen Dauer zwischen Ionenerzeugung und Ionennachweis von großer Bedeutung ist.

Der Zusatz von Additiven zu Matrices ist eine allgemein übliche Strategie, um die Ergebnisse in der MALDI-Massenspektrometrie zu verbessern. Einerseits werden Additive zur Verbesserung der Probenhomogenität [Bil93], andererseits zur Aufreinigung und damit zur

Verminderung von unerwünschten Addukten [Pie93] eingesetzt. Weiterhin werden Zusätze benutzt, um das Kristallgitter einer Matrix zu verändern, was eventuell eine schonendere Desorption labiler Biomoleküle erlaubt [Kar93], [Bah97]. Der Effekt von Zusätzen zu einer Matrix auf die Startgeschwindigkeit von Analytationen ist nicht voraussagbar. Der Zusatz von DAHC resultiert z.B. in einer Reduzierung von v_0 bei allen Matrices [Glü99b]. Im Fall des Zusatzes Bernsteinsäure zu DHB kann im Gegensatz hierzu am grobkristallinen Rand der Probe im Verhältnis zum mikrokristallinen Innern eine stark erhöhte Startgeschwindigkeit gemessen werden.

In folgender Tabelle 5-14 sind die experimentell bestimmten Startgeschwindigkeiten für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei Zusatz verschiedener Zucker zur Matrix DHB zusammengefaßt.

Tabelle 5-14 Startgeschwindigkeiten von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei Zusatz verschiedener Zucker zur Matrix DHB ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE)

| Matrixzusatz zur Matrix DHB | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-----------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| L(-)-Fucose | 495 | 57 | 5 |
| D(+)-Glucose | 522 | 41 | 5 |
| D(+)-Allose | 525 | 111 | 6 |
| D(+)-Talose | 633 | 62 | 5 |
| D(-)-Ribose | 639 | 62 | 5 |
| D(+)-Xylose | 641 | 118 | 5 |
| D(-)-Fructose | 659 | 49 | 5 |

Bei allen Zuckern, die untersucht worden sind, zeigt sich eine Verringerung der Signalintensitäten der Addukte von Na^+ und K^+ in den Spektren, was sich insgesamt positiv auf die Auflösung auswirkt.¹⁴⁵ Weiterhin sind durch Zusatz von verschiedenen Zuckern zur Matrix DHB verschiedene Ergebnisse zu erzielen, die in Folge kurz beschrieben werden.

Bei Zusatz von L(-)-Fucose zu DHB ist eine Aufnahme von Spektren hauptsächlich nur im inneren, feinkristallinen Bereich der Präparation möglich. Die Stabilität des Ionensignals („Schuß zu Schuß“-Stabilität) bei Anwendung dieser Präparation ist relativ gering. Weiterhin wird bei Anwendung dieser feinkristallinen Präparation aus DHB/L(-)-Fucose eine Startgeschwindigkeit der Analytationen detektiert, die mit dem v_0 aus dem Innern einer DHB/*dried droplet*-Präparation vergleichbar ist (siehe Kapitel 5.2.1.2).

Der Zusatz von D(+)-Glucose zu DHB ergibt Spektren in ähnlicher Qualität wie reine DHB. Auch ist die hier gefundene Startgeschwindigkeit der Analytationen vergleichbar mit der aus einer reinen Matrix DHB in einer *dried droplet*-Präparation.

Insgesamt ist bei der Präparation mit D(+)-Allose weniger Laserenergie (Laser 1840) als bei reiner DHB (Laser 1960) notwendig. Bei der Präparation mit D(+)-Allose werden

¹⁴⁵ Ein anderer Präparationsansatz zur Verringerung der Ionenintensität von Addukten mit Alkali-metallkationen besteht darin, Schichten aus Octadecyl Mercaptan (c18) bei SINA als Matrix [Bro97] einzusetzen. Weiterhin finden Kronenether [Orl92] zum Entsalzen Verwendung.

Summenspektren im feinkristallinen Bereich aufgenommen. Weiterhin gibt es bei einigen Präparationen auch Stellen mit hoher "Schuß zu Schuß"-Stabilität, die eine höhere Startgeschwindigkeit für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ zeigen.

D(+)-Talose als Additiv zur Präparation von Insulin/DHB ergibt ausgeprägte große DHB-Nadeln. Die notwendige Laserenergie an der Schwellbestrahlung ist mit der der reinen DHB vergleichbar. In folgenden Abbildungen wird ein Spektrum der Carboanhydrase aus der Matrix DHBs (siehe Abbildung 5-6) mit dem Spektrum des gleichen Ions aus der Matrix DHB bei Zusatz von D(+)-Talose (siehe Abbildung 5-7) verglichen.

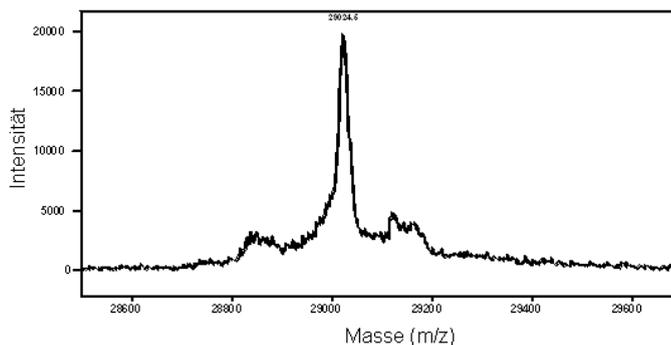


Abbildung 5-6 Carboanhydrase, Matrix DHBs

Summe über 25 Spektren, FWHM 30 Da

($G = 94,38\%$, $U_{ges} = 25\text{ kV}$, $t = 1000\text{ ns}$, $l = 337\text{ nm}$, Voyager DE, Laser 2020)

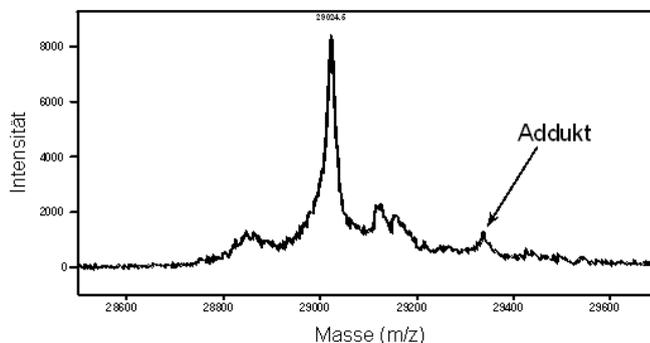


Abbildung 5-7 Carboanhydrase, Matrix DHB mit Zusatz D-Talose

Summe über 67 Spektren, FWHM 24 Da

($G = 94,4\%$, $U_{ges} = 25\text{ kV}$, $t = 1000\text{ ns}$, $l = 337\text{ nm}$, Voyager DE, Laser 2420)

D(+)-Talose bildet im Massenspektrum ein zusätzliches Addukt, was sich bei Untersuchung von Ionen hoher Masse negativ auswirkt. Die Auflösung für z.B. Carboanhydrase ist jedoch vergleichbar zu DHBs (siehe Abbildung 5-6 und Abbildung 5-7), wobei die Startgeschwindigkeit der Analytionen höher liegt als im Fall des Zusatzes HMBA.

D(-)-Ribose als Additiv zur Präparation von Insulin/DHB ergibt lange, schmale DHB-Nadeln. Im Innern der DHB-Präparation (transparente Schicht) ist bei Zusatz von D-Ribose kein Signal von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ zu finden. Insgesamt verschlechtert der Zusatz von D-Ribose im

Vergleich zu reiner DHB die Spektrenqualität. Im Gegensatz zur L(-)-Fucose ist ein Signal von Matrix und Analyt fast nur am grobkristallinen Rand der Präparation zu finden.

D(+)-Xylose als Zusatz zur DHB-Präparation ergibt flache, lange, ineinander übergehende DHB-Nadeln. In den Spektren ist die Wasserabspaltung des $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ deutlich zu erkennen. Bei der Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit des $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ konnten ausgeprägte, ortsabhängige Geschwindigkeitsunterschiede zwischen Rand und Innerem festgestellt werden. Im Innern konnte z.B. in einer Messung ein $v_0 = 327 \text{ m/s}$ bestimmt werden. Die Meßergebnisse für D(+)-Xylose aus Tabelle 5-14 sind vom Rand der Präparation aufgenommen worden. Insgesamt bietet der Zusatz von D(+)-Xylose keine Vorteile gegenüber der reinen DHB-Präparation.

Mit D(-)-Fructose als Matrixzusatz zu DHB kann für Spektren von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ eine erhöhte Laserleistung¹⁴⁶ eingesetzt werden, ohne daß damit eine Verringerung der Auflösung zu einhergeht. Auch die Bestrahlungsschwelle ist bei Zusatz von D(-)-Fructose zu DHB erhöht. Weiterhin konnte eine erhöhte Auflösung der Spektren von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ gefunden werden. Bei Zusatz von D(-)-Fructose zu DHB ist eine stärkere Abhängigkeit der Ionenintensitäten vom bestrahlten Probenort als bei reiner DHB festzustellen. Der Matrixzusatz D-Fructose zur Matrix DHB ist allerdings positiv, wenn eine hohe Stabilität des Ionensignals notwendig ist.

5.2.1.5 Verteilung der axialen Startgeschwindigkeit für Insulin

In diesem Kapitel wird die Breite der Verteilung der initialen Geschwindigkeit untersucht, deren Kenntnis neben der mittleren Startgeschwindigkeit von Interesse ist (siehe Kapitel 2.6). Aus der Mittellage, d.h. dem Zentroid des Signals, wird der Wert für die Flugzeit von Ionen gewonnen. Aus dieser Größe kann durch Untersuchung mehrerer Flugzeiten bei verschiedenen Verzögerungszeiten mittels der "DE-Methode" (siehe Kapitel 2.6.2.3) die mittlere Startgeschwindigkeit der Ionen bestimmt werden. Neben der Mittellage des Ionensignals sind jedoch Auflösung und Form der Ionensignale von Bedeutung, die von der Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit mitbestimmt werden.¹⁴⁷

Die Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit ist prinzipiell im Ionensignal des Flugzeitspektrums enthalten. Aufgrund anderer Effekte, wie der Kollisionen von Ionen und Teilchen, der räumlichen Verteilung der Ionen zum Zeitpunkt der Ionenextraktion aus der Ionenquelle, dem Einfluß von Ionenoptik und Ionenfokussierungsbedingungen kann die Verteilung der Startgeschwindigkeit jedoch nicht direkt aus der Form des Ionensignals bestimmt werden. Somit kann die Form und Breite des Ionensignals nur zu einer qualitativen Abschätzung der Verteilung der Startgeschwindigkeit herangezogen werden [Gle98].

Neben der Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit wird die Form eines Ionensignals insbesondere vom Isotopenmuster bestimmt. Da die Form des Isotopenmusters bekannt ist, kann, ausgehend von bekannten Geräteparametern unter Benutzung der Flugzeitgleichung, für jede Masse (siehe Tabelle 5-15) der Isotopenverteilung des Ions $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ mit der Formel $C_{254} H_{378} N_{65} O_{75} S_6$ die Flugzeit berechnet werden.

¹⁴⁶ Die gleiche Beobachtung wird auch von Castoro [Cas93] beschrieben.

¹⁴⁷ Die Form der Ionensignale ist z.B. von Colby [Col96] ausgewertet worden.

Tabelle 5-15 Isotopenmuster von [Insulin+H]⁺ berechnet mit IsoPro Version 2.1, Isotopic Abundance Simulator, Tallahassee, FL, USA

| Masse | Breite | Intensität | Multiplizität |
|------------|-----------|------------|---------------|
| 5730.60811 | 0.0276416 | 0.00000 | 1 |
| 5731.61105 | 0.0883025 | 0.00909 | 5 |
| 5732.61329 | 0.1521030 | 0.01822 | 16 |
| 5733.61536 | 0.1854543 | 0.02469 | 33 |
| 5734.61719 | 0.1782478 | 0.03012 | 58 |
| 5735.61889 | 0.1429770 | 0.03635 | 83 |
| 5736.62043 | 0.0991362 | 0.04092 | 109 |
| 5737.62193 | 0.0607963 | 0.04477 | 126 |
| 5738.62335 | 0.0334906 | 0.04630 | 130 |
| 5739.62478 | 0.0167768 | 0.05087 | 134 |
| 5740.62619 | 0.0076612 | 0.05112 | 121 |
| 5741.62734 | 0.0031249 | 0.04810 | 94 |
| 5742.62880 | 0.0011462 | 0.04199 | 64 |
| 5743.62932 | 0.0003243 | 0.03656 | 29 |
| 5744.63128 | 0.0000731 | 0.02185 | 11 |

In folgender Abbildung ist ein simuliertes Spektrum des Ions [Insulin+H]⁺ bei einer theoretischen Auflösung von m/Dm 12000 (FWHM) gezeigt. Hierbei ist deutlich das Isotopenmuster des Ions zu erkennen, wobei eine Isotopenauflösung mit $Dm < 1$ Da bzw. $R = m/Dm > m/(1 \text{ Da})$ erreicht wird.

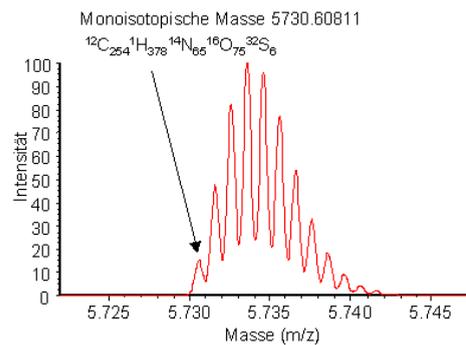


Abbildung 5-8 Simuliertes Massenspektrum des Ions [Insulin+H]⁺ bei einer theoretischen Auflösung von m/Dm 12000 (FWHM)¹⁴⁸

In folgender Abbildung ist ebenfalls ein theoretisches Spektrum des Ions [Insulin+H]⁺ bei einer Auflösung von m/Dm 1000 (FWHM) dargestellt. Die durchschnittliche Masse des Ions ist hierbei gekennzeichnet.

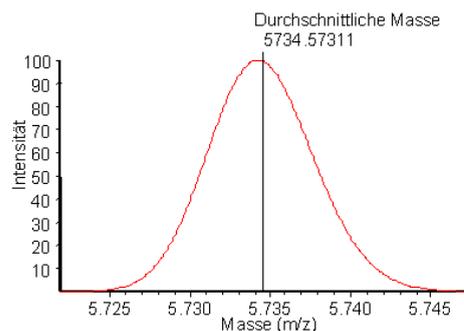


Abbildung 5-9 Simuliertes Massenspektrum des Ions [Insulin+H]⁺ bei einer theoretischen Auflösung von m/Dm 1000 (FWHM)¹⁴⁸

Aus niedrig aufgelösten Massenspektren (wenn $Dm > 1$ Da bzw. die Auflösung $R = m/Dm < m/(1 \text{ Da})$ wird) kann eine Aussage über die Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit gewonnen werden, da die Verteilung der axialen Komponente der Startgeschwindigkeit direkt die Auflösung (siehe Kapitel 3.2.6) beeinflusst.

Es wird eine Gaußverteilung der Startgeschwindigkeit von 250 m/s bis 750 m/s angenommen.¹⁴⁹ Die Intensitäten, die sich zu den jeweiligen Flugzeiten eines Ions ergeben, werden aus den Beiträgen der Isotopenverteilung sowie den Beiträgen für die

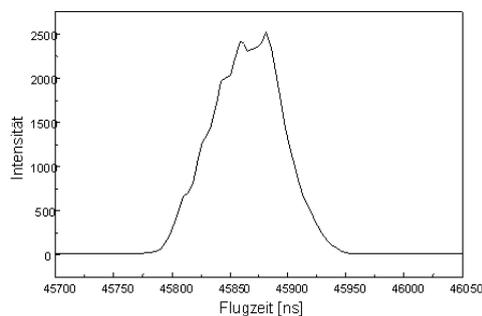
¹⁴⁸ Programm IsoPro Version 2.1, Isotopic Abundance Simulator, Tallahassee, FL, USA.

¹⁴⁹ Üblicherweise wird die Maxwell-Boltzmann Geschwindigkeitsverteilung benutzt, um die Verteilung der Geschwindigkeit bzw. die Flugzeitprofile anzupassen [Dan99], [Ens91], allerdings kann die Form des Ionensignals ebenso mittels einer Gaußverteilung der Startgeschwindigkeit angepaßt werden. Zur Analyse von theoretischen Ionensignalen bei Annahme verschiedener v_0 -Verteilungsfunktionen siehe [Gle99].

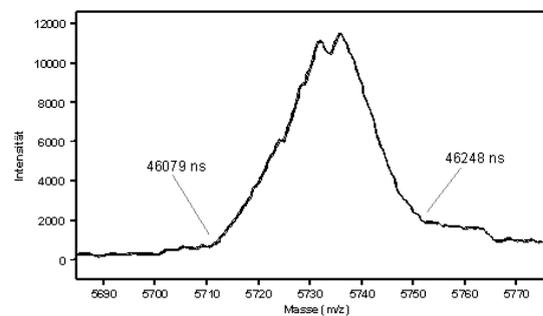
Startgeschwindigkeitsverteilung durch einfache Multiplikation berechnet. Hierbei werden zusätzlich die Beiträge verschiedener Ionen addiert, wobei die Gesamtintensität für jeweils zwei Nanosekunden Flugzeit zu einem Intensitätswert zusammengefaßt wird. Weiterhin werden für das Ion $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ von der Flugzeit 45000 ns bis 47000 ns genau 1000 Kanäle, d.h. 1000 Intensitäten, simuliert, die ein theoretisches Flugzeitspektrum ergeben.

Für das Ion $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ ergibt sich bei einer gaußförmigen v_0 -Verteilung von 250 bis 750 m/s sowie bei $U_{ges} = 25$ kV, $G = 92\%$ und den Geräteparametern des Voyager DE PRO folgende simulierte Form des Ionensignals (bei einer Verzögerungszeit von $t = 600$ ns).

Abbildung 5-10 Vergleich der simulierten und experimentell bestimmten Form des Ionensignals für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei $t = 600$ ns, $U_{ges} = 25$ kV, $G = 92\%$, $l = 337$ nm, Voyager DE PRO



Simulierte Form des Ionensignals



Typisches Ionensignal¹⁵⁰ für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$

Hierbei kann eine zur simulierten Form des Ionensignals vergleichbare Struktur des experimentell beobachteten Ionensignals gefunden werden. In Abbildung 5-10 ist das Ionensignal für das Ion $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei einer Verzögerungszeit von $t = 600$ ns sowie der Gesamtspannung $U_{ges} = 25$ kV und dem Verhältnis $G = 92\%$ dargestellt. Die Auflösung des beobachteten Ionensignals liegt jedoch unterhalb der theoretisch zu erwartenden Auflösung.

Die simulierten Formen der Ionensignale sind, ausgehend von einer Gaußverteilung der Startgeschwindigkeit, jedoch relativ unsymmetrisch. Aufgrund der verzögerten Extraktion sind im Ionensignal zu niedriger Masse hin im Bezug auf die Startgeschwindigkeit schnellere Ionen enthalten, da Ionen mit höherer initialer Geschwindigkeit in der Ionenquelle weniger kinetische Energie aufnehmen als Ionen mit geringerer initialer Geschwindigkeit.

Ähnlich wie bei den Ergebnissen für $G = 92\%$ kann auch für andere Werte von G und U_{ges} eine Simulation durchgeführt werden. In folgender Abbildung werden die experimentellen Werte der Auflösung für das Ion $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ aus der Matrix DHB mit den Ergebnissen der Auflösung der simulierten Ionensignale bei einer gaußförmigen Verteilung der Startgeschwindigkeit von 250-750 m/s verglichen.

¹⁵⁰ Mit der GRAMS/386 Software der Fa. Galactic Industries ist die Darstellung einer Flugzeitachse nicht möglich. Der hier gewählte Massenausschnitt entspricht jedoch dem in der Simulation gewählten Ausschnitt.

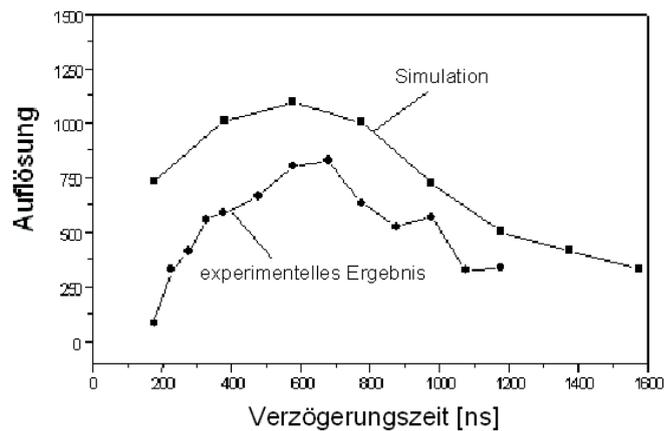


Abbildung 5-11 Auflösung der simulierten Ionensignale ■ für das Ion [Insulin+H]⁺, $t = 0$ ns, $U_{ges} = 25$ kV, $G = 95\%$ $v_0 = 250$ bis 750 m/s, im Vergleich zur experimentellen Auflösung ● (Voyager DE PRO)

Die Lage des Maximums der Auflösung wird dabei richtig wiedergegeben, so wie es aus der berechneten Auflösung (unter Bedingungen des Geschwindigkeitsfokus erster Ordnung) zu erwarten wäre. Die Höhe der theoretischen Auflösung liegt jedoch über der der simulierten Auflösung. Obwohl die Simulation neben der Verteilung der Startgeschwindigkeit weder Stöße oder Zerfälle der Ionen berücksichtigt, ist dennoch eine übereinstimmende Lage der maximalen Auflösung bei ca. $t = 600$ ns und einem $U_{ges} = 25$ kV, $G = 95\%$ zu erkennen.

Der Vergleich der experimentellen Auflösung mit der berechneten macht jedoch deutlich, daß die Verteilung der initialen Energie nicht der einzige Faktor ist, der die Auflösung beeinflusst. Effekte, die zur Verminderung der Auflösung neben der Breite der Startgeschwindigkeitsverteilung beitragen, sind z.B. Ionenzerfälle innerhalb der feldfreien Driftstrecke [Spe91], [Spe97], [Wu94].

Wird die Laserbestrahlung (über Variation der softwaregesteuerten Abschwächung) erhöht, kann zum Beispiel aufgrund von Stößen innerhalb der dichten Teilchenwolke eine Verbreiterung der Ionensignale insbesondere zu höheren Flugzeiten hin festgestellt werden.

Wird die Form des Ionensignals für verschiedene Werte der Verzögerungszeit berechnet, so kann die in Abbildung 5-12 dargestellte Abhängigkeit der Gesamtflugzeit t_{ges} von der Verzögerungszeit t bestimmt werden.

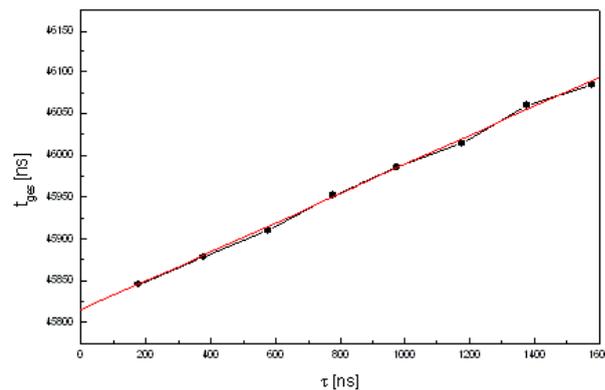


Abbildung 5-12 Simulierte Abhängigkeit t_{ges} gegen t der simulierten Formen des Ionensignals für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ bei $U_{ges} = 25$ kV, $G = 95\%$ (Geräteparameter des Voyager DE PRO)

Für diese Gerade kann mittels der "DE-Methode" ein $v_0 = 516$ m/s berechnet werden. Zwischen der Annahme einer v_0 -Verteilung mit Maximum von $v_0 = 500$ m/s und der simulierten Geraden¹⁵¹ (siehe Abbildung 5-12) ergibt sich trotz teilweise unsymmetrischer Form der Ionensignale keine wesentliche Differenz. Die Simulation zeigt, daß die mittlere Geschwindigkeit der Verteilung in etwa mit der initialen Geschwindigkeit aus der "DE-Methode" korreliert.

5.2.2 Ergebnisse der Messungen von v_0 verschiedener Zucker

Peptide und Proteine zeigen analytunabhängige, aber matrixabhängige Startgeschwindigkeiten (siehe Kapitel 5.2). Für andere Analytklassen können jedoch andere Geschwindigkeiten aus einer Matrix detektiert werden. Alle Oligosaccharide, deren Startgeschwindigkeiten aus verschiedenen Matrices bestimmt wurden, zeigen wesentlich niedrigere Werte der Startgeschwindigkeit [Glü99c]. Im Gegensatz zu Peptiden und Proteinen werden Zucker aus dem polykristallinen Inneren der DHB-Präparation untersucht. Hier ist eine höhere Sensitivität zu erzielen [Pfe98], [Pfe99]. Allerdings ist die Auflösung m/Dm im Vergleich zu Peptiden/Proteinen gleicher Masse verringert. Weiterhin wird ein erhöhter Grad an metastabiler Fragmentierung festgestellt.

5.2.2.1 Untersuchungen zu v_0 bei einer CMBT/DHB-Präparation

Neben DHB werden 5-Chlor-2-mercaptobenzothiazol (CMBT) oder 2-Mercapto-benzothiazol [Xu97], 1-Hydroxyisochinolin [Moh95], 3-Aminochinolin [3-AQ] [Met94], [Sta94] und deren Mischungen als Matrices für neutrale Oligosaccharide eingesetzt. Verschiedene andere Matrices finden in der Praxis zur Analyse von Glycopeptiden und sauren Oligosacchariden Verwendung.¹⁵²

¹⁵¹ Bei der Simulation wird eine gaußförmige v_0 -Verteilung von 250 m/s bis 750 m/s mit einem Maximum bei $v_0 = 500$ m/s angenommen.

¹⁵² Hierbei wird HCCA für kleine Glycopeptide [Bea92], 3-Amino-chinolin für Polysaccharide [Met94], 3-Amino-chinolin (3-AQ) in Methanol mit HCCA zu einer viskosen, flüssigen Matrix zur Analyse von Oligosacchariden [Kol96], [Kol97] eingesetzt. Bei der massenspektrometrischen Analyse von sauren oder neutralen Oligosacchariden findet ATT oder THAP Verwendung [Pap96].

Bei MALDI wird z.B. die Matrix CMBT in einer Präparation mit DHB zur Untersuchung von neutralen Oligosacchariden benutzt [Pfe98], [Pfe99]. Bei dieser Präparation ist festzustellen, daß nur kleine Kristalle der Matrix DHB auftreten und im Innern der Präparation eine homogene Schicht aus Matrix und Analyt zu finden ist [Pfe99]. Die CMBT/DHB Präparation eignet sich besser als die *dried droplet*-Präparation mit reiner DHB zur MALDI-Untersuchung von Oligosacchariden. Diese Präparation bietet für Zucker gleichwertige Spektren hoher Qualität.

Diese Präparation erlaubt durch ihre mikrokristalline Oberfläche eine effektive Kationisierung neutraler Oligosaccharide, die im wesentlichen als $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ detektiert werden. Für Proteine bietet die CMBT/DHB-Präparation jedoch keine Vorteile (siehe hierzu Einschub in Kapitel 5.2.2.2). Für stark fragmentierende Zucker ist sie jedoch von großem Vorteil. In den Kapiteln 5.2.2.3 bis 5.2.2.5 werden Ergebnisse zur Messung der Startgeschwindigkeit verschiedener Oligosaccharide aus dem Matrixgemisch DHB/CMBT im Vergleich zu verschiedenen DHB-Präparationen (siehe Kapitel 4.2.3) vorgestellt.

5.2.2.2 Einschub: Präparation von Insulin/DHB auf CMBT-Unterlage

Die Präparation von Insulin/DHB auf einer CMBT-Unterlage¹⁵³ bietet gegenüber der Präparation mit reiner DHB keine Auflösungsvorteile.¹⁵⁴ Jedoch ist für Insulin (wie auch bei allen Zuckern) eine geringere Laserenergie (Laser 1360) im Vergleich zur reinen DHB notwendig. Folgende Startgeschwindigkeiten für $[\text{Insulin}+H]^+$ konnten bestimmt werden:

**Tabelle 5-16 Startgeschwindigkeiten von $[\text{Insulin}+H]^+$
($G = 92\%$, $U_{ges} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE PRO)**

| Matrix/Matrixzusatz | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|---------------------|-------------|-----------|------------------------|
| DHB/CMBT | 328 | 20 | 5 |

Die Meßergebnisse der Startgeschwindigkeiten für $[\text{Insulin}+H]^+$ aus dieser Matrixpräparation sind eher mit der Startgeschwindigkeit des gleichen Ions bei HCCA (Oberflächenpräparation, $v_0 = 291 \text{ m/s}$) als mit dem v_0 bei reiner DHB ($v_0 = 543 \text{ m/s}$) vergleichbar.

5.2.2.3 Ergebnisse zur Chitotetraose

Chitotetraose ist aus vier N-Acetyl-Glucosamineinheiten (DP_4) aufgebaut. Bei der DHB/CMBT-Präparation ist, ebenso wie bei anderen Analyten, eine wesentlich geringere Laserenergie (Laser 1330) im Vergleich zur Präparation mit reiner DHB (Laser 2090) notwendig.

Chitotetraose, die aufgrund einer N-Acetyl-Gruppe protoniert werden kann, bietet die Möglichkeit der Untersuchung sowohl kationisierter als auch protonierter Ionen. Folgende Abbildung 5-13 zeigt ein typisches Spektrum des Analyts Chitotetraose aus einer

¹⁵³ Zur Präparation siehe Kapitel 5.2.2.1.

¹⁵⁴ Die maximale Auflösung (FWHM) lag bei m/Dm 1438 (linear, $G = 94,5\%$, $U_{ges} = 25 \text{ kV}$)

DHB/CMBT-Präparation. Deutlich erkennbar ist neben den Signalen der Ionen $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ auch das $[M+H]^+$ sowie das Fragmentation $[M-H_2O+H]^+$.

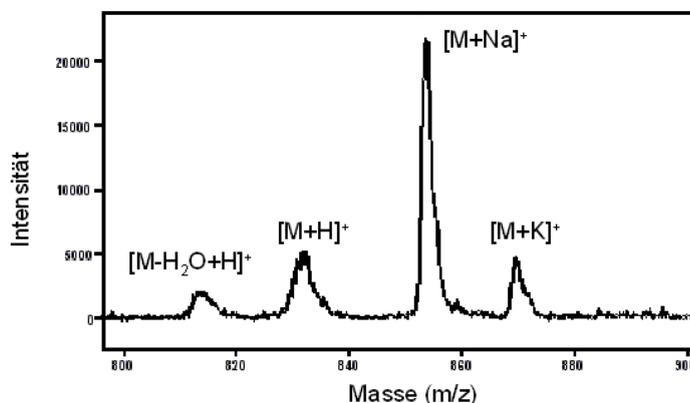


Abbildung 5-13 Spektrum der Chitotetraose mit verzögerter Extraktion bei einer CMBT/DHB-Präparation ($t = 200$ ns, $G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

In Tabelle 5-17 sind Startgeschwindigkeiten für verschiedene Ionen der Chitotetraose aus der Matrix DHB/CMBT oder einer mikrokristallinen DHB-Präparation zusammengefaßt.

Tabelle 5-17 Startgeschwindigkeiten verschiedener Ionen der Chitotetraose ($G = 94\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

| Matrix | Analytion | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|----------------------|------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| DHB (feinkristallin) | $[Chitotetraose+H]^+$ | 185 | 75 | 5 |
| DHB (feinkristallin) | $[Chitotetraose+Na]^+$ | 201 | 50 | 5 |
| DHB (feinkristallin) | $[Chitotetraose+K]^+$ | 204 | 43 | 5 |
| DHB/CMBT | $[Chitotetraose+Na]^+$ | 19 | 16 | 5 |

Die CMBT/DHB-Präparation zeigt eine wesentlich geringere Startgeschwindigkeit von $v_0 \approx 0$ m/s von Chitotetraose $[M+Na]^+$ als die Präparation aus reiner DHB ($v_0 \approx 200$ m/s). Bei der Untersuchung der Startgeschwindigkeiten aus der Matrix DHB wird die gleiche Geschwindigkeit für die Ionen des Typs $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oder $[M+K]^+$ (mit $v_0 \approx 200$ m/s) bestimmt.

Untersucht wurde weiterhin die Startgeschwindigkeit von Chitotetraose bei einer DHB/*dried droplet*-Präparation (Präparation wie für Peptide und Proteine). Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 5-18 zusammengefaßt.

Tabelle 5-18 Mittlere Startgeschwindigkeiten von [Chitotetraose + Na]⁺ bei Präparation aus der Matrix DHB ($U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE ($G = 89$ %) und Voyager DE PRO ($G = 92$ %))

| Ort | v_0 [m/s] | s [m/s] | G [%] | Anzahl der Experimente |
|--------------------------------------|-------------|-----------|---------|------------------------|
| <i>dried droplet</i> /Rand | 458 | 92 | 92 | 5 |
| <i>dried droplet</i> /Innen | 377 | 74 | 92 | 3 |
| Standardpräparation (feinkristallin) | 374 | 101 | 89 | 9 |

Bei der Untersuchung der Startgeschwindigkeiten an *dried droplet*-Präparationen mit der Matrix DHB und [Chitotetraose+Na]⁺ kann im feinkristallinen Bereich im Zentrum ein anderes v_0 als am grobkristallinen Rand des eingetrockneten Matrix-Analyttropfens experimentell bestimmt werden. Spektren hoher Signalintensität des kationisierten Zuckers können im mikrokristallinen Bereich der DHB aufgenommen werden.

Bei einer feinkristallinen Standardpräparation (siehe Kapitel 4.2.3) ergibt sich eine niedrigere Startgeschwindigkeit aller Ionen der Chitotetraose als für [Insulin+H]⁺. Im Vergleich zu Peptiden und Proteinen zeigt sich auch für diesen Zucker ein Einfluß der Präparation bzw. des Präparationsprotokolls auf die Startgeschwindigkeit [Glü99b]. So können verschiedene Startgeschwindigkeiten für eine feinkristalline DHB-Präparation im Vergleich zu einer grobkristallinen *dried droplet*-DHB-Präparation gewonnen werden.

5.2.2.3.1 Signalintensitäten verschiedener Ionen im Spektrum von Chitotetraose aus der Matrix DHB

Im Fall des Moleküls Chitotetraose wird sowohl im Randbereich als auch im feinkristallinen Inneren der DHB-Präparation bei erhöhten Verzögerungszeiten eine relativ geringere Intensität der Ionen [M-H₂O+H]⁺ sowie [M+H]⁺ gefunden (siehe Abbildung 5-13). Es ist daher untersucht worden, inwiefern bei Anwendung einer feinkristallinen Standardpräparation (siehe Kapitel 4.2.3) von Chitotetraose/NaCl aus DHB eine Abhängigkeit der Ionenintensitäten vom Desorptionsort, von der Verzögerungszeit oder von der Laserenergie besteht.

In der folgenden Abbildung ist die Intensität der Ionen [M-H₂O+H]⁺ sowie [M+H]⁺ bezogen auf die Signalintensität des Ions [M+Na]⁺ für Verzögerungszeiten von $t = 200$ ns bis $t = 1200$ ns aufgetragen.¹⁵⁵ Hierzu sind jeweils sechs Spektren bezüglich der relativen Signalintensitäten (*counts*) der Ionen ausgewertet worden. Die Signalintensitäten jedes Spektrums sind somit auf die Signalintensität des in den Spektren dominanten Ions [M+Na]⁺ normiert.

¹⁵⁵ M entspricht hierbei dem Molekül Chitotetraose.

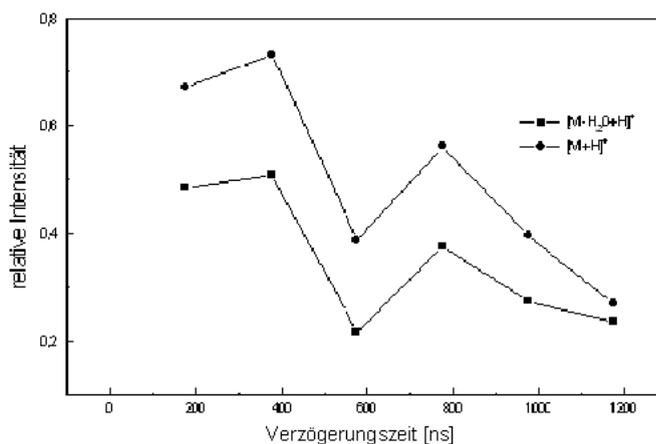


Abbildung 5-14 Relative Signalintensitäten von $[M-H_2O+H]^+$ und $[M+H]^+$ bezogen auf die Signalintensität des $[M+Na]^+$ -Ions bei Variation der Verzögerungszeiten¹⁵⁵
($U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE, Rand)

Wie man aus Abbildung 5-14 erkennen kann, kommt es bei erhöhter Verzögerungszeit zu einer relativ verstärkten Kationisierung des Analyten.¹⁵⁶

Am kristallinen Rand der DHB-Präparation kann im Vergleich zum mikrokristallinen Innern der DHB-Präparation eine erhöhte Signalintensität der Ionen $[M-H_2O+H]^+$ sowie $[M+H]^+$ bezogen auf das Ion $[M+Na]^+$ festgestellt werden. Im Randbereich der Präparation kann weiterhin eine höhere Geschwindigkeiten der Ionen gemessen werden (siehe Tabelle 5-18).

Durch Aufnahme von Spektren von Chitotetraose aus einer Standardpräparation mit DHB/NaCl bei verschiedenen Laserleistungen ließ sich die Abhängigkeit der Laserleistung bezogen auf die Intensitäten der Ionensignale untersuchen (siehe Abbildung 5-15).

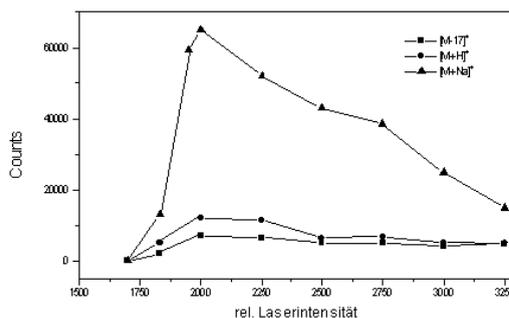


Abbildung 5-15 Absolute Intensitäten der Ionen $[M-H_2O+H]^+$, $[M+H]^+$ sowie $[M+Na]^+$ in Abhängigkeit von der relativen Laserenergie (Voyager DE)¹⁵⁵

Im Bereich der relativen Lasereinstellung von 1830 (Schwelle) bis 3000 relativen Einheiten¹⁵⁷ ist in einem weiten Bereich der Lasereinstellung die Aufnahme von Spektren guter Qualität

¹⁵⁶ Ein ähnliches Ergebnis ist ebenfalls für andere Analytklassen von Wang [Wan93] und Mowat [Mow97] gefunden worden.

¹⁵⁷ Die relative Lasereinstellung 3000 entspricht der maximal möglichen Laserenergie.

möglich. Wie bereits in Kapitel 2.5 dargestellt, zeigt die Zahl der detektierten Ionen eine starke Abhängigkeit von der Laserenergie (siehe Abbildung 5-15). Die relativen Intensitäten der Ionen $[M-H_2O+H]^+$ sowie $[M+H]^+$ im Vergleich zur Signalintensität des Ions $[M+Na]^+$ sind jedoch kaum verändert. Weiterhin ist kein Zusammenhang der Analytionenanregung¹⁵⁸ und der Zunahme des Fragmentes $[M-H_2O+H]^+$ bei erhöhter Laserenergie zu erkennen.

5.2.2.4 Startgeschwindigkeiten von Maltotetraose

Maltotetraose ist aus vier Glucoseeinheiten aufgebaut. Im Gegensatz zur Chitotetraose werden von Maltotetraose im MALDI-Massenspektrum nur kationisierte Ionen im wesentlichen der Form $[M+Na]^+$ oder $[M+K]^+$ registriert. In Tabelle 5-19 sind Startgeschwindigkeiten für $[Maltotetraose+Na]^+$ aus verschiedenen Matrizes zusammengestellt. Bei der DHB-Präparation bilden sich feinste Nadeln. Diese stehen hoch und brechen teilweise beim Eintrocknen im Luftstrom ab. An diesen DHB-Nadeln ist im Gegensatz zum feinkristallinen Bereich im Inneren der Präparation keine Spektrenaufnahme möglich. Bei der DHB/CMBT-Präparation¹⁵⁹ ist eine wesentlich geringere Laserenergie (relative Einheit der Laserenergie 1320) im Vergleich zur Präparation mit reiner DHB (Laserenergie 2090) notwendig. Aufgrund starker Fragmentierung konnte Maltotetraose bei harter Extraktion im Reflektormodus ($G = 70\%$) jedoch bei keiner der Präparationen detektiert werden.

Tabelle 5-19 Startgeschwindigkeiten von $[Maltotetraose+Na]^+$
($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $\lambda = 337$ nm, Voyager DE)

| Matrix/Matrixzusatz | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|---------------------|-------------|-----------|------------------------|
| DHB | 187 | 97 | 6 |
| DHB/CMBT | 0 | | 5 |

Für den aus vier $\alpha(1-4)$ -verknüpften Glucoseeinheiten aufgebauten Zucker wird im Fall der DHB/CMBT-Präparation eine Startgeschwindigkeit von $v_0 \approx 0$ m/s bestimmt, während im Fall der DHB-Präparation ein $v_0 \approx 200$ m/s detektiert wird.

5.2.2.5 Startgeschwindigkeiten von komplexen Zuckern aus Humanmilch

Untersucht wurde eine Verteilung neutraler Milchligosaccharide aus Humanmilch. Bei der Präparation wurde eine Standardpräparation von Analyt/DHB auf einer CMBT-Unterlage eingesetzt.¹⁵⁹ Bei dieser Präparation konnten bereits bei geringer Laserenergie (Laser 1350) natriumangelagerte Analytionen detektiert werden (reine DHB: Laser 1990). Drei Oligosaccharide, die im weiteren mit Zucker Z0, Z1 und Z2 bezeichnet werden, konnten untersucht werden. Die Komposition der Oligosaccharide (aus der Verteilung der neutralen Zucker) kann wie folgt beschrieben werden:

¹⁵⁸ Eine erhöhte z.B. thermische Anregung resultiert im allgemeinen in einem erhöhten Fragmentierungsgrad der Analytionen.

¹⁵⁹ Siehe Kapitel 5.2.2.1 zu den Untersuchungen zu v_0 bei einer CMBT/DHB-Präparation.

Zucker Z0:

Tetrasaccharid aus einer Lactose und einem N-Acetyllactosamin, d.h. Isomerenmischung aus Lacto-N-Tetraose und Lacto-N-neo-Tetraose

Zucker Z1

Isomerenmischung der monofucosylierten core-Struktur von Zucker Z0 (Pentasaccharid)

Zucker Z2

Isomerenmischung der difucosylierten core-Struktur von Zucker Z0 (Hexasaccharid)

Die Molekulargewichte der Saccharide, die entweder einfach-, zweifach- oder unfucosyliert sind, werden in Tabelle 5-20 zusammengestellt. Die zur Bestimmung der Startgeschwindigkeit eingesetzten Zucker besitzen abhängig von ihrer Komposition unterschiedliche Massen (siehe Tabelle 5-20). Aufgrund der Verzweigung der Humanmilcholigosaccharide sind diese weiterhin nicht isomerenrein.

Tabelle 5-20 Milchzucker aus Humanmilch (Auswahl)

| Zucker | Komposition ¹⁶⁰ | Molekulargewicht [g/mol] |
|--------|----------------------------|--------------------------|
| Z0 | L1/0-0 | 707,64 |
| Z1 | L1/1-0 | 853,78 |
| Z2 | L1/2-0 | 999,93 |

Folgende Ergebnisse für die Startgeschwindigkeit der $[M+Na]^+$ -Ionen der verschiedenen Milchzucker konnten aus der DHB/CMBT-Präparation detektiert werden.

Tabelle 5-21 Startgeschwindigkeiten verschiedener Oligosaccharide $[M+Na]^+$ ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE, CMBT/DHB-Präparation)

| Oligosaccharid | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|----------------|-------------|-----------|------------------------|
| Z0 | 27 | 37 | 4 |
| Z1 | 39 | 21 | 4 |
| Z2 | 64 | 28 | 4 |

Die Startgeschwindigkeiten der Zucker sind hierbei mit den Startgeschwindigkeiten der Maltotetraose oder Chitotetraose aus der Matrix DHB/CMBT vergleichbar. Auffällig ist jedoch, daß die Startgeschwindigkeit des difucosylierten Zuckers Z2 mehr als doppelt so hoch wie die Startgeschwindigkeit des unfucosylierten Zuckers Z0 ist.

¹⁶⁰ Zur Komposition der Zucker siehe Pfenninger [Pfe98] und Finke [Fin99].

Die Startgeschwindigkeiten verschiedener Zucker aus dem Milchzuckergemisch wurden weiterhin aus der Matrix DHB untersucht. Hierbei fand eine feinkristalline Präparation mit der reinen DHB-Matrix Verwendung. Folgende Startgeschwindigkeiten für die zuvor untersuchten Milchzucker wurden bestimmt:

Tabelle 5-22 Startgeschwindigkeiten verschiedener Zucker als $[M+Na]^+$ aus dem Milchzuckergemisch ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE, Matrix DHB)

| Milchzucker | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------|-------------|-----------|------------------------|
| Z0 | 275 | 65 | 4 |
| Z1 | 353 | 62 | 4 |
| Z2 | 371 | 61 | 4 |

Auch für die Matrix DHB wird eine ca. 100 m/s höhere Startgeschwindigkeit für den Zucker Z2 im Vergleich zu Zucker Z0 festgestellt. Eventuell könnte hier eine Abhängigkeit vom Fucosylierungsgrad der Oligosaccharide oder ihrer Masse vorliegen.

Weiterhin wurden die Startgeschwindigkeiten der isomerenreiner Zucker Z1a und Z1b aus der Matrix DHB untersucht um festzustellen, ob eine Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit (siehe Tabelle 5-23) von der Struktur der unterschiedlichen Isomeren besteht. Bei den Zuckern 1a und 1b handelt es sich um einfachfucosylierte Milchzucker mit Komposition entsprechend Zucker Z1. Beide Zucker besitzen eine Tetrasaccharid-Corestruktur, unterschiedlich ist die Verknüpfung der beiden Fucosen.

Tabelle 5-23 Startgeschwindigkeiten verschiedener isomerenreiner Milchzucker der Komposition von Zucker Z1 ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE, Matrix DHB)

| Milchzucker | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------|-------------|-----------|------------------------|
| Z1a | 366 | 59 | 5 |
| Z1b | 327 | 63 | 5 |

Der Zucker Z1a zeigt eine zum Milchzucker Z1b vergleichbare Startgeschwindigkeit (siehe Tabelle 5-23). Zucker der Komposition von Zucker Z1 sind auch im Zuckergemisch untersucht worden (siehe Tabelle 5-22). Der Zucker Z1 aus dem Milchzuckergemisch zeigt eine zu v_0 von Zucker Z1a bzw. Z1b vergleichbare Startgeschwindigkeit.

5.2.3 Startgeschwindigkeit von Matrixionen

In Tabelle 5-24 sind die Ergebnisse für die Startgeschwindigkeit¹⁶¹ verschiedener Matrixionen zusammengestellt ($t < 800$ ns).¹⁶² Im Fall der Untersuchung der

¹⁶¹ Mittlere Startgeschwindigkeiten von HCCA-Matrixionen sind z.B. von Dworschak zu 1100 m/s bis 1400 m/s bestimmt worden [Dwo98] (siehe hierzu auch Kapitel 2.6.2).

¹⁶² Bei $G = 94,5$ % werden (im Vergleich zu $G = 89\%$, Voyager DE) wesentlich niedrigere Geschwindigkeiten der Matrixionen gefunden. Eventuell sind hier Felddurchgriffe weniger gut

Startgeschwindigkeit von Matrixionen sind die Geschwindigkeiten aus Matrix-/Analytgemischen¹⁶³ ermittelt worden, um zu üblicherweise für Peptide/Proteine eingesetzten Präparationsbedingungen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Tabelle 5-24 Startgeschwindigkeiten von Matrixionen verschiedener Matrices (mit Analyt) im Vergleich mit v_0 von [Insulin + H]⁺ ($U_{ges} = 25$ kV, $G = 89$ %, $l = 337$ nm, Voyager DE)

| Matrix | Matrixion | | | | | | [Insulin+H] ⁺ | |
|--------------------|------------|---------------------------------------|-------------|-----------|------------------------|-------------|--------------------------|--|
| | Masse [Da] | Strukturformel | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente | v_0 [m/s] | s [m/s] | |
| DHB ¹⁶⁴ | 273 | [2M-2H ₂ O+H] ⁺ | 549 | 100 | 2 | 543 | 40 | |
| | 137 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 212 | 58 | 2 | | | |
| | 154 | M ⁺ | 512 | 81 | 7 | | | |
| HCCA | 190 | [M+H] ⁺ | 167 | 67 | 4 | 291 | 51 | |
| | 172 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 229 | 27 | 4 | | | |
| | 212 | [M+Na] ⁺ | 137 | 27 | 4 | | | |
| | 379 | [2M+H] ⁺ | 278 | 34 | 4 | | | |
| 3-HPA | 140 | [M+H] ⁺ | 346 | 123 | 4 | 444 | 62 | |
| | 96 | [M+H-CO ₂] ⁺ | 410 | 20 | 4 | | | |
| | 235 | [2M+H-CO ₂] ⁺ | 421 | 57 | 4 | | | |
| | 279 | [2M+H] ⁺ | 421 | 102 | 4 | | | |
| SINA | 225 | [M+H] ⁺ | 306 | 7 | 2 | 332 | 29 | |
| | 207 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 271 | 4 | 2 | | | |
| | 449 | [2M+H] ⁺ | 285 | 28 | 2 | | | |
| 2,6-DHB | 155 | [M+H] ⁺ | 289 | 166 | 4 | 315 | 42 | |
| | 193 | | 321 | 109 | 4 | | | |
| | 137 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 314 | 133 | 4 | | | |

Die Untersuchungen haben ergeben, daß verschiedene initiale Geschwindigkeiten für verschiedene Matrixionen und Matrixfragmentionen bestimmt werden. Einige Matrixionen zeigen in etwa die gleiche Startgeschwindigkeit wie Proteine, die Startgeschwindigkeit anderer Matrixionen weicht jedoch stark von dieser ab [Glü99]. Die Matrix DHB zeigt für das

kompensiert. Zum Beispiel zeigt das Ion m/z 274 ein $v_0 = 355 \pm 114$ (Durchschnitt über drei Experimente) und das Ion m/z 154 ein $v_0 = 186 \pm 60$ m/s (Durchschnitt über vier Experimente).

¹⁶³ Hierfür wurde der Analyt Insulin zugesetzt.

¹⁶⁴ Die Startgeschwindigkeit des DHB Matrixions m/z 155 konnte nicht bestimmt werden, da eine sichere Identifizierung des Signals des Ions in dem zu höherer Masse abfallenden Ionensignal des Matrixions m/z 154 nicht möglich war.

Matrixion $[2M-2H_2O+H]^+$ bei m/z 273 sowie für das Radikal M^{\bullet} bei m/z 154 ein v_0 nahe der Startgeschwindigkeit der Peptid- und Proteinionen, während für 3-HPA, SINA und 2,6-DHB alle Matrixionen, die untersucht wurden, eine zur Analytioneengeschwindigkeit vergleichbare Startgeschwindigkeit haben.¹⁶⁵ Für die Matrix DHB ist die Geschwindigkeit des Ions $[M-H_2O+H]^+$ im Vergleich zur Analytioneengeschwindigkeit stark vermindert. Die Ionen des Typs $[2M+H]^+$ für die Matrix SINA, 3-HPA oder HCCA sowie das Ion $[2M-2H_2O+H]^+$ für die Matrix DHB zeigen Startgeschwindigkeiten nahe der für Analytionen wie z.B. $[\text{Insulin}+H]^+$ aus den jeweiligen Matrices.

¹⁶⁵ Für Matrixionen der Matrix DHBs m/z 137 und m/z 151 wurden Verteilungen für v_0 von 1750-2250 m/s, für das Ion m/z 287 und m/z 273 von 1250-1750 m/s bestimmt [Dwo98], wobei diese Meßmethode Ionen hoher kinetischer Energie überrepräsentiert (siehe Kapitel 2.6.2).

5.3 Diskussion (Teil I): Ergebnisse der Startgeschwindigkeit

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit aus Kapitel 5.2.1 bis 5.2.3 zur Startgeschwindigkeit diskutiert.

Aufgrund des Laserimpulses wird bei MALDI aus der festen Präparation von Matrix und Analyt eine Wolke aus Neutralteilchen und Ionen freigesetzt. Mittels der "DE-Methode" (siehe Kapitel 5.1) lassen sich Werte der Startgeschwindigkeit von Analytionen und Matrixionen einfach bestimmen. Hierbei zeigen verschiedene Matrizes verschiedene axiale Startgeschwindigkeiten der Analytionen; der Ladungszustand, die Ionenpolarität und die Ionenmasse sind hierbei nicht von Bedeutung. Die beobachtete Startgeschwindigkeit von Ionen ist somit eine Eigenschaft der Matrix.

Die Startgeschwindigkeit zeigt sich prinzipiell unabhängig von der UV-Wellenlänge.¹⁶⁶ Weiterhin konnte kein direkter Zusammenhang zwischen dem Absorptionskoeffizienten bei der jeweiligen Wellenlänge bei verschiedenen Matrizes und der Startgeschwindigkeit für [Insulin+H]⁺ festgestellt werden.

Die Werte von Ionen verschiedener Masse und Ladungszahlen deuten an, daß eine Bestimmung der Startgeschwindigkeit von einzelnen Ionen sinnvoll ist, um die so gewonnenen Werte in die Kalibrierung aller Ionen der gleichen Substanzklasse einfließen zu lassen. Da für einfach- und mehrfachgeladene Ionen die experimentell bestimmte Startgeschwindigkeit vergleichbar ist, kann davon ausgegangen werden, daß der Desorptionsprozeß für diese Ionen - ebenso wie für (einfach-)deprotonierte Analytionen - identisch ist.

Für Peptid- und Proteinionen aus der Matrix DHB ist festzustellen, daß eine initiale gaußförmige Verteilung der Geschwindigkeit von 250 bis 750 m/s bei einem Maximum von 500 m/s eine gute Näherung der experimentellen Werte darstellt. Verschiedene Messungen zeigen, daß im allgemeinen die Breite der Verteilung der Startgeschwindigkeit etwa mit der mittleren Startgeschwindigkeit der Verteilung korreliert. Diese Werte stimmen gut überein mit dem experimentellen Wert der Startgeschwindigkeit verschiedener Peptid- und Proteinionen aus dieser Matrix, die mittels der "DE-Methode" ermittelt worden sind.

Weiterhin ist die Startgeschwindigkeit innerhalb bei MALDI eingesetzter Laserenergien unabhängig von der Laserbestrahlung. Bei erhöhter Laserenergie wird eine größere Menge an Matrix- und Analytmaterial desorbiert, die Zusammensetzung der Teilchenwolke ändert sich dadurch allerdings nicht wesentlich. Weiterhin ist im Fall der Chitotetraose kein Zusammenhang der Analytionenanregung¹⁶⁷ und der Zunahme der Fragmentationen bei

¹⁶⁶ Geht man davon aus, daß die Menge an Material (d.h. die Tiefe des abgetragenen Materials) mit der Startgeschwindigkeit korreliert, ist das Ergebnis nicht überraschend, da die Matrizes bei beiden Wellenlängen eine vergleichbare Absorption und eine vergleichbare Qualität der Spektren zeigen. Um zu zeigen, daß eine Abhängigkeit von der Laserwellenlänge besteht, wären Matrizes mit signifikant unterschiedlichen Absorptionsquerschnitten (aber gleicher Spektrenqualität) erforderlich. Dies könnte evtl. durch Untersuchung bei weiteren UV-Wellenlängen erfolgen [Glü99b].

¹⁶⁷ Eine erhöhte z.B. thermische Anregung resultiert im allgemeinen in einem erhöhten Fragmentierungsgrad der Analytionen.

erhöhter Laserenergie zu erkennen. Hierbei kann entweder eine unimolekulare, metastabile Zerfallsreaktion oder das Vorhandensein des beobachteten Fragmentes $[M-H_2O+H]^+$ bereits in der festen Matrix-/Analytpräparation angenommen werden.

Die Werte der Startgeschwindigkeit der Analytionen aus den Matrices DHB und Ferulasäure stimmen sehr gut mit den Werten der mittels der Photoionisation ermittelten Geschwindigkeiten der Neutralteilchen und den Ergebnissen der "Feldfrei-Methode" von Verentchikov [Ver92] überein. Die Übereinstimmung mit der Geschwindigkeit der Neutralteilchen ist hierbei besonders wichtig für die Abschätzung der Genauigkeit der Messung, da diese den größten Teil des desorbierten Materials ausmachen [Spe88] und keinen Feldinhomogenitäten unterworfen sind. Aus Messungen zu Ionen mit geringem m/z -Verhältnis kann weiterhin ein Einfluß von Feldinhomogenitäten bei der hier angewandten Bestimmungsmethode der Startgeschwindigkeit ausgeschlossen werden.

Die Startgeschwindigkeit v_0 von Analytionen ist charakteristisch für eine Matrix, sie ist allerdings durch die Präparationsbedingungen beeinflussbar. Für alle untersuchten Peptide und Proteine als positiv- oder negativgeladene sowie einfach- oder mehrfachgeladene Analytionen wird aus der gleichen Matrix die gleiche Startgeschwindigkeit ermittelt, während Kohlenhydrate wesentlich geringere Werte der Startgeschwindigkeit zeigen. Bei der Kalibrierung ist somit die Analytklasse der beobachteten Substanzen ebenfalls zu berücksichtigen.

Die Startgeschwindigkeiten werden jedoch von Verunreinigungen innerhalb der Probe, Matrixadditiven und auch Präparationsbedingungen (wie z.B. Lösungsmitteln) beeinflusst. So resultieren aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen unterschiedliche Startgeschwindigkeit von $[\text{Insulin}+H]^+$ aus der Matrix 3-HPA. Wechselnde Lösungsmittel können eventuell über die unterschiedliche Kristallisation der Matrices unterschiedliche Startgeschwindigkeiten verursachen. Bei der Präparation ist daher auf standardisierte Präparationsprotokolle zu achten, um vergleichbare Ergebnisse bei der Massenbestimmung zu erreichen.

Der Zusatz von Additiven zu Matrices hat einen nicht vorhersagbaren Einfluß auf die Startgeschwindigkeit. Einige Additive wie Monosaccharide zu DHB (oder DHBs) zeigen für Analytionen im Vergleich zur Startgeschwindigkeit aus der reinen Matrix erhöhte Werte für v_0 . Andere Zusätze ergeben jedoch im Vergleich zur reinen Matrix verminderte Werte der Startgeschwindigkeit der Analytionen, wie z.B. der Zusatz DAHC zur Matrix DHAP. Vier von sieben der untersuchten Zuckerezsätze zur Matrix DHB zeigen eine im Vergleich zur reinen DHB-Matrix erhöhte Startgeschwindigkeit der Analytionen. Ebenso wie bei der Matrix DHBs kann reproduzierbar präpariert werden, und die Ergebnisse für Proteine und Peptide weisen bei diesen Zuckerezsätzen zur Matrix DHB auf eine beinahe ebenso schonende Desorption/Ionisation hin [Glü99b].

Ergebnisse für verschiedene Matrices zeigen, daß niedrige Werte für v_0 im Fall mikrokristalliner, homogener Präparationen gefunden werden. Für Peptide und Proteine kann bei Präparation mit einer Matrix bzw. einem Matrixgemisch bei allen untersuchten Matrices eine höhere Startgeschwindigkeit detektiert werden als für die hier untersuchten Oligosaccharide. Die relative Abfolge der Matrices bleibt für beide Analytklassen jedoch

erhalten. So zeigt die Matrix DHB immer höhere Analytioneengeschwindigkeiten als DHB bei Zusatz von CMBT (siehe folgende Abbildung 5-16).

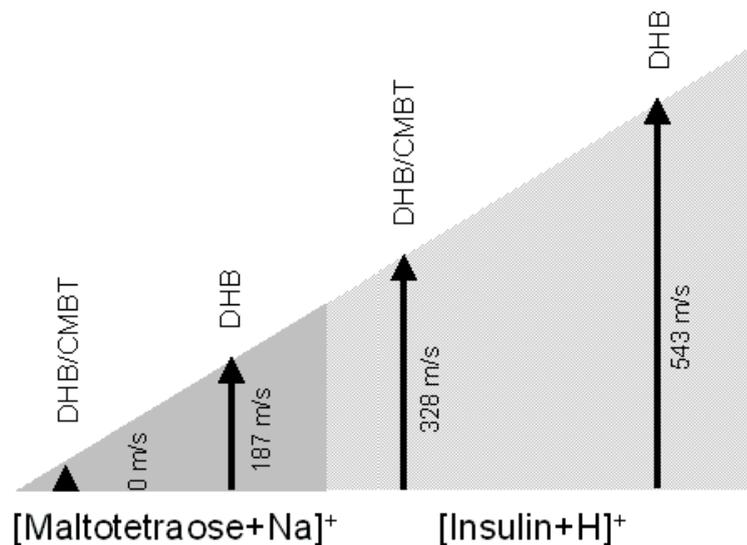


Abbildung 5-16 Vergleich der Startgeschwindigkeiten von Kohlenhydraten und Peptiden/Proteinen

Alle untersuchten Peptide und Proteine zeigen gegenüber den in dieser Arbeit eingesetzten Zuckern eine stark erhöhte Startgeschwindigkeit (siehe Abbildung 5-16). Die Messungen zeigen, daß in der Praxis bei der Kalibrierung von Flugzeitmassenspektren die Analytklasse der untersuchten Substanzen berücksichtigt werden muß. Die Startgeschwindigkeit wird jedoch stärker von der Matrix beeinflusst als von der Struktur der Analytsubstanzen. Bei der Untersuchung der Startgeschwindigkeiten aus der Matrix DHB wird die gleiche Geschwindigkeit für die Analytionen der Chitotetraose des Typs $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ oder $[M+K]^+$ (mit $v_0 \approx 200$ m/s) bestimmt. Es besteht somit wahrscheinlich kein Unterschied im Desorptionsprozeß für die kationisierten oder protonierten Ionen der Chitotetraose.

Für alle Matrixes zeigt mindestens ein Matrixion oder ein Fragmention der Matrix die Startgeschwindigkeit der Analytionen. Die Ionen des Typs $[2M+H]^+$ für die Matrix SINA, 3-HPA oder HCCA sowie das Ion $[2M-2H_2O+H]^+$ für die Matrix DHB zeigen Startgeschwindigkeiten nahe der Startgeschwindigkeit für Analytionen wie z.B. $[Insulin+H]^+$ aus den jeweiligen Matrixes. Bei der Matrix HCCA treten neben der Analytioneengeschwindigkeit auch stark verminderte Geschwindigkeiten des $[M+Na]^+$ Ions auf; das weist auf eine andere Desorptionsart dieses Ions hin, da bei gleichem Desorptionsprozeß für Analytionen und Matrixionen auch die gleiche Startgeschwindigkeit zu erwarten wäre. Im Prinzip sind die Werte der Startgeschwindigkeit von Neutralteilchen der Matrix DHB (z.B. Messungen von Dreisewerd [Dre94]) mit den in dieser Arbeit vorgestellten Werten der Startgeschwindigkeit von Ionen vergleichbar, die mit der "DE-Methode" experimentell bestimmt worden sind. Die Startgeschwindigkeit der Analytionen aus einer Matrix entspricht dem mittleren v_0 der Matrix-Neutralteilchen. Dies gilt jedoch nicht unbedingt für die Startgeschwindigkeit aller Matrixionen. Da die Startgeschwindigkeit der Analytionen im wesentlichen von der Matrix abhängt, wird das dynamische Verhalten der Teilchenwolke

nach der Expansion voraussichtlich mehr von Neutralteilchen¹⁶⁸ der Matrix als von ihren Ionen bestimmt.

Eventuell kann ein Clustermechanismus zur Beschreibung des Desorptions- bzw. Ionisationsprozesses von Peptid- und Proteinionen bei MALDI herangezogen werden. Im folgenden Kapitel 6 wird ein Versuch unternommen, ein Desorption- und Ionisationsmodell für MALDI aufzustellen.

¹⁶⁸ Die Anzahl der Neutralteilchen liegt um Faktor 10^3 bis 10^4 höher als die der Ionen [Ens91], [Sch96], [Bah96].

Kapitel 6

Desorption- und Ionisation bei MALDI:
"Cluster-Modell"

6 Desorption und Ionisation bei MALDI: "Cluster-Modell"

Wie in Kapitel 2.4.2 vorgestellt, wurden verschiedene Ionisationsmechanismen für MALDI vorgeschlagen. Ein Verständnis des Ionisationsprozesses bei MALDI ist von großer Bedeutung, um Fragmentierung, Ionenausbeute, Ladungszustand der beobachteten Analytionen zu verstehen oder zu kontrollieren. Ein verbessertes Verständnis des MALDI-Ionisationsmechanismus kann weiterhin die Auswahl einer Matrix für ein analytisches Problem erleichtern.

Viele der in diesem Kapitel beschriebenen Ionisationswege wurden bereits für SIMS oder FAB oder andere Desorptions-/Ionisationstechniken (DI-Techniken) vorgestellt, so wie z.B. das Auftreten von Radikalkationen [Lig86], [Mce86], von Redoxprozessen [Gal86] oder die Ladungsreduktion von Analytionen durch Elektronen zu im wesentlichen einfachgeladenen Ionen [Cla84], [Cer85]. Ähnlichkeiten der verschiedenen Desorptions-/Ionisationstechniken [Pac87], [Coo83b], [Ens81] wurden bereits früher festgestellt. Trotz der Ähnlichkeiten in MALDI-Massenspektren bei Bestrahlung der Probe mit IR- oder UV-Laserlicht [Che98], [Niu98] beschränkt sich dieses Modell im wesentlichen auf UV-MALDI.

Auch wenn eine starke Fokussierung des Modells auf Peptide/Proteine und auch "gängige" Matrizes (wie z.B. DHB oder HCCA) erfolgt, können dennoch einige grundlegende Prozesse bei MALDI beschrieben werden.

Aus den vorliegenden Beobachtungen (siehe Kapitel 5 und Kapitel 2) lassen sich einfache Fragen entwickeln:

- Wie ist der Zustand der Analyteilchen in den Matrixkristallen? Werden Teilchen als Ionen in Matrixkristalle eingebaut, und welche Gegenionen sind dann zu berücksichtigen?
- Wie, zu welcher Zeit (nach dem Laserimpuls) und an welchem Ort wird die Ladungstrennung, d.h. die Trennung von positiven und negativen Teilchen, realisiert?
- Warum erfolgt während der Verzögerungszeit nicht eine Rekombination der Ladungsträger zu einer im wesentlichen ungeladenen Teilchenwolke?
- Während Protonierung und Deprotonierung bei MALDI auftreten, ist zur Kationisierung bei MALDI keine analoge Anionisierung bekannt. Welche Gründe liegen vor?
- Warum ist der Ladungszustand nahezu "1"?
- Ist die Matrix aktiv notwendig zur Ionisation?
- Können weitere Effekte wie Ionenanregung und Fragmentierung berücksichtigt werden?

In den folgenden Kapiteln 6.1 bis 6.3 soll ein erster Versuch gemacht werden, ein Desorptions-/Ionisationsmodell für MALDI zu entwickeln [Kar00], [Glü00c], [Kar00b]. Im folgenden Kapitel soll die Funktion der Matrix am Beispiel von Peptiden und Proteinen beschrieben werden. Die hier beschriebenen einfachen Reaktionen lassen sich auch prinzipiell auf andere Analytklassen übertragen. Allerdings bieten zum Beispiel neutrale Kohlenhydrate meistens nicht die Möglichkeit der Deprotonierung oder Protonierung, so daß

diese Reaktionen für diese Analytklasse ausgeschlossen werden können und die Ionisierung dieser Analyte auf die Kationisierung beschränkt bleibt.

6.1 Matrix-Analytfestkörper

Eine wesentliche Funktion der Matrix besteht im Fall von Peptiden und Proteinen darin, mit dem Analyten eine „feste Lösung“ (*solid solution*) zu bilden [Hil91]. Der Analyt wird in die Matrixkristalle eingebaut. Eine Funktion der Matrix ist somit die Isolation von Analytionen. Weiterhin dient die Matrix zur Einkopplung der Laserenergie. Die Absorption des Laserimpulses führt zur Emission des Materials. Da der Einbau von Analytsubstanzen [Str91] die Kristallstruktur von Einkristallen nicht beeinflusst [Str91b], bietet der mittels hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie erfolgte Nachweis von Höhlungen [Hor00] innerhalb der Einkristalle eine mögliche Erklärung für die Analytinkorporation. In diesen Höhlungen könnten der Analyt sowie Lösungsmittelreste vorhanden sein, wobei Lösungsmittelreste über Solvatation die Ladungstrennung erleichtern .

Ausgehend von der einfachen Hypothese, daß der in Lösung vorhandene Ladungszustand der Analytsubstanzen im Matrixfestkörper nahezu konserviert wird, können folgende "Summenformeln" für einfache Matrix-Analytfestkörper aufgestellt werden. Dabei wird der Matrix-Analytfestkörper durch eckige Klammern [] symbolisiert, wobei die Matrix T nahezu "unendlich" häufig vorkommt, was durch das Zeichen ∞ symbolisiert wird. Weiterhin werden mit $m, n \in \mathbb{N}$ die ganzzahligen Vielfachen der Teilchenzahl innerhalb einer Formel angegeben. Prinzipiell wären mehr höhergeladene Ionen zu berücksichtigen; die wichtigsten Kationen, die hier betrachtet werden, sind jedoch Metallkationen (Cat^+), wie Na^+ , K^+ oder mehrfachgeladene Kationen (Me^{2+}) wie Zn^{2+} . Weiterhin werden auch nur einfachgeladene Anionen (B^-) wie zum Beispiel das Chlorid-Ion Cl^- berücksichtigt.

Im Festkörper gilt die Elektroneutralitätsbedingung, d.h. nach außen, ist die Präparation von Analyt und Matrix insgesamt ungeladen. Peptide und Proteine werden bei typischen pH-Werten des Matrix-Analyttropfens in Lösung mehrfachprotoniert vorliegen.¹⁶⁹

- $[\infty \text{ T} / \text{M}_n]$ für einen neutralen Analyten (M) in einer idealen reinen Matrix (T)
- $[\infty \text{ T} / \text{M}_n / \text{Cat}_m^+ / \text{B}_m^-]$ für einen neutralen Analyten in einer mit Salz (Cat^+ und B^- , für Metallkation und Anion z.B. mit NaCl) kontaminierten Matrix
- $[\infty \text{ T} / \text{M}_n / (\text{Me}^{2+} / 2\text{B}^-)_m]$ für den Fall der zweifachgeladenen Metallkationen
- $[\infty \text{ T} / (\text{M} + x\text{H}^{x+})_n / n \times \text{B}^-]$ für einen protonierten Analyten (z.B. Proteine)
- $[\infty \text{ T} / (\text{M} - x\text{H}^{x-})_n / n \times \text{Cat}^+]$ für einen deprotonierten Analyten (z.B. Oligonukleotide)

¹⁶⁹ Ein Protein, präpariert aus einer Lösung mit pH 2, trägt typischerweise eine große Zahl von positiven Überschlußladungen, die durch Gegenionen wie z.B. das Trifluoressigsäureanion, Matrixanionen sowie einfache Ionen wie Cl^- ausgeglichen werden.

Im Fall von Peptiden/Proteinen und Carbonsäuren als Matrix liegt der Analyt in Lösung in der Regel protoniert vor. Hierzu kann folgende einfache Gleichung aufgestellt werden¹⁷⁰: $[T-H] \cdots H^+ \cdots M \rightarrow [T-H]^- + [M+H]^+$, d. h. die Ladung wird im einfachsten Fall durch Anionen der Matrix ausgeglichen sein. In Abbildung 6-1 ist eine schematische Darstellung eines Proteins als $(M+3H)^{3+}$ in einer Matrix gezeigt. In diesem Beispiel eines Festkörpers $[(M+3H)^{3+}+3B^-]$ wird die Ladung durch drei Anionen B^- ausgeglichen.

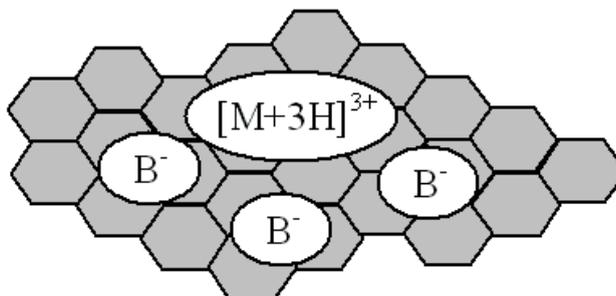


Abbildung 6-1 Beispiel: Protein als $(M+3H)^{3+}$ mit drei Anionen B^- in einer Matrix

Ein weiterführendes Modell zur Ionisation bei UV-MALDI wird im folgenden Kapitel präsentiert, welches einige Phänomene der Prozesse bei MALDI beschreibt. Das Modell berücksichtigt einige Teile früherer Modelle, wie zum Beispiel die Photoionisation und auch photochemische Reaktionen (siehe Kapitel 2.4.2).

6.2 Desorptionereignis: Bildung von geladenen Clustern

Grundannahme ist, daß als Folge der Laserbestrahlung hochangeregte Cluster gebildet werden. Das Bild der Desorption, wie es im Desorptionsmodell nach Zhigilei, Kodali and Garrison [Zhi97] beschrieben ist (siehe Kapitel 2.4.1.5), soll auch hier angenommen werden. In deren Modellberechnungen werden aufgrund des UV-Laserimpulses oberhalb der Schwellbestrahlung Cluster (Bruchstücke von Material) freigesetzt. Cluster können hierbei durch Rekombination von sekundären Species oder durch direkte Emission im Bereich des Desorptionsortes an der Schnittstelle von Oberfläche zu Vakuum entstehen.

Diese Cluster (im folgenden durch $\{ \}$ symbolisiert) bestehen aus Matrix, Analyt und geladenen Ionen. Aufgrund der Laseranregung sind diese Cluster hochangeregt und in einem dynamischen Zerfallsprozeß [Kar00]. Die Energie im Cluster reicht aus, um Matrix und andere Moleküle zu verdampfen, so daß stabile Analytionen (und Analytmoleküle) zurückbleiben (siehe Abbildung 6-2). Hierbei verlassen nur kleine Moleküle die Cluster, das Verdampfen von großen Biomolekülen, wie zum Beispiel von Peptiden oder Proteinen als Neutralteilchen oder Ionen, ist hierbei nicht möglich. Die Beobachtung von Clustern bei erhöhtem Druck in der MALDI-Ionenquelle bei orthogonalem MALDI (siehe Kapitel 2.4.1.5) [Ver99] spricht dafür, daß die Überschussenergie aus der Absorption des Laserlichtes die notwendige Energie zur Verdampfung aller Neutralteilchen wie z.B. der Matrixmoleküle und

¹⁷⁰ Nur im Fall saurer Analyte wird diese Reaktion umgekehrt.

damit zur Desolvatisierung der Analytionen bei "normalem" MALDI unter reduziertem Druck in der Ionenquelle bei weitem überwiegt.

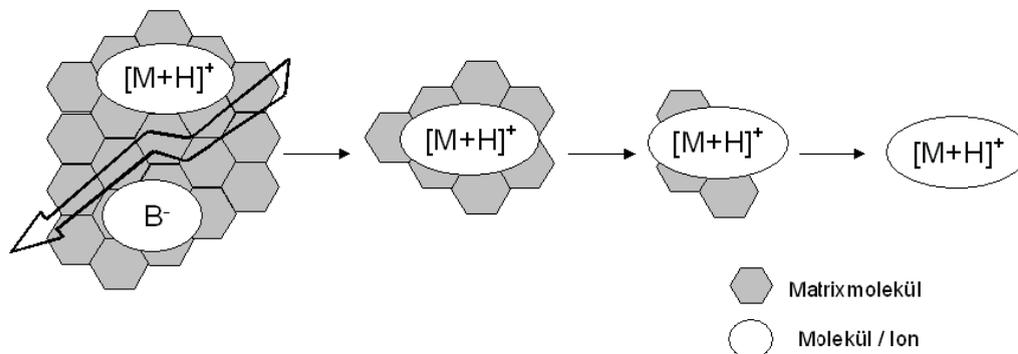


Abbildung 6-2 Cluster: Statistische Ladung der Cluster gefolgt vom Abdampfen von Neutralen (z.B. Matrixmolekülen) führt zu Ionen

Die Idee der Clusterbildung bei MALDI folgt dabei Modellen der Ionisation für DI-Techniken [Lan79], [Coo83b], [Mic83], [Spe87]. Clusterbildung wurde ebenfalls von Vestal in einem Übersichtsartikel zu Ionisationstechniken von nichtflüchtigen Substanzen vorgeschlagen [Ves83].

Die Ionisation ist daher mit der Desorption gekoppelt und zwar durch "Freisetzung" von bereits im Festkörper vorliegenden (*precharged*) Ionen, allerdings nicht durch direkte "Ionenverdampfung", sondern durch die Bildung von Clustern, die aufgrund des Fehlens oder eines Überschusses von Gegenionen geladen sind. Die Coulombkräfte zwischen geladenen Teilchen können dabei zum einen durch die kinetische Energie der expandierenden Cluster überwunden werden, zum anderen ist eine Reduktion der aufzubringenden Energie durch Komplexierung und Abschirmung der in der kondensierten Phase noch vorhandenen polaren Moleküle und Lösungsmittelreste denkbar (siehe hierzu auch Abbildung 6-3).

Das *precursor*-Modell (entwickelt für die Ionisationstechnik *fast atom bombardment*) geht ebenfalls davon aus, daß das Massenspektrum im wesentlichen durch direkte Desorption von vorgeformten (*preformed*) Ionen aus der flüssigen Matrix (in der sie in der Form von Elektrolyten vorliegen) entsteht [Ben83], [Sun88]. Für den Ort der Desorption als räumlicher und auch zeitlicher Übergang der kondensierten Phase aus Matrix/Analyt zur Wolke aus angeregten Molekülen, Neutralen und auch Ionen wird bei SIMS/FAB der Begriff *selvedge* eingeführt¹⁷¹ [Hon78], [Lan79], [Pac85], [Sun88].

Im Fall des Clustermodells können nur dann Ionen auftreten, wenn innerhalb eines Clusters ein Überschuß oder ein Mangel an Kationen oder Anionen vorliegt. Beim Zerreißen des Matrix/Analytfestkörpers während des Desorptionsereignisses ist zu erwarten, daß hochgeladene Cluster nur bei Verlust von mehreren Gegenionen auftreten. Für besonders kleine Cluster wird der resultierende Ladungszustand für hochgeladene, vorgeformte

¹⁷¹ Der Begriff *selvedge* kann als "Nähkante" übersetzt werden.

Analytionen allerdings höher sein, da die Wahrscheinlichkeit, alle Gegenionen im gleichen Cluster mitzudesorbieren, geringer wird, so daß Cluster wie $\{nT---MH_x^{x+} ---yB^{-}(x-y)^+\}$ oder $\{nT---(M-xH)^{x-} ---yCat^+\}^{(x-y)^-}$ (alle mit $x > y$) gebildet werden. Abbildung 6-3 zeigt eine piktographische Erklärung für die Bildung eines zweifachgeladenen Ions MH_2^{2+} aus einem zweifachgeladenen Cluster $\{nT---MH_2^{2+}\}^{2+}$.

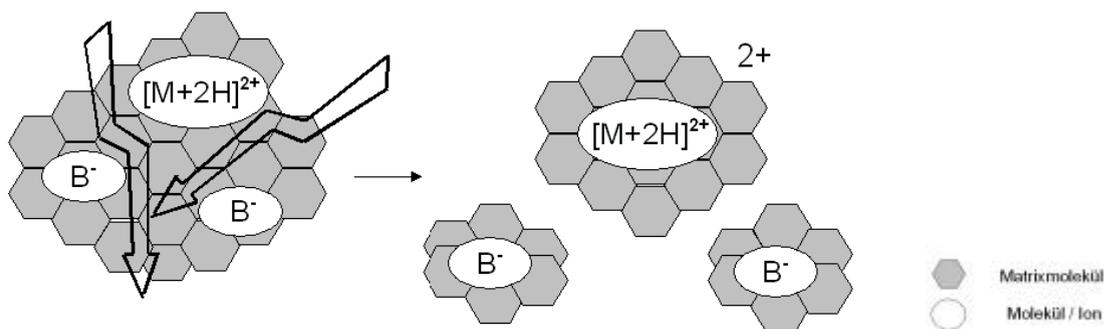
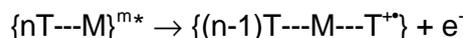


Abbildung 6-3 Positive Ionen: Hochgeladene Cluster werden während der Desorption in der *selvedge*-Region gebildet

Im Fall von neutralen Analyten werden voraussichtlich auch mehr elektroneutrale Cluster desorbiert; zudem dürfte der Ladungszustand eher gering sein. Dennoch werden einige Cluster mit der Summenformel $\{nT---M---Cat^+\}^{1+}$ oder $\{nT---M---B\}^{1-}$ auftreten. Für zweifachgeladene Kationen ist eine Bildung eines $\{nT---M---Me^{2+}---B\}^{1+}$ -Clusters wahrscheinlicher als die Bildung eines Clusters der Form $\{nT---M---Me^{2+}\}^{2+}$. Die Beobachtung, daß im wesentlichen Ionen der Form $[M+Me(II)-H]^+$ gebildet werden, kann damit ebenfalls auf die im Festkörper der Präparation festgelegte Anordnung der Ionen zurückgeführt werden.¹⁷²

Wie bereits im einführenden Kapitel zur Ionisation bei MALDI (siehe Kapitel 2.4.2) dargestellt, kann die Ladungstrennung bei MALDI auch durch Photoionisierung erfolgen. Hierbei ist im Rahmen des hier vorgestellten Modells eine Matrix/Cluster-Photoionisierung bei UV-MALDI gemäß folgendem einfachen Reaktionsweg möglich:



Dies erklärt das Auftreten von Radikalen [Ehr92], Elektronen [Qui94] und auch Photoionisationsprodukten bei MALDI. Der Ansatz des Energietransfers zwischen mehreren einfach angeregten Molekülen (*energy pooling*, siehe Abbildung 6-4, Weg A) [Ehr92], [Pre94], [Ehr95], [Lue00] innerhalb eines Clusters aus vielen einfachangeregten Matrixmolekülen kann über Photoionisation die Bildung von Radikalen und das Auftreten von Elektronen im Spektrum bei MALDI erklären. Ionisationspotentiale von Matrices in der kondensierten Phase (eher dem Zustand der schwer faßbaren, transienten Struktur von Clustern in der *selvedge*-Region vergleichbar als dem von Matrices in der Gasphase) wurden bisher nicht bestimmt. Da durch Lösungseffekte auch die Ionisationspotentiale von

¹⁷² Zur Anordnung von Ionen mit Matrixmolekülen siehe auch Untersuchungen von Wong [Won97].

typischen Matrixmolekülen verringert werden [Ehr95], [Kar98], erscheinen somit einfache Ionenbildungsmechanismen ausgehend von mehrfach angeregten Matrixmolekülen für den MALDI-Prozeß möglich (siehe Abbildung 6-4).

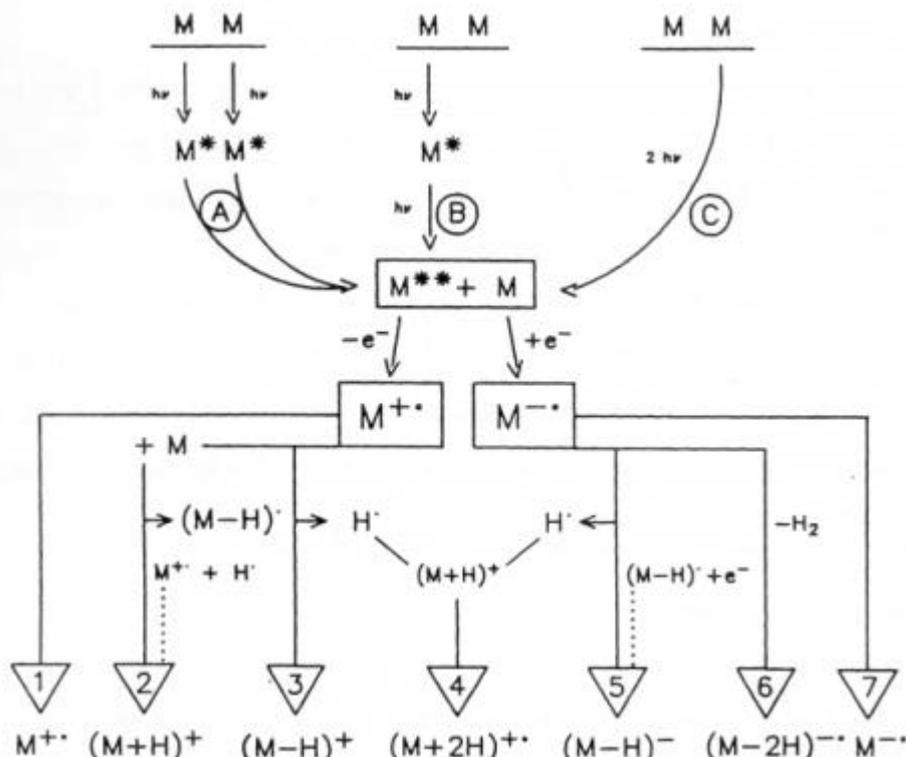


Abbildung 6-4 Ionisationswege bei UV-Laserdesorption [Ehr92]

Neben der Bildung von Radikalen wurden auch andere Ionenbildungsmechanismen vorgeschlagen (siehe Abbildung 6-5), die in Ergänzung zu den in Abbildung 6-4 dargestellten Reaktionswegen zu sehen sind. Da die direkte Photoionisation von einzelnen Matrixmolekülen bei typischen Bestrahlungsstärken für UV-MALDI nicht mit zwei Photonen¹⁷³ der Wellenlänge $\lambda = 337 \text{ nm}$ möglich ist [Kar98], [Lan98], ist eine direkte Photoionisation (siehe Abbildung 6-5, Weg C [Mef95]) bei MALDI auszuschließen.¹⁷⁴ Die Wege D und E entsprechen Protonenübertragungsreaktionen aus angeregten Zuständen der Matrixmoleküle (*excited state proton transfer, ESPT*) [Gim97], [Chi93]. Hierbei erfolgt die Ionisation des Moleküls M über den Zwischenschritt der Protonierung eines Matrixmoleküls durch ein angeregtes Matrixmolekül.¹⁷⁵ Jedoch zeigen verschiedene Untersuchungen, daß ESPT mit einem Photon bei UV-MALDI nicht möglich ist [Chi93], [Zen98], [Kar98]. Eventuell

¹⁷³ Hierbei kann die Absorption des zweiten Photons aus einem angeregten Zustand des Moleküls (Abbildung 6-4, Weg B [Kar85]) oder durch nicht-resonante Zweiphotonenabsorption (Weg C) erfolgen [Ehr92].

¹⁷⁴ Direkte Photoionisation ist ebenso bei den Bestrahlungsstärken von IR-MALDI nicht möglich, dennoch kann auch hier eine große Zahl von Radikalen im Spektrum beobachtet werden [Ehr93].

¹⁷⁵ Dieser Mechanismus geht auf erste Arbeiten von [Kar87] zurück.

steht dieser Weg $2T + nh\nu \rightarrow \{2T\}^* \rightarrow [T+H]^+ + [T-H]^-$ innerhalb von Clustern aus Matrix und Analyten über die Absorption mehrerer Photonen offen [Bre99].

Die Wege A und B entsprechen dem Weg 2 in Abbildung 6-4 [Ehr92]. Innerhalb von Clustern wird der Weg A durch Absorption von zwei Photonen durch die Matrix und anschließendem Protonentransfer auf den Analyten möglich [Lan98]. Der Protonentransfer innerhalb von geladenen Clustern gemäß Weg B ist nur dann möglich, wenn die Protonenaffinität der Matrix kleiner als die Protonenaffinität des Analyten ($PA(T) < PA(M)$) ist und ($PA([T-H]^+) < PA(T)$) wird.¹⁷⁶

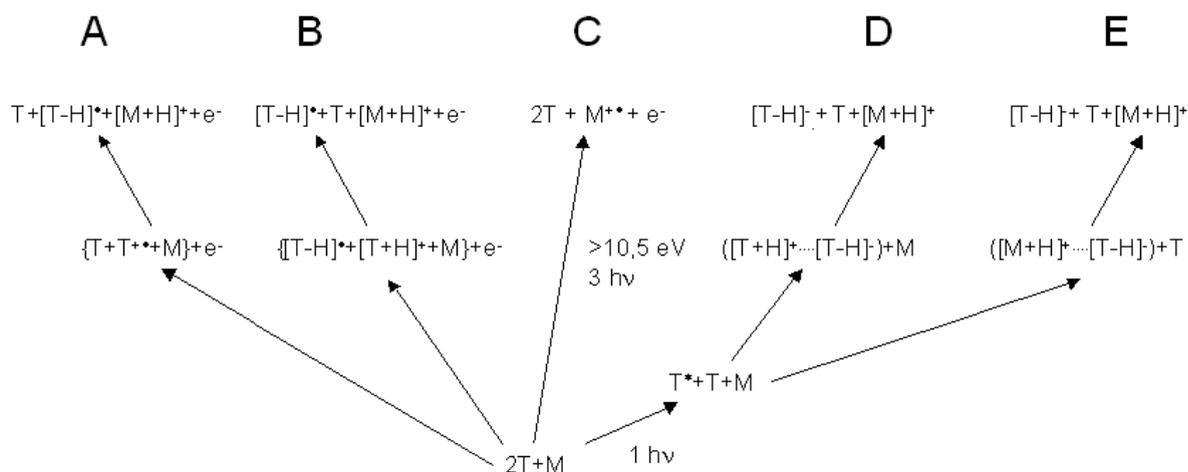


Abbildung 6-5 Einige einfache Ionisationswege bei UV-Laserdesorption unter Bildung einfach protonierter Analytmoleküle $[M+H]^+$

Da Photoionisierung gemäß $\{nT\}^{m*} \rightarrow \{nT\}^{*+} + e^-$ stattfinden kann, wie Untersuchungen von kleinen neutralen Clustern gezeigt haben [Mef98], [Kar98], [Lan98], [Mef95], wird aufgrund der hohen Mobilität der Elektronen und deren Verlust in der Ionenquelle die Teilchenwolke (*plume*) neutral bis partiell positiv geladen sein. Die Photoionisation erklärt sowohl die experimentelle Beobachtung eines intensiven Elektronensignals als auch die geringere Ionenintensität von Peptid-/Proteinanalyten bei MALDI im negativen Ionenmodus. Neben der Freisetzung von präformierten Ionen sind somit auch andere Reaktionswege möglich.

6.3 Freisetzung von Ionen in der Gasphase

Aus den anfänglich gebildeten Clustern werden durch Abdampfen von Neutralteilchen Biomolekülonen freigesetzt. Während der "Lösungsmittel"-Verdampfung folgen einfache Ionen/Ionen- und Ionen/Neutral-Reaktionen. So werden einfache Säure/Base-Reaktionen zur Bildung von Neutralen (z.B. HCl aus Cl^- and H^+) und Ionen führen.

¹⁷⁶ Hierzu wurden experimentelle Untersuchungen für verschiedene Analyte mit unterschiedlicher Protonenaffinität von Alves [Alv00] präsentiert, die auf einen Solvatationseffekt hindeuten.

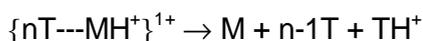
Im Fall von einfachgeladenen Clustern werden einfachgeladene Ionen entstehen. In folgender Tabelle 6-1 sind einige einfache Reaktionswege für positive Ionen aufgeführt, die zur Bildung von im MALDI-Massenspektrum typischerweise zu beobachtenden Ionen führen. In Tabelle 6-1, Tabelle 6-2, Abbildung 6-6 und Abbildung 6-7 werden nur die Reaktionswege betrachtet, die zu Analytionen führen. Die Matrix konkurriert allerdings immer mit dem Analyten um die Ladung, was zum Beispiel gemäß der Gleichung $(M-H)^{1+} + nT \rightarrow (T-H)^{1+} + M + (n-1)T$ erfolgen kann.

Tabelle 6-1 Positiver Ionenmodus: Einfache Cluster und deren ionische und neutrale Produkte (alle $x > 0$)

| Cluster | Ionische und neutrale Produkte |
|---|---|
| (1a) $\{nT---MH^+\}^{1+}$ | $\rightarrow MH^+ + nT$ |
| (2a) $\{nT---MH_x^{x+}---(x-1)B^-\}^{1+}$ | $\rightarrow MH^+ + (x-1)HB + nT$ |
| (3a) $\{nT---M---Cat^+\}^{1+}$ | $\rightarrow M Cat^+ + nT$ |
| (4a) $\{nT---M---Me^{2+}---B^-\}^{1+}$ | $\rightarrow ((M-H)+Me)^{1+} + HB + nT$ |
| (5a) $\{(n-1)T---M---T^{*+}\}^{*+}$ | $\rightarrow MH^+ + (n-1)T + (T-H)^*$ |

Folgende Abbildung 6-6 veranschaulicht die in Tabelle 6-1 aufgezeigten einfachen Reaktionswege von positiv geladenen Clustern in der *selfedge*-Region. So wird (siehe Tabelle 6-1, 4a) aus einem Cluster $\{nT---M---Me^{2+}---B^-\}^{1+}$ unter Verlust von HB und n Matrixmolekülen das Ion $((M-H)+Me)^{1+}$ freigesetzt (siehe auch Abbildung 6-8).

Die Reaktion 1a) in Tabelle 6-1 beschreibt die einfache Freisetzung eines protonierten Analytions $[M+H]^+$ aus einem Cluster der Form $\{nT---MH^+\}^{1+}$. Diese Reaktion wird nur dann auftreten, wenn die Protonenaffinität des Analyten höher ist als die der Matrix, was für Peptide/Proteine und "typische" Matrices wie DHB zutrifft. Sollte die Protonenaffinität geringer sein, erfolgt die Deprotonierung des Analytions gemäß folgender Reaktion:



Die Reaktion 3a) in Tabelle 6-1 beschreibt die Freisetzung eines kationisierten Analytions $M Cat^+$ aus einem $\{nT---M---Cat^+\}^{1+}$ -Cluster. Die Reaktion 2a) verdeutlicht, wie aufgrund des Abdampfens von neutralen Teilchen HB nach Rekombination von Gegenionen B^- und H^+ aus dem im Cluster $\{nT---MH_x^{x+}---(x-1)B^-\}^{1+}$ mehrfachprotonierten Analytion der Ladungszustand des Analytions bis zu $(M+H)^+$ reduziert wird.

Bei Reaktion 5a) in Tabelle 6-1 erfolgt unter Trennung von Radikal und Ladung die Protonierung des Analytmoleküls M durch ein radikalisches Matrixkation T^{*+} . Diese Reaktion entspricht dem von Ehring [Ehr92] vorgeschlagenen Mechanismus. Hierbei ist eine Reaktion ebenfalls nur möglich, wenn die Protonenaffinität des Analyten höher ist als die der Matrix.

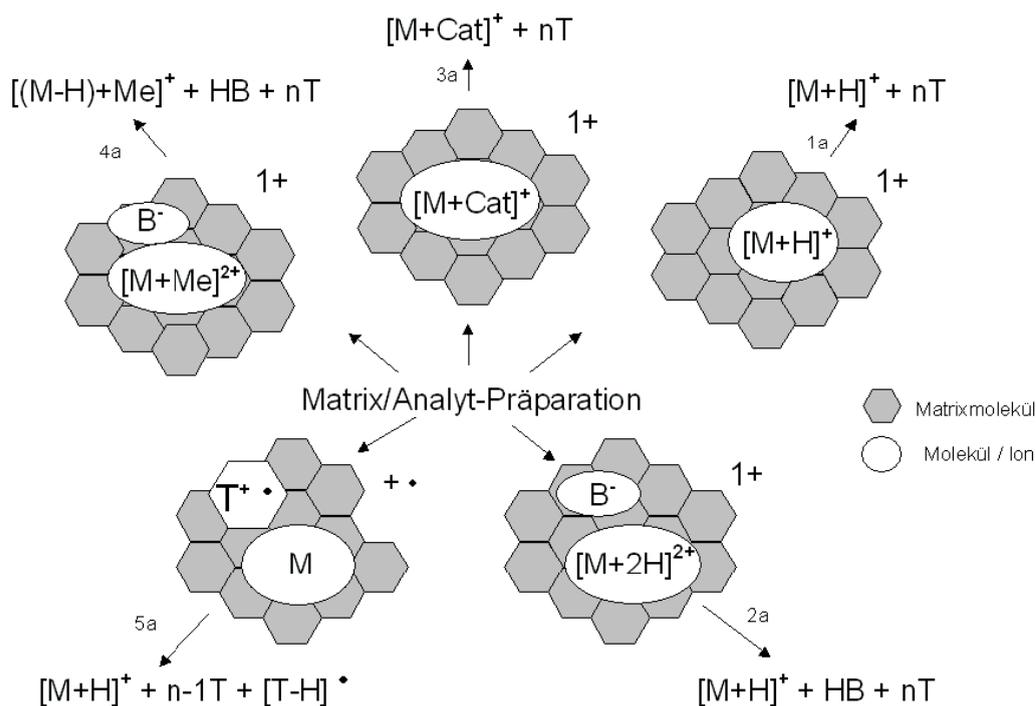


Abbildung 6-6 Positiver Ionenmodus: Einfache Cluster und deren ionische und neutrale Produkte (alle x = 2, zur Bezeichnung der Reaktionswege siehe Tabelle 6-1)

Im negativen Ionenmodus lassen sich analog zum positiven Ionenmodus folgende einfache Reaktionswege von negativ geladenen Clustern aufstellen.

Tabelle 6-2 Negativer Ionenmodus: Einfache Cluster und deren ionische und neutrale Produkte (alle x > 0)

| Cluster | Ionische und neutrale Produkte |
|--|---|
| (1b) $\{nT---(M-H)^-\}^{1-}$ | $\rightarrow (M-H)^{1-} + nT$ |
| (2b) $\{nT---(M-xH)^x---(x-1)baseH^+\}^{1-}$ | $\rightarrow (M-H)^{1-} + nT + (x-1)base$ |
| (3b) $\{nT---(M-xH)^x---(x-1)Cat^+\}^{1-}$ | $\rightarrow ((M-xH)^x+(x-1)Cat^+)^{1-} + nT$ |
| (4b) $\{nT---MH_x^{x+}---(x+1)B^-\}^{1-}$ | $\rightarrow (M-H)^{1-} + nT + (x+1)HB$ |
| (5b) $\{nT---M---B^-\}^{1-}$ | $\rightarrow (M-H)^{1-} + HB + nT$ |

Die Reaktion 1b) in Tabelle 6-2 beschreibt den einfachen Fall der Freisetzung eines $(M-H)^{1-}$ -Ions in die Gasphase.

Im Fall von Reaktion 2b) in Tabelle 6-2 ist das Kation Cat^+ durch $baseH^+$ (z.B. NH_4^+ mit der Base entsprechend dann NH_3) ersetzt. Nur in diesen Fällen werden freie Analytanionen durch Protonentransferreaktion entstehen. Sobald Na^+ oder allgemein Cat^+ vorhanden ist,

werden kationisierte Ionen detektiert. Dies erklärt den notwendigen Austausch von Kationen gegen NH_4^+ für die erfolgreiche MALDI-Untersuchung von zum Beispiel Oligonukleotiden [Sim97], [Cur93], [Zhu96b] (siehe 3b in Tabelle 6-2).

Im Fall eines Clusters, der einen neutralen Analyten sowie ein weiteres Anion enthält (5b, Tabelle 6-2), ist die Reaktion $\{n\text{T}---\text{M}---\text{B}^-\}^{1-} \rightarrow \text{M} + n\text{T} + \text{B}^-$ wahrscheinlich, da die Säure HB typischerweise eine wesentlich stärkere Säure als die Matrix oder der Analyt ist. Die Bildung von Analytionen ist dann nicht möglich.

Im Fall von Peptiden/Proteinen wird bei Carbonsäuren als Matrix der Analyt in Lösung und auch in der festen Matrix-/Analytpräparation protoniert vorliegen (siehe 4b, Tabelle 6-2). Insgesamt sind daher für Analytionen im negativen Ionenmodus geringere Ionenintensitäten zu erwarten, da nur dann aus einem Cluster, der einen mehrfachprotonierten Analyten enthält, ein negatives Ion freigesetzt werden kann, wenn die Zahl der Anionenladungen ebenfalls die Zahl der positiven Ladungen übersteigt. Die Intensitäten der Analytionen im positiven Ionenmodus werden daher im Vergleich zum negativen Ionenmodus für viele Peptide/Proteine erhöht sein (siehe Abbildung 6-6 und Abbildung 6-7), was in der Praxis auch festgestellt wird (siehe Kapitel 2.4.2.1).

Die in Tabelle 6-2 für den negativen Ionenmodus aufgestellten Reaktionen sind in folgender Abbildung dargestellt.

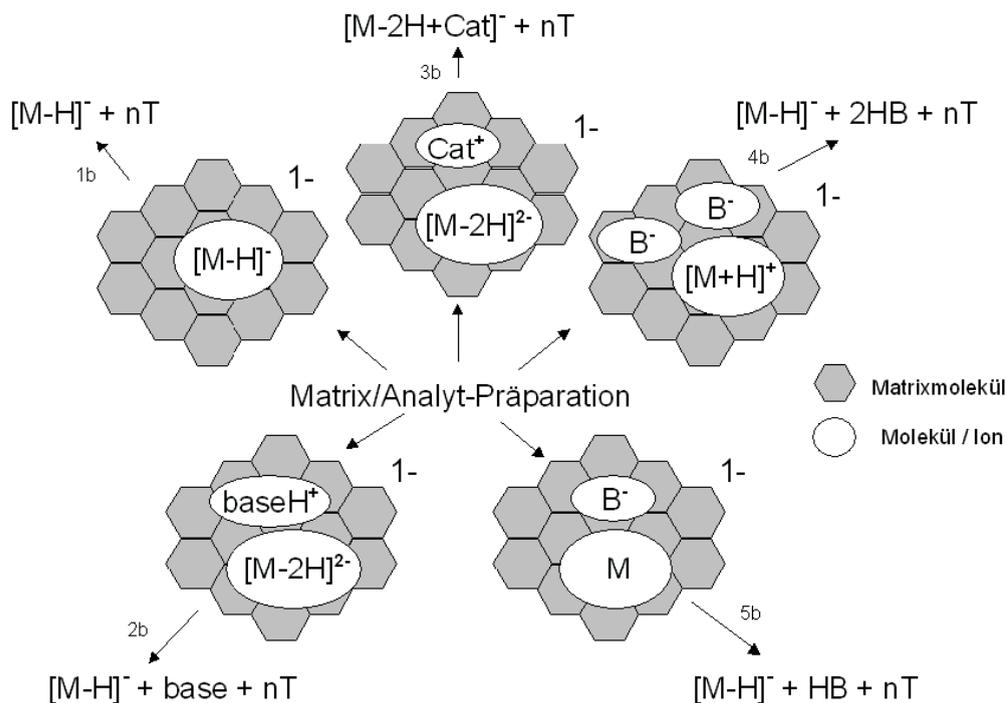


Abbildung 6-7 Negativer Ionenmodus: Einfache Cluster und deren ionische und neutrale Produkte (alle $x = 2$, zur Bezeichnung der Reaktionswege siehe Tabelle 6-2)

Auch zeigen Analysen, in denen zweifachgeladene Kationen (wie Zn^{2+}) enthalten sind, im wesentlichen nur einfachgeladene Ionen (siehe Abbildung 6-8). Hierbei werden im MALDI-Spektrum Ionen des Typs $[\text{M-H+Zn}]^+$ beobachtet, wenn der Analyt eine saure funktionelle Gruppe besitzt. Die Bildung von Clustern des Typs $\{\text{nT---M---B---Zn}^{2+}\}^{1+}$, gefolgt von dem Verlust des Neutralteilchens HB, kann hierbei zur Bildung eines $[\text{M-H+Zn}]^+$ -Ions führen.¹⁷⁷ Ob diese Ionen auch aus anionisierten Cluster $\{\text{nT---M---3B---Zn}^{2+}\}^{1-}$ unter Freisetzung der neutralen Säuren nach Protonentransfer gebildet werden, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Abbildung 6-8 zeigt einen Massenausschnitt des MALDI-Spektrums von Angiotensin II unter Zusatz von Zn(II)Cl_2 . Hierbei ist das Signal des $[\text{Peptid-H+Zn}]^+$ -Ions deutlich zu erkennen. Die theoretische Isotopenverteilung für das $[\text{M+Zn-H}]^+$ -Ion bei einer Auflösung von m/Dm 1550 (FWHM) ist in der Abbildung 6-9 dargestellt. Es kann hierbei eine sehr gute Übereinstimmung zwischen theoretischem und beobachtetem Ionensignal gefunden werden. Im Spektrum kann kein Signal des $[\text{M+Zn}]^{2+}$ -Ions detektiert werden.

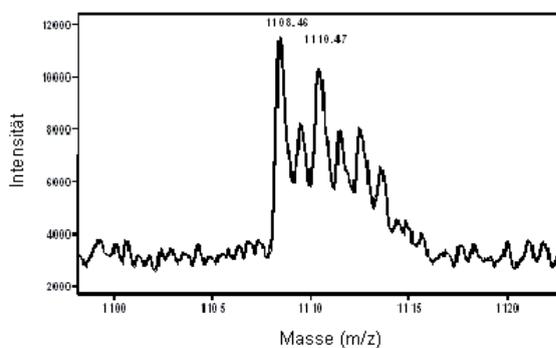


Abbildung 6-8 Reflektor MALDI-Spektrum von Angiotensin II¹⁷⁸ unter Zusatz von Zink(II)chlorid (Matrix DHB, Voyager DE PRO, $U_{ges} = 20$ kV, $G = 74$ %, $t = 180$ ns, Auflösung m/Dm 1570 (FWHM)). Das Ion $[\text{Peptid-H+Zn}]^+$ wird hierbei beobachtet

¹⁷⁷ Zur Bildung von spezifischen Peptid/Zink-Komplexen siehe [Leh99], [Mas99], [Woo95].

¹⁷⁸ Die monoisotopische Masse von Angiotensin II (mit der Summenformel $\text{C}_{50}\text{H}_{71}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$) ist 1045,5345 g/mol.

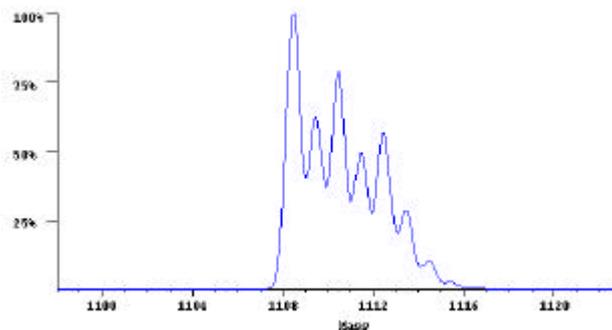


Abbildung 6-9 Theoretische Isotopenverteilung für das $[M+Zn-H]^+$ -Ion bei einer Auflösung von m/Dm 1550 (FWHM) (IsoPro Isotopic Abundance Calculator, Version 2.1, Tallahassee, FL, USA)

Neben der Beobachtung der Ladungsreduktion bei Analytionen durch Protonentransferreaktion können bei MALDI hochgeladene Ionen nach Freisetzung aus hochgeladenen Clustern durch Einfang von Elektronen aus Photoionisationsprozessen reduziert werden. Der Mechanismus des Einfangs von Elektronen durch mehrfachgeladene Ionen ist ein Weg den geringen Ladungszustand der MALDI-Ionen zu erklären, da mehrfach protonierte Molekülionen in der Gasphase stabil gegenüber Protonentransfer zu neutralen Matrixmolekülen (in Abhängigkeit von den Werten der Protonenaffinität) sind, was für Elektrospray-Ionisation zum Beispiel für das Lösungsmittel Wasser gezeigt werden konnte (siehe [Wil96] und darin enthaltene Quellen). Die Ladungsreduktion durch Elektronenaufnahme erfolgt bei MALDI bis zum Ladungszustand 1 oder 0. Die Ladungsreduktion sollte stark von der Ladung des Analyten abhängig sein, da der bei der Technik der *electron capture dissociation* (ECD) [Zub98] festgestellte Elektroneneinfang vom Quadrat der Ladung des Analyten abhängt [Zub00], [Zub98b]. Die im Spektrum vorhandenen höhergeladenen Ionen sind daher das Ergebnis eines insgesamt geringen Ladungszustandes bei MALDI sowie der Ladungsreduktion gemäß der in den folgenden Tabelle 6-3 und Tabelle 6-4 aufgezeigten Reaktionswege.

Ladungsneutralisation im positiven Ionenmodus kann weiterhin durch Reaktion mit Anionen (B^- , T^-) erfolgen. Im negativen Ionenmodus (siehe Tabelle 6-3) kann die Ladungsreduktion nicht über Elektronen erfolgen, eine Ladungsreduktion durch Reaktionen mit der protonierten Matrix ist hierbei jedoch möglich und aufgrund der großen Anzahl der protonierten Matrixmoleküle in der desorbierten Teilchenwolke wahrscheinlich. Bei einer basischen Matrix für den negativen Ionenmodus ist somit theoretisch eine höhere Intensität von mehrfach-negativgeladenen Ionen zu erwarten.

Tabelle 6-3 Clusterbildung und ionische Produkte < > (alle $x > y$, $y \geq 0$)

| Cluster | Produkte |
|---|--|
| | positive Ionen: |
| $\{nT---MH_x^{x+}---yB^-\}^{(x-y)+}$ | $\rightarrow \langle (M+(x-y)H)^{(x-y)+} \rangle + yHB + nT$ |
| | negative Ionen: |
| $\{nT---(M-xH)^x---ybaseH^+\}^{(x-y)-}$ | $\rightarrow \langle (M-(x-y)H)^{(x-y)-} \rangle + ybase + nT$ |

Der Einfang von Elektronen führt zur direkten Fragmentierung von polyprotonierten Ionen (siehe Tabelle 6-4). Die Fragmentierung von Molekülionen aufgrund des Einfangs von Elektronen (*electron capture dissociation*, ECD) kann analytisch in der Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie genutzt werden [Mcl99], [Zub00]. Da der Elektroneneinfang bei Analytionen, von Ausnahmen wie zum Beispiel dem Ethylviologen-Dikations abgesehen (siehe Abbildung 6-11), zur Fragmentierung führt, sind die einfachgeladenen Ionen, die meistens im Spektrum beobachtet werden, so etwas wie "glückliche Überlebende" (*lucky survivors*) [Kar00].

Die Ähnlichkeit der Fragmentierung bei ECD-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie [Zub00] und ISD-MALDI-Flugzeitmassenspektrometrie [Bro95b] ist hierbei von Krüger [Krü00] untersucht worden. Die experimentellen Untersuchungen zu verschiedenen Analytsubstanzen zeigen, daß die auf den Elektroneneinfang folgende Fragmentierung eine Erklärung für ISD bei MALDI und auch für das intensive chemische Rauschen in den MALDI-Spektren sein kann. Bei MALDI-Spektren ist häufig ein starkes Rauschsignal festzustellen, das gleichmäßig bei jeweils ganzzahligem m/z -Verhältnis bis zur Masse des Analyten detektiert wird (siehe zum Beispiel [Kat98]). Da die Masseninformation offensichtlich nicht verloren ist, müssen die Ionen, die dieses Rauschsignal erzeugen, relativ kurz nach dem Laserimpuls¹⁷⁹, d.h. noch beim Übergang des Festkörpers in die Gasphase entstehen. Ferner sind diese Ionen offensichtlich stabil gegenüber weiterer Fragmentierung, was die Frage nach der Struktur der Ionen im Rauschsignal aufwirft.

Tabelle 6-4 Hauptwege der Ladungsreduktion bzw. Neutralisation von Ionen bei MALDI (alle $x > y$, $y \geq 0$)

| Edukte | Reaktionsprodukte |
|---|---|
| $\langle MH_{x-y}^{(x-y)+} \rangle + (x-y-1)e^-$ | $\rightarrow \langle (MH_{x-y})^{1+(x-y-1)*} \rangle \rightarrow$ Fragmentionen |
| $\langle (M-(x-y)H)^{(x-y)-} \rangle + (x-y-1)MH^+$ | $\rightarrow (M-H)^{1-} + (x-y-1)M$ |

¹⁷⁹ Eine Zeit von maximal 200 ns der Entstehung dieser Ionen nach dem Laserimpuls muß bei der detektierten Auflösung angenommen werden.

Eine Bildung von höhergeladenen Ionen und anschließendem Einfang von Elektronen kann anhand der Analyse von einfachen Substanzen untersucht werden, die stabile Elektronenaddukte bilden, so daß der Elektroneneinfang nicht von Fragmentierungsreaktionen des Radikals versteckt wird. Ein Beispiel bietet hierbei das Ethylviologendibromid (1,1'-Diethyl-4,4'-bipyridiniumdibromid, 20 g/l, Wasser, Fluka (Deisenhofen, Deutschland) Strukturformel des Ethylviologen-Dikations siehe Abbildung 6-10), dessen Spektrum in Abbildung 6-11 gezeigt ist.

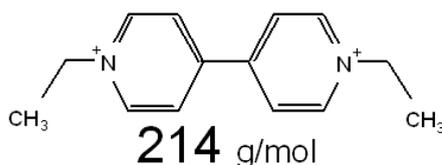
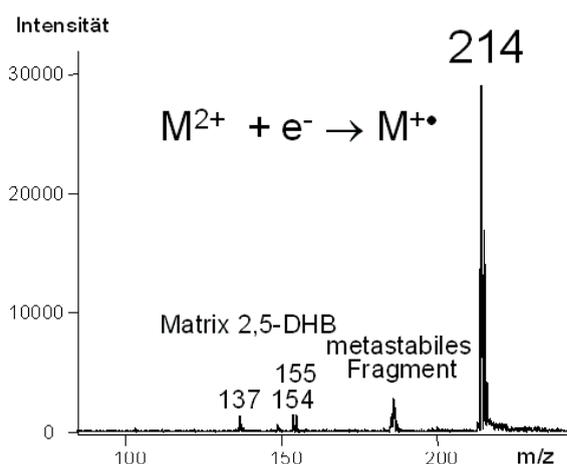


Abbildung 6-10 Das Ethylviologen-Dikation



**Abbildung 6-11 Reflektor MALDI-Spektrum von Ethylviologendibromid
(Matrix DHB, Voyager RP, $U_{ges} = 20$ kV; $G = 60$ %)**

Das Spektrum von Ethylviologendibromid aus der Matrix DHB in Abbildung 6-10 zeigt das Signal des partiell elektronen-neutralisierten, einfachgeladenen Ethylviologen-Kations. Ein Signal des M^{2+} -Ions kann nicht detektiert werden. Neben den verschiedenen DHB Matrixionen bei m/z 137, 155 und 154 wird auch ein metastabiles Fragmention¹⁸⁰ beobachtet. Ein ähnliches experimentelles Ergebnis für das Methylviologen ist ebenfalls als Beweis für die Einelektronenreduktion bei FAB [Cla84], [Rya80] genutzt worden. Vergleichbare Experimente bei SIMS zeigten ebenfalls einfachgeladene Ionen der Form $[M^{2+}+A]^{+}$, partiell elektronen-neutralisierte Ionen sowie Fragmentionen [Coo83].

¹⁸⁰ Das Fragmention mit Masse m/z 185 entsteht voraussichtlich unter Abspaltung eines Ethylradikals.

Im Fall von MALDI kann das $[M^{2+}+A]^{+}$ -Ion ebenfalls im MALDI-Massenspektrum auftreten, z.B. bei 1,12-Dodecanediyl-bis(tributylphosphonium)dibromid mit der Formel $[(C_4H_9)_3P^+(CH_2)_{12}P^+(C_4H_9)_3]^{2+} \cdot 2Br^-$ [Kar00], [Sch99b]. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur Elektrospray-Ionisation, wo für ähnliche Analyten sowohl das zweifachgeladene Kation¹⁸¹ als auch das einfachgeladene Ion, welches ein Anion enthält, beobachtet werden [Tag98].

Ein weiteres Beispiel bietet ein mehrkerniger Metallkomplex [Kar00], [Sch97], [Sch99b]; die Struktur dieses Komplexes besteht aus vier Cobalt(II)-Ionen sowie vier neutralen Liganden.¹⁸² Im Kristall gleichen acht PF_6^- -Ionen die Ladung aus. Im MALDI-Spektrum aus der Matrix HCCAamid wird jedoch statt eines Signals z.B. eines $[(Co(II)_4Ligand_4)^{8+}(PF_6^-)_2]^{6+}$ -Ions ein $[(Co(II)_4Ligand_4)^{8+}(PF_6^-)_2(e^-)_5]^{1+}$ -Ion beobachtet. Die Reduktion erfolgt hierbei nicht über den Verlust eines PF_6^\bullet -Radikals, was durch die Stabilität ähnlicher Komplexe in der Elektrospray-Massenspektrometrie gezeigt werden konnte [Hop99], sondern über Elektronen. Für obenstehendes Beispiel kann folgende Reaktionsgleichung aufgestellt werden: $[Komplex]^{6+} + 5e^- \rightarrow [Komplex]^{1+}$

Auch in diesem Beispiel kann die Reduktion von MALDI-Ionen durch Elektroneneinfang und der Ladungszustand sowie die Zusammensetzung der nach dem Laserimpuls freigesetzten Cluster gezeigt werden.

6.4 Diskussion (Teil II): Desorptions-/Ionisationsmodell

Eine wesentliche Funktion der Matrix ist die Verdünnung und die Isolation der Analytmoleküle. Hierdurch wird beim Eintrocknen der Matrix- und Analytlösungstropfen eine "feste Matrix/Analytlösung" gebildet. Eine weitere wichtige Aufgabe der Matrix besteht darin, als "Mediator" zur Einkopplung der Laserenergie zu dienen [Kar85], [Kar87], [Kar88], [Glü99b], [Zen98], [Str91], [Xia93], [All97], [Hil91]. Bei hoher Energiedichte innerhalb der Matrix findet ein explosiver Phasenübergang statt [Hil90], der am besten durch Bildung eines Überschallstrahls von Matrixneutralen und Ionen beschrieben werden kann, welcher die Biomoleküle mitreißt [Pac85], [Bea91]. Dieser Überschallstrahl kann experimentell durch die Messung der hohen initialen Geschwindigkeit [Juh97], [Glü99b] und der Startgeschwindigkeitsverteilung [Bea91], [Hut91], [Spe93] nachgewiesen werden.

Als neuen Gesichtspunkt für den MALDI-Mechanismus wird in dieser Arbeit die Bildung von Clustern, d.h. Bruchstücken aus Analyt- und Matrixteilchen, berücksichtigt. Die Freisetzung von geladenen Clustern unter Laserbestrahlung ermöglicht die Beschreibung der Freisetzung von geladenen Teilchen in die Gasphase und damit einen direkten, mit dem Materialabtrag verknüpften Ionisierungsmechanismus. Bei der Desorption gelangen geladene Teilchen in die Gasphase, der Prozeß der Desorption ist somit nicht vom Prozeß der Ionisation zu trennen. Dabei ist der wesentliche Schritt der Ionisation im statistischen Auftreten von geladenen Bruchstücken zu sehen, d.h. dem Überschuß von Anionen oder Kationen innerhalb eines Bruchstücks. Aus einem durch Laserbeschuß hochangeregten

¹⁸¹ Dieses Ergebnis bei Elektrospray-Ionisation beweist die Stabilität des M^{2+} -Ions in der Gasphase.

¹⁸² Der Komplex besteht hierbei aus vier Liganden 4,6-bis-(5"-tert-butylxytetramethylenoxymethyl-(2',2"-bipyrid-6'-yl))-2-phenylpyrimidine $[C_{48}H_{56}N_6O_4]$ mit vier Metallkationen $Co(II)$ und acht PF_6^- Anionen [Sch97].

Bruchstück wird durch Verlust von ungeladenen Matrixmolekülen oder anderen, z.B. Lösungsmittelmolekülen, ein geladenes Analytteilchen freigesetzt. Weiterhin wird die Photoionisation innerhalb der Matrix-Analyt Partikel im Fall von UV-MALDI als zweiter primärer Ionenbildungsmechanismus einbezogen.

Cluster bieten somit die "Reaktionsgefäße", in denen verschiedene sekundäre Reaktionen ablaufen. Nach Abdampfen von ungeladenen Matrix- und anderen Molekülen in der Gasphase (evtl. nach einfachen Protonentransferreaktionen) bleiben im analytisch relevanten Fall Analytionen übrig. Der Clusterzerfall führt zu geladenen Teilchen, deren Geschwindigkeit mit der Geschwindigkeit der neutralen Matrixmoleküle aus diesen Clustern vergleichbar ist. Aus dem Abdampfen von Neutralen aus diesen Clustern resultiert darüber hinaus eine Kühlung der ehemals eingebauten Biomoleküle. Es ist hierbei denkbar, daß die Matrixionensignale, die das Matrixspektrum repräsentieren, nicht in direktem Zusammenhang mit den Signalen der Analytionen stehen. Die Freisetzung von Analyt- und Matrixionen aus einem einzigen Cluster wäre nur möglich, wenn nach Verlust von ungeladenen Molekülen aus dem Cluster mehrere geladene Teilchen zurückblieben. Protonentransferreaktionen unter Bildung und nachfolgende Abdampfung von ungeladenen Teilchen, wie z.B. Matrix, Ammoniak (NH_3) oder Salzsäure (HCl), bewirken eine Ladungsreduktion von (ursprünglich) höhergeladenen "neutralisierbaren" Analyt-Ionen im Falle einfach geladener Cluster. Zusätzlich ist für hochgeladene Analyten auch eine initiale Bildung höher geladener Cluster wahrscheinlich. Im Falle positiver Ionen kann eine Ladungsreduzierung auf den Ladungszustand "1", wie im MALDI Massenspektrum typisch beobachtet, durch Aufnahme von Elektronen erfolgen. Durch Neutralisation von Ladungsträgern und auch durch Elektroneneinfang im Fall von positiven Ionen wird die Ladung von höhergeladenen Ionen reduziert, und nur die Ionen mit einem geringen Ladungszustand haben eine Chance zu überleben. Die dem Elektroneneinfang unmittelbar folgende Fragmentierung könnte eine Erklärung sein für die beobachteten schnellen, metastabilen Zerfälle von Ionen und somit das intensive chemische Rauschen in den MALDI-Massenspektren beschreiben. Die auf den Elektroneneinfang der Ionen folgende Fragmentierung erklärt die zunehmende Schwierigkeit, Massenspektren größerer Peptide und Proteine zu beobachten.

Das "Cluster"-Modell gibt eine einfache Beschreibung, warum im positiven Ionenmodus höhere Signalintensitäten für Peptide und Proteine beobachtet werden als im Negativionenmodus. Zum Beispiel muß, um ein durch ein Metallkation (Cat^+) kationisiertes Analytion (M) im Fall von Peptiden/Proteinen zu detektieren, ein mehrfachdeprotoniertes Analytion $[M-2H+\text{Cat}]$ im Cluster vorliegen, was unwahrscheinlicher ist als das Auftreten eines einfach kationenangelagerten Adduktes $[M+\text{Cat}]^+$ im positiven Ionenmodus. Genauso wird der schwierige Nachweis von polyanionischen Substanzen bei MALDI verständlich. Da Kationen als Gegenionen auftreten, müssen zur erfolgreichen MALDI-Massenanalyse Metallkationen gegen Gegenionen, wie z.B. Ammonium, ausgetauscht werden, die durch Protonentransfer neutralisierbar sind. Zusätzlich erklärt die Freisetzung von Elektronen auf der Basis der Elektroneutralität der desorbierten Teilchenwolke höhere Ionenintensitäten im positiven Ionenmodus bei UV-MALDI.

Bei positiven und negativen Ionen werden prinzipiell die gleichen Schwellbestrahlungen detektiert [Yau93]. Dies wird verständlich, da ein Abtrag einer Schicht aus Matrix und Analyt

bis zu einer bestimmten Tiefe unabhängig von der Ionenpolarität oder dem Ladungszustand der beobachteten Ionen erfolgt. Der Desorptionsprozeß bzw. die Ablation ist somit für positive und negative sowie auch für einfach- und mehrfachgeladene Ionen identisch. Zwar wird bei erhöhter Laserintensität eine größere Menge an Matrix- und Analytmaterial desorbiert (siehe Kapitel 5.2.2.3 zu Ergebnissen der Chitotetraose), die Zusammensetzung der Teilchenwolke ändert sich dadurch allerdings nicht wesentlich.

Die protonierten Peptide und Proteine zeigen im wesentlichen höhere Startgeschwindigkeiten als kationisierte Kohlenhydraten. Die großen Unterschiede zwischen Peptiden/Proteinen sowie Kohlenhydraten in der initialen Geschwindigkeit weisen auf einen unterschiedlichen Desorptions-/Ionisationsweg der beiden Analytklassen hin. Verschiedene Startgeschwindigkeiten konnten ebenfalls für Matrixionen bestimmt werden [Spe93], [Glü99], [Dwo98]. Da auch aus dem Innern einer DHB Präparation im wesentlichen langsame kationisierte Molekülionen und im Rand Molekülionen mit hohen Startgeschwindigkeiten detektiert werden, ist ein einfacher Ionisationsmechanismus über Cluster zur Beschreibung des Desorptions-/Ionisationsprozesses nicht ausreichend. Es ist daher notwendig, das "Cluster-Modell" zu erweitern. Die Berücksichtigung von Gasphasenprozessen bietet hierzu einen Ansatz. Das bisher beschriebene "Cluster-Modell" berücksichtigt im wesentlichen die Ionisation von Peptiden und Proteinen, zeigt allerdings auch auf, wieso gerade diese Analyten sich besonders für die MALDI MS anbieten. Zusätzlich besitzt das Modell nur eine geringe "Voraussagekraft". Ob eine Substanz als Matrix geeignet ist oder ob sie einen hohen bzw. geringen Grad an metastabiler Fragmentierung für zum Beispiel Peptide/Proteine zeigt, kann weiterhin nur experimentell bestimmt werden.

Kapitel 7

Ergebnisse

Alternative Präparationstechniken
Winkelabhängige Verteilung von v_0
Fragmentierung von Analytinen

7 Weitere Ergebnisse

Wie in Kapitel 5 bereits vorgestellt, gibt die axiale Startgeschwindigkeit die Möglichkeit, den Desorptionprozeß bei MALDI zu charakterisieren. In Kapitel 7.1 erfolgt eine Untersuchung der axialen Startgeschwindigkeit verschiedener Analyte bei "alternativen" Präparationstechniken. Es werden hierbei die Startgeschwindigkeiten verschiedener Analytionen aus Preßlingen von Analyt und Matrix sowie bei einer nano-Elektrospray-Präparation untersucht. Ziel ist es, durch klar definierte Präparationsbedingungen Unterschiede im Desorptions- und Ionisationsprozess verschiedener Analyte deutlich zu machen, die bei typischen *dried droplet*-Präparationen durch die Überlagerung verschiedener primärer und sekundärer Prozesse nur schwierig zu differenzieren sind. Die Experimente sollen die Unterschiede im Desorptionsprozeß verschiedener Analyte wie Peptide/Proteine und Kohlenhydrate deutlich machen, um so eine Erweiterung des eher auf die Klasse der Peptide und Proteine beschränkten "Cluster-Modells" zu ermöglichen. In Kapitel 5 sind bereits Ergebnisse der Startgeschwindigkeit von Peptiden/Proteinen im Vergleich zu Kohlenhydraten vorgestellt worden, in Kapitel 7.1 werden weitere experimentelle Ergebnisse zu diesen Substanzklassen gegeben.

Neben der axialen Startgeschwindigkeit ist auch die winkelabhängige Verteilung der Startgeschwindigkeit von Bedeutung (siehe Kapitel 7.3). Diese Verteilung der Startgeschwindigkeit soll dazu genutzt werden, die desorbierte Teilchenwolke bei MALDI im Sinne der Ausbildung eines Molekularstrahls, der zur Kühlung der im *jet* transportierten labilen Biomolekülonen erforderlich ist, zu beschreiben. Ein Zusammenhang zwischen Fragmentierung der Analytionen und der initialen Geschwindigkeit wird daher in Kapitel 7.5 diskutiert.

Die hier vorgestellten Ergebnisse erlauben eine Erweiterung des in Kapitel 6 behandelten Ionisationsmodells der Clusterionisation. Gasphasenionisierung kann als möglicher Mechanismus der Ionenbildung identifiziert werden, so daß in Kapitel 8 eine Erweiterung des Desorptions- und Ionisationsmodells erfolgt.

7.1 Alternative Präparationstechniken und Startgeschwindigkeit

Obwohl MALDI als Desorptions-/Ionisationstechnik seit nahezu fünfzehn Jahren [Kar85], [Kar87] erfolgreich in der Bioanalytik eingesetzt wird [Hil91], ist die Funktion der Matrix immer noch unklar. Viele der Ideen zur Funktion der Matrix sind bereits für andere Desorptions- und Ionisationstechniken vorgestellt und diskutiert worden, wie z.B. die Isolierung der Analytmoleküle durch die Matrix [Coo83b].¹⁸³ Untersuchungen von festen Präparationen [Kar88] und von Einkristallen verschiedener Matrices mit Proteinen haben zu dem Ergebnis geführt, daß im Fall von Peptiden und Proteinen die Analytsubstanzen in die Kristalle¹⁸⁴ der Matrix eingebaut werden [Str91], [Bea93], [Dok91], [Cha92], [Kam97]. Als eine der wesentlichen Funktionen der Matrix ist somit der Einbau der Analytmoleküle in die Matrixkristalle diskutiert worden. In Kapitel 7.1.2 werden Experimente zum Einbau verschiedener Analytsubstanzen in DHB-Matrixkristalle beschrieben. Über frühere Ergebnisse für Peptide und Proteine hinaus¹⁸⁵ werden neue Ergebnisse für Zucker vorgestellt.

Die Präparationsbedingungen der üblicherweise festen Matrix-/Analytproben für die MALDI-massenspektrometrische Analyse haben einen starken Einfluß auf den Desorptionsprozeß bei MALDI. So werden z.B. für einen gegebenen Analyt bei verschiedenen Präparationsbedingungen einer Matrix unterschiedliche Startgeschwindigkeiten detektiert (siehe Kapitel 5). Zudem zeigen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zucker im Gegensatz zu Peptiden und Proteinen verschiedene Startgeschwindigkeiten der Analytionen (siehe Kapitel 5). Wie im "Cluster-Modell" dargestellt (siehe Kapitel 6), besteht die Möglichkeit, daß Analytionen aus geladenen Clustern freigesetzt werden. Voraussetzung des Desorptions- und Ionisationsprozesses über geladene Cluster ist somit der Einbau der Analytteilchen in die Matrixkristalle. In diesem Kapitel werden daher verschiedene Präparationen von Analyt und Matrix untersucht, die einen Inkorporationsschritt der Analyte in die Matrixkristalle ausschließen. Erst durch erneute Lösungsmittelzugabe und Kristallisation von Matrix und Analyt aus einem Lösungsgemisch kann eine "feste Lösung" [Hil91] gebildet werden.

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß der Einbau von Analytmolekülen für den Nachweis von Biomolekülen bei Laserdesorption nicht unbedingt notwendig ist [Hor99], da für die Matrix 2,6-Dihydroxybenzoesäure (2,6-DHB), die Peptid- und Proteinanalyte nicht in Matrixkristalle einbaut, dennoch ein Analytsignal für Cytochrom C nachweisbar ist. Allerdings ist die Qualität der dabei generierten Massenspektren nicht mit der im Falle von 2,5-Dihydroxybenzoesäure, bei der der Einbau von Proteinen klar gezeigt ist, vergleichbar. Untersuchungen an Kristallen der Matrix 2,6-DHB mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie

¹⁸³ Diese Funktion der Matrix ist z.B. für FAB und SIMS [Bar81], [Hsu83] und auch für Laserdesorption [Zak81], [Wri85] diskutiert worden.

¹⁸⁴ Untersuchungen der Kristallstruktur verschiedener Matrices, z.B. 2,5-DHB [Hai82], Ferulasäure [Net88], 2,6-DHB [Gda94] und SINA [Lev81], zeigten keinen Zusammenhang der Kristallstruktur mit dem Einbau von Analytsubstanzen.

¹⁸⁵ Vergleiche hierzu die Ergebnisse zum Einbau von [Str91], [Bea93], [Coh96], [Spe94], [Kam97], [Hor98], [Hor99], [Hor00].

zeigten ebenfalls nur eine oberflächennahe Position der Analytsubstanzen [Hor00b]. Daraus ergibt sich die Frage, ob diese Ergebnisse auf einen Oberflächeneffekt zurückzuführen sind, wie er ebenfalls für SALDI (siehe Kapitel 2.2) bei stark absorbierenden Substanzen in Glycerol beobachtet wird. Hierzu werden Ergebnisse zur Abhängigkeit der Startgeschwindigkeit vom Grad des Einbaus der Analytsubstanz bei den Matrizes 2,4-Dihydroxybenzoesäure, 2,6-Dihydroxybenzoesäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure gegeben (siehe Kapitel 7.1.1). Das Problem, ob MALDI von Oberflächentechniken getrennt betrachtet werden muß, wird ebenfalls anhand verschiedener Präparationstechniken untersucht. Neben der Untersuchung von großen DHB-Kristallen und Standardpräparationen ist hierbei eine Präparation von gepreßter Matrix- und Analytsubstanz (siehe Kapitel 7.1.3) sowie eine Präparation von Analyten auf Matrixoberflächen mittels nano-Elektrospray (siehe Kapitel 7.1.5) genutzt worden. Weiterhin wird in Kapitel 7.1.6 die Startgeschwindigkeit von LDI- und MALDI-Ionen verglichen. Hierbei sind Fragen nach dem Zustand des Analyten in der Präparation (zum Beispiel seines Ladungszustandes) von Interesse.¹⁸⁶

Der Einbau verschiedener Analytsubstanzen ist somit auf folgende Fragestellungen hin untersucht worden:

- Ist der Einbau der Analytsubstanz eine Voraussetzung für eine erfolgreiche MALDI-Analyse?
- Wie können die verschiedenen Präparationsprotokolle für unterschiedliche Analytsubstanzen erklärt werden?

Die Startgeschwindigkeit von Ionen gibt hierbei die Möglichkeit, den Desorptionsprozeß bei MALDI zu charakterisieren.

¹⁸⁶ Die Ergebnisse dieses Kapitels sind in folgenden Tagungsbeiträgen präsentiert worden: [Glü99], [Pfe00], [Kar00b].

7.1.1 Einbauverhalten verschiedener DHB-Isomere

Bei der Untersuchung des Einbaus von Peptiden und Proteinen in Matrixkristalle konnte gezeigt werden, daß der Grad des Einbaus für verschiedene DHB-Stellungsisomere stark variiert [Str97], [Hor98]. Während DHB nahezu quantitativ Peptide und Proteine einbaut, zeigt 2,4-Dihydroxybenzoesäure (2,4-DHB) einen niedrigen und 2,6-Dihydroxybenzoesäure (2,6-DHB) keinen nachweisbaren Einbau.¹⁸⁷ Dennoch sind bei einer Laserwellenlänge von $I = 337$ nm alle diese Isomere als Matrices geeignet. Die Matrix 2,6-DHB zeigt insbesondere bei mikrokristallinen Oberflächen der Präparation gute Ionensignale. Die Startgeschwindigkeiten von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ sind bei Präparation mit diesen drei verschiedenen Isomeren der Dihydroxybenzoesäure als Matrix untersucht worden. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 7-1 zusammengefaßt.

**Tabelle 7-1 Startgeschwindigkeit von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$
($G = 92\%$, $U_{\text{ges}} = 25$ kV, $I = 337$ nm, Voyager DE)**

| Matrix | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|---------|-------------|-----------|------------------------|
| 2,6-DHB | 315 | 42 | 5 |
| 2,4-DHB | 238 | 23 | 5 |
| DHB | 543 | 40 | 15 |

Die Ergebnisse für die Startgeschwindigkeit von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ aus 2,4-DHB oder 2,6-DHB sind nicht vergleichbar mit dem von DHB (2,5-DHB). DHB zeigt eine wesentlich höhere Startgeschwindigkeit für $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ von $v_0 = 543 \pm 40$ m/s.

7.1.2 Untersuchungen zum Analyteinbau in Kristalle der Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure

Aus der Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure können mit Peptiden und Proteinen große Matrixkristalle erhalten werden, in die die Analytteilchen eingebaut (inkorporiert) sind. Die Matrix DHB eignet sich daher hervorragend zur Untersuchung des Einbauverhaltens von verschiedenen Analytsubstanzen. Mit großen DHB-Kristallen kann in den Massenspektren eine hohe Auflösung m/Dm für Cytochrom C im Reflektormodus erreicht werden. Die Auflösung m/Dm der Analytionensignale aus großen DHB-Kristallen ist weiterhin gegenüber der bei *dried droplet*-Präparationen von DHB leicht erhöht, was auf eine geringere Breite der Verteilung der initialen Geschwindigkeit in Folge dieser Präparationstechnik hinweist.

¹⁸⁷ Zu diesen DHB-Isomeren sind folgende Sublimationsenthalpien beschrieben worden: DHB 109 ± 3 kJ/mol, 2,6-DHB 111 ± 7 kJ/mol, 2,4-DHB 126 ± 6 kJ/mol [Pri99]. Die Matrix DHB hat die niedrigste Sublimationsenthalpie.

Der zur Messung der Startgeschwindigkeit von Peptid- und Proteinionen eingesetzte große Kristall aus DHB mit dem Analyt Cytochrom C hat eine Kristallform von ca. 6,8 x 0,5 x 1,6 mm. Die Flächen des Kristalls sind gemäß Abbildung 7-1 gekennzeichnet.

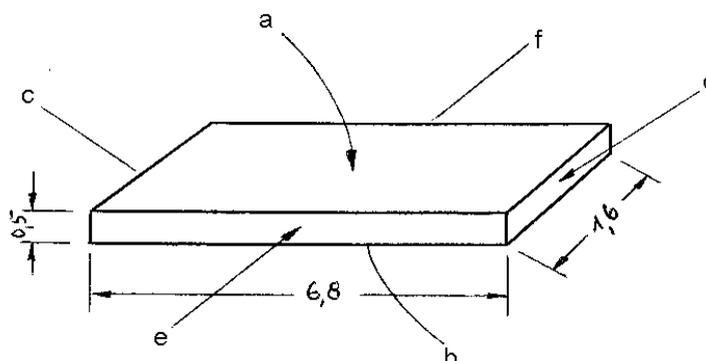


Abbildung 7-1 Bezeichnung der Kristallflächen des eingesetzten Cytochrom C/DHB-Kristalls

Zur Messung der Startgeschwindigkeit von $[\text{Cytochrom C+H}]^+$ von den Kristallflächen werden jeweils die Außenflächen des ursprünglichen Kristalls eingesetzt. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Messungen der Startgeschwindigkeit von den Kristallflächen *a*, *b*, *e* und *f* sowie von *c* und *d* nach Zerteilen des Kristalls wiedergegeben.

Tabelle 7-2 Ergebnisse für das Ion $[\text{Insulin+H}]^+$ desorbiert von DHB-Kristallflächen
($G = 92\%$, $U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $I = 337 \text{ nm}$, **Voyager DE PRO**)

| Kristallfläche | v_0 [m/s] | s [m/s] | Zahl der Einzelmessungen |
|----------------|-------------|-----------|--------------------------|
| a | 539 | 56 | 5 |
| b | 550 | 22 | 5 |
| c | 558 | - | 1 |
| d | 520 | - | 1 |
| e | 524 | - | 1 |
| f | 606 | - | 1 |

Es konnte experimentell eine (in etwa) gleiche Startgeschwindigkeit für alle Kristallflächen *a* bis *e* bestimmt werden. Von der Kristallfläche *f* wurde eine etwas erhöhte Startgeschwindigkeit von Cytochrom C erhalten.¹⁸⁸ Alle Kristallflächen zeigten jedoch die gleiche Qualität der MALDI-Spektren und die gleichen Laserschwellbestrahlungen. Für DHB-Einkristalle mit dem Analyt Substanz P wurden unterschiedliche Signalintensitäten von verschiedenen Kristallflächen berichtet [Bök95]. Im Gegensatz dazu zeigen die hier

¹⁸⁸ Voraussichtlich liegt hier ein Meßfehler vor. Weitere Messungen waren jedoch nicht möglich, da der Kristall sich vom Probenteller gelöst hatte und eine erneute Orientierung nicht mit hoher Sicherheit möglich war.

vorgestellten Ergebnisse jedoch weder eine Abhängigkeit der Signalintensität noch der Schwellbestrahlung von den Kristallflächen, von denen desorbiert wurde. Obwohl die DHB-Kristalle bei den Präparationen eine Verteilung aller möglichen Orientierungen zeigen, ist die Kalibrierung bei Standardpräparationen nicht davon abhängig, von welcher Kristallfläche von großen DHB-Kristallen desorbiert wird.

In verschiedenen Experimenten ist das Einbauverhalten von Proteinen und auch von Zuckern in DHB-Kristalle untersucht worden. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 7-3 zusammengestellt. Kristalle werden direkt ohne Waschen massenspektrometrisch bzw. nach Abspülen untersucht, wobei durch das Waschen Salzverunreinigungen von der Oberfläche der Kristalle entfernt werden.

Tabelle 7-3 Intensität von Ionensignalen verschiedener Analyte aus großen DHB-Kristallen
($U_{ges} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE PRO)

| Analyt | Ionensignal | Ionensignal von Kristallen | | Ionensignal nach Wiederauflösen | |
|----------------|-------------|----------------------------|-----------|---------------------------------|------------------|
| | | ungewaschen | gewaschen | ungewaschen | gewaschen |
| Cytochrom C | $[M+H]^+$ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Insulin | $[M+H]^+$ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Carboanhydrase | $[M+H]^+$ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| Maltotetraose | $[M+Cat]^+$ | + | - | ++ | - ¹⁸⁹ |

Die Intensität der Ionensignale im MALDI-Massenspektrum ist wie folgt gekennzeichnet: +++ sehr intensives Ionensignal, ++ intensives Ionensignal, + Ionensignal, - kein Ionensignal detektierbar.

Für Peptide und Proteine kann im Gegensatz zu Zuckern sowohl von den gewaschenen als auch von ungewaschenen Kristallen ein intensives oder sehr intensives Ionensignal des $[M+H]^+$ -Ions detektiert werden. Die Stabilität der Intensität des Ionensignals ist sehr hoch für proteindotierte große Kristalle der Matrix DHB. Für gewaschene Kristalle ist ein komplettes Fehlen der kationisierten Peptide und Proteine feststellbar.¹⁹⁰ Peptide und Proteine werden allerdings als $[M+H]^+$ detektiert. Innerhalb der Kristalle sind trotz der in der Lösung vorhandenen Alkaliverunreinigungen Alkaliionen nicht nachweisbar.

Für Zucker wird von ungewaschenen DHB-Kristallen ein intensives Signal des $[M+Cat]^+$ -Ions detektiert (mit Cat^+ für die Alkalimetallkationen Na^+ und K^+). Für gewaschene Kristalle konnten jedoch keine kationisierten Analytsubstanzen und damit auch keine Ionensignale der Zucker im MALDI-Massenspektrum festgestellt werden. Im Überstand der Kristalle kann nach MALDI-Standardpräparation der Analytzucker nachgewiesen werden. Nach Wiederauflösen der Zucker/DHB-Kristalle in Wasser/10mM NaCl und erneuter Präparation in

¹⁸⁹ Nach Zusatz von NaCl kann auch hier ein intensives Ionensignal (++) erhalten werden.

¹⁹⁰ Für Peptide und Proteine aus großen DHB-Kristallen hat Bökelmann [Bök95] bereits das Fehlen kationisierter Ionen festgestellt.

einer feinkristallinen *dried droplet*-Präparation kann gezeigt werden, daß in den großen DHB-Kristallen Zucker vorhanden ist. Da die Ionisation über Kationisierung erfolgt, kann jetzt ein Ionensignal festgestellt werden.

7.1.3 Untersuchungen zu Preßlingen aus fester Matrix- und Analytsubstanz

Zur Untersuchung ob eine Mischung der festen Analyt- und Matrixsubstanz - im Gegensatz zu einer "festen Lösung" für Peptide und Proteine (siehe Kapitel 6.1) - zum Nachweis von Biomolekülen bei Lasermassenspektrometrie ausreicht, wurden Preßlinge der festen Substanzen hergestellt. Das Gemisch aus Matrix und Analyt wird im Mörser fein verrieben und in einer Hochdruckpresse gepreßt. Alle Analyt-/Matrixpreßlinge (*pellets*) werden auf einen modifizierten Probenhalter aufgebracht und massenspektrometrisch untersucht. In folgender Abbildung 7-2 ist eine Ansicht dieses Probenhalters dargestellt. Die Preßlinge werden jeweils so aufgeklebt, daß ihre Oberfläche mit der ursprünglichen Oberfläche des Probentellers übereinstimmt.

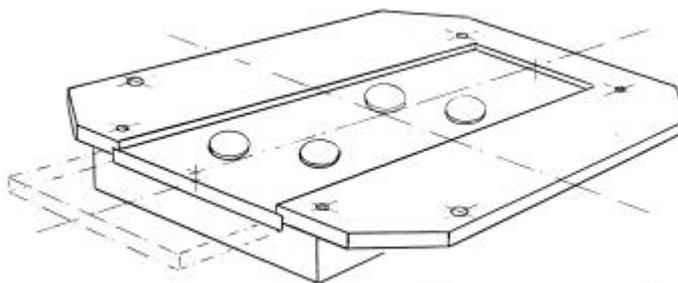


Abbildung 7-2 Skizzierter Probenhalter mit vier gepreßten Matrix-/Analytpreßlingen zur Untersuchung im Massenspektrometer

Die Ergebnisse zum Ionensignal verschiedener Analyte und Matrizes aus Matrix-/Analytpreßlingen sind in Tabelle 7-4 zusammengefaßt. Neben Preßlingen aus fester Analyt- und Matrixsubstanz sind ebenfalls große Kristalle der Matrix DHB, in die verschiedene Analyten inkorporiert waren, gemörsert und gepreßt worden.

Tabelle 7-4 Preßling aus Analyt und Matrix: Untersuchung der Signalintensität
($G = \text{div } \%$, $U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $I = 337 \text{ nm}$, Voyager DE PRO)

| | Preßling | Analyt | Signal aus Preßling |
|----------------------|---------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Peptide und Proteine | DHB | BSA FITC ¹⁹¹ | - |
| | 2,4-DHB | Cytochrom C | - |
| | 2,6-DHB | Cytochrom C | - |
| | 3HPA | Cytochrom C | - |
| | DHB | Cytochrom C | - |
| | Ferulasäure | Cytochrom C | - |
| | HCCA | Cytochrom C | + |
| | HCCA ¹⁹² | Cytochrom C | - |
| | 3HPA | Lysozym | - |
| | DHB | Melittin | - |
| | DHB | Insulin | + |
| | DHB/Kristall | Carboanhydrase | + |
| | DHB/Kristall | Cytochrom C | + |
| | DHB/Kristall | Insulin | + |
| Kohlenhydrate | Aminochinolin | Maltoheptaose | ++ |
| | ATT | Maltoheptaose | ++ |
| | CMBT | Maltoheptaose | ++ |
| | DHB | Maltoheptaose | +++ |
| | DHB | Maltoheptaose\Insulin | +++ (Maltoheptaose) - (Insulin) |
| | DHB | Maltotetraose | +++ |

Die Intensität der Ionensignale im MALDI-Massenspektrum ist wie folgt gekennzeichnet:
+++ sehr intensives Ionensignal, ++ intensives Ionensignal, + Ionensignal, - kein Ionensignal detektierbar.

Bei allen Matrizes, die getestet wurden, konnte (neben den Matrixsignalen) im Vergleich zu einer Standardpräparation kein intensives Protein- oder Peptidsignal detektiert werden (siehe Tabelle 7-4). Auch wenn Kristalle aus Protein und DHB gemörsert und gepreßt werden, ist ein Proteinsignal (wenn überhaupt) nur mit geringer Intensität nachweisbar.

¹⁹¹ BSA FITC: Bovines Serumalbumin (BSA) mit ca. 7-12 mol/mol Fluorescein-isothiocyanat (FITC) markiert.

¹⁹² Für HCCA wird aus der Oberflächenpräparation eine Desorption von dünnen Proteinschichten, die auf der Oberfläche der Matrix adsorbiert sind, vorgeschlagen [Che98]. Dies kann mit diesem Ergebnis widerlegt werden.

Um den Nachweis zu führen, ob genügend Analytsubstanz im Preßling vorhanden ist, wird ein Teil des Preßlings in geeignetem Lösungsmittel aufgelöst, in einer Standardpräparation präpariert und erneut massenspektrometrisch untersucht (siehe Tabelle 7-5).

Tabelle 7-5 Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung der Matrix/Analyt-Preßlinge nach Auflösen und erneuter Präparation
($G = \text{div } \%$, $U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $I = 337 \text{ nm}$, Voyager DE PRO)

| Preßling | Analyt | Konzentration [mg/ml] des gemörserten Preßlings im nebenstehenden Lösungsmittel | Lösungsmittel | Signal |
|--------------|----------------|---|---------------|--------|
| 2,4-DHB | Cytochrom C | ges. | ATW | + |
| 2,6-DHB | Cytochrom C | ges. | ATW | + |
| 3HPA | Cytochrom C | 20 | ATW | ++ |
| 3HPA | Lysozym | 25 | ATW | ++ |
| DHB | Cytochrom C | 30 | ATW | ++ |
| DHB | Insulin | 30 | ATW | +++ |
| DHB | BSA FITC | 30 | ATW | ++ |
| DHB | Melittin | 30 | ATW | +++ |
| DHB/Kristall | Carboanhydrase | 30 | ATW | +++ |
| DHB/Kristall | Insulin | 30 | ATW | +++ |
| DHB/Kristall | Cytochrom C | 30 | ATW | +++ |
| Ferulasäure | Cytochrom C | 10 | ATW | ++ |
| HCCA | Cytochrom C | 30 | Aceton | ++ |
| HCCA | Cytochrom C | 30 | Aceton | +++ |

Die Intensität der Ionensignale im MALDI-Massenspektrum ist wie folgt gekennzeichnet:
+++ sehr intensives Ionensignal, ++ intensives Ionensignal, + Ionensignal detektierbar.

Alle Preßlinge von Matrix und Peptid/Protein zeigen nach Auflösen in einem geeigneten Lösungsmittel und nach erneuter Präparation in der massenspektrometrischen Untersuchung ein intensives oder sehr intensives Analyt-Ionensignal (siehe Tabelle 7-5). Dies beweist, daß Analytsubstanz im Preßling in ausreichender Menge vorhanden war.

In folgender Abbildung 7-3 ist ein MALDI-Massenspektrum von einem Insulin/DHB-Preßling im Massenbereich m/z 5000 bis 6500 dargestellt. Es kann hierbei kein Ionensignal des Analyten Insulin detektiert werden. Nach Auflösen eines Teils des Preßlings aus Insulin/DHB (ca. 30 mg/ml, in ATW) ist jedoch ein deutliches Insulinsignal des $[M+H]^+$ -Ions erkennbar. Weiterhin ist aus dem aufgelösten Preßling eine große Zahl von Addukten z.B. der $[M+Na]^+$ oder $[M+K]^+$ Ionen zu registrieren.

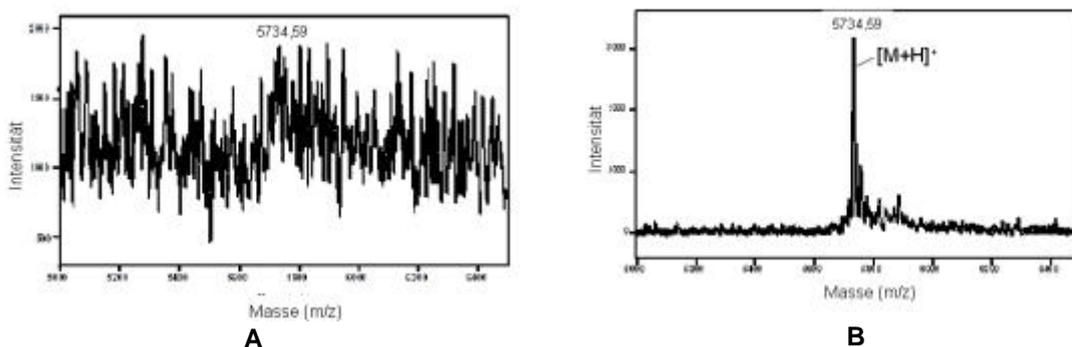


Abbildung 7-3 MALDI-Massenspektren von Insulin/DHB im Massenbereich m/z 5000 bis 6500:
(A) Aus Insulin/DHB-Preßling und (B) von wiederaufgelösten und in einer *dried droplet*-Präparation präpariertem Insulin/DHB-Preßling. (Voyager DE PRO, Linearmodus, $G = 94\%$ $U_{ges} = 25$ kV, $t = 150$ ns, $l = 337$ nm, Spannung am *guide wire* 0.3 % von U_{ges})

Obwohl in großen Kristallen aus Protein und Matrix das Protein eingebaut ist, kann nach dem Mörsern und Pressen des feinpulvrigen Feststoffes kein intensives Analytionensignal detektiert werden.

Nach dem Mörsern der trockenen Matrix- und Analytsubstanz über zehn Minuten kann für die Matrix DHB sowie den Analyten Melittin jedoch ein Ionensignal geringer Intensität detektiert werden. Hierbei ist eine gegenüber der *dried droplet*-Präparation stark erhöhte Laserbestrahlung notwendig. Es können die Startgeschwindigkeiten der Ionen $[\text{Melittin}+\text{Na}]^+$ und $[\text{Melittin}+\text{H}]^+$ vor und nach dem Anlösen der Oberfläche des Matrix- und Analytpreßlings untersucht werden (siehe Tabelle 7-6).

Tabelle 7-6 Startgeschwindigkeiten und Signalintensität der Ionen $[\text{Melittin}+\text{Na}]^+$ und $[\text{Melittin}+\text{H}]^+$ vor und nach Anlösen der Oberfläche eines Melittin/DHB-Preßlings ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE PRO)

| Melittin/DHB-Preßling | Ion | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente | Signal |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------------|-----------|------------------------|--------|
| "trocken" | $[\text{Melittin}+\text{H}]^+$ | 154 | 97 | 5 | + |
| | $[\text{Melittin}+\text{Na}]^+$ | 118 | 65 | 5 | + |
| mit 1 μl ATW angefeuchtet | $[\text{Melittin}+\text{H}]^+$ | 580 | 11 | 5 | +++ |
| | $[\text{Melittin}+\text{Na}]^+$ | 446 | - | 1 | + |

Die Intensität der Ionensignale im MALDI-Massenspektrum ist wie folgt gekennzeichnet:
 +++ sehr intensives Ionensignal, ++ intensives Ionensignal, + Ionensignal detektierbar.

Die Startgeschwindigkeit der Ionen $[\text{Melittin}+\text{Na}]^+$ und $[\text{Melittin}+\text{H}]^+$ aus dem trockenen Preßling sind vergleichbar mit der Startgeschwindigkeit von Kohlenhydraten. Nach dem Anfeuchten wird eine Startgeschwindigkeit gemessen, wie sie für *dried droplet*-Präparationen von Peptiden und Proteinen mit der Matrix DHB typisch ist.

Im Gegensatz zum Preßling mit Proteinen oder Peptiden zeigt ein Preßling mit Zucker als Analyt ein intensives oder sehr intensives Analytionensignal. Auch kann im Gegensatz zu den Spektren der Peptide/Proteine eine zur normalen Präparation vergleichbare Auflösung

erreicht werden. In folgender Abbildung ist ein Spektrum von Maltoheptaose¹⁹³ aus einem Preßling mit der Matrix DHB dargestellt.

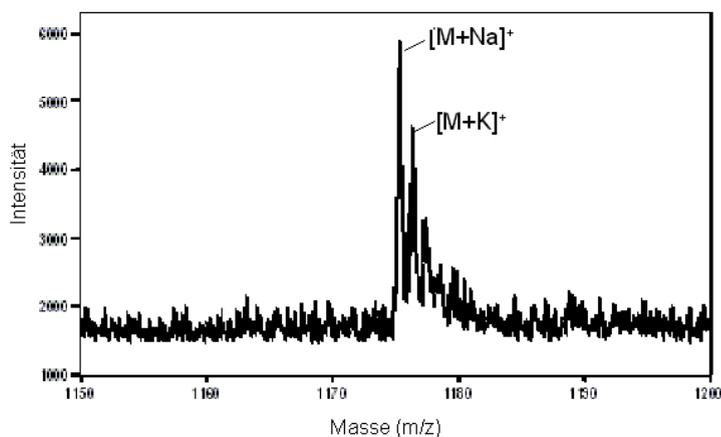


Abbildung 7-4 MALDI-Massenspektrum von Maltoheptaose aus einem Preßling mit DHB-Matrix (Voyager DE PRO, Reflektormodus, $G = 74\%$ $U_{ges} = 20\text{ kV}$, $t = 180\text{ ns}$, $l = 337\text{ nm}$)

Im Reflektormodus ist aus dem Zucker/Matrixpreßling eine zur Standardpräparation aus DHB/CMBT vergleichbare Auflösung von ca. 3500 FWHM für das Analyt [Maltoheptaose+Na]⁺ erreichbar. Maltotetraose zeigt aus dem DHB-Preßling hohe relative Ionenintensitäten des Analyten. Es wurde hierbei die Startgeschwindigkeit des Ions [Maltotetraose+Na]⁺ bestimmt. Hierbei ergibt sich ein Mittelwert von $v_0 = 237 \pm 118\text{ m/s}$ (fünf Messungen, vergleichbares Ergebnis zu Zuckern bei einer mikrokristallinen DHB *dried droplet*-Präparation).

7.1.4 Präparation von Analytlösung auf Matrixpreßlinge

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern das Aufgeben von Analytlösung auf Matrixpreßlinge ein Analytsignal liefert.¹⁹⁴ Die Ergebnisse werden in Tabelle 7-7 zusammengefaßt.

¹⁹³ Das [M+Na]⁺-Ion der Maltoheptaose hat eine monoisotopische Ionenmasse von 1175,3700 g/mol.

¹⁹⁴ Preßlinge der Matrix 3-HPA, DHB, SINA, HCCA sind bereits vorher als Matrixunterlage zur Präparation von Probenlösung eingesetzt worden [Hur94].

Tabelle 7-7 Präparation von Analytlösungen auf Matrixpreßlinge
($G = \text{div } \%$, $U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $I = 337 \text{ nm}$, Voyager DE PRO)

| | Matrixpreßling | Analyt | Signal | Fragmentationenintensität (im Vergleich zur Standardpräparation) |
|-------------------------|--------------------|---|--------|--|
| Peptide und Proteine | HCCA | Insulin | ++ | intensiver |
| | 3-HPA | Insulin | + | |
| | DHB | Insulin | +++ | |
| | SINA | Insulin | ++ | |
| Kohlenhydrate | CMBT (ungemörsert) | Maltotetraose | +++ | vergleichbar |
| | CMBT | Maltotetraose | +++ | vergleichbar |
| | CMBT | Verteilung neutraler Milchzucker aus Humanmilch | +++ | vergleichbar |

Die Intensität der Ionensignale im MALDI-Massenspektrum ist wie folgt gekennzeichnet:
+++ sehr intensives Ionensignal, ++ intensives Ionensignal, + Ionensignal detektierbar.

Hierbei konnte in jedem Fall ein in etwa vergleichbares Analytionensignal wie in einer Standardpräparation detektiert werden. Die aufpräparierte Analytsubstanz ist in allen Fällen der Präparation bei der Videobeobachtung im Massenspektrometer gut zu erkennen. Die Ergebnisse erreichen in Auflösung und Verhältnis von Signal zu Rauschen die der *dried droplet*-Präparation, allerdings ist diese Präparation komplizierter und der Verbrauch an Matrixmaterial wesentlich höher. Weiterhin wird keine vergleichbare Sensitivität erreicht, so daß diese Präparationsmethode für Routinemessungen wenig geeignet ist.

7.1.5 Nano-Elektrospraypräparation von Analyten auf Matrixoberflächen

In einer weiteren Serie von Experimenten sind Analytlösungen mittels Elektrospray auf Matrixoberflächen aufgebracht worden.¹⁹⁵ Hierbei sind Analytkonzentration und Öffnungsdurchmesser der Glaskapillaren variiert worden. Mittels nano-Elektrospray kann bei kleinen Öffnungsdurchmessern der Kapillaren der Analyt lösungsmittelfrei, d.h. "trocken" auf der Matrixoberfläche präpariert werden.¹⁹⁶ Hierbei sind als Matrixunterlagen Kristalle, *dried droplet*-Präparationen, gepreßte Matrix oder Oberflächenpräparationen genutzt worden (siehe hierzu Tabelle 10-3 in Kapitel 10). In Tabelle 7-8 sind die Ergebnisse für verschiedene Analytsubstanzen zusammengefaßt.

¹⁹⁵ Mittels Elektrospray sind bereits vorher Matrixschichten präpariert worden [Sad98], [Xia94b]. Weiterhin wurden von Thierolf [Thi99] Präparationen von nichtkovalenten Komplexen mittels nano-Elektrospray und Elektrospray untersucht.

¹⁹⁶ Untersuchungen des Tröpfchendurchmessers bei nano-Elektrospray in Abhängigkeit vom Kapillarendurchmesser belegen dieses experimentelle Ergebnis (A. Schmidt, Universität Frankfurt, unveröffentlichte Ergebnisse).

Tabelle 7-8 Signalintensitäten der Analytsubstanzen bei nano-Elektrospraypräparation von Analytlösungen auf verschiedene Matrixpräparationen (normale Präparationen und Preßlinge)

| Analyt | Matrix | Präparation der Matrix- unterlage | Signal | Auflösung <i>m/Dm</i> | Signal nach Auflösung mit 1 - 2 µl ATW |
|---------------|---------|--------------------------------------|--------|--------------------------|---|
| Maltotetraose | CMBT | nach [Pfe99] | ++ | + | o |
| | DHB | nach [Pfe99] | + | + | o |
| | CMBT | Preßling | + | + | o |
| | DHB | Preßling | ++ | + | o |
| Insulin | 2,6-DHB | Dünnschicht | - | - | +++ |
| | 2,4-DHB | Dünnschicht | - | - | + |
| | DHB | <i>dried droplet</i> | - | - | ++ |

Die Intensität der Ionensignale im MALDI-Massenspektrum ist wie folgt gekennzeichnet: +++ sehr intensives Ionensignal, ++ intensives Ionensignal, + Ionensignal, - kein Ionensignal detektierbar. Mit o gekennzeichnete Experimente wurden nicht durchgeführt. Im Fall der Auflösung *m/Dm* bezeichnet + eine zur Standardpräparation vergleichbare Auflösung.

Abbildung 7-5 zeigt ein MALDI-Massenspektrum von Maltotetraose/CMBT, wobei auf die Matrixoberfläche der Zucker mittels nano-Elektrospray präpariert worden ist.

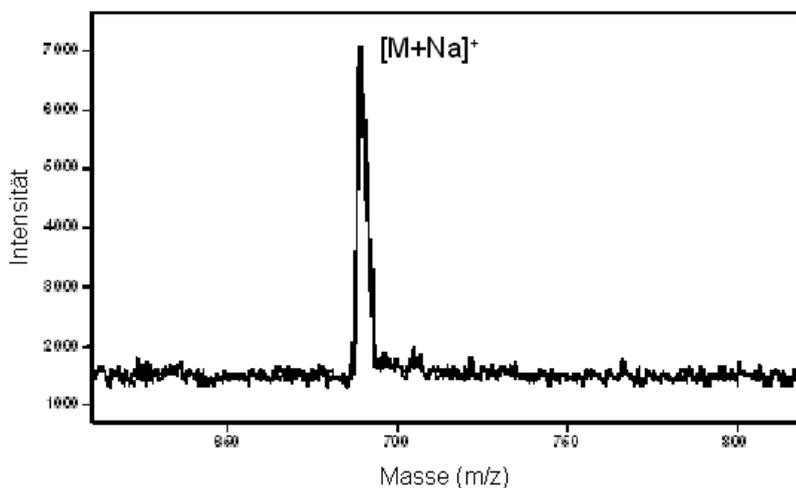


Abbildung 7-5 CMBT Unterlage mit Lösung von Maltotetraose mittels nano-Elektrospray "trocken" besprüht ($G = 75\%$, $U_{ges} = 20$ kV, $l = 337$ nm, Reflektor-Modus, Voyager DE PRO)

Die Präparation von Peptiden und Proteinen mittels nano-Elektrospray zeigt nur ein geringes bis kein Analyt ionensignal, während mit Zuckern intensive Ionensignale beobachtet werden können. Nach Zugabe von Lösungsmittel auf nano-Elektrospraypräparationen bei Peptiden/Proteinen kann auch für diese Substanzgruppe ein intensives Ionensignal detektiert

werden, was beweist, daß eine ausreichende Menge an Analytsubstanz auf der Oberfläche der Präparation vorhanden war.

7.1.6 Vergleich der Startgeschwindigkeit von LDI- und MALDI-Ionen am Beispiel Gramacidin S

Bei der Desorption des Peptids Gramacidin S mit der Matrix DHB (MALDI) oder direkt vom Probeneller (LDI) kann eine abweichende Startgeschwindigkeit der Ionen festgestellt werden [Glü99]. Laserdesorbierte Teilchen zeigen eine niedrigere Geschwindigkeit als MALDI-Ionen¹⁹⁷ [Pan92]. Tryptophan bei LDI zeigt zum Beispiel ein $v_0 = 195$ m/s [Spe88]. Für laserdesorbierte, photoionisierte Polymermoleküle sind weiterhin Startgeschwindigkeiten von 10 bis 150 m/s bestimmt worden [Hun91]. Die Desorption von Gramacidin S macht die Unterscheidung zwischen LDI- und MALDI-Ionen möglich, da mit Hilfe der Matrix im wesentlichen Ionen des Typs $[M+H]^+$ detektiert werden, während ohne Matrix Ionen des Typs $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ mit hoher relativer Ionenintensität zu beobachten sind [Ehr95b], [Wan93].

Laserdesorbiertes Gramacidin S zeigt im Massenspektrum eine im Vergleich zum MALDI-Fall wesentlich höhere Intensität an Fragmentionen. Aus dem mikrokristallinen Innern der DHB-Präparation können neben dem $[M+H]^+$ -Signal auch Signale des kationisierten Analytions, d.h. $[M+Na]^+$ oder $[M+K]^+$ detektiert werden. Für alle Ionen aus dem Innern der MALDI-Präparation werden niedrigere Werte der Startgeschwindigkeit als aus dem Rand der Präparation gefunden.

Tabelle 7-9 Startgeschwindigkeiten von $[Gramacidin\ S+H]^+$ (DHB/MALDI) bzw. $[Gramacidin\ S+Na]^+$ (LDI) ($G = 89\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

| Desorption | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| LDI | 11 | 25 | 5 |
| MALDI (DHB, mikrokristallin, innen) | 478 | 52 | 5 |

Im Fall der Laserdesorption ist somit für den Analyten Gramacidin S nur eine geringe Startgeschwindigkeit festzustellen. Aufgrund ihrer geringen kinetischen Energie legen die Gramacidin S-Analytionen nur eine geringe Strecke x [m] zurück (siehe Kapitel 5.1.1.1), so daß keine Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit festzustellen ist (siehe Abbildung 7-6).

¹⁹⁷ Hierbei sind verschiedene Startgeschwindigkeitsverteilungen von MALDI- und LDI-Ionen bestimmt worden [Pan92]. Die MALDI-Matrix Nikotinsäure zeigt ein mittleres $v_0 = 1000$ m/s mit einer Verteilung der Startgeschwindigkeit von 700-1300 m/s, [Arg]-Vasopressin (ebenfalls aus Nikotinsäure desorbiert) zeigt ein mittleres $v_0 = 1000$ m/s mit einer Verteilung von 400-1600 m/s ähnlich wie die pure Matrix. Bei LDI zeigt Gramacidin S ein $v_0 = 500$ m/s mit einer Verteilung von 300-700 m/s, FWHM 400 m/s [Pan92]. Diese Werte sind zwar nicht vergleichbar mit den hier vorgestellten Werten der Startgeschwindigkeit, jedoch konnte für laserdesorbierte Ionen ebenfalls eine geringere Startgeschwindigkeit detektiert werden als für MALDI-Ionen.

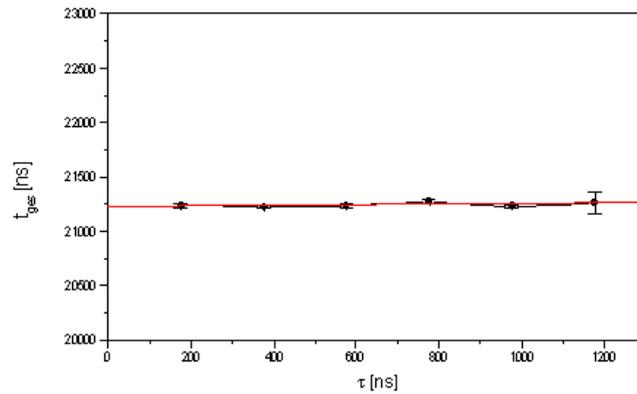


Abbildung 7-6 Startgeschwindigkeiten von [Gramicidin S+H]⁺ bei Desorption direkt vom Probeneller: Nahezu keine Abhängigkeit von t_{ges} gegen t ($G = 89\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

Auch wenn nur für eine geringe Zahl von thermisch sehr stabilen Peptiden nachweisbar, wird experimentell für laserdesorbierte Peptidionen eine niedrigere Startgeschwindigkeit bestimmt als für matrixunterstützt desorbierte Ionen.

7.2 Diskussion (Teil III): Querverbindungen - Alternative Präparationstechniken und Startgeschwindigkeit

Bei der Matrix 2,5-DHB konnte eine hohe Startgeschwindigkeit der Analytionen gefunden werden, während niedrigere v_0 -Werte für 2,4-DHB and 2,6-DHB detektiert wurden. Da für 2,6-DHB gezeigt werden konnte, daß kein Einbau von Peptiden oder Proteinen in die Matrixkristalle stattfindet [Hor99], ist der Einbau der Analytsubstanz keine notwendige Voraussetzung für die erfolgreiche lasermassenspektrometrische Analyse; Die Unterschiede im Einbauverhalten können hierbei mit den unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten in Verbindung gebracht werden. Es zeigt sich ein genereller Trend, daß bei größerem Grad des Einbaus von Peptiden und Proteinen auch höhere Startgeschwindigkeiten auftreten.

In Ergänzung zu früheren Ergebnissen zur Inkorporation von Peptiden und Proteinen [Str91], [Bea93], [Spe94] konnte ebenfalls für Zucker gezeigt werden, daß ein Einbau in DHB-Matrixkristalle erfolgt (siehe Kapitel 7.1.2). Somit werden Peptide/Proteine¹⁹⁸ und Zucker während der langsamen Kristallisation¹⁹⁹ in die Matrixkristalle inkorporiert, wobei Kationen ausgeschlossen werden. Für Zucker ist jedoch der Einbau in die DHB-Kristalle eher mit einem Intensitäts- und auch Sensitivitätsverlust im MALDI-Massenspektrum verbunden, da eine effektive Kationisierung aufgrund des Fehlens von Kationen innerhalb der Kristalle nicht stattfinden kann. Zucker werden effektiver detektiert, wenn feinkristalline Oberflächen der Präparation [Pfe99] mit hohen Salzkonzentrationen eine effektive Kationisierung erlauben.

Aus den Experimenten zum Einbau an Preßlingen und nano-Elektrosprayproben kann gezeigt werden, daß der Einbau für Zucker nicht unbedingt notwendig ist, und die Zucker im Gegensatz zu Peptiden und Proteinen auch dann detektiert werden können, wenn Analyt und Matrix in der Präparation "nur" in unmittelbarer Nähe auftreten. Während für Peptide und Proteine nur im Fall der "feuchten" Präparationen ein Ionensignal zu erhalten ist (und dann auch eine hohe Geschwindigkeit der Analytionen vorliegt), wird für kleine Oligosaccharide auch bei "trockenen" Präparationsschritten ein intensives Ionensignal festgestellt. Die relativen Unterschiede in Signalintensitäten und Startgeschwindigkeit zwischen Peptiden und Proteinen einerseits und kleinen Kohlenhydraten andererseits sind bei den verschiedenen Präparationen signifikant. Das Wiederauflösen der "trockenen" Peptid/Proteinpräparationen mit Wasser oder Lösungsmitteln generiert einen "Kokristall" aus Matrix und Analyt.

Da sich neben den fundamentalen Unterschieden im Einbau auch unterschiedliche Startgeschwindigkeiten der hier untersuchten Zucker bzw. Peptide/Proteine detektieren lassen, können auch verschiedene Desorptionsprozesse angenommen werden. Verdampfende Kristalle der Matrix im Sinne des Desorptionsmodells von Zhigilei [Zhi98] könnten eventuell ausreichend sein zur Desorption von kleinen, neutralen Oligosacchariden gefolgt von der Kationisierung in der Gasphase. Die gemeinsame Desorption (Kodesorption)

¹⁹⁸ Auch für Peptide und Proteine sind bereits Unterschiede in den Intensitäten von Ionensignalen in Abhängigkeit von der Präparation und den Eigenschaften des Analyten beschrieben worden. Siehe hierzu z.B. [Juh94], [Ama97].

¹⁹⁹ Vergleiche hierzu die Ergebnisse zum Einbau von [Dok91], [Str91], [Bea93], [Coh96], [Spe94], [Kam97].

einer dünnen Schicht von Analyt und Kation in diesem Fall führt somit zu Spektren der kationisierten Analytmoleküle. Eine Übereinstimmung der Startgeschwindigkeiten der hier untersuchten Oligosaccharide bei verschiedenen Präparationen deutet auf einen ähnlichen Desorptionsprozeß und auch auf ähnliche "Startbedingungen" von Analyt und Matrix bei allen Präparationen hin. Im Fall von kleinen Peptiden, die aus "trockenen" Präparationen untersucht werden, ist die Inkorporation ebenfalls auszuschließen. Es wird dann eine Startgeschwindigkeit beobachtet, die zu der kleiner Kohlenhydrate vergleichbar ist. Erst der Inkorporationsschritt, der eine Präparation aus gelöster Matrix und Analytsubstanz erfordert, führt zu den hohen initialen Geschwindigkeiten, die mit einer Desorption über Cluster (siehe Kapitel 6) korreliert werden kann. Basierend auf den obenstehenden Ergebnissen wird postuliert, daß der Einbau von Analytmolekülen in Matrixkristalle eine wesentliche Voraussetzung der Analyse labiler Biomoleküle (> 30 kDa) ist, auch wenn einige Matrices Signale für Analytionen im Massenspektrum liefern, ohne Analyteinbau zu zeigen. Hierbei könnte ein Oberflächeneffekt von Bedeutung sein, der eventuell vergleichbar zu SALDI [Sun95] oder dem Ansatz von Tanaka [Tan88] ist. Im folgenden werden Ergebnisse zur metastabilen Fragmentierung sowie eine Untersuchung der winkelabhängigen Verteilung der initialen Geschwindigkeit vorgestellt.

7.3 Winkelabhängige Verteilung der Startgeschwindigkeit

Aufgrund des Laserimpulses werden Neutralteilchen und Ionen aus der kristallinen Präparation von Matrix und Analyten desorbiert. Die Desorption resultiert in einer Überschallstrahlexpansion, die durch eine hohe axiale Startgeschwindigkeit charakterisiert wird. Neben dieser initialen Geschwindigkeit ist auch die Form der Verteilung der Startgeschwindigkeit von Analytionen in der Teilchenwolke von großer Bedeutung. Die Messung der initialen Geschwindigkeit in verschiedenen Winkeln zur Achse des Flugzeitmassenspektrometers erlaubt die Bestimmung der winkelabhängigen Verteilung der initialen Geschwindigkeit. Im folgenden sollen die Meßergebnisse vorgestellt werden [Glü00], [Glü00b], die mittels der "DE-Methode" innerhalb des gleichen Massenspektrometers unter der Verwendung eines modifizierten Probenhalters bestimmt wurden. Ionen werden aus großen DHB-Matrixkristallen oder von DHB *dried droplet*-Präparationen desorbiert, die Ergebnisse der Startgeschwindigkeit für Analytionen aus HCCA-Oberflächenpräparationen werden mit den v_0 -Ergebnissen von Analytionen aus der Matrix DHB verglichen.

Die Messungen wurden am Voyager DE-PRO durchgeführt. Ein modifizierter Probenhalter (siehe Kapitel 4.2.6) mit zusätzlichem Gitter (siehe Abbildung 7-7) erlaubt die Änderung der Normalen der Probenoberfläche gegenüber der Achse des Flugzeitmassenspektrometers in einem nahezu feldfreien Raum. Hierbei ist an diesem Massenspektrometer sowohl die Bestimmung der axialen Startgeschwindigkeit als auch der winkelabhängigen Verteilung der Startgeschwindigkeit möglich.

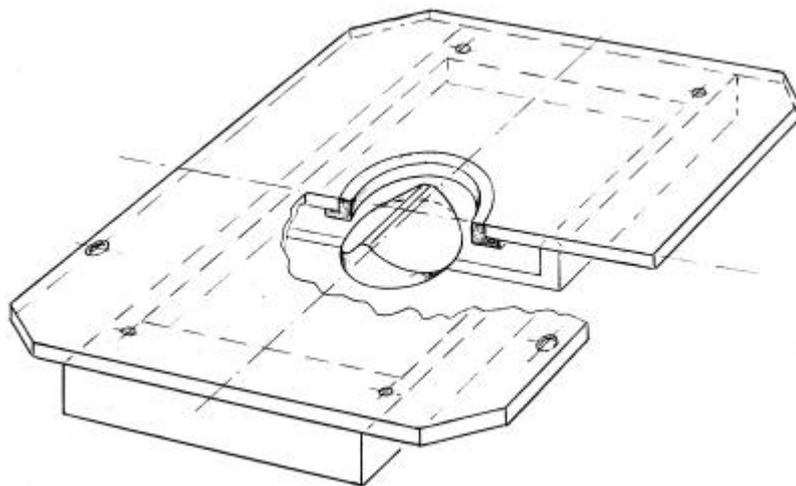


Abbildung 7-7 Modifiziertes Target mit zusätzlichem Netz zur Bestimmung der winkelabhängigen Startgeschwindigkeitsverteilung

Dieser Probenhalter erlaubt die Variation des Winkels J von 0° bis 45° zwischen der Achse des Flugzeitmassenspektrometers und der Normalen zur Oberfläche (zur Definition des Winkels J siehe Abbildung 7-8).

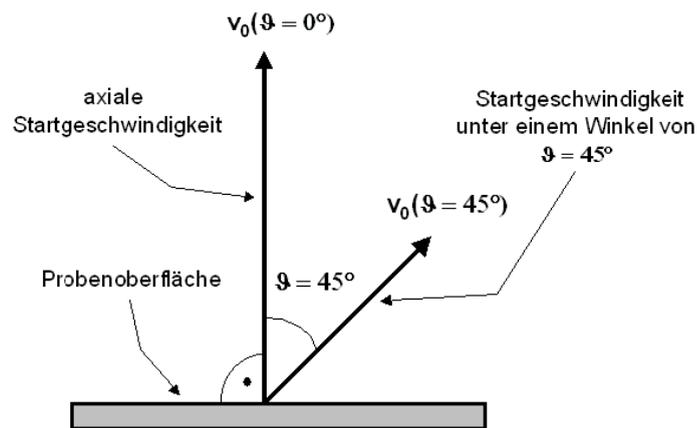


Abbildung 7-8 Die axiale Startgeschwindigkeit ist normal zur Probenoberfläche angeordnet ($J = 0^\circ$), unter dem Winkel $J = 45^\circ$ zur Normalen der Oberfläche wird beispielsweise die Startgeschwindigkeit $v_0(J = 45^\circ)$ bestimmt

Für alle Winkel erfolgen die Messungen unter den gleichen experimentellen Bedingungen (z.B. Feldeinstellungen). Ionen, die mit der initialen Geschwindigkeit v_0 (während der Verzögerungszeit ergibt sich eine feldfreie Driftstrecke innerhalb des Targets, siehe Kapitel 4.2.6) desorbiert werden, befinden sich bei Ende der Verzögerungszeit entweder innerhalb des modifizierten Probenhalters oder bereits in der ersten Strecke der Ionenquelle des Massenspektrometers. Es lassen sich somit zwei Fälle unterscheiden.

Für $t < t_{target}$ ist die eingestellte Verzögerungszeit t kürzer als die Flugzeit t_{target} der MALDI-Ionen innerhalb der neuen feldfreien Driftstrecke d_{target} . Die Steigung (als partielle Ableitung der experimentellen Flugzeit nach der Verzögerungszeit) wird $0 > dt_{ges}(exp)/dt < -1$, da die Flugzeit t_{target} der Ionen innerhalb des Probenhalters etwa konstant ist, jedoch die Gesamtflugzeit der Ionen um die angelegte Verzögerungszeit verkürzt wird.

Bei $t > t_{target}$ haben die Ionen die Beschleunigungsstrecke d_1 innerhalb der Ionenquelle erreicht. Die Steigung wird jetzt $dt_{ges}(exp)/dt = 0$ und kann zur Bestimmung der Startgeschwindigkeit aus der Abhängigkeit der Gesamtflugzeit t_{ges} gegen die Verzögerungszeit t genutzt werden.

In Abbildung 7-9 ist die experimentelle Abhängigkeit der Flugzeit von der Verzögerungszeit anhand von $[Insulin+H]^+$, desorbiert aus der Matrix HCCA, dargestellt. Bei einer Verzögerungszeit von ca. 200 bis 1100 ns wird $dt_{ges}(exp)/dt \approx 1$ aufgenommen, oberhalb von $t = 1100$ ns wird die für die "DE-Methode" typische Abhängigkeit der Flugzeit t_{ges} von der Verzögerungszeit t registriert.

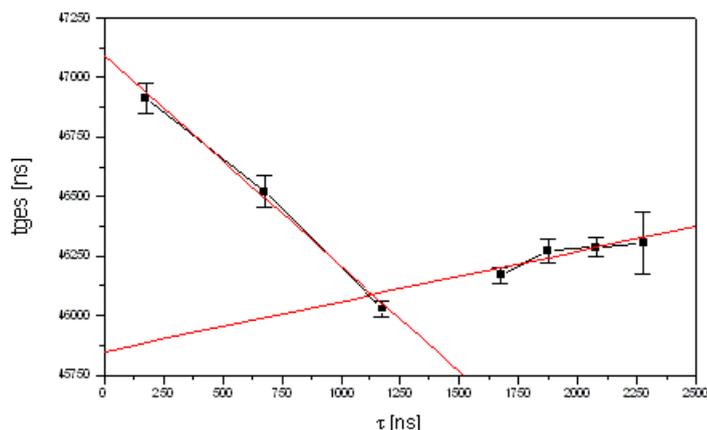


Abbildung 7-9 $[Insulin+H]^+$ desorbiert aus der Matrix HCCA: Bei $t > 1100$ ns wird die typische Abhängigkeit der Flugzeit registriert ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE PRO)

Mit Kenntnis der Strecke zwischen Probe und dem zusätzlichen Netz im Probenteller d_{target} kann die Startgeschwindigkeit aus $v_0 = d_{target} / t_{target}$ berechnet werden. Man erhält ein $v_0 = 862 \pm 27$ m/s für das Ion $[Insulin+H]^+$ aus der Matrix DHB. Für $[Insulin+H]^+/HCCA$ erhält man ein $v_0 = 413 \pm 52$ m/s (jeweils 5 Einzelmessungen). Diese Werte liegen höher als das mittels der "DE-Methode" bestimmte axiale v_0 , eine Bestimmung der Flugzeit t_{target} ist jedoch nicht mit zur "DE-Methode" vergleichbarer Genauigkeit möglich.

Aus der Abhängigkeit der Gesamtflugzeit gegen die Verzögerungszeit lässt sich bei Verzögerungszeiten über t_{target} eine Startgeschwindigkeit von $[Insulin+H]^+$ aus DHB von $v_0(J = 0^\circ) = 508 \pm 40$ m/s experimentell bestimmen. Hierbei werden die Ionen von einer Fläche direkt unterhalb des Netzes desorbiert. Die Startgeschwindigkeit von Insulin entspricht hierbei in etwa der Startgeschwindigkeit für Ionen, die direkt von der Oberfläche des

Probentellers desorbiert werden. Dies beweist, daß die Feldeinstellungen die Startgeschwindigkeitsbestimmungen gegenüber dem Fall der Desorption von der Probentelleroberfläche nur in geringem Maße beeinflussen.

Große quaderförmige Kristalle der Matrix DHB mit verschiedenen Analyten sind für die Messung der winkelabhängigen Verteilung der initialen Geschwindigkeit sehr geeignet, da sie eine definierte Oberfläche liefern. Kristalle von DHB mit Cytochrom C werden unter verschiedenen Winkeln von 0 - 45° unterhalb des Gitters im vertieften Probenteller plaziert. Die Messung der Startgeschwindigkeit ergibt so die Komponente der Startgeschwindigkeit in dieser Raumrichtung. In folgender Tabelle sind Ergebnisse für das Ion [Cytochrom C+H]⁺ von Cytochrom C aus Matrixkristallen zusammengefaßt. In verschiedenen Winkeln J werden unterschiedliche Startgeschwindigkeiten detektiert.

Tabelle 7-10 Winkelabhängige Verteilung der initialen Geschwindigkeit von [Cytochrom C+H]⁺ desorbiert von DHB Kristallen ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE PRO)

| Experiment | Winkel J (d_{target}) | $v_0(J)$ [m/s] | s [m/s] | Zahl der Einzelmessungen |
|------------|-----------------------------|----------------|-----------|--------------------------|
| 1 | 40° | 231 | 101 | 5 |
| 2 | 30° | 359 | 26 | 5 |
| 3 | 15° | 415 | 104 | 5 |
| 4 | 0° (1,6 mm) | 562 | 97 | 5 |
| 5 | 0° (0,1 mm) | 545 | 106 | 5 |

Ein Einfluß von d_{target} auf die v_0 -Werte kann vernachlässigt werden, da die Öffnung der CID-Zelle (siehe Kapitel 4.1.1) nur Ionen innerhalb eines engen Raumwinkels in die feldfreie Driftstrecke des Massenspektrometers gelangen läßt. Bei Cytochrom C konnte keine Abhängigkeit von d_{target} detektiert werden (siehe Tabelle 7-10). Hier sind die Werte für $J = 0^\circ$ bei $d_{target} = 1,6$ mm sowie bei $d_{target} = 0,1$ mm im Rahmen der Fehlergrenzen vergleichbar.

In Abbildung 7-10 ist die winkelabhängige Verteilung der initialen Geschwindigkeit von [Cytochrom C+H]⁺, desorbiert von großen DHB-Kristallen dargestellt (siehe Tabelle 7-10). Hierzu werden die Ergebnisse der vier Messungen (siehe Tabelle 7-10, Ergebnisse der Experimente 1 - 4) in einer Abbildung zusammengefaßt.

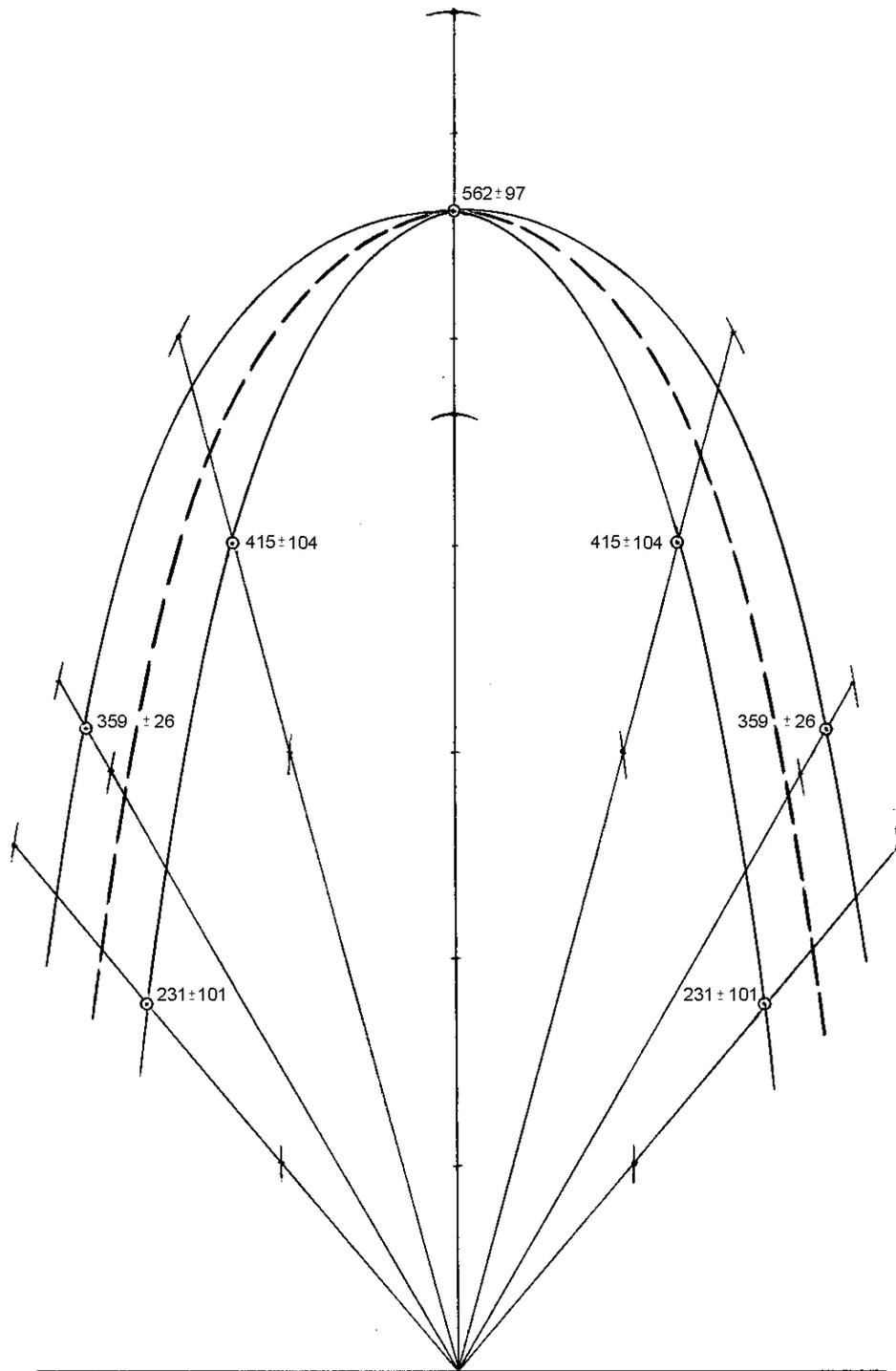


Abbildung 7-10 Winkelabhängige Verteilung der initialen Geschwindigkeit für $[\text{Cytochrom C+H}]^+$ aus großen DHB/Cytochrom C-Kristallen

Bei einem Winkel von 45° konnte bei zusätzlicher Drehung der Probe um 10° in der Ebene eine Startgeschwindigkeit von 258 ± 146 m/s gefunden werden (6 Messungen). Diese Messung zeigt, daß die Expansion zur Normalen der Probenoberfläche in etwa rotationssymmetrisch erfolgt. Weiterhin kann kein Einfluß des Einfallswinkels des Lasers

detektiert werden. Bei der hier vorgestellten Bestimmungsmethode lässt sich jedoch eine Neigung der Desorptionsachse zur Richtung des einfallenden Laserimpulses nicht erkennen, da aufgrund des experimentellen Aufbaus nur Winkel $J > 0^\circ$ untersucht werden können.

Der eingestrahelte Laserimpuls wird absorbiert, und die Emission der Teilchen erfolgt im wesentlichen normal zur Probenoberfläche (siehe Abbildung 7-11). In Teil A der Abbildung ist die bei den Voyager-Massenspektrometern für MALDI-Messungen rechtwinklige Anordnung des Probenhalters zur Achse des Flugzeitmassenspektrometers dargestellt. Diese Anordnung erlaubt die Bestimmung der axialen Startgeschwindigkeit. Teil B der Abbildung zeigt die Messung der Geschwindigkeit unter einem Winkel J . Hierbei erfolgt die Desorption der Teilchen ebenfalls normal zur Probenoberfläche, jedoch wird die Geschwindigkeit $v_0(J)$ der Ionen in Richtung der Achse des Flugzeitmassenspektrometers bestimmt.

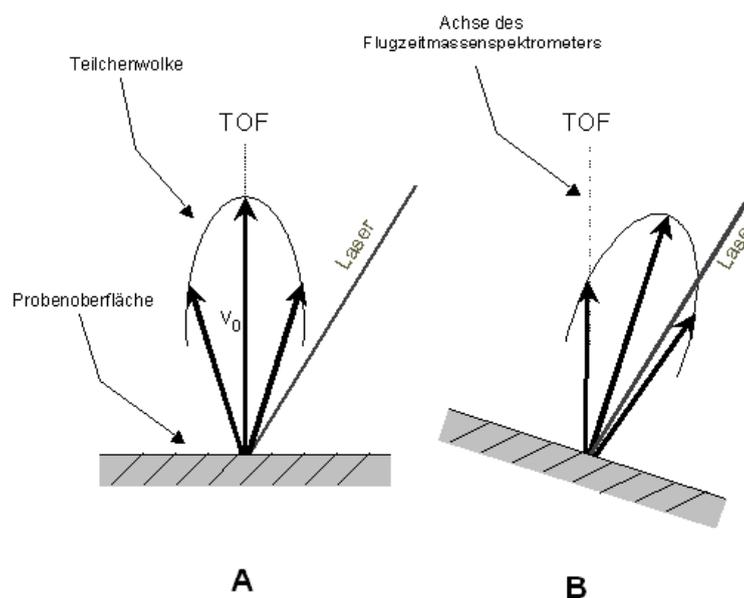


Abbildung 7-11 Messung der initialen Geschwindigkeit in Abhängigkeit vom Winkel der Normalen des Probenhalters im Verhältnis zur Achse des Flugzeitmassenspektrometers

Wie aus den Messungen deutlich wird, ist das aus der Optik bekannte Reflexionsgesetz (bei Spiegelung des Lichtes ist der Reflexionswinkel gleich dem Einfallswinkel) hier nicht anwendbar (siehe Abbildung 7-12). Die Emission im Sinne des Reflexionsgesetzes ist nicht zu erwarten, da eine elektronische Anregung durch den Laserimpuls stattfindet. Es erfolgt jedoch bei den hier eingesetzten Laserbestrahlungsstärken keine Impulsübertragung von Photonen auf Teilchen.

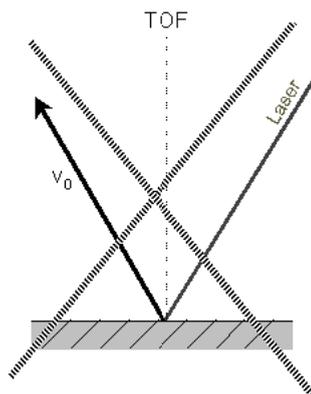


Abbildung 7-12 Die Desorptionsrichtung der Teilchen von der Oberfläche bei MALDI erfolgt nicht unter dem gleichen Winkel wie der Einfallswinkel des Laserlichtes

Die hier vorgestellten Messungen zeigen, daß die Ionen in etwa normal zur Oberfläche der Kristalle desorbiert werden. Sie stehen im Gegensatz zu Messungen in anderen Arbeitsgruppen, in denen eine Neigung der Verteilung der Ionen in Richtung des einfallenden Laserlichtes gefunden wurde [Aks95], [Joh98]. Dieser Effekt der Neigung der Desorptionsrichtung in Richtung des einfallenden Laserlichtes könnte z.B. auf die Bildung von Kratern im bestrahlten Material zurückzuführen sein [Bök95]. In Abbildung 7-13 wird die Entstehung eines Kraters im Matrixmaterial skizziert. Bei den ersten Laserimpulsen (Teil A) ist keine Beschädigung der Oberfläche zu erkennen. Erst nach weiteren Laserimpulsen (Teil B und C) erfolgt die Bildung eines Kraters, dessen Grund zum einfallenden Laserimpuls hin ausgerichtet ist. Dies führt zu einer verstärkten Ionenemission auf der Seite des Kraters, die bestrahlt wird.²⁰⁰

²⁰⁰ Kampmaier [Kam97] und Fournier [Fou98] untersuchten ebenfalls die Effekte der Laserablation von großen Matrixkristallen. Beide fanden Krater, die in die Richtung des Lasereinfalls geneigt sind.

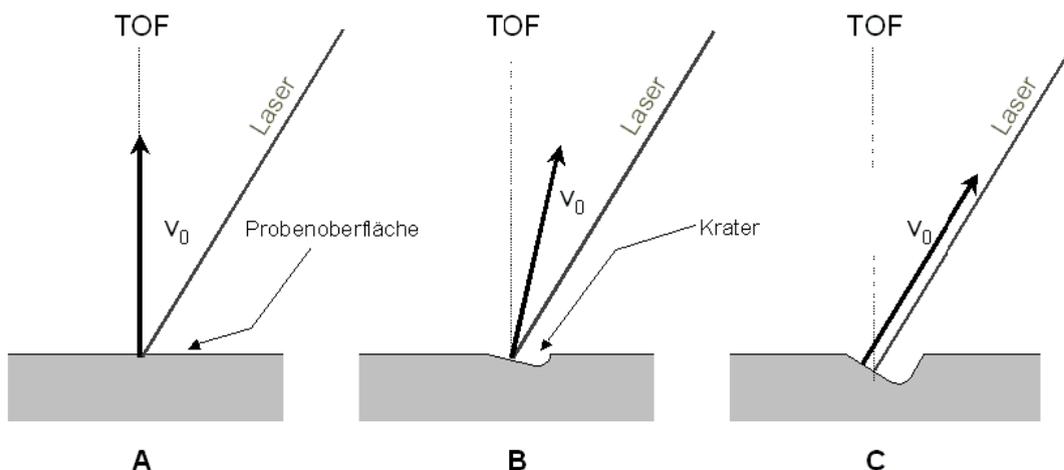


Abbildung 7-13 Durch mehrere Laserimpulse entsteht in der Probenoberfläche ein Krater: Dies führt zu einer Neigung der Emissionsachse der MALDI-Teilchenwolke zur Richtung des Laserimpulses hin

Neben den Messungen für Cytochrom C sind Werte der initialen Geschwindigkeit verschiedener anderer Ionen bei verschiedenen Winkeln J zur Achse des Flugzeitmassenspektrometers bestimmt worden, die in folgender Tabelle zusammengefaßt sind. Die hierbei vorgenommene Anpassung der Meßwerte der Startgeschwindigkeit unter verschiedenen Winkeln J erfolgt mit einer Funktion der Form:

$$v_0(J = 0^\circ) \cdot \cos^n(J) = v_0(J)$$

Im Fall der Matrix DHB wird $v_0(J = 0^\circ) = 543 \text{ m/s}$, im Fall der Matrix HCCA wird $v_0(J = 0^\circ) = 291 \text{ m/s}$ eingesetzt. Hierbei handelt es sich um die Werte der axialen Startgeschwindigkeit, die in Kapitel 5.2.1.1 zusammengefaßt sind.

Tabelle 7-11 Ergebnisse für verschiedene Ionen desorbiert aus DHB-Matrixkristall, normaler DHB/*dried droplet*-Präparation sowie HCCA-Oberflächenpräparation ($G = 92\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE PRO)

| Analytion | Präparation | $v_0(J)$ [m/s] | s [m/s] | Zahl der Einzel- messungen | Winkel J | n^{201} |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------|--------------|-------------------------------|------------|----------------------|
| [Insulin+H] ⁺ | DHB/ <i>dried droplet</i> | 362 | 107 | 5 | 45° | 1,17 ^(*) |
| [Insulin+H] ⁺ | DHB/Kristall | 228 | 99 | 5 | 45° | 2,50 ^(*) |
| [Leucine Enkephalin+H] ⁺ | DHB/ <i>dried droplet</i> | 216 | 61 | 2 | 45° | 2,66 ^(*) |
| [Carboanhydrase+H] ⁺ | DHB/Kristall | 517 | - | 1 | 40° | 0,18 ^(*) |
| [Carboanhydrase+H] ⁺ | DHB/ <i>dried droplet</i> | 502 | 180 | 4 | 40° | 0,29 ^(*) |
| [Insulin+H] ⁺ | HCCA-Oberflächen- präparation | 285 | 60 | 5 | 40° | 0,08 ^(**) |

(*) Anpassung von n in: $\cos^n(J)$ mit $543 \cdot \cos^n(\vartheta) = v_0(\vartheta)$

(**) Anpassung von n in: $\cos^n(J)$ mit $291 \cdot \cos^n(\vartheta) = v_0(\vartheta)$

Die experimentellen Ergebnisse der Startgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom Winkel J können jeweils mit einer $\cos^n(J)$ -Funktion angenähert werden. Die initialen axialen Geschwindigkeiten werden hierbei Kapitel 5.2.1.1 entnommen. Es wird für die Matrix HCCA ein $v_0(J = 0^\circ) = 291$ m/s und für die Matrix DHB ein $v_0(J = 0^\circ) = 543$ m/s eingesetzt. Für das Ion [Insulin+H]⁺ aus einem DHB-Kristall (siehe Tabelle 7-11) ergibt sich somit mit $n = 2,50$:

$$v_0(\vartheta = 45^\circ) = v_0(45^\circ) = 543 \cdot \cos^n(\vartheta = 45^\circ) \frac{m}{s} = 228 \frac{m}{s}$$

Wie man aus den Daten in Tabelle 7-11 erkennen kann, ergeben sich unterschiedliche experimentelle Werte des Exponenten n für verschiedene Analytionen, Matrices sowie Präparationen. Eine größere Breite der Verteilung der initialen Geschwindigkeit kann für Insulin bei einer *dried droplet*-Präparation im Vergleich zu DHB-Matrixkristallen gefunden werden. Eine Anpassung der experimentellen Werte von $v_0(J)$ mit einer $\cos^n(J)$ -Funktion zeigt folgendes Ergebnis:

$$n_{\text{Carboanhydrase}} < n_{\text{Insulin}} < n_{\text{Leucine Enkephalin}}$$

Die experimentell bestimmten initialen Geschwindigkeiten $v_0(J)$ für ein $J = 45^\circ$ sinken mit der Masse $v_0(45^\circ)_{\text{Carboanhydrase}} > v_0(45^\circ)_{\text{Cytochrom C}} > v_0(45^\circ)_{\text{Insulin}} > v_0(45^\circ)_{\text{Leucine Enkephalin}}$.

²⁰¹ Die Berechnung von n erfolgt mit: $\ln(v_0(\vartheta)/v_0(0))/\ln(\cos(\vartheta)) = n$

7.4 Startgeschwindigkeit und Fragmentierung

In diesem Abschnitt soll das Fragmentierungsverhalten von Analytionen aus verschiedenen Matrices im Zusammenhang mit der Startgeschwindigkeit untersucht werden. Es wird daher die metastabile Fragmentierung des Analytions $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ aus verschiedenen Matrixsubstanzen untersucht. Wie in Kapitel 7.1.6 dargestellt, zeigen laserdesorbierte Ionen einen verstärkten Grad der Fragmentierung gegenüber matrixunterstützten laserdesorbierten Ionen.

Für verschiedene Matrices wurde die Fragmentierung des Analytions Insulin (unter Abspaltung eines Moleküls Wasser) bei Reflektorbetrieb und verzögerter Extraktion untersucht. Die relative Signalintensität des Ions $[\text{Insulin}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ bezogen auf die Signalintensität des Ions $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ ist hierbei in Tabelle 7-12 angegeben. Die Ermittlung der Durchschnittswerte basiert hierbei jeweils auf zwölf Summenspektren.

Tabelle 7-12 Fragmentierung von Insulin: Mittlere Signalintensität von $[\text{Insulin}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ bezogen auf die Signalintensität von $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ ($U_{\text{ges}} = 20 \text{ kV}$, $G = 60 \%$, $t = 200 \text{ ns}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE, Reflektorbetrieb)

| Matrix | Mittlere Signalintensität [%] von $[\text{Insulin}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ bezogen auf $[\text{Insulin}+\text{H}]^+$ | Standardabweichung der mittleren Signalintensität [%] | v_0 [m/s] | s [m/s] |
|-------------|--|---|-------------|-----------|
| DHBs | 3 | 4 | 565 | 15 |
| DHB | 8 | 4 | 543 | 40 |
| Ferulasäure | 12 | 4 | 410 | 28 |
| SINA | 14 | 4 | 332 | 29 |
| HCCA | 22 | 6 | 291 | 51 |

Aus den Meßwerten in Tabelle 7-12 ist deutlich zu erkennen, daß Matrices mit hoher initialer Geschwindigkeit der Analytionen einen geringen metastabilen Fragmentierungsgrad für Analytionen aufweisen. Die experimentell festgestellte Verbreiterung des Ionensignals für Analytionen bei der Matrix DHB aufgrund von metastabilen Fragmenten ist wesentlich geringer als für die Matrices Ferulasäure und SINA [Hut92]. Dieses Ergebnis kann ebenfalls mit den Werten der Startgeschwindigkeit [Glü99b] korreliert werden.²⁰²

Die Fragmentierung von Insulin ist weiterhin ohne verzögerte Extraktion untersucht worden, wobei für alle Matrices ein wesentlich höherer metastabiler Fragmentierungsgrad der Analytionen festzustellen ist. Ebenfalls einbezogen wurde die Matrix DHB mit dem Zusatz

²⁰² Die Matrices DHAP und THAP sind bei der Untersuchung der Wasserabspaltung von Insulin als relativ schonend zu bewerten. Jedoch ist bei diesen Matrices keine zur Matrix DHB vergleichbare Spektrenqualität erreichbar, was darauf hindeutet, daß die Fragmentationsintensität des $[\text{Insulin}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ -Ions als "Sonde" zur Bewertung von Matrices nicht unproblematisch ist.

D(+)-Talose, für die eine hohe Startgeschwindigkeit der Analytionen festgestellt worden ist (siehe Kapitel 5.2.1.4).

Tabelle 7-13 Fragmentierung von Insulin bei kontinuierlicher Extraktion: Mittlere Signalintensität von [Insulin-H₂O+H]⁺ bezogen auf die Signalintensität von [Insulin+H]⁺ ($U_{ges} = 20$ kV, $G = 60\%$, $l = 337$ nm, Voyager DE, Reflektorbetrieb)

| Matrix | Mittlere Signalintensität [%] von [Insulin-H ₂ O+H] ⁺ | Standardabweichung der mittleren Signalintensität [%] | v_0 [m/s] | s [m/s] |
|----------------------|---|---|-------------|-----------|
| 3-HPA ²⁰³ | 8 | 5 | 620 | 87 |
| DHB/D(+)-Talose | 10 | 2 | 633 | 62 |
| DHBs | 12 | 2 | 565 | 15 |
| DHB | 26 | 14 | 543 | 40 |
| HCCA | 53 | 16 | 291 | 51 |

Eine hohe Startgeschwindigkeit und eine geringe Fragmentierung werden für die Matrix 3-HPA detektiert, während HCCA eine niedrige Startgeschwindigkeit und einen hohen Grad der metastabilen Fragmentierung der untersuchten Analytionen zeigt.

²⁰³ Die Matrix 3-HPA zeigt eine Startgeschwindigkeit der Analytionen von $v_0 = 620$ m/s bei einzelnen untersuchten Probenbereichen hoher Analytionenintensität.

7.5 Diskussion (Teil IV): Querverbindungen – Fragmentierung, Startgeschwindigkeit und winkelabhängige Verteilung von v_0

Ergebnisse für verschiedene Matrizes zeigen, daß niedrige Werte für v_0 im Fall mikrokristalliner, homogener Präparationen gefunden werden. Zum Beispiel werden mit der Matrix HCCA (Oberflächenpräparation) oder im Fall feinkristalliner DHB-Präparationen niedrigere Startgeschwindigkeiten der Analytionen detektiert als im Fall grobkristalliner Präparationen. Niedrige Werte von v_0 könnten mit einem oberflächennahen Einbau oder sogar völligem Fehlen des Einbaus der Analyte in die Matrixkristalle (siehe Kapitel 7.1.1 und 7.2) korreliert sein. Die hierbei beobachteten Unterschiede in Abhängigkeit von der Präparation übersteigen die durch Unterschiede in der Ionenemissionsachse zu erwartenden Werte bei weitem (siehe Kapitel 7.3).

Matrizes, die hohe Startgeschwindigkeiten aufweisen, sind für Peptide/Proteine schonender als Matrizes, die zu niedrigen Startgeschwindigkeiten der Analytionen führen. Es konnte eine Korrelation von hoher Startgeschwindigkeit und reduzierter metastabiler Fragmentierung der Analytionen für die Matrizes DHB, DHBs (oder DHB mit Zusatz von Monosacchariden) und 3-HPA gefunden werden. So zeigt die Matrix DHBs eine reduzierte metastabile Fragmentierung für Peptide und Proteine [Bah97]. Weiterhin wird 3-HPA als schonende Matrix für die MALDI-massenspektrometrische Untersuchung von Glykoproteinen oder Oligonukleotiden eingesetzt [Juh96], während HCCA eine verstärkte metastabile Fragmentierung für Peptide [Kar95], [Spe97] zeigt und daher für PSD-Untersuchungen eingesetzt wird.²⁰⁴ Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Experimenten von Stevenson [Ste00], die als Folge der Veröffentlichungen [Thi97], [Glü99b] durchgeführt wurden. Niedrige Startgeschwindigkeiten eines Ions sind bei den meistens mit einem erhöhten Grad an Fragmentierung verbunden. Die Ordnung einiger Matrizes nach steigender Startgeschwindigkeit ist in Abbildung 7-14 dargestellt.

²⁰⁴ Genauso wird die Matrix Bumetanid mit einer Startgeschwindigkeit der Analytionen von $v_0 = 350$ m/s zu PSD-Untersuchungen eingesetzt [Lav99].

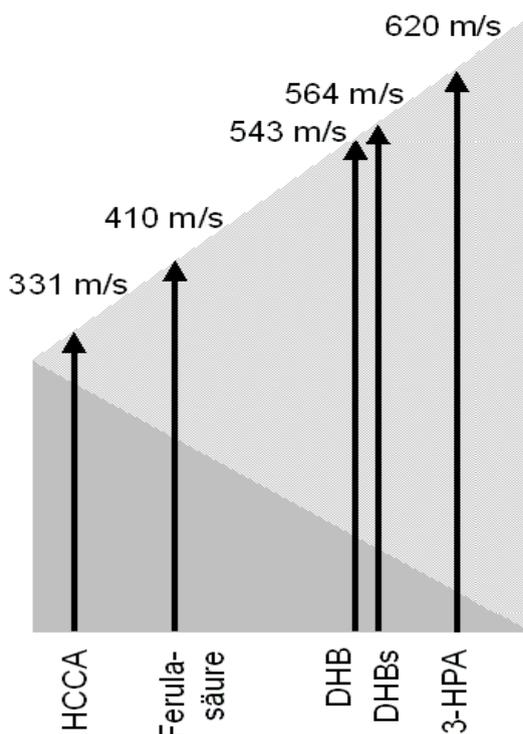


Abbildung 7-14 Startgeschwindigkeit verschiedener Matrizes für $[\text{Insulin}+\text{H}]^{+203}$: Bei steigender Startgeschwindigkeit (hellgrau unterlegt) wird eine reduzierte metastabile Fragmentierung (dunkelgrau unterlegt) festgestellt

Für die Matrix DHB unter Zusatz von D(+)-Talose wird ein zur Matrix DHBs vergleichbarer Fragmentierungsgrad gefunden. Eine hohe Startgeschwindigkeit der Analytionen kann somit für verschiedene Matrizes als Indiz für eine schonende Desorption herangezogen werden. Weiterhin kann die Analytionenstartgeschwindigkeit zur Beurteilung von Matrizes dienen.

Verschiedene Desorptionsmodelle nehmen die Bildung eines Überschallstrahls bei der Überführung des Matrix- und Analytmaterials in die Gasphase an. Ein Ansatz wäre es, mittels der Startgeschwindigkeit den Überschallstrahl bei der Desorption zu beurteilen. Eine schmale winkelabhängige Verteilung der initialen Geschwindigkeit, die einen ausgeprägten Überschallstrahl charakterisiert, kann ein Indiz für eine bessere Kühlung bei geringerer metastabiler Fragmentierung der im Molekularstrahl transportierten labilen Biomoleküle sein. Hier läge auch die Möglichkeit, die Korrelation zwischen hoher Geschwindigkeit der Analyten und geringer Fragmentierungsrate zu erklären.

Eine gemeinsame Darstellung der experimentell bestimmten axialen Startgeschwindigkeiten (siehe Kapitel 5.2.1.1) und der Ergebnisse der Startgeschwindigkeit aus Tabelle 7-11 für das Analyt $[\text{Insulin+H}]^+$ aus der Matrix DHB in einer *dried droplet*-Präparation, aus einem DHB-Kristall sowie aus einer HCCA-Oberflächenpräparation sind in Abbildung 7-15 dargestellt. Man erhält für die drei unterschiedlichen Kombinationen aus Matrix und Präparation jeweils eine zur Abbildung 7-10 vergleichbare Darstellung. Das Verhältnis von axialer Startgeschwindigkeit $v_{\text{axial}} = v_0(J = 0^\circ)$ zur Startgeschwindigkeit $v_J = v_0(J)$ unter einem Winkel $J = 45^\circ$ oder 40° ist jeweils angegeben. Deutlich ist für $[\text{Insulin+H}]^+$ -Ionen aus einem großen DHB-Kristall eine wesentlich schmalere winkelabhängige Verteilung der Startgeschwindigkeit im Vergleich zur *dried droplet*-Präparation mit DHB oder einer Oberflächenpräparation mit HCCA zu erkennen.

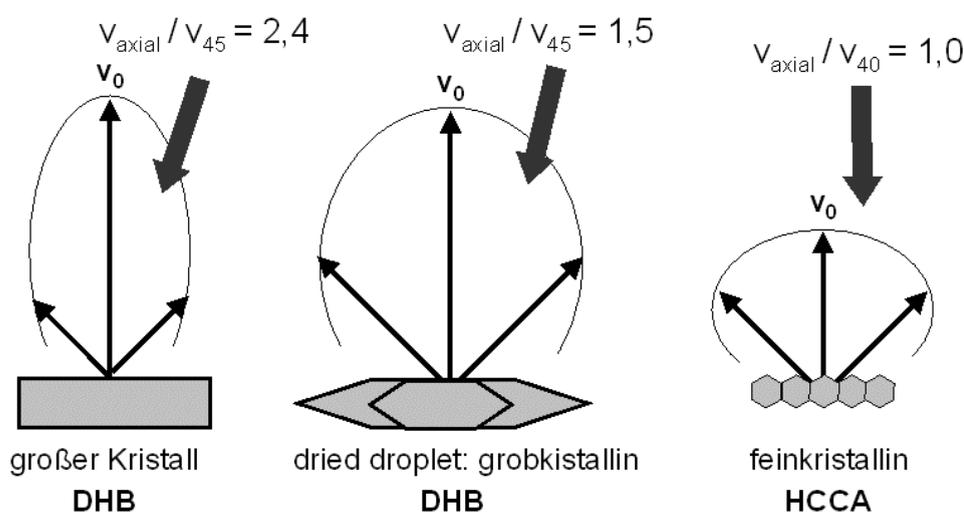


Abbildung 7-15 Verhältnis der axialen Startgeschwindigkeit $v_0(J = 0^\circ)$ zur Startgeschwindigkeit $v_0(J = 45^\circ$ oder $J = 40^\circ)$ von $[\text{Insulin+H}]^+$ bei Präparation aus verschiedenen Matrices

Die experimentellen Werte der winkelabhängigen Verteilung der initialen Geschwindigkeit sind ein Indiz für eine Überschallstrahlexpansion, wie sie ähnlich auch bei Düsenexpansionen stattfindet. Die Ergebnisse der winkelabhängigen Verteilung der Startgeschwindigkeit machen allerdings deutlich, daß eine nicht ideale Düsenstrahlexpansion bei MALDI anzunehmen ist, wie es bereits Spengler [Spe93] formuliert hat. Erst das hier vorgestellte Verhältnis der axialen Startgeschwindigkeit zur Startgeschwindigkeit $v_0(J = 45^\circ)$ bzw. $v_0(J = 40^\circ)$ bei gleichzeitiger Bestimmung der Intensitätsverteilungen macht jedoch eine Aussage über die Form der expandierenden Teilchenwolke bei MALDI möglich.

In moleküldynamischen Simulationen [Zhi98] zeigen alle Analyte unabhängig von ihrer Masse die gleiche axiale Geschwindigkeit, wohingegen die radiale Verteilung der Startgeschwindigkeit mit einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung für eine konstante Temperatur angepaßt werden kann. Somit wäre die Verteilung der radialen Geschwindigkeit mit der thermischen Anregung der Teilchenwolke verknüpft.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Messung der winkelabhängigen Verteilung der Startgeschwindigkeit, daß aufgrund der Mischung von axialen und radialen Geschwindigkeitskomponenten bei grobkristallinen Präparationen Probleme mit der Kalibrierung sowie eine schlechtere Auflösung zu erwarten sind. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei inhomogenen Probenpräparationen ein Kippen der Achse der Ionenemission zu einer Veränderung der Startgeschwindigkeit führt und somit die Kalibrierung verändert wird, da bei der Kalibrierung die Startgeschwindigkeit über die Projektion der Emissionsachse auf die Achse des Flugrohres eingeht. Weiterhin zeigen die Messungen, daß Ionenfokussierung (entweder durch *guide wire* oder andere ionenoptische Systeme) für Analytionen hoher Masse von großer Bedeutung ist, da die breite winkelabhängige Verteilung der Startgeschwindigkeit zu stärkeren Verlusten von Analytionen führt.

Kapitel 8

Desorption und Ionisation bei MALDI:
Erweiterung des "Cluster-Modells"

8 Erweiterung des "Cluster-Modells"

Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse kann die Startgeschwindigkeit von Ionen als ein Indikator für verschiedene Desorptionscharakteristiken angesehen werden. So kann mittels der Messung der Startgeschwindigkeit zwischen langsamen, laserdesorbierten Ionen (LDI) und MALDI-Ionen mit hohen Anlytionengeschwindigkeiten unterschieden werden. Laserdesorbierte Ionen zeigen im Vergleich zu MALDI-Ionen außerdem eine starke metastabile Fragmentierung (siehe Abbildung 8-1). Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist somit, daß die Idee eines einzigen MALDI Desorptions- und Ionisationsmechanismus aufgegeben werden muß. Es existiert ein fließender Übergang zwischen bislang zu LDI oder MALDI gezählten Prozessen. Die Desorption und Ionisation von Proteinen ist hierbei erst bei minimaler Anregung der Analytionen und damit geringer metastabiler Fragmentierung möglich, wie sie im Fall des "wahren", d.h. schonenden MALDI zu beobachten ist.

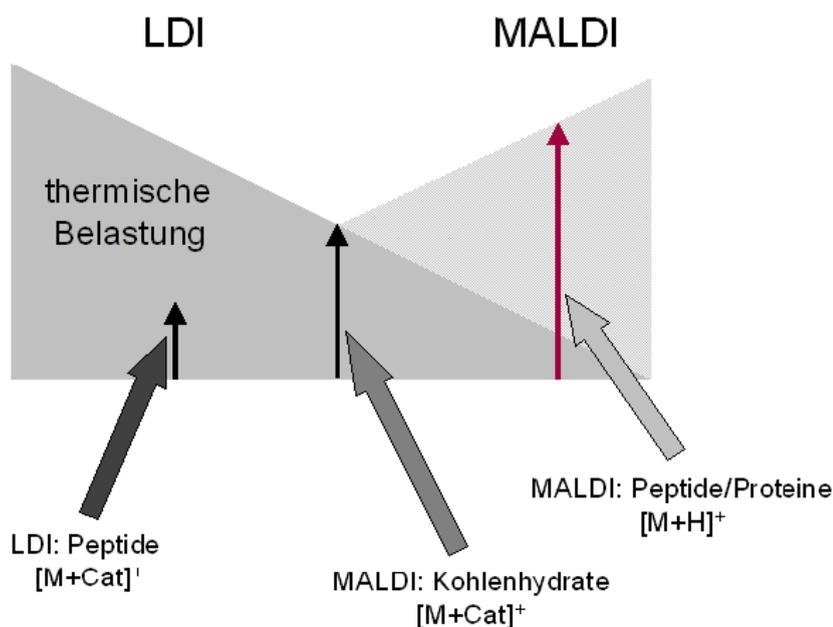


Abbildung 8-1 Laserdesorbierte Ionen zeigen gegenüber MALDI-Ionen einen erhöhten Grad der Fragmentierung

Viele theoretische Modelle sind zur Beschreibung der Desorption von Biomolekülen aufgestellt worden (siehe Kapitel 2.4.1) [Gar85], [Joh91], [Ver90], [Ver90b], [Mic83], [Sun88], [Beu87]. Das *breathing sphere*-Modell beschreibt jedoch die wesentlichen in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Ergebnisse zum MALDI-Desorptionsprozeß [Zhi98]. Eventuell ließe sich dieses Modell mit der Idee der Überschallstrahlkühlung sowie dem Gedanken verknüpfen, daß die Biomoleküle in der expandierenden Matrixteilchenwolke transportiert bzw. mitgerissen werden (*entrainment*).

Unter der Annahme der Korrelation der Menge des ablatierten Materials und der Dichte der Teilchenwolke sollte diese Menge mit der Eindringtiefe des Laserimpulses (und damit mit

dem Absorptionskoeffizienten der Matrix) verknüpft sein. Weiterhin ist anzunehmen, daß über die Energie, die zum Zerreißen des Festkörpers notwendig ist, ein Zusammenhang mit den Festkörpereigenschaften der Matrix besteht. Man kann daher davon ausgehen, daß die Startgeschwindigkeit eine Auskunft über die Bildung eines Überschallstrahls bei der Desorption gibt [Glü99b], [Ben97]. Die abgetragene Materialmenge wird durch die Eindringtiefe des Laserlichtes sowie durch die intermolekularen Kräfte innerhalb der Analyt-/Matrixpräparation bestimmt. Schonende Desorption von labilen Biomolekülen wird insbesondere für Matrizes beobachtet, bei denen Analytmolekülen mit hohen initialen Geschwindigkeiten registriert werden; Ein Zusammenhang zwischen der Menge des abgetragenen Materials und der Expansionskühlung innerhalb des Molekularstrahls erscheint daher wahrscheinlich. Die Startgeschwindigkeit ist somit ein Parameter zur Bewertung der Anwendbarkeit einer Matrix für ein analytisches Problem, da hohe Startgeschwindigkeiten über Expansionskühlung mit einer schonenden Desorption von Analytmolekülen verbunden sind.

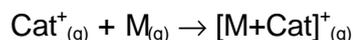
Analytionen können nur dann die matrixspezifische Startgeschwindigkeit zeigen, wenn die Ionen in der Matrix eingebaut sind. Nur im Fall des Einbaus werden Analytionen in der expandierenden Matrixwolke mitgerissen, und somit kann nur für diese Ionen eine effektive Kühlung erfolgen. Bei der Annahme von Clustern, die bei der Ablation des Materials entstehen, kann die Ionenerzeugung mit dem Ereignis der Ablation verbunden werden. Da unter erhöhtem Druck und stoßinduzierter Kühlung bei MALDI im orthogonalen Flugzeitmassenspektrometer die Existenz von Clustern nachgewiesen werden konnte [Ver99], bietet es sich an, Cluster als wesentlichen Schritt der Desorption/Ionisation vorzusetzen.²⁰⁵ Normalerweise werden bei UV-MALDI jedoch keine Cluster der Form $[n(\text{Matrix})+\text{Analyt}+\text{Ladung}]$ beobachtet, sondern typischerweise Ionen der Zusammensetzung $[\text{Analyt}+\text{Ladung}]$, d.h. die Energie innerhalb der Cluster aus Analyt und Matrix muß sehr viel größer sein als die Energie, die zur Sublimation der Matrixmoleküle benötigt wird. Eventuell kann diese Energie durch Stöße zwischen den Teilchen innerhalb der dichten Teilchenwolke aufgebracht werden.

Die Ergebnisse für den Einbau machen deutlich, daß für Peptide und Proteine der Einbau in die Matrixkristalle notwendig ist, um eine effektive, schonende Desorption und Ionisation von labilen Biomolekülen zu erlauben. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wird postuliert, daß die hohe initiale Geschwindigkeit das Resultat des Einbaus der Analytmoleküle ist und daß die effektive Kühlung der labilen Biomolekülen als Effekt einer Überschallstrahlexpansion (gemessen durch ein hohes Verhältnis von axialer zu radialer Geschwindigkeitskomponente) zu einer geringen Analytanregung und damit einer verminderten Fragmentierung führt. Einen experimentellen Hinweis bietet die breitere Verteilung der winkelabhängigen Startgeschwindigkeiten für die Matrix HCCA im Vergleich zur Matrix DHB. Erst der Einbau von präformierten Analytmolekülen in die Kristalle ergibt einen hohen Wert der Startgeschwindigkeit der Analytionen.

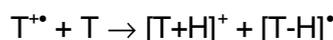
Neben der Freisetzung von Analytionen in der Gasphase aus geladenen Clustern kann auch eine Ionisation von neutralen Analytmolekülen in der Gasphase erfolgen. Außer der

²⁰⁵ Ebenso wurden Cluster bei MALDI von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen [Han99], [Han99b], [Fou00] experimentell beobachtet.

Kationisierung von Analyten in der Lösung kann somit auch eine Kationisierung in der *selvedge*-Region auftreten, was aus unterschiedlichen Desorptionsgeschwindigkeiten von Ionen geschlossen werden kann. So kann durch Mischung der Ionenwolke von laserdesorbierten Alkalimetallkationen und von einem weiteren Laser desorbierten neutralen Analytmolekülen eine verstärkte Kationisierung in der Gasphase gemäß folgender Reaktion festgestellt werden [Wan93], [Mow97]:

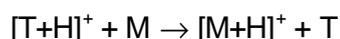


Bei steigender kinetischer Energie der Kationen sinkt jedoch die Wahrscheinlichkeit der Adduktbildung [Lia95]. Bei verzögerter Extraktion kann bei erhöhten Verzögerungszeiten ebenfalls eine verstärkte Kationisierung nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.2.2.3). Neben der Kationisierung könnte in der Gasphase auch ein Protonentransfer gemäß folgender Reaktion möglich sein [Ehr92]:



Hierbei kann das Radikal eventuell freie Elektronen einfangen, wodurch wiederum ein $[\text{T-H}]^-$ -Ion resultiert.²⁰⁶

Analysen der Flugzeitspektren von Analytionen zeigen Unterschiede der kinetische Energie der Ionen. Dies kann neben der verzögerten Freisetzung der Ionen aus Clustern auch auf Protonenübertragungsreaktionen in der Gasphase gemäß folgendem Reaktionsmechanismus zurückgeführt werden [Kin97], [Pre97]:



Für kleine Oligosaccharide kann eine effektive Kationisierung nur bei mikrokristallinen Präparationen erfolgen, bei denen Kationen in direkter Nachbarschaft zu den Kohlenhydraten vorliegen. Die Kodesorption von Matrix, Analyt und Salz führt zu einer Ionisation dieser Oligosaccharide in der Gasphase, wobei eine niedrige Startgeschwindigkeit der Analytionen detektiert wird. Gasphasenionisation ist somit einer der möglichen Wege der Ionisation neben der Freisetzung von Ionen aus geladenen Clustern.

Da auch für Peptide und Proteine Kationisierung (und vielleicht auch Photoionisation) in der Gasphase auftreten kann, lassen sich auch für diese Substanzklasse langsame Molekülionenspezies experimentell feststellen, was mehrere initiale Geschwindigkeitskomponenten und damit auch ein Ionensignal mit unterschiedlichen Komponenten zur Folge hat (siehe Kapitel 2.4.1.6). Weiterhin sollte auch unterhalb der Schwelle des Analytionennachweises (und damit der kollektiven Ablationsschwelle gemäß dem *breathing sphere*-Modell) bei MALDI aufgrund von Verdampfung einzelner Moleküle gefolgt von Ionisation in der Gasphase ein Ionensignal feststellbar sein. Die Desorption (bzw. im Sinne des Desorptionsmodells von Zhigilei [Zhi98]: Sublimation) nicht eingebauter Analytteilchen gefolgt von der Ionisierung in der Gasphase ergibt eine im Vergleich zur Startgeschwindigkeit von präformierten Peptid- und Proteinionen aus Clustern wesentlich verminderte Startgeschwindigkeit der Ionen. Die Idee eines umfassenden Modells zur Beschreibung des MALDI-Prozesses kann somit nur unter Einbeziehung verschiedener

²⁰⁶ Dieser Reaktionsweg wurde bereits für FAB vorgeschlagen [Sun93].

Mechanismen der Ionenbildung erfolgen, da während des MALDI-Desorptionsprozesses sowohl Cluster als auch vorgeformte bzw. präformierte Ionen gebildet werden und in der dichten Teilchenwolke in der *se/vedge*-Region (siehe Kapitel 6) weitere Ionen-Molekülreaktionen erfolgen.

Kapitel 9

Zusammenfassung und Ausblick

9 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die initialen Bewegungsparameter von Ionen bei matrixunterstützter Laserdesorption zu bestimmen, um mit deren Kenntnis das Verständnis des Desorptions- und Ionisationsprozesses bei MALDI zu verbessern. Die Etablierung einer Meßmethode der initialen Geschwindigkeit von Analytionen sowie die Überprüfung verschiedener experimenteller Parameter führten zur Bestimmung einer großen Zahl von Meßwerten der Startgeschwindigkeit von Ionen unterschiedlicher Masse, Ladung und Substanzklasse bei verschiedenen Matrices und Präparationsbedingungen (siehe Kapitel 5 und 7). Durch Vergleich dieser Meßwerte ist eine Charakterisierung des Desorptions- und Ionisationsprozesses bei MALDI möglich. Aufbauend auf diesen Untersuchungen der Startgeschwindigkeit von Ionen wurde ein Desorptions-/Ionisationsmodell für MALDI entwickelt (siehe Kapitel 6 und 8).

Aus der festen Matrix-/Analytpräparation werden durch den Laserimpuls oberhalb einer kritischen Laserbestrahlung geladene Bruchstücke ("Cluster") freigesetzt. Aus diesen Clustern resultiert nach Abdampfen von ungeladenen Teilchen, wie zum Beispiel Matrixmolekülen, die Freisetzung von Ionen in der Gasphase. Hierbei kann das Modell der Clusterbildung sehr gut mit dem Desorptionsmodell nach Zhigilei (siehe Kapitel 2.4.1.5) verknüpft werden [Zhi97]. Die Cluster verschiedener Größe werden in der sich ausdehnenden Teilchenwolke transportiert. Sie bewegen sich mit der initialen Geschwindigkeit der expandierenden Teilchenwolke. Dieser Vorgang kann mit dem "Mitgerissen werden" der Biomoleküle (*entrainment*) [Bea91] bei MALDI korreliert werden: So wird beispielsweise beobachtet, daß die mittlere initiale Geschwindigkeit v_0 der Analytmoleküle im Mittel nie höher ist als die der Matrixmoleküle.

Die Schwellbestrahlungsabhängigkeit der Ionisation kann weiterhin mit der Schwellbestrahlung der Ablation, d.h. der kollektiven Ablation von großen Partikeln aus der Matrix-/Analytpräparation, wie sie von Zhigilei in molekulardynamischen Simulationen gefunden wurde, verknüpft werden. Desorption und Ionisation sind somit nicht getrennt voneinander zu betrachten, da während der Desorption die Freisetzung von Ionen erfolgt. Wenn Peptide und Proteine aus Clustern stammen, besitzen die freigesetzten Biomolekülionen die gleiche mittlere Analytionen-geschwindigkeit wie die Matrixneutralen [Dre94].

Für kleine Oligosaccharide werden niedrigere Startgeschwindigkeiten detektiert als für Peptide und Proteine. Das kann darauf zurückgeführt werden, daß diese Ionen nicht als vorgeformte Ionen aus Clustern freigesetzt werden. Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten neutralen Oligosaccharide kationisiert und (im wesentlichen) nicht protoniert im MALDI-Massenspektrum auftreten und bei höheren Verzögerungszeiten eine verstärkte Kationisierung von Oligosacchariden zu beobachten ist, werden diese Teilchen voraussichtlich nach der Desorption in der Gasphase ionisiert (siehe Kapitel 7 und 8). Da Oligosaccharide in die Matrix DHB eingebaut werden, jedoch Kationen zur Ionisation nicht in den Matrixkristallen zur Verfügung stehen, ist anzunehmen, daß neutrale Oligosaccharide aus Clustern mit der gleichen Startgeschwindigkeit wie Peptide und Proteine in der

desorbierten Teilchenwolke vorkommen; ihre Ionisation und damit ihre Detektion ist aufgrund der fehlenden Ladung jedoch nicht möglich.

Die Ergebnisse der Startgeschwindigkeit von Ionen bei verschiedenen Präparationen verdeutlichen, daß Gasphasenionisation einer der möglichen Wege der Ionisation neben der Freisetzung von Analytionen aus geladenen Clustern ist. Da auch für Peptide und Proteine Kationisierung in der Gasphase auftreten kann, lassen sich auch langsame Molekülionenspezies experimentell feststellen, was mehrere initiale Geschwindigkeitskomponenten und damit auch ein Ionensignal mit unterschiedlichen Komponenten der Startgeschwindigkeit zur Folge hat. Weiterhin sollte auch unterhalb der Schwelle des Analytionennachweises (und damit der kollektiven Ablationsschwelle gemäß dem *breathing sphere*-Modell) bei MALDI aufgrund von Verdampfung einzelner Moleküle gefolgt von Ionisation in der Gasphase ein Ionensignal feststellbar sein. Die beobachtete mittlere Startgeschwindigkeit von Analytionen wäre somit eine Mischung aus schnellen, aus Clustern stammenden, und aus langsamen, in der Gasphase ionisierten Teilchen. Eine Komponente kann als prompt ionisierte Komponente mit im wesentlichen massenunabhängiger, konstanter (hoher) initialer Geschwindigkeit verstanden werden. Die zweite Komponente kann durch verzögert auftretende Gasphasenionisation innerhalb des expandierenden Materials erklärt werden, wobei die Analytionen eine geringere Startgeschwindigkeit zeigen. Zusammenfassend (siehe Kapitel 8) wird eine kollektive Ablation von Partikeln und vorgeformten Ionen beim MALDI-Desorptionsprozeß gefolgt von Sekundärreaktionen innerhalb der dichten Teilchenwolke in der Gasphase in der *selvedge*-Region durch Ionen-Molekülreaktionen vorgeschlagen, wie es bereits bei dem *precursor*-Modell für Sekundärionenmassenspektrometrie formuliert wurde [Sun88], [Pac85], [Ben83].

Bezogen auf die Auswahl potentieller Matrizes besitzt das Modell nach wie vor nur eine geringe "Voraussagekraft": Ob eine Substanz als Matrix geeignet ist oder ob sie einen hohen bzw. geringen Grad an metastabiler Fragmentierung für zum Beispiel Peptide oder Proteine zeigt, kann weiterhin nur experimentell bestimmt werden, wobei jedoch eine Charakterisierung mit Hilfe der Startgeschwindigkeit möglich ist. Der Zusammenhang eines Cluster-Desorptions-/Ionisationsmodells mit molekulardynamischen Simulationen nach Zhigilei ermöglicht jedoch eine Beschreibung vieler experimenteller Ergebnisse bei MALDI.

Weiterführende Experimente sollen die Verifikation des "Cluster-Modells" der Ionisation zum Ziel haben. Hier ist insbesondere die Untersuchung des Ladungszustandes von Analytmolekülen in festen Matrix-/Analytpräparationen von Bedeutung. Weitere Untersuchungen zur Spektrenqualität bei Matrizes, die keinen Einbau der Analytmoleküle in die Matrixkristalle zeigen, sowie eine eingehende Untersuchung der verschiedenen alternativen Präparationstechniken aus Kapitel 7 sind hierbei geplant.

Kapitel 10

Anhang

Substanzen und Probenpräparation

Programme

Ergebnisse der Startgeschwindigkeit verschiedener Ionen

10 Anhang

10.1 Substanzen und Probenpräparation

Tabelle 10-1 Matrizes und Matrixpräparation

| Matrix | Name | Präparation | Lösungsmittel und Konzentration |
|-----------------|--|--|---|
| 2,4-DHB | 2,4-Dihydroxybenzoesäure | Kokristallisation | 30 mg/ml in ATW (0,1% TFA in Acetonitril/Wasser 1:1) |
| 2,6-DHB | 2,6-Dihydroxybenzoesäure | Kokristallisation | ges. in ATW |
| 2-Thiohydantoin | | Oberflächenpräparation | 10 mg/ml in Acetonitril/Wasser 1:1 |
| 3-HPA | 3-Hydroxypicolinsäure | Kokristallisation | 50 mg/ml in Acetonitril/Wasser 1:1 25 mg/ml in Methanol/Wasser 1:1 25 mg/ml in Ethanol/Wasser 1:1 25 mg/ml in Wasser |
| 4-HBA | 4-Hydroxybenzoesäure | Kokristallisation | 10 mg/ml in Wasser |
| ATT | 6-Aza-2-thiothymidin | Kokristallisation | 10 mg/ml in Acetonitril/Wasser 1:1 |
| DHAP | 2,6-Dihydroxyacetophenon | Kokristallisation oder Oberflächenpräparation | 10 mg/ml in Acetonitril/Wasser 1:1 |
| DHB | 2,5-Dihydroxybenzoesäure | Kokristallisation | 10 mg/ml in ATW |
| DHBs | super DHB (Mischung von DHB mit 10% HMBA) | Oberflächenpräparation | 20 mg/ml DHB mit 10% HMBA in ATW |
| Ferulasäure | 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure | Kokristallisation | 8 mg/ml in Wasser 8 mg/ml in TFA/Acetonitril/Wasser 1:1:2 |
| HABA | 2-(4'-Hydroxy-phenylazo)- benzoesäure | Oberflächenpräparation | 2,5 mg/ml in Wasser/Aceton 1:1 |
| HCCA | 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure | Oberflächenpräparation | 40 mg/ml in Aceton |
| HCCAamid | 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäureamid | Oberflächenpräparation | 8 mg/ml Aceton |
| HMBA | 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure | Kokristallisation | 10 mg/ml in ATW |
| SA | Salicylsäure 2-Hydroxybenzoesäure | Kokristallisation | 20 mg/ml in ATW |
| SINA | Sinapinsäure 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure | Oberflächenpräparation oder Kokristallisation | 10 mg/ml in ATW |
| THAP | 2,4,6-Trihydroxyacetophenon Hydrat | Kokristallisation oder Oberflächenpräparation | 10 mg/ml in Acetonitril/Wasser 1:1 |

Tabelle 10-2 Matrices, Matrixeigenschaften und Hersteller

| Matrix und Literaturstelle | Name | Formel | Molekulargewicht [g/mol] | Farbe | Schmelzpunkt [°C] | Hersteller Reinheit Katalognummer |
|---------------------------------------|--|---|--------------------------|----------------------------------|--------------------|---|
| 2,4-DHB [Kra96] | 2,4-Dihydroxybenzoesäure | C ₇ H ₆ O ₄ | 154,12 | weiß | 213 | Fluka, Deisenhofen ≥ 98% 37530 |
| 2,6-DHB [Kra96] | 2,6-Dihydroxybenzoesäure | C ₇ H ₆ O ₄ | 154,12 | weiß | 165 (Zers.) | Aldrich, Deisenhofen 98 % D 10,960-6 |
| 2-Thiohydantoin [Juh97] | 2-Thiohydantoin | C ₃ H ₄ N ₂ OS | 116,14 | gelb | 229-231 (Zers.) | Aldrich 99 % T3,040-6 |
| 3-HPA [Wu94] [Wu93] [Tan94] | 3-Hydroxy-picolinsäure 3-Hydroxypyridin-2-carbonsäure | C ₆ H ₅ NO ₃ | 139,11 | weiß | 219-221 (Zers.) | Aldrich 98 % 15,230-7 |
| 4-HBA | 4-Hydroxybenzoesäure | C ₇ H ₆ O ₃ | 138,12 | weiß | 214-216 | Fluka 99 % 54630 |
| ATT [Juh92] | 6-Aza-2-thiothymidin 5-Hydroxy-3-mercapto-6-methyl- 1,2,4-triazin 3,4-Dihydro-6-methyl-3-thio-1,2,4- triazin-5-(2H)-on | C ₄ H ₅ N ₃ OS | 143,17 | weiß | 218-219 | Sigma 99,9 % A 4661 |
| DHAP [Gor96] [Pit96] | 2,6-Dihydroxyacetophenon 2-Acetylresorcin | C ₈ H ₆ O ₃ | 152,15 | weiß bis gelblich -weiß | 156-158 | Aldrich 97 % D10,780-8 |
| DHB [Str91] | 2,5-Dihydroxy-benzoesäure Gentisinsäure Hydrochinoncarbonsäure | C ₇ H ₆ O ₄ | 154,12 | weiß | 205 (Zers.) | Aldrich 99 % 14,935-7 |
| Ferulasäure [Bea89a] [Bea89] | 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 194,19 | weiß | 168-171 | Aldrich 99 % 12,870-8 |
| HABA [Juh93] | 2-(4'-Hydroxyphenylazo)- benzoesäure 2-(4'-Hydroxybenzolazo)- benzoesäure | C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃ | 242,23 | orange | 205-207 | Aldrich 14,803-2 |
| HCCA [Bea92] | 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure α -Cyano- p-hydroxymethoxyzimtsäure 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure | C ₁₀ H ₇ NO ₃ | 189,17 | gelb | 250-253 (Zers.) | Sigma C 2020 |
| HCCA-Amid [Sch99b] | 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäureamid | C ₁₀ H ₈ O ₂ N ₂ | 188,19 | weiß | - | Synthese |
| HMBA [Kar92] [Kar93] | 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure 5-Methoxysalicylsäure | C ₈ H ₈ O ₄ | 168,15 | weiß | 141-143 | Aldrich 98 % 14,618-8 |
| SA [Kar96] | Salicylsäure 2-Hydroxybenzoesäure | C ₇ H ₆ O ₃ | 138,12 | weiß | 158-161 | Aldrich > 99 % 25,758-8 Lot L5S05020BS |
| SINA [Bea89a] [Bea89] | Sinapinsäure 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymethoxyzimtsäure | C ₁₁ H ₁₂ O ₅ | 224,21 | weiß | 203-205 | Aldrich 98 % D13,460-0 |
| THAP [Pap96] [Pie93] [Zhu96] | 2,4,6-Trihydroxyacetophenon Hydrat Phloracetophenon Hydrat 2-Acetylphloroglucin Hydrat | C ₈ H ₈ O ₄ · H ₂ O | 186,17 | weiß bis gelblich -weiß | 219-221 | Aldrich 98 % T6,460-2 |

Tabelle 10-3 Präparation der Matrixunterlagen bei nano-Elektrospraypräparation von Analytlösungen

| Matrix | Lösungsmittel und Konzentration | Präparation der Matrixunterlage |
|---------|---|-----------------------------------|
| CMBT | ges. in Wasser, Ethanol, THF | nach [Pfe99] |
| DHB | ges. in Ethanol, Wasser, 9:1, stark geföhnt | nach [Pfe99] |
| 2,6-DHB | 40 g/l in Aceton | Dünnschichtpräparation |
| 2,4-DHB | 40 g/l in Aceton | Dünnschichtpräparation |
| DHB | 40 g/l in ATW | <i>dried droplet</i> -Präparation |

Tabelle 10-4 Matrixzusätze, Eigenschaften und Hersteller

| Matrixzusatz und Literaturstelle | Name | Formel | Molekulargewicht [g/mol] | Farbe | Schmelzpunkt [°C] | Hersteller Reinheit Katalognummer |
|----------------------------------|--------------------------------|--|--------------------------|-------|-------------------|--|
| Bernsteinsäure | Dicarbonsäure C ₄ | C ₄ H ₆ O ₄ | 118,09 | weiß | 185-188 | Fluka >99,5 % 14079 Lot 339540/1 1295 |
| DAHC [Pie93] | Diammoniumhydrogencitrat | C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₇ | 226,19 | weiß | - | Sigma 98 % C 1883 |
| CMBT [Pfe99] | 5-Chlor-2-mercaptobenzothiazol | C ₇ H ₄ NS ₂ Cl | 201,70 | weiß | 198-200 | Aldrich > 90 % 12,557-1 |

Tabelle 10-5 Matrixzusätze, Präparation

| Matrix | Name | Lösungsmittel und Konzentration |
|----------------|------------------------------|---------------------------------|
| Bernsteinsäure | Dicarbonsäure C ₄ | 20 mg/ml in Wasser |
| DAHC | Diammoniumhydrogencitrat | 50 mg/ml in Wasser |

Tabelle 10-6 Lösungsmittel, Hersteller

| Lösungsmittel | Hersteller | Reinheit und Katalognummer |
|---------------|----------------|-----------------------------------|
| Aceton | Hoechst | (zur Analyse) |
| Acetonitril | Roth | > 99,9 % (HPLC-Qualität) 57275 |
| Ethanol | Riedel-de-Haen | > 99,8 % (zur Analyse) 32205 |
| Methanol | Baker | > 99,8 % (zur Analyse) 8402 |
| TFA | Aldrich | 99 % T6,220-0 |
| Wasser | Millipore | - |

Tabelle 10-7 Matrix und Matrixzusatz bei der CMBT/DHB-Präparation

| Matrix/Matrixzusatz | Lösungsmittel und Konzentration |
|---------------------|--------------------------------------|
| CMBT [Pfe99] | 10 g/l in Wasser/Ethanol/THF 1: 1: 1 |
| DHB | 20 g/l in Wasser |

Tabelle 10-8 Analytsubstanzen und Präparation der Analytlösungen (Peptide/Proteine)

| Protein/Peptid | Sequenz/Formel | Herkunft | Molekulargewicht (relativ) | Lösungsmittel und Konzentration | Hersteller Reinheit Katalognummer |
|--|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|---|
| Angiotensin II | $C_{50}H_{71}N_{13}O_{12}$ | Mensch, synthetisch | 1046,2 (freie Base) | 10^{-5} mol/l in ATW | Sigma, Deisenhofen > 98 % A 9525 |
| Insulin | $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$ | Rind, Pankreas | 5733,5 | 10^{-5} mol/l in ATW | Sigma Gehalt unbestimmt I-5500 |
| Gramicidin S | $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$ | Bacillus brevis (Nagano) | 1141,5 | 10^{-4} mol/l in ATW | Sigma G-5127 Lot 93F0144 |
| Carbonic Anhydrase Carbonat- Dehydratase Carboanhydrase | | | 29023,5 | 5 mg/ml in Wasser ($1,7 \cdot 10^{-4}$ mol/l) | Boehringer Mannheim 103 187 |
| Melittin | $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ | | 2846,5 | 10^{-5} mol/l in ATW | Serva, Heidelberg |
| Insulin B-Kette (oxidiert) | $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$ | Rind | 3495,9 | 10^{-5} mol/l in ATW | Sigma 87 % I-6383 Lot 38H5845 |
| Leucine Enkephalin | $C_{28}H_{37}N_{6}O_7$ | | 555,6 | $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l in ATW | Sigma 99 % L-9133 Lot 38H5803 |
| BSA FITC | | Rind | | 10^{-5} mol/l in ATW | Sigma A 4378 |
| Lysozym | | Huhn | | 10^{-5} mol/l in ATW | Fluka 62970 Lot 46622/1 10999 |
| Cytochrom C | | Pferd, Herz | 12360,5 | 10^{-5} mol/l in ATW | Serva 18020 Lot 21030 |

Tabelle 10-9 Analytsubstanzen und Präparation der Analytlösungen (Kohlenhydrate, Lösungsmittel Wasser)

| Zucker | Molekulargewicht [g/mol] | Farbe | Hersteller Reinheit Katalognummer | Konzentration in Wasser |
|----------------------------|--------------------------|-------|---|-------------------------|
| Maltotetraose | 666,59 | weiß | Milupa | 10 ⁻⁵ mol/l |
| Chitotetraose | 830,80 | weiß | Milupa | 10 ⁻⁵ mol/l |
| Milchzucker aus Humanmilch | | | Milupa | ca. 1 g/l |
| Maltoheptaose | 1153,0 | weiß | Sigma 92 % M-7753 Lot 74H0608 | 10 ⁻⁵ mol/l |

Tabelle 10-10 Matrixzusätze, Eigenschaften und Hersteller und Präparation

| Matrixzusatz | Formel | Molekulargewicht | Farbe | Schmelzpunkt [°C] | Hersteller Reinheit Katalognummer | Lösungsmittel und Konzentration |
|---------------|---|------------------|-------|-------------------|---|---------------------------------|
| D(+)-Talose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,16 | weiß | 133-135 | Aldrich 97 % 37,426-1 | 30 mg/ml in ATW |
| D(-)-Fructose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,16 | weiß | 119-122 | Roth 4981 | 30 mg/ml in ATW |
| D(-)-Ribose | C ₅ H ₁₀ O ₅ | 150,13 | weiß | 88-92 | Aldrich 98 % R 175-7 | 30 mg/ml in ATW |
| D(+)-Xylose | C ₅ H ₁₀ O ₅ | 150,13 | weiß | - | Fluka > 99 % 95729 | 30 mg/ml in ATW |
| D(+)-Glucose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,16 | weiß | 153-156 | Merck 59178 | 30 mg/ml in ATW |
| L(-)-Fucose | C ₆ H ₁₂ O ₅ | 164,2 | weiß | 150-153 | Sigma F-2252 Lot 71H0961 | 30 mg/ml in ATW |
| D(+)-Allose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 180,2 | weiß | 148-150 | Sigma A-6390 Lot 33H4023 | 30 mg/ml in ATW |

10.2 Programme

Programm (Turbo-Pascal 7.0) zur Berechnung der Startgeschwindigkeit aus experimentellen Daten mit der Näherungsformel

```
{$A+}                                {Daten ordnen = schnell}
{$N+}                                {Coprozessor an = schnell}
{$B-} {$D+} {$F-} {$R-} {$S-}      {Compilerdirektiven}
{Empfohlene CompilerEinstellung: Daten ausrichten, numerische Berechnung}
{$M 21000,0,50000}

program Naeherung;
uses crt;
{Definition von Konstanten}

{Variablen Definition}
var
  Beta, H, Le, G, tges: extended;
  A, B, ahilf, bhilf, v0, v0hilf, wurz: extended;
  d1, d2, L : EXTENDED;
  antwort, antwort2 :char;
  fehler: boolean;

{Programmbeginn*****}
begin
  ClrScr;
  writeln; textcolor(2) ;
  writeln(' Programm zur Bestimmung der Geräteparameter H, Le, Beta ');
  writeln(' und der Startgeschwindigkeit');writeln;
  writeln(' nach Juhasz, Vestal, Martin [J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1997, 8, 209-217.]);
  writeln;
  writeln(' 1998, Matthias Glückmann');
  WRITELN; textcolor(3);
  writeln;

{Definition der Geräteparameter}
  d1:=0.0022;
  d2:=0.0174;
  L:=1.315;
  writeln (' Voyager DE-Gerät, Geräteparameter ');
  writeln (' Standardwerte [m]: d1: ',d1:2:5);
  writeln (' d2: ',d2:2:5);
  writeln (' L : ',L:2:5); writeln;
  write (' Berechnungen für Voyager DE-Gerät? (j/n) '); readln (antwort);
  IF (antwort = 'n') OR (antwort = 'N') THEN
    REPEAT
      writeln (' Bitte Werte größer als Null eingeben (m) ');
      write (' Werte (m): d1: '); readln(d1);
      write (' Werte (m): d2: '); readln(d2);
      write (' Werte (m): L: '); readln(L);
      UNTIL (d1>0) AND (d2>0) AND (L>0);
    writeln;

{Eingabe des Verhältnisses G}
  Repeat
    REPEAT
      IF (antwort='j') OR (antwort='J') THEN
        Begin
          writeln(' Bei Voyager DE-Gerät nur bestimmte Verhältnisse G möglich. ');
          End;
          write(' Verhältnis G (%): ');readln(G);
          UNTIL (0<=G) AND (G<=100);
          G:=G/100; {Umrechnung G aus Prozent in Zahl}

{Beginn der Berechnungen}
  wurz:=exp(1/2*ln(1-G));
  Le:=L+(2*d2)/(1+wurz)+(2*d1)/(wurz);
  H:=((1-G)*L)+((2*d2*wurz)/(1+wurz))-((2*d1)/(wurz));
  Beta:=H/(2*d1*Le) ;

{Ausgabe Bildschirm}
  writeln;
  writeln(' Die Berechnungen ergeben folgende Werte:');
  writeln(' Le = ', Le:4:4 , ' [m] ');
  writeln(' H = ', H:4:4 , ' [m] ');
  writeln(' Beta = ', Beta:4:4 , ' [1/m]');

{Berechnung verschiedener v0 werte mit experim. Daten}
  Repeat
    {Eingabe der exp. Werte}
    writeln;
    writeln (' Bitte Werte größer als Null eingeben [ns]! ');
    write (' y-Achsenabschnitt A [ns] : '); readln(ahilf);
    write (' Steigung B [ns/ns]: '); readln(bhilf);

{Berechnung v0 Umrechnung v0 vom m/ns in m/s}
    v0:=(bhilf/(Beta*ahilf)*1000000000);

{Ausgabe Bildschirm}
    writeln;
    writeln(' Die Werte für A und B ergeben');
    writeln(' für ein G = ',G:0:2, ' folgende Startgeschwindigkeit:');
    writeln(' v0 = ', v0:4:1 , ' [m/s] ');

{Ausgabe Bildschirm}
```

```

        writeln;
        write(' Weitere v0 aus exp. Daten berechnen ? (j/n) '); readln(antwort);
until (antwort='n') or (antwort='N');

{Ausgabe Bildschirm}
writeln;
write(' Weitere Berechnungen für anderes G [%] ? (j/n) '); readln(antwort);
writeln;

until (antwort='n') or (antwort='N');
end.

```

Programm (Turbo-Pascal 7.0) zur Berechnung der Startgeschwindigkeit aus experimentellen Daten (Numerische Anpassung)

```

{$A+}                                {Daten ordnen = schnell}
{$N+}                                {Coprozessor an = schnell}
{$B-} {$D+} {$F-} {$R-} {$S-}       {Compilerdirektiven}
{Empfohlene CompilerEinstellung: Daten ausrichten, numerische Berechnung}
{$M 21000,0,50000}

program Steigung;

{Definition von Konstanten}
const z=1.60219E-19;

{Variablen Definition}
var
  T0, T1, T2, T19, T29, T09, hilf1, hilf2, hilf3, de, dhilf, x, x0, x0hilf, U, U1, E1, E2, G, m, tges: extended;
  tmes, v0, v0hilf, iteration : extended;
  d1, d2, L, thilf, demaxhilf, demax, deabsthilf, deabst, wert1, wert2, differenz, steigung, messwert : EXTENDED;
  i, schritt : integer;
  antwort, antwort2 : char;
  fehler : boolean;

{Programmbeginn*****}
begin
  writeln; writeln; writeln; writeln;
  writeln(' Programm zur Bestimmung der Startgeschwindigkeit ');
  writeln(' aus der Steigung der Funktion (tges gegen DE-Zeit)');
  writeln;
  writeln(' 1998, Matthias Glückmann');
  WRITELN;
  writeln;

  {Definition der Geräteparameter}
  d1:=0.0022;
  d2:=0.0174;
  L:=1.315;
  x0hilf:=0;
  writeln (' Voyager DE-Gerät, Geräteparameter ');
  writeln (' Standardwerte (m): d1: ',d1:2:5);
  writeln ('                d2: ',d2:2:5);
  writeln ('                L : ',L:2:5); writeln;
  write (' Berechnungen für Voyager DE-Gerät? (j/n) '); readln (antwort);
  IF (antwort = 'n') OR (antwort = 'N') THEN
    REPEAT
      writeln (' Bitte Werte größer als Null eingeben (m)! ');
      write (' Werte (m): d1: '); readln(d1);
      write (' Werte (m): d2: '); readln(d2);
      write (' Werte (m): L: '); readln(L);
    UNTIL (d1>0) AND (d2>0) AND (L>0);
    writeln;

  {Eingabe der Spannung (Gesamtspannung U=U1+U2) und des Verhältnisses G}

  IF (antwort='j') OR (antwort='J') THEN
    writeln(' Bei Voyager DE-Gerät maximal 25 kV möglich. ');
    REPEAT
      write(' Spannung U (KV) (0<U<100 KV): ');readln(U);
    UNTIL (U>0) AND (U<100);
    writeln;

    REPEAT
      IF (antwort='j') OR (antwort='J') THEN
        Begin
          writeln(' Bei Voyager DE-Gerät nur bestimmte Verhältnisse G möglich. ');
          End;
          write(' Verhältnis G (%): ');readln(G);
        UNTIL (0<=G) AND (G<=100);
        G:=G/100;                                {Umrechnung G aus Prozent in Zahl}
        U1:=U*(1-G)*1000;                       {Umrechnung kV in V}
        writeln;

  {Eingabe der Proteinmasse }
  m:=5734.5;
  writeln (' Proteinmasse m (g/mol): ');
  write (' Standardvorgabe für Insulin+H+ (5734.5 g/mol), Proteinmasse ändern? (j/n) ');
  readln(antwort2);
  IF (antwort2 = 'j') OR (antwort2='J') THEN
    REPEAT
      write(' Proteinmasse (g/mol) (0<m<100000 g/mol): ');
      readln(m);
    UNTIL (m>0) AND (m<100000);
    m:=(m/6.02205E23)/1000;                    {Umrechnung u [Da] in kg}
    writeln;

  {Eingabe der Anfangshöhe x0}
  write (' Starthöhe, d.h Anfangsstrecke x0 (nm) ',x0hilf:2:2, ' ändern? (j/n) ');

```

```

readln(antwort2);
IF (antwort2 = 'j') OR (antwort2='J') THEN
REPEAT
  write(' Starthöhe (nm): ');
  readln(x0hilf);
  UNTIL (x0hilf>=0) AND (x0hilf<=d1*1E9);
  x0:=x0hilf*1E-9; {Umrechnung Nanometer in Meter}
writeln;

{Eingabe max. DE-Zeit}
writeln(' Bis zu welcher DE-Zeit soll die Simulation laufen? (ns) ');
write(' Standard: 1200 ns, ändern? (j/n) '); readln(antwort2);
IF (antwort2='j') OR (antwort2='J') THEN
REPEAT
  write(' Maximale DE-Zeit (ns): ');
  readln(demaxhilf);
  UNTIL (demaxhilf>=0) and (demaxhilf<=30000)
  ELSE demaxhilf:=1200;
demax:=demaxhilf*1E-9; {Umrechnung in sec.}
writeln;

{Definition der Wertepaaranzahl}
deabsthilf:=1;
deabst:=demax/deabsthilf;
writeln;

{Einsprungpunkt vom letzten until}
{nach der Werteeingabe beginnt hier die Routine für verschiedene Steigungen}
repeat

{Nullsetzen der im evtl. vorhergehenden Zyklus berechneten Werte}
v0:=0; {Startwert der Simulation}
wert1:=0;
wert2:=0;
steigung:=0;
differenz:=0;
schritt:=1;
writeln;

{Eingabe der gemessenen Steigung}
writeln('*****');
REPEAT
  writeln;
  write(' Bitte die gemessene Steigung (ns/ns) eingeben: '); readln(messwert);
  UNTIL messwert>0;
  writeln;

{Eingabe der max. zu simulierenden Startgeschwindigkeit}
{ Repeat
  write(' Bei welchem maximalen v0 (m/s) soll die Simulation enden? '); readln(iteration);
  until (iteration>=0);}
  iteration:=1000;

{Beginn der Berechnungen ***** }
repeat
  v0:=v0+0.05;
  schritt:=schritt+1;
  de:=0;
  writeln;
  repeat
    x:=v0*de+x0;
    T1:=z*U1*(1-x/d1)+0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
    T2:=(z*G*U1/(1-G))+z*U1*(1-x/d1)+0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
    T0:=0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
    E1:=U1/d1; {Feldstärke E1}
    E2:=((G*U1)/(1-G))/d2; {Feldstärke E2}
    hilf1:=((sqrt(2)* sqrt(m))*0.624146E19);
    hilf2:=((sqrt(T1)-sqrt(T0))/E1)+ ((sqrt(T2)-sqrt(T1))/E2);
    hilf3:=L*sqrt((m/(2*T2)));
    tges:=(hilf1*hilf2)+hilf3; {Gesamtflugzeit in Sekunden}
    dhilf:=de*1E9; {Umrechnung DE-Zeit in [ns]}
    thilf:=tges*1E9; {Umrechnung Gesamtflugzeit in [ns]}
    de:=de+deabst; {Erhöhung der DE-Zeit}

{Festlegung des 2. Wertes für DE-Zeit=Demaxhilf}
wert2:=thilf;
until (de>=demax+deabst);

{Berechnung Nullwert}
de:=0;
x:=v0*de+x0;
T1:=z*U1*(1-x/d1)+0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
T2:=(z*G*U1/(1-G))+z*U1*(1-x/d1)+0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
T0:=0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
E1:=U1/d1; {Feldstärke E1}
E2:=((G*U1)/(1-G))/d2; {Feldstärke E2}
hilf1:=((sqrt(2)* sqrt(m))*0.624146E19);
hilf2:=((sqrt(T1)-sqrt(T0))/E1)+ ((sqrt(T2)-sqrt(T1))/E2);
hilf3:=L*sqrt((m/(2*T2)));
tges:=(hilf1*hilf2)+hilf3; {Gesamtflugzeit in Sekunden}
dhilf:=de*1E9; {Umrechnung DE-Zeit in [ns]}
wert1:=tges*1E9; {Umrechnung Gesamtflugzeit in [ns]}

{Berechnung Steigung}
differenz:=wert2-wert1;
steigung:=(differenz/(demaxhilf));

{Abbruchkriterien der Simulation}
until (steigung>=messwert) OR (v0>iteration) OR (schritt>50000);

if (schritt<50000) then

```

```
begin
  {Ausgabe Bildschirm}
  writeln;
  writeln(' Die Simulation ergibt ein v0 = ', (v0-0.05): 5: 1, ' m/s. ');
  writeln;
  writeln('    simulierte Steigung    (ns/ns): ', steigung: 2: 4 );
  writeln('    y-Achsenabschnitt    (ns):    ', wert1 : 4: 2 );
end
else
  begin
    writeln(' Bei den eingegebenen Parametern ist zur Steigung ');
    writeln(' kein Ergebnis aufzufinden. ');
  end;

  {Ausgabe Bildschirm}
  writeln;
  write(' Weitere Iteration ? (j/n) '); readln(antwort);
  writeln;

until (antwort='n') or (antwort='N');

end.
```

Programm (Turbo-Pascal 7.0) zur Berechnung der Flugzeit eines Iones

```

{$A+}                                {Daten ordnen = schnell}
{$N+}                                {Coprozessor an = schnell}
{$B-} {$D+} {$F-} {$R-} {$S-}      {Compilerdirektiven}
{Empfohlene CompilerEinstellung: Daten ausrichten, numerische Berechnung}
{$M 21000,0,50000}

program Flugzeit;
const z=1.60219E-19;
type
dateinamtyp= STRING[14];
dateityp=TEXT;
var
T0, T1, T2, T19, T29, T09, hilf1, hilf2, hilf3, de, dhilf, x, x0, x0hilf, U, U1, E1, E2, G, m, tges, tmes, v0 : extended;
d1, d2, L, thilf, demaxhilf, demax, deabsthilf, deabst : extended;
i:integer;
antwort, antwort2 :char;
fehler: boolean;
datei_name:dateinamtyp;
datei:dateityp;

begin
  writeln;
  writeln(' Programm zur Bestimmung der Flugzeit tges mit Änderung der DE-Zeit ');
  writeln(' 1999, Matthias Glückmann');
  WRITELN;
  writeln;

  {Definition der Geräteparameter}
  d1:=0.00243;
  d2:=0.0174;
  L:=1.281;
  x0hilf:=50;
  writeln (' Voyager DE-Gerät, Geräteparameter ');
  writeln (' Standardwerte (m): d1: ',d1:2:5);
  writeln ('                d2: ',d2:2:5);
  writeln ('                L : ',L:2:5); writeln;
  write (' Berechnungen für Voyager DE-Gerät? (j/n) '); readln (antwort);
  IF (antwort = 'n') OR (antwort = 'N') THEN
    REPEAT
      writeln (' Bitte Werte größer als Null eingeben (m)! ');
      write (' Werte (m): d1: '); readln(d1);
      write (' Werte (m): d2: '); readln(d2);
      write (' Werte (m): L: '); readln(L);
    UNTIL (d1>0) AND (d2>0) AND (L>0);

    writeln;

  {Eingabe der Spannung (Gesamtspannung U=U1+U2) und des Verhältnisses G}
  REPEAT
    write (' Spannung U (KV) (0<U<100 KV): ');readln(U);
  UNTIL (U>0) AND (U<100);
  writeln;
  REPEAT
    IF (antwort='j') OR (antwort='J') THEN
      Begin
        writeln(' Bei Voyager DE-Gerät nur (56<=G<=99 %) möglich. ');
      End;
      write (' Verhältnis G (%): ');readln(G);
      UNTIL (56<=G) AND (G<=99) OR (antwort='n') OR (antwort='N');
      G:=G/100;

      U1:=U*(1-G)*1000;

    writeln;

  {Eingabe der Proteinmasse }
  m:=5734.5;
  writeln (' Proteinmasse m (g/mol): ');
  write (' Standardvorgabe für Insulin+H+ (5734.5 g/mol), Proteinmasse ändern? (j/n) ');
  readln(antwort2);
  IF (antwort2 = 'j') OR (antwort2='J') THEN
    REPEAT
      write(' Proteinmasse (g/mol) (0<m<100000 g/mol): ');
      readln(m);
    UNTIL (m>0) AND (m<100000);
    m:=(m/6.02205E23)/1000;

    writeln;

  {Eingabe der Anfangshöhe x0}
  write (' Starthöhe, d.h Anfangsstrecke x0 (nm) ',x0hilf:2:2, ' ändern? (j/n) ');
  readln(antwort2);
  IF (antwort2 = 'j') OR (antwort2='J') THEN
    REPEAT
      write(' Starthöhe (nm): ');
      readln(x0hilf);
    UNTIL (x0hilf>=0) AND (x0hilf<=d1*1E9);
    x0:=x0hilf*1E-9;

  writeln;

  {Eingabe max. DE-Zeit}

  writeln (' Bis zu welcher DE-Zeit soll die Simulation laufen? (ns) ');
  write(' Standard: 1200 ns, ändern? (j/n) '); readln(antwort2);
  IF (antwort2='j') OR (antwort2='J') THEN
    REPEAT
      write(' Maximale DE-Zeit (ns): ');

```

```

    readln(demaxhilf);
    UNTIL (demaxhilf>=0) and (demaxhilf<=30000)
    ELSE demaxhilf:=1200;

    demax:=demaxhilf*1E-9;

    writeln;

    {Definition der Wertepaaranzahl}

    writeln(' Wieviele Wertepaare sollen erzeugt werden? ');
    write(' Standard: 24 Wertepaare, ändern? (j/n) '); readln(antwort2);
    IF (antwort2='j') OR (antwort2='J') THEN
    REPEAT
    write(' Anzahl der Wertepaare (max. 1024): ');
    readln(deabsthilf);
    UNTIL (deabsthilf>0) and (deabsthilf<=1024)
    ELSE deabsthilf:=24;
    deabst:=demax/deabsthilf;

    writeln;

repeat

{Definition des Dateinamens etc.}
    write(' Dateinamen und Pfad (Standard: A:\daten.dat), ändern? (j/n) '); readln(antwort);
    IF (antwort='j') OR (antwort='J') THEN
    BEGIN
        write(' Dateinamen und Pfad eingeben (max 14 Zeichen) (z.B.: a:\Name): ');
        readln(datei_name);
    END
    ELSE datei_name:='a:\daten.dat';
    assign(datei, datei_name);

    writeln;

{Eingabe der Initialgeschwindigkeit v0}

    writeln;
    REPEAT
        write(' Initialgeschwindigkeit (m/s): '); readln(v0);
    UNTIL v0>0;
    writeln;

{Beginn der Datei}
    rewrite(datei);
    writeln;

{Beginn der Berechnungen}
    de:=0;
    writeln;
    writeln(' Berechnungen für v0= ', v0: 5: 2, 'm/s');
    writeln;
    repeat
        x:=v0*de+x0;
        T1:=z*U1*(1-x/dl)+0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
        T2:=(z*G*U1/(1-G))+z*U1*(1-x/dl)+0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
        T0:=0.5*m*v0*v0; {Kin. Energie}
        E1:=U1/dl; {Feldstärke E1}
        E2:=(G*U1)/(1-G)/d2; {Feldstärke E2}
        hilf1:=((sqrt(2)*sqrt(m))*0.624146E19);
        hilf2:=((sqrt(T1)-sqrt(T0))/E1)+((sqrt(T2)-sqrt(T1))/E2);
        hilf3:=L*sqrt((m/(2*T2)));
        tges:=(hilf1*hilf2)+hilf3; {Gesamtflugzeit in Sekunden}
        dhilf:=de*1E9; {Umrechnung DE-Zeit in [ns]}
        thilf:=tges*1E9; {Umrechnung Gesamtflugzeit in [ns]}
    {Ausgabe Bildschirm}
        writeln(' tges(ns): ',thilf: 4: 1, ' DE-Zeit (ns): ',dhilf: 4: 2);
    {Ausgabe in Datenfile}
        writeln(datei, thilf: 4: 1, dhilf: 4: 2, #9);
        de:=de+deabst;
        until (de>=demax+deabst);
    {Ausgabe Bildschirm}
        writeln;
        writeln(' Es erfolgten Berechnungen für v0 = ', v0: 5: 2, ' m/s. ');
        writeln;
        writeln;
        write(' Weitere Iteration ? (j/n) '); readln(antwort);
        writeln;
        close(datei); {Ende der Datei}
        until (antwort='n') or (antwort='N');

end.

```

10.3 Ergebnisse der Startgeschwindigkeit verschiedener Ionen

In der folgenden Tabellen werden die wichtigsten Ergebnisse der Startgeschwindigkeiten für verschiedene Ionen aus Kapitel 4, 5 und 7 zusammengefaßt.

Tabelle 10-11 Startgeschwindigkeiten der Alkaliionen Na^+ und K^+ bei verschiedenen Desorptionsbedingungen (Vergleich LDI und MALDI)
($U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE PRO)

| G [%] | Ion | Desorptionsbedingungen | Zahl der Einzelmessungen | v_0 [m/s] | s [m/s] |
|-------|---------------|------------------------|--------------------------|-------------|-----------|
| 92 | Na^+ | LDI | 4 | 39 | 34 |
| 94 | K^+ | LDI | 1 | 31 | - |
| 92 | Na^+ | MALDI (Matrix DHB) | 4 | 630 | 52 |

Tabelle 10-12 Startgeschwindigkeiten der Alkaliionen Na^+ und K^+ bei verschiedenen Desorptionsbedingungen (Vergleich LDI und MALDI)
($U_{\text{ges}} = 25 \text{ kV}$, $l = 337 \text{ nm}$, Voyager DE)

| G [%] | Ion | Desorptionsbedingungen | Zahl der Einzelmessungen | v_0 [m/s] | s [m/s] |
|-------|---------------|----------------------------|--------------------------|-------------|-----------|
| 89 | K^+ | LDI | 3 | 3 | 5 |
| 89 | Na^+ | LDI | 7 | 29 | 27 |
| 86 | K^+ | MALDI (Matrix Ferulasäure) | 1 | 475 | - |
| 86 | Na^+ | MALDI (Matrix Ferulasäure) | 1 | 345 | - |
| 89 | K^+ | MALDI (Matrix HCCA) | 2 | 484 | 59 |
| 89 | Na^+ | MALDI (Matrix HCCA) | 1 | 456 | - |
| 89 | K^+ | MALDI (DHB) | 4 | 531 | 115 |

Tabelle 10-13 Startgeschwindigkeit von [Insulin+H]⁺ aus verschiedenen Matrizes bzw. Matrizes mit Matrixzusätzen ($U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE und Voyager DE PRO)

| Matrix + evtl. Zusatz (Lösungsmittel) | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|--|-------------|-----------|---------------------------|
| 2,4-DHB | 238 | 23 | 5 |
| 2,6-DHB | 315 | 42 | 5 |
| 3-HPA (Ethanol, Wasser) | 620 | 87 | 6 |
| 3-HPA (Methanol, Wasser) | 522 | 25 | 4 |
| 3-HPA (Wasser) | 444 | 62 | 11 |
| 3-HPA (Wasser) + DAHC | 370 | 20 | 5 |
| 6-Aza-2-thiothymin (ATT) | 315 | 29 | 6 |
| DHAP | 353 | 56 | 10 |
| DHAP + DAHC | 268 | 11 | 6 |
| DHB | 543 | 40 | 15 |
| DHB + Bernsteinsäure | 475 | 170 | 8 |
| DHB/CMBT | 328 | 20 | 5 |
| DHB/D(-)-Fructose | 659 | 49 | 5 |
| DHB/D(-)-Ribose | 639 | 62 | 5 |
| DHB/D(+)-Allose | 525 | 111 | 6 |
| DHB/D(+)-Glucose | 522 | 41 | 5 |
| DHB/D(+)-Talose | 633 | 62 | 5 |
| DHB/D(+)-Xylose | 641 | 118 | 5 |
| DHB/L(-)-Fucose | 495 | 57 | 5 |
| DHBs | 565 | 15 | 5 |
| Ferulasäure | 410 | 28 | 13 |
| HABA | 273 | 27 | 6 |
| HCCA | 291 | 51 | 18 |
| HCCA-Amid | 382 | 39 | 4 |
| HMBA | 384 | 54 | 5 |
| SA | 493 | 39 | 5 |
| SA/Bernsteinsäure | 490 | 68 | 4 |
| SINA | 332 | 29 | 7 |
| THAP | 306 | 32 | 13 |
| THAP + DAHC | 201 | 19 | 6 |

Tabelle 10-14 Startgeschwindigkeiten bei Experimenten mit einer Wellenlänge von $l = 266$ nm ($G = 89$ %, $U_{ges} = 25$ kV, Voyager DE [Glü97])

| Matrix | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| 2-Thiohydantoin | 390 | 55 | 7 |
| 3-HPA (Wasser) | 485 | - | 1 |
| 4-Hydroxy-benzoesäure (4-HBA) | 452 | 32 | 3 |
| Ferulasäure | 372 | 41 | 8 |
| HCCA | 289 | 13 | 5 |
| SINA | 307 | 37 | 6 |

Tabelle 10-15 Startgeschwindigkeiten verschiedener Ionen ($U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

| Matrix | Ion | G [%] | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------|----------------------------------|-------|-------------|-----------|------------------------|
| ATT | [Insulin-H] ⁻ | 89 | 322 | 40 | 6 |
| ATT | [Insulin+H] ⁺ | 89 | 315 | 29 | 6 |
| DHB | [Insulin B-Kette-H] ⁻ | 89 | 577 | 20 | 6 |
| DHB | [Insulin B-Kette+H] ⁺ | 89 | 586 | 31 | 6 |
| DHB | [Melittin-H] ⁻ | 89 | 574 | 89 | 5 |
| DHB | [Melittin+H] ⁺ | 92 | 530 | 52 | 8 |
| DHB | [Insulin-H] ⁻ | 89 | 535 | 48 | 8 |
| DHB | [Insulin+H] ⁺ | 89 | 543 | 40 | 15 |
| DHB | [Carboanhydrase+H] ⁺ | 94 | 599 | 119 | 8 |
| Ferulasäure | [Insulin-H] ⁻ | 89 | 350 | 46 | 5 |
| Ferulasäure | [Insulin+H] ⁺ | 89 | 410 | 28 | 13 |
| Ferulasäure | [Melittin-H] ⁻ | 89 | 346 | 72 | 6 |

Tabelle 10-16 Startgeschwindigkeiten von [Melittin+H]⁺ aus der Matrix DHB in Abhängigkeit vom Desorptionsort einer *dried droplet*-Präparation ($G = 89$ %, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

| Desorptionsort | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|----------------|-------------|-----------|------------------------|
| Rand | 530 | 52 | 5 |
| Innen | 433 | 25 | 7 |

Tabelle 10-17 Messungen für [Insulin+2H]²⁺ im Vergleich zu Messungen von v_0 für [Insulin+H]⁺ bei $l = 337$ nm, Voyager DE

| Matrix | Ion | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------|----------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| DHB | [Insulin+2H] ²⁺ | 565 | - | 1 |
| DHB | [Insulin+H] ⁺ | 543 | 40 | 15 |
| Ferulasäure | [Insulin+2H] ²⁺ | 446 | 112 | 5 |
| Ferulasäure | [Insulin+H] ⁺ | 410 | 28 | 13 |
| HCCA | [Insulin+2H] ²⁺ | 251 | 75 | 5 |
| HCCA | [Insulin+H] ⁺ | 291 | 51 | 18 |

Tabelle 10-18 Startgeschwindigkeiten verschiedener Ionen der Chitotetraose ($G = 94\%$, $U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE)

| Matrix | Analation | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|----------------------|---------------------------------|-------------|-----------|------------------------|
| DHB (feinkristallin) | [Chitotetraose+H] ⁺ | 185 | 75 | 5 |
| DHB (feinkristallin) | [Chitotetraose+Na] ⁺ | 201 | 50 | 5 |
| DHB (feinkristallin) | [Chitotetraose+K] ⁺ | 204 | 43 | 5 |
| DHB/CMBT | [Chitotetraose+Na] ⁺ | 19 | 16 | 5 |

Tabelle 10-19 Startgeschwindigkeiten verschiedener Oligosaccharide [M+Na]⁺
($U_{ges} = 25$ kV, $l = 337$ nm, Voyager DE und Voyager DE PRO)

| Oligosaccharid | Matrix | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|----------------|----------|-------------|-----------|------------------------|
| Maltotetraose | DHB | 187 | 97 | 6 |
| Maltotetraose | DHB/CMBT | 0 | | 5 |
| Z0 | CMBT/DHB | 27 | 37 | 4 |
| Z0 | DHB | 275 | 65 | 4 |
| Z1 | CMBT/DHB | 39 | 21 | 4 |
| Z1 | DHB | 353 | 62 | 4 |
| Z1a | DHB | 366 | 59 | 5 |
| Z1b | DHB | 327 | 63 | 5 |
| Z2 | CMBT/DHB | 64 | 28 | 4 |
| Z2 | DHB | 371 | 61 | 4 |

Tabelle 10-20 Startgeschwindigkeiten von Matrixionen verschiedener Matrizes (mit Analyt) im Vergleich mit v_0 von [Insulin + H]⁺ ($U_{ges} = 25$ kV, $G = 89$ %, $l = 337$ nm, Voyager DE)

| Matrix | Matrixion | | | | | [Insulin+H] ⁺ | |
|---------|------------|---------------------------------------|-------------|-----------|------------------------|--------------------------|-----------|
| | Masse [Da] | Strukturformel | v_0 [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente | v_0 [m/s] | s [m/s] |
| DHB | 273 | [2M-2H ₂ O+H] ⁺ | 549 | 100 | 2 | 543 | 40 |
| | 137 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 212 | 58 | 2 | | |
| | 154 | M ⁺ | 512 | 81 | 7 | | |
| HCCA | 190 | [M+H] ⁺ | 167 | 67 | 4 | 291 | 51 |
| | 172 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 229 | 27 | 4 | | |
| | 212 | [M+Na] ⁺ | 137 | 27 | 4 | | |
| | 379 | [2M+H] ⁺ | 278 | 34 | 4 | | |
| 3-HPA | 140 | [M+H] ⁺ | 346 | 123 | 4 | 444 | 62 |
| | 96 | [M+H-CO ₂] ⁺ | 410 | 20 | 4 | | |
| | 235 | [2M+H-CO ₂] ⁺ | 421 | 57 | 4 | | |
| | 279 | [2M+H] ⁺ | 421 | 102 | 4 | | |
| SINA | 225 | [M+H] ⁺ | 306 | 7 | 2 | 332 | 29 |
| | 207 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 271 | 4 | 2 | | |
| | 449 | [2M+H] ⁺ | 285 | 28 | 2 | | |
| 2,6-DHB | 155 | [M+H] ⁺ | 289 | 166 | 4 | 315 | 42 |
| | 193 | | 321 | 109 | 4 | | |
| | 137 | [M-H ₂ O+H] ⁺ | 314 | 133 | 4 | | |

**Tabelle 10-21 Ergebnisse für das Ion [Insulin+H]⁺ desorbiert von DHB-Kristallflächen
(G = 92%, U_{ges} = 25 kV, l = 337 nm, Voyager DE PRO)**

| Kristallfläche | v ₀ [m/s] | s [m/s] | Zahl der Einzelmessungen |
|----------------|----------------------|---------|--------------------------|
| a | 539 | 56 | 5 |
| b | 550 | 22 | 5 |
| c | 558 | - | 1 |
| d | 520 | - | 1 |
| e | 524 | - | 1 |
| f | 606 | - | 1 |

**Tabelle 10-22 Startgeschwindigkeiten der Ionen [Melittin+Na]⁺ und [Melittin+H]⁺ vor und nach
Anlösen der Oberfläche eines Melittin/DHB-Preßlings
(G = 92 %, U_{ges} = 25 kV, l = 337 nm, Voyager DE PRO)**

| Melittin/DHB-Preßling | Ion | v ₀ [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|---------------------------|----------------------------|----------------------|---------|------------------------|
| "trocken" | [Melittin+H] ⁺ | 154 | 97 | 5 |
| | [Melittin+Na] ⁺ | 118 | 65 | 5 |
| mit 1 µl ATW angefeuchtet | [Melittin+H] ⁺ | 580 | 11 | 5 |
| | [Melittin+Na] ⁺ | 446 | - | 1 |

**Tabelle 10-23 Startgeschwindigkeiten von [Gramicidin S+H]⁺ (DHB/MALDI) bzw.
[Gramicidin S+Na]⁺ (LDI) (G = 89%, U_{ges} = 25 kV, l = 337 nm, Voyager DE)**

| Desorption | v ₀ [m/s] | s [m/s] | Anzahl der Experimente |
|-------------------------------------|----------------------|---------|------------------------|
| LDI | 11 | 25 | 5 |
| MALDI (DHB, mikrokristallin, innen) | 478 | 52 | 5 |

Tabelle 10-24 Winkelabhängige Verteilung der initialen Geschwindigkeit von [Cytochrom C+H]⁺ desorbiert von DHB Kristallen (G = 92%, U_{ges} = 25 kV, l = 337 nm, Voyager DE PRO)

| Experiment | Winkel J | (d _{target}) | v ₀ (J) [m/s] | s [m/s] | Zahl der Einzelmessungen |
|------------|-------------|------------------------|--------------------------|---------|--------------------------|
| 1 | 40° | | 231 | 101 | 5 |
| 2 | 30° | | 359 | 26 | 5 |
| 3 | 15° | | 415 | 104 | 5 |
| 4 | 0° (1,6 mm) | | 562 | 97 | 5 |
| 5 | 0° (0,1 mm) | | 545 | 106 | 5 |

Tabelle 10-25 Ergebnisse für verschiedene Ionen desorbiert aus DHB-Matrixkristallen oder anderen Präparationen (G = 92%, U_{ges} = 25 kV, l = 337 nm, Voyager DE PRO)

| Analytion | Präparation | v ₀ (J) [m/s] | s [m/s] | Zahl der Einzelmessungen | Winkel J | n |
|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------|--------------------------|----------|----------------------|
| [Insulin+H] ⁺ | DHB/dried droplet | 362 | 107 | 5 | 45° | 1,17 ^(*) |
| [Insulin+H] ⁺ | DHB/Kristall | 228 | 99 | 5 | 45° | 2,50 ^(*) |
| [Leucine Enkephalin+H] ⁺ | DHB/dried droplet | 216 | 61 | 2 | 45° | 2,66 ^(*) |
| [Carboanhydrase+H] ⁺ | DHB/Kristall | 517 | - | 1 | 40° | 0,18 ^(*) |
| [Carboanhydrase+H] ⁺ | DHB/dried droplet | 502 | 180 | 4 | 40° | 0,29 ^(*) |
| [Insulin+H] ⁺ | HCCA Oberflächenpräparation | 285 | 60 | 5 | 40° | 0,08 ^(**) |

^(*) Anpassung von n in: $\cos^n(J)$ mit $543 \cdot \cos^n(\vartheta) = v_0$

^(**) Anpassung von n in: $\cos^n(J)$ mit $291 \cdot \cos^n(\vartheta) = v_0$

Kapitel 11

Literatur
Veröffentlichungen

11 Literatur

- [Aks95] P. Aksouh, P. Chaurand, C. Deprun, S. Della-Negra, J. Hoyes, Y. LeBeyec, R. Rosas Pinho, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 515-518. Influence of the Laser Beam Direction on the Molecular Ion Ejection Angle in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [Ali56] S. G. Alikhanov, *Soviet. J. Exptl. Theoret. Phys.* 1956, 31, 517-518. A New Impulse Technique for Ion Mass Measurements.
- [All96] D. A. Allwood, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, P. E. Dyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 1575-1578. UV Optical Absorption of Matrices Used for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [All97] D. A. Allwood, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, P. E. Dyer, *Appl. Surface Sci.* 1997, 109/110, 154. Optical absorption of matrix compounds for laser-induced desorption and ionization (MALDI).
- [Alv00] S. Alves, F. Wind, F. Fournier, J. C. Tabet, *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA, USA, 2000. Influences of Gas-phase Ionization/Desolvation Processes on the Charge State Distribution of multiply-charged Proteins desorbed by MALDI.*
- [Ama97] F. M. L. Amado, P. Domingues, M. G. Santana-Marques, A. J. Ferrer-Correia, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, 11, 1347-1352. Discrimination Effects and Sensitivity Variations in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [Amf98] M. Amft, F. Moritz, C. Weickhardt, J. Grotemeyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, 12, 1879-1888. Application of the Post-source Pulse-focusing Technique in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: Optimization of the Experimental Parameters and their Influence on the capability of the Method.
- [Aya99] E. Ayala, C. C. Vera, P. Hakansson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 792-797. The Angular Distribution of neutral Poly-alanine Molecules Produced in a Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Process.
- [Bah96] U. Bahr, U. Röhling, C. Lautz, K. Strupat, M. Schürenberg, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1996, 153, 9-21. A charge detector for time-of-flight mass analysis of high mass ions produced by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI).
- [Bah97] U. Bahr, J. Stahl-Zeng, E. Gleitsmann, M. Karas, *J. of Mass Spectrom.* 1997, 32, 1111-1116. Delayed Extraction Time-of-Flight MALDI Mass Spectrometry of Proteins above 25000 Da.
- [Bar81] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *Biomed. Mass Spectrom.* 1981, 8, 493-496. Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry of Cobalamines.
- und
- M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1981, 325-327. Fast Atom Bombardment of Solids (F.A.B.): A New Ion Source for Mass Spectrometry.
- [Bea89] R. C. Beavis, R. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989, 3, 432-435. Cinnamic Acid Derivatives as Matrices for Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of

Proteins.

- [Bea89a] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989, 3, 436-439. Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometer Using 355 nm Radiation.
- [Bea89b] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989, 3, 233-237. Factors Affecting the Ultraviolet Laser Desorption of Proteins.
- [Bea90] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* 1990, 62, 1836-1840. High-Accuracy Molecular Mass Determination of Proteins Using Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry.
- [Bea91] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Chem. Phys. Lett.* 1991, 181, 479-484. Velocity Distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption.
- [Bea92] R. C. Beavis, T. Chaudhary, B. T. Chait, *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 156-158. α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry.
- [Bea92b] R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 864-868. Phenomenological Models for Matrix-assisted Laser Desorption Ion Yields Near the Threshold Fluence.
- [Bea93] R. C. Beavis, J. N. Bridson, *J. Phys. D.: Appl. Phys.* 1993, 26, 442-447. Epitaxial protein inclusion in sinapinic acid crystals.
- [Bec95] C. H. Becker, K. J. Wu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995, 6, 883-888. On the Photoionization of Large Molecules.
- [Ben78] A. Benninghoven, W. K. Sichter, *Anal. Chem.* 1978, 50, 1180-1184. Detection, Identification and Structural Investigation of Biologically Important Compounds By Secondary Ion Mass Spectrometry.
- [Ben83] A. Benninghoven, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1983, 53, 85-99. Some Aspects of Secondary Ion Mass Spectrometry of Organic Compounds.
- [Ben95] A. Bencsura, A. Vertes, *Chem. Phys. Lett.* 1995, 247, 142-148. Dynamics of hydrogen bonding and energy transfer in matrix-assisted laser desorption.
- [Ben97] A. Bencsura, V. Navale, M. Sadeghi, A. Vertes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, 11, 679-682. Matrix-Guest Energy Transfer in Matrix-assisted Laser Desorption.
- [Ber98] S. Berkenkamp, F. Kirpekar, F. Hillenkamp, *Science*, 1998, 281, 260-262. Infrared MALDI Mass Spectrometry of Large Nucleic Acids.
- [Ber98b] S. Berkenkamp, C. Menzel, K. Strupat, U. Röhling, F. Hillenkamp, *Adv. Mass Spectrom.* 1998, 14 B073940/1 - B073940/4, Mean initial velocity of ions in infrared MALDI.
- [Beu87] R. J. Beuhler, L. Friedman, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987, 78, 1-15. Rapid Heating in Fragile Molecule Mass Spectrometry.
- [Bil93] T. M. Billeci, J. T. Stults, *Anal. Chem.* 1993, 65, 1709-1716. Tryptic Mapping of Recombinant Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
- [Boe92] U. Boesl, R. Weinkauf, E. W. Schlag, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1992, 112, 121-166. Reflectron time-of-flight mass spectrometry and laser excitation for the analysis of neutrals, ionized molecules and secondary fragments.
- [Bök95] V. Bökelmann, B. Spengler, R. Kaufmann, *Eur. Mass Spectrom.* 1995, 1, 81-93. Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser

desorption/ionization.

- [Bör97] K. O. Börnsen, M. A. S. Gass, G. J. M. Bruin, J. H. M. von Adrichem, M. C. Biro, G. M. Kresbach, M. Ehrat, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1997, 11, 603-609. Influence of Solvents and Detergents on Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Measurements of Proteins and Oligonucleotides.
- [Bre98] K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1998, 176, 149-159. Matrix-assisted laser desorption/chemical ionization with reagent ion generation directly from a liquid matrix.
- [Bre99] K. Breuker R. Knochenmuss, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999, 10, 1111-1123. Proton Transfer Reactions of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrix Monomers and Dimers.
- [Bro95] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Anal. Chem.* 1995, 67, 1998-2003. Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer.
- [Bro95b] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Anal. Chem.* 1995, 67, 3990-3999. Sequence-Specific Fragmentation of Matrix-Assisted Laser Desorbed Protein/Peptide Ions.
- [Bro96] R. S. Brown, B. L. Carr, J. J. Lennon, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1996, 7, 225-232. Factors That Influence the Observed Fast Fragmentation of Peptides in Matrix-Assisted Laser Desorption.
- [Bro97] A. H. Brockmann, B. S. Dodd, R. Orlando, *Anal. Chem.* 1997, 69, 4716-4720. A Desalting Approach for MALDI-MS Using on-Probe Hyrdophobic Self-Assembled Monolayers.
- [Bro97b] R. S. Brown, J. Feng, D. C. Reiber, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 169/170, 1-18. Further studies of in-source fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption-ionization.
- [Cam48] A. E. Cameron, D. F. Eggers Jr., *Rev. Sci. Instrum.* 1948, 605-607. An Ion "Velocitron".
- [Cam84] R. Campargue, *J. Phys. Chem.* 1984, 88, 4466-4474. Progress in Overexpanded Supersonic Jets and Skimmed Molecular Beams in Free-Jet Zones of Silence.
- [Cam87] J. E. Campana, *Mass Spectrom. Rev.* 1987, 6, 395-442. Cluster Ions. I. Methods.
- [Cas92] J. A. Castoro, C. Köster, C. Wilkins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992, 6, 239-241. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization of High-mass Molecules by Fourier-transform Mass Spectrometry.
- [Cas93] J. A. Castoro, C. L. Wilkins, *Anal. Chem.* 1993, 65, 2621-2627. Ultrahigh Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Small Proteins by Fourier Transform Mass Spectrometry.
- [Cer85] R. Cerny, M. L. Gross, *Anal. Chem.* 1985, 57, 1160-1163. Abundances of Molecular Ion Species Desorbed by Fast Atom Bombardment: Observation of $(M+2H)^{+*}$ and $(M+3H)^{+}$.
- [Cha92] T.-W. D. Chan, A. W. Colburn, P. J. Derrick, D. J. Gardiner, M. Bowden, *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 188. Suppression of Matrix Ions in Ultraviolet Laser Desorption: Scanning Electron Microscopy and Raman Spectroscopy of the Solid Samples.
- [Cha93] D. M. Chambers, D. E. Goehringer, S. A. McCluckey, G. L. Glish, *Anal. Chem.* 1993, 65, 14-20. Matrix-Assisted Laser Desorption of Biological Molecules in the Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer.

- [Cha93b] J. R. Chapmann, *Practical Organic Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 1993.
- [Cha94] T.-W. D. Chan, I. Thomas, A. W. Colburn, P. J. Derrick, *Chem. Phys. Lett.* 1994, 222, 579-585. Initial velocities of positive and negative protein molecule-ions produced in matrix-assisted ultraviolet laser desorption using a liquid matrix.
- [Che98] X. Chen, J. A. Carroll, R. C. Beavis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 885-891. Near-Ultraviolet-Induced Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization as a Function of Wavelength.
- [Chi93] M. P. Chiarelli, A. G. Sharkey Jr., D. M. Hercules, *Anal. Chem.* 1993, 65, 307-311. Excited-State Proton Transfer in Laser Mass Spectrometry.
- [Cla84] E. Clayton, A. J. C. Wakefield, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1984, 969-970. Fast Atom Bombardment (F.A.B.) Mass Spectrometry; Mechanism of Ionisation.
- [Coh96] S. L. Cohen, B. T. Chait, *Anal. Chem.* 1996, 68, 31-37. Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS of Peptides and Proteins.
- [Col94] S. M. Colby, T. B. King, J. P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 8, 865-868. Improving the Resolution of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry by Exploiting the Correlation between Ion Position and Velocity.
- [Col96] S. M. Colby, J. P. Reilly, *Anal. Chem.* 1996, 68, 1419-1428. Space-Velocity Correlation Focusing.
- [Col99] R. B. Cole, J. Zhu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 607-611. Chloride Anion Attachment in Negative Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry.
- [Com85] G. Comsa, R. David, *Surf. Sci. Rep.* 1985, 5, 145-198. Dynamical parameters of Desorbing molecules.
- [Coo83] R. G. Cooks, K. L. Bush, G. L. Glish, *Science* 1983, 222, 273-291. Mass Spectrometry: Analytical Capabilities and Potentials.
- [Coo83b] R. G. Cooks, K. L. Busch, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1993, 53, 111-124. Matrix Effects, Internal Energies and MS/MS Spectra of Molecular Ions Sputtered From Surfaces.
- [Cor93] D. S. Cornett, M. A. Duncan, I. J. Amster, *Anal. Chem.* 1993, 65, 2608-2613. Liquid Mixtures for Matrix-Assisted Laser Desorption.
- [Cot94] R. J. Cotter, *ACS Symposium Series 549*, Washington, DC, USA, 1994. Time-of-Flight Mass Spectrometry.
- [Cra97] R. Cramer, R. F. Haglund Jr., F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 169/170, 51-67. Matrix-assisted laser desorption and ionization in the O-H and C=O absorption bands of aliphatic and aromatic matrices: dependence on laser wavelength and temporal beam profile.
- [Cur93] G. J. Currie, J. R. Yates III, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993, 4, 955-963. Analysis of Oligodeoxynucleotides by Negative-Ion Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry.
- [Dal96] M. J. Dale, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3321-3329. Graphite/Liquid Mixed Matrices for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
- [Dan99] H. Dang, Q. Qin, *Appl. Surf. Sci.* 1999, 151, 180-188. Velocity distributions of laser

ablated species from a $\text{La}_{0.67}\text{Ca}_{0.33}\text{MnO}_3$ target.

- [Dav83] D. V. Davies, R. G. Cooks, B. N. Meyer, J. L. McLaughlin, *Anal. Chem.* 1983, 55, 1302-1305. Identification of Naturally Occurring Quaternary Compounds by Combined Laser Desorption and Tandem Mass Spectrometry.
- [Dee97] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Nature*, 1997, 389, 827-829. Capillary flow as a cause of ring stains from dried liquid drops.
- [Dem92] P. Demirev, A. Westman, C. T. Reimann, P. Håkansson, D. Barofsky, B. U. R. Sundqvist, Y. D. Cheng, W. Seibt, K. Siegbahn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992, 6, 187-191. Matrix-assisted Laser Desorption with Ultra-short Laser Pulses.
- [Dem93] W. Demtröder, *Laserspektroskopie, Grundlagen und Techniken*, 3. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York 1993.
- [Dok91] S. J. Doktycz, P. J. Savickas, D. A. Krueger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5, 145-148. Matrix/Sample Interactions in Ultraviolet Laser-desorption of Proteins.
- [Dre90] K. Dreisewerd, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Inst. Phys. Conf. Ser. No. 114, Section 11*, Paper presented at RIS 90, Varese, Italy, 16-21 September 1990, UV-Laser desorption of neutral organic molecules: Speed distributions and fragmentations, pp 447-450.
- [Dre94] K. Dreisewerd, *Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster*, 1994. Untersuchungen zu den physikalischen Prozessen bei der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation thermisch labiler organischer Moleküle.
- [Dre95] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1995, 141, 127-148. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile.
- [Dre96] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1995, 154, 171-178. Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse widths.
- [Dub97] F. Dubois, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 169/170, 89-98. An ion-to-photon conversion detector for mass spectrometry.
- [Dwo97] R. G. Dworschak, W. Ens, K. G. Standing, *Proceedings of the 45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Palm Springs, CA, USA, 1997, p 841. Initial Velocity Measurements in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [Dwo98] R. G. Dworschak, V. Spicer, W. Ens, K. G. Standing, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, USA, 1998, pp 932. Simultaneous Initial Velocity Distribution Measurements of Matrix Ions and their Fragments.
- [Edm96] R. D. Edmondson, D. H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1996, 7, 995-1001. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Measurement Accuracy by Using Delayed Extraction.
- [Egg19] J. Eggert, *Z. Physik.* 1919, 20, 570-574. Über den Dissoziationszustand der Fixsterngase.
- [Ehr92] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 472-480. Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic Molecules and Relevance for Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.

- [Ehr93] H. Ehring, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1993. Untersuchungen zum Ionisationsprozeß bei der Laserdesorptions-/Ionisations-;Massenspektrometrie thermisch labiler Biomoleküle.
- [Ehr95] H. Ehring, B. U. R. Sundquist, *J. of. Mass Spectrom.* 1995, 30, 1303-1310. Studies of the MALDI Process by Luminescence Spectroscopy.
- [Ehr95b] H. Ehring, C. Costa, P. A. Demirev, B. U. R. Sundquist, *Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GA, USA, 1995*, p 1245. Photochemical versus Thermal Mechanism for MALDI Probed by Backside Desorption.
- [Ens81] W. Ens, K. G. Standing, B. T. Chait, F. H. Field, *Anal. Chem.* 1981, 53, 1241-1244. Comparison of Mass Spectra Obtained with Low-Energy Ion and High Energy Californium-252 Fission Fragment Bombardment.
- [Ens91] W. Ens, Y. Mao, F. Mayer, K. G. Standing *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5, 117-123. Properties of Matrix-assisted Laser Desorption. Measurements with a Time-to Digital Converter.
- [Fin99] B. Finke, B. Stahl, A. Pfenninger, M. Karas, H. Daniel, G. Sawatzki, *Anal. Chem.* 1999, 71, 3755-3762. Analysis of High-Molecular-Weight Oligosaccharides from Human Milk by Liquid Chromatography and MALDI-MS.
- [Fit93] M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith, *Anal. Chem.* 1993, 65, 3204. Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass-spectrometry of proteins and oligonucleotides.
- [Fou00] I. Fournier, A. Brunot, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Desorption 2000, Saint-Malo, France, 3-7 September 2000*, P-12. Delayed Extraction Experiments Using a Repulsing Potential Before Ion Extraction: Evidence of Clusters as Ion Precursors in MALDI.
- und
- I. Fournier, A. Brunot, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA, USA, 2000*. Some experimental evidence of cluster desorption as precursor in the ion production in MALDI.
- [Fou98] I. Fournier, R. C. Beavis, J. C. Blais, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1997, 169/170, 19-29. Hysteresis effects observed in MALDI using oriented, protein-doped matrix crystals.
- [Fou98b] I. Fournier, A. Brunot, J. C. Blais, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, USA, 1998*, pp 920. Some Dynamical Aspects in the MALDI-TOF-MS Ion Formation.
- [Fuj96] T. Fujii, *Eur. Mass Spectrom.* 1996, 2, 91-114. Account: Surface ionization organic mass spectrometry: mechanism.
- [Gal86] P. J. Gale, B. L. Bentz, B. T. Chait, F. H. Field, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* 1986, 58, 1070-1076. Reduction in Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry of the Fission Fragment and Liquid Secondary Ion Mass Spectra of Organic Dye-stuffs.
- [Gar85] B. J. Garrison, R. Srinivasan, *J. Appl. Phys.* 1985, 57, 2909-2914. Laser Ablation of organic polymers: Microscopic models for photochemical and thermal processes.
- [Gda94] M. Gdaniec, M. Gilsky, G. S. Denisov, *Acta Cryst.* 1994, C50, 1622-1626. γ -Resorcylic acid, its monohydrate and its pyridinium complex.

- [Gim97] M. Gimon-Kinsel, L. Preston-Schaffter, G. Kinsel, D. H. Russell, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 2534--2540. Effects of Matrix Structure/Acidity on Ion Formation in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.
- [Gle98] E. Gleitsmann, M. Glückmann, M. Karas, Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, USA, 1998, p 928. Peak Shapes for DE-MALDI-TOF Ion Signals- Simulation, Measurement and Usefulness for Characterizing the Initial Velocity Distribution.
- [Gle99] E. Gleitsmann, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, 1999. Untersuchungen der Verzögerten Ionenextraktion bei Matrix-unterstützter Laserdesorption/-Ionisation Massenspektrometrie unter Einsatz von Computersimulationsrechnungen.
- [Glü00] M. Glueckmann, M. Karas, Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA, USA, 2000. Imaging of the Ion Velocity in the Plume produced by UV-MALDI.
- [Glü00b] M. Glueckmann, M. Karas, Desorption 2000, Saint-Malo, France, 3-7 September 2000, P-10. The initial velocity of MALDI ions: A comparison of different experimental approaches.
- [Glü00c] M. Glückmann, M. Karas, Zusammenfassungen der 33. Diskussionstagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie; M. Linscheid, T. Hagemeyer, R. Molzahn, G. Zhang, Eds., Berlin, 2000, p 70. Aktueller Beitrag zu Modellvorstellungen bei MALDI.
- [Glü97] M. Glückmann, Diplomarbeit im Fach Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, 1997. Untersuchungen zur MALDI-Massenspektrometrie Ermittlungen von Ionenanfangsgeschwindigkeiten und ihr Einsatz in der Prozeßdiagnostik.
- [Glü98] M. Glückmann, M. Karas, Desorption '98, Mass Spectrometry of Large Organic Ions by Electrospray, Particle and Photon Induced Desorption, Rio de Janeiro, Brazil, 1998, Book of Abstracts, p. 36. The Initial Ion Velocity in MALDI - Its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation.
- [Glü98b] M. Glückmann, M. Karas in Abstracts der 31. Diskussionstagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie; C. Wernitz, A. Meffert, R. Heinicke, C. Grun, C. Weickhardt, J. Grotemeyer, Eds., Cottbus, 1998, p 95. Untersuchungen zu Startgeschwindigkeiten bei MALDI/MS.
- [Glü98c] M. Glückmann, M. Karas, Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, USA, 1998, p 790. On the Physics of the MALDI Process - The Initial Ion Velocity and its Dependence on Matrix and Preparation.
- [Glü98d] M. Glückmann, M. Karas, Desorption '98, Mass Spectrometry of Large Organic Ions by Electrospray, Particle and Photon Induced Desorption, Rio de Janeiro, Brazil, 1998, Book of Abstracts, p. 36. The Initial Ion Velocity in MALDI - Its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation.
- [Glü98e] M. Glückmann, M. Karas, Verhandl. DPG (VI) 1998, 33, 166. Untersuchungen zu Startgeschwindigkeiten in der MALDI.
- [Glü99] M. Glückmann, M. Karas, Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, Texas, USA, 1999, pp 2232-2233. The initial Velocity as a Marker for Different Desorption Characteristics in MALDI.
- [Glü99b] M. Glückmann, M. Karas, J. Mass Spectrom. 1999, 34, 467-477. The Initial Ion Velocity and its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation Method in Ultraviolet Matrix-

assisted Laser Desorption/Ionization.

- [Glü99c] M. Glückmann, M. Karas, Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, Texas, USA, 1999, pp 2232-2233. The Initial Velocity as a Marker for Different Desorption Characteristics in MALDI.
- [Gor96] J. J. Gorman, B. L. Ferguson, T. B. Nguyen, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1996, 10, 529-536. Use of 2,6-Dihydroxyacetophenone for the Analysis of Fragile Peptides, Disulphide Bonding and Small Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [Gri88] R. Grix, R. Kutscher, G. Li, U. Grüner, H. Wollnik, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988, 2, 83-85. A Time-of-flight Mass Analyzer with High Resolving Power.
- [Gri96] G. Grigorean, R. I. Carey, J. Amster, Eur. Mass Spectrom. 1996, 2, 139-143. Studies of exchangeable protons in the matrix-assisted laser desorption/ionization process.
- [Gui00] M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynski, Mass Spectrom. Rev. 2000, 19, 65-107. Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry.
- [Gui95] M. Guilhaus, J. of Mass Spectrom. 1995, 30, 1519-1532. Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Gui97] M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997, 11, 951-962. Perfect Timing: Time-of-Flight Mass Spectrometry.
- [Gus95] A. I. Gusev, W. R. Wilkinson, A. Procter, D. M. Hercules, Anal. Chem. 1995, 67, 1034-1041. Improvement of Signal Reproducibility and Matrix/Comatrix Effects in MALDI Analysis.
- [Gus95b] A. I. Gusev, A. Procter, Y. I. Rabidovich, D. M. Hercules, Anal. Chem. 1995, 67, 1805-1814. Thin Layer Chromatography Combined with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
- [Hai82] M. Haisa, S. Kashino, S.-I. Hanada, K. Tanaka, S. Okazaki, M. Shibagaki, Acta Cryst. 1982, B38, 1480. The structures of 2-hydroxy-5-methylbenzoic acid and dimorphs of 2,5-dihydroxybenzoic acid.
- M. Haisa, S. Kashino, S.-I. Hanada, K. Tanaka, S. Okazaki, M. Shibagaki, Acta Cryst. 1982, B38, 2984. The structures of 2-hydroxy-5-methylbenzoic acid and dimorphs of 2,5-dihydroxybenzoic acid; erratum.
- [Han89] O. W. Hand, R. G. Cooks, Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1989, 88, 113-132. Organic Reactions at Interfaces: Charge Minimization in Desorption Ionization of Zwitterionic Compounds.
- [Han97] M. Handschuh, S. Nettesheim, R. Zenobi, Chem. Phys. Lett. 1997, 275, 93-97. Picosecond laser desorption kinetics of poly-(ethylene glycol).
- [Han99] M. Handschuh, S. Nettesheim, R. Zenobi, Appl. Surf. Sci. 1999, 137, 125-135. Laser-induced molecular desorption and particle ejection from organic films.
- [Han99b] S. M. Hankin, P. John, J. Phys. Chem. B 1999, 103, 4566-4569. Microscopic Cluster Formation during the Laser Desorption of Chrysene-d₁₂.
- [Hei99] J. Heitz, J. T. Dickinson, Appl. Phys. A 1999, 68, 515-523. Characterization of particulates accompanying laser ablation of pressed polytetrafluorethylene (PTFE) targets.
- [Hil75] F. Hillenkamp, E. Unsöld, R. Kaufmann, R. Nietsche, Nature, 1975, 256, 119-120. Laser

microbe mass analysis of organic materials.

- [Hil83] F. Hillenkamp, in *Ion Formation from Organic solids*, A. Benninghoven, Ed., Springer Series in Chemical Physics, Springer Verlag, Berlin 1983, 25, 190-205. *Laser Induced Ion Formation from Organic Solids*.
- [Hil90] F. Hillenkamp, M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, in *Ion Formation from Organic solids (IFOS V)*, A. Hedin, B. U. R. Sundquist, A. Benninghoven, Eds., John Wiley and Sons, Chichester, 1990, 111-118. *On Popping Corn, Erupting Volcanoes, Tasting Wine, Massive Proteins and Related Matters*.
- [Hil91] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* 1991, 63, 1193A-1203A. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers*.
- [Hil91b] J. A. Hill, R. S. Annan, K. Biemann, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5, 395-399. *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization with a Magnetic Mass Spectrometer*.
- [Hil98] F. Hillenkamp, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, USA, 1998, p 796. *MALDI-MS with other wavelengths: Options, Potentials and Limitations*.
- [Hon78] F. Honda, G. M. Lancaster, Y. Fukuda, R. J. Rabalais, *J. Chem. Phys.* 1978, 69, 4931-4937. *SIMS study of the mechanism of cluster formation during ion bombardment of alkali halides*.
- [Hop99] G. Hopfgartner, F. Vilbois, C. Piguet, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 302-306. *Characterization of Supramolecular Complexes by High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry*.
- [Hor00] V. Horneffer, B. Krebs, R. Reichelt, F. Hillenkamp, *Desorption 2000*, Saint-Malo, France, 3-7 September 2000, P-01. *Investigation of the Protein Inclusion into MALDI-Matrix Crystals with High Resolution Scanning Electron Microscopy*.
- [Hor00b] V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitschek, *Anal. Chem.* accepted, Nov. 2000.
- [Hor98] V. Horneffer, K. Strupat, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, USA, 1998, p 923. *Incorporation of Cytochrome C into crystals of different isomers of dihydroxybenzoic acid for MALDI-MS*.
- [Hor99] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom.* 1999, 185/186/187, 859-870. *Is the incorporation of analytes into the matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid*.
- [Hsi98] S. Hsi, K. Dreisewerd, R. C. van der Schors, C. Jiménez, J. Stahl-Zeng, F. Hillenkamp, J. W. Jorgenson, W. P. M. Geraerts, K. W. Li, *Anal. Chem.* 1998, 70, 1847-1852. *Separation and Identification of Peptides in Single Neurons by Microcolumn Liquid Chromatography-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Postsource Decay Analysis*.
- [Hsu83] B. H. Hsu, Y.-X. Xie, K. L. Bush, R. G. Cooks, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1983, 51, 225-233. *Enhanced Ionization of Organic Salts in Secondary-Ion Mass Spectrometry*.
- [Hun91] J. E. Hunt, K. R. Lykke, M. J. Pellin, in K. G. Standing, W. Ens, Eds., *Methods and Mechanisms for Producing Ions from Large Molecules*, Plenum Press, New York, 1991, 309-314. *Laser Desorption/Photoionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry of*

Polymer additives.

- [Hur94] G. B. Hurst, T. J. Czartoski, M. V. Buchanan, Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, Illinois, USA, 1994, pp 975. Alternative Sample Preparation Methods for MALDI-MS.
- [Hut91] T. Huth-Fehre, C. H. Becker, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991, 5, 378-382. Energetics of Gramicidin S After UV Laser Desorption from a Ferulic Acid Matrix.
- [Hut92] T. Huth-Fehre, J. N. Gosine, K. J. Wu, C. H. Becker, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1992, 6, 209-213. Matrix-assisted Laser Desorption Mass Spectrometry of Oligodeoxythymidylic Acids.
- [Hut93] T. W. Hutchens, T.-T. Yip, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1993, 7, 576-580. New Desorption Strategies for the Mass Spectrometric Analysis of Macromolecules.
- [Imr95] D. C. Imrie, J. M. Pentney, J. S. Cottrell, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1995, 9, 1293-1296. A Faraday Cup Detector for High-mass Ions in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Ing94] A. Ingendoh, M. Karas, F. Hillenkamp, U. Giessmann, Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1994, 131, 345-354. Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry.
- [Ioa95] D. Ioanoviciu, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995, 6, 889-891. Linear Time-of-Flight Mass Spectrometers: Postsource Pulse Focusing Conditions and Mass Scale.
- [Jac97] A. T. Jackson, H. T. Yates, C. I. Lindsay, Y. Didier, J. A. Segal, J. H. Srievens, G. Critchley, J. Brown, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997, 11, 520-526. Utilizing Time-lag Focusing Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for the End Group Analysis of Synthetic Polymers.
- [Jes94] S. Jespersen, M. Niessen, U. R. Tjaden, J. van der Greef, E. Litborn, U. Linberg, J. Roeraade, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1994, 8, 581-584. Attomole Detection of Proteins by Matrix-assisted Laser/Desorption/Ionization Mass Spectrometry with the use of Picolitre Vials.
- [Joh91] R. E. Johnson, B. U. R. Sundquist, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991, 5, 574-578. Laser-pulse Ejection of Organic Molecules from a Matrix: Lessons from Fast-ion-induced Ejection.
- und
- R. E. Johnson, S. Banerjee, A. Hedin, D. Fenyo, B. U. R. Sundquist, in K. G. Standing and W. Ens, Eds., Methods and Mechanisms for Producing Ions from Large Molecules, Plenum Press, New York, 1991, p 89.
- [Joh98] R. E. Johnson, Y. LeBeyec, Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 1998, 177, 111-118. Angular distribution of the ejecta in matrix-assisted laser desorption/ionization: Model dependence.
- [Jou90] C. Jouvét, C. Lardeux-Dedonder, M. Richard-Viard, D. Solgadi, A. Tramer, J. Phys. Chem. 1990, 94, 5041-5048. Proton-transfer reactions in neutral phenol-(NH₃)_n and phenol-(C₂H₅NH₂)_n.
- [Juh92] P. Juhasz, I. A. Papayannopoulos, C. Zeng, V. Papov, K. Biemann, Proceedings of the 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC, USA, 1992, pp 1913-1914. The Utility of Matrix-assisted Laser Desorption for the direct

Analysis of enzymatic Digests of Proteins.

- [Juh93] P. Juhasz, C. E. Costello, K. Biemann, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993, 4, 399-409. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry with 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic Acid Matrix.
- [Juh94] P. Juhasz, K. Biemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91, 4333-4337. Mass Spectrometric Molecular-Weight Determination of Highly Acidic Compounds of Biological Significance via Their Complexes with Basic Polypeptides
- [Juh96] P. Juhasz, M. T. Roskey, I. P. Smirnov, L. A. Haff, M. L. Vestal, S. A. Martin, *Anal. Chem.* 1996, 68, 941-946. Applications of Delayed Extraction Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry to Oligonucleotide Analysis.
- [Juh97] P. Juhasz, M. L. Vestal, S. A. Martin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997, 8, 209-217. On the Initial Velocity of Ions generated by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization and its Effect on the Calibration of Delayed Extraction Time-of-Flight Mass Spectra.
- [Kam97] J. Kampmeier, K. Dreisewerd, M. Schürenberg, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 169/170, 31-41. Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for UV and IR MALDI. Part: I UV and IR laser ablation in the MALDI process.
- [Kar00] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer, *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 1-12. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors.
- [Kar00b] M. Karas, M. Glueckmann, *Desorption 2000, Saint-Malo, France, 3-7 September 2000, O-22. First Steps to a Unified MALDesorption and Ionization Model.*
- [Kar85] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 1985, 57, 2935-2939. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules..
- [Kar87] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987, 78, 53-68. Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-volatile Compounds.
- [Kar88] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 1988, 60, 2299-2301. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons.
- [Kar89] M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1989, 92, 231-242. UV Laser Matrix Desorption/ionization Mass Spectrometry of Proteins in the 100 000 Dalton Range.
- [Kar92] M. Karas, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, *Proceedings of the 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC, USA, 1992, pp 368- 369. Matrix-Mixtures for a Superior Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.*
- [Kar93] M. Karas, H. Ehring, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, M. Grehl, B. Krebs, *Org. Mass Spectrom.* 1993, 28, 1476-1481. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry with Additives to 2,5-Dihydroxybenzoic Acid.
- [Kar93b] M. Karas, in *Fundamental Processes in Sputtering of Atoms and Molecules (Sput92), Symposium on the Occasion of the 250th Anniversary of the Royal Danish Academy of Sciences and Letters, Copenhagen, 1992, Invited Reviews, P. Sigmund, Ed., Bianco Lunos Bogtrykkeri, 1993, 623-641. Fundamental Aspects of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.*

- [Kar95] M. Karas, U. Bahr, K. Strupat, F. Hillenkamp, A. Tsarbopoulos, B. N. Pramanik, *Anal. Chem.* 1995, 67, 675-679. Matrix-Dependence of Metastable Fragmentation of Glycoproteins in MALDI TOF Mass Spectrometry.
- [Kar96] M. Karas, U. Bahr, J. Stahl-Zeng, *Large Ions: Their Vaporization, Detection and Structural Analysis*, ed. by T. Baer, C. Y. Ng, I. Powis, p. 27. John Wiley, 1996. Steps Towards a More Refined Picture of the Matrix Function in UV MALDI.
- [Kar97] M. Karas, *J. of Mass Spectrom.* 1997, 32, 1-3. 'Time-of-Flight Mass Spectrometry with Improved Resolution,' W. C. Wiley and I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* 26, 1150 (1955).
- [Kar98] V. Karbach, R. Knochenmuss, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, 12, 968-974. Do Single Matrix Molecules Generate Primary Ions in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [Kat98] V. Katta, D. T. Chow and M. F. Rohde, *Anal. Chem.* 1998, 70, 4410-4416. Applications of In-Source Fragmentation of Protein Ions for Direct Sequence Analysis by Delayed Extraction MALDI-TOF Mass Spectrometry.
- [Kau96] R. Kaufmann, P. Chaurand, D. Kirsch, B. Spengler, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 1199-1208. Post-source Decay and Delayed Extraction in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometry. Are There Trade-offs?
- [Kin89] G. R. Kinsel, M. V. Johnston, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1989, 91, 157-176. Post Source Pulse Focusing: A Simple Method to Achieve Improved Resolution in a Time-of-flight Mass Spectrometer.
- [Kin97] G. R. Kinsel, R. D. Edmondson, D. H. Russell, *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 714-722. Profile and Flight Time Analysis of Bovine Insulin Clusters as a Probe of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Ion Formation Dynamics.
- [Kin99] G. R. Kinsel, M. E. Gimon-Kinsel, K. J. Gillig, D. H. Russell, *J. Mass Spectrom.* 1999, 34, 684-690. Investigation of the Dynamics of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Ion Formation Using an Electrostatic Analyzer/Time-of-flight Mass Spectrometer.
- [Kno96] R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 871-877. The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption Ionization.
- [Kno97] M. Knobeler, K. P. Wanczek, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 163, 47-68. Theoretical investigation of improved ion trapping in matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: independence of ion initial velocity.
- [Kno98] R. Knochenmuss, V. Karbach, U. Wiesli, K. Breuker, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, 12, 529-534. The Matrix Suppression Effect in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization: Application to negative Ions and further Characteristics.
- [Kol96] V. S. K. Kolli, R. Orlando, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1996, 10, 923-926. A New Matrix for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization on Magnetic Sector Instruments with Point Detectors.
- [Kol97] V. S. K. Kolli, R. Orlando, *Anal. Chem.* 1997, 69, 327-332. A New Strategy for MALDI on Magnetic Sector Mass Spectrometers with Point Detectors.
- [Kös92] K. Köster, J. A. Castoro, C. I. Wilkens, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 7572-7574. High-Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Biomolecules by Fourier

Transform Mass Spectrometry.

- [Kra96] J. Krause, M. Stoeckli, U. P. Schlunegger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 1927-1933. Studies on the Selection of New Matrices for Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Kra98] P. Kraft, S. Alimpiev, E. Dratz, J. Sunner, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 912-924. Infrared, Surface-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry on Frozen Aqueous Solutions of Proteins and Peptides Using Suspensions of Organic Solids.
- [Krü00] R. Krüger, M. Karas, P. Juhasz, *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, CA, USA, 2000. Similarities of ECD and ISD as a hint for electron capture in MALDI.
- [Kru98] A. N. Krutchinsky, A. V. Loboda, V. L. Spicer, R. G. Dworschak, W. Ens, K. G. Standing, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1998, 12, 508-518. Orthogonal Injection of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Ions into a Time-of-flight Spectrometer Through a Collisional Damping Interface.
- [Lan29] I. Langmuir; K. H. Kingdon, *Phys. Rev.* 1929, 34, 129-135. Contact potential measurements with adsorbed films.
- [Lan79] G. M. Lancaster, F. Honda, Y. Fukuda, J. W. Rabalais, *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 1951-1958. Secondary Ion Mass Spectrometry of Molecular Solids. Cluster Formation during Ion Bombardment of Frozen Water, Benzene and Cyclohexane.
- [Lan98] C. M. Land, G. R. Kinsel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 1060-1067. Investigation of the Mechanism of Intracluster Proton Transfer from Sinapinic Acid to Biomolecular Analytes.
- [Lav99] G. Lavine, J. Allison, *J. of Mass Spectrom.* 1999, 34, 741-748. Evaluation of Bumetanide as a Matrix for Prompt Fragmentation Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization and Demonstration of Prompt Fragmentation/Post-source Decay Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
- [Leh97] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, 11, 1483-1492. Ionization mechanisms in matrix-assisted laser-desorption/ionization mass-spectrometry – Contribution of preformed ions.
- [Leh99] E. Lehmann, S. Vetter, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999, 10, 27-34. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectra Reflect Solution-Phase Zinc Finger Peptide Complexation.
- [Len98] C. Lenz, M. Schäfer, H. Budziewicz, *J. Mass Spectrom.* 1998, 33, 984-987. Improved Matrices for the Analysis of Ferri-Pyoverdins by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry.
- [Lev81] J.-L. Leviel, G. Auvert, J.-M. Savariault, *Acta Cryst.* 1981, B37, 2185. Hydrogen bond studies. A neutron diffraction study of the structures of succinic acid at 300 K and 77 K.
- [Lia95] P.-C. Liao, J. Allison, *J. of Mass Spectrom.* 1995, 30, 408-423. Ionization Processes in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Matrix-dependent Formation of $[M+H]^+$ vs. $[M+Na]^+$ Ions of Small Peptides and Some Mechanistic Comments.
- [Lig86] W. V. Ligon, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 52, 189. The Secondary Ion Mass Spectrum of Glycerol- d_5 : Evidence for Radical Cation Intermediates.

- [Loo94] J. A. Loo, P. Hu, R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1994, 5, 959-965. Interaction of Angiotensin Peptides and Zinc Metal Ions Probed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry.
- [Lsi95] LSI Laser Science, Inc. VSL-337ND Nitrogen Laser Operator`s Manual, 1995.
- [Lue00] H.-C. Lüdemann, R. W. Redmond, F. Hillenkamp, *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, CA, USA, 2000. UV-MALDI: Fluorescence Spectroscopy of Crystalline Matrices.
- [Mam72] V. I. Karataev, B. A. Mamyryn, D. V. Shmikk, *Soviet Phys.-Technical Phys.* 1972, 16, 1177-1179. New Method for Focusing Ion Bunches in Time-of-Flight Mass Spectrometers.

Translated from *Zh. Eksp. Theor. Fiz.* 1971, 41, 1498-1501.
- [Mam73] B. A. Mamyryn, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin, *Soviet Phys.-JETP.* 1973, 37, 45-48. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution.

Translated from *Zh. Eksp. Theor. Fiz.* 1973, 64, 82-89.
- [Mam79] B. A. Mamyryn, D. V. Shmikk, *Soviet Phys.-JETP.* 1979, 49, 762-764. The linear mass-reflectron.

Translated from *Zh. Eksp. Theor. Fiz.* 1979, 76, 1500-1505.
- [Mam94] B. A. Mamyryn, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1994, 131, 1-19. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry.
- [Mar95] J. A. Marto, A. G. Marshall, M. A. May, P. A. Limbach, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995, 6, 936-946. Ion Trajectories in an Electrostatic Ion Guide for External Ion Source Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry.
- [Mas99] C. Masselon, B. Salih, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999, 10, 19-26. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Fourier Transform Mass Spectrometry of Luteinizing Hormone Releasing Hormone-Metal Ion Complexes.
- [Mce86] C. N. McEwen, *Mass Spectrom. Rev.* 1986, 5, 521-547. Radicals in analytical mass spectrometry.
- [Mcf76] R. D. McFarlane, D. F. Torgesson, *Science*, 1976, 191, 920-925. Californium-252 Plasma Desorption Mass Spectrometry.
- [Mcl99] F. W. McLafferty, E. K. Fridriksson, D. M. Horn, M. A. Lewis, R. A. Zubarev, *Science* 1999, 284, 1289-1290. Biomolecule Mass Spectrometry.
- [Mef95] A. Meffert und J. Grotemeyer, *Eur. Mass Spectrom.* 1995, 1, 594-598. Letter: Reactions in molecular clusters: proton transfer to small amino acids.
- [Mef98] A. Meffert, J. Grotemeyer, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 1998, 102, 459-468. Formation, Stability and Fragmentation of Biomolecular Clusters in a Supersonic Jet Investigated with Nano- and Femtosecond Laser Pulses.
- [Met93] J. O. Metzger, R. Woisch, W. Tszynski, R. Angermann, J. Puls, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7, 1041-1047. Matrix Isolation Applied to the ^{252}Cf Plasma-desorption

Mass Spectrometry of Underivatized Oligosaccharides.

- [Met94] J. O. Metzger, R. Woisch, W. Tuszynski, R. Angermann, Fresenius. J. Anal. Chem. 1994, 349, 473-475. New type of matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of polysaccharides and proteins.
- [Mic83] J. Michl, Int. J. Mass Spectrom. and Ion Phys. 1983, 53, 255-272. Secondary Ion Mass Spectrometry of Low-Temperature Solids.
- [Moh95] M. D. Mohr, K. O. Börnsen, H. M. Widmer, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1995, 9, 809-814. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass spectrometry: Improved Matrix for Oligosaccharides.
- [Mow94] C. D. Mowry, M. V. Johnston, J. Phys. Chem. 1994, 98, 1904. Internal energy of neutral molecules ejected by matrix-assisted laser-desorption.
- [Mow97] I. A. Mowat, R. J. Donovan, R. R. J. Maier, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997, 11, 89-98. Enhanced Cationization of Polymers Using Delayed Ion Extraction with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [Nel92] R. W. Nelson; T. W. Hutchens, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1992, 6, 4-8. Mass Spectrometric Analysis of a Transition-metal-binding Peptide Using Matrix-assisted Laser-desorption Time-of-flight Mass Spectrometry. A Demonstration of Probe Tip Chemistry.
- [Nel94] R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1994, 8, 627-631. Mass Determination of Human Immunglobulin IgM Using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Nel95] R. W. Nelson, D. Dogruel, P. Williams, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1995, 5, 625. Detection of human IgM at $m/z \sim 1$ Mda.
- [Net88] M. Nethaji, V. Pattabhi, G. R. Desiraju, Acta Cryst. 1988, C44, 275-277. Structure of 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid (ferulic acid)
- [New95] New Wave Research, Inc. Mini/Lase Nd- YAG Laser Operating Manual, Sunnyvale, USA, 1995.
- [Niu98] S. Niu, W. Zhang, B. T. Chait, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1998, 9, 1-7. Direct Comparison of Infrared and Ultraviolet Wavelength Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins.
- [Ori92] R. Orlando, Anal. Chem. 1992, 64, 332-334. Analysis of Peptides Contaminated with Alkali-Metal Salts by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry Using Crown Ethers.
- [Ove90] A. Overberg, M. Karas, U. Bahr, R. Kaufmann, F. Hillenkamp, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1990, 4, 293-296. Matrix-assisted Infrared-laser (2,94 μm) Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules.
- [Ove91] A. Overberg, M. Karas, F. Hillenkamp, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991, 3, 128-131. Matrix-assisted Laser Desorption of Large Biomolecules with a TEA-CO₂-Laser.
- [Pac85] S. J. Pachuta, R. G. Cooks, ACS Symp. Ser. 1985, 291, 1-42. Molecular Secondary Ion Mass Spectrometry. Molecular Secondary Ion Mass Spectrometry
- [Pac87] S. J. Pachuta, R. G. Cooks, Chem. Rev. 1987, 87, 647-669. Mechanisms in Molecular SIMS.

- [Pan92] Y. Pan, R. J. Cotter, *Org. Mass Spectrom.* 1992, 27, 3-8. Measurement of the initial Translational Energies of Peptide Ions in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
- [Pap96] D. I. Papac, A. Wong, A. J. S. Jones, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3215-3223. Analysis of Acidic Oligosaccharides and Glycopeptides by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry.
- [Per96] PerSeptive Biosystems, Inc. Framingham, USA, Voyager™ Biospectrometry™ Workstation with Delayed Extraction™ Technology, User's Guide. 1996.
- [Pfe00] A. Pfenninger, M. Glueckmann, M. Karas, *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, CA, USA, 2000. Successful MALDI Analysis: Interaction or Incorporation of Analytes and Matrix?
- [Pfe98] A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, B. Stahl, G. Sawatzki, *Proceedings of the 46st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, USA, 1998, pp 1382. Matrix-optimization for MALDI/MS of oligosaccharides from human milk.
- [Pfe99] A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, B. Stahl, G. Sawatzki, *J. of Mass Spectrom.* 1999, 34, 98-104. Matrix Optimization for Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Oligosaccharides from Human Milk.
- [Pie93] U. Piesles, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser, *Nucleic. Acids Research* 1993, 21, 3191-3196. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides.
- [Pit96] J. J. Pitt, J. J. Gorman, *Raid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 1786-1788. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry of Sialylated Glycopeptides and Proteins Using 2,6-Dihydroxyacetophenone as a Matrix.
- [Pos78] M. A. Posthumus; P. G. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar, M. C. Ten Noever de Brauw, *Anal. Chem.* 1978, 50, 985-991.
- [Pre94] L. M. Preston-Schaffter, G. R. Kinsel, D. H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1994, 5, 800-806. Effects of Heavy-Atom Substituents on Matrices Used for Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry.
- [Pre97] J. Preisler, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* 1997, 69, 4390-4398. Laser Photodissociation of Insulin Ions Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption.
- [Pri99] D. M. Price, S. Bashir, P. R. Derrick, *Thermochimica Acta* 1999, 327, 167-171. Sublimation properties of x,y-dihydroxybenzoic acid isomers as model matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) matrices.
- [Pur97] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, *Chem. Phys. Lett.* 1997, 286, 425. Gas-phase diagnostics and LIF imaging of 3-hydroxypicolinic acid MALDI matrix plumes.
- [Pur98] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, *Chem. Phys. Lett.* 1998, 286, 425-432. Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes.
- [Pur99] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, G. B. Hurst, M. V. Buchanan, *Phys. Rev. Lett.* 1999, 83, 444-447. Imaging of Vapour Plumes Produced by Matrix Assisted Laser Desorption: A Plume Sharpening Effect.
- [Qui94] A. P. Quist, T. Huth-Fehre, B. U. R. Sundqvist, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 8, 149-154. Total Yield Measurements in Matrix-assisted Laser Desorption Using a Quartz

- Crystal Microbalance.
- [Ria94] K. Riahi, G. Bolbach, A. Brunot, F. Breton, M. Spiro, J.-C. Blais, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 8, 242-247. Influence of Laser Focusing in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
- [Röm95] H. Römpp (Begr.), J. Falbe (Hrsg.), *Chemie Lexikon*, Stuttgart, New York, Thieme, 1995.
- [Rus97] D. H. Russell, R. D. Edmondson, *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 263-276. High-resolution Mass Spectrometry and Accurate Mass Measurements with Emphasis on the Characterization of Peptides and Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Rya80] T. M. Ryan, R. J. Day, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* 1980, 52, 2054-2057. Secondary Ion Mass Spectra of Diquaternary Ammonium Salts.
- [Sad98] M. Sadeghi, A. Vertes, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, USA, 1998, p 925. Sample morphology Effects on Volatilization Efficiency in Matrix-Assisted Laser Desorption.
- [Sah21] M. N. Saha, *Z. Physik* 1921, 6, 40-50. Versuch der Theorie der physikalischen Erscheinungen bei hohen Temperaturen mit Anwendungen uf die Astrophysik.
- [Sch96] M. Schürenberg, T. Schulz, K. Dreisewerd, F. Hillenkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 1873-1880. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization in Transmission Geometry: Instrumental Implementation and Mechanistic Implications.
- [Sch96b] D. C. Schriemer, L. L. Li, *Anal. Chem.* 1996, 68, 2721-2725. Detection of High Molecular Weight Narrow Polydisperse Polymers up to 1.5 Million Daltons by MALDI Mass Spectrometry.
- [Sch97] U. S. Schubert, J. M. Lehn, J. Hassmann, C. X. Hahn, N. Hallschmid and P. Müller, *ACS Symposium Series* 1997, 704, 248-258. Design of Assemblies of Functionalized Nanoscopic Gridlike Coordination Arrays.
- [Sch99] M. Schürenberg, K. Dreisewerd, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 1999, 71, 221-229. Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Peptides and Proteins with Particle Suspension Matrices.
- [Sch99b] J. Schäfer, *Dissertation*, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, 1999. Untersuchungen zur Bildung von negativen Ionen bei der matrixunterstützten Laser-Desorptions/Ionisation Massenspektrometrie.
- [Sco94] C. T. J. Scott, C. Kosmidis, W. J. Jia, W. D. Ledingham and R. P. Singhal, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 8, 829-832. Formation of Atomic Hydrogen in Matrix-assisted Laser Desorption Ionization.
- [Sho97] R. T. Short, *Physica Scripta.* 1997, T71, 46-49. High Resolution Time-of-Flight Spectrometry.
- [Sim97] T. A. Simmons, P. A. Limbach, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, 11, 567-572. The Use of a Co-matrix for Improved Analysis of Oligonucleotides by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Spe87] B. Spengler, M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *J. Phys. Chem.* 1987, 91, 6502-6506. Excimer Laser Desorption Mass Spectrometry of Biomolecules at 248 and 193 nm..
- [Spe88] B. Spengler, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Instrum.* 1988, 17(1&2), 173-193. Postionization of Laser-desorbed Organic and Inorganic Compounds in a Time of Flight

Mass Spectrometer.

- [Spe90] B. Spengler, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* 1990, 62, 793-796. Ultraviolet Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins above 100 000 Daltons by Pulsed Ion Extraction Time-of-Flight Analysis.
- [Spe91] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5, 198-202. Metastable Decay of Peptides and Proteins in Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry.
- [Spe92] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, E. Jaeger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992, 6, 105-108. Peptide Sequencing by Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry.
- [Spe93] B. Spengler, V. Bökelmann, *Nucl. Instrum Meth.* 1993, B 82, 379-385. Angular and time resolved intensity distributions of laser-desorbed matrix ions.
- [Spe94] B. Spengler, M. Hubert, R. Kaufmann, *Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, USA, 1994*, pp 1041. MALDI Ion Imaging and Biological Ion Imaging with a new Scanning UV-Laser Microprobe.
- [Spe97] B. Spengler, *J. of Mass Spectrometry*, 1997, 32, 1019-1036. Post-source Decay Analysis in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules.
- [Sta94] B. Stahl, S. Thurl, J. Zeng, M. Karas, F. Hillenkamp, M. Steup, G. Sawatzki, *Anal. Biochem.* 1994, 223, 218-226. Oligosaccharides from Human Milk as Revealed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
- [Ste00] E. Stevenson, K. Breuker, R. Zenobi, *J. of Mass Spectrom.* 2000, 35, 1035-1041. Internal energies of analyte ions generated from different matrix-assisted laser desorption/ionization matrices.
- [Str91] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1991, 111, 89-102. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry.
- [Str91b] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 12th International Mass Spectrometry Conference, August 1991, Amsterdam, NL, extended Abstract, ThA-B23.
- [Str97] K. Strupat, J. Kampmeier, V. Horneffer, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 169/170, 43-50. Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for UV and IR MALDI. Part II: Crystallographic and mass spectrometric analysis.
- [Stu91] J. T. Stults, J. C. Marsters, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5, 359-363. Improved Electrospray Ionization of Synthetic Oligodeoxynucleotides.
- [Sun88] J. Sunner, A. Morales, P. Kebarle, *Int J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1988, 89, 169-186. Mechanism of Formation of FAB Spectra.
- [Sun93] J. Sunner, *Org. Mass Spectrom.* 1993, 28, 805. Ionization in liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (LSIMS).
- [Sun95] J. Sunner, E. Dratz, Y.-C. Chen, *Anal. Chem.* 1995, 67, 4335-4342. Graphite Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Peptides and Proteins from Liquid Solutions.
- [Sze98] E. T. P. Sze, T.-W. D. Chan, G. Wang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 166-174. Formulation of Matrix Solutions for the Use in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Biomolecules.

- [Tag98] V. Y. Taguchi, S. W. D. Jenkins, P. W. Crozier, D. T. Wang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 830-839. Determination of Diquat and Paraquat in water by Liquid Chromatography- (electrospray Ionization) Mass Spectrometry.
- [Tan88] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 151-153. Protein and Polymer Analysis up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Tan88b] X. Tang, R. Beavis, W. Ens, F. Lafortune, B. Schueler, K. G. Standing, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1988, 85, 43-67. A Secondary Ion Time-of-Flight Mass Spectrometer with an Ion Mirror.
- [Tan94] K. Tang, N. I. Taranenko, S. L. Allman, C. H. Chen. L. Y. chen, L. Y. Cháng, K. B. Jacobson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 8, 673-677. Picolinic Acid as a Matrix for Laser Mass Spectrometry of Nucleic Acids and Proteins.
- [Thi97] M. Thierolf, U. Bahr, M. Karas, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm Springs, FL, USA, 1997*, pp 856. Which Matrix Properties determine if MALDI Ions Survive or Die (Fragment)?
- [Thi99] M. Thierolf, M. Karas, *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, Texas, USA, 1999*, pp 2612-2613. Incorporation and Detectability of Noncovalent Complexes in MALDI MS.
- [Tsa97] A. Tsarbopoulos, U. Bahr, B. N. Pramanik, M. Karas *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 169, 251-261. Glycoprotein analysis by delayed extraction and post-source decay MALDI-TOF-MS.
- [Twe96] D. Twerenbold, *Rep. Prog. Phys.* 1996, 59, 349-426. Cryogenic particle detectors.
- [Ver90] A. Vertes, R. D. Levine, *Chem. Phys. Lett.* 1990, 171, 284-290. Sublimation versus Fragmentation in matrix-assisted laser desorption.
- [Ver90b] A. Vertes, R. Gijbels, R. D. Levine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1990, 4, 228-233. Homogeneous Bottleneck Model of Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of Large Molecules.
- [Ver92] A. Verentchikov, W. Ens, J. Martens, K. G. Standing, *Proceedings of the 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC, USA, 1992*, pp 360-361. Experimental Study of Ion Ejection Processes in Matrix Assisted Laser Desorption.
- [Ver93] A. Vertes, G. Irinyi, R. Gijbels, *Anal. Chem.* 1993, 65, 2389-2393. Hydrodynamic Model of Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry.
- [Ver94] A. Verentchikov, W. Ens, K. G. Standing, *Anal. Chem.* 1994, 66, 126-133. Reflecting Time-of-Flight Mass Spectrometer with an Electrospray Ion Source and Orthogonal Extraction.
- [Ver99] A. Verentchikov, I. Smirnov, M. L. Vestal, *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, Texas, USA, 1999*, pp 3052-3053. Collisional Cooling and Ion Formation Processes in orthogonal MALDI at intermediate Gas Pressure.
- [Ves83] M. L. Vestal, *Mass Spectrom. Rev.* 1983, 2, 447-480. Ionization techniques for nonvolatile molecules.
- [Ves95] M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 1044-

1050. Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Ves98] M. Vestal, P. Juhasz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 8, 892-911. Resolution and Mass Accuracy in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight.
- [Vor94] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Anal. Chem.* 1994, 66, 3281-3287. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation
- [Vor94b] O. Vorm, M. Mann, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1994, 5, 955-958. Improved Mass Accuracy in Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Peptides.
- [Wan93] B. H. Wang, K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993, 4, 393-398. Gas-Phase Cationization and Protonation of Neutrals Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption.
- [Web78] H. Weber, G. Herziger, *Laser: Grundlagen u. Anwendungen*, 1. Nachdr. d. 1. Aufl. 1972 Weinheim, Physik Verlag 1978.
- [Wei93] S. R. Weinberg, K. O. Boernsen, J. W. Finchy, V. Robertson, B. D. Musselmann, *Proceedings of the 41st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, CA, USA, 1993, pp 775a-775b.
- [Wei99] J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature*, 399, 243-246. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon.
- [Wes94] A. Westman, P. Demirev, T. Huth-Fehre, J. Bielawski, B. U. R. Sundquist, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1994, 130, 107-115. Sample exposure effects in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry of large biomolecules.
- [Wes95] A. Westman, E. Barofsky, *Proceedings of the 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Atlanta, GA, USA, 1995, pp 1222. Scanning Electron Microscopy as a Tool to Investigate Sample Morphology Effects in Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry.
- [Wes95b] A. Westman, T. Huth-Fehre, P. Demirev, B. U. R. Sundquist, *J. of Mass Spectrom.* 1995, 30, 206-211. Sample Morphology Effects in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins.
- [Whi91] M. A. White, F. H. Strobel, D. H. Russell, *Proceedings of the 39th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Nashville, TN, USA, 1991, p 334. Temporal Profiles of Ions Produced by Matrix-assisted Laser Desorption.
- [Whi92] M. A. White, F. H. Strobel, D. H. Russell, *Proceedings of the 40th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Washington, DC, USA, 1992, pp 362-363. Comparison of Arrival Time Distributions of Mass Selected Ions Produced Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization.
- [Whi95] R. M. Whittal, L. Li, *Anal. Chem.* 1995, 67, 1950-1954. High-Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization in a Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer.
- [Whi97] R. M. Whittal, D. C. Schriemer, L. Li, *Anal. Chem.* 1997, 69, 2734-2741. Time-Lag Focusing MALDI Time-of-Flight Mass Spectrometry for Polymer Characterization: Oligomer Resolution, Mass Accuracy and Average Weight Information.
- [Wil55] W. C. Wiley, I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* 1955, 26, 1150-1157. Time-of-Flight Mass

Spectrometry with Improved Resolution.

- [Wil96] E. R. Williams, *J. Mass Spectrom.* 1996, 31, 831-842. Proton Transfer Reactivity of Large Multiply Charged Ions.
- [Won97] C. K. L. Wong, T.-W. D. Chan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997, 11, 513-519. Cationization Processes in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Attachment of Divalent and Trivalent Metal Ions.
- [Woo95] A. S. Woods, J. C. Buchsbaum, T. A. Worrall, J. M. Berg, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* 1995, 67, 4462-4465. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of noncovalently Bound Compounds.
- [Wri85] L. G. Wright, R. G. Cooks, K. V. Wood, *Biomed. Mass Spectrom.* 1985, 12, 159-162. Matrix Enhanced Laser Desorption in Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry.
- [Wu93] K. J. Wu, A. Steding, C. H. Becker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7, 142-146. Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry of Oligonucleotides Using 3-Hydroxypicolinic Acid as an Ultraviolet-sensitive Matrix..
- [Wu94] K. Wu, T. A. Shaler, B. T. Becker, *Anal. Chem.* 1994, 66, 1637-1645. Time-of-Flight Mass Spectrometry of Underivatized Single-Stranded DNA Oligomers by Matrix-Assisted Laser Desorption.
- [Wu98] X. Wu, M. Sadeghi, A. Vertes, *J. Phys. Chem. B* 1998, 102, 4770-4778. Molecular Dynamics of Matrix-Assisted Laser Desorption of Leucine Enkephalin Guest Molecules from Nicotinic Acid Host Crystal.
- [Xia93] F. Xiang, R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* 1993, 28, 1424-1429. Growing Protein-doped Sinapinic Acid Crystals for Laser Desorption: an Alternative Preparation Method for Difficult Samples.
- [Xia94] F. Xiang, R. Beavis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 8, 199-204. A Method to Increase Contaminant Tolerance in Protein Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization by the Fabrication of Thin Protein-doped Polycrystalline Films.
- [Xia94b] F. Xiang, R. C. Beavis, *Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, USA, 1994*, p 974. New Methods for Matrix-Assisted Laser Desorption Sample Handling.
- [Xu97] N. Xu, Z.-H. Huang, J. T. Watson, D. A. Gage, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997, 8, 116-124. Mercaptobenzothiazoles: A New Class of Matrices for Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.
- [Yao95] J. Yao, M. Dey, S. J. Pastor, C. L. Wilkens, *Anal. Chem.* 1995, 67, 3638-3642. Analysis of High-Mass Biomolecules Using Electrostatic Fields and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization in a Fourier Transform Mass Spectrometer.
- [Yao98] J. Yao, J. R. Scott, M. K. Young, C. L. Wilkins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 805-813. Importance of Matrix: Analyte Ratio for Buffer Tolerance Using 2,5-Dihydroxybenzoic Acid as a Matrix in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Fourier Transform Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight.
- [Yau93] P. Y. Yau, T.-W. Dominic Chan, P. G. Cullis, A. W. Colburn, P. J. Derrick, *Chem. Phys. Lett.* 1993, 202, 93-100. Threshold fluences for production of positive and negative ions in matrix-assisted laser desorption/ionisation using liquid and solid matrices.

- [Yef89] G. E. Yefchak, C. G. Enke, J. F. Holland, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1989, 87, 313-330. Models for Mass-Independent Space and Energy Focusing in Time-of-flight Mass Spectrometry.
- [Zak81] D. Zakett, A. E. Schoen, R. G. Cooks, P. H. Hemberger, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 1295-1297. Laser-Desorption Mass Spectrometry/Mass Spectrometry and the Mechanism of Desorption Ionization.
- [Zar87] R. N. Zare, R. D. Levine, *Chem. Phys. Lett.* 1987, 136, 593-599. Mechanism for Bond-selective Processes in Laser Desorption.
- [Zen98] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrom. Rev.* 1998, 17, 337-366. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry.
- [Zha96] H. Zhang, R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.* 1996, 31, 690-692. Direct Analysis of Aqueous Samples by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Using Membrane Targets Precoated with Matrix.
- [Zha97] W. Zhang, B. T. Chait, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997, 160, 259-267. Radial velocity distributions of molecular ions produced by matrix-assisted laser desorption/ionization.
- [Zha98] W. Zhang, S. Niu, B. T. Chait, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998, 9, 879-884. Exploring Infrared Wavelength Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Proteins with Delayed-Extraction Time-of-Flight Mass Spectrometry.
- [Zhi00] L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, *J. of Appl. Phys.* 2000, 88, 1281-1298. Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes.
- [Zhi97] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, B. J. Garrison, *Chem. Phys. Lett.* 1997, 276, 269-273. On the threshold behavior in laser ablation of organic solids.
- [Zhi97b] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 2028-2037. Molecular Dynamics Model for Laser Ablation and Desorption of Organic Solids.
- [Zhi98] L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, 12, 1273-1277. Velocity distributions of Analyte Molecules in Matrix-assisted Laser Desorption from Computer Simulations.
- [Zho92] J. Zhou, W. Ens, K. G. Standing, A. Verentchikov, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 1992, 6, 671-678. Kinetic Energy Measurements of Molecular Ions Ejected into an Electric Field By Matrix-assisted Laser Desorption.
- [Zho95] J. Zhou, T. D. Lee, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1995, 6, 1183-1189. Charge State Distribution Shifting of Protein ions Observed in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry.
- [Zhu96] Y. F. Zhu, C. N. Chung, N. I. Taranenko, S. L. Allman, S. A. Martin, L. Haff, C. H. Chen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 383-388. The Study of 2,3,4-Trihydroxyacetophenone and 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as Matrices for DNA Detection in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry.
- [Zhu96b] Y. F. Zhu, N. I. Taranenko, S. L. Allman, S. A. Martin, L. Haff, C. H. Chen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996, 10, 1591-1596. The Effect of Ammonium Salt and Matrix in the Detection of DNA by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-

Flight Mass Spectrometry.

- [Zöl97] P. Zöllner, G. Stübiger, E. Schmid, E. Pittenauer, Günther Allmeier *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Proc.* 1997, 169/170, 99-109. MALDI mass spectrometry of biomolecules and synthetic polymers using alkali hexacyanoferrate (II) complexes and glycerol as matrix.
- [Zub00] R. A. Zubarev, D. M. Horn, E. K. Fridriksson, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* 2000, 72, 563-573. Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations.
- [Zub98] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 3265-3266. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A nonergodic Process.
- [Zub98b] R. A. Zubarev, E. K. Fridriksson, D. M. Horn, N. L. Kelleher, N. A. Kruger, M. A. Lewis, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, USA, 1998, p. 67. Electron Capture Dissoziation: Unique Rapid Cleavage of Multiply-Charged Cations.

Veröffentlichungen

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

1. M. Glückmann, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* 1999, 34, 467-477. The Initial Ion Velocity and its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation Method in Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization.
2. M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer, *J. Mass Spectrom.* 2000, 35, 1-12. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors.
3. M. Glückmann, A. Pfenninger, R. Krüger, M. Thierolf, M. Karas, V. Horneffer, F. Hillenkamp, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom.* (zur Publikation angenommen, März 2001). Successful MALDI Analysis: Surface Interaction or Incorporation of Analytes?
4. R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, in Vorbereitung, Incorporation of precharged analytes as initial step for successful UV-MALDI analysis of protonated molecules.

Posterbeiträge:

1. M. Glückmann, M. Karas in Abstracts der 31. Diskussionstagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie; C. Wernitz, A. Meffert, R. Heinicke, C. Grun, C. Weickhardt, J. Grottemeyer, Eds., Cottbus, 1998, p 95. Untersuchungen zu Startgeschwindigkeiten bei MALDI/MS.
2. E. Gleitsmann, M. Glückmann, M. Karas, *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL, USA, 1998, p 928. Peak Shapes for DE-MALDI-TOF Ion Signals - Simulation, Measurement and Usefulness for Characterizing the Initial Velocity Distribution.
3. M. Glückmann, M. Karas, *Desorption '98, Mass Spectrometry of Large Organic Ions by Electrospray, Particle and Photon Induced Desorption*, Rio de Janeiro, Brazil, 1998, *Book of Abstracts*, p. 36. The Initial Ion Velocity in MALDI - Its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation.
4. M. Glückmann, M. Karas, *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Dallas, Texas, USA, 1999, pp 2232-2233. The Initial Velocity as a Marker for Different Desorption Characteristics in MALDI.
5. M. Glueckmann, M. Karas, *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, CA, USA, 2000. Imaging of the Ion Velocity in the Plume produced by UV-MALDI.
6. A. Pfenninger, M. Glueckmann, M. Karas, *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, CA, USA, 2000. Successful MALDI Analysis: Interaction or Incorporation of Analytes and Matrix?
7. M. Glueckmann, M. Karas, *Desorption 2000*, Saint-Malo, France, 3-7 September 2000, P-10. The initial velocity of MALDI ions: A comparison of different experimental approaches.
8. M. Glückmann, A. Pfenninger, M. Karas, V. Horneffer, F. Hillenkamp, K. Strupat in Abstracts der 34. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie; U. Boesl-von Grafenstein, R. Garnica, J. Müller, C. Ueberfluff, R. Weishäupl, Eds., München, 2000, p 95.

Matrix/Analyt-Wechselwirkung in MALDI – Teil 1: Einbau von Analytmolekülen in Matrixkristalle und Auswirkung auf den Desorptions/Ionisationsprozeß.

9. V. Horneffer, F. Hillenkamp, K. Strupat, M. Glückmann, A. Pfenninger, M. Karas in Abstracts der 34. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie; U. Boesl-von Grafenstein, R. Garnica, J. Müller, C. Ueberfluß, R. Weishäupl, Eds., München, 2000, p 96. Matrix/Analyt-Wechselwirkung in MALDI – Teil 2: Anhaftung der Analytmoleküle an Matrixkristall-Oberflächen oder Einbau der Analytmoleküle in Matrixkristalle?
10. M. Glückmann, I. Fournier, R. Krüger, A. Pfenninger, M. Karas, V. Horneffer, K. Strupat, F. Hillenkamp, Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, USA, 2001. The initial velocity of MALDI ions as a marker for different desorption-ionization mechanisms in MALDI.
11. R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, USA, 2001. PH-indicators as molecular probes to evaluate the relevance of different processes in UV-MALDI-ionization.
12. M. Karas, I. Fournier, M. Glückmann, R. Krüger, A. Pfenninger, Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, USA, 2001. Is the "Lucky-Survivor" Model Still Alive?
13. I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, Proceedings of the 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, USA, 2001. Investigation of the MALDI process studying large crystals of MALDI matrices.

Vorträge:

1. M. Karas, M. Glückmann, Proceedings of the 10th Sanibel Conference: Time-of-Flight Mass Spectrometry 1997. On the physics of the MALDI-Process - Can the Determination of Initial Velocities Initiate Further Understanding?

siehe O. A. Sparkmann, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1998, 9, 849-851. Review of the 10th Sanibel Conference on Mass Spectrometry: Time-of-Flight Mass Spectrometry.
2. M. Glückmann, M. Karas, Verhandl. DPG (VI) 1998, 33, 166. Untersuchungen zu Startgeschwindigkeiten in der MALDI.
3. M. Glückmann, M. Karas, Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, USA, 1998, p 790. On the Physics of the MALDI Process - The Initial Ion Velocity and its Dependence on Matrix and Preparation.
4. M. Glückmann, M. Karas, Desorption '98, Mass Spectrometry of Large Organic Ions by Electrospray, Particle and Photon Induced Desorption, Rio de Janeiro, Brazil, 1998, Book of Abstracts, p. 36. The Initial Ion Velocity in MALDI - Its Dependence on Matrix, Analyte and Preparation.
5. M. Glückmann, M. Karas in Zusammenfassungen der 33. Diskussionstagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie; M. Linscheid, T. Hagemeyer, R. Molzahn, G. Zhang, Eds., Berlin, 2000, p 70. Aktueller Beitrag zu Modellvorstellungen bei MALDI.
6. M. Karas, M. Glueckmann, Desorption 2000, Saint-Malo, France, 3-7 September 2000, O-22. First Steps to a Unified MALDesorption and Ionization Model.

Eidesstattliche Versicherung
Danksagung
Lebenslauf

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über Untersuchungen zur Ablation und Ionenbildung bei matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation (MALDI) selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schriften bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Oberursel, den 01.08.2001

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Karas für die Aufnahme in seinem Arbeitskreis. Weiterhin möchte ich ihm für die hervorragende Betreuung, die vielen Diskussionen und Anregungen danken.

Allen, die mir mit Anregungen oder mit kritischer Durchsicht meiner Arbeit geholfen haben, möchte ich hiermit meinen herzlichen Dank aussprechen. Mein Dank gilt dabei insbesondere meiner Frau Martina, meinen Eltern sowie meiner Schwester Susanne. Weiterhin möchte ich hiermit Herrn Dr. Michael Thierolf und ganz besonders Frau Dr. Anja Pfenninger danken, die mir beim Korrekturlesen sehr geholfen haben.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. Ute Bahr für Ihre Hilfe bei Arbeiten an den Massenspektrometern und ihre Anmerkungen und Diskussionen zu meiner Arbeit danken.

Herrn Dr. Jürgen Schäfer, Herrn Dr. Eckhard Gleitsmann, Herrn Dipl. Chem. Ralf Krüger, Herrn Dr. Thomas Russ sowie Frau Dr. Andrea Schmidt möchte ich für ihre Ratschläge und Diskussionen zu meiner Arbeit herzlichen Dank aussprechen. Weiterhin danke ich Frau Dr. Isabelle Fournier für interessante Diskussionen zum Ionisations- und Desorptionsmechanismus sowie Vladimir Montero Collado für Diskussionen zur Instrumentierung und zum Desorptionsprozeß bei MALDI. Weiterhin danke ich Frau Verena Horneffer, Frau Dr. Kerstin Strupat und Herrn Prof. Dr. Franz Hillenkamp für die interessanten Diskussionen und die erfolgreiche Zusammenarbeit bei verschiedenen Einbau-Experimenten.

Frau Erika Sportiello und insbesondere Herrn Walter Eckhard danke ich für die Hilfe bei allen Verwaltungsangelegenheiten, sowie Herrn Jürgen Döll für seine Hilfe im Praktikum "Chemie für Mediziner".

Herrn Ernst Winter danke ich hiermit für alle Hilfe bei Reperaturen an Massenspektrometern und für die Anfertigung meiner "schrägen" Probenhalter.

Weiterhin danke ich Daniel Röhnert and Prof. Dr. Gerhard Brey (Institut für Mineralogie, Universität Frankfurt) für die Benutzung einer hydraulischen Presse.

Weiterhin gilt mein Dank der Fa. Applied Biosystems, Langen, für die Möglichkeit hochauflösende MALDI-Spektren des Kobalt-Komplexes aufzunehmen.

Meinen Eltern danke ich für die Selbstverständlichkeit, mit der sie mich zu allen Zeiten unterstützt und mir geholfen haben. Insbesondere Danke ich meinem Vater, der mich beim Anfertigen von technischen Zeichnungen unterstützt hat.

Zum Schluß noch einmal Dank an meine Frau Martina für alle Ihre Hilfe und Unterstützung während meines Studiums und bei dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Matthias Glückmann
Geburtsdatum: 02.12.1970
Geburtsort: Frankfurt am Main
Anschrift: Kurmainzer Straße 109, 61440 Oberursel/Ts.

Familienstand:

verheiratet mit
Martina Glückmann, geb. Wessels
Dipl. Wirtschaftsinformatikerin (TU)

Eltern:

Gisela Glückmann, geb. Hoinkis
Apothekerin
Helmut Glückmann
Dipl. Ing. Maschinenbau (TH)

Schulbildung:

1978 - 1980 Grundschole in Oberursel/Weißkirchen
1980 - 1990 Gymnasium in Oberursel. Abschluß: Abitur

Studium:

1990 Beginn des Studiums der Chemie an der Johann Wolfgang
Goethe-Universität Frankfurt am Main
02.11.1992 Vordiplom

Juni-Dezember 1997

Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der
Universität Frankfurt (Arbeitskreis Prof. Dr. M. Karas);
Thema der Arbeit: "Untersuchungen zur MALDI-
Massenspektrometrie: Ermittlung von Ionenanfangs-
geschwindigkeiten und ihr Einsatz in der Prozeßdiagnostik"

19.12.1997

Diplom

Seit Januar 1998

Promotionsstudium (bei Prof. Dr. M. Karas, Universität Frankfurt
am Main)

Berufliche Tätigkeit:

26.09.-21.10.1994

Wissenschaftliche Hilfskraft, Organisch-
chemisches Praktikum für Biologen und
Lehramtskandidaten

01.05.1997-31.07.1998

Wissenschaftliche Hilfskraft, Praktikum „Chemie für
Mediziner“

01.08.1998-30.04.2001

Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Betreuung und
Organisation Praktikum „Chemie für Mediziner“

Fremdsprachen:

Englisch
Latein: Großes Latinum

EDV:

Administration von Novell Netware, Windows Betriebssystemen
und Anwendungen in verteilter Umgebung, Kenntnisse in
graphischer Präsentation, Tabellenkalkulation, Internet
(Erstellen von HTML-Seiten) sowie Programmierung

Persönliche

Interessen/ Hobbys:

Segeln, Reisen, Lesen, Möbel-Restauration

