

# **Untersuchungen zum Einbau von Analytinen in MALDI Matrizes sowie zur Ionisation und Adduktbildung in der MALDI-Massenspektrometrie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von

Ralf Krüger  
aus Bonn

Frankfurt (2003)  
(D F 1)

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

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. M. Karas,  
Prof. Dr. W. D. Lehmann

Datum der Disputation: 24. 10. 2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>A</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>B</b>	<b>Grundlagen der MALDI-Massenspektrometrie</b>	<b>3</b>
	<b>B.1. Entstehung und Entwicklung von MALDI</b>	<b>3</b>
	<b>B.2. Probenpräparation</b>	<b>6</b>
	B.2.1. Matrizes und Matrixzusätze	6
	B.2.2. Präparation und Probenvorbereitung	10
	<b>B.3. Instrumenteller Aufbau der axialen MALDI-TOF-MS</b>	<b>12</b>
	B.3.1. Grundprinzip	12
	B.3.2. Verbesserung der Auflösung: Ionenquelle, verzögerte Extraktion und Reflektor	13
	B.3.3. Aufbau des verwendeten MALDI-Massenspektrometers	17
	<b>B.4. Fragmentierung und Fragmentationenanalyse</b>	<b>19</b>
	B.4.1. Ursachen von Fragmentierungen	19
	B.4.2. Metastabile Fragmente: Post-Source-Decay (PSD)	21
	B.4.3. Prompte Fragmente: In-Source-Decay (ISD)	22
	<b>B.5. Neuere Entwicklungen: Andere Massenanalytoren und API-MALDI</b>	<b>24</b>
<b>C</b>	<b>Modellvorstellungen zum Mechanismus der MALDI-MS</b>	<b>26</b>
	<b>C.1. Analyteinbau</b>	<b>27</b>
	C.1.1. Lokalisierung und Verteilung der Analyten im Matrixkristall	27
	C.1.2. Einflüsse bei der Probenpräparation auf die Kristallisation	28
	C.1.3. Relevanz des Analyteinbaus und der Kristallisation für den MALDI-Prozeß	30
	<b>C.2. Desorption / Ablation</b>	<b>33</b>
	C.2.1. Schwellbestrahlung und Einfluß von Laser-Parametern	33
	C.2.2. Untersuchungen von Matrixkristall-Oberflächen nach der Laser-Bestrahlung	35
	C.2.3. Dynamik und Energetik der Desorption / Ablation	37
	C.2.3.1. Initiale axiale Geschwindigkeit	38
	C.2.3.2. Räumliche und zeitliche Verteilungen der Moleküle und Energiedefizit	39
	C.2.4. Desorptionsmodelle und Simulationen	40

<b>C.3. Ionisation und Ionen-Molekül-Reaktionen.....</b>	<b>45</b>
C.3.1. Primäre Ionisation.....	46
C.3.1.1. Photoionisation sowie Elektronenaufnahme der Matrix.....	46
C.3.1.2. Excited-State-Proton-Transfer und Disproportionierung.....	48
C.3.1.3. Desorption und Freisetzung von präformierten Ionen.....	50
C.3.2. Sekundärreaktionen.....	51
C.3.2.1. Kationisierung.....	52
C.3.2.2. Protonentransfer.....	53
C.3.2.3. Elektronentransfer und –einfang.....	55
C.3.2.4. Transfer von Wasserstoff-Radikalen.....	58
C.3.3. Adduktbildung.....	60
C.3.4. Ladungszustand.....	64
<b>C.4. Das Cluster-Modell.....</b>	<b>66</b>
<b>D Ergebnisse: Analyteinbau, Ionisation und Adduktbildung bei der MALDI-MS.....</b>	<b>73</b>
<b>D.1. pH-Indikatoren als molekulare Sonden: Ladung, Solvation und Ionenbildung.....</b>	<b>74</b>
D.1.1. Ladungszustand der pH-Indikatoren im Matrixkristall.....	77
D.1.1.1. Farbvergleich in MALDI-Präparationen.....	77
D.1.1.2. Mehrfarbige MALDI-Präparationen.....	83
D.1.1.3. Farbvergleich mit größeren Matrixkristallen.....	85
D.1.2. Einbau von Lösungsmittel in Matrix-Analyt-Kristalle.....	89
D.1.2.1. Alterungseffekte.....	89
D.1.2.2. <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie von aufgelösten Matrixkristallen.....	91
D.1.3. Korrelation des Lösungs-pH mit MALDI-Spektren der Farbstoffe.....	94
D.1.3.1. Säure-Base-Eigenschaften der verwendeten Matrices und Indikatoren.....	94
D.1.3.2. Titrationsexperiment: Korrelation von intrinsischem pH-Wert und Ionenbildung.....	98
D.1.3.3. pH-abhängige Ionenbildung bei einer Neutralmatrix.....	107
D.1.4. Vergleich von LDI und MALDI: Transfer von Protonen und H-Atomen.....	113
D.1.5. Initiale Ionengeschwindigkeiten von Farbstoffen und Vergleich mit Peptiden.....	116
D.1.6. Diskussion: Einbau von Analytionen in Matrixkristalle.....	120
<b>D.2. Ionenbildung von basischen Analyten bei MALDI.....</b>	<b>124</b>
D.2.1. Einfluß der Basizität des Analyten.....	124
D.2.2. Einfluß der Anzahl basischer Gruppen im Analyten.....	129
D.2.3. In-Source Decay (ISD) und Basizität: Indizien für Elektronentransfer ?.....	133
D.2.4. Vergleich von MALDI-ISD und ESI-ECD.....	135
D.2.5. Diskussion: Einfluß basischer Gruppen im Analyten auf Ionisation, Ladungszustand und ISD-Fragmentierungen.....	139

---

<b>D.3. Anionen-Addukte bei MALDI.....</b>	<b>143</b>
D.3.1. Einfluß der Gasphasen-Basizitäten bei der Neutralisation von Ionenpaaren.....	143
D.3.2. Einfluß von Matrix und Analyten.....	148
D.3.3. Einfluß von Ionenpolarität und Nettoladung.....	152
D.3.4. Konkurrenz mit Matrix-Anionen und Effizienz der Ladungstrennung.....	154
D.3.5. Fragmentierung von Anionenaddukten.....	157
D.3.6. Diskussion: Addukte und Ionenpaare bei MALDI.....	161
<b>E Diskussion: Konsequenzen für den MALDI-Mechanismus.....</b>	<b>165</b>
<b>E.1. Der Analyt im Matrixkristall: Konservierung des Lösungszustandes.....</b>	<b>165</b>
<b>E.2. Ionisation bei MALDI.....</b>	<b>167</b>
<b>E.3. Neutralisation von ionischen Addukten durch Protonentransfer.....</b>	<b>170</b>
<b>E.4. Unterdrückungseffekte und Ladungszustand.....</b>	<b>172</b>
<b>E.5. Praktische Konsequenzen für die MALDI-Analyse von Biopolymeren.....</b>	<b>175</b>
<b>E.6. Die Rolle der Matrix.....</b>	<b>177</b>
<b>E.7. Offene Fragen und Ausblick.....</b>	<b>179</b>
<b>F Zusammenfassung.....</b>	<b>182</b>
<b>G Anhang.....</b>	<b>184</b>
<b>G.1. Farbumschlag bei pH-Indikatoren.....</b>	<b>184</b>
<b>G.2. Titration und pH-Wert-Bestimmung.....</b>	<b>188</b>
<b>H Literatur.....</b>	<b>189</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

3-AQ	3-Aminochinolin (3-aminoquinoline)
2,6-DHAP	2,6-Dihydroxyacetophenon
2,5-DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
311-PTH	4-(3-Pyridinylmethylaminocarboxypropyl)-Phenylhydantoin
$\alpha$ CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure
$\alpha$ CMCA	$\alpha$ -Cyano-4-methoxymizimtsäureamid
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
AMNP	2-Amino-4-methyl-5-nitropyridin
ANP	2-(2-Aminoethylamino)-5-nitropyridin
AP	atmosphärischer Druck
AS	Aminosäure
ATT	6-Aza-2-thiothymin
B	Bradykinin
BE	Benzopurpurin 4B
BP	Bromphenolblau
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
CMBT	5-Chloro-2-mercaptobenzothiazol
CFM	<i>confocal fluorescence microscopy</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CO	Congorot
CV	Kristallviolett ( <i>crystal violet</i> )
DHBs	"super"-DHB (Zusatz von 5-Methoxysalicylsäure)
DE	<i>delayed extraction</i>
$D_K$	Dielektrizitätskonstante
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
ECD	<i>electron capture dissociation</i>
ECNI	<i>electron capture negative ionization</i>
ESI	Elektrospray-Ionisierung ( <i>electrospray ionization</i> )
FAB	fast atom bombardement
FD	Felddesorption ( <i>field desorption</i> )
FER	Ferulasäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT-ICR	Fourier-Transform Ionencyclotron-Resonanz
FWHM	<i>full-width half-maximum</i> (Auflösung, Breite auf halber Peakhöhe)
G	[Glu <sup>1</sup> ]-Fibrinopeptid
GB	Gasphasenbasizität
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HTFSI	Bis-(Trifluormethyl)-Sulfonimid
IA	N-(4-Dimethylaminoazo-benzen-4')-iodacetamid
IE	Ionisationsenergie
IR	Infrarot
IRMPD	<i>infrared multiphoton dissociation</i>
ISD	<i>in-source decay</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LDI	Laserdesorption/Ionisierung
LIF	laser-induzierte Fluoreszenz
M	Analytmolekül
ma	Matrix

---

MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry</i>
MO	Methylorange
MR	Methylrot
MS	Massenspektrometrie ( <i>mass spectrometry</i> )
N	Neurotensin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
o-TOF	orthogonales time-of-flight (-Massenspektrometer)
PA	Protonenaffinität
PDMS	<i>plasma desorption mass spectrometry</i>
PSD	<i>post-source decay</i>
PTH	Phenylhydantoin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
SALDI	<i>surface-assisted laser desorption/ionization</i>
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SIMS	<i>secondary ion mass spectrometry</i>
SIN	Sinapinsäure
SPE	<i>solid phase extraction</i>
TB	Thymolblau
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>trifluoroacetic acid</i> )
TFSI	Bis-(Trifluormethyl)-Sulfonimid-Anion
TOF	Flugzeit ( <i>time-of-flight</i> )
UV	Ultraviolett
$v_0$	initiale axiale Ionengeschwindigkeit
QIT	Quadrupol-Ionenfalle ( <i>quadrupol ion trap</i> )





## A Einleitung und Zielsetzung

Der Einsatz der Massenspektrometrie in der biochemischen Forschung hat in den letzten beiden Jahrzehnten erheblich an Bedeutung gewonnen. War die Massenspektrometrie früher nur von wenigen Spezialisten hauptsächlich zur Strukturaufklärung kleiner, unzersetzt verdampfbarer Verbindungen eingesetzt worden, so ist sie heute immer mehr zu einem weit verbreiteten Werkzeug geworden, das verstärkt zur Analytik von Biopolymeren eingesetzt wird. Erleichtert wurde diese Entwicklung durch instrumentelle und datentechnische Fortschritte. Besonders deutlich wird der Erfolg der neuen massenspektrometrischen Methoden durch die Tatsache, daß sich die Zahl der internationalen Zeitschriften, die ausschließlich massenspektrometrische Arbeiten veröffentlichen, alleine zwischen 1982 und 1995 aufgrund von vier Neugründungen auf sechs verdreifacht hat<sup>1</sup>.

Diese Entwicklung war schon Anfang der 1980er Jahre erkennbar und ist zu einem erheblichen Teil auf die Entwicklung von schonenden Desorptionsmethoden für nicht-flüchtige polare Verbindungen zurückzuführen. In einem Übersichtsartikel der Zeitschrift *Science* von 1983 (*Mass Spectrometry: Analytical Capabilities and Potentials* [Coo83]) schrieb Graham Cooks zu den damals neuen Entwicklungen:

*" Three new capabilities epitomize the present state of mass spectrometry and point up its potential for far-reaching contributions in biology and medicine. The mass range of mass spectrometers has been extended by approximately an order of magnitude in the past decade. (...) A second capability is desorption ionization, a family of procedures (...) which allows ionic, non-volatile compounds to be examined by mass spectrometry. (...) The third notable capability is the successful integration of separation and analysis techniques represented by tandem mass spectrometry (MS-MS) and the much improved liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) interfaces. (...)"*

Nur wenige Jahre später wurde die MALDI-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*) entwickelt [Kar85, Kar87], die zusammen mit der Elektrospray-Ionisation (ESI) [Yam84, Whi85, Fen89] der massenspektrometrischen Bioanalytik endgültig zum Durchbruch verhalf und den zugänglichen Massenbereich aufgrund der vergleichsweise geringen Fragmentierung und Adduktbildung stark erweiterte. Dabei gab es anfänglich durchaus Zweifel, ob sich MALDI durchsetzen würde (nachzulesen in einem persönlichen Artikel von Hillenkamp und Karas über die ersten Jahre der MALDI-Entwicklung [Hil00]). Wichtig für die Akzeptanz und Verbreitung war auch, daß andere Forscher (vor allem Beavis und Chait [Bea89a-c]) die neue Technik aufgriffen. Erst zu dieser Zeit begann die kommerzielle Entwicklung von MALDI-TOF (time-of-flight) Massenspektrometern, was zu der im Vergleich zu ESI verzögerten Verbreitung von MALDI beigetragen haben könnte.

Im starken Gegensatz zur praktischen Bedeutung von MALDI ist der Mechanismus der Ionenbildung nur ansatzweise verstanden. Obwohl eine Vielzahl von Untersuchungen zum Ionisations- und Desorptionsmechanismus der MALDI veröffentlicht wurden und dadurch immer mehr Details bekannt wurden, konnten diese bisher nicht eindeutig zusammengesetzt werden, so daß bis heute kein einheitlicher und schlüssiger Mechanismus der MALDI vorgestellt wurde. Dieses

---

<sup>1</sup> MS-Journals in der Reihenfolge ihrer Entstehung: *Journal of Mass Spectrometry* (gegr. 1966 als *Organic Mass Spectrometry*), *International Journal of Mass Spectrometry* (gegr. 1968 als *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*); *Mass Spectrometry Reviews* (gegr. 1982); *Rapid Communications in Mass Spectrometry* (gegr. 1987); *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* (gegr. 1990); *European Journal of Mass Spectrometry* (gegr. 1995).

Mißverhältnis zwischen schwach entwickelter Theorie und breiter Anwendung führte in der Zeit, als die vorliegende Arbeit begonnen wurde, in der Arbeitsgruppe Karas immer wieder zu lebhaften Diskussionen. Angeregt durch aktuelle Resultate aus verschiedenen Arbeitsgruppen, aber auch unter Berücksichtigung bekannter Ergebnisse und Charakteristika von MALDI, stellten Karas, Glückmann und Schäfer schließlich ein in Teilen hypothetisches Modell vor, dessen Veröffentlichung im Frühjahr 2000 [Kar00] auch dazu beitragen sollte, neue Impulse und Anstöße für Diskussionen zu liefern. Die wesentliche Aussage dieser Hypothese war, daß es durch die Einkopplung der Laserenergie zu einer explosionsartigen Ablation von Clustern kommt, die durch Trennung von Anionen und Kationen statistisch geladen sind. In der Folge finden dann Sekundärreaktionen unter Ladungstransfer (Protonen, Elektronen) statt, wodurch im Wesentlichen einfach geladene Ionen übrigbleiben ("*Singly charged molecular ions are the lucky survivors*").

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Überprüfung dieser Modellvorstellungen durchgeführt. Das Ziel war es, Hypothesen zu verifizieren oder zu widerlegen. Das Clustermodell basiert zum Beispiel auf der Annahme, daß Analyte in ihrer ionischen Form und (zumindest teilweise) getrennt von ihren Gegenionen im Matrixkristall vorliegen. Ein Analyteinbau wurde bereits früh einwandfrei nachgewiesen [Str91], aber es war unbekannt, in welcher die Form die Analyten im Matrixkristall eingebaut werden (Ladung, Lösungsmittel, Gegenionen u.a.). Anhand dieser Informationen sind Aussagen über verschiedene mögliche Reaktionen beim MALDI-Prozeß möglich, deren Bedeutung und Anteil umstritten und bisher nur zum Teil bekannt sind. Des weiteren ist die Ursache für die bevorzugte Bildung von einfachgeladenen Ionen bei MALDI und die Relevanz möglicher Neutralisationsreaktionen wie Elektronen- oder Protonentransfer offen. Auch die Gründe für eine unterschiedlich ausgeprägte Adduktbildung sind bisher nur teilweise bekannt.

Diesen Fragen wird in der vorliegenden Arbeit nachgegangen, und die Ergebnisse werden mit früheren Erkenntnissen zum MALDI-Mechanismus korreliert. Im Literaturteil werden nach einer kurzen Einführung (Entwicklung von MALDI, Probenpräparation, instrumentelle Parameter) die wesentlichen Ergebnisse der letzten Jahre zum Mechanismus der MALDI-MS vorgestellt und in Zusammenhang gebracht. Dabei werden die Teilgebiete Analyteinbau, Desorption/Ablation und Ionisation/Molekülreaktionen zunächst getrennt behandelt, da diese Gebiete auch in der Literatur und bei mechanistischen Überlegungen meist separat betrachtet wurden. Eine große Neuerung des Cluster-Modells, das im Anschluß vorgestellt wird, ist daher auch die Überwindung dieser "historischen" Trennung.

Im Ergebnisteil werden neue Erkenntnisse zum Analyteinbau, zur Adduktbildung und zum Protonen- und Elektronentransfer vorgestellt. Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung des Ausgangszustandes des Analyten im Matrixkristalls (Ladungszustand, Ionenpaarbildung, Solvation) sowie die Untersuchung nachfolgender Reaktionen. Ein Vergleich verschiedener, definierter Ausgangsbedingungen mit den letztendlich detektierten Ionen erlaubt die Abschätzung möglicher Ionisationswege und liefert damit plausible Erklärungsmöglichkeiten für die analyt-, matrix- und präparationsabhängige Bildung bestimmter Ionen bei MALDI. Durch die Kenntnis der zugrundeliegenden Prozesse kann der Einfluß verschiedener Parameter auf die Art der gebildeten Ionen, deren Ladungszustand oder auf die Bildung von Addukten abgeschätzt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse leisten einen Beitrag zur Aufklärung dieser Mechanismen, um so eine gezielte Optimierung der MALDI-MS zu erreichen.

## B Grundlagen der MALDI-Massenspektrometrie

### B.1. Entstehung und Entwicklung von MALDI

Das Prinzip der Massenspektrometrie besteht darin, Ionen zu erzeugen und deren Verhältnis von Masse und Ladung ( $m/z$ ) durch geeignete Methoden zu detektieren. Dabei ist die Bildung geladener Analyte sowie deren Überführung in die Gasphase eine Grundvoraussetzung, da zur massenabhängigen Detektion in den Massenanalysatoren die Ablenkung oder Beschleunigung gasförmiger Ionen mit Hilfe von elektromagnetischen Feldern herangezogen wird. In der Regel erfolgt dabei vor der eigentlichen Detektion eine zeitliche oder räumliche Trennung von Ionen nach deren  $m/z$ -Verhältnis. Obwohl dieses Grundprinzip schon sehr lange bekannt ist [Tho11] und auch für Atome und kleine Moleküle in der Folge sofort zur Anwendung kam [Dem18, Ast20], gelang es lange Zeit nicht, empfindliche und höhermolekulare Substanzen, wie z.B. Biopolymere, unzersetzt aus der kondensierten Phase in die Gasphase zu überführen und zu ionisieren.

Dies änderte sich erst mit dem Aufkommen der ersten nicht-thermischen Desorptions- und Ionisationsmethoden, welche die sonst durch thermische Belastung verursachte starke Fragmentierung empfindlicher Analyte verringern konnte. Hier sind zum einen die Desorption/Ionisation mit Hilfe von starken elektrischen Feldern zu nennen (Felddesorption (FD) [Bec77]), aber besonders die Desorption/Ionisation durch den Beschuß geeigneter Oberflächen mit Partikeln brachte wesentliche Fortschritte. Zunächst wurden dazu hochenergetische Teilchen (einige MeV) verwendet, die aus dem spontanen Zerfall von  $^{252}\text{Californium}$  stammen (*Plasma Desorption Mass Spectrometry*, PDMS) [Mcf76]. Wenig später ging man dazu über, Teilchen geringerer Energie (einige keV), die bis dato nur zur Analyse von Oberflächen eingesetzt wurden, auch für die Analyse von Biomolekülen zu verwenden [Ben78, Ben83]. Bei dieser Technik werden Ionen beschleunigt und auf die Probenoberfläche gelenkt, wodurch dann Sekundärionen gebildet werden (*Secondary Ion Mass Spectrometry*, SIMS). SIMS wird nach wie vor zur Oberflächenanalytik eingesetzt, aber aufgrund des hohen Probenabtrags und der starken Fragmentierung von empfindlichen Verbindungen findet sie kaum noch Verwendung in der Bioanalytik. Die Zerstörung der Probenoberfläche kann allerdings durch Verringerung der Ionenströme etwas zurückgedrängt werden, und die Fragmentierung läßt sich durch Zusatz von z.B. Ammoniumsalzen etwas vermindern [Liu81]. Dies ist zugleich ein frühes Beispiel für die Verwendung einer (Salz)-Matrix.

Als sehr vorteilhaft erwies sich die Einführung von flüssigen, schwerflüchtigen Matrices wie Glycerol oder Nitrobenzylalkohol bei gleichzeitiger Verwendung von neutralen Primärteilchen, weshalb die Methode unter dem Namen *Fast Atom Bombardement* (FAB) bekannt wurde [Bar81a, Bar81b]. Allerdings konnten auch mit Ionen als Primärteilchen ähnliche Ergebnisse erzielt werden (*liquid SIMS*) [Pac87]. FAB war die erste schonende Methode zur Desorption/Ionisation von Biomolekülen [Rin82, Fen87, Sun88], mit der zum einen ein geringer Fragmentierungsgrad erreicht wurde und zum anderen selbst von empfindlichen Verbindungen intakte Molekülionen detektiert wurden, was zu einem großen Teil auf die sich immer wieder neu bildende Probenoberfläche der flüssigen Matrix zurückgeführt wurde.

Eine weitere Möglichkeit zum lokalen Eintrag hoher Energien in einen Festkörper ist die Verwendung eines Lasers [Hil83]. Durch die Kohärenz der Strahlung, die kurze Pulsdauer und die Fokussierung ermöglicht der Laser einen begrenzten und gezielten Energieimpuls ohne die Probe über längere Zeit thermisch zu belasten. Trotzdem beobachtet man bei der Laserdesorption einen relativ hohen Fragmentierungsgrad, wobei dieser stark von der verwendeten Wellenlänge sowie von den Absorptionseigenschaften des Analyten abhängt. Obwohl sich dieser Effekt ähnlich wie bei FAB und SIMS durch die Verwendung von Salz-Matrices etwas zurückdrängen läßt [Wri85], führt erst die Mischung mit bestimmten organischen Verbindungen zu qualitativ anderen Spektren mit

wesentlich reduzierter Fragmentierung. Bei Arbeiten zur *laser desorption/ionization* (LDI) bei verschiedenen Wellenlängen beobachteten Karas, Bachmann und Hillenkamp, daß in einem Gemisch zweier Substanzen auch dann beide Verbindungen massenspektrometrisch detektiert werden können, wenn eine davon bei der verwendeten Wellenlänge keine Absorption aufweist [Kar85]. Zunächst wurden diese Versuche mit Aminosäuren durchgeführt (Tryptophan als absorbierende Spezies), aber schon bald danach konnten mit Nikotinsäure, 3-Nitrophenylether und 2-Nitrooctylether die ersten effektiven Matrizes präsentiert werden [Kar87]. Die nicht absorbierenden Analyten werden dabei im positiven Ionenmodus generell als protonierte  $[M+H]^+$  oder kationenangelagerte  $[M+Na]^+$  Moleküle detektiert, während die eingesetzte Matrix in der Regel sowohl als Radikal  $M^{\bullet+}$  als auch als  $[M+H]^+$  detektiert wird. Häufig kann der Analyt dabei noch in sehr starker Verdünnung nachgewiesen werden (Verhältnis Matrix:Analyt >10.000:1), und oft ist dabei das Analytsignal stark überrepräsentiert, gleichbedeutend mit einer sehr effizienten Ionisierung des Analyten. Bei hohen Analytkonzentrationen kann dies bis zur kompletten Unterdrückung des Matrixsignals führen. Diese matrix-unterstützte Laserdesorption (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI) war damit die erste Desorptionsmethode, mit der größere Bioanalyte auch in starker Verdünnung noch massenspektrometrisch unzersetzt nachgewiesen werden konnten. Zudem konnte der detektierbare Massenbereich in den Folgejahren stetig erweitert werden [Kar88, Kar89, Kar90], so daß heute die MALDI-MS neben der *Elektrospray-Ionisierung* (ESI-MS) aus der biochemischen Forschung nicht mehr wegzudenken ist.

Parallel zu diesen Arbeiten wurde eine ähnliche Methode entwickelt, mit der ebenfalls Analyten mit Massen bis zu 100 kDa detektiert werden konnten, die sich aber in der Folge nicht durchgesetzt hat [Tan88]. Hierbei wurden Suspensionen von Metallen mit den Analytlösungen vermischt, eingetrocknet und mit einem Laser bestrahlt. Eine Fortführung dieser Methode stellt die Verwendung von Graphit dar, die später von Sunner und Mitarbeitern unter dem Begriff SALDI (*Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization*) eingeführt wurde [Sun95]. In jüngster Zeit wurde eine Methode vorgestellt, bei der UV-absorbierende Siliciumoberflächen verwendet werden und keine Matrix notwendig ist [Wei99, She01]. Bei dieser DIOS-MS (*desorption/ionization on porous silicon*) wird durch chemisches Ätzen eine poröse Siliziumstruktur geschaffen, von der eine Desorption/ionisation mittels UV-Laser möglich ist. Besonders vielversprechend ist DIOS für die Analyse von niedermolekularen Verbindungen, da keine Interferenzen mit Matrixsignalen auftreten können.

Nach den ersten Arbeiten und Veröffentlichungen war schnell klar, daß die MALDI-MS ein hohes Potential für die biochemischen Forschung hat. Die darauffolgenden Arbeiten konzentrierten sich vor allem auf die Suche nach geeigneten Matrizes und Präparationsprotokollen. Trotz der Vielzahl der möglichen Verbindungen, die potentiell als Matrix geeignet sein könnten, wurden fast alle effektiven und auch heute noch verwendeten Matrizes in den ersten Jahren nach der Entdeckung des MALDI-Effekts gefunden, insbesondere die Zimtsäurederivate [Bea89b, Bea92] und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB) [Str91]. Dabei ging man größtenteils empirisch vor, da bis heute nicht klar ist, welche Eigenschaften die Matrixfunktion einer Verbindung ausmachen, abgesehen davon, daß die Matrix bei der eingesetzten Laserwellenlänge eine genügend hohe Absorption aufweisen muß. Daneben spielen einige praktische Erwägungen wie Vakuumstabilität, Löslichkeit in gängigen Lösungsmitteln oder geringe chemische Reaktivität eine Rolle. (Eine Beschreibung der wichtigsten Matrizes und Präparationsprotokolle wird in Kap. B.2 gegeben.)

Entscheidend für den Durchbruch der neuen Methode waren aber apparative und instrumentelle Verbesserungen. Aufgrund der gepulsten Ionenerzeugung durch den Laser und der hohen Analytmassen bietet sich die Detektion der erzeugten Ionen mit einem Flugzeit-Massenanalysator an. Obwohl das Prinzip der TOF-MS (*time-of-flight mass spectrometry*) sehr

lange bekannt war, wurde es früher nur selten verwendet. Ausgelöst durch die Entdeckung und Weiterentwicklung von MALDI und durch Fortschritte in der Elektronik und Computertechnik gab es erhebliche Verbesserungen der TOF-Technologie, die z. B. eine schnellere Datenakkumulation ermöglichten. Problematisch erwiesen sich aber die aus dem Desorptionsprozeß rührenden Unschärfe der Anfangsgeschwindigkeiten und damit die Varianz der kinetischen Anfangsenergien der Teilchen, die zu einer Energie- und Geschwindigkeitsverteilung der Ionen führt, die eine Peakverbreiterung zur Folge hat [Bea91, Zho92]. Dieser Effekt konnte im Wesentlichen durch zwei Verbesserungen minimiert werden: Zum einen wurden höhere Beschleunigungsspannungen (bis zu 30 kV) verwendet, so daß der aus dem Desorptionsprozeß stammende Energieanteil weniger zur Gesamtenergie der Ionen beiträgt [Bea89a]. Zum anderen konnte durch die Einführung der *Delayed Extraction* (DE) oder *Time-Lag-Focusing* (aufbauend auf Arbeiten von Wiley und McLaren [Wil55]) eine erheblich Verbesserung der Auflösung und gleichzeitig eine geringere Anregung und Fragmentierung der Analyte erreicht werden [Col94, Bro95, Ves95]. Darüber hinaus wird eine verbesserte Massengenauigkeit erreicht [Edm96]. Bei dieser Technik wird die Beschleunigungsspannung erst nach einer gewissen Wartezeit (typischerweise 200 bis 1500 ns) eingeschaltet. Dadurch wird eine Fokussierung von Ionen mit unterschiedlichen Desorptionsgeschwindigkeiten erreicht. Zusätzlich zur verzögerten Beschleunigung wird eine zweistufige Extraktion in der Ionenquelle verwendet, so daß durch Änderung der an den beiden Gittern anliegenden Spannungen und der Verzögerungszeit unterschiedliche Massenbereiche auf den Detektor fokussiert werden können (s. Kap. B.3.2). Die verbesserte Auflösung bei DE rührt aber auch daher, daß das ablatierte Material sich in der Wartezeit ausbreitet und die Ionen nicht mehr durch eine dichte Wolke aus Neutralteilchen hindurch beschleunigt werden, wodurch Stöße reduziert werden. Zusätzlich können kinetische Energiedifferenzen durch einen Reflektor kompensiert werden. Es sei hier angemerkt, daß Spengler und Cotter bereits 1990 einen TOF-Massenanalysator mit Reflektor und verzögerter Extraktion für MALDI mit Nachionisierung verwendet haben, allerdings in einer orthogonalen Anordnung (Extraktion 90 Grad zur Desorptionsrichtung) [Spe90].

Neben der Anwendung auf technische Polymere [Nie99, Han01] findet die MALDI-MS heute besonders in der biochemischen Forschung breite Verwendung. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Analyse von Biopolymeren wie Proteinen [Ngu95, Gro97], Oligonukleotiden [Nor96], aber auch anderen Naturstoffen wie z.B. Oligosacchariden [Har99]. Dabei ist sowohl die Massenbestimmung der intakten Moleküle als auch deren Identifizierung und strukturelle Charakterisierung anhand von spezifischen Fragmenten von Bedeutung (inklusive der Analyse von nicht-kovalenten Wechselwirkungen [Far98]). Besonders im Bereich der funktionellen Protein- und Genanalyse ("Proteomics") spielt die MALDI-MS eine zentrale Rolle, was sich auch an der enormen Zahl der Veröffentlichungen zu diesem Thema ablesen läßt (aktuelle Reviewartikel sind z.B. [Aeb01, Lah00, Gev00]). So wird z.B. die vergleichende Analyse aller exprimierten Proteine in zwei verschiedenen Zelllinien oder Zellstadien durchgeführt, indem die Proteine gelelektrophoretisch getrennt und enzymatisch verdaut werden. Anschließend erfolgt die massenspektrometrische Detektion der Spaltpeptide sowie deren Vergleich mit einer Datenbank. Dabei kommt es zunehmend auf die Analyse einer großen Anzahl Proben in möglichst kurzer Zeit an (*high throughput*).

## B.2. Probenpräparation

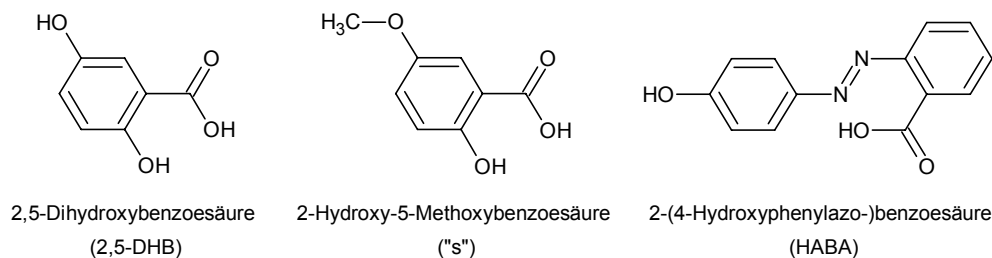
Im ersten Abschnitt werden die am häufigsten eingesetzten Matrizes und Matrixzusätze sowie alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Matrizes vorgestellt. Im zweiten Abschnitt wird auf verschiedene Möglichkeiten der Probenpräparation eingegangen, und es werden Möglichkeiten der Aufkonzentrierung und Reinigung vorgestellt.

### B.2.1. Matrizes und Matrixzusätze

Bei der Suche nach neuen Matrizes standen (und stehen heute noch) nur wenige greifbare Kriterien zur Auswahl. Neben der Löslichkeit in gängigen Lösungsmitteln und der Stabilität im Vakuum ist eine der Grundvoraussetzungen die Absorption des Laserlichts durch die Matrix, so daß die Suche nach neuen Matrizes von der verwendeten Laserwellenlänge abhängig ist und umgekehrt. Wesentlich war daher nicht nur die Entdeckung von neuen Matrizes, sondern auch die Entwicklungen und Fortschritte in der Lasertechnik. Bei den ersten Experimenten mit Nicotinsäure und Nitroverbindungen wurde ein frequenzvervielfachter Nd-YAG-Laser verwendet [Kar85, Kar87]. Zunächst wurde die vierte harmonischen Oberschwingung ( $\lambda = 266$  nm) verwendet, da die Nitro-Verbindungen bei höheren Wellenlängen nicht absorbieren. Erst durch Verwendung anderer Matrizes (z.B. der Zimtsäurederivate) konnten größere Wellenlängen verwendet werden, z.B. die dritte harmonischen Oberschwingung des Nd-YAG-Lasers ( $\lambda = 355$  nm) [Bea89c]. Später ging man zu Stickstofflasern ( $\lambda = 337$  nm) über [Kar90], die aufgrund der geringen Größe und einfachen Handhabbarkeit auch in fast allen heute kommerziell vertriebenen Geräten zu finden sind. Daneben wurden auch Versuche mit Excimer-Lasern ( $\lambda = 249$  oder  $308$  nm) [Dok91, Ens91], durchstimmbaren Titan-Saphir-Lasern [Che98] und IR-Lasern ( $\lambda = 2.94$  oder  $10.6$   $\mu\text{m}$ ) [Ove90, Ove91] durchgeführt.

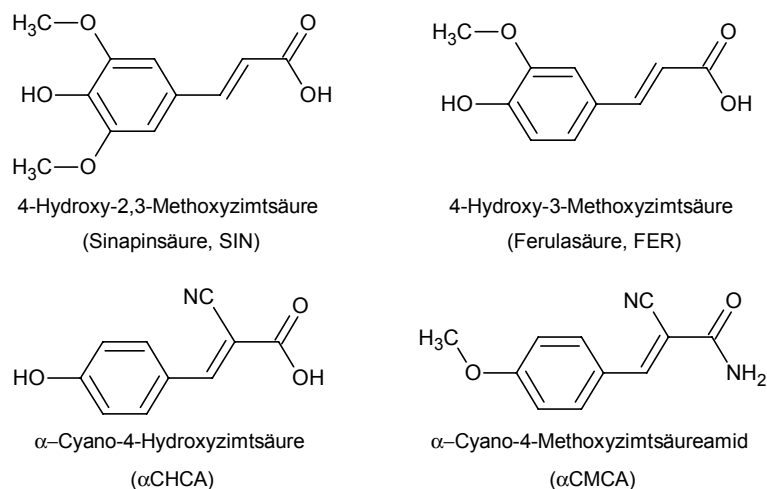
Bei der Suche nach neuen Matrizes zeigte sich schnell, daß anhand von physikalischen oder chemischen Eigenschaften nur sehr eingeschränkt Vorhersagen über eine mögliche Eignung einer Verbindung als MALDI-Matrix möglich war. Deswegen wurden vielfach eine ganze Reihe von kleinen, absorbierenden organischen Molekülen empirisch getestet. Mit der Zeit kristallisierten sich aber doch einige Verbindungsklassen heraus, in denen besonders viele Matrizes gefunden wurden. Aufgrund der notwendigen Absorption im Bereich 266 bis 355 nm waren dies vor allem aromatische Systeme. Dabei ist keine bestimmte funktionelle Gruppe eine notwendige Voraussetzung für eine Matrix. Allerdings darf die Verbindung aufgrund der notwendigen Vakuumstabilität nicht zu flüchtig sein, so daß die meisten Matrizes polar sind und hohe Siede- bzw. Sublimationstemperaturen haben [Bea89a]. Nicht alle Konstitutionsisomere einer Verbindung zeigen Matrixeigenschaften, und bis heute ist der Grund dafür nicht eindeutig geklärt. Ehring et al. sahen als wichtige Voraussetzung die Fähigkeit zur Stabilisierung protonierter Matrixmoleküle  $[M+H]^+$  an, begünstigt durch funktionelle Gruppen in ortho-Position [Ehr92, Kra96]. Dies trifft aber nicht auf alle Matrizes zu, jedoch enthalten die meisten Moleküle entweder ortho- oder para-ständige Hydroxyl- oder Aminogruppen, und nahezu alle Matrizes besitzen acide Wasserstoffe (-OH oder -NH) sowie einen Carbonylgruppe (Carbonsäure, Amid oder Keton). Trotzdem sind bisher keine eindeutigen Kriterien für die Eignung einer Verbindung als Matrix gefunden worden, und weder eine Carboxylgruppe noch ein basischer Stickstoff sind notwendige Voraussetzung. Die meisten Matrizes sind zudem nicht für alle Analytklassen gleichermaßen gut geeignet, wewegen es verschiedene Protokolle für die Probenpräparation gibt, die alle auf unterschiedliche Anforderungen zugeschnitten sind. Die wichtigsten Matrixklassen und Präparationsprotokolle für UV-MALDI sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

**Benzoessäurederivate:** In dieser Substanzklasse hat sich besonders die 2,5-Dihydroxybenzoessäure (2,5-DHB) durchgesetzt, die von Strupat et al. 1991 zuerst eingesetzt wurde [Str91]. Vorteilhaft ist diese Matrix bei der Analyse von größeren Proteinen, vor allem wenn sie in einer Mischung mit 5-Methoxysalicylsäure verwendet wird ("super"-DHB, DHBs) [Kar93, Bah97]. Ein weiterer Vorteil von 2,5-DHB ist, daß sie anorganische Ionen wie  $\text{Na}^+$  teilweise bei der Kristallisation ausschließt, wodurch sich eine Aufreinigung der Proben ergibt [Str91, Wan93]. Nachteilig ist die stark ortsabhängige Ionenintensität ("*sweet spots*"), die eine visuelle Kontrolle und eine manuelle Suche nach den besten Präparationsstellen notwendig macht. Im Prinzip können auch Salicylsäure und einige ihrer Derivate als Matrizes verwendet werden, aber aufgrund des hohen Sublimationsdrucks verdampfen diese Verbindungen im Hochvakuum der Ionenquelle sehr schnell. Juhasz et al. stellten 1993 die Matrix 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoessäure (HABA) vor, die ebenso wie 2,5-DHB gut zur Analyse von großen Proteinen und Glykoproteinen geeignet ist [Juh93].



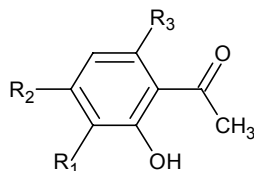
**Abbildung B.2.1.1 :** MALDI-Matrizes: Benzoessäurederivate.

**Zimtsäurederivate:** Aus dieser Verbindungsklasse stammen einige der wichtigsten und auch heute weit verbreiteten Matrizes für UV-MALDI. Beavis und Chait stellten erstmals 1989 eine Reihe von Zimtsäurederivaten mit Matrixeigenschaften vor [Bea89b], von denen Sinapinsäure (SIN) und Ferulasäure (FER) auch heute noch viel genutzt werden. Insbesondere Sinapinsäure ist eine weit verbreitete Matrix zur Analyse von Proteinen. Später fanden dieselben Autoren aus dieser Substanzklasse auch die Matrix  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure ( $\alpha$ CHCA), die in der Peptidanalytik und damit in der Proteomanalyse heute zur wichtigsten Matrix geworden ist [Bea92]. Die Zimtsäure-Matrizes sind so weit verbreitet, daß mindestens 50 % aller MALDI-Analysen mit ihnen durchgeführt werden.



**Abbildung B.2.1.2 :** MALDI-Matrizes: Zimtsäurederivate.

Polyhydroxyacetophenone: Diese Verbindungsklasse wurde 1993 von Piele et al. eingeführt [Pie93] und unter Zusatz von Ammoniumsalzen (insbesondere Ammoniumhydrogencitrat) zur Verdrängung bzw. Komplexierung von Na-Ionen eingesetzt. Es werden sowohl Acetophenone mit zwei Hydroxygruppen [Pit96] als auch mit drei Hydroxygruppen [Zhu96] eingesetzt. Vorteilhaft sind diese Verbindungen unter anderem, weil sie abgesehen von schwach sauren phenolischen OH-Gruppen keine Säurefunktionen tragen und somit eine Probenpräparation in nahezu neutraler Lösung erlauben. Deswegen werden sie bei der Analyse von säureempfindlichen Verbindungen und besonders von Oligonukleotiden verwendet.



2,6-Dihydroxyacetophenon (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OH)

2,3,4-Trihydroxyacetophenon (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = H)

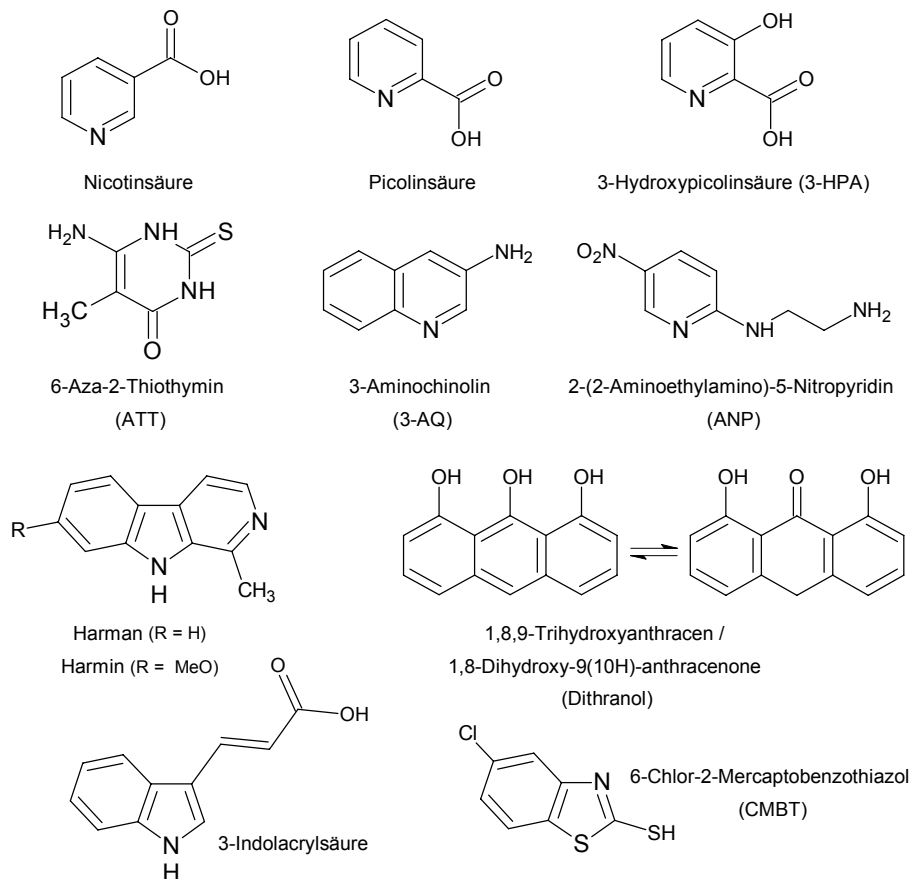
2,4,6-Trihydroxyacetophenon (R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = OH)

**Abbildung B.2.1.3** : MALDI-Matrizes: Polyhydroxyacetophenone.

Heteroaromaten und kondensierte Aromaten: Eine sehr große Zahl Matrizes enthält heteroaromatische Systeme, vor allem stickstoffhaltige Ringe. Dazu zählen Pyridinderivate wie Nicotinsäure [Kar87], aber auch andere Verbindungen wie 6-Aza-2-thiothymine (ATT) [Lec95a, Lec95b] oder kondensierte Aromaten wie 3-Aminochinolin [Met94]. Fitzgerald et al. untersuchten 37 stickstoffhaltige basische Verbindungen auf ihre Matriceigenschaften [Fit93], aber diese Substanzen zeigten nur mäßige Matriceigenschaften und konnten sich in der Folge nicht durchsetzen. Die Basizität des Stickstoffs führte aber nicht zu der erwarteten verbesserten Protonenabstraktion und einer damit einhergehenden erhöhten Empfindlichkeit im negativen Ionenmodus. Allerdings wurden kürzlich gute Spektren im negativen Ionenmodus mit 9-Aminoacridin als Matrix gezeigt ( $pK_B = 4,5$ ) [Ver02]. Einige zwitterionische Verbindungen eignen sich dagegen gut als Matrix: Durch die Einführung der sehr schonenden 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) [Wu93] und Picolinsäure [Tan94] gelang erstmals die Detektion von größeren Oligonukleotiden, wobei auch zu 3-HPA normalerweise Ammoniumhydrogencitrat zugesetzt wird [Nor95]. 3-HPA zeigt auch von den bekannten Matrizes die geringste Tendenz zu metastabilen Fragmentierung bei Glykoproteinen [Kar95].

Es wurde zwar eine Reihe weiterer Matrizes entdeckt, die Verbesserungen für bestimmte Analytklassen oder Anwendungen brachten, aber keine dieser Matrizes erreichte dieselbe Bedeutung wie die oben genannten Gruppen. Eine Ausnahme bildet nur die Analyse von nicht-basischen Polymeren, für die einige besondere Matrizes und auch Präparationstechniken eingeführt wurden. Zur Analyse von Oligosacchariden eignen sich außer 2,5-DHB auch  $\beta$ -Carboline (Harmane, Harmine u.a.) [Non98] oder 5-Chloro-2-mercaptobenzothiazol (CMBT) [Xu97, Pfe99]. Letztere wird aber aufgrund der starken Fragmentierung vor allem zur PSD-Analyse verwendet. Für die Analyse von synthetischen Polymeren kommen neben den "klassischen" Matrizes vor allem Dithranol [Bel96] und Indolacrylsäure [Dan93] zum Einsatz. Die Strukturformeln der in der MALDI-MS am häufigsten eingesetzten Matrizes sind in Abb. B.2.1.4 dargestellt.





**Abbildung B.2.1.4 :** MALDI-Matrizes: Heteroaromaten und kondensierte Aromaten.

**Matrixzusätze:** Besonders viele Untersuchungen gibt es über den Einfluß von Matrix-Zusätzen. Hierzu zählen zum einen der Zusatz von matrix-ähnlichen Verbindungen wie z.B. bei DHBs (s.o.) [Kar93], aber auch der bereits erwähnte Zusatz von Salzen wie Ammoniumcitrat [Pie93, Zhu96a] oder anderen (Alkyl)-ammonium- oder Pyridiniumsalzen [Cur93, Che96]. Diese Zusätze sind besonders bei Oligonukleotiden (und anderen Verbindungen mit stark sauren Funktionen) vorteilhaft, vermutlich weil negativ geladene Gruppen durch Ammonium durch Protonentransfer neutralisiert werden. Zum Teil wurden auch direkt neutrale Basen zur Lösung gegeben, z.B. Imidazol, Trimethylamin [Sim97] oder Spermin [Asa99]. Zur Entfernung von Salzen kann Nitrocellulose zugegeben werden. Die Nitrocellulose bindet Peptide, so daß diese gewaschen werden können [Kus97, Lan00].

Für die Analyse von nicht-basischen Verbindungen ist dagegen meist ein Zusatz von bestimmten Kationen vorteilhaft, auch wenn besonders bei  $\text{Na}^+$  oft schon die vorhandenen Verunreinigungen von Oberflächen und Lösungsmittel ausreichen, damit genügend Kationen für die Ionisierung vorhanden sind [Stah91, Dan93]. So werden in der Oligosaccharid-Analytik  $\text{Na}^+$ -Salze zugesetzt [Bah92], und bei der Analyse von unpolaren organischen Polymeren werden häufig  $\text{Ag}^+$ - oder  $\text{Cu}^{2+}$ -Salze verwendet, die sich besonders gut an Doppelbindungen anlagern [Kah93, Won97, Mow97, Ras98].

Durch bestimmte Zusätze läßt sich auch die Fragmentierung zurückdrängen oder forcieren. So wurde bereits für die Laserdesorption ohne Matrix festgestellt, daß durch Zusatz von Monosacchariden die Fragmentierung zurückgedrängt werden kann [Bea88]. Eine schonendere Desorption und somit eine geringere Fragmentierung von Analyten konnte auch für die matrixunterstützten Laserdesorption bestätigt werden, was besonders für empfindliche Analyten oder in der FT-ICR-MS ausgenutzt wurde [Koe92, Bil93, Gus95, Dis01].

### B.2.2. Präparation und Probenvorbereitung

Bei MALDI spielt die verwendete Präparationstechnik eine wichtige Rolle. Beeinflusst wird die Präparation von allen Faktoren, die auf die Kristallisation wirken. Dazu zählen das Lösungsmittel, die Geschwindigkeit der Kristallisation, sowie Zusätze, Verunreinigungen oder auch das Substrat. Als Lösungsmittel für Peptide und Proteine wird häufig sowohl für die Analyten als auch für die Matrix eine Mischung aus Acetonitril und 0,1%iger wäßriger Trifluoressigsäure (TFA) im Verhältnis 1:2 verwendet. Daneben kommen auch rein wäßrige Lösungen (mit oder ohne Säurezusatz) und Wasser-Alkohol-Mischungen zum Einsatz. Günstig ist dabei ein molares Verhältnis von Analyt zu Matrix von 1:1.000 bis 1:100.000, da bei höheren Analytmengen verstärkt Unterdrückungseffekte auftreten [Cha92, Per95]. Es können sowohl Matrixionen durch bestimmte Analyten unterdrückt werden als auch verschiedene Analyten stark unterschiedliche Ionisierungseffizienz aufweisen. Bei hohen Analytkonzentrationen kann dies dazu führen, daß fast keine Signale von Matrixionen oder von anderen, in geringerer Konzentration vorhandenen Analyten mehr detektiert werden. Unterdrückungseffekte treten auch im negativen Ionenmodus oder zwischen protonierten und kationisierten Spezies auf [Kno96, Kno98].

Präparationstechniken: Im einfachsten Fall werden für die MALDI-Präparation je ca. 1 µL der Analyt- und der Matrix-Lösung direkt auf dem Probensteller gemischt und anschließend getrocknet ("*dried droplet*"). Das Trocknen kann an der Luft erfolgen, alternativ kann aber auch ein Luft- oder Stickstoffstrom verwendet oder ein leichtes Vakuum angelegt werden. Die *dried droplet* Technik hat den großen Vorteil, daß sie einfach und schnell ist. Darüber hinaus erfolgt bei der Kristallisation einiger Matrices auch eine Art Aufreinigung, wobei die Analyte im grobkristallinen Rand angereichert werden und Salze im polykristallinen mittleren Bereich verbleiben.

Eine ebenfalls weit verbreitete Präparationstechnik ist die von Vorm et al. eingeführte Oberflächen- oder Dünnschichtpräparation [Vor94]. Dabei wird die Matrix in einem organischen, flüchtigen Lösungsmittel gelöst (z.B. Aceton) und bleibt nach Verdampfen des Lösungsmittels als dünne Schicht auf dem Probensteller zurück. Danach wird die wäßrige Analytlösung direkt auf die Matrixoberfläche getropft und getrocknet. Diese Technik hat den Vorteil, daß die Analyten an der Oberfläche konzentriert sind. Darüber hinaus kann die Präparation bei geringer Wasserlöslichkeit der Matrix (z.B.  $\alpha$ CHCA) mit wäßriger Säure zur Entfernung von Salzen gewaschen werden. Die Analytlösung darf allerdings nur wenig organische Lösungsmittel enthalten, da sich sonst die Matrixschicht wieder auflöst. Als Variante kann die zweite Schicht sowohl Analyt als auch Matrix enthalten [Edm96], und das Prinzip läßt sich auch auf Mehrschichtsysteme erweitern [Dai99]. Sehr dünne Filme für die MALDI-Analyse lassen sich auch durch *spin-coating* herstellen [Per95].

Es fehlte auch nicht an Versuchen, für wasserlösliche Matrices ähnliche Protokolle zu entwickeln um eine homogene Präparation zu erzielen. Xiang und Beavis erreichten feinkristalline Präparationen, indem sie durch Zerdrücken von Matrixkristallen einer normalen *dried droplet* Präparation (insbesondere 2,5-DHB) kleine Kristallisationskeime auf der Oberfläche schufen, auf die dann eine Matrix-Analyt-Mischung gegeben wurde [Xia94a]. Kürzlich wurde auch für die Analyse von DNA mit ATT eine ähnliche Methode vorgestellt [Gar02]. Da aber dabei ein wesentlicher Vorteil, die Aufreinigung bei der Kristallisation, verloren geht, und zudem kein Waschen der Präparation möglich ist, setzten sich solche Techniken bisher nicht durch. Für bestimmte Oberflächenpräparationen wurde eine verbesserte Auflösung, Massengenauigkeit und Reproduzierbarkeit gefunden [Koo00]. Ein Vergleich verschiedener auf dünnen Schichten basierenden Präparationstechniken sowie deren Effekte auf die MALDI-Analyse wurde von Allwood et al. vorgestellt [All96].

Mit der Hilfe von piezoelektrischen Pipetten können sehr kleine Volumina genau dosiert und an einer exakten Position eines miniaturisierten MALDI-Chips aufkonzentriert werden [Lit97]. Auch die Kombination mit miniaturisierten *vials* auf einem *chip* wurde beschrieben [Eks01]. Durch Kombination mit der Dünnschichtpräparation (Probenteller beschichtet mit Matrix/Nitrocellulose) kann so eine sensitive Detektion bei einem hohen Probendurchsatz erreicht werden [Mil02].

Einige andere Präparationstechniken dienen fast ausschließlich der Grundlagenforschung und haben für die praktische Anwendung nur wenig Bedeutung. Meist versucht man hier, eindeutige Bedingungen zu schaffen, um Aussagen über den Kristallisationsprozeß und die nachfolgenden Mechanismen bei der MALDI-Analyse zu erhalten. Zu diesen Methoden zählt das Züchten von Einkristallen [Stru91, Xia93], das Sprühen der Analyten auf eine Matrixschicht mittels ESI [Xia94b, Glü01] oder pneumatisch [Köc95] sowie das Pressen oder Verreiben von trockener Matrix und Analyt [Hur94, Prz00, Skel00, Tri01, Wan01]. Mit der letztgenannte Methode ist auch eine Analyse unlöslicher Polymere möglich.

Aufkonzentrierung: Gerade bei der Aufkonzentrierung der Analyten auf dem Probenteller sind Verunreinigungen oft der limitierende Faktor. Eine Konzentrierung läßt sich durch eine hydrophobe Oberfläche erreichen, wodurch der Tropfen nicht so stark verläuft und die Probe auf einer kleineren Oberfläche eintrocknet. Oft wird dazu auch die Matrixkonzentration der geringeren Analytkonzentration angepaßt, so daß kleinere Kristalle entstehen. Als hydrophobe Oberfläche wurden z.B. Paraffin [Hun98], Klebefolien [Yan00], Teflon [Hun99] oder auch verschiedene andere Polymere [Kim01, Smi01, Rec02] verwendet. Darüber hinaus wurde auch der Einsatz von *self-assembled monolayers* [Bro97] oder derivatisierten Oberflächen [Odo97, Zha99] zur Adsorption der Analyten beschrieben. Bei den sogenannten *anchor chips* [Sch00, Gob01, Joh01], die mittlerweile auch kommerziell angeboten werden, ist zur Lokalisierung der Kristalle und als Kristallisationskeim ein hydrophiler Anker aus Gold aufgebracht. Limitierender Faktor ist aber bei all diesen Verfahren die Reinheit der Probe, da auch Verunreinigungen wie Salze mit aufkonzentriert werden.

Aufreinigung: Viele Protokolle dienen dazu, die Probe (oft Peptide und Proteine) vor der MALDI-Analyse von Verunreinigungen, insbesondere anorganischen Salzen, zu befreien. Eine Reduzierung der Ionenstärke kann mit Ionenaustauschern erreicht werden, was besonders bei Oligonukleotiden häufig erforderlich ist [Nor92, Nor93]. Bevorzugt werden dazu Ionentauscher-Kügelchen verwendet, die nach dem Trocknen der Probe durch einen Luftstrom leicht wieder entfernt werden können. Salze können auch durch Ionentauscher-Folien wie z.B. Nafion gebunden werden [Bai94, Jac01]. Vielfach werden zur Aufreinigung auch *reversed phase* Materialien verwendet. Vergleichende Untersuchungen zu verschiedenen Aufreinigungsmethoden für Proteine, unter anderem die Herstellung einer miniaturisierten SPE-Säule (*solid phase extraction*) in einem Gel-Loader-Tip, wurden von Roepstorff und Mitarbeitern vorgestellt [Kus97, Gob99]. Kürzlich wurde auch eine Lösungsmittel-Extraktion für besonders kleine Volumina vorgestellt, die vor einer miniaturisierten MALDI-Präparation zur Aufreinigung verwendet werden kann [Kel01].

### B.3. Instrumenteller Aufbau der axialen MALDI-TOF-MS

In den nachfolgenden Kapiteln wird zunächst das allgemeine Prinzip der Flugzeitmassenspektrometrie erläutert, um dann auf Techniken zur Verbesserung der Auflösung einzugehen (zweistufige Ionenquelle, verzögerte Extraktion und Reflektor), die in fast allen MALDI-TOF Massenspektrometern heute angewendet werden. Im letzten Kapitel werden dann Besonderheiten des verwendeten Massenspektrometers Voyager-DE Pro der Firma Applied Biosystems (Framingham, MA, USA) vorgestellt.

#### B.3.1. Grundprinzip

In den meisten MALDI-Geräten erfolgt die Massenanalyse der gebildeten Ionen mit einem Flugzeitmassenspektrometer. Dieses besteht aus Ionenquelle, Laser, Flugrohr, Detektor und ggf. Reflektor und einem zweiten Detektor. Nach der Beschleunigung in der Ionenquelle werden Ionen mit unterschiedlichem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) anhand ihrer unterschiedlichen Flugzeiten (*time-of-flight*, TOF) in der feldfreien Driftstrecke nachgewiesen [Gui95].

Für die MALDI Analyse wird der Probensteller mit der kristallinen Matrix-Analyt-Präparation durch ein Schleusensystem über eine Vorvakuumkammer ( $\sim 10^{-2}$  hPa) in das Hochvakuum ( $\sim 10^{-7}$  hPa) der Ionenquelle eingeschleust. Zur Desorption/Ionisation werden Laser mit Wellenlängen im nahen Ultraviolett sowie vereinzelt IR-Laser verwendet. Dabei kommen vor allem Neodym-YAG-Laser ( $\lambda = 266$  nm und  $\lambda = 355$ ) und Stickstofflaser ( $\lambda = 337$ ) zum Einsatz. Stickstofflaser haben den Vorteil, daß sie einfach und robust sind. Die Laserenergie kann auch über eine Glasfaser eingekoppelt werden. Zur Optimierung der Laserenergie für verschiedene Matrices und Präparationen muß zudem eine optische Einheit zur regulierbaren Abschwächung des Laserstrahls vorhanden sein.

Die nach dem Laserbeschuß gebildeten Ionen werden mit einer hohen Spannung (15 - 30 kV) beschleunigt und gelangen dann in eine feldfreie Driftstrecke. Ionen unterschiedlicher Masse (bzw.  $m/z$ ) haben am Ende der Beschleunigungsstrecke unterschiedliche Geschwindigkeiten. Es gilt folgende Gleichung für die kinetische Energie der Ionen:

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

$$\begin{array}{lll}
 E_{kin} = \text{kinetische Energie [eV]} & e = \text{Elementarladung} & z = \text{Ladung} \\
 U = \text{Beschleunigungsspannung [V]} & m = \text{Masse [kg]} & v = \text{Geschwindigkeit [m/s]}
 \end{array}$$

Alle Ionen gleicher Ladung nehmen (im Idealfall) die gleiche kinetische Energie auf, also ist die resultierende Geschwindigkeit je nach Masse der Ionen unterschiedlich. In der feldfreien Driftstrecke erreichen die Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Flugzeit nacheinander den Detektor. Aus der Flugzeit wird dann mit Hilfe der Flugzeitgleichung die Masse errechnet. Mit  $v = L / t$  erhält man:

$$t = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2 \cdot E_{kin}}}$$

$$t = \text{Flugzeit [s]} \quad L = \text{Länge der feldfreien Driftstrecke [m]}$$

Die Geschwindigkeit der Ionen nach der Beschleunigung und damit auch die Flugzeit bei gegebener Driftstrecke ist sowohl abhängig von der Masse als auch über die kinetische Energie (Beschleunigungsphase) von der Ladung. Mit zwei Analyten bekannter Masse läßt sich auf Basis

der Flugzeitgleichung eine Zweipunktkalibrierung durchführen, die zu einer Geradengleichung mit der Steigung  $a$  und dem y-Achsenabschnitt  $t_0$  führt:

$$t = t_0 + a \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Die kinetische Energie, die die Ionen während der Beschleunigung aufnehmen, ist durch die Feldstärke  $E$  bestimmt und damit von der gewählten Spannung  $U$  und der Beschleunigungsstrecke  $d$  abhängig ( $E = U/d$ ). Die Zeit, die die Ionen in die Beschleunigungsstrecke verbringen, muß zur obigen Flugzeit dazugerechnet werden. Die Gesamtflugzeit  $t_{ges}$  ergibt sich daher zu:

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

$t_1 =$  Flugzeit in der Beschleunigungsstrecke,  $t_2 =$  Flugzeit in der feldfreien Driftstrecke

Auch die Flugzeit  $t_1$  bei der Beschleunigung enthält einen massenabhängigen Term, ist aber zusätzlich von der Ladung, der kinetischen Energie sowie von Beschleunigungsstrecke und –spannung abhängig. Die resultierende Flugzeitgleichung lautet:

$$t_{ges} = \frac{\sqrt{2 \cdot m \cdot d \cdot (\sqrt{E_{kin1} - E_{kin0}})}}{z \cdot U} + L \cdot \sqrt{\frac{m}{2 \cdot E_{kin1}}}$$

$$\begin{array}{lll} t_{ges} = \text{Gesamtflugzeit,} & E_{kin} = \text{kinetische Energie [eV]} & z = \text{Ladung} \\ U = \text{Beschleunigungsspannung [V]} & m = \text{Masse [kg]} & d = \text{Beschleunigungsstrecke [m]} \end{array}$$

Die Detektion der Ionen erfolgt in den meisten Geräten mit sogenannten *micro channel plates*. Auf diesen Platten sind eine große Zahl kleiner Glasröhren (Länge 0,5-1 mm,  $\varnothing$  5-6  $\mu\text{m}$ ) nebeneinander angeordnet. Aus der Beschichtung der Kanäle können leicht Elektronen herausgelöst werden. Treffen nun Ionen auf das Innere dieser leicht schräg angeordneten Kanäle, werden durch die kinetische Energie Elektronen herausgeschlagen, die durch die anliegende Spannung (1-2 kV) beschleunigt werden, wiederum Elektronen herauslösen und damit eine Elektronenkaskade auslösen. Der so erzeugte analoge Stromimpuls erzeugt einen Spannungsimpuls und wird mit einem Transientenrekorder ausgelesen und mit einer festgelegten Zählrate und zeitlichen Kanalbreite digitalisiert.

### B.3.2. Verbesserung der Auflösung: Ionenquelle, verzögerte Extraktion und Reflektor

Die Auflösung  $R$  ist in der Flugzeit-Massenspektrometrie durch die Breite des Peaks bei der halben Peakhöhe definiert (Halbwertsbreite). Die Peakbreite ist durch die Unterschiede der Flugzeit gegeben [Gui95]:

$$R = \frac{m}{\Delta m_{1/2}} \quad \text{bzw.} \quad R = \frac{t}{2\Delta t_{1/2}}$$

Je genauer die Flugzeit definiert ist, desto geringer ist die Halbwertsbreite des Peaks und desto besser ist die Auflösung. Eine höhere Auflösung kann zudem zu einer höheren

Empfindlichkeit führen, da ein schmalerer Peak auch gleichzeitig höher wird.<sup>2</sup> Begrenzender Faktor ist meist das Verhältnis von Signal zu Rauschen, da die Intensität von Rauschpeaks bei verbesserten Auflösung und Sensitivität ebenfalls intensiver werden.

Zwei Effekte tragen zur Begrenzung der Auflösung bei: Ionen gleicher Masse können zum Einen unterschiedliche kinetische Energien besitzen, zum Anderen kann aber vor der Beschleunigung auch eine Ortsunschärfe vorhanden sein [Bea91, Zho92]. Die Energieunterschiede entstehen bei MALDI durch den Desorptions/Ionisationsprozeß und führen zu Differenzen der initialen Geschwindigkeit der Ionen. Durch die unterschiedliche Geschwindigkeit dieser Ionen entstehen Ortsunterschiede beim Anlegen der Beschleunigungsspannung, da die schnelleren Ionen bereits weiter vom Startort entfernt sind. Diese Ortsunschärfe führt aufgrund der Streckendifferenz in der Ionenquelle zu unterschiedlichen Endgeschwindigkeiten nach der Beschleunigung. Darüber hinaus können aber auch Ionen mit gleicher Geschwindigkeit (bzw. kinetischer Energie) eine "echte" Ortsunschärfe besitzen, die durch unterschiedliche Entstehungszeiten oder -orte der Ionen hervorgerufen wird. Auch dabei resultieren unterschiedliche Endgeschwindigkeiten der Ionen. Vor allem Unebenheiten bei der MALDI-Präparation machen sich hier störend bemerkbar.<sup>3</sup>

Je höher die Beschleunigungsspannung ist, desto niedriger wird der relative Anteil der kinetischen Energie der Ionen vor der Beschleunigung an der resultierenden Gesamtenergie. Dadurch werden die durch Energiedifferenzen verursachten Unterschiede bei der Flugzeit und damit die relative Peakbreite geringer. Zusätzlich wird mit hohen Spannungen eine bessere Extraktion der Ionen aus der Ionenquelle und eine empfindlichere Detektion erreicht. Daher wird eine möglichst hohe Beschleunigungsspannung verwendet. Die hohe Spannung führt aber insgesamt zu kürzeren Flugzeiten, so daß eine schnellere Datenakkumulation notwendig wird. Aus diesem Grunde werden möglichst lange feldfreie Flugstrecken verwendet (1-3 m). Die verlängerte Strecke und damit die Flugzeiten führt bei Ionen unterschiedlicher Masse (bzw.  $m/z$ ) zu einer größeren Flugzeitdifferenz, die einfacher und genauer meßbar ist und nicht mehr durch die Kanalbreite des Transientenrekorders begrenzt ist.

Eine wesentliche Rolle spielt bei MALDI die durch unterschiedliche Geschwindigkeiten verursachte Energieunschärfe, für deren Kompensation ein Reihe Techniken entwickelt worden sind. Zur Verbesserung der Auflösung können sowohl die Quellengeometrie, die verzögerte Extraktion der Ionen [Col94, Bro95, Ves95] als auch die Verwendung eines Reflektors beitragen.

Verzögerte Extraktion: Eine Energiefokussierung wird durch *time-lag-focusing* [Col94], *pulsed extraction* [Bro95] oder *delayed extraction* (DE) [Ves95] erreicht. Die Grundlage für diese Technik wurde bereits 1955 von Wiley und McLaren beschrieben [Wil55]. Bei DE wird die Beschleunigungsspannung erst einige Zeit nach dem Laserpuls angelegt, die benötigte Zeit schwankt je nach Masse und Driftstrecke von einigen Nanosekunden bis hin zu Mikrosekunden. Basierend auf einer zweistufigen Ionenquelle zur Ortsfokussierung wird durch die variable Verzögerungszeit bei der Beschleunigung eine Energiefokussierung und damit ein Ausgleich von initialen Geschwindigkeitsdifferenzen der Ionen erreicht. Diese Methode war auch deswegen so erfolgreich, weil damit eine Verringerung der Kollisionen in der Ionenquelle einhergeht. Da sich die desorbierte Probe zum Zeitpunkt der Beschleunigung bereits ausgebreitet hat und deswegen die Konzentration der Moleküle in der Umgebung der Ionen geringer ist, wird die Zahl der Kollisionen bei der

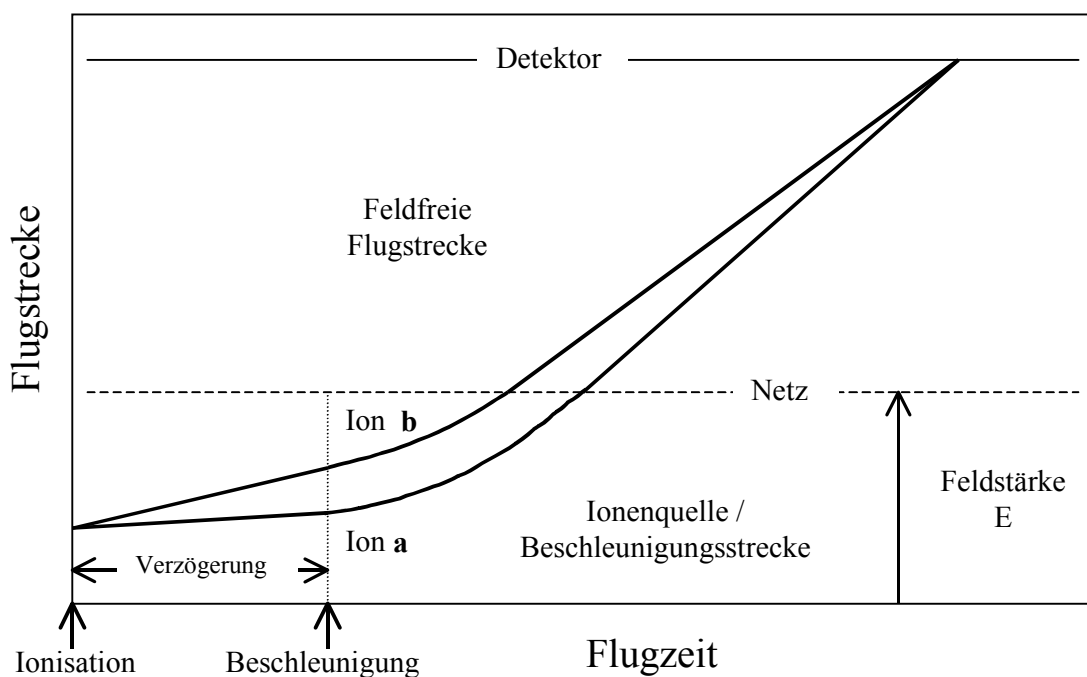
---

<sup>2</sup> Dies trifft allerdings nicht zu, wenn die höhere Auflösung durch Aperturen erreicht wird, weil dabei gleichzeitig die IONENTRANSMISSION verringert wird.

<sup>3</sup> Als weitere Gründe für eine begrenzte Auflösung sind Kollisionen der Moleküle bei der Beschleunigung, metastabile Zerfälle in der feldfreien Flugstrecke, nicht-optimale Felder und elektronische Schwankungen zu nennen.

Ionenextraktion stark zurückgedrängt. Dies macht sich in einer geringeren Geschwindigkeitsverteilung und damit in einer verbesserten Auflösung bemerkbar.

Außerdem können die oben genannten Geschwindigkeits- bzw. Energieunterschiede ausgeglichen werden, so daß Ionen mit unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten, aber identischem  $m/z$ , gleichzeitig auf einen Ort fokussiert werden: Wenn nach dem Laserpuls kein Feld anliegt, kann sich das ablatierte Material einschließlich gebildeter Ionen ausbreiten. Dabei legt ein Ion mit hoher Startgeschwindigkeit einen längeren Weg zurück als ein Ion mit niedriger Geschwindigkeit. Nach der Beschleunigung besitzt das schnellere Ion aber eine geringere Endgeschwindigkeit (kinetische Energie), da es auf einer kürzeren Strecke beschleunigt wird. Obwohl also das ursprünglich schnellere Ion die Ionenquelle eher verläßt, ist es in der feldfreien Flugstrecke langsamer. Im Idealfall gleicht dieser Unterschied den Unterschied in den Startgeschwindigkeiten gerade aus und alle Ionen mit gleichem  $m/z$  kommen zur selben Zeit am Detektor an, wenn dieser sich im Ortsfokus befindet (s. Abb. B.3.2.1).



**Abbildung B.3.2.1** : Prinzip von Time-Lag-Focusing: In der Ionenquelle entstehen zwei Ionen a und b mit unterschiedlicher Startgeschwindigkeit, wobei  $v_0(a) < v_0(b)$  ist. Nach der optimalen Verzögerungszeit werden die Ionen über unterschiedliche Strecken in der Ionenquelle beschleunigt und dadurch am Detektor fokussiert (nach [Gui95]).

Die Spannungswerte und Verzögerungszeiten müssen so gewählt werden, daß die geschwindigkeitsbedingten Ortsunterschiede der Ionen in der Ionenquelle bei Erreichen des Detektors gerade ausgeglichen werden. Die ist mit zunehmender Masse ( $m/z$ ) nach einer längeren Verzögerungszeit der Fall (= höherer Strecken- und damit Energieunterschied bei der Beschleunigung). Daher ist diese Technik massenabhängig, so daß bei gleichbleibenden Spannungen in der Ionenquelle mit steigendem  $m/z$  höhere Verzögerungszeiten notwendig sind.<sup>4</sup>

In die Gesamtflugzeit geht die aus dem MALDI-Prozeß rührende Anfangsgeschwindigkeit der Ionen ein. Da die Ionen bei der verzögerten Extraktion bereits einen gewisse Strecke in der

<sup>4</sup> Alternativ kann auch die Aufteilung der Spannungen in der Ionenquelle bei gleichbleibender Verzögerungszeit verändert werden.

Ionenquelle zurückgelegt haben, verringert sich die Flugstrecke  $d_l$  und damit auch die resultierende kinetische Energie, wodurch sich die Gesamtflugzeit über die Verzögerungszeit hinaus erhöht. Daher läßt sich die Anfangsgeschwindigkeit der Ionen durch Variation von  $\tau$  (Verzögerungszeit) ermitteln (s. Kap D.1.5).

Ortsfokus und zweistufige Ionenquelle: Unterschiedliche Startgeschwindigkeiten von Ionen werden im TOF-Massenspektrometer durch Beschleunigung über unterschiedliche Strecken in der Ionenquelle ausgeglichen, allerdings gilt dies nur an einem definierten Ort. Alle Ionen mit gleichem  $m/z$  haben bis zum Erreichen dieser Stelle in der feldfreien Flugstrecke dieselbe Flugzeit benötigt, so daß Ionen mit unterschiedlicher Anfangsgeschwindigkeit an einem Ort fokussiert werden.<sup>5</sup> Dieser Ortsfokus liegt für ein einfaches System mit einer einstufigen Ionenquelle bei der doppelten Beschleunigungsstrecke und ist damit durch die Quellengeometrie und die Extraktionsspannung vorgegeben [Gui95].

Bei einer kurzen Beschleunigungsstrecke resultiert aber auch eine sehr kurze Flugstrecke bis zum Erreichen des Ortsfokus. Eine Lösung dieses Problems ist die zweistufige Ionenquelle, durch die der Ortsfokus nach hinten verschoben werden kann. Dazu wird zwischen Proben-teller und Beginn der feldfreien Flugstrecke ein zweites Gitter angebracht, an dem eine variabler Bruchteil der gesamten Beschleunigungsspannung anliegt, so daß man zwei Strecken mit unterschiedlichen Feldstärken erhält. Die Flugzeitgleichung erweitert sich dadurch zu:

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

Die zweistufige Ionenquelle ermöglicht eine Verlängerung der feldfreien Flugstrecke und eine idealere Ortsfokussierung von Ionen. Durch Variation der Spannungsanteile in den beiden Beschleunigungsstufen kann man zudem Ionen verschiedener Masse auf den Detektor fokussieren, ohne die Quellengeometrie ändern zu müssen. Variiert man dabei gleichzeitig die Verzögerungszeit (s. oben), kann für alle Massen die gleiche, hohe Beschleunigungsspannung verwendet werden. Daraus resultiert für alle Ionen idealerweise die gleiche kinetische Energie.<sup>6</sup>

Reflektor: Ionen gleicher Masse können durch Stoßprozesse oder bedingt durch den MALDI-Prozeß (Anfangsgeschwindigkeit- und verteilung) leicht unterschiedliche kinetische Energien besitzen ( $E_{kin} = \frac{1}{2} m v^2$ ). Durch einen Reflektor können Ionen gleicher Masse, aber unterschiedlicher kinetischer Energie zur gleichen Zeit auf einen Ort fokussiert werden. Dies ist aber nur möglich, wenn keine Ortsunterschiede vorhanden sind, was jedoch in der MALDI-Ionenquelle aufgrund der Geschwindigkeitskomponente der Ionen nicht gegeben ist. Daher müssen die Ionen zunächst mit DE an einem Ort fokussiert werden. Diesen Ortsfokus erreichen im Idealfall alle Ionen mit gleichem  $m/z$  zur gleichen Zeit. Beim Einsatz eines Reflektors werden die Extraktionsbedingungen so gewählt, daß der Fokus an einem bestimmten Ort in der feldfreien Flugstrecke liegt. Der Reflektor bildet diesen Fokus auf einem zweiten Detektor ab, er wirkt im Prinzip wie ein Spiegel. Dabei dringen Ionen mit höherer kinetischer Energie tiefer in den Reflektor ein, bevor sie reflektiert werden. Daher legen sie eine größere Strecke zurück, wofür sie auch eine längere Zeit brauchen als

---

<sup>5</sup> Die Ionen haben aber immer noch unterschiedliche kinetische Energien.

<sup>6</sup> Kinetische Energiedifferenzen führen insbesondere bei der Detektion der Ionen zu einer stark unterschiedlichen Empfindlichkeit, da die Ionendetektion vom Impuls und damit von der Geschwindigkeit der Ionen abhängt.



Ionen mit geringerer kinetischer Energie. Im Idealfall erreichen durch einen Reflektor alle Ionen gleicher Masse, aber unterschiedlicher kinetischer Energie, zur gleichen Zeit den Detektor.

Die Energieverteilung am Ortsfokus, wie sie durch eine optimale Fokussierung durch DE vorgegeben ist, wird durch den Reflektor eins zu eins auf den Detektor abgebildet. Dies ermöglicht eine Verlängerung der Flugstrecke, ohne daß die Breite der Energieverteilung größer wird. Durch die längere Flugzeit können auch die damit einhergehenden größeren Flugzeitdifferenzen genauer erfaßt werden. Dadurch ist eine bessere Massenauflösung möglich.

Der Einsatz des Reflektors ist nur bis zu einem Massenbereich von ca. 10 kDa sinnvoll, da metastabile Fragmentierungen mit der Molekülmasse zunehmen. Diese werden (sofern sie in der feldfreien Flugstrecke gebildet werden) nur im Reflektorbetrieb detektiert, da hier die Fragmente aufgrund ihrer kleineren kinetischen Energie weniger tief in den Reflektor eindringen. Die Geschwindigkeit der in der feldfreien Flugstrecke gebildeten Fragmente ist vor der Reflektion genauso groß wie die des Vorläuferions, daher kommen sie im Linearmodus auch zur selben Zeit und damit bei der Flugzeit des Vorläuferions am Detektor an.<sup>7</sup>

### B.3.3. Aufbau des verwendeten MALDI-Massenspektrometers

Für alle Experimente wurde ein kommerzielles MALDI-TOF Gerät eingesetzt (Voyager-DE Pro der Firma Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), das sowohl mit verzögerter Extraktion arbeitet als auch mit einem Reflektor ausgestattet ist (s. Abb. B.3.3.1). In dem Gerät ist ein Stickstofflaser der Firma Laser Science eingebaut ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ). Der Laserstrahl wird über ein Prisma und eine Linse in die Ionenquelle fokussiert. Da die Schwellbestrahlungsstärke abhängig von Matrix und Präparation variiert, ist in den Strahlengang ein drehbarer Graukeil eingebaut, mit dessen Hilfe die Laserintensität angepaßt werden kann.

Das Voyager DE-Pro besitzt wie die meisten kommerziell vertriebenen MALDI-TOF Systeme eine zweistufige Ionenquelle: Zwischen Probenzelle und Flugrohr (geerdet) liegt die volle Extraktionsspannung an, dazwischen ist jedoch ein Gitter, an dem ein Teilbetrag dieser Spannung frei gewählt werden kann (60 – 100 %). Dadurch kann man die Extraktionsspannung in der ersten Stufe (*grid-voltage*) frei wählen ohne die Gesamtbeschleunigungsspannung zu verändern und die Fokussierung der Ionen kann durch verschiedene Kombinationen aus Verzögerungszeit und *grid-voltage* erreicht werden.

---

<sup>7</sup> Allerdings können durch eine Beschleunigung der Ionen vor dem Detektor, die zur Erhöhung der Empfindlichkeit dient, Peakverbreiterungen auftreten. Außerdem können Rückstöße beim Zerfall zu einer Änderung der Geschwindigkeit der Ionen in Richtung der Flugachse führen.

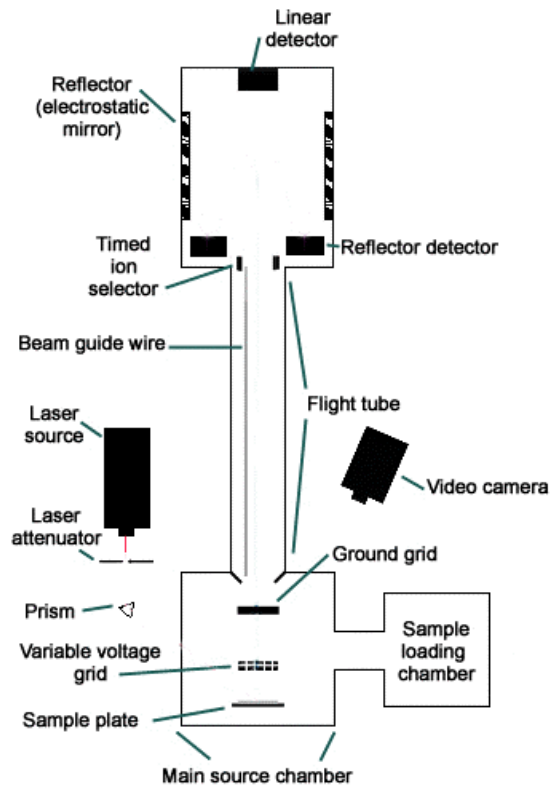


Abbildung B.3.3.1 : Schematischer Aufbau des verwendeten MALDI-TOF Massenspektrometers

Das Voyager-DE Pro hat zwei Detektoren, eines für den Reflektor- und eines für den Linearbetrieb. Während im Reflektormodus eine doppelte *channel plate* eingesetzt wird, ist im Linearbetrieb hinter einer einfachen *channel plate* ein Szintillationsdetektor eingebaut. In diesem werden durch die Elektronen aus der *channel plate* Photonen erzeugt, die dann in einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) eine verstärkte Elektronenkaskade auslösen. Diese Anordnung wird auch als "*high current detector*" bezeichnet und bringt besonders bei höheren Massen eine sensitivere Detektion.

Die eingesetzten Detektoren besitzen eine gewisse Totzeit, da nach einer Signalkaskade die Spannung am Detektor erst wieder neu aufgebaut werden muß. Aus diesem Grund sinkt die Empfindlichkeit direkt nach der Detektion eines sehr hohen Signals, was besonders bei hohen Matrixsignalen störend sein kann. Hier bietet das Gerät die Option des *low-mass-gate*: Dabei wird erst nach einer bestimmten Flugzeit (z.B. nach den Matrixionen) die volle Spannung am Detektor angelegt, d.h. er erreicht erst dann seine volle Empfindlichkeit. Eine erhöhte Sensitivität bewirkt auch der *guide-wire*: Dies ist ein dünner Metalldraht im Flugrohr, an dem eine geringe Spannung anliegt, typischerweise 0 bis maximal 0.3 % der Beschleunigungsspannung (= max.  $\pm 75$  V bei 25 kV Beschleunigungsspannung; die benötigte Spannung ist massenabhängig). Der *guide-wire* dient zur Fokussierung der Ionen auf den Detektor. Eine höhere *guide-wire*-Spannung ergibt eine bessere Nachweisempfindlichkeit, führt aber auch zu einer geringeren Auflösung.

## B.4. Fragmentierung und Fragmentionenanalyse

Obwohl MALDI im Gegensatz zu anderen Desorptionstechniken wie FAB und SIMS relativ schonend ist und mit Ausnahme von labilen Verbindungen eine geringe Tendenz zur Fragmentierung zeigt, ist dennoch ein gewisser Grad des Zerfalls von intakten Biomolekülen vorhanden [Spe91, Zho92]. Neben der insgesamt schonenden Natur der Ionenbildung bei MALDI ist auch die kurze Zeit für die Aufnahme eines Massenspektrums im Bereich einiger Mikrosekunden für eine Detektion intakter Analytionen von Bedeutung. Insbesondere bei metastabilen, unimolekularen Zerfällen wird keine Fragmentierung beobachtet, da der Zerfall oft langsamer als die Massenanalyse ist. Dies ist besonders bei höhermolekularen Verbindungen der Fall. Fragmente werden im Linearmodus auch dann nicht detektiert, wenn sie erst in der feldfreien Flugstrecke entstehen, da in diesem Fall die Fragmente dieselbe Geschwindigkeit wie die Vorläuferionen besitzen und zur gleichen Zeit am Detektor ankommen. Die Existenz von metastabilen Zerfallsreaktionen wurde durch Anlegen einer Bremsspannung kurz vor dem Detektor nachgewiesen [Spe92]. Dabei werden alle Ionen abgebremst, nicht jedoch neutrale Fragmente, die daher eher am Detektor ankommen. Auch intakte Molekülonen und metastabile Fragmentionen werden unterschiedlich stark abgebremst. Eine Fokussierung und damit eine Massenbestimmung dieser metastabilen Fragmente kann durch einen Reflektor erreicht werden (s. Kap. B.4.2) [Spe91]. Fragmente, die bereits in der Ionenquelle entstehen, werden dagegen auch im Linearmodus getrennt detektiert. Entstehen Fragmente bei der Beschleunigung der Ionen, haben diese je nach Entstehungsort unterschiedliche Flugzeiten und erscheinen daher hauptsächlich als "chemisches Rauschen" im MALDI-Spektrum.

Obwohl eine Fragmentierung bei der Massenbestimmung oft unerwünscht ist, kann eine Fragmentanalyse auch wertvolle Informationen zur Strukturinformation von Biopolymeren liefern. Bei der axialen MALDI-TOF-MS kommen hierfür zwei Verfahren zum Einsatz, die entweder die prompte Fragmentierung in der Ionenquelle (*in-source decay*, ISD) oder die metastabile Fragmentierung in der feldfreien Flugstrecke (*post-source decay*, PSD) ausnutzen. Diese werden in den nachfolgenden Kapiteln erläutert. Die Technik der gezielten kollisionsinduzierten Fragmentierung (*collision-induced dissociation*, CID) mit Selektion des Vorläuferions ist erst seit kurzem und nur in Kombination mit anderen Massenanalysatoren sinnvoll einsetzbar. Diese werden in Kap. B.5 beschrieben.

### B.4.1. Ursachen von Fragmentierungen

Fragmentierungen können durch verschiedene Ursachen entstehen. Bei der MALDI-TOF-MS sind dies vor allen Dingen Stöße bei der Beschleunigung. Daneben spielen auch Stöße bei der MALDI-Desorption selbst eine Rolle, da bei höherem Druck die freie Weglänge abnimmt und niederenergetische Kollisionen vorherrschen. Das Ausmaß der Energieaufnahme der Analytionen durch Kollisionen ist aber in erster Linie von der Beschleunigungsspannung abhängig, so daß bei geringerer Spannung weniger Fragmente auftreten [Kar96]. Auch der Druck in der Ionenquelle spielt dabei eine Rolle. Eine wesentliche Reduktion von Kollisionen wird durch die verzögerte Extraktion der Ionen erreicht (s. Kap. B.3.2) [Co194, Bro95, Ves95].

Der Grad der Fragmentierung ist bei MALDI aber auch wesentlich durch die Matrix bestimmt, wobei die Matrices 3-HPA, Salicylsäure<sup>8</sup> und 2,5-DHB (besonders unter Zusatz von 3-Methoxy-5-Hydroxysalicylsäure, DHBs) sich als besonders schonend erwiesen [Kar95, Kar96]. Allerdings gibt es bisher nur Vermutungen, worin dieser Einfluß besteht. Vorgeschlagen wurde eine

---

<sup>8</sup> Salicylsäure kann allerdings in den meisten Massenspektrometern aufgrund der schnellen Sublimation bei Drücken unterhalb von  $10^{-5}$  hPa nicht eingesetzt werden.

Abhängigkeit von der Sublimationstemperatur oder –energie [Ver90a, Kar96]. Eine Sublimation könnte dafür sorgen, daß die Temperatur der Moleküle bei der Desorption nicht zu hoch wird, da die eingekoppelte Energie aufgrund des Phasenübergangs nahezu vollständig als Sublimationsenthalpie verbraucht wird. Experimente ergaben aber bisher keine Belege für diese Theorie [Pri99]. Es gibt zudem eine Reihe von Versuchen, die "Härte" einer Matrix mit der internen Energie der Moleküle nach der Desorption/Ionisation zu korrelieren [Cla93, Mow94, Ste00, Luo02]. Aber auch bei diesen Untersuchungen und Berechnungen gibt es einige Unstimmigkeiten. Dabei sind nicht nur die energetischen Abschätzungen mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, sondern es wurden auch unterschiedliche Einschätzungen über die schonende oder weniger schonende Natur verschiedener Matrizes berichtet (vgl. mit [Kar95, Kar96]). Letzteres könnte aber mit unterschiedlichen Präparationsbedingungen zusammenhängen. In einigen Untersuchungen wurden zudem Testmoleküle verwendet, die auch ohne Matrix desorbiert und ionisiert werden können. Die direkte Laserdesorption ist aber weniger schonend und führt zu höheren Fragmentierungsraten.

Kürzlich wurde ein neues Kriterium für die "Härte" einer Matrix vorgeschlagen [Glü01a, Kar03]. Dabei zeigte sich, daß Matrizes mit hohen initialen Ionengeschwindigkeiten besonders schonend sind. Durch die hohe Geschwindigkeit der Ionen breitet sich die Wolke aus Ionen und neutralen Molekülen (*plume*) schnell aus, so daß weniger Kollisionen stattfinden. Gleichzeitig könnte es zu einer Kühlung aufgrund der schnellen, adiabatischen Expansion kommen (*expansional cooling*) [Bea91, Ens91, Spe93], was letztendlich zu einer geringeren Fragmentierung führt.

Eine Photofragmentierung aufgrund der Laserenergie spielt dagegen bei MALDI keine Rolle, solange die Matrix in großem Überschuß vorliegt und die Analyten bei der verwendeten Wellenlänge keine oder nur eine geringe Absorption aufweisen [Bök95, Kar96]. Allerdings können exotherme Reaktionen von Matrixmolekülen mit Analyten zu einer Erhöhung der internen Energie von Analytmolekülen und somit zur Fragmentierung führen. Dazu zählen sowohl Radikalreaktionen und Elektronentransfer als auch Protonentransfer. Insbesondere der Protonentransfer könnte neben Kollisionen ein weiterer Grund für metastabile Fragmentierungen sein [Bur97, Tan97, Jør98]. Bei der Fragmentierung von Oligonukleotiden scheint die Protonierung einer labilen Nukleobase der initiale Schritt zu sein [Sch93a, Zhu95a, Nor95]. Dieser führt anschließend zum Basenverlust aufgrund der überschüssigen Energie und in der Folge zu einem Bruch des DNA-Rückgrats. Dies ist besonders bei Guanidin der Fall, wobei wohl nicht nur die Basizität der Nukleobase eine Rolle spielt, sondern auch eine strukturell bedingte leichtere Fragmentierung [Tan97a, Gro01]. Vor allem die besonders starke Fragmentierung positiv geladener Oligonukleotide wurde mit der Protonierung einer labilen Nukleobase in Verbindung gebracht [Tan97b].

Die beim Protonentransfer von der Matrix auf Analytmoleküle freiwerdende Energie und damit der Grad der Fragmentierung sollte dabei um so größer sein, je höher die Gasphasenacidität der protonierten Matrix ist. Dieser Zusammenhang wurde auch für einige Matrizes gefunden [Jør98], ist aber nicht für alle Matrizes konsistent (z.B. 2,5-DHB).<sup>9</sup> Die geringe Abhängigkeit der Fragmentierung von der eingekoppelten Laserenergie deutet zudem darauf hin, daß Fragmentierungen aufgrund von Reaktionen mit Matrixmolekülen nur eine untergeordnete Rolle spielen [Bök95] und im wesentlichen durch Kollisionen entstehen. Allerdings treten außer den erwähnten metastabilen, langsamen Fragmentierungen auch schnelle, prompte Fragmentierungen auf (s. Kap. B.4.3) [Bro95a]. Diese werden bereits in der Ionenquelle gebildet und könnten durch exotherme Reaktionen entstehen, da die beiden Arten der Fragmentierung sich signifikant unterscheiden.

---

<sup>9</sup> Allerdings müßte bei diesen Überlegungen auch die Gasphasenacidität von Fragmentionen der Matrix berücksichtigt werden.

#### B.4.2. Metastabile Fragmente: Post-Source-Decay (PSD)

Zur Analyse der metastabilen Fragmente, die in der feldfreien Flugstrecke entstehen, kann ein Reflektor verwendet werden. Diese Technik wurde von Spengler et al. für MALDI eingeführt und ist unter dem Begriff PSD-Analyse (*post-source decay*) bekannt [Spe91, Spe92, Spe97]. Bei der metastabilen Fragmentierung verteilt sich die kinetische Energie des Vorläuferions entsprechend der Masse auf die Fragmente, während die Geschwindigkeit gleich bleibt. Der Reflektor wirkt als Energiefilter, so daß die Fragmente aufgrund ihrer geringeren kinetischen Energie weniger tief in den Reflektor eindringen und daher früher (an einer niedrigeren Äquipotentialfläche) reflektiert werden. Durch die geringere Flugstrecke sind sie allerdings im Massenspektrum zu niedrigeren  $m/z$ -Werten verschoben. Der Reflektor ist für eine bestimmte kinetische Energie der Ionen optimiert und fokussiert diese Ionen auf den Detektor. Bei kleinen Massendifferenzen zum Vorläuferion (z.B. Abspaltung von kleinen Neutralteilchen wie  $\text{NH}_3$  oder  $\text{H}_2\text{O}$ ) werden die Fragmente daher noch relativ gut aufgelöst und erscheinen nahezu bei der korrespondierenden Flugzeit des Fragments und damit bei dessen korrekter Masse. Bei kleineren metastabilen Fragmenten (größere Differenz zum Vorläuferion) führt deren wesentlich niedrigere Energie aber dazu, daß diese Fragmentionen nicht fokussiert werden und mit zunehmender Massendifferenz zum Vorläuferion als breite, nicht aufgelöste Peaks detektiert werden.

Zur Fokussierung der Fragmentionen muß die Reflektorspannung der kinetischen Energie der Fragmentionen angepaßt werden. Um den gesamten Massenbereich abzudecken, wird die Reflektorspannung in diskreten Schritten variiert und jeweils ein Spektrum aufgenommen. Diese Einzelspektren werden dann zum kompletten MALDI-PSD-Spektrum zusammengesetzt. Dazu müssen die Spektren aller Massenbereiche einzeln kalibriert werden. Diese kann anhand der bekannten relativen Absenkung der Reflektorspannung jedes Massensegments ausgerechnet werden. In der Regel wird zur Massenkalisierung eine Anpassung mit einer Polynomfunktion oder eine Berechnung der Flugzeiten durchgeführt.

Durch die PSD-Technik gelang erstmals eine Fragmentionenanalyse mit MALDI, bei der eine Selektion des Vorläuferions möglich ist. Die Ionenselektion wird mit einem Deflektor bewerkstelligt, der aus zwei gegenüberliegenden Metallplatten besteht. Ionen werden durch eine anliegende Spannung abgelenkt und erreichen nicht den Detektor. Zur Auswahl eines Vorläuferions wird die Deflektorspannung bei der korrespondierenden Flugzeit des entsprechenden Ions ausgeschaltet, so daß diese den Deflektor passieren kann. Daher ist im Gegensatz zu prompten Fragmenten, die in der Ionenquelle entstehen und bereits im normalen MALDI-Spektrum auftreten, bei PSD eine eindeutige Zuordnung der Fragmente zum Vorläuferion und damit auch eine Analyse von Mischungen möglich. Leider ist die Auflösung bei der Selektion der Vorläuferionen nach wie vor begrenzt, so daß Ionen, die sich nur um wenige Dalton in ihrer Masse unterscheiden, nicht selektiert werden können. Dazu gehören je nach Analytmasse auch Addukte, die die Interpretation der Spektren erschweren kann. Die sequentielle Aufnahme eines PSD-Spektrums ist zudem relativ zeitaufwendig. Trotzdem wird die PSD-Analyse erfolgreich zur Sequenzierung von Biopolymeren, insbesondere von Peptiden verwendet [Kau96, Spe97, Cha99]. Eine Weiterentwicklung ermöglicht die Aufnahme von PSD-Spektren in einem Schritt (potential LIFT PSD) [Fre00]. Dabei werden die metastabilen Fragmente zusammen mit ihrem Vorläuferion in der Mitte der feldfreien Driftstrecke selektiert und erneut beschleunigt. Dadurch sind die kinetischen Energieunterschiede so gering, daß alle Ionen bei gleicher Reflektorspannung und daher in einem Schritt fokussiert werden können.

Das Ausmaß der Fragmentierung ist nur in engen Grenzen beeinflussbar und ist in erster Linie durch die Stabilität der Analyte und der Matrix vorgegeben. Es können nur Zerfälle detektiert werden, die eine langsame Kinetik haben und erst in der feldfreien Flugstrecke zerfallen. Der Energieeintrag kann zudem nur begrenzt variiert werden. Eine Erhöhung der Laserenergie führt

zwar zu einer stärkeren Fragmentierung, gleichzeitig wird dabei aber auch die Spektrenqualität, insbesondere die Auflösung und die Massengenauigkeit, geringer. Die Stärke der Fragmentierung hängt zudem von der Wahl der Matrix ab. Während die Matrix  $\alpha$ CHCA für die Analyse von intakten, hochmolekularen Verbindungen wenig geeignet ist, wird sie aufgrund ihrer "Härte" besonders oft für die PSD-Analyse eingesetzt.

Die Empfindlichkeit von MALDI-PSD hängt zudem stark von der Ionentransmission des eingesetzten Massenspektrometers ab. Zur Erhöhung der Kollisionsrate kann zudem der Druck erhöht werden. Eine Kollisionszelle am Beginn der feldfreien Flugstrecke sorgt dafür, daß nicht über die ganze Flugstrecke Zerfälle stattfinden, die zu einer Peakverbreiterung führen. Auch dabei ist die Ionentransmission der kritische Parameter [Spe97].

Bei der verzögerten Extraktion ist dagegen die Zahl der Kollisionen stark reduziert, so daß die Fragmentierung zurückgedrängt wird. Dennoch werden PSD-Analysen oft unter Einsatz von DE aufgenommen, da die geringere Fragmentierungsrate durch eine höhere Auflösung und Massengenauigkeit meist wettgemacht wird [Kau96]. Der limitierende Faktor bei der Auflösung ist die freiwerdende kinetische Energie beim Zerfall der Ionen, die zu einer statistisch verteilten Geschwindigkeitskomponente in Richtung der Flugachse führt. Dadurch werden bei metastabilen Fragmentierungen auch im Linearmodus verbreiterte Peaks detektiert.

#### **B.4.3. Prompte Fragmente: In-Source-Decay (ISD)**

Bei sehr schnellen Zerfallsreaktionen werden die Produkt-Ionen bereits in der Ionenquelle gebildet. Diese prompten Fragmentierungen werden als *in-source decay* (ISD) bezeichnet [Bro95a, Bro96, Bro97a]. Zur Erhöhung der ISD-Fragmentierungsrate wird meist die Laserenergie um etwa 10-30 % erhöht. Noch höhere Laserintensitäten führen zu breiteren Signalen und damit zu einer schlechteren Auflösung und Massengenauigkeit. Die so erzeugten Fragmente erreichen bei der Beschleunigung die gleiche kinetische Energie wie die intakten Vorläuferionen. Daher erreichen sie auch nach der Flugzeit den Detektor, die ihren  $m/z$ -Verhältnis entspricht.

Obwohl die ISD-Analyse also weit weniger aufwendig ist als PSD, hat ISD doch einen entscheidenden Nachteil. Da keine Selektion des Vorläuferions möglich ist, können nur Einzelkomponenten analysiert werden, die zudem nicht zu stark verunreinigt sein dürfen. Wertvoll ist ISD aber dadurch, daß komplementäre Informationen zu PSD und CID erhalten werden können [Bro95a, Tak00]. Während bei ISD von labilen Verbindungen, wie z.B. sialysierten Oligosacchariden, im wesentlichen dieselben Fragmente detektiert werden [Har99a] wie bei PSD oder CID, entstehen bei stabileren Oligosacchariden [Nav97], modifizierten Oligonukleotiden [Wan97] und Peptiden und Proteinen [Kat98, Rei98, Rei98a] zu einem großen Teil andere Fragmentationen. Bei Peptiden werden außerdem viel weniger Abspaltungen von kleinen Neutramolekülen wie  $\text{NH}_3$  oder  $\text{H}_2\text{O}$  beobachtet. Ein weiterer Vorteil ist, daß eine Reihe von labilen Gruppen, wie z.B. posttranslationale Modifikationen von Proteinen, nicht abgespalten werden. Daher kann aus der entsprechenden Massendifferenz (z.B. 80 Da bei einer Phosphorylierung), die modifizierte Aminosäure bestimmt werden [Len99, Kin00].

ISD-Fragmente sind bereits nach weniger als 100 ns nachweisbar [Bro95a]. Sie werden vor allem bei verzögerter Extraktion der Ionen detektiert, bei der kontinuierlichen Extraktion treten sie dagegen kaum auf [Bro96]. Sowohl die Pulsdauer als auch die Wellenlänge des Lasers spielen eine untergeordnete Rolle, allerdings wurde bei  $\lambda = 266$  nm eine stärkere Fragmentierung beobachtet [Bro97a]. Typische ISD-Fragmente treten aber nur mit UV-Lasern auf, während die Spektren bei IR-MALDI eher PSD- oder CID-Spektren vergleichbar sind [Men99].

Wie PSD ist auch ISD matrixabhängig, allerdings wird eine starke Fragmentierung nicht mit denselben Matrices gefunden. Besonders viele ISD-Ionen treten mit 2,5-DHB, Sinapinsäure und

Ferulasäure auf, dagegen sind  $\alpha$ CHCA und DHBs für ISD-Analysen weniger geeignet [Bro95a, Bro97a]. Gerade  $\alpha$ CHCA führt aber zu einer besonders starken PSD-Fragmentierung. Eine stärkere ISD-Fragmentierung wird auch bei Salzzugabe beobachtet, dagegen bewirkt eine Säurezusatz eine geringere Fragmentierung [Kat98, Mar00a].

Aufgrund der großen Unterschiede zu CID und PSD scheinen Kollisionen mit niedriger Stoßenergie nicht die Ursache für ISD-Fragmentierungen zu sein. Dagegen treten besonders bei Peptiden ähnliche Fragmente auf, wie sie sowohl bei hochenergetischen Kollisionen [Med00] als auch bei der *electron capture dissociation* (ECD) [Zub98, Zub00] von elektro-spray-generierten Ionen beobachtet werden. Da ISD-Spektren im positiven und negativen Ionenmodus sich kaum unterscheiden [Bro96], wird diskutiert, ob ISD-Reaktionen unabhängig von geladenen Stellen im Molekül stattfinden [Tak98], wie dies bei ECD der Fall ist. Die Ähnlichkeit mit ECD führte zu der Hypothese, daß die ISD-Reaktionen bei MALDI wie bei ECD ebenfalls durch Elektroneneinfang verursacht sein könnte, und daß der Elektroneneinfang auch zur Neutralisation von mehrfachgeladenen Vorläuferionen bei MALDI führt [Kar00].

### B.5. Neuere Entwicklungen: Andere Massenanalysatoren und API-MALDI

In den letzten Jahren hat es einige neue Entwicklungen in der MALDI-MS gegeben. Abgesehen von dem großen Bedarf für hohen Probendurchsatz zielen die meisten instrumentellen Neuentwicklungen darauf ab, durch Fragmentierungstechniken vermehrt Strukturinformationen zu erhalten. Bei der axialen MALDI-TOF-MS ist dies nur eingeschränkt möglich (PSD und ISD, s. vorhergehendes Kapitel).

Eine Möglichkeit dafür bietet die Kombination eines Quadrupolfilter mit einem TOF-Massenanalysator. Dabei wird eine orthogonale Anordnung verwendet (o-TOF), wodurch zusätzlich Differenzen der Anfangsenergie bzw. -geschwindigkeit der Ionen eine geringere Rolle spielen [Kru98, Lob00]. In einem solchen Aufbau können Ionen einer bestimmten Masse selektiert und dann stoßinduziert fragmentiert werden (*Collision Induced Fragmentation*, CID) [Bal01, Che01]. Es zeigt sich, daß dieser Ansatz durch die aus der Fragmentanalyse erhaltenen Sequenzinformationen in der Proteomanalyse eine große Rolle spielt [Gri01, Ver01]. Da diese Geräte für ESI entwickelt wurden und normalerweise beide Ionisationsmethoden an einem Gerät eingesetzt werden können, findet die MALDI-Ionisation dann unter erhöhtem Druck ( $\sim 10^{-2}$  Torr) in der ersten Druckstufe statt.

Ein großes Interesse besteht auch, MALDI bei noch höheren Druck (Atmosphärendruck) zu betreiben, womit die komplette Entkopplung von Ionisation und Ionenanalyse möglich würde und zudem aufwendige Schleusenverfahren hinfällig würden. Obwohl bereits MALDI bei Atmosphärendruck vorgestellt wurde [Lai00a, Lai00b], konnten bisher auf diese Weise nur Peptide, aber keine größeren Biomoleküle detektiert werden. Eine interessante Möglichkeit bietet die Kopplung einer MALDI-Quelle mit einer Ionenfalle, da hierdurch auch  $MS^n$ -Experimente möglich sind. Auch hier werden die MALDI-Ionen oft nicht im Hochvakuum erzeugt, sondern bei Atmosphärendruck oder leicht darunter. Obwohl die Kopplung mit einer *Quadrupol-Ionenfalle* (QIT) bereits früh beschrieben wurde [Sch93, Jon93, Qin96], fand sie aufgrund des eingeschränkten Massenbereichs und des ineffizienten Einfangs der schnellen MALDI-Ionen bisher kaum Anwendung. Kürzlich wurde allerdings eine verbesserte Kopplung vorgestellt, in der die Ionen vor dem Eintritt in die Ionenfalle durch Stöße mit Gasmolekülen gekühlt und durch Quadrupole fokussiert werden [Kru01]. Mittlerweile werden QIT mit einer AP-MALDI-Quelle, die bei Atmosphärendruck oder leichtem Vakuum arbeitet, auch kommerziell vertrieben. Eine Übersicht über jüngste Entwicklungen dieser Technik findet sich bei [Dor02].

Eine besonders hohe Auflösung wird mit der *Fourier-Transform Ionencyclotron-Resonanz* (FT-ICR) erreicht, bei der die Ionen mit Hilfe eines Magnetfeldes gespeichert werden und die massenabhängige Bewegung der gefangenen Ionen über Induktion als Frequenzsignal detektiert wird [Ams96, Mar98, Mar00]. Diese Geräte sind aber relativ aufwendig und teuer, und auch hier müssen die Ionen gekühlt und gefangen werden, bevor sie im Magnetfeld gespeichert werden können. Als Fragmentierungstechnik kann hier neben CID alternativ auch die *Electron-Capture-Dissociation* (ECD) [Zub98, Zub00] eingesetzt werden, mit der zu CID komplementäre Informationen erhalten werden können. Außerdem können mit Hilfe eines IR-Lasers gezielt CID-ähnliche Fragmentierungen induziert werden (*Infrared Multiphoton Dissociation*, IRMPD) [Lit94]. Sowohl Vorläufer- als auch Fragmentionen können mit einer sehr hohen Massenauflösung detektiert werden. Schwierig ist allerdings nach wie vor, Ionen mit hohem  $m/z$ -Verhältnis in der Ionenfalle einzufangen, wobei sich besonders die initiale Geschwindigkeit sowie die Geschwindigkeitsverteilung mit zunehmendem  $m/z$  ungünstig auswirken [Woo92]. Zudem nimmt mit steigendem  $m/z$  die Auflösung ab und die metastabile Fragmentierung zu, weswegen eine besonders schonende Desorption notwendig ist, die noch nicht für alle Analyten und für höhere



Massen möglich ist. Trotz dieser Schwierigkeiten wurden bereits sehr früh Kopplungen einer MALDI-Quelle mit FT-ICR vorgestellt [Cas92, Koe92 ].

Das weitgehende Fehlen mehrfachgeladener Ionen bei MALDI stellt vor allem für die FT-ICR-MS sowie für die QIT-MS eine wesentliche Begrenzung dar, da sowohl die Effizienz des Ioneneinfangs als auch die Auflösung mit steigender Masse abnimmt. Mehrfachgeladene Ionen wären aber auch für andere vorgestellte Techniken vorteilhaft. So ist die Detektion von (langsamen) Ionen hoher Masse im TOF-Analysator ineffizienter. Aber vor allem Fragmentierungstechniken sind mit einfachgeladenen Ionen weniger effektiv als mit mehrfachgeladenen. Eine bessere, aber auch aufwendige Möglichkeit zur stoßinduzierten Fragmentierung (CID) bietet die Kopplung von zwei TOF-Analysatoren hintereinander mit einer dazwischenliegenden Stoßzelle (TOF/TOF) [Med00]. Die Selektion der Vorläuferionen erfolgt durch einen *timed-ion-selector*, aber im Gegensatz zur LIFT-Technik [Fre00], bei der eine Analyse metastabiler PSD-Fragmente durch Nachbeschleunigung erfolgt, werden die Fragmentionen im TOF/TOF in der Kollisionszelle erzeugt (CID). Der große Vorteil dieser Methode liegt in der effizienteren Fragmentierung aufgrund der höheren Stoßenergien nach der ersten Beschleunigung.

### **C Modellvorstellungen zum Mechanismus der MALDI-MS**

Im Laufe der Jahre wurden eine ganze Reihe von Modellen und Interpretationen des MALDI-Phänomens publiziert. Trotz dieser Vielzahl von Untersuchungen und Erkenntnisse kam aber kein schlüssiges Bild zustande, daß alle zugrundeliegenden Mechanismen und Charakteristika von MALDI hinreichend erklären konnte. Dies lag wohl auch daran, daß eine Reihe von einzelnen Parametern unabhängig voneinander untersucht wurde und Querverbindungen zwischen einzelnen Erkenntnissen – z.B. zwischen Desorption und Ionisation - nicht immer beachtet wurden. Trotzdem bekommt man aus der Summe der vielen Untersuchungen einen Überblick über die wesentlichen Aspekte von MALDI, und natürlich muß jedes MALDI-Modell diese bekannten Tatsachen erklären können. Einige dieser Hauptmerkmale von MALDI sind:

- im Wesentlichen Bildung von einfachgeladenen Ionen
- sehr effektive Ionisation, aber positive und negative Spektren sind nicht komplementär
- großer Einfluß der Matrix und der Präparationsbedingungen auf die Spektren
- Unterdrückungseffekte (Analyt / Analyt und Analyt / Matrix)
- unterschiedliche Schwellbestrahlungsstärken für Neutralteilchen und Ionen
- hohe initiale Geschwindigkeit der Ionen
- Bildung von Addukten
- Fragmentierungen (PSD, ISD)

In den folgenden Kapiteln sollen die wichtigsten Erkenntnisse und Modelle zum MALDI-Mechanismus vorgestellt und dem "Cluster-Modell" gegenübergestellt werden. Die wesentlichen neuen Elemente dieses Modells sind die Verknüpfung von Clusterbildung und Ionisation sowie die Ladungsreduktion, doch schließt es auch viele vorhergehenden Erkenntnisse mit ein und baut auf ihnen auf.

## C.1. Analyteinbau

Eine grundlegende Eigenschaft von MALDI Matrices ist der Einbau von Analyten in die Kristallstruktur der Matrix. Dabei ist dieser Einschluß nicht nur für einen engen Kontakt mit den Matrixmolekülen nötig, sondern er sorgt auch für eine Separation der Analyte und deren Verteilung in Matrixkristall in einer Art "festen Lösung" (*solid solution*) [Bea93, Kar93a]. Man ging davon aus, daß die meisten Analyte beim Einbau in ungeladener Form in der Matrix vorliegen und als solche desorbiert werden [Ehr92], andere Möglichkeiten wurden zunächst nicht diskutiert und es gab dazu keine Untersuchungen. Der Analyteinbau selbst konnte aber schon recht früh für die Matrices 2,5-DHB und Sinapinsäure bestätigt werden [Str91, Bea93]. Schwieriger erwies sich die Frage, ob dieser Einbau auch eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche MALDI Analyse ist und wie die Analyte im Kristall bzw. in der polykristallinen Präparation verteilt sind. Einige grundlegende Untersuchungen dazu werden in den nächsten Kapiteln vorgestellt.

### C.1.1. Lokalisierung und Verteilung der Analyten im Matrixkristall

Zur Bestätigung des Analyteinbaus führten Strupat et al. einen einfachen Versuch durch [Str91]: Matrixlösungen (2,5-DHB) wurden mit Cytochrom C dotiert und das Verhältnis Matrix/Analyt spektroskopisch bestimmt. Danach wurden aus den Lösungen Einkristalle gezüchtet, die Oberflächen gewaschen und die Kristalle wieder aufgelöst. Die spektroskopische Untersuchung ergab, daß sich das Verhältnis Matrix/Analyt nicht verändert hatte und somit der Analyt im Kristall eingeschlossen gewesen sein mußte. Auch für Sinapinsäure konnte der Einbau von Proteinen in Einkristalle durch Zusatz von Coomassie anhand der charakteristischen Färbung der Kristalle nachgewiesen werden [Bea93]. Beavis und Bridson [Bea93] fanden zudem bei der Matrix Sinapinsäure, daß Analyte bevorzugt an der hydrophoben Oberfläche der Kristalle angelagert werden und sogenannte "*hourglass zones*" bilden. Bei 2,5-DHB wurden nur im Falle einer feldfreien Expansion von einer Kristallseite keine Ionen detektiert, während bei Anlegen einer Extraktionsspannung von allen Seiten Ionen detektiert werden und keine Diskriminierungen auftreten [Bök95]. Dies spricht eindeutig gegen einen bevorzugten Einbau in einer Kristallebene, und eine solche Vorzugsrichtung und damit eine Bindung durch hydrophobe Wechselwirkung konnte in der Folge auch in keinem weiteren Experiment bestätigt werden.

Aber selbst wenn bei einer langsamen Kristallisation Analyte in den Matrixkristallen gleichmäßig verteilt sind, muß dies für andere Präparationstechniken nicht zwangsläufig auch gelten. Es gibt eine Reihe Veröffentlichungen, in denen die Analytverteilungen in verschiedenen MALDI Präparationen und deren Morphologie mit optischen Methoden untersucht wurden. Viele Matrices ergeben Präparationen, deren Inhomogenität bereits mit bloßem Auge erkennbar ist. Meist entstehen am Rand größere Kristalle, während in der Mitte ein dünner Film oder polykristalline Bereiche vorherrschen. Abb. C.1.1.1 zeigt die Ansicht einer 2,5-DHB Präparation (*dried droplet*) durch ein Mikroskop, in der die unterschiedlichen Bereiche gut zu erkennen sind. Durch Phasenkontrast kann man verschiedene Bereiche der Präparation mit einem Lichtmikroskop besser sichtbar machen, und es zeigte sich, daß auch die Verteilung der Analyten meist nicht homogen ist [Dok91]. Der Einbau und die teilweise inhomogene Verteilung der Analyte konnte auch mit Hilfe der Raman-Spektroskopie [Cha92] und mit fluoreszierenden Analyten durch Einsatz der *confocal fluorescence microscopy* (CFM) bestätigt werden [Dai96, Yal98]. Dieser Befund ist im Einklang mit der Tatsache, daß auch von verschiedenen Regionen der Präparation erhaltene Massenspektren stark unterschiedlich sein können.



**Abbildung C.1.1.1** : MALDI-Präparation (dried droplet) mit der Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB).

Genauere Untersuchungen der Oberflächen sind mit Elektronenmikroskopie möglich (*scanning electron microscopy*, SEM). Die Korrelation der Ionenausbeute und -verteilung mit der Morphologie der Präparation wurde von verschiedenen Autoren mit Hilfe von SEM-Aufnahmen untersucht [Cha92, Per95, All96, Ama97]. Die Erscheinungsform der Kristalle wird dabei neben der Präparationsmethode auch durch Menge und Art des Analyten bestimmt, und fast immer sind bei Änderungen der Kristallmorphologie auch Unterschiede in den MALDI-Spektren zu finden. Eine homogene Präparation führt normalerweise auch zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Analyten und der Ionenintensitäten. Obwohl bei höherer Analytkonzentration meist größere Kristalle entstehen, konnte bei Matrix-Einkristallen nach Analytzugabe keine Veränderung der Kristallstruktur festgestellt werden [Bea93, Str97]. Da der Analyt üblicherweise in starker Verdünnung vorliegt, liefert er bei der Röntgenstrukturanalyse keine Signale, aber auch eine Aufweitung oder Veränderung der Kristallstruktur des "Wirtskristalls" wurde nicht beobachtet.

Um die Intensitätsverteilung der Ionen bildlich darzustellen, kann die Probenoberfläche mit SIMS [Han99] oder mit einer Laser-Mikrosonde [Spe94] abgerastert werden, und man erkennt auf diesen Bildern gut die unterschiedliche Verteilung von Analyt- und Natriumionen. Ein solches Abrastern der Probenoberfläche ist prinzipiell auch mit einem kommerziellen Gerät möglich [Gar00], aber gerade für den Einsatz der scannenden Mikrosonde für MALDI mit einer hohen Auflösung ( $< 1 \mu\text{m}$ ) sind erst in den letzten Jahren die instrumentellen Voraussetzungen wie optimale Fokussierung oder exakte Positionierung der Probe geschaffen worden [Spe02].<sup>10</sup> Durch die verbesserte Auflösung ist auch eine genauere Lokalisierung von Molekülen in der MALDI-Präparation möglich. Zusätzlich wird durch die stärkere Fokussierung des Lasers mehr Material abgetragen, so daß auch Informationen aus dem Inneren der Kristalle gewonnen werden können. Der Einbau von Analyten in Matrixkristalle sowie der Ausschluß von Natrium-Ionen wurde durch diese Untersuchungen bestätigt [Spe02]. Zusätzlich kann man bei *dried droplet* Präparationen gut erkennen, daß protonierte Analyte bevorzugt aus großen Kristallen detektiert werden, während kationisierte Analyte im feinkristallinen Zentrum gebildet werden. Eine Übersicht über Möglichkeiten und Limitierungen beim Einsatz von SIMS und MALDI zum Abrastern von Probenoberflächen (*ion imaging*) findet sich bei Todd et al. [Tod01].

### C.1.2. Einflüsse bei der Probenpräparation auf die Kristallisation

Besonders entscheidend für das Ergebnis einer MALDI-MS-Analyse sind die Bedingungen bei der Probenpräparation. Während sich viele Publikationen auf die (meist empirische)

<sup>10</sup> Eine noch höhere Auslösung ist durch eine Nahfeld-Optik mittels Glasfaser möglich [Stö01].

Optimierung der Präparation für bestimmte Anforderungen und Analytklassen konzentrieren, gibt es auch eine Reihe von Versuchen, Einflußfaktoren systematisch zu untersuchen. Dabei sind die Ergebnisse nicht ohne Widerspruch, und es scheint schwierig zu sein, die Ursachen für bestimmte Effekte eindeutig zuzuordnen. Die meisten Untersuchungen betreffen Parameter, die letztendlich bei der Kristallisation eine Rolle spielen. Da aber die Kristallisation von sehr vielen Parametern beeinflußt wird, ist nicht immer eine eindeutige Zuordnung von Ursache und Wirkung möglich. Einige wichtige Untersuchungen und Erkenntnisse sollen dennoch im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Bereits die Zusammensetzung der Lösung vor der Kristallisation ist ein entscheidendes Kriterium. Cohen und Chait fanden Diskriminierungen von Analyten abhängig von der verwendeten Lösungsmittelzusammensetzung und der Geschwindigkeit der Kristallisation [Coh96]. Dabei spielt sowohl das verwendete Lösungsmittel als auch der pH-Wert (bzw. die Art des Säurezusatzes) eine große Rolle. Cohen und Chait folgerten, daß es je nach Art der Präparation in unterschiedlichem Maße zu einer Art chromatographischen Trennung bei der Kristallisation kommen müsse. Eine schnelle Kristallisation fördert demnach den Analyteinbau, wohingegen bei langsamer Kristallisation kleine Analyte ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen zur Rolle des Lösungsmittels wurden von Börnsen et al. [Bör97] sowie von Yalcin et al. [Yal98] veröffentlicht. Auch diese Autoren führten die Effekte im Wesentlichen auf die Verteilung und den unterschiedlichen Einbau der Analyte bei der Kristallisation zurück, wobei vor allem eine Präzipitation der Analyte verhindert werden muß. Ein interessantes Beispiel für den Einfluß der Präparation auf die MALDI-Analyse ist von Cadene und Chait gegeben worden [Cad00]. Diese verwendeten für  $\alpha$ CHCA statt der üblichen Lösungsmittel (Acetonitril/wäßrige TFA oder Aceton) eine Mischung aus Ameisensäure, Wasser und Isopropanol und konnten damit eine erhebliche Verbesserung bei der Analyse von Proteinen und vor allem Membranproteinen erreichen (höhere Auflösung, geringere Fragmentierung).

Figuroa et al. [Fig98] untersuchten den Einfluß des Wassergehalts und fanden ein Optimum bei 30 bis 50 % Wasser für die Analyse von Peptiden, was sie auf Änderungen der Oberflächenspannung zurückführten. Sie fanden darüber hinaus ebenfalls einen großen Einfluß der Kristallisationsgeschwindigkeit, und folgerten das beide Effekte auf Unterschiede beim Analyteinbau zurückzuführen sind, wobei unter anderem auch die Solvation der Analyten eine Rolle spielt. Allerdings gibt es in jüngster Zeit auch einige Protokolle, die auf Lösungsmittel ganz verzichten und sowohl Analyt als auch Matrix in fester Form verreiben [Prz00, Ske00, Tri01, Wan01]. (Zur Relevanz des Lösungsmittelinbaus s. Kap. C.1.3).

Natürlich beeinflussen auch alle anderen in Lösung vorhandenen Spezies die Kristallisation und somit die MALDI-Analyse. Die häufigsten in biologischen Proben vorkommenden Substanzen sind Salze, Puffer und Detergentien. Obwohl MALDI relativ unempfindlich gegen Verunreinigungen ist, bringen Salze - und oft auch andere Verbindungen - in höherer Konzentration meist Verlust an Auflösung und Intensität mit sich, besonders im Falle von stark sauren Analyten wie Oligonukleotiden [Sha96, Dub96] (Methoden zur Aufreinigung s. Kap. B.2.2). Im Gegensatz dazu profitieren unpolare Verbindungen, die kationisiert werden, von einem Salzzusatz, zumindest solange die Salzkonzentration unterhalb der Matrixkonzentration bleibt. Die Notwendigkeit für Salzzugaben steigt mit der Analytmasse [Dog96], vermutlich sinkt in gleichem Maße die Kationisierungseffizienz. Hoberg et al. fanden, daß für die Effizienz der Kationisierung auch das Anion eine Rolle spielt [Hob98]. Dabei sind Iodide effektiver als Bromide und diese wieder besser als Chloride. Der Effekt von verschiedenen Puffern wurde von Yao et al. beschrieben [Yao98], wobei neben Art und Konzentration des verwendeten Puffers zusätzlich das Matrix/Analyt-Verhältnis eine entscheidende Rolle spielt: Bei großem Matrixüberschuß gelang es eher, trotz hoher

Pufferkonzentration noch aussagekräftige Spektren zu erhalten. Eine höhere Toleranz gegenüber Puffern kann mit Isopropanol als Lösungsmittel [Bör97] bzw. durch die bereits erwähnte Präparation von Cadene und Chait mit wäßriger Ameisensäure und Isopropanol erreicht werden [Coh96, Cad00]. Aber auch oberflächenaktive Substanzen haben einen erheblichen Einfluß, wobei je nach Art des Detergens mehr oder weniger Probleme auftreten [Ros95]. Detergentien müssen aber nicht in jedem Fall störend wirken, sondern können auch die Qualität der Spektren erhöhen, besonders wenn dadurch schlecht lösliche Analyte bis zur Kristallisation in Lösung gehalten werden können [Bör97, Bre00]. Auch Diskriminierungseffekte können durch Zusatz von nichtionischen Detergentien vermindert werden [Coh96]. Da die Löslichkeit und auch der Einschluß der Analyten im Matrixkristall eine große Rolle spielt, ist auch die Polarität der Analyte ein wesentlicher Faktor [Ama97]. Vielfach ist eine MALDI-Analyse dann schwierig, wenn es sich um sehr unpolare Verbindungen handelt, weswegen auch für technische Polymere oder Membranproteine besondere Präparationstechniken nötig sind. Eine höhere Löslichkeit und damit eine bessere Cokristallisation läßt sich auch durch Temperaturerhöhung erreichen [Bir02]. Daneben spielen eine Reihe weiterer Faktoren eine Rolle, unter anderem auch die Sekundärstruktur von Proteinen [Wen98].

Da mit MALDI in der Regel protonierte oder deprotonierte Moleküle detektiert werden, kommt der Säure-Base-Chemie eine weitere zentrale Rolle zu. Viele Untersuchungen beziehen sich allerdings auf Gasphasen-Reaktionen, da der Protonentransfer in der Gasphase ein wichtiger Punkt vieler MALDI-Theorien ist. (s. Kap. C.3.2.2) Aber es gibt auch einige Hinweise, daß Protonentransfer bereits in kondensierter Phase erfolgt. Der pH-Wert ist nicht nur in Bezug auf die Analyten von Bedeutung, sondern er bestimmt auch, in welcher Form die Matrix vorliegt. Es hat sich gezeigt, daß Substanzen nur in ihrer elektrisch neutralen Form als Matrix wirken und diese Eigenschaft normalerweise durch (De-)Protonierung und Bildung von Salzkristallen verloren geht [Dog96]. Interessanterweise fanden Cohen und Chait, daß ein niedrigerer pH-Wert die Detektion von Analyten höherer Masse erleichtert, wobei der Effekt bei Ameisensäure besonders stark ausgeprägt war [Coh96]. Neben dem allgemeinen Einfluß des pH-Werts wurden besonders die Säure-Base-Eigenschaften von Matrices [Dog96, Gim97] und Analyten [Ama97] untersucht, wobei im positiven Ionenmodus erwartungsgemäß basischere Analyten besser detektiert werden.

### **C.1.3. Relevanz des Analyteinbaus und der Kristallisation für den MALDI-Prozeß**

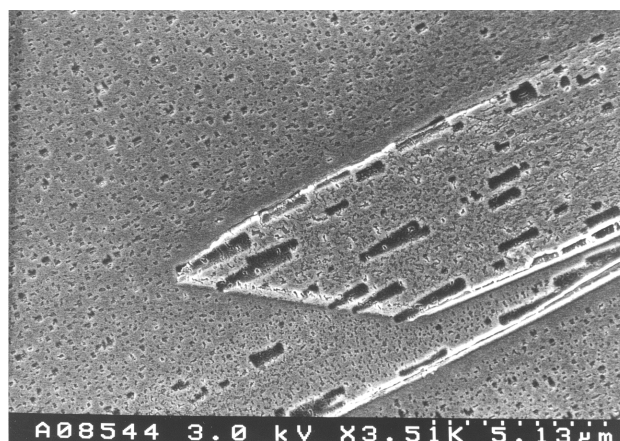
Obwohl der Einschluß und die Isolierung von Analytmolekülen im Matrixkristall zunächst als notwendige Bedingung für eine erfolgreiche MALDI Analyse angesehen wurde, kamen mit der Zeit Zweifel daran auf. Mit der Etablierung der Dünnschichtpräparation [Vor94] war klar, daß eine gemeinsame Kristallisation von Matrix und Analyt nicht unbedingt notwendig ist. Ob bei dieser Technik allerdings die obere Matrixschicht unter Einschluß des Analyten rekristallisiert wird oder ob der Analyt auf der Oberfläche adsorbiert wird bzw. auskristallisiert, bleibt unklar.

Auch vergleichende Experimente mit Matrix-Isomeren nährten Zweifel an der Allgemeingültigkeit des Analyteinbaus. Horneffer et al. untersuchten Isomere der Dihydroxybenzoesäure, und fanden, daß nur 2,4-DHB und 2,5-DHB Analyten nahezu quantitativ einbauen [Hor99, Hor01]. Diese Isomere ergeben auch die besten Spektren, 2,4-DHB absorbiert allerdings kaum bei 337 nm (die Experimente wurden bei 308 nm durchgeführt). Trotzdem wurden auch mit anderen Isomeren teilweise Analytsignale detektiert, wenn auch mit geringerer Intensität und mit schlechterer Spektrenqualität. Dünne Matrixschichten ergaben in diesen Fällen die intensivsten Signale, was auf eine mögliche Adsorption an der Oberfläche hindeutet.

In den letzten Jahren wurden einige Protokolle vorgestellt, in denen durch gründliche Mischung von fester Matrix und Analyt ohne Zusatz von Lösungsmitteln MALDI Spektren erhalten werden konnten [Prz00, Ske00, Tri01, Wan01]. Bisher wurden vor allem schwerlösliche Polymere

auf diese Weise analysiert, und es konnten auch schon kleinere Biomoleküle bis etwa  $m/z$  6000 detektiert werden. Eine generelle Anwendbarkeit dieser Protokolle steht aber noch aus, und es ist nicht klar, ob nicht bei sehr fein gemahlener Pulvern eine Kondensation von Wasser aus der Luft oder Hydratwasser des Analyten für eine Rekristallisation ausreicht. Trotzdem ist auch denkbar, daß bei sehr kleinen Partikeln ein inniger Kontakt zwischen Matrix und Analyt ausreicht, um eine Desorption und Ionisation zu ermöglichen. Untersuchungen zum Lösungsmiteleinschluß in Matrixkristallen werden im Ergebnisteil vorgestellt.

Bei Untersuchungen von Matrixkristallen mit SEM wurden außerdem bei der Matrix 2,5-DHB Kristalldefekte entdeckt [Hor03]. Diese regelmäßig geformten Löcher haben Kantenlängen von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern, wobei sowohl eine schnelle Kristallisation als auch ein Analytzusatz zu kleineren, aber zahlreicheren Kristalldefekten führen (s. Abb. C.1.3.1). Mit zunehmender Analytmasse setzt sich diese Tendenz fort. Die Autoren interpretierten die Defekte als Einschlüsse von restlichem Lösungsmittel (*liquid inclusions*). Da aber auch 2,6-DHB solche Einschlüsse zeigt, andererseits aber Analyte nicht in 2,6-DHB-Kristalle einbaut werden, schlossen die Autoren, daß diese Flüssigkeitseinschlüsse nicht der Grund für den Analyteinbau sein können, sondern ein direkter Einbau in die Kristallstruktur erfolgt.



**Abbildung C.1.3.1** : SEM-Aufnahmen eines 2,5-DHB-Kristalls (Innenseite nach Spaltung) dotiert mit Rinderserum Albumin (BSA) (reproduziert aus [Hor03]).

Kürzlich wurden einige ionische, flüssige Matrizes vorgestellt [Arm01]. Flüssige Matrizes wie z.B. Glycerin sind zwar bekannt und werden für IR-MALDI und FAB eingesetzt, aber normalerweise können aus Matrix-Salzen keine MALDI Spektren erhalten werden, sondern es müssen Molekülkristalle vorliegen [Ehr92]. Auch die frühen Matrizes 3-Nitrobenzylalkohol und Nitrophenyloctylether sind Flüssigkeiten [Kar87]. Die vorgestellten flüssigen, ionischen Matrizes sind aber fast alle Alkylammonium- oder Pyridinium-Salze von bekannten Matrizes, und da bei der Präparation immer Säuren zugegeben wurde, muß man von einer partiellen Neutralisation ausgehen. Das Resultat wäre eine normale (aber flüssige) MALDI Präparation mit Zusatz eines Ammoniumsalzes. Neue Indizien für die Notwendigkeit einer kristallinen Struktur wurden von Bauer et al. veröffentlicht [Bau02]. Sie benutzten Tri- $\alpha$ -naphthylbenzen als Matrix, das oberhalb von 68 °C in den Glaszustand übergeht. Oberhalb des Glaspunktes konnten keine Spektren von Polystyrol mehr erhalten werden, erst durch Rekristallisation mit 1-Butanol war eine erneute MALDI-Analyse möglich, wobei sich außerdem Polystyrol-Aggregate bildeten. Obwohl es sich nicht unbedingt um eine repräsentative Matrix/Analyt-Kombination handelt, stehen die Beobachtungen im Einklang mit der Praxis. Häufig erhält man auch mit gängigen Matrizes

besonders dann schlechte oder gar keine Spektren, wenn die Probe stark verunreinigt ist und nicht richtig auskristallisiert.

Um den Einfluß der Kristallisation näher zu untersuchen, führten Glückmann et al. eine Reihe von Untersuchungen mit verschiedenen Präparationstechniken mit klar und eindeutig definierten Parametern durch [Glü01]. Dabei zeigte sich, daß bei konsequentem Ausschluß von Lösungsmitteln und Vermeidung einer Rekristallisation keine oder nur sehr schwache Signale von Peptiden und Proteinen detektiert werden können. Dazu wurden Preßlinge aus Analyt- und Matrix-Pulver hergestellt oder die Analyten wurden auf eine dünne Matrixschicht mittels nano-Elektrospray gesprüht. In letzterem Fall wurde die Größe der Kapillarenöffnung so klein gewählt, daß das Lösungsmittel auf dem Weg zum Probeneller verdampft, so daß eine molekulare Verteilung der Analyte auf der Matrixoberfläche entsteht ("trockenes" Nanospray). In beiden Fällen konnte durch Zugabe von Lösungsmittel auf die Oberfläche und anschließender Rekristallisation das gewohnte intensive MALDI-Signal wiederhergestellt werden. Allerdings gilt dieser Befund nicht für alle Analyten gleichermaßen. Neutrale Oligosaccharide waren nahezu mit allen Präparationsmethoden mit hohen Intensitäten zu detektieren. Lediglich Einkristalle, die gründlich gewaschen wurden, führten zu sehr geringen Signalintensitäten, was auf fehlende Metallkationen (insbesondere Natrium) zur Ionisation zurückzuführen sein dürfte. Es ist bekannt, daß in Spektren von 2,5-DHB-Einkristallen nahezu keine Natrium-Ionen detektiert werden, auch wenn diese in der Lösung als Verunreinigung enthalten sind [Bök95]. Insgesamt wurde klar, daß für einige (kationisierte) Analyte keine Co-Kristallisation nötig ist, während die Notwendigkeit zur Inkorporation für protonierte Analyte bestätigt wurde. Eine sorgfältige Differenzierung zwischen diesen Fällen scheint somit unabdingbar für eine klare und eindeutige Interpretation der zugrunde liegenden Mechanismen zu sein. Auf die möglichen Unterschiede bei der Desorption und Ionisation wird in den Kapitel C.3 näher eingegangen.

Abgesehen von einer Separierung der Analyte könnte dem Analyteinbau noch eine weitere, wesentliche Bedeutung zukommen, und zwar dann, wenn ein Einbau in ionischer Form erfolgt. Dies würde bedeuten, daß präformierte Ionen in der Matrix vorliegen und eine Ionisation auch über eine Freisetzung dieser Ionen bzw. über eine Ladungstrennung erfolgen kann (s. Kap. C.3.1.3). Bei diesem Mechanismus müßten aber trotzdem bei fast allen Analyten sekundäre Reaktionen wie z.B. Protonentransfer stattfinden, da sonst die gebildeten, einfach geladenen Ionen nicht erklärbar sind. Metallkationen können nur als Ionen eingebaut werden, und auch bei quaternären Verbindungen wie Ammonium- oder Phosphoniumionen ist eine Deprotonierung in Lösung nicht möglich. Daher wurde für die Bildung von kationisierten Molekülen –neben Gasphasenreaktionen– schon früh die Freisetzung präformierter Ionen postuliert [Nel91, Leh97, Won97]. Saure oder basische Gruppen können dagegen leicht durch Protonentransfer neutralisiert werden. Obwohl es bereits Vermutungen gab, daß einige Analytklassen protoniert bzw. deprotoniert und damit geladen im Kristall vorliegen könnten [Zhu95], gab es dazu bisher noch keine Untersuchungen. Für den Einbau von Ionen bzw. Ionenpaaren spricht auch die Detektion einer ganzen Reihe von Addukten und nichtkovalenten Komplexen, die nur durch ionische Wechselwirkungen hinreichend zu erklären sind (s. Kap. C.3.3).

Ein weiteres starkes Indiz wurde von Horneffer et al. publiziert [Hor01]: Diese untersuchten den Analyteinbau mit CLSM (*confocal laser scanning microscopy*) und derivatisierten dazu Proteine mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC). Die Fluoreszenz der im Kristall eingebauten Fluoreszeinderivate wurde stark gequencht, was sich durch eine Protonierung der Fluoreszeinreste erklären läßt. Es ist bekannt, daß nur die Anionen stark fluoreszieren, während das neutralisierte Fluoreszein keine Fluoreszenz zeigt [Sjö95]. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde die Fluoreszenz des nicht protonierbaren Fluoreszenzfarbstoffes Texas Red nicht gequencht.



## C.2. Desorption / Ablation

Bei MALDI werden durch den Laserpuls Neutralteilchen und Ionen in die Gasphase überführt. Mit verschiedenen Ansätzen wurde versucht, den Mechanismus der Desorption aufzuklären. Dazu zählen die Korrelation der Desorption mit Laserparametern, die Untersuchung der Kristalloberfläche nach dem Laserpuls sowie Computersimulationen, die vor allem für energetische und molekulardynamische Betrachtungen hilfreich sind. In jüngster Zeit erwies sich außerdem, daß die initiale Geschwindigkeit der Ionen ein guter Parameter zur Beschreibung und Charakterisierung des MALDI-Prozesses ist. Die MALDI-Desorption wurde schon früh durch das sehr einfache, qualitative Bild einer vulkanartigen Eruption beschrieben, die durch die in sehr kurzer Zeit akkumulierte hohe Energiedichte zustande kommt [Hil90]. Fraglich ist aber, ob es sich dabei um thermische und/oder mechanische Prozesse handelt, und in wie weit thermodynamische oder kinetische Aspekte eine Rolle spielen. Im Laufe der Zeit wurden einige Modelle zur Desorption bzw. Ablation bei MALDI entwickelt, die im letzten Abschnitt dieses Kapitels kurz vorgestellt werden. Ein Übersichtsartikel zum Desorptionsprozeß bei MALDI wurde kürzlich veröffentlicht [Dre03].

### C.2.1. Schwellbestrahlung und Einfluß von Laser-Parametern

Eine wesentliche Eigenschaft von MALDI ist, daß erst ab einer bestimmten Schwellbestrahlungsstärke (*threshold irradiance* [ $\text{W}/\text{cm}^2$ ]) Ionen detektiert werden. Die dazu benötigte Bestrahlungsstärke ist umgekehrt proportional zum Absorptionskoeffizienten der Matrix bei der gegebenen Wellenlänge und liegt in der Größenordnung  $10^6$ - $10^7$   $\text{W}/\text{cm}^2$  [Ens91, Kar93a, Kar96]. Oberhalb dieser Schwelle steigt die Ionenintensität bis zu einer durch Sekundäreffekte (Fragmentierung) verursachten Sättigung steil an [Dre95]. Die Schwelle liegt zudem bei niedrigeren Temperaturen höher [Ehr95].

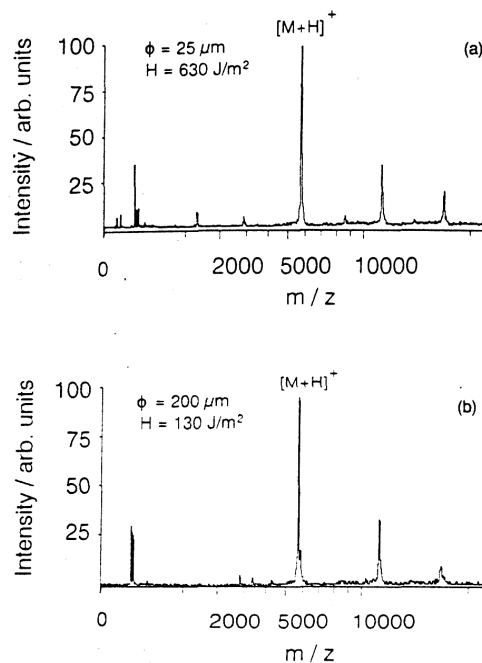
Solange die Pulsdauer kurz genug ist um einen Energieverlust durch Wärmeleitung zu verhindern, spielt sie in der UV-MALDI nur eine untergeordnete Rolle [Dem92, Dre96]. Daher wird meist nicht die Bestrahlungsstärke, sondern die auf den gesamten Puls bezogene Bestrahlung bzw. Energiedichte (*fluence* [ $\text{J}/\text{cm}^2$ ]) als signifikanter Parameter angegeben. Die Größen lassen sich jedoch bei bekannter Pulsdauer ineinander umrechnen. Der entscheidende Laserparameter scheint somit die absolute Energiemenge pro Fläche bzw. Volumen zu sein, während die Zeit dabei kaum einen Rolle spielt. Nur extrem kurze Pulsdauern können aufgrund von nicht-linearen Mehrphotonenprozessen zu einer höheren Schwellbestrahlungsstärke führen. Bei optimalen Einstellungen liegt die Peakbreite am Detektor und damit die Auflösung (ohne DE) in der Größenordnung des Laserpulses [Ing94]. Bei zu hoher Laserenergie kommt es, vermutlich durch Ablation größerer Volumina, zu mehr Stößen und dadurch zu einer stärkeren Fragmentierung und einer schlechteren Auflösung.

Schon durch die ersten MALDI-Experimente war bekannt, daß eine genügend hohe Absorption der Matrix notwendig ist und somit die Wellenlänge auf eine Absorptionsbande abgestimmt werden muß [Kar85]. Eine geringere Absorption bei gegebener Wellenlänge führt daher zu einer höheren Schwellbestrahlung, bei der Ionen detektiert werden können. Dagegen sollte der Analyt möglichst nicht bei dieser Wellenlänge absorbieren, da die elektronische Anregungsenergie in Vibrationsfreiheitsgrade umgewandelt wird, woraus Fragmentierungen resultieren können. Da viele organische Moleküle unterhalb 300 nm absorbieren, sind bei 266 nm stärkere Fragmentierungen zu erwarten als bei Wellenlängen über 300 nm. Dies ist aber nicht generell der Fall, vielmehr scheint der Fragmentierungsgrad in erster Linie matrixspezifisch zu sein, was vermutlich mit der starken Verdünnung und den meist wesentlich geringeren Absorptionskoeffizienten der Analyte zusammenhängen dürfte. Für eine Detektion von Analytionen

ist in erster Linie eine genügend hohe Absorption der Matrix und damit die Laserschwelle wesentlich. Chen et al. konnten bei Experimenten mit einem durchstimmbaren Laser bei höheren Wellenlängen (360-450 nm) unterhalb eines Absorptionskoeffizienten von  $6 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$  keine Ionen mehr detektieren [Che98]. Daraus resultiert ein Energieeintrag von mindestens  $8 \text{ kJ/cm}^3$  in der obersten Matrixschicht, bei einer Eindringtiefe von 10 nm entspricht das  $12 \text{ }\mu\text{J}$  für die angegebene Bestrahlungsfläche von  $0,15 \text{ mm}^2$  (übliche Pulsenergien liegen im  $\mu\text{J}$  Bereich). Oberhalb dieser Schwelle fanden sie jedoch bei gleichem Energieeintrag keine Abhängigkeit von der Wellenlänge.

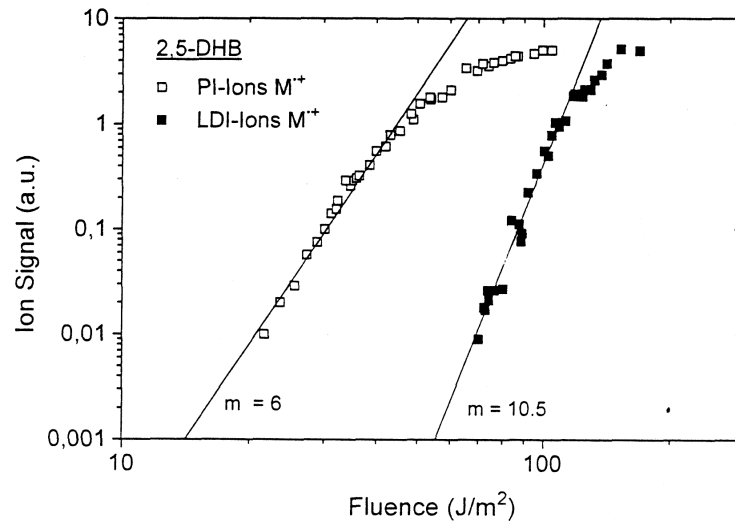
Die Quantenausbeute der Lumineszenz beträgt je nach Matrix zwischen 0.002 und 0.2, so daß fast die gesamte Laserenergie in Form von Phononen (Vibrationen) in das Kristallgitter übertragen wird und zur Desorption/Ionisation beiträgt [Ehr95, All00]. In dünnen Matrixfilmen ist die Quantenausbeute deutlich höher, aber die Absorptionskoeffizienten unterschieden sich kaum von denen in Lösung [All96a, All97]. Die Absorption kann bei nicht zu hoher Laserenergie (lineare Absorption) in erster Näherung mit dem Lambert-Beerschen Gesetz wiedergegeben werden. Je nach Ansatz wurde die absorbierte Energie pro Molekül zu 0,2 bis maximal 10 eV (bei Mehrphotonen-Absorption) berechnet [Dre95, Kar96]. Daraus resultieren Eindringtiefen im Bereich von wenigen Nanometern bis maximal 300 nm, die somit wesentlich kleiner sind als der Durchmesser des Laserfokus (je nach Fokussierung 10-200  $\mu\text{m}$ ).

Es zeigt sich jedoch ein starker Einfluß der bestrahlten Fläche: Bei stärkerer Fokussierung des Lasers resultiert eine höhere Schwellbestrahlungsstärke [Ing94, Dre95]. Trotz stark unterschiedlicher Pulsenergie unterscheiden sich die resultierenden Spektren nur wenig (s. Abb. C.2.1.1). Wird dagegen die Laserenergie bei gleichbleibendem Fokus erhöht, so führt dies ab etwa 3- bis 4-facher Schwellbestrahlungsstärke zu einer starken Fragmentierung. Allerdings besteht keine lineare Beziehung zwischen der Fläche und der Ionenintensität. Man kann vermuten, daß bei kleinerem Fokus die Eindringtiefe durch die höhere Photonendichte ansteigt, so daß die Energie pro Volumen die entscheidende Größe ist.



**Abbildung C.2.1.1** : Vergleich von MALDI-Spektren (Rinderinsulin mit 2,5-DHB als Matrix) bei verschiedenen Laserfoki. Beide Spektren sind knapp über der Schwellbestrahlung aufgenommen (Reproduziert aus [Dre95])

Matrixmoleküle (sowohl  $[M+H]^+$  als auch Radikationen) werden oft schon bei etwas geringerer Laserenergie detektiert als Analyte, aber sie zeigen eine ähnliche Abhängigkeit der Ionenintensität von der Bestrahlungsstärke [Dem92, Dre95]. Durch Nachionisations-Experimente wurde zudem festgestellt, daß unterhalb der Schwelle für die Matrixionen bereits Neutralteilchen desorbiert werden, deren Zahl aber bei Steigerung der Laserintensität etwas weniger steil ansteigt als die der Ionen (s. Abb. C.2.1.2) [Spe88, Dre95].



**Abb. C.2.1.2 :** Abhängigkeit der Ionenintensität von der Laserbestrahlung (fluence) für direkt gebildete MALDI-Ionen (LDI-Ions) und nachionisierte Neutralteilchen (PI-Ions). (Reproduziert aus [Dre95])

Es gibt also für Neutralteilchen und Ionen unterschiedliche Schwellbestrahlungsstärken, die Schwelle für die Ionen ist dabei etwa um den Faktor 3-4 höher als die für Neutralteilchen. Man stellte außerdem fest, daß die ermittelten absoluten Schwellen deutlich schwanken und stark von instrumentellen Parametern abhängen (z.B. Sensitivität, IONENTRANSMISSION, Laserfokussierung oder Beschleunigungsspannung), so daß Zweifel an einer echten physikalischen Schwelle aufkamen. Durch Experimente mit Einzelionendetektion konnten auch bei Laserenergien, die etwa zwei Größenordnungen unter der Schwellbestrahlungsstärke bei der analogen Ionendetektion lagen, noch MALDI-Ionen nachgewiesen werden [Wes02]. Die Autoren fanden zudem die gleiche Abhängigkeit der Ionenintensität von der Bestrahlungsstärke wie bei höheren Laserenergien. Dies bedeutet, daß die Schwelle entweder wesentlich niedriger liegt als angenommen oder daß gar keine echte, physikalische Schwelle für die Ionenbildung besteht, sondern nur eine Schwelle für die (analoge) Ionendetektion existiert.

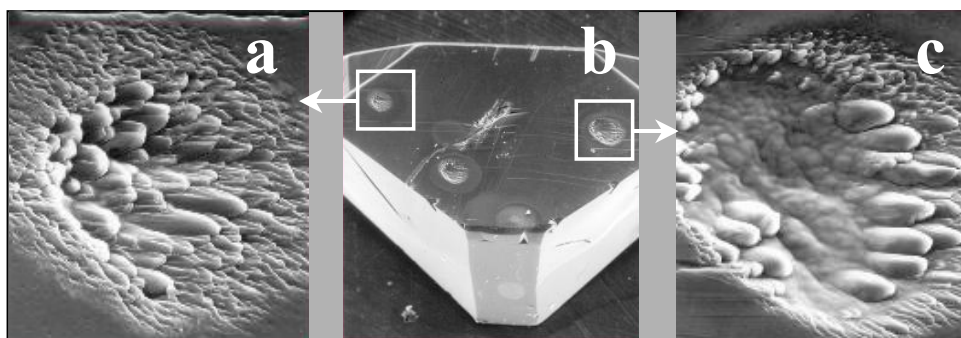
Bei orthogonal angeordneten TOF-Systemen findet man zudem einen wesentlich geringeren Einfluß der Laserbestrahlung, und es können wesentlich höhere Laserenergien pro Fläche verwendet werden [Kru98, Lob00]. Dies macht deutlich, daß die engen Grenzen der Laserbestrahlung bei der axialen MALDI-TOF-MS hauptsächlich von sekundären Effekten, wie Fragmentierungen durch Stöße, und weniger durch die direkte Anregung durch den Laser verursacht werden. Zusätzlich spielt die Wahl der Matrix eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Anregung (s. auch Kap. B.4.1).

### C.2.2. Untersuchungen von Matrixkristall-Oberflächen nach der Laser-Bestrahlung

Die Kristalloberfläche nach dem Laserbeschuß kann gut elektronenmikroskopisch untersucht werden. Einzelne Laserpulse bei Schwellbestrahlung sind auf der Oberfläche aber kaum zu erkennen, erst bei höherer Energie oder nach Aufsummieren einer großen Zahl Laserpulse erkennt

man Veränderungen an der Kristalloberfläche. Auf SEM Aufnahmen von Einkristallen sind deutliche Spuren von explosionsartigen Eruptionen zu erkennen, die die einfache Modellvorstellung einer vulkanartigen Explosion stützen [Str91]: um einen Krater in der Mitte gibt es meist einen Bereich, in dem Risse und Unregelmäßigkeiten der Oberfläche zu erkennen sind. Darum findet man teilweise Ablagerungen, augenscheinlich ist in Regionen außerhalb des Laserfokus Matrix kondensiert. In unmittelbarer Nähe des Kraters werden auch wellenartige Strukturen sichtbar, die eine Art Schockwelle durch die (evtl. geschmolzene) Kristalloberfläche nahelegen [Kam97, Fou01, Fou02]. Abb. C.2.2.1 zeigt Aufnahmen eines Einkristalls von  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycimtsäure ( $\alpha$ CHCA) nach einigen tausend Laserpulsen. In der Vergrößerung erkennt man gut die Wellenstruktur der Oberfläche, und bei Laserenergien oberhalb der Schwellbestrahlungsstärke ist ein tiefer Krater zu erkennen.

Die Intensität der Kraterbildung hängt stark von der Fokussierung des Lasers und der Laserenergie ab. Unterhalb der Schwellbestrahlungsstärke wird nahezu kein Material abgetragen, während die Krater bei sehr hoher Laserbestrahlung schon unter dem optischen Mikroskop sichtbar werden. Diese Beobachtung stützt die These, daß eine stärkere Fokussierung zu einem tieferen Eindringen des Lasers in den Kristall mit stärkerem Materialabtrag führt und somit der Energieeintrag pro Volumen einen entscheidenden Parameter darstellt. Anhand der Kratergröße ( $\sim 50 \times 0,5 \mu\text{m}$  bei 10 Laserschüssen, Focus =  $50 \mu\text{m}$ ) kann man abschätzen, daß selbst bei hohen Laserintensitäten nur etwa  $100 \mu\text{m}^3$  Material pro Schuß abgetragen werden [Str91]. Sadeghi und Vertes fanden, daß die Menge des desorbierten Materials von der Kristallgröße abhängt und das kleine Kristalle durch den Laserpuls ganz abgetragen werden können [Sad98].



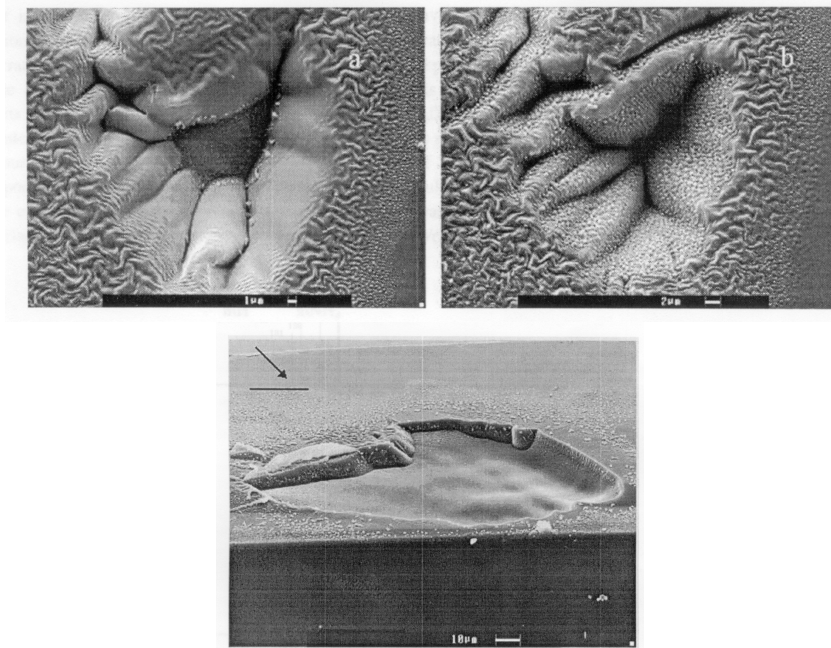
**Abbildung C.2.2.1** : SEM Aufnahmen eines  $\alpha$ CHCA-Einkristalls nach Bestrahlung mit einem  $\text{N}_2$ -Laser. a: 1000 Laserpulse bei Schwellbestrahlungsstärke, b: Gesamtansicht des Kristalls, c: 2000 Laserpulse oberhalb der Schwellbestrahlungsstärke.

(Reproduziert aus [Fou01])

Verschiedene Autoren beobachteten, daß nach einigen Laserschüssen die Ionenintensität stark abnahm, und führten dies auf die Zerstörung der Oberfläche und photochemische Veränderungen der Matrix (Decarboxylierung) zurück [Hut91, Qui94, Wes94, Wes95]. Fournier et al. konnten zeigen, daß eine hohe Ionenintensität im Falle von Sinapinsäure als Matrix durch Laserpulse hoher Energie wiederhergestellt werden kann (Hysterese-Effekt), vermutlich weil so eine neue Oberfläche geschaffen wird [Fou97]. Diese Hypothese konnte kürzlich mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen erhärtet werden: nach einigen hochenergetischen Laserschüssen entstand am Grunde des Kraters erneut eine glatte Oberfläche, wo vorher eine stark strukturierte Oberfläche mit kleinen Kristalliten zu erkennen war [Fou02] (s. Abb. C.2.2.2).

Die Bildung der strukturierten Oberfläche konnte auf eine Decarboxylierung der Matrix zurückgeführt werden, indem diese Schicht abgetrennt und mit CI-MS (chemische Ionisation)

untersucht wurde. Jedoch scheint diese chemische Modifikation ein sekundärer, vermutlich thermischer Prozeß zu sein, da in MALDI Spektren nur ein geringer  $\text{CO}_2$ -Verlust detektiert wurde. Die höhere Laserschwelle der modifizierten Fläche läßt sich durch eine größere Oberfläche oder durch eine Verschiebung der Absorptionsbande und der damit einhergehenden geringeren Absorption erklären. Insgesamt scheint klar zu sein, daß die Struktur der Oberfläche einen wesentlichen Einfluß auf die Einkopplung der Laserenergie hat, im Einklang mit den unterschiedlichen Laserswellen bei verschiedenen Präparationsprotokollen.



**Abbildung C.2.2.2** : SEM-Aufnahmen eines Sinapinsäure-Einkristalles. Oben links: nach 256 Laserpulsen mit  $2,5 \mu\text{J}/\text{Puls}$ . Oben rechts: nach 1280 Laserpulsen mit  $2,5 \mu\text{J}/\text{Puls}$ . Unten: nach 24 Laserpulsen mit  $8,6 \mu\text{J}/\text{Puls}$ . (Reproduziert aus [Fou02])

### C.2.3. Dynamik und Energetik der Desorption / Ablation

Die nach dem Laserpuls entstehende Wolke aus desorbierten Partikeln und Molekülen (engl. "plume") breitet sich schnell aus, wobei dies ein stark gerichteter Prozeß ( $90^\circ$  zur Oberfläche) mit einem geringerem radialen Anteil ist. Durch verschiedene Experimente konnte die Geschwindigkeit der Partikel sowie ihre zeitliche, räumliche und energetische Verteilung bestimmt werden. Dies gelang sowohl für Ionen als auch für Neutralteilchen, die den größten Anteil der desorbierten Moleküle ausmachen. Mit Sinapinsäure als Matrix wurde bei Einzelionen-Experimenten ein Überschuß der Neutralteilchen um mindestens den Faktor 1000 festgestellt, indem die Ionisationsausbeute bestimmt und mit dem abgetragenen Volumen verglichen wurde [Ens91]. Andere Autoren fanden mit Hilfe einer Quarz-Mikrowaage für Ferulasäure ein Verhältnis Neutralteilchen zu Ionen von  $10^5$  [Qui94]. Pro Laserpuls wurden etwa  $10^{10}$  bis  $10^{14}$  Partikel detektiert, die Zahl der positiven Ionen lag dagegen bei  $10^5$  bis  $10^9$ . Die Zahl der desorbierten Partikel stieg mit zunehmender Laserenergie, aber sank mit der Zahl der aufeinander folgenden Pulse, vermutlich durch die photochemische Veränderung der Oberfläche. Auch die simultane Detektion von Ionen und nachionisierten Neutralteilchen ergab ein Verhältnis von mindestens 10.000:1 [Mow93]. Sie fanden zudem, daß sich das Verhältnis Ionen/Neutralteilchen bei verschiedenen Matrices trotz insgesamt unterschiedlicher Signalintensitäten kaum unterscheidet.

### C.2.3.1. Initiale axiale Geschwindigkeit

Die stark gerichtete Ausbreitung spiegelt sich in einer hohen initialen axialen Geschwindigkeit der Ionen wieder [Bea91, Ens91]. Die mittlere Startgeschwindigkeit von Matrixionen und Analytationen wurde mit verschiedenen experimentellen Ansätzen bestimmt und liegt je nach Matrix etwa zwischen 200 und 800 m/s, wobei je nach Meßmethode auch Werte bis weit über 1000 m/s gefunden wurden [Spe93, Glü99]. Aufgrund dieser Diskrepanzen gab es nach den ersten Ergebnissen eine Vielzahl weiterer Messungen der initialen Geschwindigkeit. Dazu kamen im Wesentlichen zwei Verfahren zum Einsatz: Zum einen kann die Ausbreitung der Ionen im feldfreien Raum anhand der verlängerten Flugzeit oder anhand der Driftgeschwindigkeit bestimmt werden (Feldfrei-Methode) [Bea91, Ver92, Spe93, Cha94, Dwo97, Dwo98]. Zum anderen kann bei MALDI-Geräten mit verzögerter Extraktion die Verzögerungszeit variiert werden und gegen die resultierenden Flugzeiten aufgetragen werden. Aus der Steigung dieser Geraden läßt sich die initiale Geschwindigkeit der Ionen errechnen (DE-Methode) [Juh97, Glü99]. Durch Photoionisation kann man zudem die Geschwindigkeit der Neutralteilchen bestimmen. Bei dieser Methode werden die Moleküle zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem zweiten Laser nachionisiert [Spe88, Hut91].

Die mit der DE-Methode bestimmten Werte bewegen sich je nach Matrix im Bereich von ca. 200 bis 700 m/s [Glü99, Glü01a]. Allgemein werden bei der Bestimmung der Ausbreitung im feldfreien Raum tendenziell höhere Werte erhalten, insbesondere da es schwierig ist einen Felddurchgriff zu vermeiden. Experimente mit besserer Feldabschirmung ergaben aber für die Feldfrei-Methode niedrigere und mit der DE-Methode vergleichbare Werte [Kin99, Ber02, Spe03]. Bei der DE-Methode spielt außerdem die Wahl der Parameter wie z.B. der Extraktionsspannung oder der Bereich der Verzögerungszeiten eine Rolle. Es ist also wichtig, nur Werte zu vergleichen, die mit derselben Methode gewonnen wurden.

Trotz der teilweise recht unterschiedlichen absoluten Werte zeigte sich, daß Messungen der initialen Ionengeschwindigkeit eine gute Charakterisierung des MALDI Prozesses erlauben. Glückmann stellte auf Basis der DE-Methode einige vergleichende Untersuchungen an, von welchen Parametern die Anfangsgeschwindigkeit der Ionen abhängt [Glü99, Glü01a]. Eine der wichtigsten Informationen aus allen Messungen ist, daß die Startgeschwindigkeit in erster Linie von der verwendeten Matrix abhängt und -mit seltenen Ausnahmen- für alle Spezies (Matrix- und Analytationen) gleich ist. Dies belegt, daß die Ausbreitungsgeschwindigkeit eine inhärente Matrixeigenschaft ist und spricht gegen eine thermische Desorption, da bei dieser eine massenabhängige Geschwindigkeit zu erwarten wäre.<sup>11</sup> Der Grund für die massenunabhängige, gleichförmige und hohe Geschwindigkeit der Ionen dürfte im kollektiven Ablationsprozeß zu suchen sein. Die Ablationscharakteristika könnten ihrerseits wieder von Kristalleigenschaften wie Gitterenergie oder Energieaufnahme und -verteilung abhängen. Konsequenterweise ändert sich die initiale Geschwindigkeit daher dann, wenn die Kristallisationsbedingungen verändert werden, z.B. infolge von Zusätzen, bei Verwendung anderer Lösungsmittel oder anderen Änderungen der Präparationsmethode. Allerdings ist diese präparationsbedingte Geschwindigkeitsänderung vergleichsweise gering, solange dieselbe Matrix verwendet wird.

Noch interessanter ist ein Blick auf Ausnahmen von der gleichförmigen Geschwindigkeit aller Ionen. Auf diese Weise kann z.B. der Fall einer matrixgestützten LDI von einer Laserdesorption ohne Matrixeinfluß unterschieden werden, da für letztere Geschwindigkeiten von nahezu Null ermittelt werden. Außerdem zeigte sich, daß kleine, neutrale Moleküle vielfach eine

---

<sup>11</sup> Es sei angemerkt, daß im Widerspruch dazu kürzlich initiale Ionengeschwindigkeiten veröffentlicht wurden, die eine Abhängigkeit von der Analytmasse zeigen. Diese ist aber geringer als bei einer thermischen Desorption zu erwarten wäre [Spe03].

niedrigere Geschwindigkeit besitzen, wenn sie als kationisierte Spezies detektiert werden. Dies legt einen anderen Ionisationsmechanismus für diese Spezies nahe, z.B. eine Gasphasen-Kationisierung (s. auch Kap. und 3.2.1).

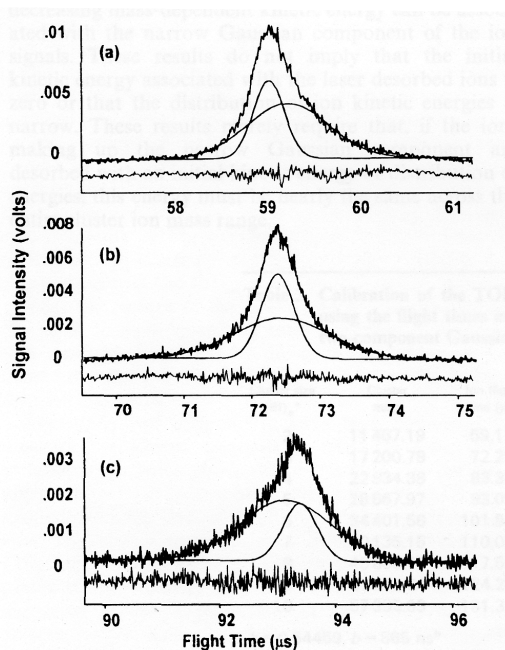
Die schnelle Ausbreitung der Moleküle im Raum führte zu der Annahme einer adiabatischen Expansion, die zu einer Kühlung der Moleküle führt, so daß trotz des hohen Energieeintrags ein insgesamt geringer Fragmentierungsgrad resultiert [Bea91]. In diesem Fall sollten aber Matrices mit einer hohen Startgeschwindigkeit zu einer geringeren Anregung und Fragmentierung infolge einer stärkeren Kühlung führen [Kar00]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der axialen initialen Geschwindigkeit und der "Härte" einer Matrix konnte aber bisher nicht einwandfrei bewiesen werden, auch wenn Experimente zur Fragmentierung von Glykoproteinen darauf hindeuten [Kar95]. Neue Ergebnisse, die Indizien für diesen Befund vorlegen, wurden kürzlich publiziert [Kar03]. Alternativ wurde aufgrund von Messungen der internen Energie von Anlytionen ein Einfluß der Gasphasenbasizität der Matrix propagiert [Ste00]. Eine mögliche Korrelation mit der Sublimationsenthalpie konnte dagegen nicht bestätigt werden [Pri99, Ste00].

### C.2.3.2. Räumliche und zeitliche Verteilungen der Moleküle und Energiedefizit

Nicht nur die mittlere Geschwindigkeit ist von Interesse, sondern auch die Geschwindigkeitsverteilung und damit die Verteilung der kinetischen Energie, da diese die Breite des Ionensignals bestimmt. In einer orthogonalen Anordnung der TOF-Achse in Kombination mit verzögerter Extraktion der Ionen wurde durch Variation der Verzögerungszeit eine Verteilung der kinetischen Energie von 0,5 bis 10 eV mit einem Maximum bei etwa 1-2 eV für Tryptophan bestimmt, was einer Geschwindigkeit von 970 m/s entspricht [Spe90]. Beavis und Chait ermittelten Verteilungen der Startgeschwindigkeit mit einer Halbwertsbreite von  $\pm 500$  bis 750 m/s, der Mittelwert beträgt etwa 750 m/s [Bea91]. Pan und Cotter fanden für Nicotinsäure eine Breite der Geschwindigkeitsverteilung von  $\pm 300$  m/s bei einer mittleren Geschwindigkeit von 1000 m/s [Pan92]. Damit weist die Geschwindigkeitsverteilung der Ionen eine erhebliche Breite auf.

Die Bestimmung der kinetischen Energien von MALDI-Ionen durch Variation der Reflektorspannung ergab zudem ein Energiedefizit der Ionen, was auf Kollisionen während der Beschleunigungsphase hindeutet [Pan92, Zho92]. Zho et al. fanden z.B. für Insulin und Sinapinsäure als Matrix bei ca. der dreifachen Schwellbestrahlungsstärke ein Energiedefizit von etwa 22 eV bei einer Breite der Energieverteilung von ca. 24 eV. Das Defizit steigt mit zunehmender Masse, und negative Ionen haben generell eine etwas höheres Energiedefizit, zeigen dafür aber eine geringere Massenabhängigkeit. Interessanterweise ist das Energiedefizit für intensivere Signale höher und die Energieverteilung breiter, und das fast unabhängig von der dazu nötigen Laserenergie. All diese Befunde deuten auf verstärkte Kollisionen infolge einer dichteren Teilchenwolke, die zum Energiedefizit bis hin zu Fragmentierungen führt.

Dagegen haben die Ionen vor der Beschleunigung infolge der initialen Geschwindigkeit eine positive kinetische Energie in Richtung der Flugachse. Kinsel et al. untersuchten die kinetische Energie von Ionen bei verschiedenen elektrischen Feldstärken, und fanden dabei zwei Komponenten, einen nahezu prompten Anteil, der sogar einen Energieüberschuß hat, sowie einen verzögerten Anteil mit Energiedefizit [Kin99]. Bereits früher waren solche Überlagerungen von zwei Peaks beobachtet worden [Whi91, Whi92]. Auch aus der Analyse von Flugzeitprofilen ergibt sich eine Überlagerung von mehreren Komponenten, das Peakprofil wird am besten durch einen 2-Komponenten Gauß-Fit beschrieben [Kin97]. Dabei ist eine Komponente relativ scharf und die Flugzeit ist in Übereinstimmung mit theoretischen Berechnungen, während die zweite Komponente wesentlich breiter ist und bei niedrigen Massen später, aber bei höheren Massen früher am Detektor ankommt als die erste Komponente (s. Abb. C.2.3.1).



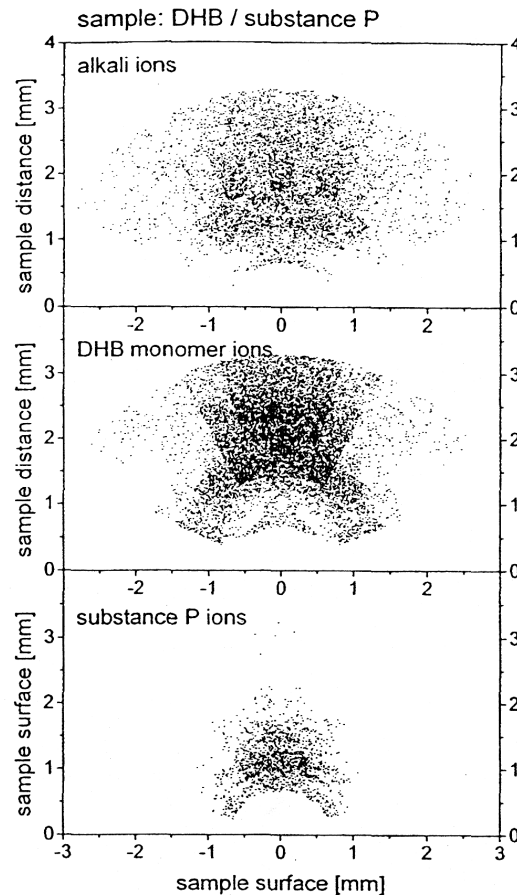
**Abbildung C.2.3.1** : Flugzeitprofile von Insulin-Clustern ( $I_n^+$ ) und Anpassung mit einem Zwei-Komponenten-Gauß-Fit: (a)  $n = 2$ , (b)  $n = 3$ , (c)  $n = 5$ . (Reproduziert aus [Kin97])

Aus den gemessenen Daten berechneten die Autoren für die breite Komponente eine Geschwindigkeit von 900-1000 m/s und eine verzögerte Ionenbildung etwa 30  $\mu\text{m}$  von der Oberfläche entfernt. Fournier et al. fanden für die initialen Geschwindigkeiten der beiden Komponenten dagegen 70 m/s und 320 m/s mit  $\alpha\text{CHCA}$  als Matrix [Fou98]. Interessanterweise wurde die erste Komponente nur bei dünnen Präparationen detektiert [Kin97]. Zudem ist das breite Signal bei höherer Extraktionsspannung und geringerer Verzögerungszeit größer, so daß man von einem Einfluß des elektrischen Feldes ausgehen muß.

Die Ergebnisse könnten auf die Existenz von zwei verschiedenen Ionisationsmechanismen hindeuten. Neuere Untersuchungen weisen aber auf eine andere Ursache: Livadaris et al. untersuchten die Bildung von Analyt-Multimeren bei verschiedenen Parametern und korrelierten deren Bildung und Fragmentierung mit dem Zerfall von Matrix-Analyt-Clustern [Liv00]. Ein prompter Zerfall dieser Cluster in der Ionenquelle führt zu scharfen Peaks, während ein metastabiler, kollisionsinduzierter Prozeß zu Beginn der Beschleunigung zu breiten Peaks mit verschobener Flugzeit führt. Je nach Matrix und interner Energie der Cluster werden entweder nur eine oder auch beide Komponenten detektiert.

Durch Messungen der radialen Geschwindigkeitskomponenten kann man die räumliche und zeitliche Ausbreitung der Moleküle bestimmen. Spengler und Bökelmann ermittelten mit einem drehbaren TOF-System für DHB-Ionen eine breite winkelabhängige Intensitätsverteilung, die mit  $\cos^x$  ( $x = 2-4$ ) auf Null abfällt [Spe93]. Auch die Geschwindigkeit bzw. die kinetische Energie der Ionen nimmt mit dem Winkel ab. Aus den zeitabhängigen Ionenintensitäten bei verschiedenen Winkeln generierten Bökelmann et al. eine bildliche Darstellung der Ionendichte zu bestimmten Zeitpunkten nach der Desorption (s. Abb. C.2.3.2) [Bök95]. Auch diese Autoren fanden zwei Geschwindigkeitskomponenten, von denen die langsamere einen höheren radialen Anteil hatte. Außerdem fanden sie, daß in bestimmten Bereichen Matrixionen gequenchet werden, sobald eine hohe Intensität von Analytionen detektiert wird.



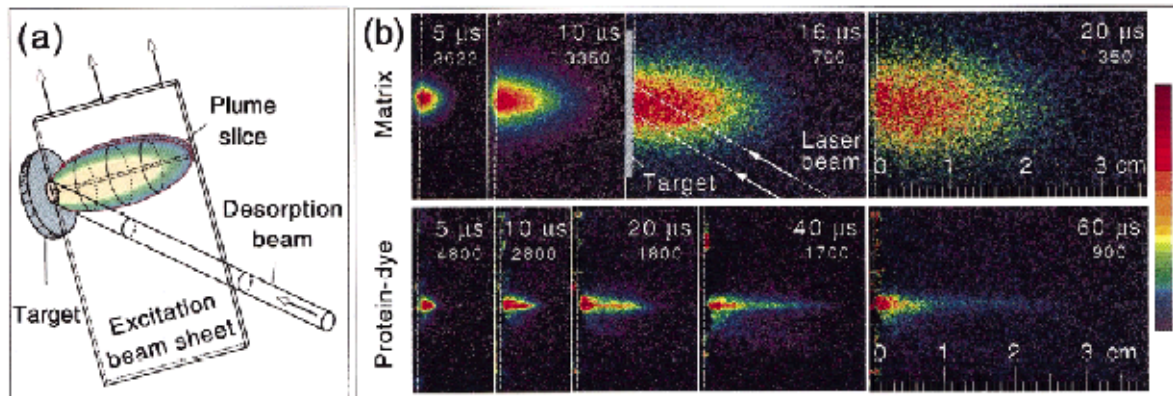


**Abbildung C.2.3.2 :** Bildliche Darstellung der Signalintensität verschiedener Ionen 1  $\mu$ s nach dem Laserpuls. (Reproduziert aus [Bök95])

Von verschiedenen Autoren ist auch eine Neigung der Emissionsachse der Ionen in Richtung des Einfallswinkels des Lasers beschrieben worden [Aks95, Bök95]. Dies wurde damit erklärt, daß sich durch den Laser ein Krater in Richtung des Laserwinkels bildet, so daß die resultierende Oberfläche gekippt ist, was auch auf SEM Aufnahmen von MALDI Kristallen gut zu erkennen ist [Kam97, Fou01, Fou02]. Normalerweise sollte die Hauptemissionsachse immer  $90^\circ$  zur Oberfläche sein. Johnson und LeBeyec berechneten, daß dieser Effekt auch bei mikrokristallinen Präparationen durch die statistische Verteilung der Orientierungen relativ zur Probenoberfläche und unterschiedliche Laserwinkel für die Kristallite hervorgerufen werden kann [Joh98]. Die Verteilung der Oberflächenwinkel sollte demnach auch einen Einfluß auf die Schwellbestrahlungsstärke haben, was auch experimentell gefunden wurde [Ing94]. Eine statistische Neigung von kleinen Kristallen relativ zur Oberfläche wurde auch als Erklärung dafür herangezogen, daß mikrokristalline Präparationen eine geringere mittlere initiale Ionengeschwindigkeit aufweisen als große Kristalle derselben Matrix [Glü01a]. Ein Vergleich winkelabhängiger Geschwindigkeiten für verschiedene Präparationen und Kristallflächen wurde ebenfalls durchgeführt.

Optische Abbildungen des MALDI-*plumes* zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Laserpuls wurden mit Hilfe der laser-induzierten Fluoreszenz (LIF) aufgenommen [Pur98, Pur98a, Pur99] (s. Abb. C.2.3.3). Allerdings wird auf diese Art die Verteilung der Neutralteilchen abgebildet. Auch bei diesen Bildern erkennt man deutlich eine unterschiedliche Ausbreitung von Matrix- und Analytionen, wobei die Analyte eine wesentlich stärker vorwärts gerichtete Dynamik aufweisen als die Matrixionen. Dieser als "*plume-sharpening*" bezeichnete Effekt wurde damit erklärt, daß die schweren Analytmoleküle von den leichteren Molekülen durch Stöße vorwärts

getrieben werden. Dies ist deswegen möglich, weil durch den wesentlich höheren Anteil der Matrixmoleküle deren Partialdruck und damit der Druckgradient höher ist als für die Analyte. Durch die Stöße kommt es aber trotzdem nicht zu einer unterschiedlichen axialen Geschwindigkeit, sondern nur zu einer unterschiedlichen radialen Verteilung und Geschwindigkeit. Auch Spengler und Bökelmann fanden bereits, daß einige Matrix-Spezies eine größere radiale Geschwindigkeit aufwiesen als Analyte [Spe93].



**Abbildung C.2.3.3 :** Zeitliche und räumliche Ausbreitung von Matrix und Analyt nach dem Laserpuls, aufgenommen mittels Laser-induzierter Fluoreszenz (LIF) (reproduziert aus [Pur99])

#### C.2.4. Desorptionsmodelle und Simulationen

Ein rein qualitatives Modell des MALDI-Prozesses ist das bereits erwähnte Vulkan-Modell [Hil90]. Ein weiteres sehr einfaches Modell ging von der Annahme aus, daß die Ionenintensität proportional zur Bestrahlungsfläche ist [Bea92a]. Als einziger weiterer Parameter war die Annahme einer Schwelle nötig, unterhalb der keine Ionen gebildet werden können, allerdings enthält dieses Modell keine mechanistischen Erklärungen. Mit der Zeit wurden aber immer mehr Einzelheiten untersucht, und mit der zunehmenden Datenmenge wurde eine Reihe von Versuchen unternommen, genauere Modelle aufzustellen. Vielfach wurden dazu thermodynamische oder kinetische Berechnungen und Simulationen durchgeführt, aber da es sich um einen sehr komplexen Prozeß handelt, sind immer bestimmte Annahmen notwendig. Alle thermischen Modelle haben das Problem, daß sie die trotz hoher Temperaturen geringe Fragmentierung erklären müssen. Schwerer wiegt jedoch, daß diese Modelle mit einer einheitlichen Ausbreitungsgeschwindigkeit aller Moleküle nicht vereinbar sind. Bei einer rein thermischen Expansion sollten alle Moleküle die gleiche kinetische Energie besitzen, woraus für höhere Massen geringere Geschwindigkeiten resultieren.

Überschall-expansion: Bei diesen Modellen wird ein starkes Aufheizen der Matrix und ein sehr schneller Phasenübergang zur Flüssigkeit angenommen [Bea91, Ens91, Spe93]. Die nachfolgende, durch den hohen Druck bedingte adiabatische Überschall-expansion könnte dann die schwereren Analytmoleküle mitreißen und gleichzeitig für eine Kühlung sorgen, da ansonsten sehr hohe Temperaturen resultieren würden. Diese These wurde durch die stark gerichtete Ausbreitung der Teilchen und die hohen Geschwindigkeiten gestützt. Das Mitreißen der Analyte durch Stöße der sich ausbreitenden Matrixmoleküle würde zudem die gleiche hohe Geschwindigkeit aller Moleküle erklären. Bestimmungen der radialen Geschwindigkeiten führten zu einer Modifikation dieses Modells, in der von einer nicht idealen Düsenstrahlexpansion ausgegangen wird, die die radiale Ausbreitung erklärt [Bök95].

Homogeneous bottleneck: Auch dieser Ansatz geht von einem starken Temperaturanstieg aus, der zu einer Auflösung der festen Phase bei gleichzeitiger Sublimation der Matrix führt [Ver90, Ver91]. Bei diesem Modell ging man davon aus, daß die Energie in der durch den Laser angeregten Region gleichmäßig verteilt ist. Ein hoher Energieeintrag führt zu einer starken Sublimation, die für eine Kühlung der sehr verdünnten Analyte sorgt [Ver90a]. Dadurch würde auch die Sublimationsenthalpie der Matrix zu einem wichtigen Parameter. In nachfolgenden Studien wurde daraus ein hydrodynamisches Modell entwickelt, in dem die Ausbreitung der Moleküle sowie der intermolekulare Energietransfer in Abhängigkeit von der eingestrahlten Laserenergie berechnet wurde [Ver93, Nen95]. Ein wesentliches Element dieser Modelle ist, daß aufgrund der starken Verdünnung der Analyte nur ein geringer Energietransfer von der angeregten (heißen) Matrix zum Analyten stattfindet, da sonst eine stärkere Fragmentierung zu erwarten wäre. Aus diesem Grunde wurde auch versucht, die Kinetik der Energieübertragung dieser Wirt-Gast-Wechselwirkungen näher zu charakterisieren [Ben97, Wu98, Sad01].

Pressure pulse: Dieses rein mechanische Modell geht von einem plötzlichen Druckaufbau infolge der thermischen Anregung aus [Joh91]. Dieser hohe Druckgradient entlädt sich in einem Druckpuls, bei dem sowohl Partikel als auch individuelle Moleküle desorbiert werden. Dabei wurde ein Vergleich mit anderen Desorptionsmethoden herangezogen, wo beim Auftreffen der Partikel auf der Oberfläche solche Druckwellen entstehen (FAB, SIMS, PDMS). Die auf der Matrixoberfläche gefundenen Wellenstrukturen könnten von einer solchen Druckwelle stammen [Kamp97, Fou01, Fou02].

Breathing sphere: Die Idee einer Druckwelle wurde von Zhigilei und Garrison aufgenommen, die eine Reihe von molekulardynamischen Simulationen durchführten [Zhi97, Zhi97a, Zhi98, Zhi00]. In diesem Modell heizt sich ein definiertes Volumen durch den plötzlichen kurzen Laserpuls auf, was zu einem Druckaufbau führt. Bei der nachfolgenden Relaxation expandiert das Kristallgitter und eine Druckwelle führt zu einer starken Kompression des umgebenden kalten Materials. Da dieser Druck infolge des umgebenden, nicht angeregten Festkörpers nur in einer Richtung frei relaxieren kann, resultiert eine Kraft und damit eine Bewegung  $90^\circ$  zur Kristalloberfläche. In dieser Phasenexplosion werden Bindungen gebrochen und Cluster gebildet, jedoch erst ab einer bestimmten Energieschwelle. Unterhalb dieser Schwelle werden aber schon einzelne Moleküle desorbiert. Bei höheren Energien werden die Cluster wieder kleiner, und bei längeren Pulsen werden auch Flüssigkeitstropfen gebildet. Abb. C.2.4.1 zeigt Ausschnitte aus Simulationen bei verschiedenem Energieeintrag.

Die Berechnungen liefern auch Daten für die Geschwindigkeitsverteilung der Moleküle, die in guter Übereinstimmung mit gemessenen Werte liegen. Insbesondere die Unterschiede bei der radialen Verteilung zwischen Analyt und Matrix, wie sie bei Messungen zur winkelabhängigen Ionendichte [Bök95] sowie bei LIF-Aufnahmen [Pur99] gefunden wurde, werden korrekt wiedergegeben.

Eine Erweiterung unter Einbezug statistisch verteilter Analytmoleküle in der Matrix ergab, daß die Analyte bei der Ablation in den Clustern lokalisiert sind [Iti02, Zhi03a]. Die Konformation der Analytmoleküle, die durch eine Kette mehrerer Atomgruppen simuliert wurden (*bead-and-spring model*), änderte sich zwar, aber es werden dabei keine Bindungen gebrochen (kaum Fragmentierung). Unterhalb der Energieschwelle für die Ablation wurden keine Analytmoleküle in die Gasphase überführt, sondern es werden nur Matrixmoleküle desorbiert.

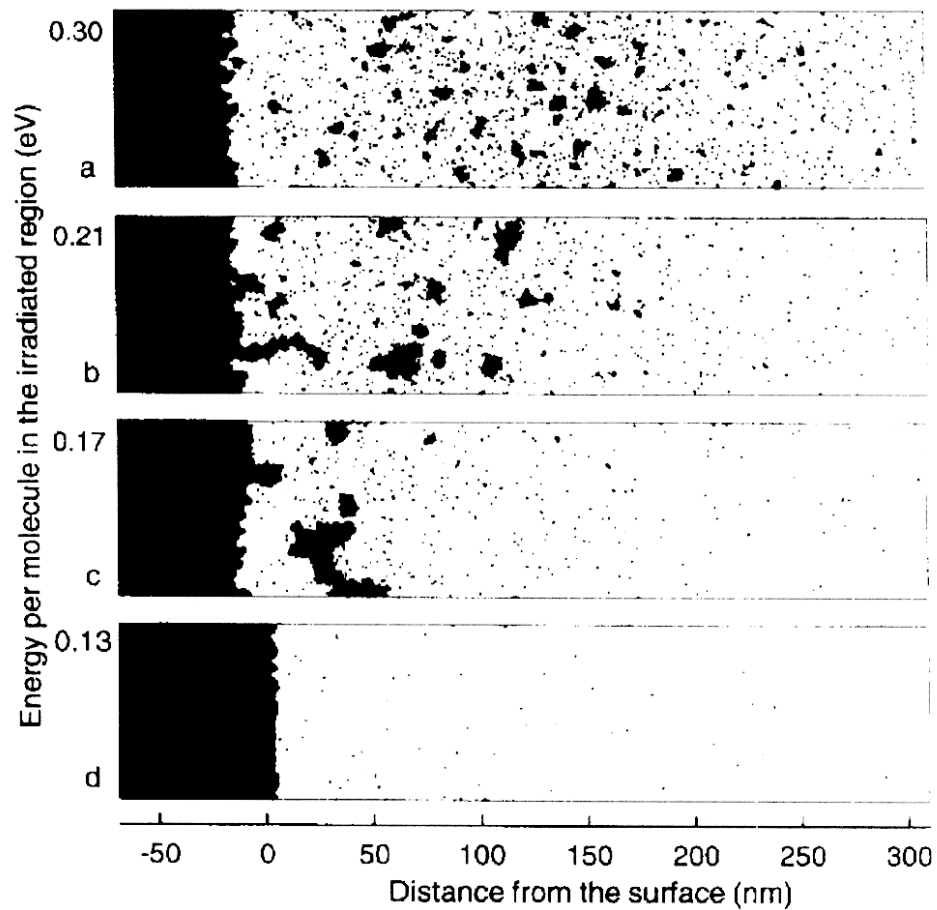
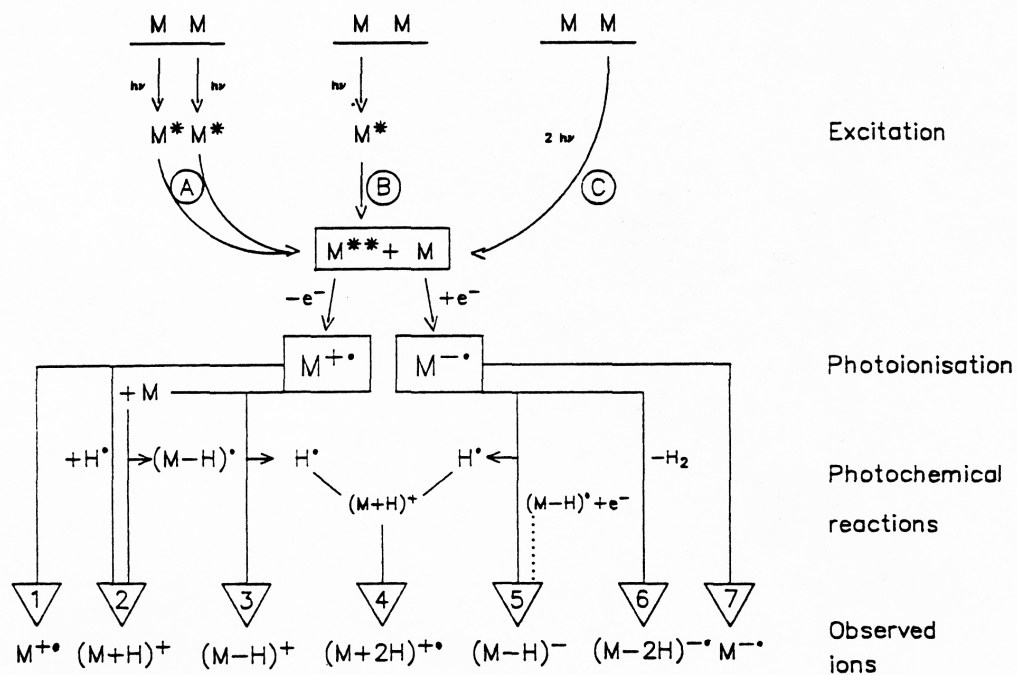


Abbildung C.2.4.1 : Ausschnitte aus einer 2D-Computersimulation 500 ps nach dem Laserpuls.(Reproduziert aus [Zhi97])

### C.3. Ionisation und Ionen-Molekül-Reaktionen

Grundlegende Arbeiten zur Matrixionisation und zu möglichen Ionisationswegen bei MALDI wurden 1992 von Ehring et al. vorgestellt [Ehr92] und in einem Schema zusammengefaßt (s. Abb. C.3.1.1). Ehring untersuchte vor allem die Matrixspektren und fand, daß nur Verbindungen gut als Matrizes für UV-MALDI geeignet sind, die sowohl Radikalkationen  $[M^{\bullet+}]$  als auch protonierte Matrixmoleküle  $[M+H^+]$  bilden. Als primäre Ionisationsquelle wurde daher zunächst eine Photoionisation der Matrix mit nachfolgendem Protonentransfer angenommen. Zur Photoionisation können prinzipiell verschiedene Mechanismen führen, z.B. *energy pooling* oder auch eine simultane oder sequentielle Mehrphotonen-Ionisation. Eine Ionisation ist aber auch auf anderen Wegen möglich, dazu gehören *excited-state-proton-transfer*, Disproportionierung, thermische Ionisation oder die Freisetzung von präformierten Ionen. Allerdings ist eine Aussage über die primäre Ionisation in der MALDI grundsätzlich schwierig, da es eine Reihe von schnellen Sekundärreaktionen gibt, deren Produkte nicht ohne Weiteres von den primären Ionen zu unterscheiden sind. Neben der Photoionisation als primäre Ionenquelle ging daher bereits Ehring von photochemischen Reaktionen, wie der Übertragung von Protonen, von Elektronen und von Wasserstoffradikalen, aus.



**Abbildung C.3.1.1:** Schematische Darstellung möglicher Wege der Photoionisation und nachfolgender photochemischer Reaktionen bei MALDI. (Reproduziert aus [Ehr92])

Lia und Allison berücksichtigten dann in ihrem 1995 publizierten Vergleich einiger möglicher Mechanismen der Ionenbildung neben den protonierten auch kationisierte Moleküle [Lia95]. Als wesentliche Mechanismen für die Bildung von kationisierten Spezies wurden sowohl Gasphasen-Reaktionen als auch die Desorption präformierter Ionen angenommen. Letzteres ist aber prinzipiell auch für protonierte und deprotonierte Analyte denkbar und spielt eine zentrale Rolle im Cluster-Modell [Kar00]. Die Freisetzung dieser präformierten Ionen könnte auf verschiedenen Wegen stattfinden, wobei eine durch den Desorptionsprozeß bedingte Ladungstrennung favorisiert wurde. Die Ionisierung und die nachfolgenden Reaktionen würden dann fern des thermodynamischen Gleichgewichts stattfinden, so daß die Kinetik dieser Reaktionen eine große Rolle spielen sollte. Im Gegensatz dazu gingen Knochenmuss et al. davon aus, daß alle Reaktionen

durch einen Vielzahl Stöße im Gleichgewicht sind und MALDI-Spektren daher generell durch sekundäre Ionen-Molekül-Reaktionen und deren Thermodynamik bestimmt werden [Kno00]. Dieser Punkt ist zwar nach wie vor umstritten, kürzlich wurde jedoch ein auf thermodynamischen Überlegungen basierendes Modell vorgestellt, allerdings unter Berücksichtigung einer möglichen Cluster-Bildung [Kno02, Kno02a]. Auch ein Einfluß kinetischer Faktoren bei geringen Laserenergien wurde diskutiert [Bre03]. Ein Übersichtsartikel zur MALDI-Ionisation wurde 1998 von Zenobi und Knochenmuss veröffentlicht [Zen98].

Die Frage, ob diese Prozesse in der Gasphase oder noch im kondensierten Zustand (Festkörper oder Cluster) erfolgen, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Allgemein kann man aber sagen, daß viele Reaktionen im Festkörper - kurz vor oder bei der Desorption - energetisch günstiger sind, vor allem durch mögliche energetische Kopplungen und Solvation der Moleküle und Ionen. Allerdings können Gasphasen-Reaktionen durch Kollisionen aktiviert werden. Wesentlich scheint aber bei der Ionisation zu sein, daß die Laserenergie zum größten Teil in kinetische Energie umgewandelt wird und sich die Ionen dadurch schnell voneinander wegbewegen, wodurch eine Rekombination wenigstens teilweise verhindert wird. Würde die eingebrachte Energie vollständig in interne Energie der Moleküle umgewandelt werden, wäre zudem eine starke Fragmentierung zu erwarten, wie sie bei der LDI ohne Matrix auch beobachtet wird [Spe87].

Nachfolgend werden einige wichtige Ionisationsmechanismen und chemische Reaktionen kapitelweise vorgestellt. Diese sind nach primären und sekundären Prozessen unterteilt, je nachdem, ob Ladungen neu generiert (oder freigesetzt) werden oder ob nur ein Ladungs- oder Atomtransfer erfolgt, auch wenn diese Unterteilung sich nicht immer konsequent anwenden läßt. Zusätzlich werden Untersuchungen zum Ladungszustand und zur Adduktbildung in der MALDI-MS vorgestellt, da diese ganz wesentliche Rückschlüsse auf den MALDI-Prozeß erlauben und in einem engen Zusammenhang zum Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit stehen. Auf eine mögliche Ionisation durch Bildung von geladenen Clustern wird bei der Vorstellung des Cluster-Modells eingegangen.

### **C.3.1. Primäre Ionisation**

Von der Vielzahl möglicher primärer Ionisationsmechanismen werden in den folgenden Abschnitten einige gesondert vorgestellt. Insbesondere zu den Themen Photoionisation und Kationisierung gibt es eine Vielzahl Untersuchungen, die eine Abschätzung der Relevanz dieser Mechanismen erlauben. Trotzdem ist die Frage nach der primären Ionisation nach wie vor offen, und das Wirken mehrerer Mechanismen parallel ist durchaus denkbar. Besonders umstritten ist die Frage, ob es in der MALDI-Matrix präformierte Ionen gibt und ob diese relevant für den Ionisationsprozeß sind. Untersuchungen dazu werden im Ergebnisteil vorgestellt.

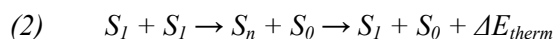
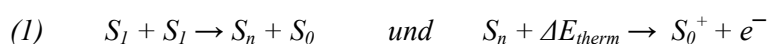
#### **C.3.1.1. Photoionisation sowie Elektronenaufnahme der Matrix**

Die große Bedeutung der Photoionisation bei vielen Erklärungsansätzen für MALDI rührt vor allem daher, daß in Matrixspektren neben nicht-radikalischen Ionen mit gerader Elektronenzahlen (z.B.  $[M+H]^+$  und  $[M-H]^-$ ) auch radikalische Spezies und damit Ionen mit ungerader Elektronenzahl auftauchen [Ehr92]. Dies sind vor allem Radikalkationen  $[M^{\bullet+}]$ , aber auch Spezies wie  $[M-2H^{\bullet+}]$  bei 2,5-DHB oder  $[M+2H^{\bullet+}]$  z.B. bei 3-Aminopyrazin-2-carbonsäure. Daher wurde das Radikalkation der Matrix als Vorläufer aller positiven Ionen angesehen, da es seine Ladung durch Protonentransfer (s. Kap. 3.2.2) auf die Analytmoleküle übertragen kann. Analog dazu galt das durch Elektronenübertragung oder -einfang entstandene Radikalanion  $[M^{\bullet-}]$  als Vorläufer aller Anionen, mit dem Unterschied, daß Radikalanionen im allgemeinen weniger stabil sind und nur selten detektiert werden können. Eine Ausnahme sind nur Substanzen mit extrem

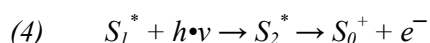
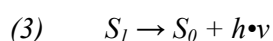
hohen Elektronenaffinitäten, wie z.B. Tetracyanochinodimethan [Ehr92]. Grundsätzlich bleibt aber die Frage, wie es zu einer Photoionisation der Matrix kommt, da die Ionisationsenergie (IE) herkömmlicher Matrices von 8-10 eV der Summe von mehr als zwei Photonen entspricht [Zen98].

Im Prinzip sind für die Photoionisation drei mögliche Wege vorstellbar (s. auch Abb. C.3.1.1). Denkbar wäre z.B. eine Mehrphotonen-Ionisation, entweder direkt (*nichtlineare Absorption*, Weg C) oder nacheinander (*resonante Absorption*, Fall B). Ehring nahm an, daß eine 2-Photonen-Ionisation in einem molekularen Matrix-Cluster durch die Herabsetzung der Ionisationsenergie (IE) möglich sein könnte [Ehr92]. Neuere Experimente ergaben aber nur eine geringe Herabsetzung der IE für Matrix-Dimere oder -multimere, z.B. für  $(2,5\text{-DHB})_n$  von 8,05 eV ( $n=1$ ) auf 7,80 eV ( $n=4$ ) [Lin01]. Auch die Komplexierung mit Wasser führt zu einer Herabsetzung der IE auf 7,78 eV. Allerdings konnten durch Experimente mit zwei nacheinanderfolgenden Laserpulsen ( $\lambda = 355$  nm, 30 ps) bereits unterhalb der Schwellbestrahlung Matrixionen erzeugt werden [Tan97, Kno00a]. Dies ist aber nur bei zeitlich versetzten und sehr kurzen Laserpulsen (30 ps) möglich (maximale Intensität je nach Matrix bei einer Differenz der Pulse von 1-10 ns), so daß man von einer sequentiellen Photonenabsorption ausgehen muß, zumal für eine nichtlineare Absorption von drei Photonen ein wesentlich höherer Photonenfluß notwendig wäre.

Ein dritter Mechanismus kommt gänzlich ohne die Absorption mehrerer Photonen durch ein einziges Molekül aus. Vor allem in kondensierter Phase könnte durch Kopplung der Anregungsenergien von zwei (oder mehreren) Molekülen genug Energie akkumuliert werden, um ein Matrixmolekül zu ionisieren (*energy pooling*, Weg A in Abb. C.3.1.1, [Ehr92]). Es ist bekannt, daß angeregte Matrixmoleküle sowie die Lebensdauer der angeregten Zustände bei MALDI eine Rolle spielen [Pre94, Ehr95, Ehr96a, All00, Zec02]. An der Laserschwelle ist die Dichte angeregter Moleküle so groß ( $\sim 25\%$ ), daß ein hoher Prozentsatz direkt benachbart ist und miteinander interagieren kann, was anhand der gequenchten Lumineszenz (gegenseitiges Auslöschung zweier Excitonen) nachgewiesen wurde [Ehr95, Ehr96a]. Bei diesem nicht-strahlenden Quenchprozeß kann es (z.B. ausgehend von zwei einfach angeregten Singulett-Zuständen) über höhere Anregungszustände sowohl zu einer Elektronenemission (1) als auch zu einer thermischen Anregung (Vibration) des Kristallgitters (2) kommen. Es können auch beide Prozesse nebeneinander stattfinden, so daß die zur Ionisation notwendige Anregungsenergie durch den Prozeß (2) entsteht:



Unterhalb der Laserschwelle bleibt dagegen der Quenchprozeß aufgrund mangelnder Kopplung aus und die Energieabgabe in Form von Strahlung (Lumineszenz) als Konkurrenzreaktion wird stärker (3). Die Lebensdauer der angeregten Singulett-Zustände liegt in der Größenordnung der optimalen Zeitdifferenz bei den 2-Puls-Experimenten (1-2 ns für 2,5-DHB) [Tan97, Kno00a]. Dies wurde als Hinweis auf eine sequentielle 2-Photonen-Absorption verstanden, bei der ein bereits angeregtes Molekül  $S_I^*$  ein zweites Photon aufnimmt (4). Die Besetzungszahl der angeregten Zustände ist zudem bei typischen MALDI-Bedingungen relativ hoch, womit dieser Prozeß wahrscheinlicher wird.



Da aber zwei Photonen für eine Ionisation nicht genug sind, wurde auch für diese Variante eine zusätzliche thermische Anregung vorgeschlagen, und es wurde eine Reihe von photothermischen Modellen vorgestellt [Dre95, All97a, All97b, Kar98]. Einige Unstimmigkeiten machen aber deutlich, daß der Mechanismus noch nicht im Detail verstanden ist. Dies könnte auch daran liegen, daß die Lebensdauer von angeregten Zuständen in kondensierter Phase in vielen Fällen deutlich kürzer ist als in der Gasphase, und daß bei MALDI ein Phasenübergang stattfindet. Kürzlich wurden erheblich geringere Lebensdauern (0.2-0.7 ns) von angeregten Matrixzuständen gemessen, die eher die weiter oben vorgestellte zeitgleiche, direkte Kopplung von angeregten Singulett-Zuständen stützen [Lüd02]. Es könnten aber auch beide Mechanismen parallel stattfinden, da in den 2-Puls-Studien zwei Maxima bei der Ionenintensität auftauchten (0.2 vs. 1.5 ns) [Kno00a]. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Detektion von zwei Komponenten bei Flugzeit- und Energieprofilen, die durch unterschiedliche Entstehungszeiten der Ionen verursacht sein könnten [Kin97, Fou98, Kin99].

Obwohl viele Ergebnisse darauf hindeuten, daß Radikalkationen der Matrix durch Photoionisation gebildet werden, ist es dennoch nicht selbstverständlich, daß diese auch für die Ionisation der Analyte verantwortlich sind. Zudem ist MALDI auch bei Wellenlängen möglich, bei denen eine Photoionisation unmöglich ist. Die mit IR-MALDI erhaltenen Spektren unterscheiden sich (abgesehen von fehlenden Radikalen und geringerer Fragmentierung) kaum von UV-MALDI-Spektren [Niu98]. Dies würde natürlich bedeuten, daß auch die Lumineszenz und die Photoionisation keine Rolle bei der Analytisation spielen kann, zumal der Hauptteil der Laserenergie durch Vibrationsfreiheitsgrade relaxiert [Ehr95]. Allerdings ist ebenso denkbar, daß die Ionisationsmechanismen bei UV- und IR-MALDI unterschiedlich sind.

Während eine Photoionisation mit nachfolgendem Protonentransfer für die Ionisation von Analyten durchaus denkbar ist, ist eine direkte Photoionisation von großen Biomolekülen aufgrund der starken Anregung und Fragmentierung nicht möglich. Nur wesentlich stabilere, große Moleküle wie Polymere oder Fullerene können photoionisiert werden, eine adiabatische Kühlung (z.B. in einem Überschallstrahl) kann aber die Fragmentierung labiler Biomoleküle reduzieren [Bec95].

### **C.3.1.2. Excited-State-Proton-Transfer und Disproportionierung**

Als weitere Möglichkeit zur Bildung von Analytionen wird die direkte Protonenübertragung aus dem angeregten Zustand der Matrix (*excited-state-proton-transfer*) diskutiert [Kar87, Gim92, Pres94]. Bei neutralen Matrixmolekülen ist diese Reaktion gleichzeitig eine Disproportionierung unter Bildung von  $[M+H]^+$  und  $[M-H]^-$ . Einige organische Moleküle haben im angeregten Zustand wesentlich höhere Gasphasen-Aciditäten, dies trifft oft für Verbindungen mit phenolischen OH-Gruppen wie z.B. Salicylsäure zu [Chi93]. Meist befindet sich die OH-Gruppe in ortho-Position zu einer Carbonylgruppe, und eine bessere Matrixfunktion dieser Isomere wurde auch bei bestimmten MALDI-Matrizes gefunden [Kra96]. Aber auch für Matrizes mit para-ständigen Hydroxygruppen [Yon98] und für 3-HPA [Wu94] wurde ein ähnlicher Mechanismus vorgeschlagen. Es gibt aber Untersuchungen, nach denen eine Derivatisierung von OH-Gruppen nur einen geringen Einfluß auf die Eignung als Matrix hat [Grig96, Won98], was gegen einen Protonentransfer unter Beteiligung von OH-Gruppen spricht. Sowohl der Einfluß der Gasphasenacidität der Matrix [Gim97] als auch der Einfluß der Gasphasenbasizität der Analyten [Olu95] wurden ebenfalls als Hinweis auf einen *excited-state-proton-transfer* verstanden.

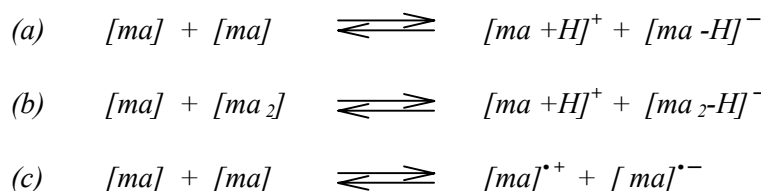
Durch Nachionisation von kleinen laserdesorbierten Matrix-Analyt-Clustern konnten Analytionen erzeugt werden [Kru95], ebenso gelang dies durch Laserbestrahlung von Clustern in einem molekularen Überschallstrahl [Mef95, Mef01, Lan98, Lan01]. Allerdings unterschieden sich die Bedingungen bei solchen Modellsystemen von den Bedingungen beim MALDI-Prozeß, so daß



nur begrenzt Rückschlüsse möglich sind. Abgesehen davon, daß die Reaktion auch aus dem Grundzustand erfolgen könnte, ist der initiale Schritt vermutlich eine Photoionisation, da andernfalls auch deprotonierte Moleküle entstehen müßten, die nicht detektiert wurden [Lan98].

Gegen die Hypothese des *excited-state-proton-transfer* spricht aber vor allem die Tatsache, daß bisher bei fast keiner bekannten Matrix eine erhöhte Acidität im angeregten Zustand nachgewiesen werden konnte, was z.B. anhand von Fluoreszenzmessungen möglich ist. Karbach et al. fanden, daß sowohl 2,5-DHB als auch die als Zusatz verwendete 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (sogenanntes "s" in DHBs) keine erhöhte Acidität im angeregten Zustand zeigen [Kar98]. Zudem muß bei der Berechnung der Energetik dieser Reaktionen immer auch die Coulomb-Energie berücksichtigt werden, die zur Trennung des entstandenen Ionenpaares nötig ist, evtl. vermindert um Solvatationsenergien in kondensierter Phase. Die Anregung mit einem einzigen Photon kann daher kaum zu einem Protonentransfer mit Ladungstrennung führen, wie es von Liao und Allison propagiert wurde [Lia95]. Auch die sehr kurzen Lebenszeiten von angeregten Zuständen der Matrixmoleküle sprechen gegen eine Protonenübertragung direkt aus dem angeregten Zustand [Ehr95].

Neben der bereits erwähnten Disproportionierung durch Protonentransfer (a), die auch unter Beteiligung von Matrixdimeren ablaufen kann (b), ist auch eine Disproportionierung unter Elektronentransfer möglich (c). Auch mit Analytmolekülen können ähnliche Reaktionen ablaufen.



Die Disproportionierung ist allerdings energetisch relativ ungünstig. So ergeben Rechnungen, daß die Disproportionierung von Matrixmolekülen unter Protonentransfer (a) um mindestens 500 kJ/mol endergonisch ist [Bre99]. Außerdem muß zusätzlich die Coulomb-Anziehung berücksichtigt werden, die für die Trennung des Ionenpaares überwunden werden muß und je nach Solvation 350 kJ/mol bis zu 590 kJ/mol betragen kann [Fül96]. Diese hohe Anregungsenergie könnte nur über einen *energy-pooling*-Mechanismus aufgebracht werden, da sie mehr als doppelt so hoch ist wie die Energie eines Photon bei 337 nm (3.68 eV bzw. 355 kJ/mol). Daher wurde ein konzertierter Mehrzentrenprozeß vorgeschlagen (*energy pooling*), bei dem die Anregung eines stark gekoppelten Matrix-Paars zur Disproportionierung führt [Kno98, Zen98]. In der Tat ist die analoge Reaktion unter Bildung eines negativen Matrix-Dimers (b) um ca. 115 kJ/mol günstiger [Bre99a]. Aber auch für die Protonierung eines Analyten unter Bildung des Matrixanions sind selbst bei stark basischen Verbindungen wie Arginin mindestens 300 kJ/mol nötig (ohne Coulomb-Anteil). Unter Bildung von Matrix-Dimeren reduziert sich dieser Betrag um ca. 100 kJ/mol. Die bei diesen Reaktionen auftretende Konkurrenz von Analyt und Matrix um das Proton wurde auch für Unterdrückungseffekte verantwortlich gemacht [Kno96, Kno98].

Allerdings erfordert die Disproportionierung keine Photoionisation, so daß dieser Mechanismus eine mögliche Erklärung für MALDI-Experimente bei höheren Wellenlängen sein könnte. Abgesehen davon, daß auch im IR-Bereich MALDI möglich ist, zeigten Chen et al., daß normale UV-MALDI-Matrizes bis zu einer Wellenlänge von über  $\lambda = 400$  nm normale MALDI-Spektren ergeben [Che98]. Bei dieser bereits im sichtbaren Bereich liegenden Wellenlänge würde eine Photoionisation in jedem Fall drei Photonen erfordern. Ob bei diesen Wellenlängen wie bei IR-MALDI photoionisierte Matrixmoleküle fehlen und nur protonierte und deprotonierte Spezies

detektiert werden, wurde leider bei [Che98] nicht erwähnt. Allerdings müßte es dann bei UV-MALDI einen anderen Mechanismus zur Bildung von  $M^{++}$  und weiteren Matrix- oder Analytradikalen geben, z.B. Photoionisation oder eine Übertragung von Wasserstoff-Radikalen.

### C.3.1.3. Desorption und Freisetzung von präformierten Ionen

Die direkte thermische Desorption von größeren Ionen ist, ebenso wie die energetisch ungünstige thermische Ionisation in der Gasphase (Disproportionierung), nicht möglich, da die Moleküle aufgrund der hohen Temperaturen (bis zu 6000 K) nicht ohne Fragmentierung desorbiert werden können [Hil83, Cot87]. Bei MALDI sind die Temperaturen (interne Energien der Moleküle) dagegen mit ca. 500 K wesentlich niedriger, vermutlich aufgrund der expansionsbedingten Kühlung [Mow94, Dre95]. Die direkte Laserdesorption (LDI) ist beschränkt auf Metallkationen wie  $Na^+$  oder kleine, stabile Moleküle wie z.B. quaternäre Ammoniumionen. Auch kleine Biomoleküle (max. 1-2 kDa), wie Zucker und Peptide, können durch thermische Verdampfung sowohl neutral als auch ionisch mittels eines Lasers desorbiert werden [Spe87, Hut91]. Die Desorption von Natrium-Ionen und kleinen, neutralen Molekülen spielt bei der Gasphasen-Kationisierung eine Rolle (s. Kap. C.3.2.1). Im Unterschied zu MALDI-Ionen ist die initiale Geschwindigkeit dieser LDI-Ionen nahezu Null [Glü99]. Dieser Unterschied läßt sich auch zur Abgrenzung von MALDI gegenüber der direkten LDI einsetzen (s. Kap. D.1.5).

Ein interessantes Beispiel dieser Art ist die Bestrahlung einer Matrixpräparation von der Rückseite [Ehr96, Gal02]. Mit einer sehr dünnen Goldfolie können Ionen von kleinen Molekülen erzeugt werden, die jedoch alle Charakteristika von LDI-Ionen aufwiesen. Die erhaltenen Spektren unterscheiden sich deutlich von MALDI-Spektren: Es entstehen viele natriumangelagerte Moleküle, aber kaum Radikalkationen, und die detektierten Ionen haben nahezu keine initiale Geschwindigkeitskomponente. Allerdings können durch eine Bestrahlung von der Rückseite auch normale MALDI-Spektren erhalten werden, und zwar wenn die Photonen nicht durch die Beschichtung absorbiert werden, sondern durch das Substrat in die Matrixkristalle gelangen können [Sch96].<sup>12</sup>

Die thermische Desorption von Ionen (z.B. durch Erhitzen des Substrats) unterscheidet sich somit grundlegend von der MALDI-Ionisation, und eine direkte Anregung der festen oder flüssigen Matrix scheint ein unabdingbarer Bestandteil von MALDI zu sein. Insbesondere sprechen aber die hohen (und massenunabhängigen) Startgeschwindigkeiten der MALDI-Ionen gegen einen thermischen Mechanismus. Allerdings scheint es auch mehr oder weniger fließende Übergänge zwischen direkter LDI und MALDI zu geben, in denen die Matrix durch Isolierung der Ionen, Unterstützung bei der Desorption und Kühlung der Ionen zu geringeren Fragmentierungen führt. Dieser Mechanismus scheint besonders bei kleinen, präformierten Ionen, wie Ammonium- oder Phosphoniumionen [Cla93], und bei der Desorption von neutralen Molekülen, wie Zuckern, wirksam zu sein [Glü02].

Obwohl die direkte, thermische Desorption von labilen Biomolekülen nicht möglich ist, wurde schon früh eine mögliche Freisetzung von präformierten Ionen auf andere Art und Weise diskutiert. Dazu müßten Analyte im geladenen Zustand in den Matrixkristallen eingebaut sein, aus dem sie dann durch den Laserpuls in die Gasphase überführt werden. Die Existenz und Freisetzung präformierter Ionen wurde besonders für kationenangelagerte Analyte diskutiert [Nel91, Leh97, Won97], aber auch für "prä-protonierte" Spezies wurde diese Möglichkeit erwogen [Zhu95]. Auch

---

<sup>12</sup> Man konnte zeigen, das in diesem Fall an der Unterseite der Kristalle MALDI-Ionen gebildet werde, die extrahiert werden und normal in einem linearen TOF nachgewiesen werden können. Dabei kommt es aber zu einer Equilibrierung der kinetischen Energien, so daß ebenfalls initiale Geschwindigkeiten von nahezu Null resultieren.

bei anderen Desorptionstechniken (FAB, SIMS, PDMS) wurde diskutiert, daß in der (meist flüssigen, polaren) Matrix präformierte Ionen vorhanden sind und diese durch den Partikelbeschuß freigesetzt werden, allerdings bezog sich dies meist auf Metallkationen oder Ionenpaare wie NaCl [Ben83, Hil83, Pac87, Sun88].

Für diese Art der Ionisation sind einige Voraussetzungen notwendig. Zum einen muß der Analyt in seiner ionischen Form (d.h. als Salz) im Matrixkristall eingebaut sein. Dies ist sicherlich für Verbindungen wie anorganische Salze oder quaternäre Ammonium- oder Phosphoniumsalze der Fall. Es konnte gezeigt werden, daß die Einführung einer quartären Ammoniumgruppe zu einer 100fach höheren Sensitivität bei der MALDI-Analyse von DNA führt [Gut97, Ber99]. Inwieweit aber auch nicht derivatisierte Biomoleküle ohne Ladungsanker, wie Proteine oder Oligonukleotide, als präformierte Ionen vorliegen, ist unklar. Viele Modelle zur MALDI-Ionisation gehen davon aus, daß die meisten Analyte bereits neutral im Kristall eingebaut sind oder sofort nach dem Laserpuls neutralisiert vorliegen, so daß eine nachfolgende ("chemische") Ionisation erfolgen muß.

Weiterhin müßte im Fall ionischer Analyte eine Freisetzung dieser geladenen Moleküle erreicht werden. Dazu ist eine Ladungstrennung erforderlich. Eine Akkumulation der Laserenergie im Kristall könnte genug Energie zu einer Ladungstrennung liefern, aber auch ein rein mechanisches Aufbrechen eines Festkörpers kann zur Ladungsinduktion führen. Die Ladungstrennung ist aber dann besonders leicht, wenn Ionenpaare schon im Matrixkristall voneinander getrennt vorliegen. Die räumliche Trennung von Kationen und Anionen im Kristall könnte zwar theoretisch alleine durch die Matrix bewirkt werden, aber durch eine Solvatation der Ionen wäre sie energetisch wesentlich günstiger. So hat z.B. selbst Acetonitril bei 20 °C eine relative Dielektrizitätskonstante ( $D_K$ ) von 37.5, und Wasser als sehr polares Lösungsmittel hat eine  $D_K$  von 80.0 [Mer89]. Von den meisten Matrices sind zwar keine  $D_K$ -Werte bekannt, verwandte Moleküle, wie z.B. Salicylsäure, haben aber Dielektrizitätskonstanten von etwa 20.

Dies macht deutlich, daß der Einbau eines Analyten in solvatisierter Form die Ladungstrennung wesentlich begünstigen würde. Zudem hängt diese Frage eng mit der Diskussion zusammen, ob eine Co-Kristallisation von Analyt und Matrix aus einem Lösungsmittel für MALDI eine notwendige Voraussetzung ist. Die Kenntnis des "Startzustands" vor dem eigentlichen MALDI-Prozeß würde somit einen Rückschluß auf mögliche Ionisationswege ermöglichen. Auch das Cluster-Modell stützt sich zumindest teilweise auf die Freisetzung präformierter Ionen, obwohl auch andere Ionisationswege nicht generell ausgeschlossen werden. Da die Frage, in welcher Form Analyte im Kristall eingebaut sind (z.B. Ladungszustand oder Solvatation), von erheblicher Bedeutung und nach wie vor ungeklärt ist, wurden Experimente dazu durchgeführt, die im Ergebnisteil vorgestellt werden (s Kap. D.1).

### C.3.2. Sekundärreaktionen

In MALDI-Spektren tauchen viele Ionen auf, die nicht durch eine der vorgestellten primären Ionisationswege gebildet werden können. Dies trifft sowohl für Matrixmoleküle als auch für Analytionen zu. Die Annahme einer Matrixionisation als initialen Schritt erfordert sogar zwingend eine Ladungsübertragung zum Analyten. Aber auch die meisten anderen Ionen können das Produkt von chemischen Reaktionen bei der Desorption sein. Schon aus der genaueren Untersuchung von Matrixspektren wurde ersichtlich, daß verschiedene Sekundärreaktionen bei MALDI auftreten, da andernfalls die Vielzahl der unterschiedlichen Ionen kaum erklärbar wäre [Ehr92]. Dabei spielt besonders der Protonentransfer eine große Rolle, der sowohl zwischen zwei Matrixmolekülen als auch zwischen Matrix und Analyt erfolgen kann. Die Existenz von Protonentransfer in der bei MALDI entstehenden dichten Molekülwolke (*plume*) ist allgemein akzeptiert, daneben wurde aber auch die Übertragung von Metallkationen, Wasserstoffatomen (Radikale) oder Elektronen diskutiert.

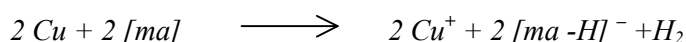
### C.3.2.1. Kationisierung

Es ist bekannt, daß kleine Kationen durch Laserbestrahlung desorbiert werden und sich in der Gasphase an neutrale Moleküle anlagern können [Lle92, Dea93]. Dazu ist prinzipiell keine Matrix erforderlich, allerdings können empfindliche Analyte nicht ohne Matrix in die Gasphase überführt werden. Diese Gasphasen-Kationisierung könnte auch bei MALDI eine Rolle spielen, insbesondere die Anlagerung von Alkalikationen an neutrale, nicht basische Analyten. Oft reichen die immer vorhandenen Verunreinigungen von NaCl und KCl für die Detektion von kationisierten Spezies aus. Die Intensität nimmt aber bei Zugabe von Salzen zu, solange genug Matrixüberschuß vorhanden ist.

Allerdings ist nicht ohne Weiteres zu erkennen, ob wirklich ein Gasphasen-Transfer der Kationen auf die Analytmoleküle stattgefunden hat, oder ob die Addukte bereits im Matrixkristall vorhanden waren (s. auch Kap. C.3.1.3 präformierte Ionen). Deutliche Indizien für das Auftreten von Gasphasen-Kationisierung ergaben Experimente mit einer zeitlich versetzten, MALDI-unabhängigen Desorption von Alkalikationen, die durch Anlagerung an neutral desorbierte Moleküle zu einer wesentlich höheren Signalintensität der kationisierten Analyten führte [Wan93]. Darüber hinaus steigt die Effizienz der Kationisierung bei verzögerter Extraktion, wobei das Optimum je nach Kationendichte bei unterschiedlichen Verzögerungszeiten auftritt [Bel98, Shi99]. Allerdings wurde dieser Effekt auch für protonierte Analyte gefunden, und könnte daher auch mit der besseren Fokussierung und der dadurch besseren Auflösung bei einer optimierten Verzögerungszeit zusammenhängen.

Kationisierte Analyte können auch mit Silber- oder Kupfer-Ionen erhalten werden. Diese größeren Metallkationen lagern sich besonders gut an ungesättigte, unpolare Verbindungen und Aromaten, z.B. Polystyrol, an [Bel96, Dee97, Mow97]. Kupfer-Kationen müssen dazu als einfachgeladenes  $\text{Cu}^+$  vorliegen oder zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden, wenn keine Anlagerung von  $\text{Cu}^{2+}$  an eine negative (deprotonierte) Funktion des Analyten möglich ist. Daher werden Spezies der Form  $[\text{M}+\text{Cu}]^+$  gebildet [Lle92, Leh97, Zen97, Won97], die in dieser Form aber auch mit ESI-MS detektiert werden [Dee97]. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß mehrfach geladene Metallkationen generell nur in kondensierter Phase durch Koordination mit Gegenionen und Solvation bzw. Komplexierung stabil sind. Die zweite Ionisierungsenergie von freien Metallatomen liegt wesentlich höher als die erste Ionisierungsenergie (z.B. 20,3 eV für  $\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}$  gegenüber 7,7 eV für  $\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^+$ ), so daß eine Freisetzung in die Gasphase nur unter Reduktion (z.B. des Solvens) oder unter Beibehaltung der Komplexierung möglich ist. Vermutlich werden daher - bei fehlenden deprotonierten Gruppen im Analyten - auch nur Addukte von einwertigen oder leicht reduzierbaren, edlen Metallen, wie Palladium oder Kupfer, detektiert [Ras98, Ras98a]. Die Reduktion scheint je nach Bedingungen über Ladungsaustausch mit der Matrix oder über Elektroneneinfang zu erfolgen [Kar00, Kno00, Zha03].

Bei Verwendung eines Metallsubstrats ist dagegen eine Oxidation nach folgendem Schema wahrscheinlich, die besonders mit sauren Protonen (Matrix (ma) oder Analyt) ablaufen kann, aber im Endeffekt ebenfalls zu einfach geladenen Metallkationen führt:



Eine solche Reaktion führt zunächst nicht zu einem geladenen Molekül. Erst durch ein zusätzliches Proton oder ein (evtl. anderweitig reduziertes) Kation entstehen Addukte der Form  $[\text{M}+\text{nCu}-\text{nH}+\text{X}]^+$  [Nel91, Won97, Shi99]. Zweifach geladene Metallkationen ( $\text{Me}^{2+}$ ) können dagegen nur in der Form  $[\text{M}+\text{nMe}-(2\text{n}-1)\text{H}]^+$  bzw.  $[\text{M}+\text{nMe}-2\text{nH}+\text{X}]^+$  detektiert werden, so daß eine Gasphasenreaktion ausgeschlossen ist. Bei einfachgeladenen Metallkationen ist aber eine Unterscheidung zwischen Metallanlagerungen (bzw. Reaktion mit dem Analyten) in der Gasphase

oder in Lösung nicht einfach, und es scheinen je nach Bedingungen beide Reaktionen möglich zu sein [Kno98a]. Lehmann et al. kristallisierten  $\text{Cu}(\text{TFA})_2$  aus Wasser auf eine Schicht aus Dithranol/Polystyrol, und schlossen aus der auftretenden Cu-angelagerten Polymerverteilung, daß eine Gasphasen-Reaktion stattgefunden haben müßte [Leh97]. Eine Rekrystallisation der obersten Schicht, wie sie bei der Dünnschichtpräparation diskutiert wurde [Vor94], wäre aber ebenso möglich.

Rashidzadeh et al. fanden, daß nicht nur die Art des Kations, sondern auch die Matrix einen Einfluß auf die Kationisation von Polyethylenglykolen hat [Ras00]. Je nach Matrix ergab entweder  $\text{Li}^+$  oder das wesentlich größere  $\text{Cs}^+$  die höhere Signalintensität. In der Gasphase sollte aber in jedem Fall  $\text{Cs}^+$  die höhere Affinität zu Polymeren haben, daher deutet auch dieser Befund auf die Existenz von zwei verschiedene Mechanismen der Ionenbildung. Das würde bedeuten, daß sowohl die Matrix als auch die Löslichkeit des Salzes ganz entscheidend beeinflussen, ob eine Kationenanlagerung schon im Kristall möglich ist oder erst in der Gasphase erfolgt. Zusätzlich spielt bei Polymeren auch die Polarität bzw. Acidität der Endgruppen eine Rolle [Bel96].

Eine Möglichkeit zur Unterscheidung von präformierten Ionen und Reaktionen in der Gasphase bietet die Bestimmung der initialen Geschwindigkeit (s. Kap C.2.3.1). Bei LDI werden generell Geschwindigkeiten von nahezu Null ermittelt. Dies ist aber auch für kleine, kationisierte Neutalmoleküle bei MALDI der Fall, so daß für diese ein Gasphasenmechanismus wahrscheinlich erscheint [Glü99, Glü01a]. Mit zunehmender Analytmasse steigt dagegen die initiale Ionengeschwindigkeit bis zu einem matrixspezifischen Grenzwert an, der für alle anderen gebildeten Ionen gilt [Kar03]. Auch die von Glückmann et al. beschriebene Detektion von kationisierten Oligosacchariden bei Ausschluß einer Co-Kristallisation (s. Kap. C.1.3) ist ein starkes Indiz für eine Gasphasen-Kationisierung, die neben der Bildung von präformierte Addukten auftreten kann [Glü01].

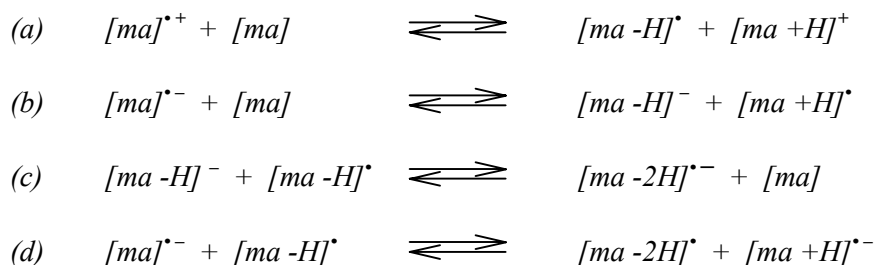
Kationen könnten im Prinzip auch von kationisierten Matrixmolekülen auf neutrale Analytmoleküle übertragen werden. Umgekehrt könnten aber auch Metallkationen in einer Konkurrenzreaktion durch die Matrix gebunden werden. Um mögliche Gasphasen-Reaktionen abschätzen zu können, wurden kürzlich Alkaliionen-Affinitäten von Matrixmolekülen sowohl experimentell [Zha02] als auch durch ab-initio Berechnungen [Oha02] bestimmt. Die Natrium-Basizitäten von MALDI-Matrizes liegen bei 140-170 kJ/mol, und sie weisen keinerlei Bezug zu den Protonenaffinitäten auf. Da viele Analyte wie z.B. Peptide, aber besonders Oligosaccharide und –nukleotide, eine höhere Affinität zu Natrium aufweisen, wäre eine Kationenübertragung um etwa 15-40 kJ/mol exergonisch. Auch die Tatsache, daß besonders geeignete Matrizes für die Analyse von kationisierten Verbindungen, wie z.B. Dithranol oder 3-Aminochinolin, die geringsten Natrium-Affinitäten aufweisen, deutet in diese Richtung. Allerdings dürfte die relative Reihenfolge der Natrium-Affinitäten in Lösung vergleichbar sein, so daß eine Kationisierung in Lösung zu einem ähnlichen Resultat führen würde. Im Falle einer Gasphasenreaktion bei MALDI ist aber bis jetzt unklar, ob diese wie bei LDI durch freie Metallkationen oder via kationisierte Matrix erfolgt.

### C.3.2.2. Protonentransfer

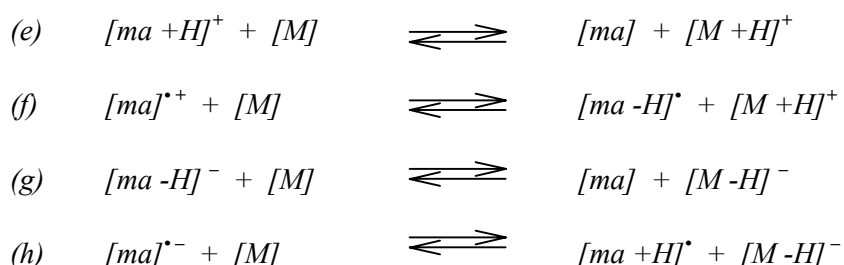
Protonentransfer spielt in fast allen Ansätzen zur Erklärung von MALDI eine zentrale Rolle [Ehr92, Zen98]. Ein starkes Indiz für Protonentransfer ist die zeitlich und räumlich parallele Abnahme von Matrixionen-Intensität auf Kosten von Analytionen, die Bökelmann und Spengler bei ihren orts- und zeitaufgelösten Aufnahmen der Ionenintensitäten fanden [Bök95]. Demnach ist die Hauptfrage weniger, ob Protonentransfer überhaupt auftritt, sondern eher, welche Rolle er im Gesamtprozeß spielt und wann, wo und wie er erfolgt. Es ist keineswegs selbstverständlich, daß die Ionisation des Analyten wie allgemein angenommen durch Protonierung bzw. Deprotonierung durch

die Matrix zustande kommt. Meist ging man von Gasphasenreaktionen aus. Protonierungen in kondensierter Phase, also in der Lösung oder im Kristall bzw. in Kristallbruchstücken (Clustern) nach dem Laserpuls, könnten aber ebenfalls eine Rolle spielen. Eine Reihe von Cluster-Experimenten zeigte, daß ein Protonentransfer von der (angeregten) Matrix zum Analyten prinzipiell möglich ist [Kru95, Mef95, Lan98, Lan01, Mef01].

Protonentransfer kann auch zwischen zwei Matrixmolekülen (ma) auftreten: <sup>13</sup>



Die erste Reaktion (a) erklärt die Bildung von protonierter Matrix bei der Photoionisation und ermöglicht die nachfolgende Protonierung von Analyten durch protonierte Matrix (e). Das entstehende Radikal ist bei den meisten Matrizes ein relativ stabiles Semichinon. Es soll hier betont werden, daß auch nicht-saure Matrizes  $[ma+H]^+$ -Matrixionen bilden können, z.B. durch Protonierung der Carbonylgruppe. In Übereinstimmung damit sind weder die Carboxyl- noch die Hydroxylfunktion der Matrix eine notwendige Voraussetzung für MALDI [Gri96, Won98]. Ehring fand, daß nur solche Moleküle ausgeprägte Matrixeigenschaften aufweisen, die sowohl  $[ma]^{*+}$  als auch  $[ma+H]^+$  bilden [Ehr92]. Dies legt eine leichte Konversion zwischen diesen Matrixspezies nahe, zu der andere Reaktionen unter Beteiligung von Analyten in Konkurrenz treten könnten. Auch für die Protonierung bzw. Deprotonierung von Analyten (M) durch die Matrix (ma) gibt es mehrere Möglichkeiten:



Zur Abschätzung möglicher Reaktionen sind thermodynamische Daten der beteiligten Verbindungen hilfreich, die in den letzten Jahren insbesondere durch massenspektrometrische Methoden (z.B. durch Zerfallsreaktionen von protonengebundenen Dimeren oder durch Vergleichsreaktionen mit einer Referenzbase) zunehmend zur Verfügung stehen. Dabei muß man beachten, daß oft nur die Reaktionsenthalpie und damit die Protonenaffinität (PA) bestimmt werden konnte, obwohl der entropische Term bei Gasphasenreaktionen häufig nicht vernachlässigt werden kann. Die freie Reaktionsenthalpie und die daraus erhaltenen Gasphasenbasizitäten (GB) enthalten dagegen den Entropie-Anteil. Vergleicht man jedoch zwei ähnliche Reaktionen miteinander, ist die Entropieänderung normalerweise in derselben Größenordnung und kann dann in erster Näherung vernachlässigt werden. Eine Übersicht über thermochemische Aspekte des Protonentransfers wurde kürzlich veröffentlicht [Gal01].

<sup>13</sup> Die Reaktionen sind aber ebenso durch Übertragung eines neutralen H-Atoms erklärbar.

Die GB der meisten Matrices liegt zwischen 800 und 900 kJ/mol, die PA liegen ca. 30 kJ/mol höher [Jør98, Bur97, Mor00]. Da einige Analyten, wie z.B. basische Peptide [Har97], aber auch Nukleotide [Gre00], höhere GB bis zu 1000 kJ/mol aufweisen, wäre eine Protonierung dieser Verbindungen durch die Matrix denkbar. Im Falle von stark basischen Analyten, z.B. Arginin-, Histidin oder Lysinreste eines Peptids, sind die ersten beiden Reaktionen (*e, f*) exergonisch. In Übereinstimmung damit korreliert die Signalintensität bei Peptiden mit der Gasphasenbasizität der Aminosäurereste (Arginin > Histidin > Lysin) [Olu95] und mit der Acidität der Matrix [Gim97]. Konsequenterweise sind bei tryptischen Peptiden die bei Arginin gespaltenen Peptide gegenüber den Lysin enthaltenen Peptiden überrepräsentiert [Kra99], und eine Derivatisierung von Lysinresten zu Homoarginin führt zu einer höheren Sequenzabdeckung [Hal00]. Zhu et al. erklärten diese Abhängigkeit von der Analyt-Basizität dagegen anhand in Lösung gebildeter, präformierter Ionen [Zhu95].

Die Deprotonierung von Analyten durch Matrix-Anionen (*g, h*) ist dagegen nur bei relativ sauren Verbindungen möglich. So ist diese Reaktion z.B. im Falle von Nukleotiden um etwa 100-200 kJ/mol exergonisch [Bre99]. Bei Peptiden ist die Energiebilanz dagegen nahezu ausgeglichen, da auch Matrixanionen meist schwach basisch sind (z.B. als Carboxylat). Aufgrund der negativen Ladung ist die GB von Anionen wesentlich höher als die von neutralen Molekülen. Die Protonierung von Anionen bzw. negativen funktionellen Gruppen durch positive Matrixmoleküle ist daher in jedem Fall exergonisch. In diese Richtung deutet z.B. die zeitabhängige Neutralisation von negativen Oligonukleotid-Ionen, die von Jones et al. beobachtet wurde [Jon93a]. Generell muß bei Oligonukleotiden eine Neutralisation des polyanionischen Rückgrates erfolgen, da sonst keine einfachgeladenen Ionen möglich wären. Dies wird normalerweise durch die Zugabe von Ammoniumsalzen erreicht, und die PA des korrespondierenden Amins scheint in der Tat eine Rolle zu spielen [Sim98]. Zu einer wesentlich erhöhten Sensitivität führt auch die Alkylierung der Phosphatgruppen, besonders bei gleichzeitiger Einführung eines Ladungsankers [Gut97, Ber99]. Chou et al. schlossen daraus, daß die Matrix am DNA-Rückgrat koordiniert ist und daß die besonders effiziente MALDI-Analyse von DNA mit 3-HPA auf eine bevorzugte Koordination zurückzuführen ist [Cho99].

Die GB von Matrix-Anionen liegen mit 1300 bis 1380 kJ/mol (Carbonsäuren) und maximal 1450 kJ/mol (Amine) in vergleichbarer Größenordnung wie bei anderen organischen Anionen [Bre99]. Daher wäre auch eine Neutralisation eines Ionenpaares Analytkation/Matrixanion je nach Basizität der protonierten Funktion im Analyten nur schwach endergonisch oder sogar exergonisch. Anionische Matrix-Dimere haben eine etwa 100 kJ/mol geringere GB [Br99a]. Korrespondierende Basen von sehr starken Säuren besitzen eine für Anionen besonders geringe GB (bis etwa 1180 kJ/mol), so daß Neutralisationsreaktionen je nach Gegenion stärker endergonisch werden können. Dies läßt sich zur Abschätzung von MALDI-Prozessen ausnutzen, und Experimente mit diesen schwach basischen Anionen werden im Ergebnisteil vorgestellt (s. Kap. D.3).

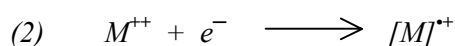
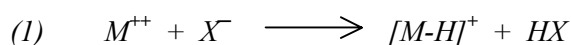
### C.3.2.3. Elektronentransfer und –einfang

Elektronenübertragung bzw. Elektroneneinfang spielte schon bei den von Ehring postulierten Reaktionsmechanismen eine große Rolle [Ehr92]. Insbesondere die Bildung von  $[ma]^{-}$  der Matrix, das ein Vorläufer von  $[ma-H]^{-}$  sein könnte, wurde durch Elektronenanlagerung erklärt. Das Ion  $[ma-H]^{-}$  könnte aber auch aus dem Semichinonradikal  $[ma-H]^{\bullet}$  durch Elektronenanlagerung entstehen. Quist et al. fanden -im Gegensatz zum positiven Ionenmodus- keine Schwelle für die Detektion von Signalen im negativen Ionenmodus, und führten dies auf die Bildung von Photoelektronen zurück [Qui94]. In der Tat werden bei einer Flugzeit von ca. 6 ns im MALDI-TOF-Massenspektrometer hohe Signalintensitäten detektiert, die nur von Elektronen stammen können [Sch99]. Ein Vergleich

mit der theoretischen Flugzeit bestätigte dies, und darüber hinaus verschwand dieses Signal durch Anbringen eines kleinen Magneten am Flugrohr. Allerdings wurden auch ohne Matrixpräparation direkt vom metallischen Probeneller Elektronen detektiert. Kürzlich wurde berichtet, daß die meisten Elektronen vermutlich durch einen photoelektrischen Effekt aus der Metalloberfläche freigesetzt werden [Fra02, Gor02]. Die Elektronen wurden durch Anlagerung an SF<sub>6</sub> als SF<sub>6</sub><sup>-</sup> nachgewiesen. Sie hatten eine kinetische Energie von 0-2 eV und eine breite Geschwindigkeitsverteilung mit einem Maximum >8000 m/s. Allerdings konnten bei diesem Versuch keine Elektronen direkt von der matrixfreien Metalloberfläche nachgewiesen werden. Die Autoren fanden außerdem, daß bei dünnen Matrixschichten besonders viele Elektronen entstehen, und erklärten dies mit einer Erniedrigung der Austrittsarbeit des Metalls durch die Matrix. Dagegen wurden bei dicken Matrixschichten oder nichtmetallischen Oberflächen erheblich weniger Elektronen detektiert. Demnach könnten [M-H]<sup>-</sup> Ionen der Matrix tatsächlich durch dissoziativen Elektroneneinfang entstehen. Daß dies prinzipiell möglich ist, konnte kürzlich mittels ECNI-MS (*electron capture negative ion mass spectrometry*) gezeigt werden [Asf02].

Obwohl bei MALDI in jedem Fall freie Elektronen gebildet werden, ist damit nicht klar, ob diese auch von der Matrix oder von Analyten eingefangen werden können, zumal dies generell nur mit langsamen Elektronen möglich ist [Zub98, Zub00] und Elektronen aufgrund der extrem niedrigen Masse auch bei kleinen Spannungen sofort aus der Teilchenwolke verschwinden sollten. Das Interesse an der Rolle von Elektronen in MALDI wurde im Zusammenhang mit dem Cluster-Modell neu geweckt, da dort ein Elektroneneinfang als eine Möglichkeit für eine Ladungsreduktion mehrfach geladener Vorläufer diskutiert wurde [Kar00]. Auch bestimmte, sehr schnelle Arten der Fragmentierung, die bereits in der Ionenquelle unmittelbar nach dem Laserpuls stattfinden (In-source decay, ISD) [Bro95a, Bro96, Bro97a], könnten durch Elektroneneinfang verursacht werden.

Die Neutralisation durch Elektronen konnte einwandfrei nachgewiesen werden, allerdings ist nicht klar, ob bei diesen Reaktionen wirklich ein Einfang freier Elektronen stattfindet oder ob ein Elektronentransfer von anderen Molekülen erfolgt. Die Elektronenaufnahme konnte im Wesentlichen an zwei Beispielen festgemacht werden [Sch99, Kar00, Glü01a]: Zum einen wurden Moleküle mit zwei quartären Ammonium- oder Phosphoniumgruppen ("Diquats") mit MALDI untersucht. Dabei wurden immer einfach geladenen Ionen detektiert. Mit Elektrospray erhält man dagegen zweifach geladene Diquats. Je nach Struktur sind mehr oder weniger Radikalkationen im MALDI-Spektrum zu finden. Zur Ladungsreduktion sind prinzipiell folgende Reaktionen möglich:



Die resultierenden Analytionen unterscheiden sich demnach in ihrer Masse um 1 Da. Bei Molekülen, die keine  $\alpha$ -H-Atome besitzen und bei denen daher der Eliminationsmechanismus (1) nicht möglich ist, wurde in der Tat nur das Radikalkation detektiert (s. Abb. C.3.2.1).

Das zweite Beispiel dieser Art ist ein vierkerniger Komplex von organischen Liganden mit Metallkationen (4 Co<sup>2+</sup>) [Han97]. Die Ladung des Gesamtkomplexes beträgt +8 und wird durch acht schwach koordinierende PF<sub>6</sub><sup>-</sup>- oder BF<sub>4</sub><sup>-</sup>-Anionen kompensiert (s. Abb. C.3.2.2). In der ESI-MS wird dieser Komplex mit einer Ladungsverteilung detektiert, die einem mittleren Ladungszustand von +2 bis +5 entspricht [Nie02]. Die übrigen positiven Ladungen des Komplexes sind nach wie vor durch Gegenionen kompensiert, so daß z.B. der 5-fach geladene Komplex noch drei Anionen enthält. Bei MALDI werden dagegen nur einfachgeladene Komplexe detektiert [Sch99, Kar00,



Glü01a]. Diese enthalten aber ebenfalls noch Gegenionen, so daß eine Verteilung von einfachgeladenen Komplexen mit einer unterschiedlichen Zahl angelagerter Anionen entsteht. Die Ladungsreduktion kann in diesem Fall nur durch Elektronen erfolgt sein. Eine Unterscheidung zwischen einem Einfang von freien Elektronen oder einem Elektronentransfer, z.B. vom Gegenion, ist anhand der Spektren aber nicht möglich.

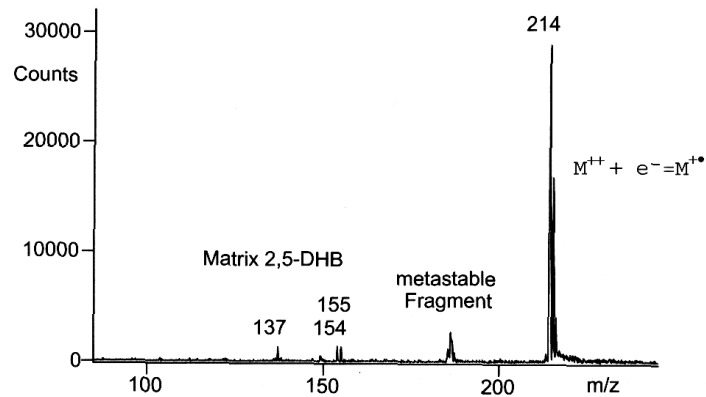


Abbildung C.3.2.1 : MALDI-Spektrum (2,5-DHB) von Ethylviologendibromid. (Reproduziert aus [Kar00]).

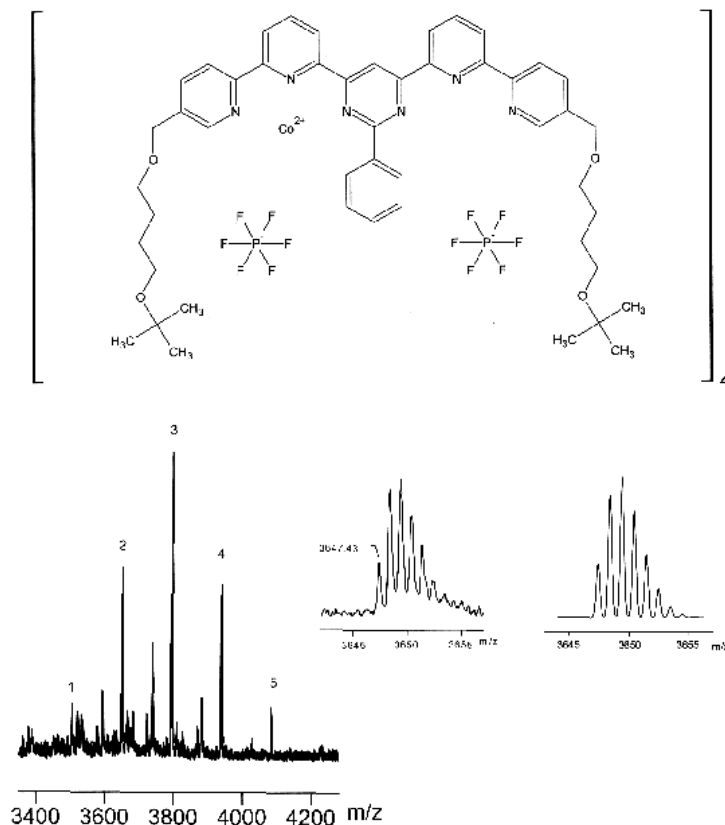


Abbildung C.3.2.2 : MALDI-Spektrum ( $\alpha$ CHCA-Amid) eines Komplexes aus 4 Liganden, 4 Metallkationen ( $\text{Co}^{2+}$ ) und 8 Gegenionen ( $\text{PF}_6^-$ ) (s. Strukturformel). Die Zahlen im Spektrum geben die Zahl der  $\text{PF}_6^-$ -Anionen an. Die Ausschnitte zeigen die gemessenen (links) und berechneten (rechts) Isotopenmuster des Peaks Nr. 2. (Reproduziert aus [Kar00]).

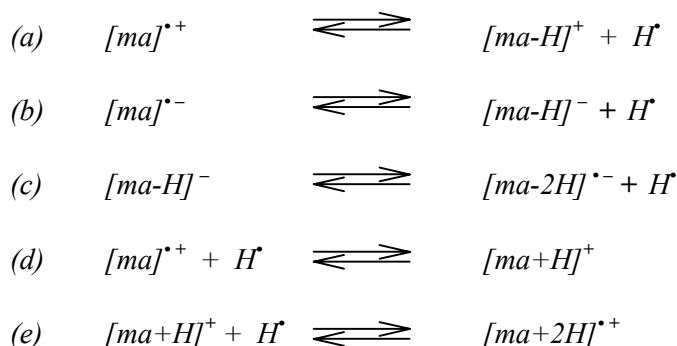
Die Elektronenanlagerung wird in speziellen Fällen auch zur Analyse von besonders empfindlichen Analyten herangezogen. So können z.B. substituierte Fullerene mit einer speziellen unpolaren und nicht aciden Matrix analysiert werden [Ulm00, Bro01]. Dabei entstehen sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus nur Radikale, vermutlich durch Photoionisation und Elektronenanlagerung. Auch Schwefel eignet sich zur Analyse von Fullerenen, vermutlich aus ähnlichen Gründen [Str02]. Kürzlich wurde aber anhand von doppelt geladenen Porphyrinen gezeigt, daß auch mit konventioneller MALDI und mit FAB nahezu die gleichen, elektronenreduzierten Fullerene entstehen [Sch01]. Die Elektronenreduktion von Molekülen mit hoher Elektronenaffinität scheint also eine Eigenschaft aller Desorptionstechniken zu sein.

Allerdings bleibt nach wie vor die Frage, ob eine Elektronenreduktion auch bei Biomolekülen stattfindet und nicht nur auf spezielle Analyte begrenzt ist. Radikalanionen sind nur in Ausnahmefällen stabil und werden daher nur in seltenen Fällen, wie z.B. metallhaltigen Porphyrinringen, detektiert [Con01]. In allen anderen Fällen erfolgen Sekundärreaktionen, die entweder zu deprotonierten Molekülen oder zu Fragmentierungen führen. Da aber ein Elektroneneinfang bevorzugt zu einer Neutralisation von positiven Ladungen führen sollte, sollte prinzipiell der Zusatz eines Elektronenfängers zu einer höheren Signalintensität und zu einer Erhöhung des Ladungszustands der Analyte im positiven Ionenmodus führen. Bisher konnte dieser Effekt aber nicht nachgewiesen werden, auch wenn die kürzlich berichtete Steigerung der Signalintensität bei Zusatz von elementarem Iod auf einen Elektroneneinfang zurückzuführen sein könnte [Bas02]. Experimente und Überlegungen dazu werden im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt (s. Kap. D.2).

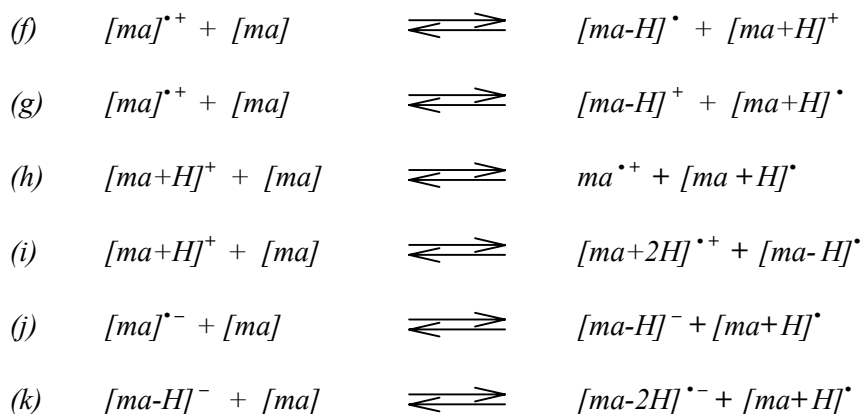
#### C.3.2.4. Transfer von Wasserstoff-Radikalen

Nicht alle mit MALDI detektierten Ionen können durch Säure-Base-Reaktionen oder Elektronentransfer erklärt werden. Das Auftreten von radikalischen Matrix-Spezies wurde schon früh mit der Übertragung von H-Atomen in Verbindung gebracht [Ehr92]. Besonders phenolische H-Atome können leicht übertragen werden, was z.B. durch Laserbestrahlung von Phenol-Ammoniak-Clustern nachgewiesen wurde [Gré00]. Dieser  $H^\bullet$ -Transfer kann zwar direkt zwischen zwei Molekülen stattfinden, es könnten aber auch freie H-Radikale gebildet werden, die dann weiter reagieren. Die Bildung von freien H-Atomen bei MALDI wurde von Scott et al. durch eine Multiphotonen-Nachionisation nachgewiesen [Sco94].

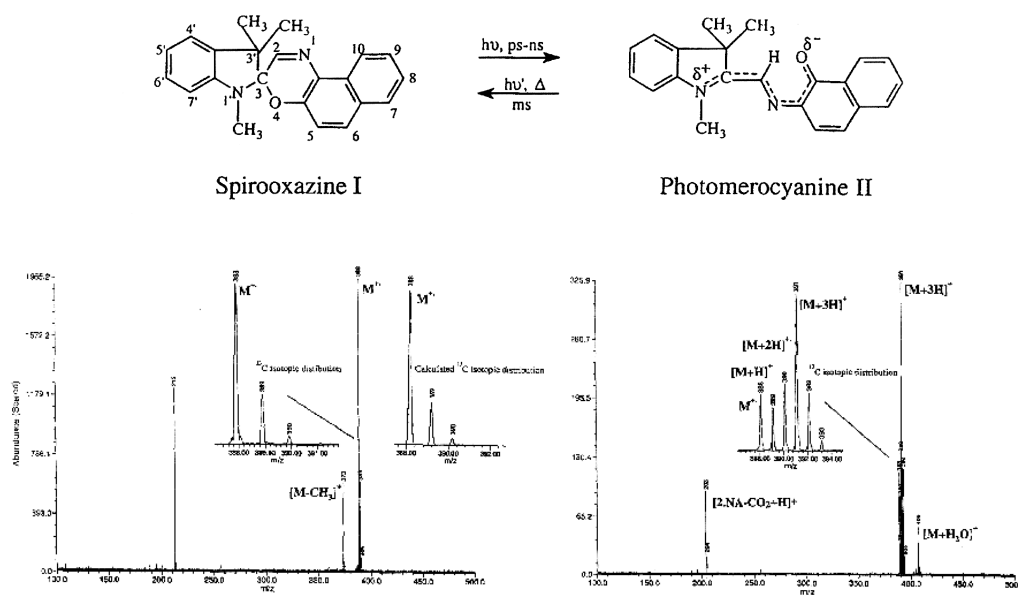
Matrixmoleküle könnten entweder ein  $H^\bullet$  aufnehmen oder abgeben. Dabei ist die Trennung von Ladung und Radikal energetisch besonders günstig:



Auch für die direkte H-Übertragung zwischen zwei Matrixmolekülen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Viele dieser Matrixspezies werden auch tatsächlich in MALDI-Spektren detektiert, so z.B.  $[M-2H]^{*-}$  bei 2,5-DHB. Einigen der Reaktionen ( $f, j$ ) könnte aber auch ein Protonentransfer zugrundeliegen.

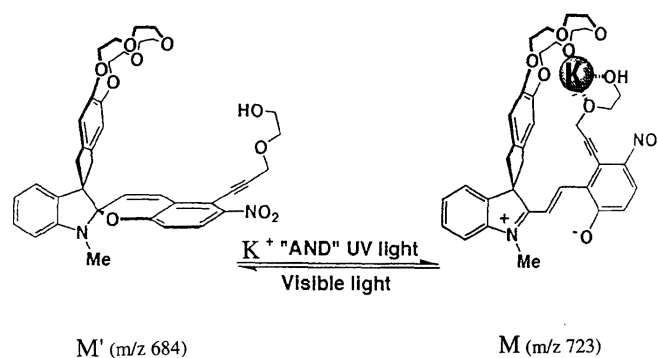


Prinzipiell können diese Reaktionen auch mit Analyten ablaufen. Reduktionen in Form von Hydrierungen werden auch in der Tat bei einigen Substanzen beobachtet. So können durch Addition von Wasserstoff Spezies wie  $[M+2H]^{\bullet+}$  oder  $[M+3H]^+$  entstehen. Selbst bei Biomolekülen kann eine solche Reduktion erfolgen. Koomen und Russell fanden anhand des Isotopenmusters eine mehrfache Addition von Wasserstoff (bis zu vier H) an Cytosin, die aber nur mit der Matrix 2,5-DHB und nicht mit 3-HPA zu beobachten war [Koo00a]. Reduktionen durch Wasserstoff werden aber auch in anderen Desorptionstechniken wie FAB oder SIMS gefunden [Cer85, Gal86, Sch00]. Ein besonders interessantes Beispiel eines H-Atom-Transfers bei MALDI ist die von Calba et al. publizierte Analyse von photochromen Spiro-Verbindungen [Cal97, Cal98]. Hier zeigte sich, daß die Reduktion in jedem Fall durch die Matrix (Nicotinsäure) erfolgt, da mit MALDI  $[M+3H]^+$  als Hauptpeak detektiert wurde, während mit LDI ohne Matrix das Radikalkation entstand. Bei elektronischer Anregung zeigen diese Verbindungen durch Ringöffnung einen Farbumschlag, das zwitterionische Intermediat wird bei MALDI reduziert. Die Reduktion unterblieb bei Verwendung von Nicotinsäuremethylester, so daß der Wasserstoff augenscheinlich von der Carboxylgruppe stammt, was auch durch Deuterierung bestätigt wurde (s. Abb. C.3.2.3).



**Abbildung C.3.2.3 :** LDI-Spektrum (links) und MALDI-Spektrum (rechts, Nicotinsäure) der Spiroverbindung I bzw. II. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Region des Molekülions, die nur bei LDI mit der theoretischen Isotopenverteilung eines Radikalkations übereinstimmt (Reproduziert aus [Cal97].)

Bei einer weiteren Verbindung mit einer zusätzlichen Kronenetherstruktur kann die offene Konformation durch Alkalkationen stabilisiert werden, so daß die Reaktion bei genügend hohen  $K^+$ -Konzentrationen irreversibel wird (s. Abb. C.3.2.4). Solange dies der Fall ist, wird mit MALDI ebenfalls eine Reduktion beobachtet. Sind aber nur wenig Alkalkationen in Lösung, wird die offene Form nicht mehr stabilisiert und ein H-Atom-transfer ist nicht mehr möglich. Dennoch werden kationisierte Moleküle der geschlossenen Form detektiert, die aber vermutlich durch einen Gasphasen-Mechanismus gebildet werden (s. Kap. C.3.2.1).



**Abbildung C.3.2.4 :** Gleichgewicht zwischen geschlossener und offener Form des Spiro-Kronenethers. Durch Kalium-Einlagerung wird die Rückreaktion irreversibel. (Reproduziert aus [Cal98].)

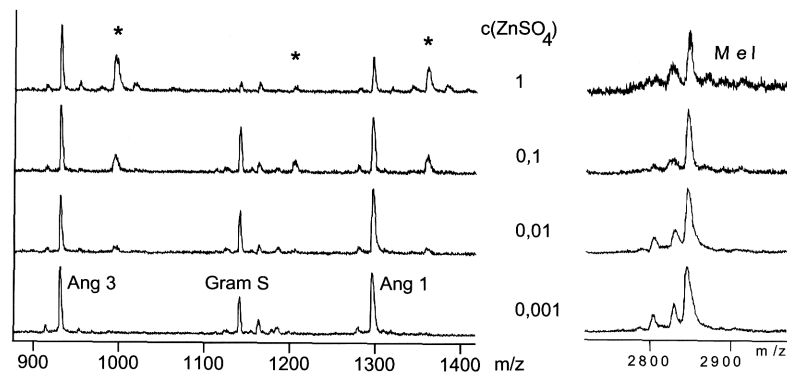
### C.3.3. Adduktbildung

Auch wenn es meistens gelingt, Analyte frei von Anlagerungen zu detektieren, ist die Bildung von Addukten eine generelle Eigenschaft von MALDI. Dabei ist das Ausmaß und die Art der Adduktbildung je nach Verbindung unterschiedlich. Die Adduktbildung kann dabei entweder selbst zur Ionisation der Analyte führen (z.B. als  $[M+Na]^+$ ), sie kann aber auch zusätzlich bei anderweitig ionisierten Molekülen auftreten (z.B. bei protonierten Spezies als  $[M+nX+H]^+$ ). Die Existenz von präformierten Addukt-Ionen bei MALDI wurde erstmals von Nelson und Hutchens für die Bildung von kationisierten Analyten postuliert, da sie bei Verwendung eines Kupfer-Probentellers  $Cu^+$ -angelagerte Moleküle der Form  $[M+nCu-(n-1)H]^+$  fanden, die auch nach dem Waschen nicht verschwanden [Nel91]. Diese Addukte sind am leichtesten durch Anlagerung einfach geladener (reduzierter) Cu-Kationen an negativ geladene funktionelle Gruppen des Analyten bei der Probenpräparation zu erklären, in diesem Fall deprotonierte Histidin-Reste (a). Auch von anderen Autoren wurde die Existenz dieser präformierten, kationenangelagerten Moleküle in der Matrix postuliert, wobei mit unedleren zweiwertigen Metallen (z.B.  $Zn^{2+}$ ) eher (nicht-reduzierte) Spezies der Form  $[M+nMe-(2n-1)H]^+$  detektiert werden [Ehr96, Leh97, Won97] (b).



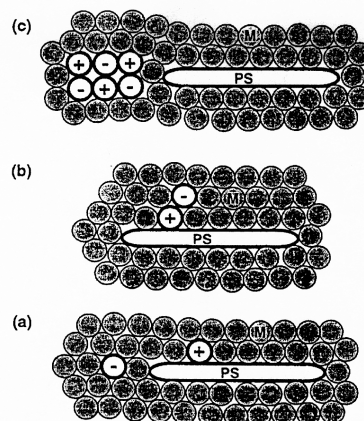
Die von einigen Autoren gefundene Spezifität von divalenten Metallkationen zu bestimmten Peptiden ("Zinkfinger-Motiv") [Sal98a, Leh99, Mas99] ist insofern nur dann spezifisch, wenn sie besonders ausgeprägt ist oder gleichzeitig eine Proteinassoziation induziert wird. Eine unspezifische Anlagerung wird auch mit anderen Peptiden beobachtet, die saure Gruppen tragen (s. Abb. C.3.3.1). Auch bei anderen sauren Verbindungen wie z.B. Oligonukleotiden wurden solche Anlagerungen gefunden, z.B. mit Eisen als  $[M+Fe-3H]^-$  und  $[M+2Fe-5H]^-$  [Chr96]. Konsequenterweise werden bei Oligonukleotiden aufgrund der stark sauren Gruppen, die mindestens bis pH 2 deprotoniert

vorliegen, besonders intensive Natrium-Anlagerungen beobachtet, so daß normalerweise eine Präparation mit Hilfe von Kationentauschern notwendig ist, um die Adduktbildung zu reduzieren.



**Abbildung C.3.3.1** : MALDI Spektren (2,5-DHB) einer Peptidmischung mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen Zinksulfat (Ang = Angiotensin, Gram = Gramicidin, Mel = Melittin). (Reproduziert aus [Kar00]).

Für eine Freisetzung der Addukte ist die Verteilung der Ionen in der Matrix wesentlich. Die Ionen können theoretisch als getrennte Ionen oder als Ionenpaare in der Matrix eingebaut sein. Dies trifft auch für den Fall eines neutralen Analyten zu, wenn eine Ionisierung über Kationisierung oder Anionisierung erfolgt. Die verschiedenen Möglichkeiten für den Fall eines neutralen Analyten (Polystyrol) sind in Abb. C.3.3.2 dargestellt.

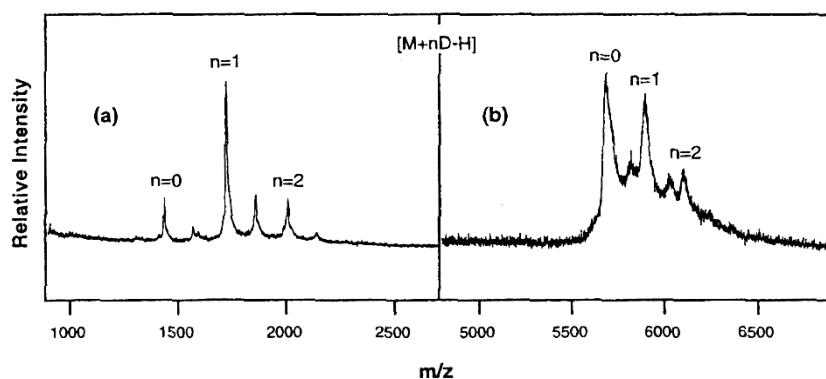


**Abbildung C.3.3.2** : Schematische Darstellung verschiedener Möglichkeiten der Kristallisation einer Mischung aus Polystyrol, Matrix und ionisierendem Salz (reproduziert aus [Leh97]).

Es können bei der Anlagerung von Metallkationen formal auch mehrfachgeladene Spezies entstehen, aber dann werden diese Ladungen fast immer durch Gegenionen kompensiert, so daß nur einfachgeladene Addukte detektiert werden. Diese Adduktbildung wurde auch für die schlechtere Auflösung bei hohen Salzkonzentrationen verantwortlich gemacht [Dub96]. Interessanterweise spielt bei der Kationisierung auch die Art des Anions eine Rolle, was auf Unterschiede bei der Ladungstrennung hindeutet [Hob98]. Metallkationen können aber auch an neutrale Moleküle schon in Lösung oder im Kristall angelagert werden (z.B. bei neutralen Polymeren und Zuckern). Insofern beweist die Bildung eines kationisierten Methylesters keine Gasphasen-Reaktion [Lia95].

Neben der Anlagerung von Metallkationen als häufigster Form der Adduktbildung werden teilweise auch andere Anlagerungen beobachtet. Dazu zählen Matrixanlagerungen, die prinzipiell

sowohl in neutraler Form als auch ionisch in Form von Ionenpaaren denkbar sind [Bea89b], aber auch die bei hoher Analytkonzentration auftretenden Analyt-Multimere [Kin97]. Dagegen werden Anionenaddukte nur äußerst selten detektiert. Beispiele hierfür sind Addukte von negativ geladenen Farbstoffen (sulfonierte Aromaten) mit mehrfach protonierten Proteinen, die von Zenobi und Mitarbeitern nachgewiesen wurden (s. Abb. C.3.3.3) [Sal98, Fri01, Fri02]. Das Auftreten dieser Addukte konnte mit der Anzahl der Argininreste im Protein korreliert werden, was mit der hohen Affinität der Farbstoffe zu Arginin-Resten erklärt wurde, die auch mit Elektrospray gefunden wurde [Ray01]. Außerdem konnten die Autoren zeigen, daß die Konformation des Analyten einen Einfluß auf die Zahl der detektierbaren Anlagerungen hat, wobei unter nativen Bedingungen weniger Addukte erscheinen.



**Abbildung C.3.3.3** : Negativ-Ionen MALDI-Spektren (Matrix: 4-Nitroanilin) von (a) Bombesin und (b) Insulin unter Zusatz von Naphthalen-2-sulfonsäure (reproduziert aus [Fri01]).

Dabei muß betont werden, daß andere Anionenaddukte, die in MALDI Spektren nicht zu sehen sind, nicht generell instabil sind und daher mit der (schonenderen) ESI-MS auch detektiert werden [Mir94, Wan96, Sch00a, Cai02]. Eine Ionisation der Analyte durch Anlagerung eines Anions an neutrale Moleküle (Anionisierung) wird bei der MALDI-MS noch seltener beobachtet und bleibt auf Spezialfälle beschränkt. Breuker et al. detektierten halogenid-angelagerte Moleküle mit einer speziellen, MALDI-ähnlichen Präparationsmethode, bei der Silicon-Partikel zur Lasereinkopplung und Tetrabutylammonium-Salze zur Ionisation gemischt wurden [Bre98]. Wong et al. analysierten Oligosaccharide unter Zusatz von Schwefelsäure bzw. Sulfonsäuren und erhielten so sulfatierte bzw. sulfonierte Moleküle [Won99, Won00].

Die zur Adduktbildung notwendige interionische Wechselwirkung kann dadurch erhöht werden, daß Polykationen mit Polyanionen assoziiert sind. Ein sehr interessantes Beispiel dafür wurde von Juhasz und Biemann vorgestellt [Juh94]. Durch Zusatz von stark basischen Peptiden und Proteinen konnten saure Verbindungen, wie Oligonukleotide, oxidierte Peptide, mehrfach sulfonierten Verbindungen wie Heparine (Oligosaccharide) oder Suramin, in Form ihrer Addukte mit MALDI analysiert werden (s. Abb. C.3.3.4). Besonders effektiv war dies bei einer ähnlichen Masse und Anzahl der Ladungen der assoziierten basischen und sauren Verbindungen. In erster Linie wurden bei diesem Ansatz die 1:1-Addukte gefunden. Andere Stöchiometrien treten zwar auf, sind aber anscheinend ungünstiger. Zudem ist die Effektivität der Adduktbildung stark matrixabhängig. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß es bei der Assoziation nicht nur auf die Zahl der basischen Stellen, sondern auch auf deren relative Lage ankommt, so daß mit dem Motiv Arg-Arg ein besonders hoher Komplexierungsgrad erreicht wird [Woo01].

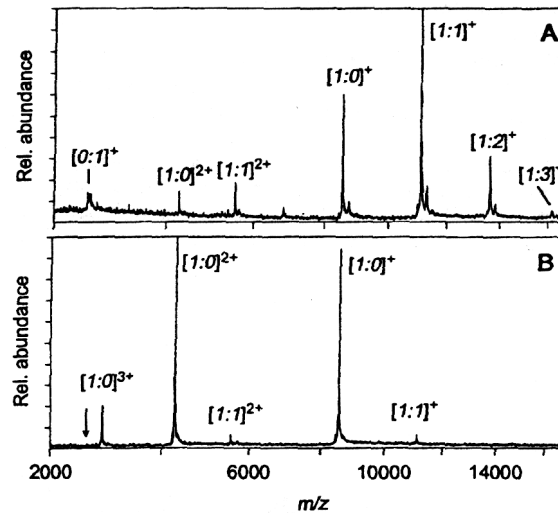


Abbildung C.3.3.4 : MALDI Spektren einer äquimolaren Mischung von Rinderinsulin und ihrer oxidierten A-Kette mit (A) Sinapinsäure und (B)  $\alpha$ CHCA (reproduziert aus [Juh94])

Auch bei der Analyse von nicht-kovalenten Komplexen werden im Prinzip Addukte detektiert. Obwohl die Analyse von ionischen Komplexen mit MALDI nicht einfach ist und dafür besonders schonende Bedingungen notwendig sind, gibt es eine Reihe von Arbeiten zu diesem Thema. Es wurden sowohl ionische Protein-Protein-Komplexe [Ros95, Mon97], metallgebundene Protein-Protein-Komplexe [Woo95, Vog99] als auch andere nichtkovalente Verbindungen, wie z.B. RNA-Peptid-Komplexe [Thi98] oder Komplexe zwischen Calixarenen und Aminosäuren [Sto02], untersucht. Besonders geeignet sind dafür die Matrices 3-HPA und 2,6-Dihydroxyacetophenon (s. Abb. C.3.3.5) [Coh97, Jes98].

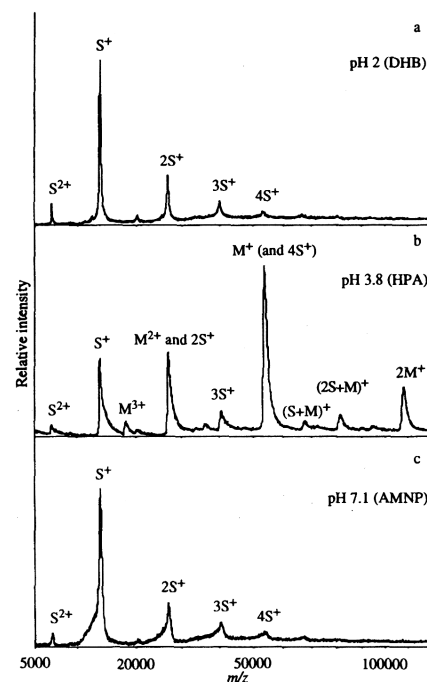


Abbildung C.3.3.5 : MALDI Spektren von rekombinatem Streptavidin (vier Untereinheiten) präpariert mit verschiedenen Matrices (DHB = 2,5-Dihydroxybenzoesäure, HPA = 3-Hydroxypicolinsäure, AMNP = 2-Amino-4-methyl-5-nitropyridin) (reproduziert aus [Jes98])

Allerdings kann nicht alleine der weniger saure Charakter dieser Matrices für die schonende Freisetzung der Komplexe verantwortlich sein, da andere, nicht-saure Matrices (z.B. 2-Amino-4-methyl-5-nitropyridin, AMNP) zur Dissoziation unter Bildung der Monomere führen. Zudem gelingt auch mit sauren Matrices (z.B. 2,5-DHB) die Desorption/Ionisation intakter, nichtkovalenter Komplexe, allerdings oft nur beim "ersten Schuß", während danach nur noch die Monomere im MALDI-Spektrum detektiert werden [Ros95, Coh97, Mon97, Thi99]. Eine Übersicht zur Analyse von nichtkovalenten Komplexen mittels MALDI wurde von Farmer und Caprioli vorgestellt [Far98].

Viele dieser Experimente zur Adduktbildung sowie die Art der gebildeten Addukte deuten darauf hin, daß die Assoziation bereits in der Lösung stattgefunden hat und bei der Kristallisation in der Matrix konserviert wird. Die Freisetzung dieser Addukte durch Ladungstrennung - entweder unter Beibehaltung der Assoziation oder unter Bildung der Monomere - ist somit ein denkbarer Weg der Ionisation bei der MALDI-MS. Diese Überlegungen spielen auch eine große Rolle bei der Cluster-Theorie, und im experimentellen Teil dieser Arbeit werden einige Untersuchungen vorgestellt, die eine solche These stützen (s. Kap. D.3).

#### C.3.4. Ladungszustand

Es wurde bereits erwähnt, daß die Ladung von mehrfachgeladenen Ionen fast immer durch Koordination mit Gegenionen kompensiert wird. Aber auch adduktfreie Ionen treten in erster Linie als einfachgeladene Spezies auf. Die Tatsache, daß in erster Linie einfachgeladene Ionen detektiert werden – und dies fast unabhängig von der Masse und der chemischen Natur des Analyten –, ist ein wesentliches Merkmal von MALDI, obwohl auch andere Desorptionstechniken (FAB, SIMS) hauptsächlich zu einfachgeladenen Molekülen führen. Dies ist auch ein zentraler Punkt im Cluster-Modell, allerdings steht dabei -im Gegensatz zu vielen anderen Modellen- nicht die Ionisation des Analyten im Vordergrund. Vielmehr bekommen Reaktionen wie Protonen- oder Elektronentransfer eine besondere Bedeutung dadurch, daß sie eine mögliche Erklärung für eine Ladungsreduktion von mehrfachgeladenen Analyten sein könnten. Außerdem könnten Sekundärreaktionen auch die Ursache für bestimmte Fragmentierungen (insbesondere bei *In-source decay*, ISD) sein [Bro95a, Bro96, Bro97a]. Eng verknüpft mit dem Ladungszustand ist auch die Bildung von Multimeren, die bei hohen Analytkonzentrationen und parallel zu der damit einhergehenden tendenziell niedrigeren Ladung vermehrt gebildet werden.

Der Ladungszustand von MALDI-Ionen läßt sich nur in sehr engen Grenzen beeinflussen. In erster Linie ist er matrixabhängig, z.B. ist die Tendenz zu mehrfach geladenen Molekülen bei  $\alpha$ CHCA besonders groß [Zho94a, Zho95]. Aber auch bei 3-HPA wird manchmal ein relativ hoher Ladungszustand detektiert. Daneben spielen andere Faktoren wie die Konzentration des Analyten (bzw. Verhältnis Analyt/Matrix), Art der Probenoberfläche oder das Lösungsmittel eine Rolle. So können z.B. durch Zusatz von Glycerin bei einer bestimmten Probenpräparation [Zho95] oder durch Verwendung von Nitrocellulose-Membranen [Zho94a] mehr höhergeladenen Ionen erzeugt werden. Generell nimmt die Tendenz zu höherer Ladung mit der Analytmasse etwas zu, was sicherlich durch den größeren Abstand der Ladungen im Molekül bedingt ist, die sich dadurch weniger stark beeinflussen können. Bei höherer Laserintensität sinkt dagegen die Tendenz zu mehrfach geladenen Ionen. Insgesamt sind aber die Faktoren, die den Ladungszustand bei der MALDI beeinflussen, noch nicht sehr gut verstanden.

Jørgensen et al. [Jør98] korrelierten eine niedrige Protonenaffinität der Matrix mit einem höheren Ladungszustand der Analyte, jedoch ist diese Schlußfolgerung nicht für alle Matrices konsistent. Eine niedrige Protonenaffinität des neutralen Matrixmoleküls sollte einen größeren Anteil mehrfach geladener Moleküle ergeben. So sollte der Ladungszustand mit 2,5-DHB (PA = 855



kJ/mol [Mor00]) fast genauso hoch sein wie mit  $\alpha$ CHCA (PA = 841 kJ/mol [Jør98]) sein, umgekehrt sollte 3-HPA (PA = 896 kJ/mol [Jør98]) nur wenig mehrfachgeladene Ionen ergeben. Zusätzlich sind die gemessenen GB mit einer deutlichen Unsicherheit behaftet und schwanken in der Literatur erheblich. Noch schwieriger zu bestimmen sind PA bzw. GB von Ionen und damit die Energetik der Bildung mehrfachgeladener Biomoleküle, da die Protonierung mit zunehmender Ladung durch die Coulomb-Abstoßung energetisch ungünstiger wird (Aktivierungsbarriere). Im Fall von zwei Ladungen im Abstand von ca. 9.5 Å macht diese etwa einen Betrag von 125 kJ/mol aus [Wil96]. In Übereinstimmung damit wurde für das protonierte Peptid Bradykinin eine GB von ca. 900 kJ/mol ermittelt [Vék95, Ewi01]. Ein Überblick über Abschätzungen der elektrostatischen Abstoßung und damit der Reaktivität in Abhängigkeit des Ladungsabstands wurde von Gronert vorgestellt [Gro99].

#### C.4. Das Cluster-Modell

Der Ansporn für einen neuen Ansatz zur Erklärung des MALDI-Phänomens kam besonders dadurch auf, daß trotz der vielen über die Jahre gewonnenen Erkenntnisse kein in sich schlüssiges Bild des MALDI-Prozesses entstanden war. Einige kaum verstandene Aspekte waren dabei besonders in den Blickpunkt gerückt, dazu gehört vor allem die bevorzugte Bildung von einfachgeladenen Ionen bei MALDI. Viele der Überlegungen beruhten und beruhen aber auf älteren Erkenntnissen, die zum großen Teil bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurden. Die grundlegende Idee wurde zunächst als Hypothese veröffentlicht [Kar00], die auch für eine breite Diskussion über dieses Modell und über den MALDI-Mechanismus sorgen sollte. Einige der wesentlichen allgemeingültigen MALDI-Charakteristika<sup>14</sup> sind:

- Bildung von im wesentlichen einfachgeladenen Ionen
- Bildung von positiven und negativen Ionen aus derselben Präparation bei nur geringem Einfluß von Lösungsmittel und pH-Wert
- Spektren im positiven und negativen Ionenmodus sind nicht komplementär (Laserschwelle, Ionenintensitäten, Art der gebildeten Ionen)
- Kationisierung bei neutralen oder sauren Analyten, aber keine Anionisierung
- Besondere Charakteristika der Matrices und Matrixspektren: Bildung von Radikationen und (de)protonierten Ionen, keine aciden H-Atome notwendig, keine Spektren mit Matrixsalzen und ein ausgeprägter chemischer Untergrund
- Unterdrückung von Matrixionen bei hoher Analytkonzentration und niedriger Laserbestrahlung
- MALDI bei stark unterschiedlichen Wellenlängen möglich (IR und UV)
- Auftreten von zwei stark unterschiedlichen Fragmentierungsarten (metastabile (PSD) und prompte (ISD) Fragmentierung) trotz der insgesamt schonenden Natur von MALDI
- Bildung von einfachgeladenen Multimeren

Auf der Basis dieser Beobachtungen und Charakteristika wurden dann eine Reihe von essentiellen Fragen abgeleitet:

- Wie ist die Ausgangssituation der Analyte im Matrixkristall (Ladungszustand, Gegenionen, Lösungsmittel) ?
- Wie kommt eine Ladungstrennung zustande, die auch nach einer Verzögerungszeit bis zu mehreren Mikrosekunden noch vorhanden ist ?
- Sind Protonierung und Deprotonierung verknüpft und warum gibt es Kationisierung, aber keine Anionisierung ?
- Welche grundlegenden Prozesse limitieren den Ladungszustand im Wesentlichen auf  $\pm 1$  ?
- Gibt es eine aktive Rolle der Matrix bei der Ionisation ?
- Sind Ionenanregung und Fragmentierung, aber auch Diskriminierungen und Unterdrückung durch sekundäre Prozesse erklärbar ?

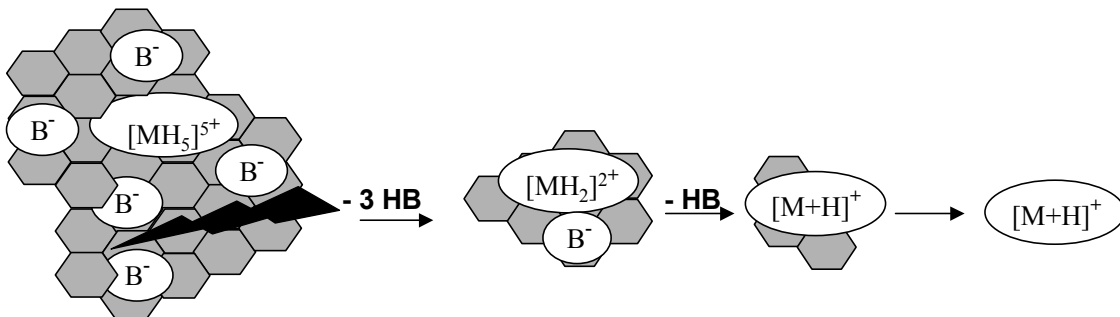
Zur Beantwortung dieser Fragen wurden im Wesentlichen drei Hypothesen verknüpft:

---

<sup>14</sup> Viele dieser Punkte treffen aber auch für andere Desorptionstechniken wie FAB oder SIMS zu.

1. **Ausgangspunkt ist ein (mehrfach) geladener Analyt im Matrixkristall.** Der Ladungszustand wird durch den Analyt selbst sowie die Lösung (pH-Wert, Lösungsmittel, andere Substanzen in Lösung) bestimmt und wird im Matrixkristall konserviert. Bei geladenen Analyten sind die Ladungen durch Gegenionen kompensiert, und Ionen oder Ionenpaare sind durch Restlösungsmittel und/oder Matrix solvatisiert.
2. **Die Ionisierung erfolgt durch Bildung von geladenen Clustern.** Dadurch wird die Ionisation mit der Desorption/Ablation verknüpft, deren historisch und experimentell begründbare getrennte Betrachtung immer fraglicher wurde. Es wurden aber bewußt mehrere Konzepte der Ionisation integriert, so daß weiterhin verschiedene Wege der Cluster-Ionisation offen standen, z.B. durch Ladungstrennung (Defizit eines Kations oder Anions) oder durch Photoionisation.
3. **Neutralisationen führen im Wesentlichen zu einfachgeladenen Ionen.** Analyte können mehrfach geladen im Kristall vorliegen. Diese werden im Cluster durch Protonentransfer und/oder Elektronentransfer größtenteils neutralisiert. Sekundärreaktionen finden also nicht in der Gasphase, sondern in Clustern statt. Die nach der Desolvatisierung detektierten Ionen sind demnach die "Lucky Survivors" des Neutralisationsprozesses, der hauptsächlich zu neutralen Molekülen führt.

In Abb. C.4.1 ist schematisch anhand eines fünffach geladenen Analyten (z.B. ein Peptid) mit seinen Gegenionen beispielhaft einer der möglichen Wege für diesen Mechanismus dargestellt:



**Abbildung C.4.1 :** Schematische Darstellung der Bildung eines einfachgeladenen Analytions aus einem fünffach geladenem Vorläuferion durch Ladungstrennung, Protonentransfer und Desolvatisierung (nach [Kar00] und [Glü01a]).

Zu diesem Modell schrieb Hillenkamp wenig später [Hil00]:

*"Systematic experiments have mostly contradicted early models based on photoionization or proton transfer from excited states of matrix molecules. Charge disproportionation in clusters and separation by fracturing have been suggested and could, in principle, explain ion formation in UV as well as in IR MALDI, but neither has been checked by systematic experiments yet."*

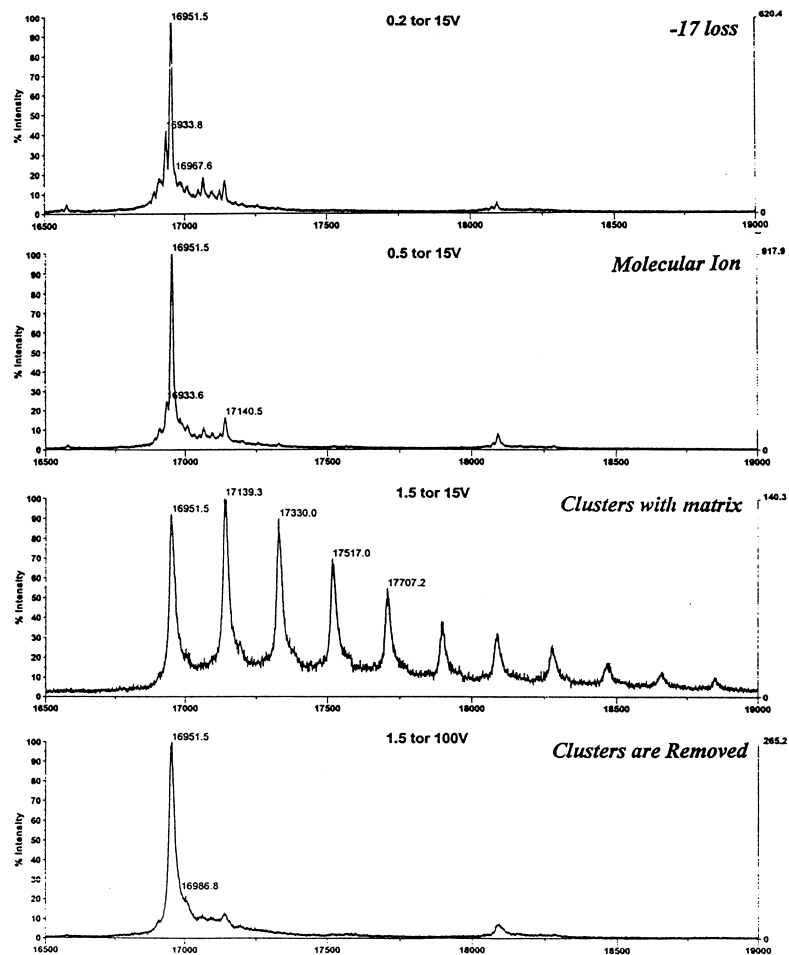
Besonders umstrittene Punkte betrafen die Clusterbildung selbst und die Ladungstrennung, aber vor allem die Elektronenneutralisation. Insbesondere die These vom Einfang von freien Elektronen rief großen Widerspruch hervor, obwohl eine Elektronenneutralisation eindeutig nachgewiesen wurde (s. Kap. C.3.2.3). Aber natürlich kann diese Ladungsreduktion auch durch Elektronentransfer zustande kommen. Zunächst gab es auch für viele andere Punkte des Cluster-Modells keine Beweise. So war z.B. der Ausgangszustand der Analyte im Matrixkristall

(Ladungszustand) sowie die Rolle der Gegenionen unklar, allerdings deutet das Auftreten einer ganzen Reihe von Addukten und Komplexen bei MALDI in diese Richtung (s. Kap C.3.3). Auch eine Abschätzung verschiedener Ionisationswege war bisher nicht möglich. Eine experimentelle Überprüfung der strittigen Punkte ist daher für eine Verifizierung -oder Widerlegung- des Modells unabdingbar. Experimente dazu, insbesondere zum Ausgangszustand der Analyte in der MALDI-Präparation und den nachfolgenden Reaktionen, sind das zentrale Thema dieser Arbeit.

Dagegen gibt es zur Clusterbildung selbst bereits eine Reihe von Beobachtungen und Publikationen, die diese These stützen. Hier sind vor allem die Simulationen von Zhigilei und Garrison zu nennen [Zhi97, Zhi97a, Zhi98, Zhi00], die sowohl die Clusterbildung als auch die gleichförmige Geschwindigkeit der Ionen vorhersagen (s. Kap. C.2.4). Auch die Verdampfung von (neutralen ?) Molekülen unterhalb der Schwelle der Clusterbildung wird vorhergesagt. Allerdings gehen die Simulationen von einer weit kürzeren Pulsdauer als bei MALDI aus (15 – 150 ps). Aber auch in früheren Arbeiten wurde die Existenz von molekularen Clustern in Erwägung gezogen. So postulierte z.B. bereits Ehring, daß in einem Matrixcluster die Schwelle der 2-Photonen-Ionisation abgesenkt sein könnte [Ehr92]. Auch wenn die Absenkung bei wenigen Molekülen relativ klein ist [Lin01], könnte sie in einem größeren Molekülverbund sowie durch Lösungsmittel weiter herabgesetzt sein. Eine Freisetzung der Analytionen aus relativ großen Molekül-Clustern mit mehreren tausend Molekülen wäre zudem eine plausible Erklärung für die gleichbleibende Startgeschwindigkeit aller Ionen. Die Startgeschwindigkeit wäre demnach eine Matrixeigenschaft und könnte z.B. mit der Clustergröße zusammenhängen.

Mittlerweile gibt es eine Reihe von Publikationen, in denen mehr oder weniger direkte Detektion der Cluster publiziert wurde. Bei Erhöhung des Drucks in der ersten Druckstufe eines orthogonalen Flugzeitmassenspektrometers mit einer MALDI-Quelle fanden Verentchikov et al. bei etwa 1,5 Torr intensive Matrixanlagerungen an Myoglobin [Ver99]. Diese Matrix-Analyt-Cluster verschwanden bei einer erhöhten Kollisionsrate durch Erhöhung der Nozzle-Skimmer Spannung auf 150 V (s. Abb. C.4.2).

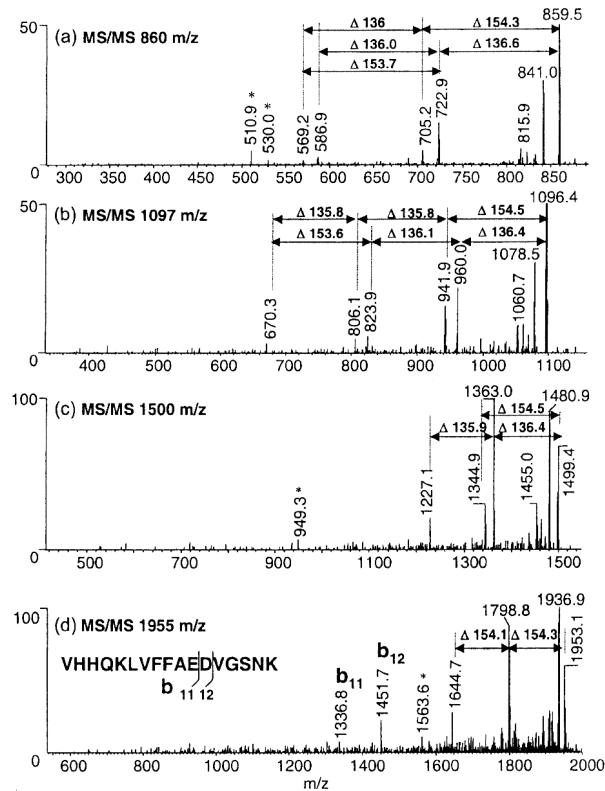
Die Entstehung von Partikeln mit etwa 200 nm Durchmesser etwa ab der für die Detektion von MALDI-Ionen notwendigen Laserenergie konnte von Handschuh et al. belegt werden [Han99a]. Die Autoren fingen die ablatierte Matrix auf einer Metallplatte auf und bestimmten Form und Größe der Aggregate mit AFM (*atomic force microscopy*). Dabei stellte sich heraus, daß die Platte mit isolierten Matrixaggregaten von etwa 200 nm Durchmesser bedeckt war. Zudem konnten sie diese erst ab der für MALDI notwendigen Schwelle der Laserenergie nachweisen. Bei noch höherer Laserenergie fanden die Autoren zusätzlich zu den isolierten Matrixpartikeln eine etwa 20 nm dicke Matrixschicht vor. Kürzlich wurden Polystyrolpartikel mit Massen von über 5 MDa und Ladungen zwischen 1 und 10 mit MALDI (Matrix 3-HPA) generiert und in einer Ionenfalle analysiert [Cai02a]. Die Partikel wurden mit einem Puls Helium (~50 mTorr) als Puffergas gekühlt und konnten durch Änderung der Frequenz gespeichert werden. Aufgrund der hohen Masse werden geladene Partikel mit einem Photomultiplier nur sehr ineffizient detektiert. Trotzdem wurden Ionen mit  $m/z 10^9$ - $10^{10}$  mit deutlich über dem Rauschen liegenden Signalintensitäten gefunden.



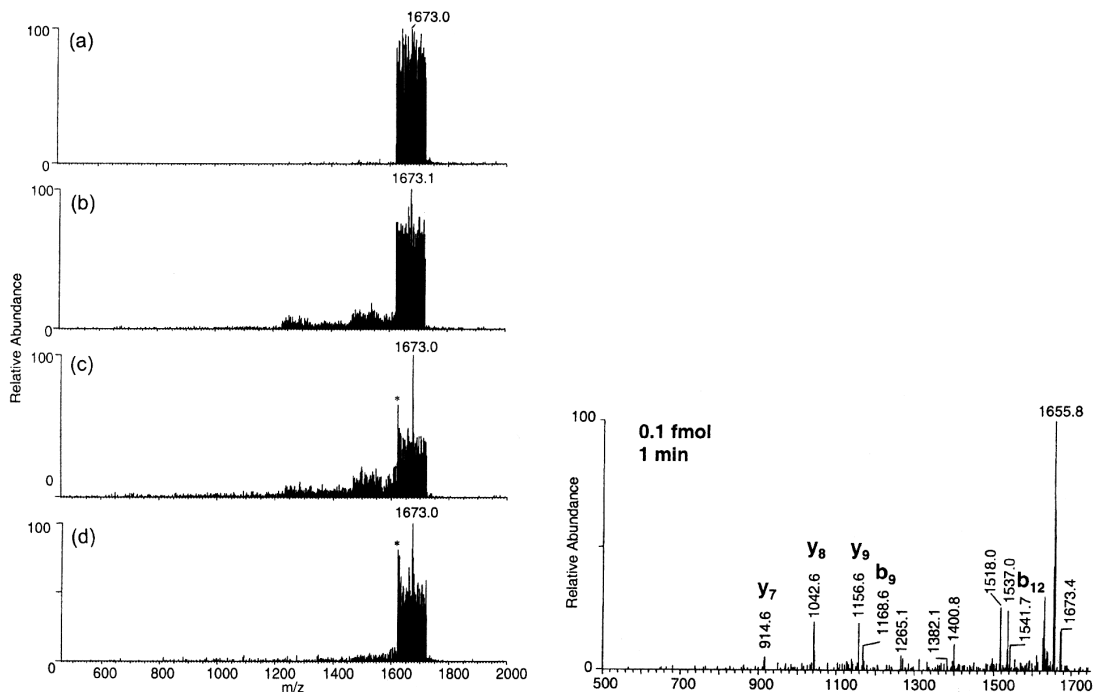
**Abbildung C.4.2 :** Druckabhängige Clusterbildung zwischen Myoglobin und Matrix in einem orthogonalen MALDI-TOF. (Reproduziert aus [Ver99])

Aber auch Experimente im normalen Massenbereich einer kommerziellen Quadrupol-Ionenfalle belegen die Existenz von Clustern. Ein besonders gelungenes und eindeutiges Beispiel dafür wurde kürzlich von Krutchinsky und Chait vorgestellt [Kru02]. Auf der Suche nach Analyten durch "blindes" MS/MS selektierten sie aus dem Rauschen mehrere Vorläuferionen mit willkürlich ausgewählten  $m/z$ -Werten. Die CID-Spektren wiesen alle die gleichen charakteristische Massendifferenzen auf, die typisch für die verwendete Matrix 2,5-DHB sind ( $M = 154$  und  $[M-H_2O] = 136$ , s. Abb. C.4.3). Die ausgewählten Vorläufer haben demnach alle die Formel  $[(Matrix)_n + (Matrix-H_2O)_m + X^+]$ , wobei  $X$  verschiedene, bisher unbekannte, geladene Spezies sein können. Darüber hinaus werden bei Anwesenheit eines Analyten die für diesen charakteristischen Fragmente detektiert, z.B. b-Fragmente eines Peptides (s. Abb. C.4.3d).

Demnach stammt das Rauschen bei MALDI in erster Linie von Matrixclustern. Diese sind relativ schwach gebunden und fragmentieren daher bei einer moderaten Kollisionsaktivierung zuerst. Kovalente Bindungen werden erst bei höherer Kollisionsenergie gebrochen, so daß z.B. Peptide auf diese Weise isoliert werden können. In Abb. C.4.4 ist eine Art  $MS^3$ -Experiment gezeigt: zunächst wurde ein Massenbereich von etwa 100 Da isoliert, dann wurde durch eine moderate Breitband-Aktivierung das Rauschen reduziert, bevor schließlich ein CID-Spektrum des isolierten Peptids aufgenommen wurde.

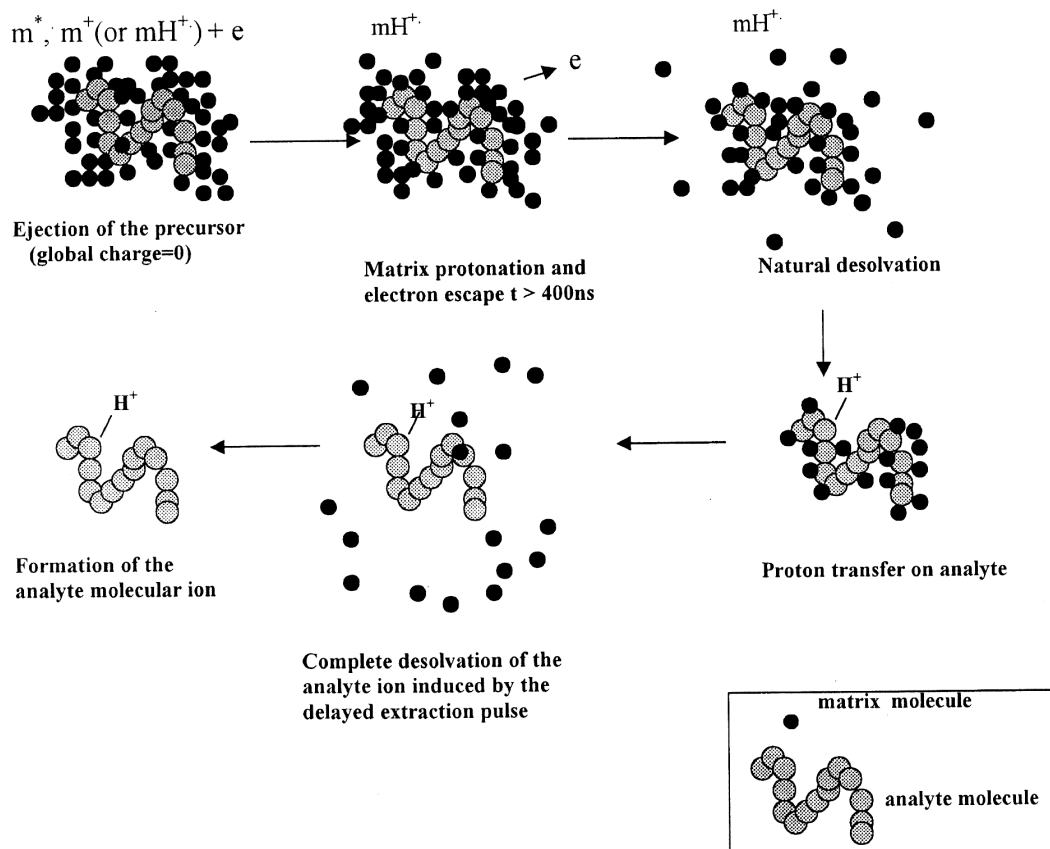


**Abbildung C.4.3 :** MALDI-MS/MS Spektren (Matrix 2,5-DHB) einer Auswahl verschiedener m/z-Werte aufgenommen mit einer Quadrupol-Ionenfalle. Die Spektren (a) - (c) zeigen nur Matrixcluster, während in Spektrum (d) spezifische Peptid-Fragmente zu erkennen sind. (Reproduziert aus [Kru02])



**Abbildung C.4.4 :** MALDI-MS<sup>n</sup> Spektren (Matrix 2,5-DHB) einer Peptidmischung (0,1 fmol). Links: (a) keine Aktivierung, (b) schwache Aktivierung (15 %, 300 ms), (c) stärkere Aktivierung (20 %, 300 ms), (d) doppelte Aktivierung (zwei mal 20 %, 300 ms). Rechts: CID-Spektrum eines Peptids mit m/z = 1673 nach vorheriger Reduktion des Rauschens durch die links gezeigte Breitbandaktivierung ("pseudo-MS<sup>3n</sup>") (Reproduziert aus [Kru02])

Indirekte Beweise für die Entstehung größerer Molekülcluster bei MALDI ergaben Messungen der initialen Geschwindigkeit von MALDI-Ionen unter speziellen Bedingungen [Fou02a]. Bei diesen Messungen fanden die Autoren Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen Flugzeit und Verzögerungszeit. Diese führten sie auf ein repulsives Feld in der Ionenquelle zurück. Die Abweichungen von der idealen Flugzeit waren abhängig von der Ionenmasse und der Stärke des repulsiven Feldes. Simulationen zur Beschreibung dieses Ergebnisses zeigten, daß die Ionen nicht direkt auf der Probenoberfläche gebildet werden, sondern durch Zerfall von Vorläufern mit höherer Masse. Die anhand der Simulationen und der initialen Geschwindigkeit berechnete Größe der Vorläuferionen für verschiedene Ionen ergab für Matrixionen eine mittlere Größe von etwa  $m/z = 3000$ , während die Vorläufer von Peptidionen mit  $m/z = 10.000 - 40.000$  laut Berechnung wesentlich größer sind. Eine Erklärung für die verschiedenen Clustergrößen und die damit verbundenen Effekte wurde aber nicht gegeben. Die bei Matrixionen und Analytionen unterschiedlichen Abweichungen von der Flugzeit könnten aber auch durch unterschiedliche Entstehungszeiten der Ionen oder Überlagerung unterschiedlicher Ionisationsmechanismen verursacht sein. Die Autoren schlossen, daß das Bild der Cluster-Ionisation im Wesentlichen richtig ist, propagierten aber eine Photoionisation der Matrix in den Clustern als initialen Ionisationsschritt und eine Desolvatation aufgrund der Beschleunigung (s. Abb. C.4.5). Das Abdampfen der Matrix würde auch die größere radiale Geschwindigkeit der Matrixionen erklären. Die notwendige Energie für die Desolvatation der Cluster könnte durch Kollisionen bei der Beschleunigung der Ionen aufgebracht werden.



**Abbildung C.4.5 :** Szenario für die Bildung eines protonierten Analyten.  
(Reproduziert aus [Fou02a])

Diese jüngsten Ergebnisse beweisen deutlich die Bildung von geladenen Clustern bei MALDI. Ob aber auch die im Cluster-Modell vorgeschlagenen Ionisationswege und Reaktionen tatsächlich alle so ablaufen, und in welchem Ausmaß mögliche Mechanismen zur Ionenbildung beitragen, ist dagegen nach wie vor unklar. Eine Abschätzung auf der Basis neuer Ergebnisse sowohl aus dieser Arbeit als auch von anderen Arbeitsgruppen wird daher im Diskussionsteil vorgestellt.

Die Vorstellung des "Cluster-Modells" für MALDI hat auf jeden Fall dazu beigetragen, eine lebhafte Diskussion in Gang zu setzen und bestimmte Vorstellungen über den MALDI-Mechanismus zu überdenken. Darüber hinaus führten diese Diskussionen auch zu einem Vergleich mit anderen Desorptionstechniken (FAB, SIMS, PDMS), die alle vor MALDI entdeckt wurden. Interessanterweise gab es auch bei diesen ähnliche (z.Tl. auch provokante) Überlegungen und Ansätze, und auch für diese Techniken wurde bereits die Bildung von Clustern diskutiert. 1983 beschrieb Marvin Vestal in einem Review über Ionisationstechniken für nichtflüchtige Moleküle sein hypothetisches und augenscheinlich ebenfalls als Denkanstoß gedachtes "*Unified Modell*" wie folgt [Ves83]:

*"Consideration of the rather bewildering array of excellent experimental results pertinent to production of pseudomolecular ions from nonvolatile molecules has led us to a conceptual model that seems to be consistent with most observations. Some parts of the model are based on very little experimental data, and no quantitative predictions have been attempted. Thus, it should be considered as totally speculative, but perhaps worthy of testing in future experiments. The basic premise of this model is that the intermediate between energy deposition and pseudomolecular ion formation is a cluster or droplet which is separated from the bulk sample by a rapid, nonequilibrium process."*

(...)

*"Some tentative and highly speculative models are suggested that may account for some of the heretofore unexplained effects. Since some of these speculations are based on little in the way of either experimental or theoretical work on the part of the author, it would not be surprising if they were wrong. We hope, however, that these suggestions may stimulate further work by investigators studying the various techniques described and that a clear picture may eventually emerge."*



## D Ergebnisse: Analyteinbau, Ionisation und Adduktbildung bei der MALDI-MS

Der MALDI-Prozeß ist in sehr kurzer Zeit (wenige Nanosekunden) nahezu abgeschlossen, weswegen kaum direkte Informationen über die zugrundeliegenden Mechanismen zugänglich sind.<sup>15</sup> Die Art der gebildeten Ionen (Matrix und Analyt) bei definierten Bedingungen läßt aber Rückschlüsse auf vorangegangene Reaktionen und Mechanismen zu, besonders wenn durch geeignete Analysebedingungen Zwischenstufen des MALDI-Prozesses "konserviert" werden können, so daß diese im Spektrum erscheinen.

Für eine Abschätzung verschiedener mechanistischer Wege ist die Kenntnis der Ausgangssituation vor der Reaktion notwendig, die nur über Untersuchungen des Matrix-Analyt-Kristalls vor der MALDI-Analyse ermittelt werden kann.<sup>16</sup> Dazu gehört besonders der Ladungszustand des Analyten, dies betrifft sowohl die Nettoladung als auch die Ladung einzelner funktioneller Gruppen. Die Ladung bei verschiedenen pH-Werten wurde anhand von pH-Indikatoren als Modellverbindungen überprüft, die eine einfache und direkte Unterscheidung zwischen protonierter und deprotonierter Form im Kristall ermöglichen (s. Kap. D.1.1). Die Resultate haben direkte Konsequenzen sowohl für mögliche primäre Ionisationswege als auch für nachfolgende sekundäre Reaktionen und erlauben somit eine Einschränkung und Präzisierung möglicher MALDI-Mechanismen. Ein ionischer Einbau von Molekülen würde durch Solvation wesentlich erleichtert und könnte darüber hinaus eine schonendere Desorption ermöglichen. Untersuchungen mit Hilfe der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und weitere Indizien für einen Lösungsmiteileinschluß in Matrixkristalle werden in Kap. D.1.2 vorgestellt.

In Kap. D.2 wird der Einfluß der Anzahl basischer Gruppen und der Basenstärke des Analyten auf die Ionenbildung untersucht, da der Protonentransfer eine wichtige Rolle beim MALDI-Prozeß spielt. Darüber hinaus wird anhand von MALDI-ISD-Spektren und einem Vergleich mit ESI-ECD eine mögliche Beteiligung von Elektronen bei der Ladungsreduktion und bei der prompten Fragmentierung diskutiert.

Bei einer positiven oder negativen Nettoladung der Moleküle im Kristall müssen notwendigerweise Gegenionen zur Ladungskompensation vorhanden sein. Aber auch bei Zwitterionen ohne Nettoladung können Gegenionen koordiniert sein. Die Kenntnis von Art und Verteilung dieser Ionen ermöglichen eine Abschätzung möglicher Ionisationswege sowie möglicher Reaktionen bei der Desorption. Aus den erhaltenen Spektren läßt sich die Natur und Zahl der Gegenionen bestimmen, wenn diese in Form von Addukten detektiert werden können. Einige Bedingungen für die Detektion von Addukten konnten im Rahmen dieser Arbeit anhand von zwei Modellsystemen verifiziert werden: Zum einen wurde für die pH-Indikatoren in einer Art Titration der Einfluß des pH-Wertes auf die Bildung kationisierter Analyte abgeschätzt (s. Kap. D.1.3), zum anderen konnten durch Zugabe von sehr starken Säuren Anionenaddukte generiert werden, die einen Rückschluß auf die Bildung von Ionenpaaren und den daraus folgenden Reaktionen ermöglichen (s. Kap. D.3). Darüber hinaus wurde untersucht, welche Parameter die Adduktverteilung beeinflussen.

Die wesentlichen Aussagen der Versuche werden jeweils direkt im Anschluß an die Vorstellung der experimentellen Ergebnisse diskutiert, und die Konsequenzen der Ergebnisse für den MALDI-Mechanismus werden am Schluß in Zusammenhang gebracht.

---

<sup>15</sup> Meßbare Größen und Variablen sind z.B. Energien und Geschwindigkeiten von Ionen, Enthalpien und Aktivierungsenergien möglicher Reaktionen, Laserparameter, Spannungen und Präparationsbedingungen.

<sup>16</sup> Die größte Schwierigkeit besteht in diesem Falle darin, daß der Analyt in starker Verdünnung vorliegt, so daß er z.B. in einer Röntgenkristallstruktur nicht detektiert wird.

### D.1. pH-Indikatoren als molekulare Sonden: Ladung, Solvatation und Ionenbildung

Der Ladungszustand im MALDI-Matrixkristall ist für die meisten Verbindungen unbekannt.<sup>17</sup> Saure oder basische Gruppen können leicht durch Protonentransfer neutralisiert werden, so daß man in vielen MALDI-Theorien davon ausging, daß diese Moleküle beim Einschluß oder bei der Laserbestrahlung neutralisiert werden und daher anschließend "aktiv" ionisiert werden müssen, z.B. durch Protonentransfer zwischen Matrix und Analyt. Eine dritte Möglichkeit wurde im Cluster-Modell propagiert: Die Trennung von mindestens einem Ionenpaar führt zu geladenen Clustern, in denen dann nachfolgende Neutralisationsreaktionen stattfinden. Bei Kenntnis des Ladungszustandes im Kristall kann jedoch in jedem Fall entweder die Ionisation neutraler Analyte oder die Ladungstrennung eindeutig ausgeschlossen werden, so daß eine Einschränkung der oben genannten Ionisationswege möglich ist. Auch die Zahl der möglichen Varianten bei den nachfolgenden Reaktionen, insbesondere beim Protonentransfer, lassen sich erheblich reduzieren.

Es gibt bereits einige Hinweise auf einen Einbau protonierter bzw. deprotonierter Moleküle. Dazu zählt die Detektion einer ganzen Reihe von Addukten und nichtkovalenten Komplexen, die nur durch ionische Wechselwirkungen hinreichend zu erklären sind (s. Kap. C.3.3). Auch der Umstand, daß Fluoreszein-Farbstoffe in der Umgebung von sauren Matrices keine Fluoreszenz aufweisen, deutet auf eine Protonierung dieser Verbindung in Lösung und den Einbau der protonierten Verbindungen im Matrixkristall ([Hor01], s. Kap. C.1.3).

In den nachfolgenden Kapiteln werden Experimente mit pH-Indikatoren vorgestellt, die die Frage nach dem Ladungszustand der Analyte beantworten. Anhand eines Farbvergleichs zwischen Indikator-Matrix-Lösungen und den daraus erhaltenen Matrix-Präparationen und größeren Matrixkristallen wurde die Ladung der pH-Indikatoren im Kristall bestimmt (s. Kap. D.1.1). Darüber hinaus werden Experimente zur Identifikation von Lösungsmittel in Matrixkristallen vorgestellt. In einer Art Titrationsexperiment erkennt man zudem, daß die Form, in welcher die Indikatoren im Kristall eingebaut werden, einen direkten Einfluß auf die Art der gebildeten Ionen hat (s. Kap. D.1.3). Darüber hinaus lassen sich auch Aussagen über Neutralisationsreaktionen machen, die ohne Matrix oder mit einer nicht-sauren Matrix nicht möglich sind. Durch einen Vergleich von LDI- und MALDI-Spektren der Farbstoffe und vor allem durch Bestimmung der initialen Ionengeschwindigkeit konnte zudem der Beweis geführt werden, daß es sich auch im Falle der pH-Indikatoren um einen matrixunterstützten Prozeß handelt, so daß eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Analytklassen berechtigt ist (s. Kap. D.1.5).

Als Modellsubstanzen wurden pH-Indikatoren aus verschiedenen Farbstoffklassen ausgewählt, von denen einige in fast jedem chemischen Labor zu finden sind. Die Umschlagbereiche der gewählten Indikatoren decken den pH-Bereich ab, bei dem auch MALDI-Analysen durchgeführt werden. Teilweise haben die Farbstoffe auch zwei Umschlagbereiche. Die Strukturen der Farbstoffe sind in Abb. D.1.1 zu finden, die Umschlagsbereiche sind in Tabelle D.1.1 aufgelistet. Auf die Ladungen und Säure-Base-Eigenschaften der verwendeten pH-Indikatoren und Matrices wird in Kap. D.1.3.1 eingegangen. Der Mechanismus des Farbumschlags der pH-Indikatoren sowie einige Besonderheiten der Farbgebung der verwendeten Farbstoffe werden in Anhang G.1 erläutert.

---

<sup>17</sup> Ausnahmen betreffen nur Verbindungen, die nicht protonierbar oder deprotonierbar sind. So können z.B. unpolare synthetische Polymere oder Saccharide nicht geladen vorliegen, wohingegen Metallkationen und quaternäre organische Kationen nur in ionischer Form existieren können und daher auch nur in dieser Form in die Matrix eingebaut werden können.

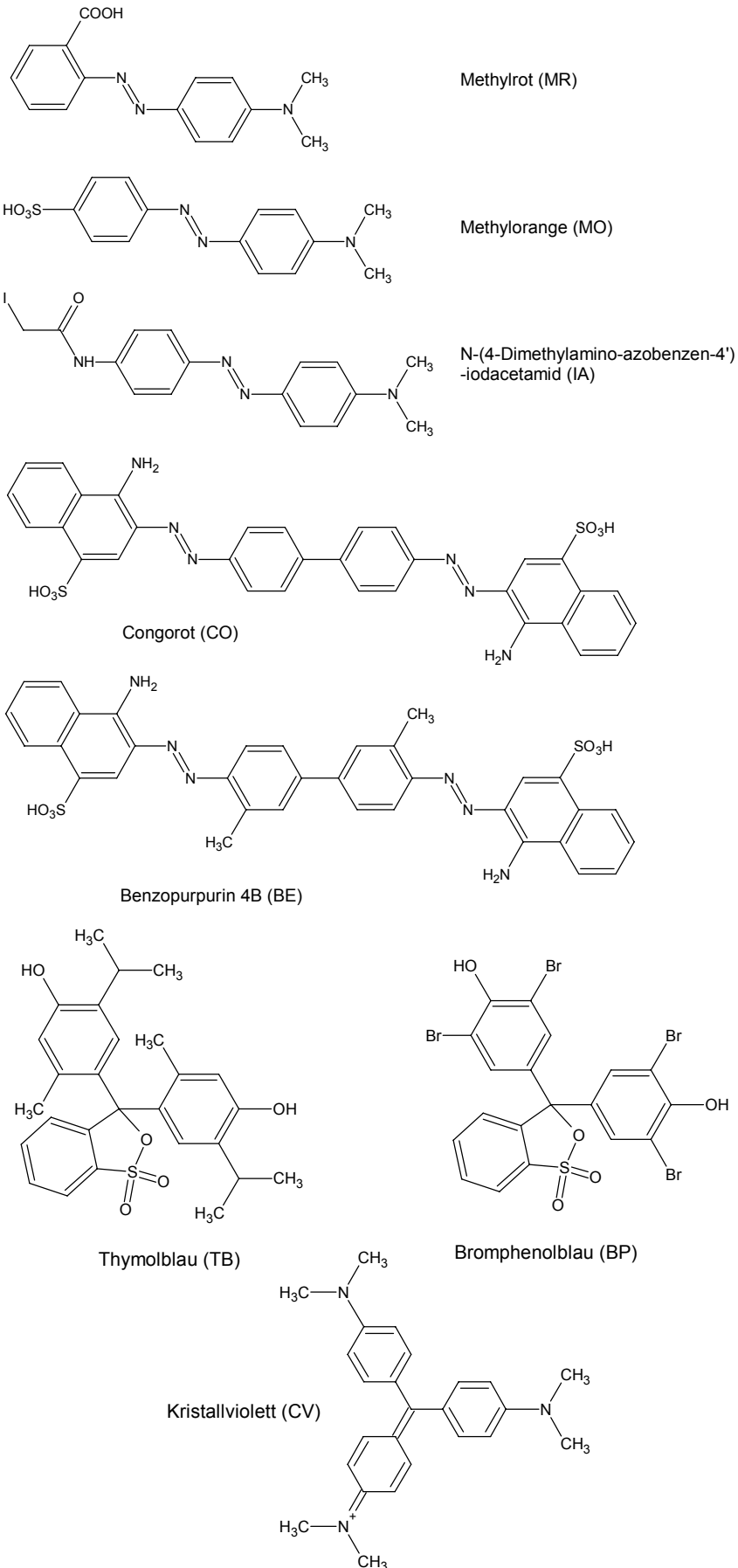


Abbildung D.1.1 : Strukturen der verwendeten pH-Indikatoren.

**Tabelle D.1.1: Umschlagsbereiche und -farben der verwendeten pH-Indikatoren**

Farbstoff	Abkürzung	Umschlagsbereich <sup>a</sup>	Farbumschlag <sup>a</sup>	Änderung der Nettoladung
Kristallviolett	CV	0.0 - 1.8	gelb – violett	+3 → +1
N-(4-Dimethylaminoazo-benzen-4')-iodacetamid	IA	~1.5 – 4	violett – gelb <sup>c</sup>	+1 → ±0
Benzopurpurin 4B	BE	2.3 - 4.4	violett – hellrot	±0 → -2
Congorot	CO	3.0 - 5.0	Blau – rot	±0 → -2
Bromphenolblau	BP	3.0 - 4.6	orange – blau	-1 → -2
Methylorange	MO	3.1 - 4.4	rot – gelb	±0 → -1
Methylrot	MR	4.4 - 6.2 <sup>b</sup>	rot – gelb <sup>b</sup>	+1 → ±0 ±0 → -1
Thymolblau	TB	1.2 - 2.8 8.0 - 9.2	rot – gelb gelb – blau	±0 → -1 -1 → -2

<sup>a</sup> Umschlagsbereiche und -farben laut Herstellerangabe (außer IA)

<sup>b</sup> Bei MR ist nur ein Farbumschlag sichtbar, der nicht am Halbäquivalenzpunkt erfolgt (Mechanismus s. Anhang G.1).

<sup>c</sup> Der Farbstoff N-(4-Dimethylaminoazo-benzen-4')-iodacetamid (IA) wird (wie Iodacetamid selbst) zur Derivatisierung verwendet, daher reagiert er sehr schnell und ist in Lösung nicht lange beständig.

### D.1.1. Ladungszustand der pH-Indikatoren im Matrixkristall

Der Ladungszustand der pH-Indikatoren im Kristall wurde anhand der Kristallfarbe bestimmt, wobei die Lösung vor der Kristallisation als Vergleich diente. Dazu wurden sowohl normale MALDI-Präparationen (*dried droplet*) als auch größere Kristalle herangezogen, die aus einer mit dem jeweiligen Farbstoff dotierten, gesättigten Matrixlösung durch langsames Abkühlen gewonnen wurden. Die mit den verschiedenen Präparationsprotokollen erhaltenen Ergebnisse werden in den nächsten Kapiteln vorgestellt. Um die Versuche möglichst einfach zu gestalten, wurde der pH-Wert bei fast allen Experimenten durch den intrinsischen pH-Wert der Matrixlösung vorgegeben.

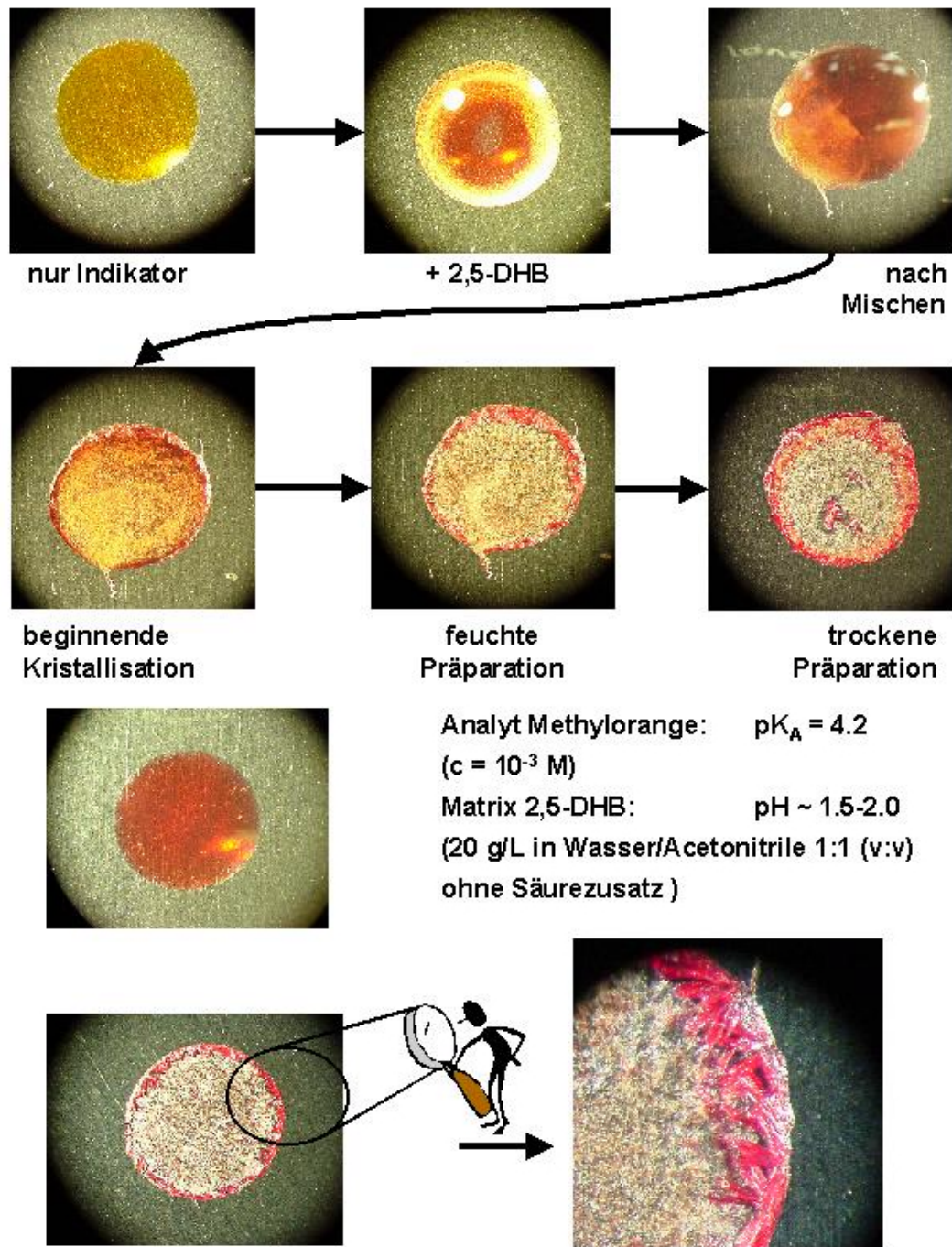
#### D.1.1.1. Farbvergleich in MALDI-Präparationen

Bis auf 3-Aminochinolin (3-AQ) und 2-(2-Aminoethylamino)-5-nitropyridin (ANP) wurden alle Matrizes und Farbstoffe in Acetonitril/Wasser (1:1/n:n) gelöst (s. Tab. D.1.3.1). Die Konzentration der Matrizes betrug 0.1 mol/L, die Konzentration der Farbstoffe betrug  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  mol/L. Das Analyt-Matrix-Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 lag somit am oberen Grenzbereich für MALDI-Analysen, wodurch aber alle Farben gut erkennbar waren. Für die MALDI-Präparation wurden jeweils 1  $\mu$ L der Matrix- und der Farbstofflösung direkt auf dem Probenhalter oder auf einem Objektträger gemischt und unter einem Föhn getrocknet. Die Farben der Lösungen vor dem Eintrocknen und der erhaltenen MALDI-Präparationen wurden mit einer Digitalkamera dokumentiert. Die Bilder wurden direkt durch das Okular eines Mikroskops aufgenommen, die Vergrößerung betrug zwischen Faktor 2 und maximal Faktor 200 (s. Abb. D.1.1.1).



Abbildung D.1.1.1: Farbige MALDI-Präparationen aufgenommen durch ein Mikroskop

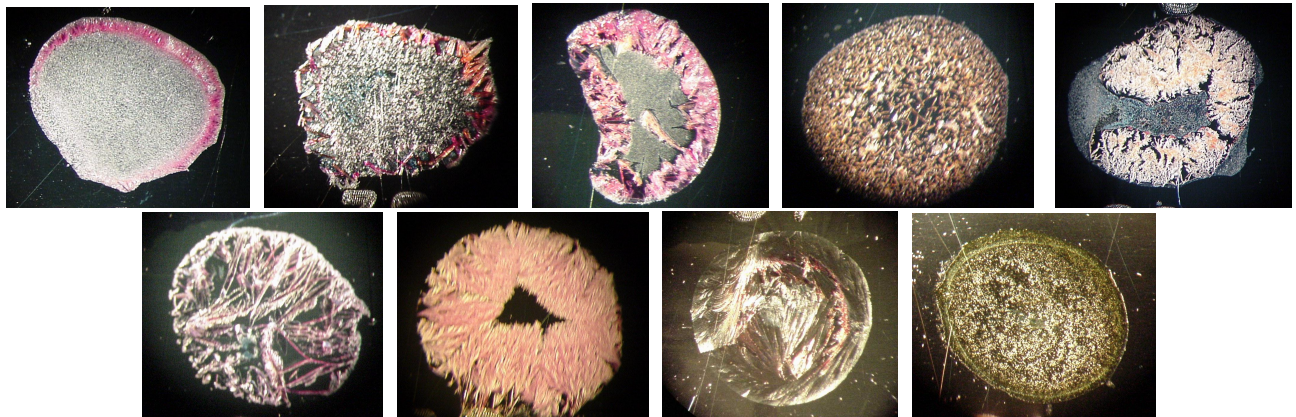
Auf diese Weise wurde für alle Kombinationen der vorgestellten pH-Indikatoren und Matrizes ein Farbvergleich der Lösungen vor und nach dem Trocknen vorgenommen. Der Misch- und Trockenvorgang von MO und der Matrix 2,5-DHB und die dabei auftretenden Farben sind in Abb. D.1.1.2 beispielhaft gezeigt.



**Abbildung D.1.1.2:** Farben beim Mischen einer MO-Lösung mit 2,5-DHB als Matrix beim Trocknen und bei der Kristallisation für die MALDI-Analyse.

Es ist deutlich zu sehen, daß bei Zugabe der sauren Matrix die Farbe des pH-Indikators umschlägt, daß aber danach die erhaltene protonierte Form des Indikators in den Kristall eingebaut wird. Die Farbe zwischen Lösung und Kristall unterscheidet sich zwar durch die veränderte Umgebung der Farbstoffmoleküle leicht, aber ein erneuter Farbumschlag zur gelben, deprotonierten Form findet eindeutig nicht statt. Dies beweist, daß der in der Lösung vorhandene Ladungszustand des pH-Indikators beim Einbau in den Matrixkristall konserviert wird und somit auch die Ladungen am Molekül erhalten bleiben. Neben der protonierten Azogruppe ist bei MO also auch die Sulfonsäure im Kristall deprotoniert, so daß der Farbstoff in einer zwitterionischen Form eingebaut wird.

Es erwies sich aber, daß die Farben nicht bei allen Matrizes gleich gut zu erkennen waren. Besonders Matrizes, die feinkristalline Präparationen bilden, erscheinen manchmal nur schwach farbig. Dies ist auch in Abb. D.1.1.2 gut zu erkennen: Der innere, feinkristalline Bereich erscheint fast farblos, während der äußere, grobkristalline Bereich ausgeprägt gefärbt ist. Abb. D.1.1.3 zeigt einen Vergleich von MALDI-Präparationen mit verschiedenen Matrizes, die mit dem Farbstoff Methylrot dotiert waren. Die Kristalle sind alle deutlich rot (bzw. gelb) gefärbt, Matrixpräparationen aus großen Kristallen (z.B. mit 2,5-DHB und 3-HPA) sind aber deutlich stärker und leuchtender gefärbt als feinkristalline Präparationen (z.B. SIN, FER und innere Bereiche von 2,5-DHB und 3-HPA). Auch der Farbton schwankt etwas je nach Matrix.<sup>18</sup>

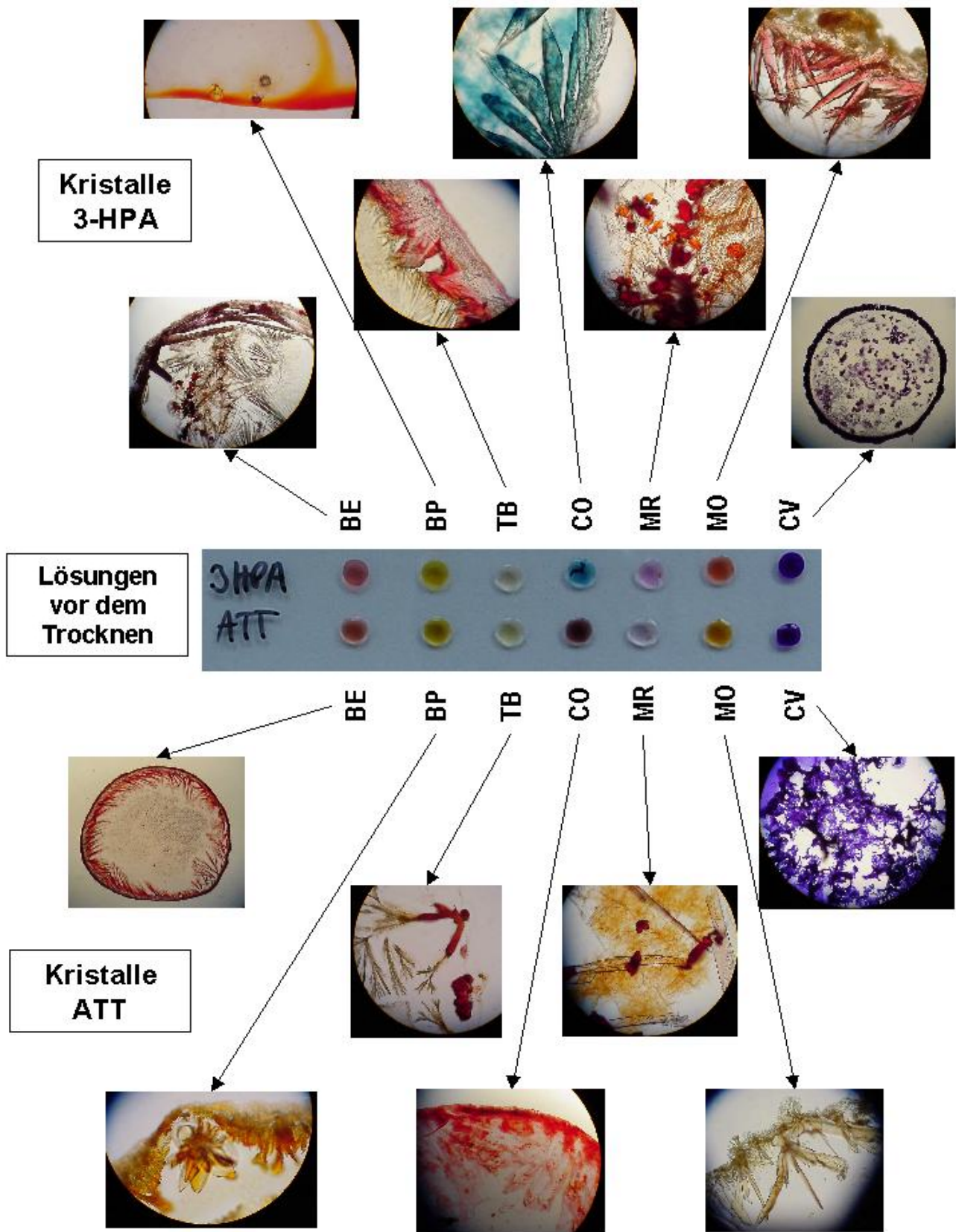


**Abbildung D.1.1.3:** MALDI-Präparationen dotiert mit MR mit unterschiedlichen Matrizes; obere Reihe: DHBs, 2,5-DHB, 3-HPA, SIN; untere Reihe: FER, ATT, THAP, 3-AQ, ANP (jeweils von links nach rechts)

Die Gründe für die unterschiedlichen Farbintensitäten in Abhängigkeit von der Kristallgröße sind nicht ganz klar, es wären aber zwei Erklärungen denkbar. Die schwächere Färbung könnte auf eine stärkere Streuung an der feinkristallinen Oberfläche zurückzuführen sein. Die leuchtenden Farben der pH-Indikatoren in den Kristallen legen aber nahe, daß diese auch im Kristall von Lösungsmittel umgeben sind, da die Indikatoren als Feststoff eine matte, dunkle Mischfarbe aufweisen, die sich zudem meist stark von der Farbe in Lösung unterscheidet. Daher wäre auch denkbar, daß in kleineren Kristallen und damit in feinkristallinen Präparationen zu wenig Lösungsmittel eingeschlossen ist, um eine intensive Färbung zu verursachen (Näheres zum Lösungsmiteleinschluß in Matrixkristalle s. Kap. D.1.2).

Darüber hinaus erkennt man in Abb. D.1.1.3 auch, daß es teilweise inhomogene Stellen und auch leicht unterschiedlich gefärbte Bereiche gibt. In Nahaufnahmen der kristallinen Randbereiche sind diese inhomogenen Stellen gut zu erkennen. In Abb. D.1.1.4 sind Aufnahmen von kristallinen, farbstoffdotierten MALDI-Präparationen der Matrizes 3-HPA und ATT gezeigt, die im Gegensatz zu den obigen Aufnahmen mit einem Durchlichtmikroskop gemacht wurden.

<sup>18</sup> Allerdings spiegeln die digitalen Aufnahmen nicht immer genau den visuellen Eindruck wieder, was neben optischen Begrenzungen (z.B. bei der Auflösung der Digitalkamera) auch durch die Lichtverhältnisse, z.B. durch unterschiedliche Lichtquellen, Lichtverluste im Strahlengang und Reflexionen auf Oberflächen, zurückzuführen ist. Viele Inhomogenitäten in Abhängigkeit von Matrix und Kristallgröße sind aber keine Artefakte der Bildgebung und auch mit dem Auge gut zu erkennen.



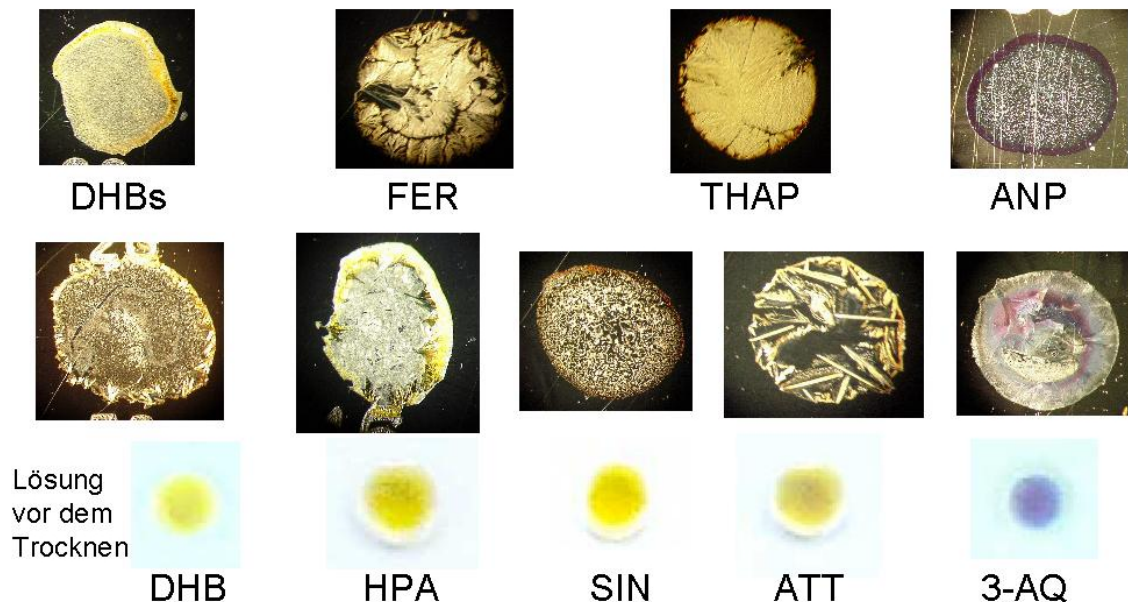
**Abbildung D.1.1.4:** Die Ausschnitte zeigen Kristalle aus Matrixpräparationen mit 3-HPA (oben) und ATT (unten) dotiert mit verschiedenen pH-Indikatoren. Zum Vergleich sind in der Mitte die dotierten Matrixlösungen vor dem Trocknen gezeigt.

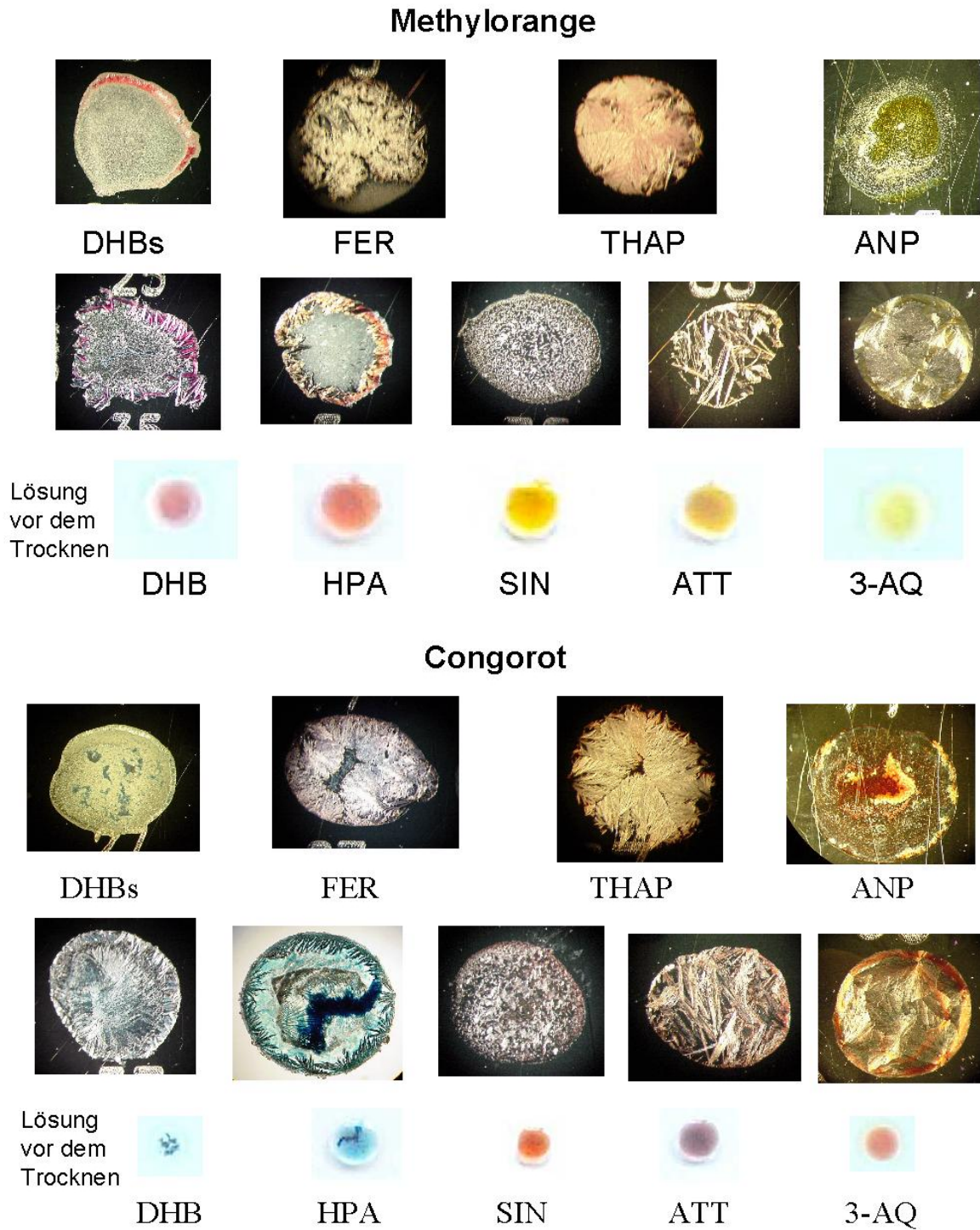


Obwohl alle Kristalle deutlich gefärbt sind, sind doch an einigen Stellen sowohl unterschiedliche Farbintensitäten als auch fast farblose Bereiche zu erkennen. Dies kann im Extremfall soweit gehen, daß zwei oder mehr verschiedene Farben in ein- und derselben Matrixpräparation auftreten (Näheres dazu s. Kap. D.1.1.2). Darüber hinaus erkennt man aber in Abb. D.1.1.4 auch, daß der Farbton des Kristalls manchmal ein wenig vom Farbton der Lösung vor dem Trocknen abweicht. Diese leichten Differenzen zwischen Lösung und Kristall sind vermutlich durch unterschiedliche Umgebungen der Indikatoren im Kristall und in der Lösung verursacht. Trotz leichter Farbverschiebungen zeigt aber der eingehende Vergleich der Farben bei verschiedenen pH-Werten, daß die pH-Indikatoren immer in derselben Form und damit in demselben Ladungszustand eingebaut wurden, wie sie kurz zuvor in Lösung vorgelegt hatten, und dies selbst bei einem unvollständigen oder inhomogenen Einbau. Besonders bei CO und MO ist das gut zu erkennen. Zur weiteren Untermauerung dieses Befundes wurden zusätzlich größere Kristalle untersucht. In diesen treten weniger Inhomogenitäten auf, so daß klarere Aussagen über die Farben möglich sind (s. Kap. D.1.1.3).

Die Erhaltung des Ladungszustands, wie er durch den pH-Wert der Lösung vor der Kristallisation vorgegeben war, konnte für alle Matrix-Analyt-Kombinationen bestätigt werden. Auch wenn sich in einigen Fällen der Farbton beim Aufkonzentrieren leicht änderte, blieb dieser Farbton der Lösung kurz vor der Kristallisation trotzdem immer in den trockenen Matrixkristallen erhalten. Dieser Effekt war zudem vollkommen unabhängig von der Nettoladung des Analyten, und es wurde der Einbau von Indikatoren mit einer Nettoladungen von +3 bis -2 durch ihre Färbung eindeutig nachgewiesen. Die Abb. D.1.1.5 zeigt für drei ausgewählte Farbstoffe einen Überblick über die erhaltenen Farben in Lösung und in der MALDI-Präparation mit unterschiedlichen Matrices.

### Bromphenolblau





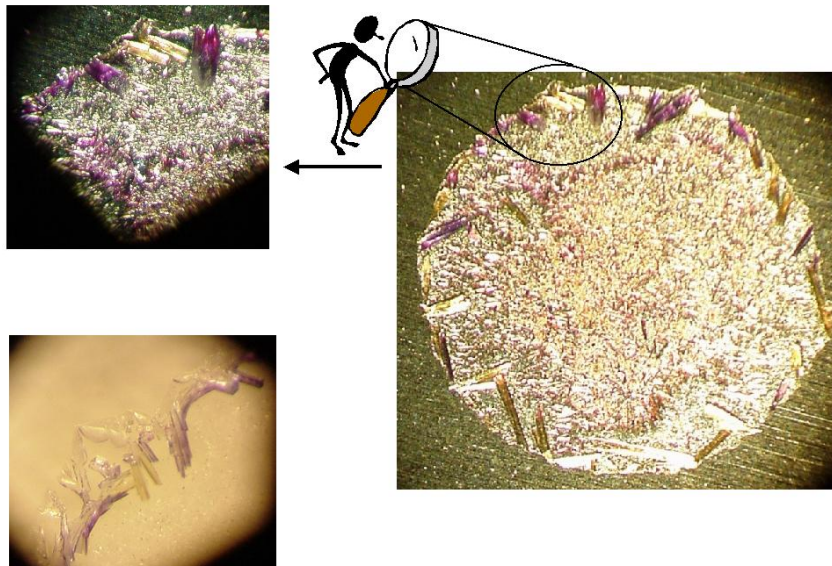
**Abbildung D.1.1.5:** Farbvergleich zwischen Lösung und Matrixpräparation für verschiedene Indikator-Matrix-Kombinationen. Vorige Seite: Bromphenolblau; diese Seite oben: Methylorange; diese Seite unten: Congorot.

### D.1.1.2. Mehrfarbige MALDI-Präparationen

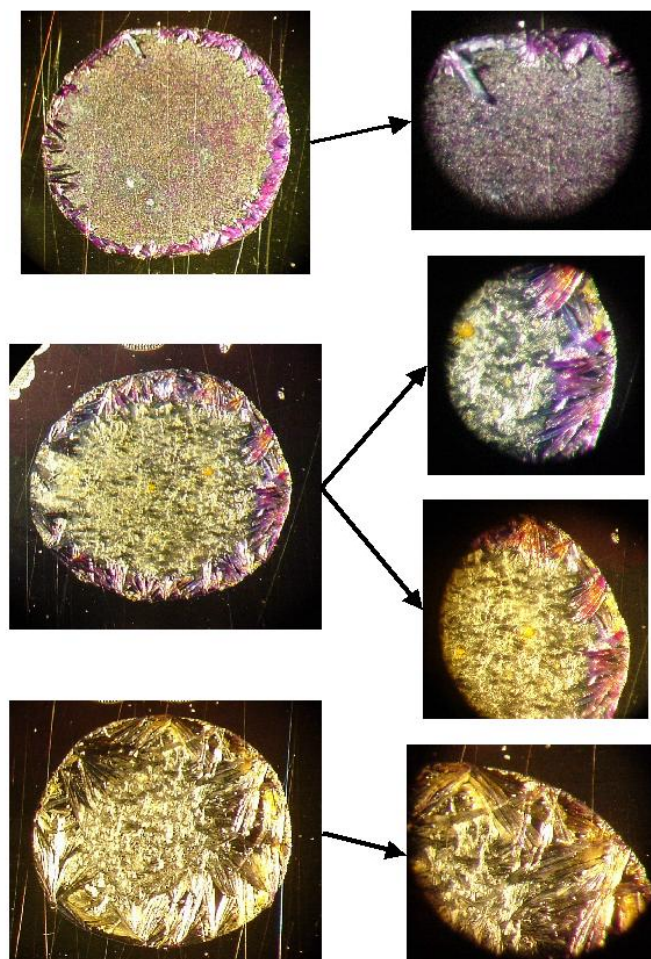
In den Präparationen, die im vorherigen Kapitel gezeigt wurden, ist teilweise eine inhomogene Verteilung des pH-Indikators zu erkennen. Dies deutet darauf hin, daß der Einbau der Farbstoffe je nach Kristallisationsbedingung und Matrix unterschiedlich effizient ist und das vor und nach der Kristallisation lokale Konzentrationsunterschiede vorhanden sind. Dies führt in einigen Fällen bis zur Bildung eines Farbstoffniederschlags, der aber in erster Linie auf die relativ hohen Konzentrationen der Indikatoren zurückzuführen sein dürfte. Trotz der Bildung des Niederschlags bleibt immer ein Teil des Farbstoffs bis zur Kristallisation in Lösung, so daß die resultierenden Kristalle durch den Einbau dieser Verbindungen gefärbt sind. Die inhomogene Verteilung von Analyten vor allem in grobkristallinen Präparationen ist bekannt und auch deswegen von besonderem Interesse, weil sie auch deutliche Auswirkungen auf die erhaltenen Spektren hat. Die unterschiedlichen Signalintensitäten, die stellenabhängig aus einer einzigen Präparation erhalten werden, sind sehr wahrscheinlich auf eine inhomogene Verteilung der Analyte zurückzuführen. Trotz der oftmals besseren Performance von grobkristallinen Matrixpräparationen (z.B. mit 2,5-DHB) werden gerne Oberflächenpräparationen verwendet, da bei diesen die Suche nach intensiven Analytsignalen ("*sweet spots*") in der Präparation entfällt und dadurch auch eine Automatisierung möglich ist.

Mit Hilfe der pH-Indikatoren sind solche leichten Variationen in einer Präparation gut zu erkennen, und zwar besonders dann, wenn ein pH-Wert in der Nähe des  $pK_A$ -Wertes eines Indikators verwendet wird. In Abb. D.1.1.6 ist eine Präparation von 2,5-DHB gezeigt, die mit dem Indikator IA dotiert ist, und es sind deutlich unterschiedlich gefärbte Kristalle zu erkennen. Es scheint also vor und bei der Kristallisation leichte Variationen und Inhomogenitäten des pH-Wertes in der Präparation zu geben, die zu einem unterschiedlichen Verhältnis von protonierter und deprotonierter Form beim Einbau des Farbstoffs führt. Der intrinsische pH-Wert von 2,5-DHB liegt etwas über pH 2 und damit relativ nahe am  $pK_A$ -Wert von IA (ca. 3.2), bei dem die protonierte und deprotonierte Form im Verhältnis 1:1 vorliegen. Es scheint demnach so zu sein, daß sich der pH-Wert beim Trockenvorgang der Matrix-Analyt-Mischung orts- und zeitabhängig ändert, was in der Folge zu lokalen pH-Werten von  $>3$ , und damit zu pH-Differenzen von ca. einer pH-Einheit innerhalb der MALDI-Präparation führt. Allerdings tritt dieser Effekt nicht bei allen Matrix-Indikator-Kombinationen auf. Durch eine Trennung der Kristalle nach ihrer Farbe mit anschließender MALDI-Analyse waren für die beiden Kristallsorten keine Unterschiede in den MALDI-Spektren zu finden. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß in unmittelbarer Nähe des  $pK_A$ -Wertes immer sowohl die protonierte als auch die deprotonierte Form des Indikators vorhanden sind, auch wenn eine Komponente im Überschuß vorliegt und damit die Farbe bestimmt.

Ein weiteres Beispiel dieser Art erhält man beim Farbumschlag von Kristallviolett (CV) im stark Säuren. Da keine der verwendeten Matrices sauer genug ist, um eine Protonierung von CV zu ermöglichen, muß hierzu eine starke Säure zugesetzt werden. Je nach verwendeter Säure findet aber eine relativ schnelle Zersetzung des Farbstoffs statt, so daß vor der Kristallisation und damit vor einem möglichen Einbau des Indikators die Farbe verschwindet. Dies ist z.B. mit Salzsäure der Fall, nicht jedoch mit Phosphorsäure. Abb. D.1.1.7 zeigt eine Präparation von CV mit 2,5-DHB unter Zusatz von Phosphorsäure inklusive einer vergrößerten Darstellung des grobkristallinen Randbereiches. In diesem sind deutlich die unterschiedlichen Farben der drei dicht beieinander liegenden Protonierungsstufen zu erkennen (Farbumschlag von violett über blau-grün nach gelb zwischen pH 1.8 und 0.0). Bei einer höheren Konzentration der Phosphorsäure findet eine Verschiebung des Protolysegleichgewichtes statt, so daß der violett-blaue Farbton verschwindet und nur noch grün-gelbe Farbtöne auftreten.



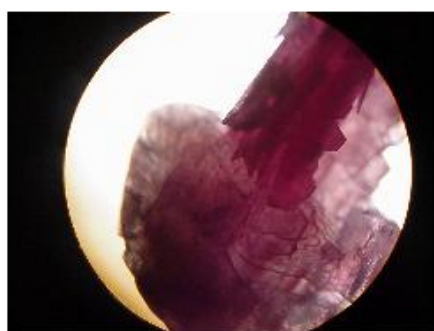
**Abbildung D.1.1.6:** Unterschiedlich gefärbte Kristalle in einer MALDI-Präparation: Matrix 2,5-DHB (dried droplet, ca. pH 2) dotiert mit dem Farbstoff IA.



**Abbildung D.1.1.7:** Unterschiedlich gefärbte Kristalle in einer MALDI-Präparation: Matrix 2,5-DHB (dried droplet) dotiert mit dem Farbstoff CV und Zusatz von Phosphorsäure. Obere Reihe: 0.094 %  $H_3PO_4$ ; Mittlere Reihe: 0.28 %  $H_3PO_4$ ; Untere Reihe: 0.85 %.

### D.1.1.3. Farbvergleich mit größeren Matrixkristallen

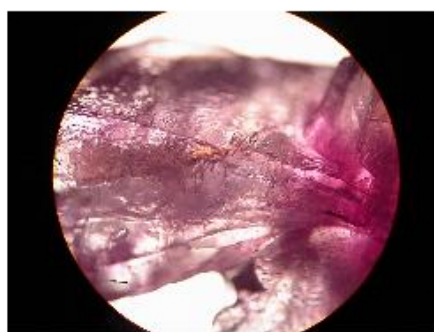
Für eine weitere Überprüfung des Analyteinbaus in Abhängigkeit vom pH-Wert wurden aus gesättigten Matrixlösungen nach Dotierung mit pH-Indikatoren größere Kristalle gezüchtet. Durch die langsamere Kristallisation ist der Einbau der Farbstoffe in die Matrixkristalle in einigen Fällen nahezu quantitativ, so daß die resultierenden Lösungen fast farblos oder nur schwach gefärbt waren, während die Kristalle eine intensive Färbung zeigten. Dies belegt erneut den sehr effizienten Einbau der Analyte in den Wirtskristall und ist zudem ein deutliches Indiz, daß die Geschwindigkeit der Kristallisation eine bedeutende Rolle spielt, im Einklang mit früheren Beobachtungen [Coh96]. Weiterhin spielt das Lösungsmittel eine Rolle, und zwar sowohl für die Effizienz des Einbaus als auch für die Intensität und den Ton der erhaltenen Farben im Kristall. Abb. D.1.1.8 zeigt 2,5-DHB-Kristalle, die alle mit derselben Menge des Farbstoffs IA und zusätzlich mit 0.1% TFA dotiert waren, aber aus unterschiedlichen Lösungen kristallisiert wurden. Im Fall von wäßrigen Lösung waren die Kristalle intensiv gefärbt, während die Lösung nahezu farblos war. Mit zunehmendem Anteil an organischem Lösungsmittel wurde sowohl die Kristallisation schwieriger als auch der Einbau des Farbstoffs, so daß die resultierenden Kristalle nur schwach gefärbt waren und der größte Teil des Farbstoffs in Lösung blieb. Auch hier sind unterschiedliche Farbintensitäten und damit Konzentrationen im Kristall zu erkennen, allerdings keine Bereiche mit verschiedenen Farben.



**Wasser**



**Wasser/Acetonitril (1:1)**



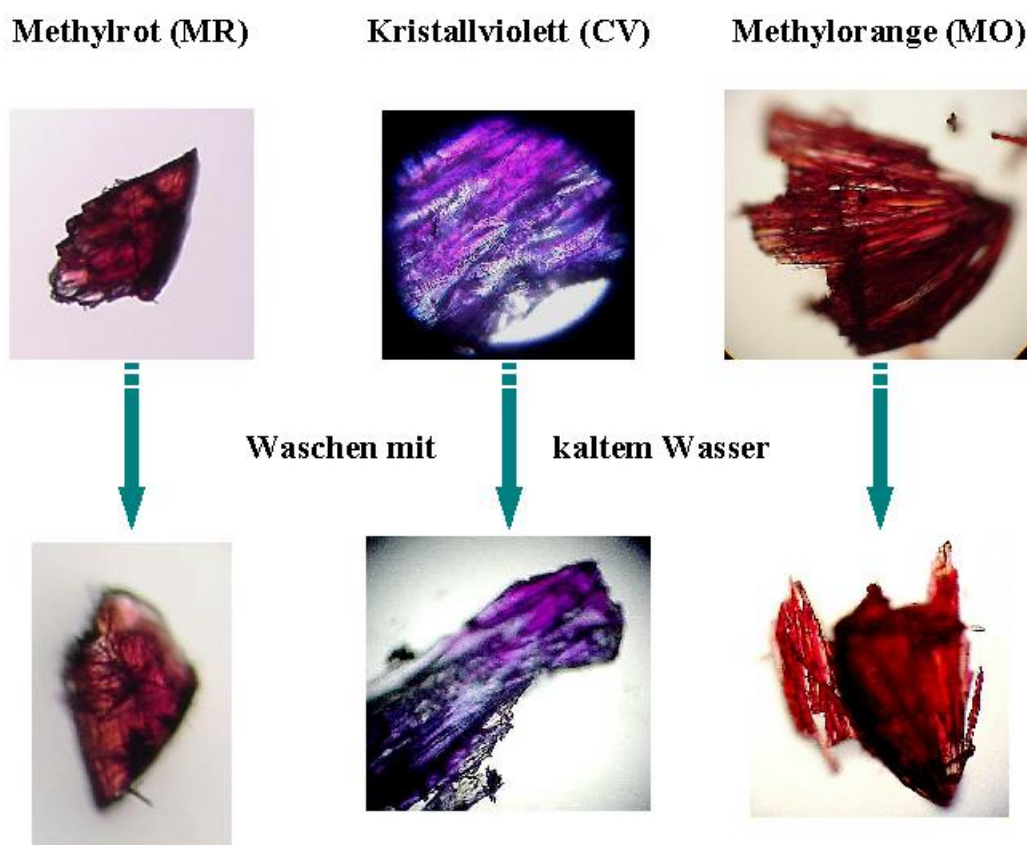
**Acetonitril**



**Gleicher Kristall wie links  
nach Waschen mit Wasser**

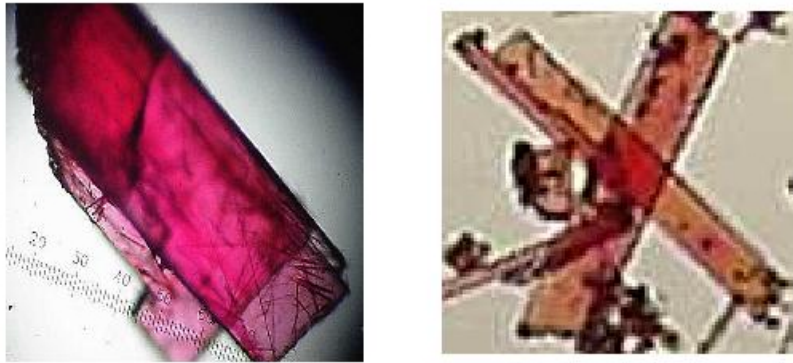
**Abbildung D.1.1.8:** Einfluß des Lösungsmittels: Matrixkristalle (2,5-DHB), erhalten durch Abkühlen von gesättigten Lösungen dotiert mit 0.1 % TFA und  $10^{-3}$  mol/L des Farbstoffs IA. Oben links: Wasser; oben rechts: Wasser/Acetonitril (1:1); unten links: Acetonitril; unten rechts: derselbe Kristall wie links unten (aus Acetonitril) nach Waschen mit kaltem Wasser.

Die oben gezeigten Kristalle wurden durch langsames Abkühlen einer gesättigten Matrixlösung gewonnen, aber auch langsames Verdampfen von Lösungsmittel bei Raumtemperatur ergab intensiv gefärbte Kristalle. Wie bereits in Abb. D.1.1.8 angedeutet, führt auch ein vorsichtiger Waschprozeß mit kaltem Wasser oder kalter TFA nicht zu einer Entfärbung der Kristalle, sofern dabei ein gleichzeitiges Auflösen der Kristalle vermieden werden kann. Daher kann man davon ausgehen, daß die Farbstoffe in den Kristall eingebaut sind und nicht nur an der Oberfläche der Kristalle adsorbiert sind. Auch nach Spalten der Kristalle sind die neuen Oberflächen genauso intensiv gefärbt wie die übrigen Oberflächen. In Abb. D.1.1.9 ist deutlich zu erkennen, daß sich die Färbung der Kristalle nach dem Waschprozeß nicht geändert hat. Erhärtert wird der Analyteinbau aber auch durch die hohen initialen Geschwindigkeiten der Farbstoffionen (s. Kap. D.1.5).



**Abbildung D.1.1.9:** Matrixkristalle dotiert mit verschiedenen pH-Indikatoren ( $10^{-3}$  mol/L) vor und nach dem Waschen mit Eiswasser.

Die Absorption und damit Farbintensität ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz von der Schichtdicke abhängig. Der Einfluß der Schichtdicke auf die Farbe eines Matrixkristall ist in Abb. D.1.1.10 besonders gut zu erkennen: An dickeren Stellen im Kristall (links) oder an der Stelle, wo sich zwei dünne Kristalle kreuzen (rechts), ist der Farbton aufgrund der größeren Schichtdicke deutlich dunkler. Dennoch sind solche Nuancen in allen Fällen deutlich von einem pH-bedingten Farbumschlag zu unterscheiden, der eine viel größere, qualitative Farbänderung mit sich bringt.



**Abbildung D.1.1.10:** Unterschiedliche Farbintensität in Abhängigkeit von der Schichtdicke bei zwei übereinander liegenden Matrixkristallen (2,5-DHB) dotiert mit MO ( $10^{-3}$  mol/L).

Beim Vergleich der Farben von größeren Matrixkristallen, die mit verschiedenen pH-Indikatoren dotiert waren, zeigte sich noch deutlicher als bei den MALDI-Präparationen, daß der Ladungszustand der Farbstoffe in Lösung immer im Matrixkristall erhalten bleibt und je nach intrinsischem pH-Wert der Matrix unterschiedlich gefärbte Kristalle entstehen. Dies ist für eine Reihe Matrix-Indikator-Kombinationen in Abb. D.1.1.11 gezeigt.<sup>19</sup>

Allerdings erkennt man auch hier in einigen Fällen eine inhomogene Verteilung der Indikatoren im Kristall, besonders bei der relativ schwerlöslichen protonierten Form von CO. Trotzdem kommt es nicht zu einem Farbumschlag und demnach zu keiner Änderung des Ladungszustandes beim Einbau. Geringe Einbauraten im Wirtskristall waren nur in wenigen Fällen und nur bei Molekülen ohne Nettoladung zu beobachten. Hauptgrund dürften geringe Löslichkeiten sein, so daß nur der gelöste Teil eingebaut wird, während der Rest vor der Kristallisation ausfällt. Dies zeigt deutlich, daß nicht etwa der Einbau von neutralen Molekülen in Matrizes besonders günstig ist, sondern daß gerade der Einbau geladener Verbindungen durch ihre gute Löslichkeit selbst in den kurz vor der Kristallisation vorherrschenden, sehr konzentrierten Matrixlösungen besonders effizient ist.

<sup>19</sup> Die Kristalle von 2,5-DHB dotiert mit Thymolblau waren so schwach farbig, daß dies auf den Aufnahmen kaum zu erkennen ist. Aber auch in Lösung sind die Farben der neutralen und einfach deprotonierten Form von TB bereits sehr schwach, was auf den Anteil an organischem Lösungsmittel und der dadurch begünstigten farblosen Sulfonylform zurückzuführen sein könnte.

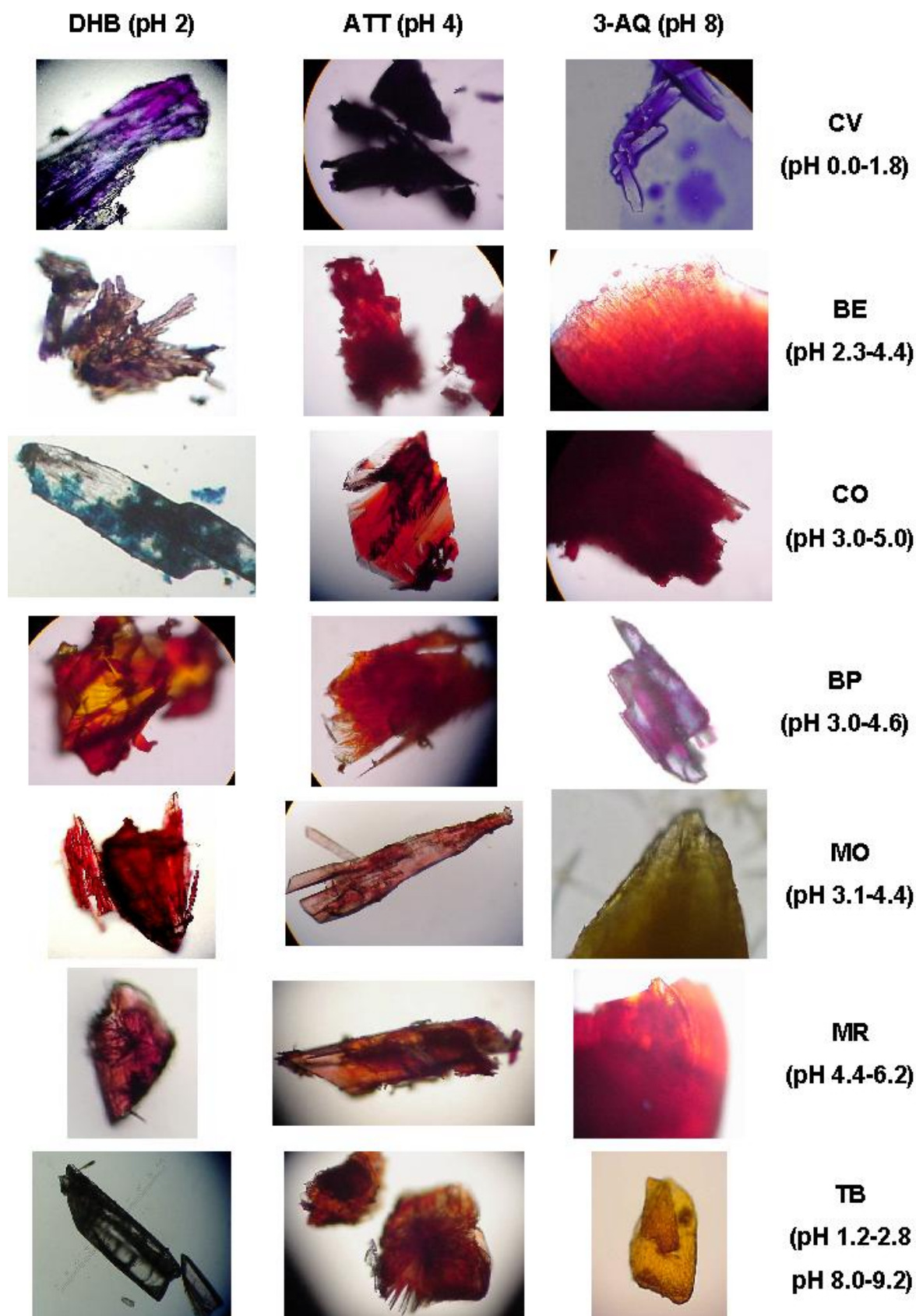


Abbildung D.1.1.11: Farbvergleich verschiedener Matrixkristalle (2,5-DHB, ATT, 3-AQ) dotiert mit unterschiedlichen pH-Indikatoren ( $10^{-3}$  mol/L) in Abhängigkeit vom intrinsischen pH-Wert der Matrix (rechts sind die Umschlagbereiche angegeben).



### D.1.2. Einbau von Lösungsmittel in Matrix-Analyt-Kristalle

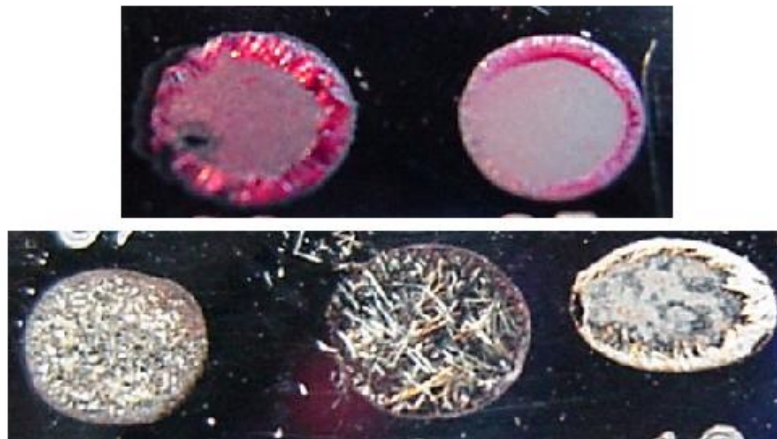
Die Matrixkristalle mit den eingebauten Indikatoren zeigen alle eine leuchtende, kräftige Farbe, wie sie auch in Lösung beobachtet wird. Dies ist bei den festen Farbstoffen nicht der Fall, die meist eine schlecht definierte, gedeckte Mischfarbe aufweisen. Daher liegt die Vermutung nahe, daß in der Umgebung der Indikatoren (und damit auch in der Umgebung anderer Analyte) Lösungsmittel vorhanden ist. Das könnte bedeuten, daß die Analytmoleküle nicht direkt zwischen die organischen Matrixmoleküle eingelagert sind, sondern in einer Lösungsmitteltasche sitzen. Dies könnte zugleich eine Erklärung dafür sein, daß Analyte in ihrer ionischen Form im Kristall existieren können und nicht beim Einbau neutralisiert werden. Besonders intensiv und leuchtend ist die Farbe bei Matrizes und Matrixkombinationen, die als sehr schonend bekannt sind, z.B. bei DHBs und 3-HPA, aber auch bei einer Mischung aus 2,5-DHB und Bernsteinsäure. Es könnte also sein, daß durch eine Hülle aus Lösungsmittel eine schonendere Desorption/Ionisation möglich ist. Die Solvation dieser Analytionen könnte zudem dafür sorgen, daß weniger enge Ionenpaare gebildet werden, so daß eine leichter Ladungstrennung erfolgen kann. Dagegen zeigen Kristalle von 2,6-DHB, von der bekannt ist, daß sie Analyte kaum einbaut, nur eine schwache, opaque Färbung, die durch Adsorption der Farbstoffe ohne Lösungsmittel verursacht sein könnte.

Ein weiteres Indiz für einen Lösungsmiteleinschluß ist die Tatsache, daß die farbigen Präparationen nach einiger Zeit ihre Farbe verlieren. Diese matrixabhängigen Alterungsprozesse werden im Folgenden beschrieben. Da aber diese Beobachtungen nur Indizien sein können, wurden zum eindeutigen Nachweis von Lösungsmiteleinschlüssen Matrixkristalle in deuteriertem Methanol aufgelöst und mit  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Diese Versuche sind in Kapitels D.1.2.2 beschrieben.

#### D.1.2.1. Alterungseffekte

Alle MALDI-Präparationen, bei denen einer der pH-Indikatoren zugesetzt wurde, zeigen eine leuchtende, brillante Farbe. Diese tritt auch in Lösung auf, nicht jedoch bei den Farbstoffen in fester Form, so daß man den Einschluß von Lösungsmitteln in Matrixkristallen vermuten kann. Diese Interpretation wird durch die Tatsache gestützt, daß die Farbe der Kristalle mit der Zeit verschwindet. Es scheint so zu sein, daß die Kristalle mit der Zeit restliches Lösungsmittel verlieren, so daß die Farbe ausbleicht. Dieser Ausbleichprozeß ist allerdings je nach Matrix und Kristallgröße sehr unterschiedlich schnell und verläuft mit feinkristallinen Präparationen meist schneller als mit großen Kristallen. Während die Farbe grobkristalliner Präparationen (z.B. der Rand von 2,5-DHB) über Tage erhalten bleibt und kaum ein Altern erkennbar ist, bleichen andere Präparationen in Minuten oder Stunden aus. Dieser unterschiedlich schnelle Alterungsprozeß könnte auch dafür verantwortlich sein, daß einige Matrixpräparationen noch nach Tagen mit MALDI vermessen werden können, während mit anderen Matrizes schon nach wenigen Stunden eine Abnahme der Signalintensitäten und eine allgemein schlechtere Spektrenqualität (höheres Rauschen) beobachtet wird. In Abb. D.1.2.1 sind verschiedene MALDI-Präparationen gezeigt, nachdem der Probenhalter einige Tage in einer verschlossenen Box, aber bei Normaldruck und Raumtemperatur, aufbewahrt wurde.

Man erkennt deutlich, daß die Präparationen mit 2,5-DHB und DHBs am grobkristallinen Rand immer noch sehr deutlich gefärbt sind, während die anderen Matrizes fast keine Farbe mehr aufweisen. Obwohl feinkristalline Matrizes bereits direkt nach der Kristallisation nur schwach gefärbt sind, erkennt man gerade bei diesen Matrizes innerhalb kurzer Zeit (wenige Stunden) eine weitere, deutliche Abnahme der Farbintensität. Dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Lösungsmittelmengen je nach Kristallgröße sein. Allerdings bleicht auch farbstoffdotierte 3-HPA trotz der recht großen Kristalle relativ schnell aus.

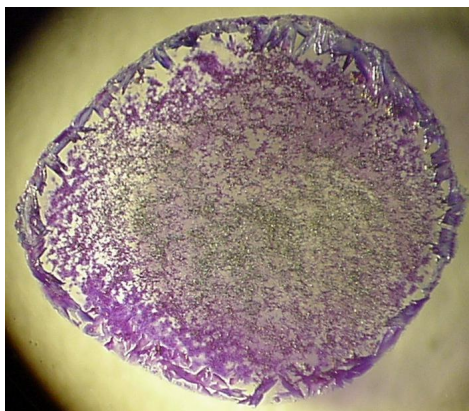


**Abbildung D.1.2.1** : Wenige Stunden alte MALDI-Präparationen verschiedener, farbstoffdotierter Matrices. Oben: 2,5-DHB, DHBs; unten: SIN, FER, 3-HPA (jeweils von links nach rechts).

Das Ausbleichen könnte prinzipiell auch durch eine Zersetzung des Farbstoffes zustande kommen, die stark unterschiedliche Alterungsgeschwindigkeit mit verschiedenen Matrices spricht jedoch dagegen. Ein Beweis dafür, daß die Farbstoffe nicht zersetzt werden, liefert das Auflösen gealterter Präparationen mit frischem Lösungsmittel. Dabei erscheint erneut die Farbe der Indikatoren, und auch neu gebildete Kristalle haben wieder leuchtende Farben. Zerdrückt man größere, intensiv gefärbte Kristalle mit einem Spatel, verschwindet die Farbe mehr oder weniger ganz. Aber auch hier entsteht nach erneuter Aufnahme in frischem Lösungsmittel wieder eine gefärbte Lösung. Die Farblosigkeit von feinkristallinen Präparationen wird also nicht durch fehlenden oder zerstörten Farbstoff verursacht, sondern kann nur an fehlendem Lösungsmittel oder einer stärkeren Lichtstreuung liegen. Obwohl auch von gealterten Proben noch Analytsignale erhalten werden können, sinkt die Spektrenqualität mit der Zeit deutlich, was sich besonders in einem niedrigeren Signal-Rausch-Verhältnis niederschlägt. Dieser Effekt ist zudem bei den Matrices am ausgeprägtesten, die ihre Farbe am schnellsten verlieren. Dazu gehört die besonders schnell alternde Sinapinsäure, wohingegen sich Präparationen mit 2,5-DHB und DHBs nur langsam verändern.

Eine interessante Beobachtung wurde bei der Präparation des Indikators CV mit DHBs unter Zusatz von verdünnter Schwefelsäure gemacht. Die intensive, violette Färbung war nach dem Einschleusen in das Vakuum des Massenspektrometers verschwunden. In einigen Fällen entstanden aber nach einer kurzen Zeit bei Normaldruck wieder gefärbte Kristalle. Eine erneute Aufnahme von Wasser aus der Atmosphäre ist dafür die einfachste Erklärung. Da Schwefelsäure (bzw.  $\text{SO}_3$ , daß nach Verlust von Wasser im Vakuum entstehen kann) hygroskopisch ist, könnte sie für eine erneute Aufnahme von Wasser bzw. für eine Rekristallisation sorgen.

Der Verlust von Lösungsmittel aus den Kristallen zeigt sich ganz deutlich, wenn man bestimmte Matrix-Indikator-Präparationen (z.B. CV präpariert mit 2,5-DHB) einige Stunden bei ca.  $80^\circ\text{C}$  in den Trockenschrank legt. Während die größeren Kristalle immer noch größtenteils violett gefärbt sind, zeigt der innere Bereich die kupfern-braun-grüne Färbung des Indikator-Feststoffs (s. Abb. D.1.2.2). Die Farbe des festen Indikators unterscheidet sich deutlich von der Farbe in Lösung. Dies zeigt, daß zum einen Lösungsmittel in der direkten Umgebung des Indikators vorhanden sein muß, daß aber das Lösungsmittel zum anderen je nach Matrix, Kristallgröße, Temperatur und Druck auch wieder aus den Kristallen entweichen und verdampfen kann.



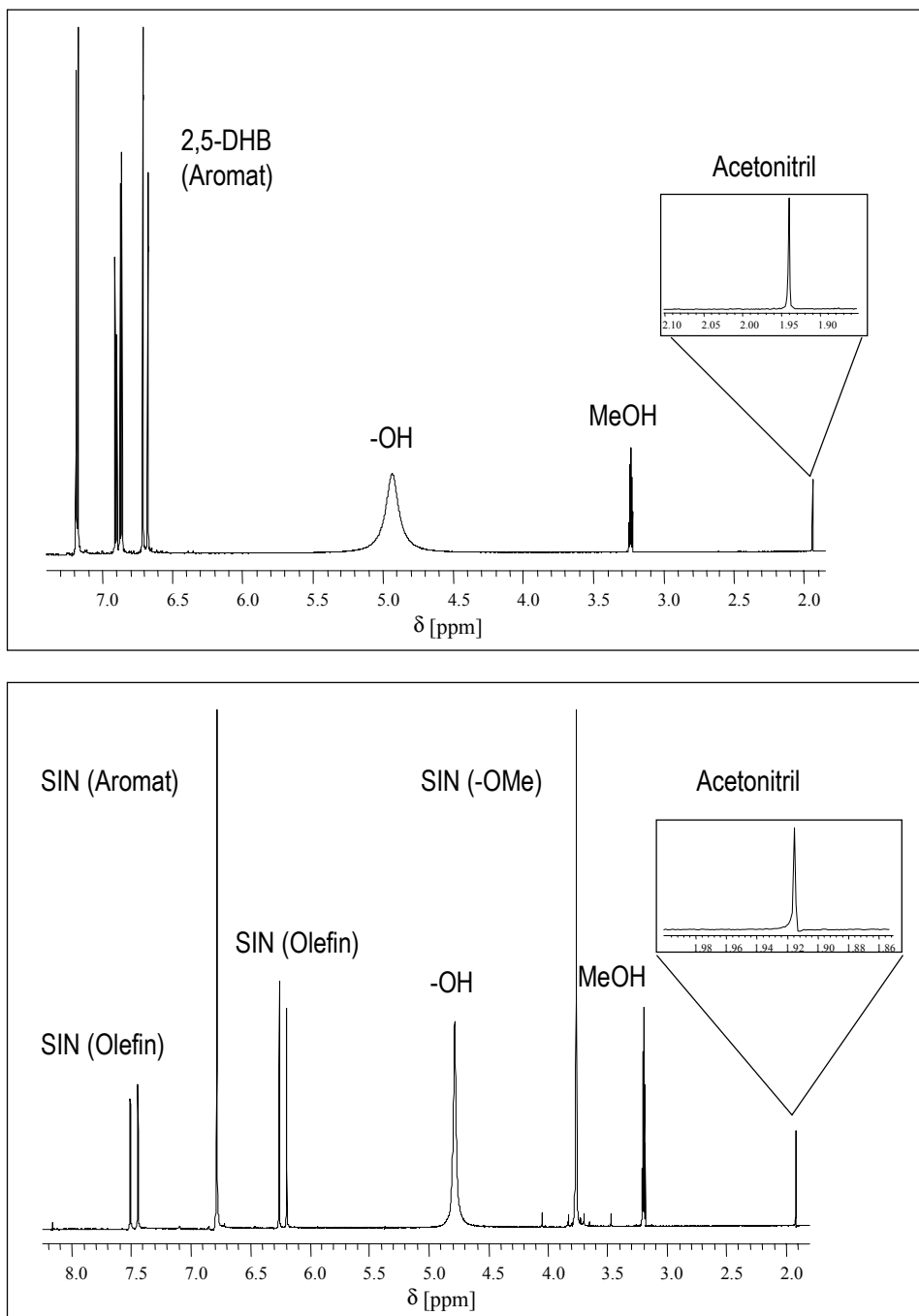
**Abbildung D.1.2.2** : Präparationen des Indikators Kristallviolett (CV) mit der Matrix 2,5-DHB nach einigen Stunden Trocknen bei 80 °C in einem Trockenschrank.

#### D.1.2.2. <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie von aufgelösten Matrixkristallen

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Lösungsmittel in den Matrixkristallen wurde die <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie eingesetzt. Dazu wurden zunächst durch langsames Abkühlen von gesättigten Matrixlösungen auf ca. 8° C im Kühlschrank Kristalle gezüchtet.<sup>20</sup> Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril im Verhältnis 1:1 verwendet. Um analythaltige Matrixkristalle zu gewinnen, wurden einige Matrixlösungen zusätzlich mit 20 µL Insulinlösung (10<sup>-5</sup> mol/L) versetzt. Die erhaltenen Kristalle wurden dann getrocknet und in deuteriertem Methanol wieder aufgenommen. Zum Vergleich wurde auch die reine Matrix in CD<sub>3</sub>OD gelöst. In Abb. D.1.2.3 sind <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von 2,5-DHB und Sinapinsäure gezeigt. Deutlich ist neben den sehr hohen Matrixsignalen ein weiteres Signal zu erkennen, daß von Acetonitril stammen muß, da das Signal im richtigen Bereich für eine Methylgruppe mit einem benachbarten Stickstoff liegt ( $\delta = 1.92 - 1.94$  ppm). Wird dagegen direkt die reine Matrix in CD<sub>3</sub>OD aufgelöst und spektroskopiert, so ist entweder fast gar kein Acetonitril-Signal zu finden oder dieses ist wesentlich niedriger als im Falle der aufgelösten Matrixkristalle.

Zur Ermittlung der Menge des Lösungsmittels im Kristall wurde in allen Spektren das Signal für die Methyl-Protonen des Acetonitril mit den <sup>1</sup>H-Signalen der Matrix verglichen. Bei Berücksichtigung der Anzahl der H-Atome pro Molekül ist auf diesem Wege eine relative Quantifizierung möglich. Diese Abschätzung ergab, daß in allen untersuchten Matrixkristallen zwischen 0.3 und 3.7 % (n/n) Acetonitril enthalten war (s. Tab. D.1.2.1). Der Acetonitril-Gehalt in der reinen Matrix liegt dagegen wesentlich niedriger, ist aber von der Matrix abhängig, vermutlich aufgrund des Herstellungs- und Reinigungsprozesses. Während bei SIN und  $\alpha$ CHCA zwischen 0.2 und 0.7 % Acetonitril gefunden wurde, betrug der Gehalt in reinem 2,5-DHB-Pulver unter 0.01 %, so daß das Signal aufgrund der geringen Intensität kaum noch integriert werden konnte. Nach der Kristallisation der Matrix aus Lösungsmittel ist damit der Lösungsmittelgehalt im Falle der Zimtsäure-Matrizes etwa um den Faktor 2 bis 5 höher, und bei 2,5-DHB findet man sogar fast die hundertfache Menge Acetonitril als in Matrixpulver.

<sup>20</sup> Die Kristalle von  $\alpha$ CHCA wurden nach einem anderen Protokoll gezüchtet: Eine gesättigte, mit TFA angesäuerte Matrixlösung wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und eine Stunde bei 40-50° C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung bis auf ein kleines Loch abgedeckt und ca. 2 Tage bei Raumtemperatur stehengelassen.



**Abbildung D.1.2.3 :**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Matrixkristallen, die in deuteriertem Methanol aufgelöst wurden. Oben: 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB); unten: Sinapinsäure (SIN).

Der Einbau von Analyten in den Matrixkristallen scheint jedoch auf den Lösungsmiteleinfluß keinen Einfluß zu haben, da bei den mit Insulin dotierten Kristallen eine ähnlicher Gehalt an Acetonitril gefunden wurde wie ohne Analytzusatz. Einen wesentlichen Einfluß hat dagegen der Trocknungsprozeß, da die Kristalle bei erhöhter Temperatur oder im Vakuum einen Teil des Lösungsmittels verlieren. Um diesen Verlust zu quantifizieren, wurden einige Kristalle drei Stunden entweder bei 100 °C im Trockenschrank oder bei ca.  $10^{-7}$  mbar im Vakuum des Massenspektrometers getrocknet. Es zeigte sich, daß die Menge des Lösungsmittelverlusts beim Trockenvorgang stark matrixabhängig ist. Während sich der Lösungsmittelgehalt von 2,5-DHB-Kristallen bei den verschiedenen Trocknungsprozessen kaum unterscheidet, verliert Sinapinsäure

insbesondere beim Trocknen im Vakuum ca. die Hälfte des eingeschlossenen Acetonitrils. Trotzdem enthalten die Sinapinsäure-Kristalle nach gründlichem Trocknen immer noch mehr Lösungsmittel, als bei Raumtemperatur getrocknete 2,5-DHB-Kristalle. Dabei ist allerdings unklar, ob beim Trocknen adsorbiertes Lösungsmittel verdunstet oder ob auch aus dem Inneren der Kristalle Lösungsmittel entweichen kann. Die Messungen zeigen jedoch deutlich, daß selbst nach gründlichem Trocknen bei erhöhter Temperatur oder im Vakuum noch restliches Lösungsmittel in den Kristallen verbleibt. Dieser verbleibende Rest kann daher definitiv nicht nur an der Oberfläche der Kristalle adsorbiert sein, sondern muß im Kristall eingeschlossen sein. Dieser Anteil des Lösungsmittels könnte auch zu einer Solvataion von Analyten im Kristall beitragen und eine schonende Desorption/Ionisation ermöglichen.

Leider ist die Detektion von Wasser aufgrund des im Vergleich zur Spektrenaufnahme schnellen Protonentransfers mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nicht möglich. Es ist aber sehr unwahrscheinlich, daß aus einem Lösungsmittelgemisch nur das organische Lösungsmittel im Kristall verbleibt und Wasser ausgeschlossen bleibt. Da alle Matrices relativ polar sind, ist sogar eher ein besonders effektiver Einschluß von Wasser zu erwarten. Dies würde bedeuten, daß die gesamte Lösungsmittelmenge in den Matrixkristallen noch höher liegen dürfte, vermutlich in der Größenordnung 5 bis 10 %. In der Tat wurde kurz nach der Publikation der hier vorgestellten Ergebnisse mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration Wasser in Matrixkristallen nachgewiesen, die Menge wurde dort mit 1.2 - 4.3 % (n:n) angegeben [Dur02].

**Table D.1.2.1 :  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Bestimmung des Acetonitrilgehalts (%/n:n) in Matrixkristallen nach Auflösen der Kristalle in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (jeder Wert repräsentiert eine einzelne Messung).**

Matrix	Reine Matrix ohne Re-kristallisation	Kristalle aus Acetonitril / Wasser (1:1)		
		Getrocknet bei Raumtemperatur	Getrocknet bei 100° C im Trockenschrank (3 Std.)	Getrocknet im MALDI-Vakuum ( $10^{-7}$ -mbar, 3 Std.)
2,5-DHB	<0.01	0.43 / 0.88	0.34 / 0.85	0.33 / 0.36
2,5-DHB + Insulin	<0.01	0.77	0.80	0.84
SIN	0.62	2.54 / 3.73	2.13 / 2.71	1.76 / 1.36
SIN + Insulin	0.62	3.37	1.61	1.57
$\alpha\text{CHCA}$	0.22	0.64	0.59	-
$\alpha\text{CHCA}$ + Insulin	0.22	0.65	-	-
$\alpha\text{CHCA}$ + Cytochrom C <sup>a</sup>	0.22	0.48	-	-

Berechnung des Lösungsmittelgehalts: Vergleich der integrierten  $^1\text{H}$ -Signalintensitäten von Acetonitril ( $\text{CH}_3$ -Gruppe) mit den Intensitäten der aromatischen und olefinischen  $^1\text{H}$ -Signalen der Matrix (unter Berücksichtigung der Anzahl H-Atome im Moleküle).

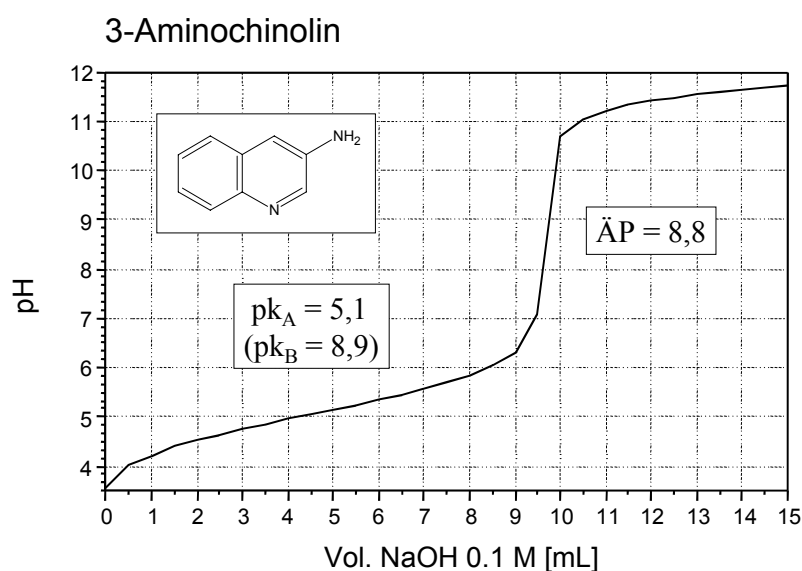
<sup>a</sup> Gelabelt mit dem Farbstoff Texas Red.

### D.1.3. Korrelation des Lösungs-pH mit MALDI-Spektren der Farbstoffe

Eine wichtige Konsequenz der Ergebnisse der vorhergehenden Kapitel ist, daß die Analyten in Abhängigkeit vom intrinsischen pH-Wert in unterschiedlichen Ladungszuständen im Matrixkristall eingeschlossen werden. Es liegt nahe, einen direkten Zusammenhang zwischen den gebildeten Ionen (bzw. MALDI-Spektren) und den verschiedenen, im Kristall vorhandenen Vorläufermolekülen zu vermuten. Anhand des intrinsischen pH-Wertes der Matrixlösung sowie der durch die Farbe leicht bestimmbaren Ladung bzw. Protonierungsgrad des Indikators ist ein direkter Vergleich mit den detektierten MALDI-Ionen möglich. Dazu wurden die notwendigen Säure-Base-Eigenschaften der Matrices und Indikatoren ermittelt und mit den erhaltenen MALDI-Spektren verglichen. Ein Überblick über Mechanismen des Farbumschlags bei verschiedenen pH-Indikatoren sowie die Strukturen der verschiedenen Protonierungsstufen findet sich im Anhang G.1.

#### D.1.3.1. Säure-Base-Eigenschaften der verwendeten Matrices und pH-Indikatoren

Für die Interpretation der nachfolgenden Korrelationsexperimente ist vor allem die Kenntnis der  $pK_A$ -Werte, Äquivalenzpunkte und Ladungen der Indikatoren sowie der intrinsischen pH-Werte der Matrixlösungen notwendig. Die Strukturformeln der Matrices finden sich in Kap. B.2.1. Die Säurekonstanten und die Äquivalenzpunkte der Matrices und Indikatoren wurden durch Säure-Base-Titration bestimmt bzw. aus den gemessenen Werten berechnet (s. Anhang G.2). Abb. D.1.3.1 zeigt beispielhaft die Titrationskurve der Matrix 3-Aminochinolin, in Tabelle D.1.3.1 sind die gemessenen und berechneten Werte der Matrices aufgelistet.



**Abbildung D.1.3.1:** Titrationskurve der Matrix 3-Aminochinolin

Von besonderem Interesse ist der intrinsische pH-Wert der Matrixlösung. Dieser ist meist durch die Matrix selbst vorgegeben, da diese normalerweise im Überschuß vorhanden ist. Der pH-Wert der Präparationslösung kann zwar in engen Grenzen auch mit Puffern eingestellt werden, dabei muß aber die Matrix immer die Hauptkomponente bleiben, da ansonsten Probleme bei der Kristallisation auftreten. Der intrinsische pH-Wert der für die MALDI-Präparation verwendeten Matrixlösungen wurde sowohl mittels einer pH-Elektrode als auch rechnerisch ermittelt. Literaturdaten sind nur für wenige Matrices vorhanden. Eine Ausnahme ist 3-HPA, für die –in relativ guter Übereinstimmung mit den obigen Werten– ein intrinsischer pH-Wert von 2.9 bei  $c = 0,5 \text{ mol/L}$  und rechnerisch ermittelte  $pK_A$ -Werte von 2.1 und 4.8 angegeben wurden [Wu94].

**Tabelle D.1.3.1: Säure-Base-Eigenschaften der verwendeten Matrizes**

Matrix	Abkürzung	pK <sub>A</sub> -Werte <sup>a</sup>	Äquivalenzpunkte <sup>b</sup>		intrinsischer pH-Wert <sup>c</sup> (c = 0.1 mol/L)	
			Gemessen (c = 0.05 mol/L)	berechnet (c = 0.1 mol/L)	gemessen	berechnet
2,5-Dihydroxybenzoesäure	2,5-DHB	3.3	6.8	8.2	2.0	2.1
3-Hydroxypicolinsäure	3-HPA	2.4 5.4 (pK <sub>B</sub> 8.6)	3.8 8.7	3.9 9.2	3.1	3.9
Sinapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure)	SIN	5.6 ~ 9.5	7.0 ~ 10 – 11	7.6 ~ 11.3	3.5	3.3
6-Aza-2-thiothymine	ATT	6.6	9.0	9.8	4.0	3.8
3-Amino-chinolin	3-AQ	5.1 (pK <sub>B</sub> 8.9)	8.8	9.1	8.0	9.1
2-(2-Aminoethylamino)-5-nitropyridin	ANP	2.2 (pK <sub>B</sub> 12.8) n.d.	5.2 n.d.	- -	- 9.5	- -

<sup>a</sup> Die pK<sub>A</sub>-Werte wurden durch Titration von 10<sup>-3</sup> mol der Matrix mit 0.1 M NaOH bestimmt.

<sup>b</sup> Die Äquivalenzpunkte (c = 0.05 mol/L) wurden den Titrationskurven entnommen und aus den pK<sub>A</sub>-Werten wurden die Äquivalenzpunkte für c = 0.1 mol/L errechnet.

<sup>c</sup> Die intrinsischen pH-Werte wurden ebenfalls aus den pK<sub>A</sub>-Werten berechnet und mit einer pH-Elektrode überprüft. Verwendete Matrixlösungen: 3-AQ 10 g/L in Wasser; ANP 10 g/L in Ethanol/Wasser (1:1); alle anderen Matrizes 20 g/L in Acetonitril/Wasser (1:1).

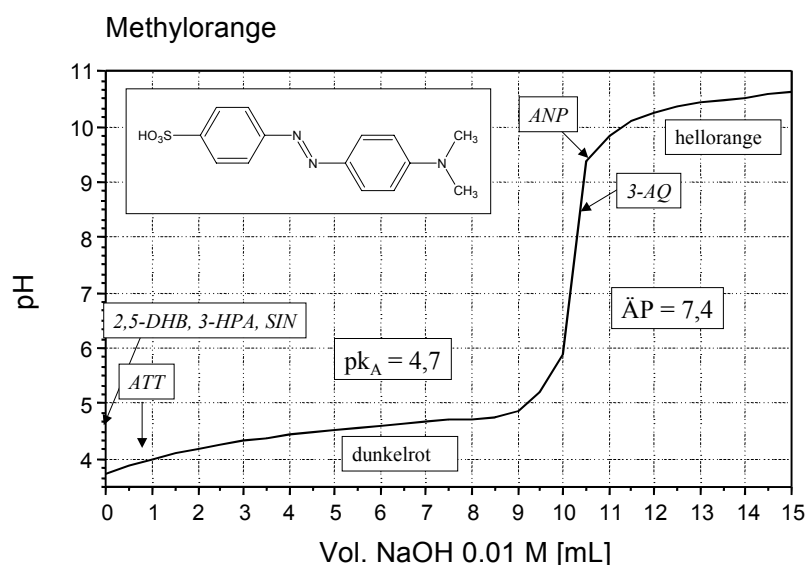
n.d. = nicht detektiert. Die 2. und 3. Dissoziationsstufe konnten bei der Titration nicht aufgelöst werden.

Im Gegensatz zu den MALDI-Matrizes sind für fast alle Säurekonstanten der Farbstoffe Literaturwerte bekannt, da diese seit ca. 100 Jahren hergestellt werden und von großer wirtschaftlicher Bedeutung sind [Ros89, Boo89]. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine Titration der Farbstoffe analog wie bei den Matrizes durchgeführt, ein Beispiel ist in Abb. D.1.3.2 abgebildet. Dort ist auch angedeutet, bei welchem Bereich der Kurve man sich jeweils befindet, wenn eine bestimmte Matrix verwendet wird. Dies zeigt anschaulich, daß je nach intrinsischem pH-Wert der Matrix ganze unterschiedliche Formen des Farbstoffes in Lösung vorherrschen, was sich auch in den MALDI-Spektren widerspiegelt (s. Kap. D.1.3.2).

Für die eindeutige Zuordnung der gebildeten Ionen zu den bereits im Kristall vorhandenen Ionen oder Molekülen sollten nicht mehrere Protonierungsstufen der detektierten Analytionen nebeneinander in der Lösung oder im Kristall vorhanden sein. Von besonderem Interesse ist daher der Äquivalenzpunkt des pH-Indikators, da jenseits dieses pH-Wertes in erster Näherung nur eine Spezies existiert.<sup>21</sup> Bei pH-Werten im Umkreis des Halbäquivalenzpunktes sind dagegen immer (mindestens) zwei unterschiedliche Formen vorhanden, die eine Interpretation erschweren. Die der

<sup>21</sup> Bei dieser Betrachtungsweise wird allerdings die Eigendissoziation am Äquivalenzpunkt vernachlässigt, durch die besonders in stark sauren oder stark basischen Lösungen auch nach dem Äquivalenzpunkt keine vollständige Protonierung bzw. Deprotonierung erreicht wird.

Literatur oder der Titrationskurve entnommenen  $pK_A$ -Werte sowie die daraus errechneten Äquivalenzpunkte für  $c = 10^{-3}$  mol/L sind in Tabelle D.1.3.2 aufgelistet.



**Abbildung D.1.3.2:** Titrationskurve von Methylorange. Zum Vergleich mit der Situation bei der MALDI-Präparation sind die intrinsischen pH-Werte einiger Matrices angedeutet.

**Tabelle D.1.3.2: Säure-Base-Eigenschaften der verwendeten pH-Indikatoren**

Farbstoff	$pK_A$ -Werte		Äquivalenzpunkte (ÄP)		
	Literatur <sup>a</sup>	gemessen	berechnet aus Literaturwert ( $c = 10^{-3}$ mol/L)	berechnet aus Meßwert ( $c = 10^{-3}$ mol/L)	gemessen ( $c = 0.005$ mol/L)
CV	-	n.d.	-	-	n.d.
IA	-	3.2	-	7.1	6.8
BE	-	$\sim 4^b$	-	$7.5^b$	$7.5^b$
CO	-	$5.4^b$	-	$8.2^b$	$7.8^b$
BP	4.1	$\sim 4.5$	7.6	7.8	7.4
MO	4.2	4.7	7.6	7.9	7.4
MR	2.5 9.6	3.0 > $7.4^c$	6.1 10.3	> 5.2 > $9.2^c$	5.4 > $8.4^c$
TB	1.7 9.2	n.d.	5.4 10.1	-	n.d.

n.d. = nicht detektiert;  $pK_A$ -Werte und Äquivalenzpunkte unter pH 1, z.B. von Sulfonsäuren, wurden generell nicht detektiert; bei CV liegt der Umschlagsbereich an der Grenze Meßbereichs; bei TB war die Titration aufgrund der langsamen Gleichgewichtseinstellung nicht auswertbar.

<sup>a</sup> Literatur: [Mer89, Crc95]

<sup>b</sup> Neutralisation von zwei sauren Gruppen pro Molekül; einzelne Protonierungsstufen waren nicht aufgelöst.

<sup>c</sup> Aufgrund eines vorgelagerten Tautomeriegleichgewichtes und unterschiedlichen Löslichkeiten der Protonierungsstufen war der 2.  $pK_A$ -Wert von MR nur näherungsweise bestimmbar



Obwohl sowohl die Azofarbstoffe als auch die Triphenylmethanfarbstoffe schon seit langer Zeit bekannt sind und seit etwa hundert Jahren als pH-Indikatoren bzw. zur Färbung verwendet werden, gibt es erstaunlicherweise immer noch einige Unsicherheiten bezüglich ihrer Strukturen. Insbesondere der Beitrag verschiedener Tautomere oder mesomerer Grenzformen in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in einigen Fällen nach wie vor unklar [San98, Muk98]. Dazu gehören z.B. Gleichgewichte zwischen Chinonform, Sultonform (Ringschluß) und zwitterionischer Struktur. Ein Überblick über die Mechanismen des Farbumschlags sowie über die Strukturen der verwendeten Farbstoffe wird in Anhang G.1 gegeben.

Je nach pH-Wert der Matrixlösung liegen also unterschiedliche Formen der Indikatoren vor, die sowohl unterschiedliche Nettoladungen (von +1 bis -2) als auch unterschiedliche Ladungen der einzelnen funktionellen Gruppen tragen, wobei sehr viele Moleküle zwitterionische Strukturen aufweisen. Dies gilt sowohl für neutrale als auch für insgesamt geladene Spezies. In Tabelle D.1.3.3 sind für Matrixlösungen mit verschiedenen pH-Werten die jeweils vorherrschenden Nettoladungen der Farbstoffe angegeben.

**Tabelle D.1.3.3: Nettoladungen der pH-Indikatoren bei verschiedenen intrinsischen pH-Werten von MALDI-Matrizes**

Matrix	2,5-DHB	3-HPA	SIN	ATT	3-AQ	ANP
Farbstoff						
CV	+1	+1	+1	+1	+1	+1
IA	+1	+1 ±0	+1 ±0	±0	±0	±0
BE	±0	±0 -2	±0 -2	±0 -2	-2	-2
CO	±0	±0	±0	±0 -2	-2	-2
BP	±0 -1	-1 -2	-1 -2	-1 -2	-2	-2
MO	±0	±0 -1	±0 -1	±0 -1	-1	-1
MR	+1 ±0	+1 ±0	+1 ±0	+1 ±0	±0 -1	±0 -1
TB	±0 -1	-1	-1	-1	-1 -2	-1 -2

### D.1.3.2. Titrationsexperiment: Korrelation von intrinsischem pH-Wert und Ionenbildung

Für eine Reihe von Kombinationen aus verschiedenen pH-Indikatoren und Matrices wurden sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus MALDI-Spektren aufgenommen. Dazu wurden dieselben Präparationen verwendet, die auch zur Bestimmung der Farbe verwendet wurden (s. Kap. D.1.1).<sup>22</sup> Der pH-Wert war bei diesen Experimenten durch den intrinsischen pH-Wert der Matrixlösungen definiert. Es zeigte sich, daß von den meisten Indikatoren sehr intensive Signale in den Spektren zu sehen waren, daß aber die Spektren deutliche Unterschiede aufwiesen. Nur der Farbstoff CV ist über den gesamten pH-Bereich positiv geladen und zudem nicht sauer, da es keine stabile deprotonierte Form gibt. In Übereinstimmung damit wurde CV mit allen Matrices mit einer extrem hohen Intensität detektiert, der Peak war in der Regel weit intensiver als die Matrixpeaks (s. Ab. D.1.3.3). Dies macht CV zu einer Art Referenz für weitere Messungen.

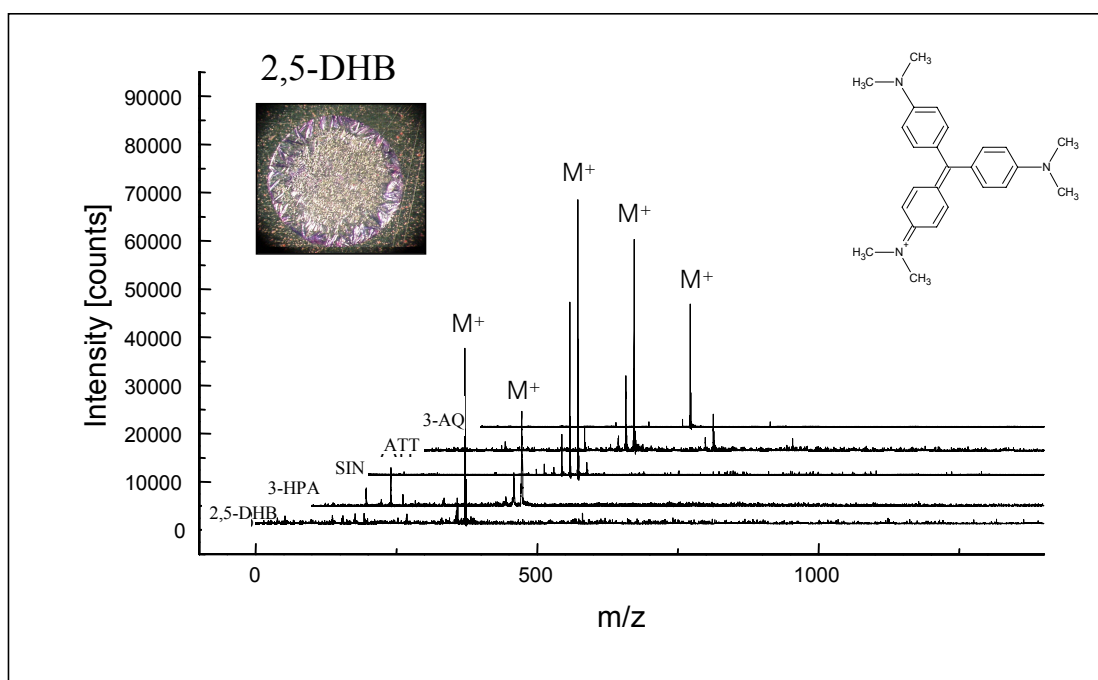
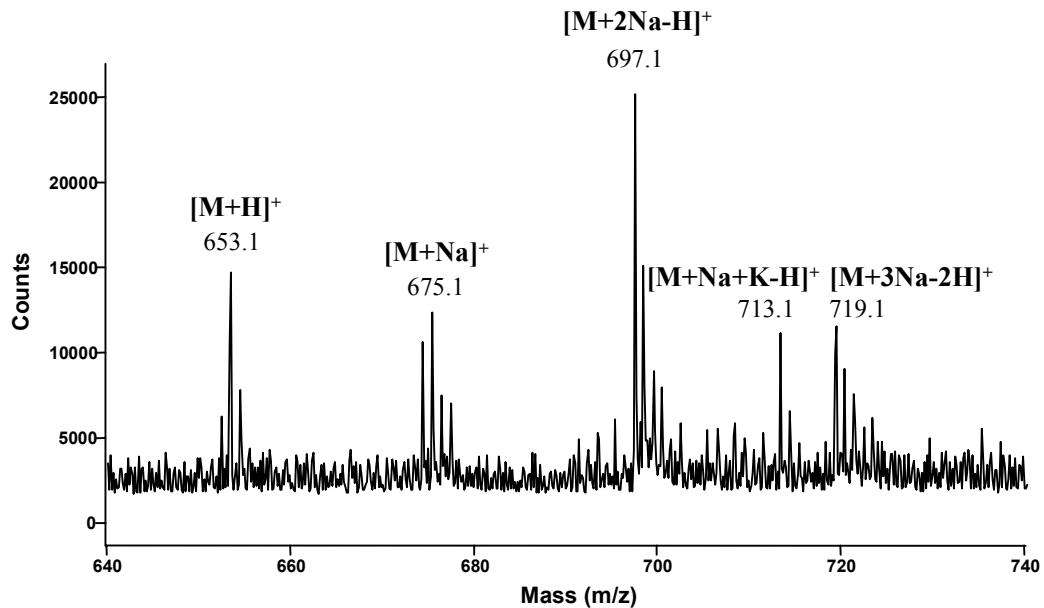


Abbildung D.1.3.3: MALDI-Spektren (positiv) von Kristallviolett (CV) mit verschiedenen Matrices.

Bei den anderen Farbstoffen traten dagegen im positiven Ionenmodus neben protonierten Molekülen mehr oder weniger ausgeprägte Natriumanlagerungen auf. Besonders intensiv waren diese Anlagerungen bei den sulfonierten Indikatoren, was ein starkes Indiz dafür ist, daß diese deprotoniert im Kristall vorliegen und Natriumionen als Gegenionen vorhanden sind. Je nach Zahl dieser deprotonierten Funktionen werden mehr oder weniger Natriumionen angelagert, die maximale Adduktzahl ist dabei immer um eins höher als die maximale Zahl der deprotonierten Gruppen. So sind z.B. mit dem Farbstoff Congorot, der zwei Sulfonsäuren enthält, neben dem Ion  $[M+Na]^+$  auch Ionen der Form  $[M+2Na-H]^+$  und  $[M+3Na-2H]^+$  zu finden (s. Abb. D.1.3.4). Zusätzlich können Kaliumanlagerungen und gemischte Anlagerungen von Kalium und Natrium auftreten, z.B.  $[M+Na+K-H]^+$ . Man erkennt in diesem Spektrum auch teilweise Radikale, so z.B. Molekülionen  $M^{•+}$  (mit geringer Intensität), aber auch radikalische Ionenpaare, z.B.  $[M+Na-H]^{•+}$  ( $m/z = 674$  bei CO).

<sup>22</sup> Aufgrund der schnellen Zersetzung bereits in Lösung wurde der Farbstoff IA bei diesen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

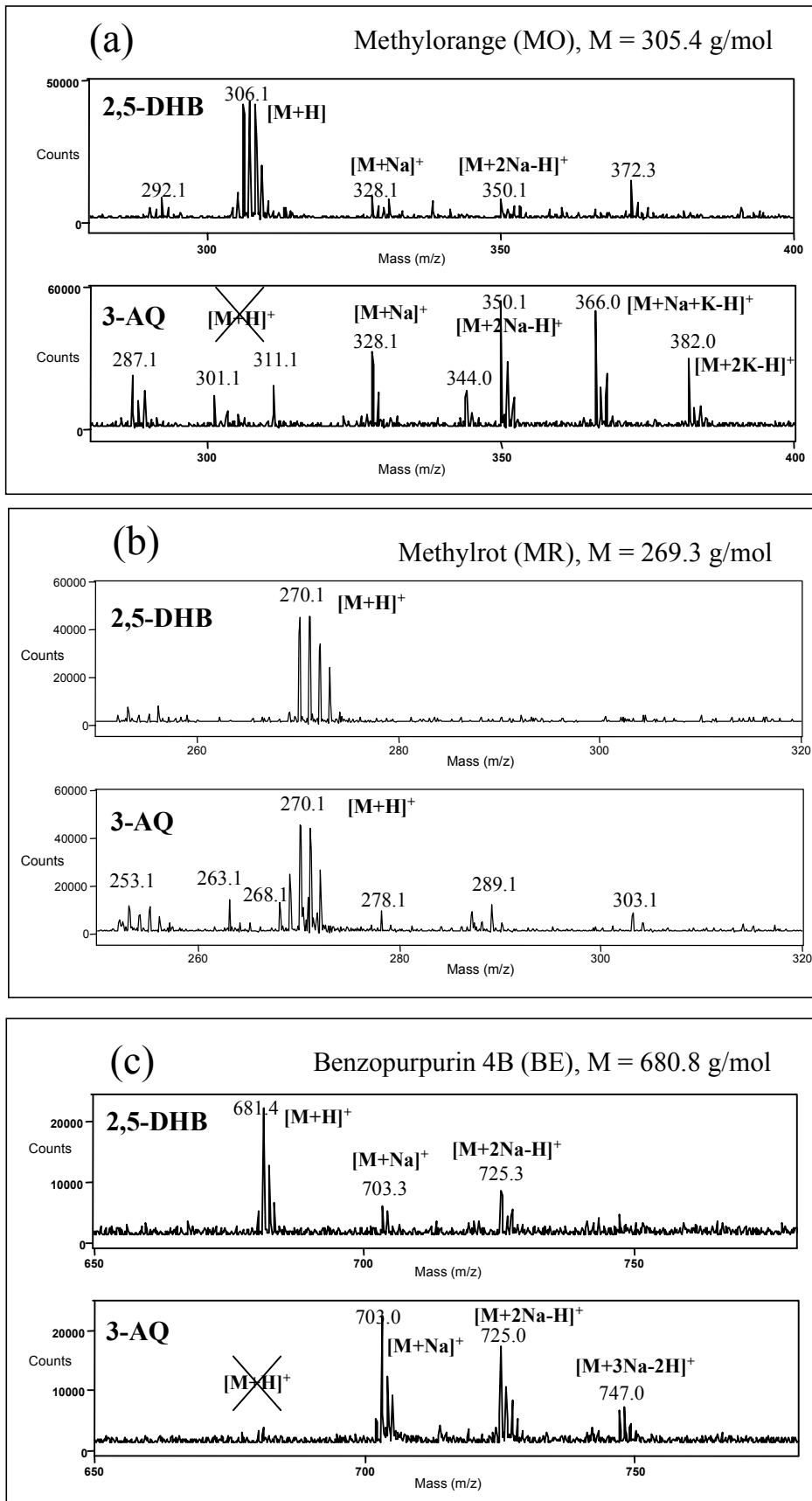


**Abbildung D.1.3.4:** MALDI-Spektrum von Congorot (CO) mit der Matrix 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) im positiven Ionenmodus.

Allerdings scheint nicht nur das Vorhandensein einer (deprotonierten) Sulfonsäure eine Rolle bei einer verstärkten Kationenanlagerung zu spielen, da der Farbstoff TB trotz der Sulfonsäurefunktion allgemein nur wenig Natriumanlagerungen bildet. Die interessanteste Beobachtung ist jedoch, daß die relative Intensität der kationisierten und protonierten Moleküle deutlich pH-abhängig ist. Generell ist die Tendenz zur Kationisierung mit zunehmendem pH-Wert größer, jedoch nicht bei allen Indikatoren gleichermaßen. Entscheidend ist vielmehr, ob der Farbstoff bereits in deprotonierter Form in Lösung vorliegt oder nicht. In Abb. D.1.3.5 sind MALDI-Spektren verschiedener Farbstoffe gezeigt, die jeweils mit einer sauren Matrix (2,5-DHB) und einer basischen Matrix (3-AQ) präpariert wurden.

Der intrinsische pH-Wert von 3-AQ beträgt etwa pH 8. Nur die beiden Farbstoffe MO und BE sind bei diesem pH-Wert vollständig deprotoniert (Äquivalenzpunkte von 7.6 bzw. 7.5) und damit (ein- bzw. zweifach) negativ geladen, während Methylrot (MR) in einer neutralen bzw. zwitterionischen Form vorliegt. Diese Tatsache spiegelt sich auch in den Spektren wieder, da MR mit beiden Matrizes in erster Linie als  $[M+H]^+$  detektiert wird, während von den beiden anderen Farbstoffen mit 3-AQ als Matrix fast nur kationisierte Moleküle zu finden sind. Mit der sauren Matrix 2,5-DHB liegen aber auch MO und BE zu einem großen Teil als Zwitterionen vor, und in der Tat werden in diesen Fällen statt der kationisierten Spezies fast nur  $[M+H]^+$ -Ionen detektiert.<sup>23</sup> Präformierte Ionen sind zur Bildung von  $[M+H]^+$ -Ionen aber eindeutig nicht notwendig, da selbst die protonierten Formen von MO und BE in Lösung keine positive Nettoladung besitzen und erst im MALDI-Spektrum durch ein weiteres Proton positiv geladen auftreten.

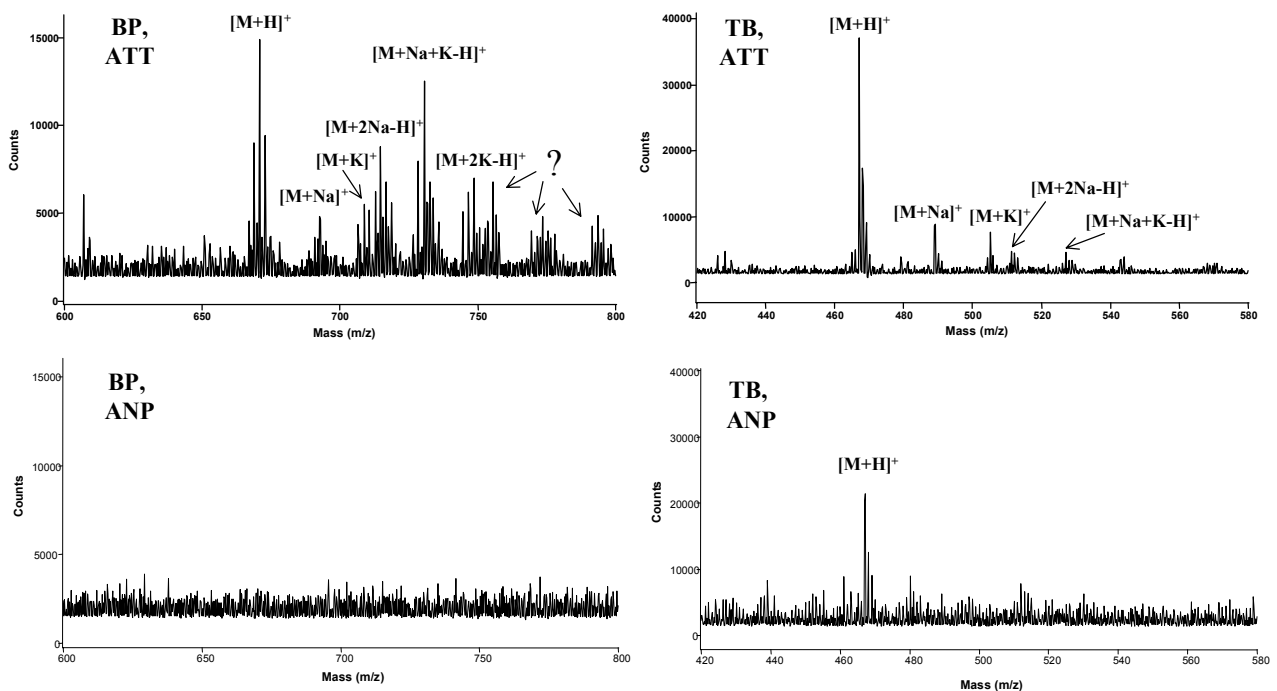
<sup>23</sup> Zusätzlich werden bei MO und MR Anlagerungen von ein bis zwei weiteren H-Atomen detektiert (Reduktion).



ebenso mit Congorot

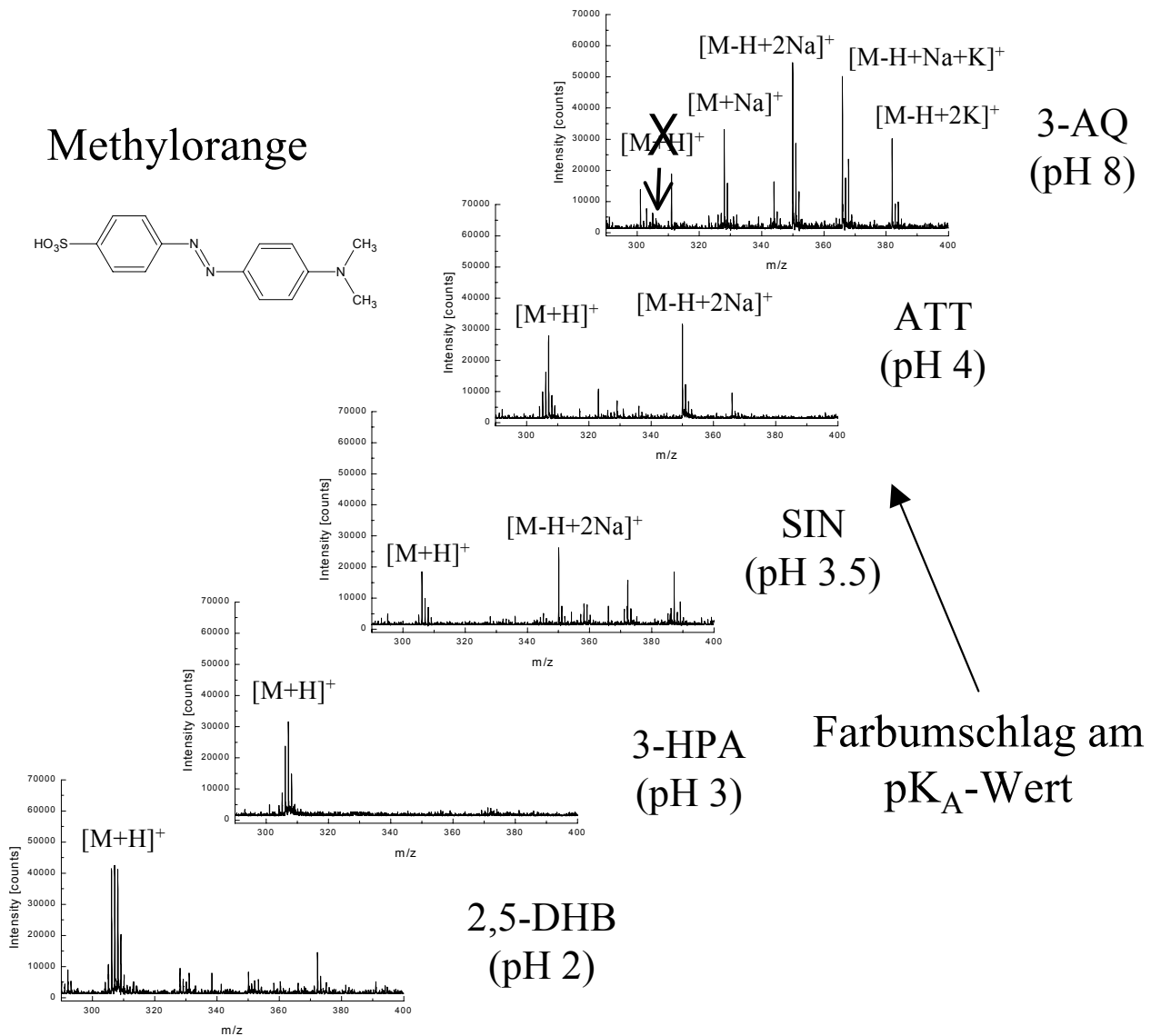
**Abbildung D.1.3.5:** MALDI-Spektren (positiv) drei verschiedener pH-Indikatoren aufgenommen mit zwei unterschiedlichen Matrices (jeweils oben 2,5-DHB, unten 3-AQ):  
 a.) Methylorange (MO), b.) Methylrot (MR), c.) Benzopurpurin 4B (BE).

In Abb. D.1.3.5 sind nur Spektren von Azofarbstoffen gezeigt, die Tendenz der pH-abhängigen Abnahme von protonierten Analytionen findet sich aber auch bei den Triphenylmethanfarbstoffen. In Abb. D.1.3.6 sind Spektren von TB und BP gezeigt, die mit den beiden Matrices ATT und ANP aufgenommen wurden. Mit ANP (pH 9.5) wurden von BP (Äquivalenzpunktes bei pH = 7.6) gar keine Ionen mehr detektiert, und schon mit ATT (pH 4) ist neben protonierten Molekülen eine Palette verschiedener kationisierter Spezies zu sehen. Dagegen treten bei TB (2. Äquivalenzpunkt bei pH = 10.1) mit beiden Matrices fast nur protonierte Ionen auf, wenn auch bei ANP mit geringerer Intensität. Diese Abhängigkeit ist insofern bemerkenswert, als sowohl protonierte als auch deprotonierte Formen der Triphenylmethane eine negative Nettoladung tragen (Umschlag von  $-1$  nach  $-2$ ). Im Gegensatz zu den oben vorgestellten Azofarbstoffen sind aber selbst bei negativer Nettoladung partiell zwitterionische Strukturen vorhanden, insbesondere bei den protonierten Formen (Nettoladung  $-1$ ). Somit ist nicht die Nettoladung für die pH-abhängige Ionenbildung der entscheidende Parameter, sondern es kommt darauf an, ob positive und/oder negative Gruppen im Molekül vorhanden sind und wie das Verhältnis dieser positiven und negativen Ladungen im Molekül ist.



**Abbildung D.1.3.6:** MALDI-Spektren (positiv) zwei verschiedener pH-Indikatoren aufgenommen mit zwei unterschiedlichen Matrices (jeweils oben ATT, unten ANP):  
a.) Thymolblau (TB), b.) Bromphenolblau (BP).

Die pH-abhängige Bildung von kationisierten Analyten auf Kosten der protonierten Form ist besonders gut in einer Art Titrationsexperiment zu erkennen: In einer Abfolge von MALDI-Spektren, die mit Matrices mit steigendem intrinsischem pH-Wert aufgenommen wurden, erkennt man deutlich die stetige Zunahme der natrium- und kaliumangelagerten Molekülonen auf Kosten der protonierten Moleküle bei zunehmend basischer Lösung. Dies ist in Abb. D.1.3.7 am Beispiel von Methylorange (MO) gezeigt.



**Abbildung D.1.3.7:** MALDI-Spektren von Methylorange (MO) in Abhängigkeit vom intrinsischen pH-Wert der verschiedenen Matrices (Titrationsexperiment).

Die protonierten Moleküle verschwinden aber nicht gleichzeitig mit dem Farbumschlag, sondern es treten erst im Bereich des Äquivalenzpunkt ( $pH > 7.6$ ) fast nur noch kationisierte Spezies auf. Am Halbäquivalenzpunkt ( $pK_A = 4.2$ ) sind dagegen protonierte und kationisierte Moleküle in etwa gleichem Verhältnis vorhanden (s. Matrix ATT, pH 4). Interessanterweise sind in diesem Spektrum nahezu keine einfach kationisierten Moleküle zu sehen, sondern nur Ionen der Form  $[M+2Na-H]^+$  und  $[M+H]^+$ . Es scheint so zu sein, daß die protonierte Form in erster Linie aus Zwitterionen als Vorläufern gebildet werden, während bei Vorläufer-Anionen nur eine Kationisierung möglich ist. Da aber bei einem einfach negativ geladenen Analyten erst zwei angelagerte Natriumionen eine positive Nettoladung ergeben, entstehen dabei in erster Linie  $[M+2Na-H]^+$ -Ionen und keine Ionen der Form  $[M+Na]^+$ .

In Tabelle D.1.3.4 sind zusammenfassend die Signalintensitäten der protonierten Farbstoffe bei der Präparation mit verschiedenen Matrices und damit in Abhängigkeit vom intrinsischen pH-Wert der Lösung angegeben. Man erkennt auch in dieser Darstellung sehr gut, daß jenseits des Äquivalenzpunktes kaum noch protonierte Moleküle zu finden sind und kationisierte Moleküle die Spektren dominieren.

**Tabelle D.1.3.4: Relative Signalintensitäten der protonierten Farbstoffmoleküle  $[M+H]^+$  bei Verwendung verschiedener Matrices im positiven Ionenmodus ( $c = 10^{-3}$  M); zum Vergleich sind die Farben der Indikatoren in der Matrixpräparation angegeben.**

Indikator	2,5-DHB (pH 2.0)	SIN (pH 3.5)	ATT (pH 4.0)	3-AQ (pH 8.0)	ANP <sup>a</sup> (pH 9.5)
Kristallviolett <sup>b</sup>	(+++) violett	(+++) violett	(+++) violett	(+++) violett	(++) grün
Benzopurpurin 4B	+ fast farblos	+ leicht rot	+ rot	- rot	- braun
Congorot	+ blau	+ violett	+ rot	- leicht rot	- leicht rot
Bromphenolblau	+ leicht orange	+ orange	+ orange	- blau	- blau-grün
Methylorange	++ rot	+ rot	+ gelb	- gelb	- gelb
Methylrot	++ rot	++ rot	++ rot	++ orange	+ gelb
Thymolblau	++ rot	++ orange	++ gelb	++ gelb	+ grün

<sup>a</sup> Präparationen zeigen eine Mischfarbe aufgrund der gelben Farbe von ANP

<sup>b</sup> Detektion als  $M^+$

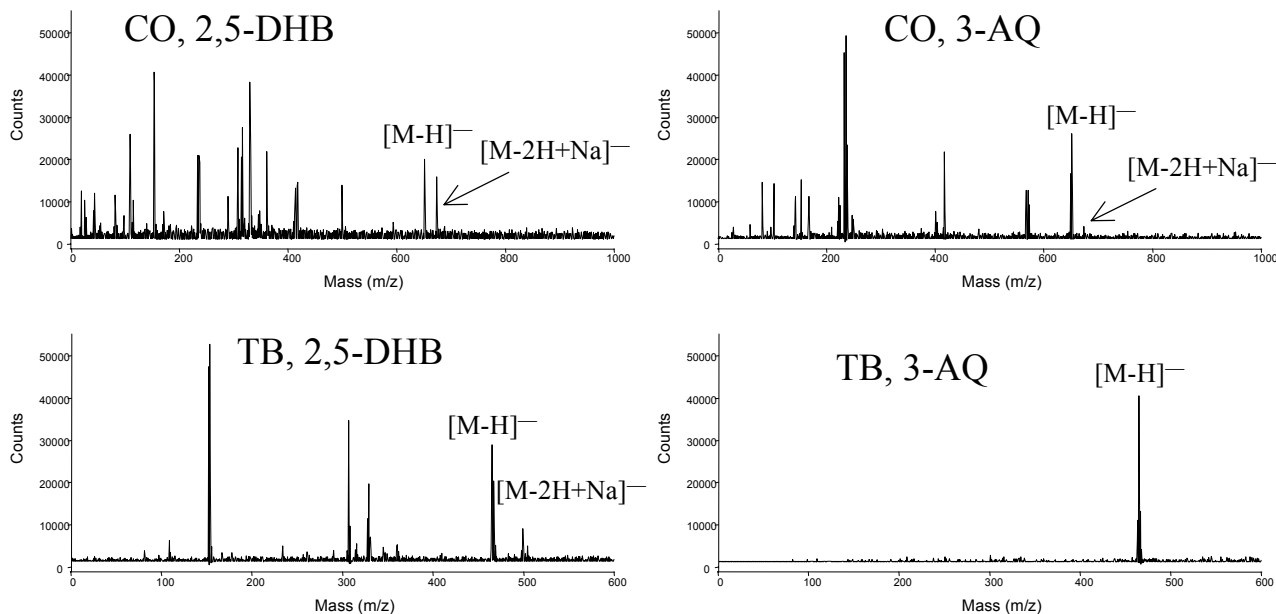
Legende:

- +++ sehr hohe Signalintensität (höher als Matrixionen, max. 10% kationisierte Analytsignale)
- ++ hohe Signalintensität (vergleichbar mit Matrixionen, max. 30% kationisierte Analytsignale)
- + mittlere Signalintensität (niedriger als Matrixionen, aber höher als kationisierte Analytsignale)
- niedrige Signalintensität: nahezu kein  $[M+H]^+$  und/oder Spektrum dominiert von kationisierten Analytsignalen ( $[M+H]^+$ -Intensität max. 20% im Vergleich zur Matrixpeaks und kationisierten Analytsignalen)

Im negativen Ionenmodus ist im Gegensatz zum positiven Ionenmodus keine eindeutige Abhängigkeit vom intrinsischen pH-Wert festzustellen, auch wenn eine Tendenz zu intensiveren Signalen mit steigendem pH-Wert durchaus auftritt. Die relativen Intensitäten der  $[M-H]^-$ -Ionen schwanken aber in Abhängigkeit von der Matrix relativ stark. Außerdem werden im negativen Ionenmodus generell viel weniger Natriumanlagerungen detektiert, selbst bei Farbstoffen mit mehreren Sulfonsäuren im Molekül. Die insgesamt geringere Adduktbildung (keine Addukte mit Anionen, wenig Addukte mit Metallkationen) macht auch einen Intensitätsvergleich der  $[M-H]^-$ -Ionen schwierig, da nur Matrixionen zum Vergleich herangezogen werden können.

Von CV werden gar keine negativen Ionen detektiert, da es keine stabile deprotonierte Form dieses Moleküls gibt. Dagegen werden von allen Farbstoffen mit Sulfonsäurefunktion über den gesamten pH-Bereich mehr oder weniger intensive Peaks der  $[M-H]^-$ -Ionen detektiert, und dies nahezu unabhängig von der Nettoladung oder dem Protonierungsgrad. Eine leichte Zunahme der Intensitäten mit steigendem pH-Wert ist z.B. bei MO und BP zu erkennen, während die

Peakintensitäten bei BE und CO mit allen Matrizes fast gleich sind. In Abb. D.1.3.8 sind MALDI-Spektren verschiedener Farbstoffe (CO und TB) gezeigt, die jeweils mit einer sauren Matrix (2,5-DHB) und einer basischen Matrix (3-AQ) präpariert wurden. Trotz leichter Intensitätsunterschiede, die bei der Kombination TB/3-AQ bis zur vollständigen Unterdrückung der Matrixsignale führen, sind die Analytsignale in allen Fällen sehr hoch.

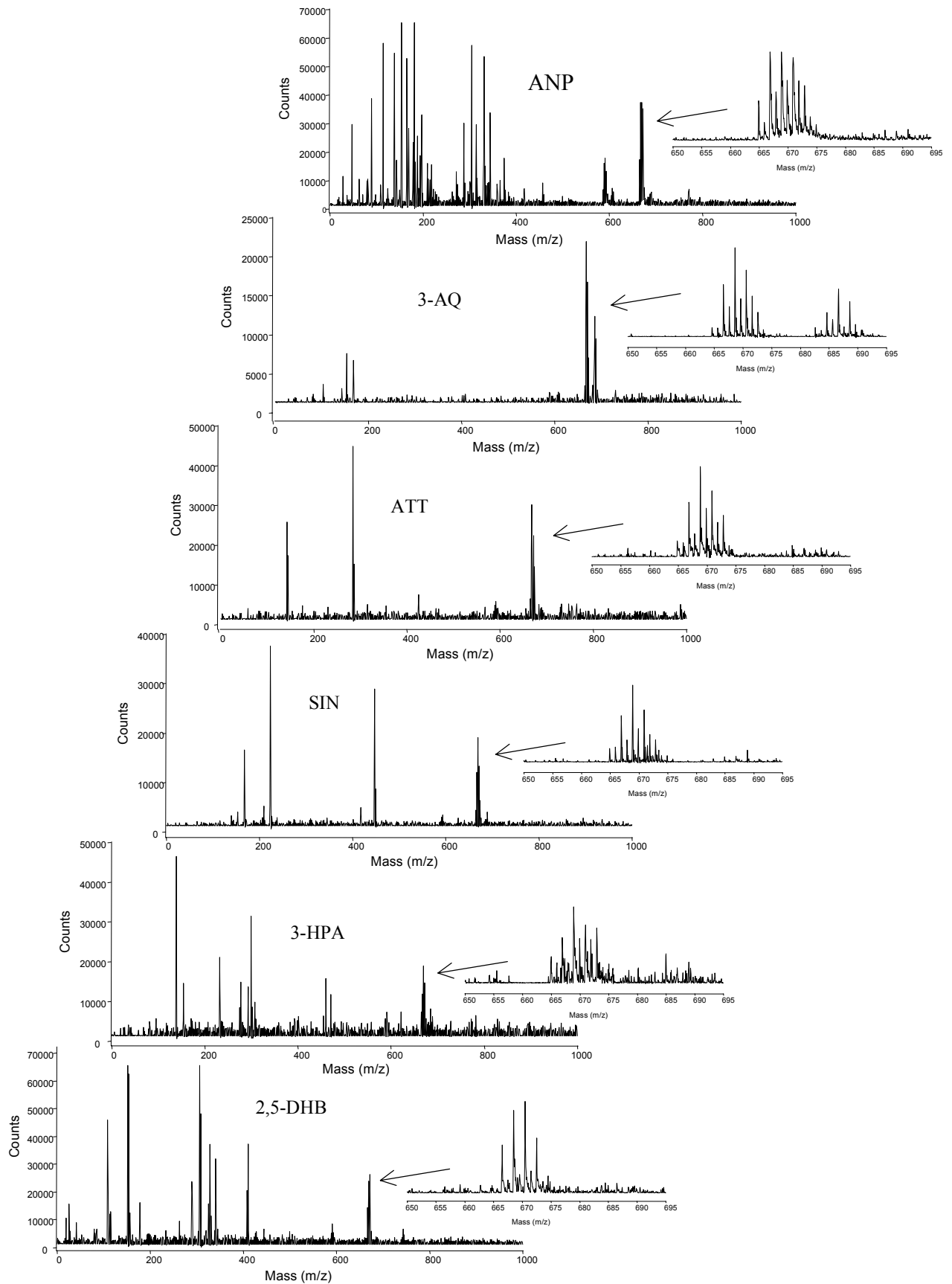


**Abbildung D.1.3.8:** MALDI-Spektren (negativ) zwei verschiedener pH-Indikatoren aufgenommen mit zwei unterschiedlichen Matrizes (jeweils links 2,5-DHB, rechts 3-AQ):  
Oben: Congorot (CO), unten: Thymolblau (TB).

In Abb. D.1.3.9 ist eine Abfolge von Spektren des Indikators Bromphenolblau (BP) geordnet nach steigendem intrinsischen pH-Wert der verschiedenen Matrizes gezeigt (Titrationsexperiment). Man erkennt zwar mit steigendem pH-Wert einen leichten Anstieg der Signalintensitäten des Analyten im Vergleich zu den Matrixionen, aber dieser ist viel weniger signifikant als im positiven Ionenmodus.<sup>24</sup> Außerdem muß Wasserstofftransfer stattgefunden haben, da das Isotopenmuster von BP (4 Bromatome) in einigen Fällen nicht mit dem theoretisch erwarteten Isotopenmuster übereinstimmt (Peakserie 1 Da versetzt). Der zweite Peakcluster bei Verwendung der Matrix 3-AQ erscheint nicht bei der Masse eines natriumangelagerten Moleküls, sondern es handelt sich vermutlich um eine Addition von H<sub>2</sub>O bzw. OH<sup>-</sup> (M + 17 Da).

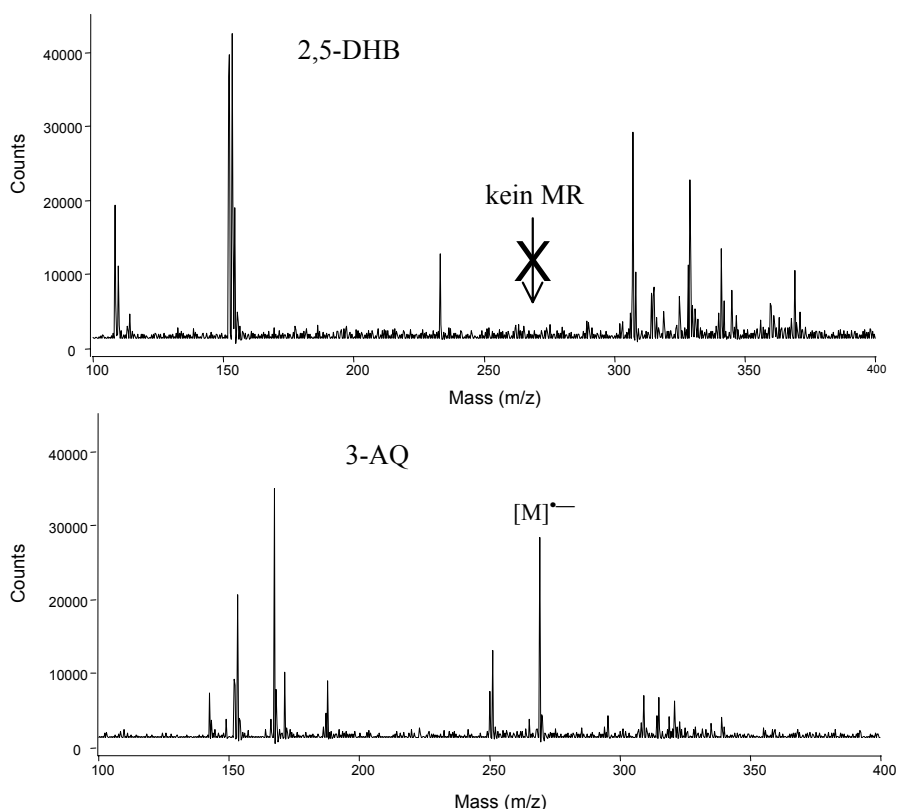
<sup>24</sup> Die Spektrenqualität (Verhältnis Signal zu Rauschen) bei Verwendung der Matrix ANP war im Vergleich zu herkömmlichen Matrizes generell etwas schlechter.)





**Abbildung D.1.3.9:** MALDI-Spektren von Bromphenolblau (BP) mit verschiedenen Matrices im negativen Ionenmodus (Titrationsexperiment). Die Ausschnitte zeigen das Isotopenmuster im Bereich des Molekülions von BP.

Ein besonders interessanter Fall ist der Farbstoff Methylrot (MR), der als einziger Indikator auch im negativen Ionenmodus eine eindeutige Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung zeigt. MR liegt in sauren bis neutralen Lösungen einfach positiv bzw. zwitterionisch neutral vor und ist erst oberhalb von etwa pH 9 merklich deprotoniert (einfach negativ geladen). Mit sauren Matrices werden fast gar keine Molekülonen detektiert, mit basischen Matrices entstehen aber keine deprotonierten Moleküle, wie man erwarten würde, sondern Radikalanionen vom Typ  $[M]^{\bullet-}$  (s. Abb. D.1.3.10). Erst in stark basischem Milieu, z.B. nach Zugabe von Natronlauge, werden auch von MR  $[M-H]^-$ -Ionen gebildet. Radikalanionen sind in MALDI-Spektren nur sehr selten zu finden, vermutlich entweder weil sie erst gar nicht gebildet werden (also weil die meisten Analyten keine Elektronen aufnehmen) oder weil die meisten Radikalanionen nicht stabil sind und unter Verlust von H-Radikalen zu  $[M-H]^-$  reagieren. Neben der Aufnahme von Elektronen könnte das Radikalanion von MR auch durch Aufnahme eines H-Atoms aus einem deprotonierten Molekül entstehen. MR hat zudem als einziger pH-Indikator keine Sulfonsäurefunktion, sondern eine Carbonsäure, die außerdem Wasserstoffbrücken mit der Azogruppe ausbilden kann (s. Anhang G.1). Dies könnte die relativ hohe Stabilität des Radikalanions erklären, es liefert allerdings keine Erklärung, warum mit sauren Matrices keine negativen Molekülonen von MR detektiert werden können.



**Abbildung D.1.3.10:** MALDI-Spektren von Methylrot (MR) mit verschiedenen Matrices im negativen Ionenmodus (alle anderen Peaks sind Matrixionen oder Verunreinigungen).

In Tabelle D.1.3.5 sind die relativen Intensitäten der Ionen vom Typ  $[M-H]^-$  (bzw.  $[M]^{\bullet-}$ ) aufgelistet. Fast alle in Lösung existierenden Vorläufermoleküle sind negativ geladen und werden konsequenterweise auch im negativen Ionenmodus mit hohen Intensitäten detektiert. Obwohl auch von neutralen, zwitterionischen Vorläufern (BE, CO) negative Ionen gebildet werden, ist dies bei MR mit sauren Matrices nicht der Fall. Generell sind aber immer dann deprotonierte Analytionen im Spektrum zu finden, wenn deprotonierte Sulfonsäuren im Molekül vorhanden sind.

**Tabelle D.1.3.5: Relative Signalintensitäten der deprotonierten Farbstoffmoleküle  $[M-H]^-$  bei Verwendung verschiedener Matrizes im negativen Ionenmodus ( $c = 10^{-3}$  M); zum Vergleich sind die Farben der Indikatoren in der Matrixpräparation angegeben.**

Indikator	2,5-DHB (pH 2.0)	SIN (pH 3.5)	ATT (pH 4.0)	3-AQ (pH 8.0)	ANP <sup>a</sup> (pH 9.5)
Kristallviolett	- violett	- violett	- violett	- violett	- grün
Benzopurpurin 4B	+ fast farblos	++ leicht rot	+ rot	+ rot	+ braun
Congorot	+ blau	+ violett	+ rot	+ leicht rot	+ leicht rot
Bromphenolblau	+ leicht orange	++ orange	++ orange	+++ blau	++ blau-grün
Methylorange	+ rot	++ rot	+++ gelb	+++ gelb	+ gelb
Methylrot	- rot	- rot	- rot	(++) <sup>b</sup> orange	(+) <sup>b</sup> gelb
Thymolblau	+ rot	++ orange	+ gelb	+++ gelb	++ grün

<sup>a</sup> Präparationen zeigen eine Mischfarbe aufgrund der gelben Farbe von ANP

<sup>b</sup> Detektion als  $[M]^-$

Legende:

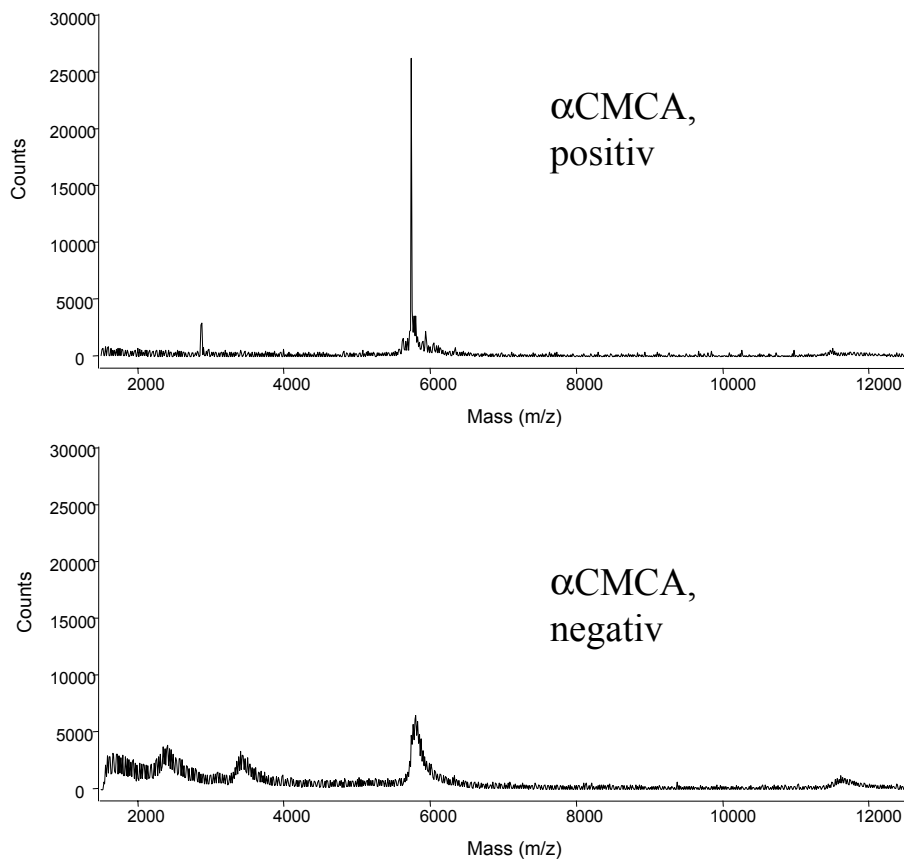
- +++ sehr hohe Signalintensität (höher als Matrixionen, max. 10% kationisierte Analytsignale)
- ++ hohe Signalintensität (vergleichbar mit Matrixionen, max. 30% kationisierte Analytsignale)
- + mittlere Signalintensität (niedriger als Matrixionen, aber höher als kationisierte Analytsignale)
- niedrige Signalintensität: nahezu kein  $[M-H]^-$  Signal (max. 20% im Vergleich zu Matrixpeaks)

### D.1.3.3. pH-abhängige Ionenbildung bei einer Neutralmatrix

Der pH-Wert wurde bei den im vorigen Kapitel beschriebenen Versuchen durch die Matrix vorgegeben. Natürlich kommen bei dieser Vorgehensweise die unterschiedlichen Eigenschaften der Matrizes wie z.B. Einbauverhalten, Absorptionskoeffizienten oder Gasphasenacidität zum Tragen, die ebenfalls einen Einfluß auf die Ergebnisse haben können. Eine pH-abhängige Aufnahme von Spektren mit einer einzigen Matrix ist nur mit einer neutralen, d.h. weder sauren noch basischen, Matrix möglich, da die Matrixeigenschaft normalerweise bei der Deprotonierung zum Matrixanion oder bei der Protonierung zum Matrixkation verloren geht. Eine solche Matrix ist  $\alpha$ -Cyano-4-methoxyzimtsäureamid ( $\alpha$ CMCA) [Sch01], ein Derivat von  $\alpha$ CHCA, daß durch Methylierung der phenolischen OH-Gruppe und Amidierung der Carbonsäure keine sauren Funktionen mehr aufweist.

Allerdings hat diese Verbindung durch die Derivatisierung der sauren Gruppen nur noch eingeschränkte Matrixeigenschaften. Während im positiven Ionenmodus aus saurer Lösung zumindest von Analyten mit Massen bis einigen kDa gute Spektren erhalten werden, ist die Spektrenqualität im negativen Ionenmodus wesentlich geringer. Von kleinen Molekülen erhält man

zwar auch im Negativen noch Signale, mit zunehmender Masse werden diese aber immer breiter. In den Spektren in Abb. D.1.3.11 ist dies deutlich zu erkennen (Rinderinsulin präpariert mit  $\alpha$ CMCA).



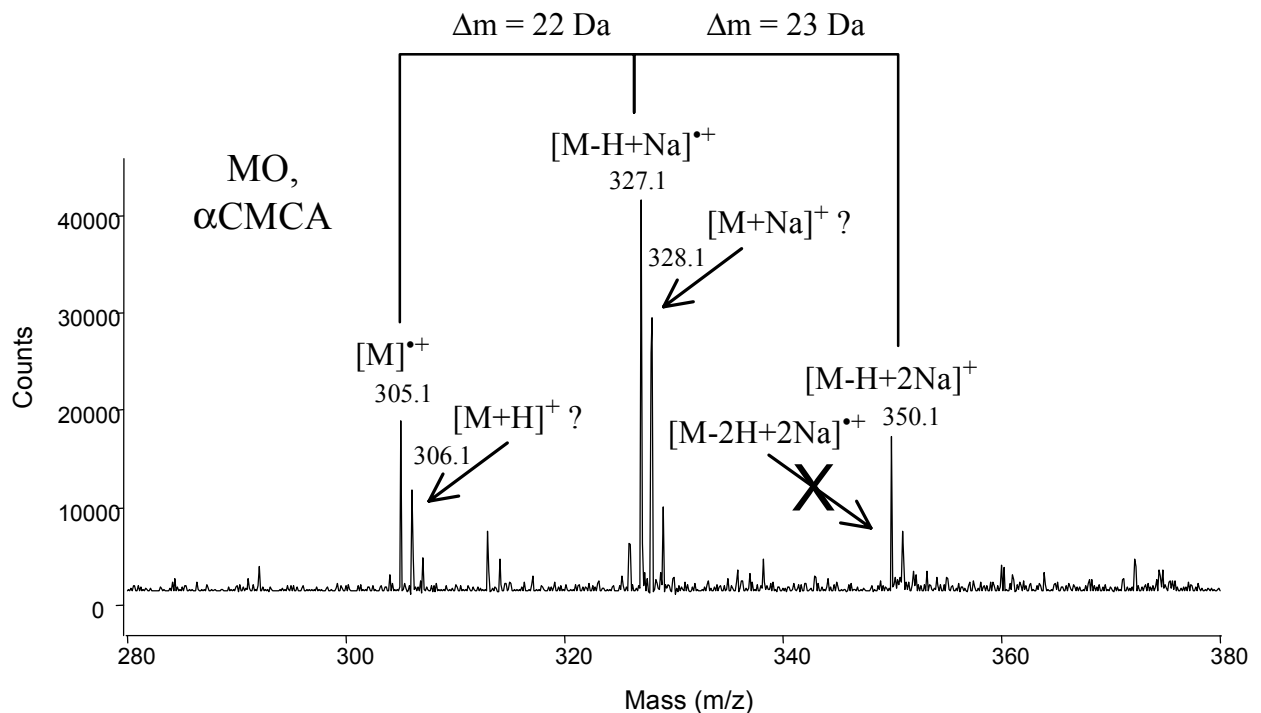
**Abbildung D.1.3.11:** MALDI-Spektren von Rinderinsulin mit der Matrix  $\alpha$ CMCA und Zusatz von 0.1 % TFA im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus.

Mit Insulin ist die Massengrenze für  $\alpha$ CMCA bereits fast erreicht, eine Detektion von Ubiquitin ( $m/z = 8556$ ) ist bereits nicht mehr möglich. Aber nicht nur das negative Insulinsignal ist sehr breit, auch das positive Signal ist mit ca. 30 Da bereits wesentlich breiter als mit herkömmlichen Matrices (Auflösung etwa 200). Die Peakbreite könnte durch metastabile Zerfälle verursacht sein. Dies würde bedeuten, daß zur Bildung von negativen Ionen wesentlich mehr Anregungsenergie notwendig ist. In der Tat erkennt man im negativen Ionenmodus auch Fragmente (A- und B-Kette), während im positiven Ionenmodus nur ein schwaches Signal des zweifach geladenen Insulins zu sehen ist. Die Spaltung des Insulins an den Disulfidbrücken bereits in der Ionenquelle (*In-Source decay*) wird oft beobachtet und könnte durch Addition von H-Atomen verursacht sein (s. Kap. B.4.3).

All diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Nettoladung der Analyte vor der Desorption eine große Rolle spielt. Durch die Zugabe von TFA liegt Insulin mehrfach protoniert vor, die Ladung muß dann durch TFA-Anionen kompensiert werden. Mit  $\alpha$ CMCA scheinen also in erster Linie präformierte Ionen freigesetzt werden, allerdings unter Ladungsreduktion, was z.B. durch Protonentransfer zu den Gegenionen möglich wäre. Um negative Ionen zu bilden, müßte dagegen ein mehrfach protoniertes, positives Molekül deprotoniert werden, was augenscheinlich schwierig ist. Es ist sicherlich plausibel, für diesen Effekt die fehlenden sauren Gruppen der Matrix verantwortlich zu machen, zumal eine Detektion von negativen Ionen mit Standardmatrices normalerweise auch aus stark sauren Präparationen vollkommen unproblematisch ist.

Zur Einstellung des pH-Wertes für die Titrationsexperimente ist ein Puffer notwendig, der aber nicht im Überschuß zugegeben werden darf, da auch dadurch die Qualität der Spektren deutlich abnimmt. Bei den hier vorgestellten Experimenten wurden Phosphatpuffer verwendet. Aber auch bei geringer Konzentration beeinflusst dieser Puffer die Spektren, da mit zunehmendem pH-Wert mehr Kationen, in diesem Fall  $\text{Na}^+$ , in Lösung sind. Würde man allerdings statt der Natriumsalze Ammoniumsalze verwenden, hätte man eine Protonendonator in der Lösung, der zudem an negative Stellen koordiniert sein dürfte, was die Interpretation weitaus schwieriger macht.

Trotz der genannten Einschränkungen ist ein Vergleich der mit  $\alpha\text{CMCA}$  bei verschiedenen pH-Werten aufgenommenen Spektren der pH-Indikatoren interessant. Generell unterscheiden sich diese Spektren deutlich von normalen MALDI-Spektren, die mit herkömmlichen Matrices aufgenommen wurden. Der größte Teil der Signale stammt von Radikalen oder von kationisierten Molekülen. Abb. D.1.3.12 zeigt Spektren von Methylorange (MO) bei pH 2.65 (Matrix  $\alpha\text{CMCA}$ ). Man erkennt deutlich aus den zwei unterschiedliche Abständen zum nächsten Peak ( $\Delta m = 22$  Da und  $\Delta m = 23$  Da), daß die ersten beiden Peaks Radikale sind, während das Ion bei  $m/z = 350$  kein Radikal ist. Neben dem Molekülion (Radikalkation) tritt also auch ein radikalisches Ionenpaar auf.



**Abbildung D.1.3.12:** MALDI-Spektren von Methylorange (MO) bei pH 2.65 (Phosphatpuffer), Matrix  $\alpha\text{CMCA}$ .

Abb. D.1.3.13 zeigt Spektren von Congorot (CO) bei verschiedenen pH-Werten, die alle mit  $\alpha\text{CMCA}$  aufgenommen wurde. Man erkennt deutlich zwei Serien von Peaks, die erste Serie besteht aus Ionen mit ungerader Elektronenzahl (Radikale), die zweite Serie besteht aus Ionen mit gerader Elektronenzahl. Beide Serien verschieben sich mit zunehmendem pH-Wert zu mehr Natriumanlagerungen. Auch hier erkennt man außer den Molekülionen auch radikalische Ionenpaare. Da Congorot zwei saure Gruppen trägt, wird zusätzlich zum einfachen Ionenpaar ein radikalisches Ionenpaar mit zwei Natriumionen detektiert.

Die plausibelste Erklärung für die Bildung dieser Radikale ist eine Photoionisation, da alle Farbstoffe bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbieren ( $\lambda = 337$  nm). Protonierte Moleküle

werden dagegen nur aus stark saurer Lösung gebildet. Die Intensität ist aber schwer abzuschätzen, da die Peaks vom Isotopenmuster des radikalischen Molekülions überlagert sind. Man erkennt in jedem Spektrum mindestens ein Peakpaar im Abstand von 1 Da, das eindeutig aus einem Radikal und einem nichtradikalischen Ion besteht. Mit zunehmendem pH-Wert treten mehr Natriumanlagerungen auf, die Serien verschieben sich entsprechend. Genau wie bei herkömmlichen Matrices ist eine deutliche Abhängigkeit der gebildeten Ionen vom pH-Wert der Lösung und damit vom Ladungszustand des Analyten in Lösung zu erkennen, nur daß statt protonierter Moleküle Radikalkationen gebildet werden. Nicht nur Anionen sondern auch Ionenpaare können augenscheinlich mit  $\alpha$ CMCA nicht protoniert werden, sondern diese können nur kationisiert oder photoionisiert werden.

Im negativen Ionenmodus treten dagegen wesentlich weniger Radikale auf, die dominierenden Signale stammen von deprotonierten Ionen mit und ohne Natriumanlagerung. Nur bei nicht zu saurem pH-Wert tritt auch ein radikalisches Ionenpaar in Form eines Radikalanions auf, daß nur durch Elektronen- oder Radikaltransfer gebildet worden sein kann. Außerdem erkennt man im Sauren auch Moleküle, die zwei H-Atome verloren haben ( $[M-2H]^{-}$ ). Die Bildung solcher Ionen ist auch bei Matrices bekannt (z.B. bei 2,5-DHB) und kann nur durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms erfolgt sein. Auch in negativen Spektren nimmt die Anlagerung von Metallkationen mit steigendem pH-Wert zu. Abb. D.1.3.14 zeigt eine Serie von Spektren (Matrix  $\alpha$ CMCA) des pH-Indikators CO im negativen Ionenmodus bei steigendem pH-Wert der Lösung.

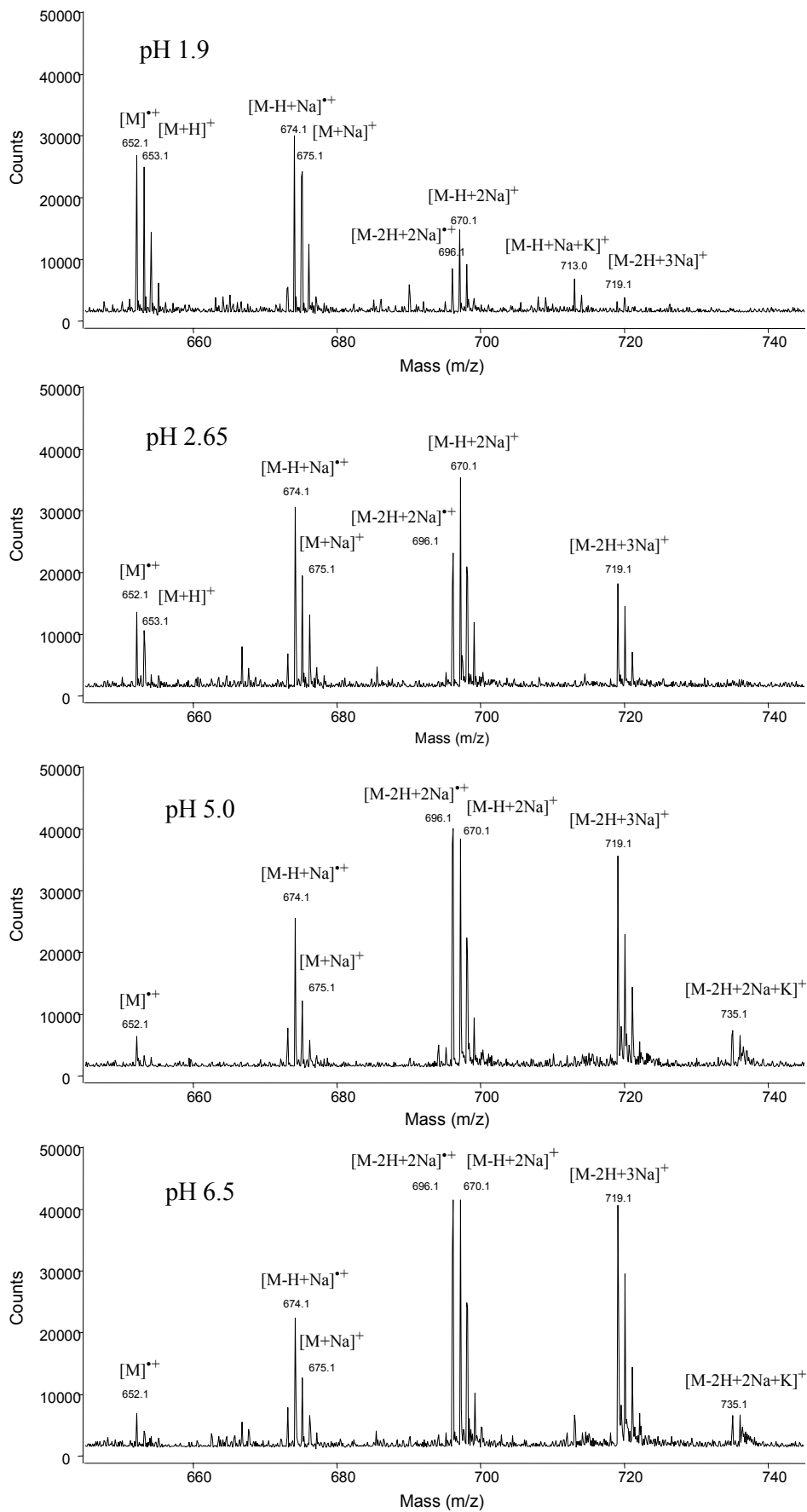
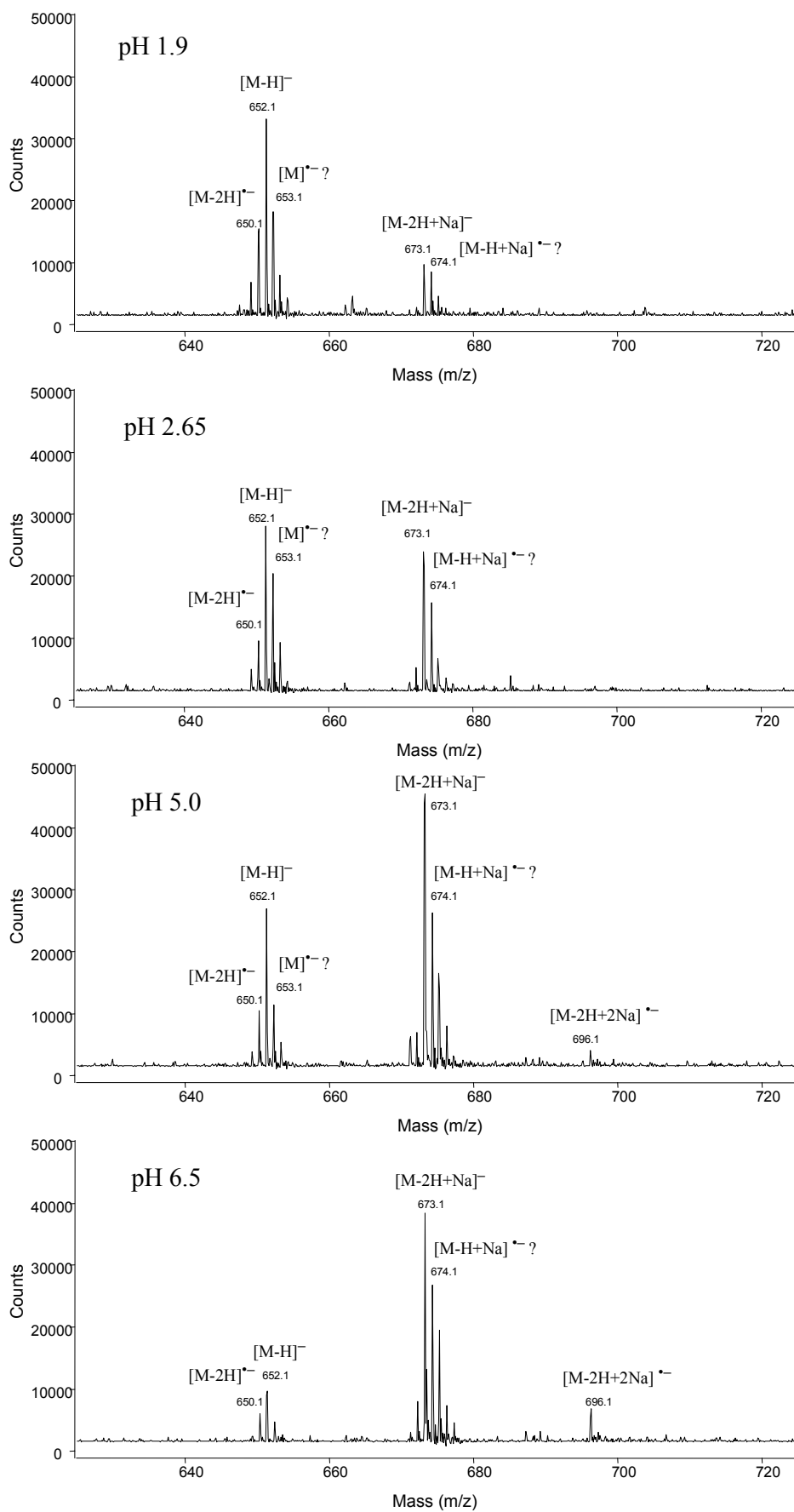


Abbildung D.1.3.13: MALDI-Spektren von Congorot (CO) bei verschiedenen pH-Werten (Phosphatpuffer), positiver Ionenmodus, Matrix  $\alpha$ CMCA.



**Abbildung D.1.3.14:** MALDI-Spektren von Congorot (CO) bei verschiedenen pH-Werten (Phosphatpuffer), negativer Ionenmodus, Matrix  $\alpha$ CMCA.



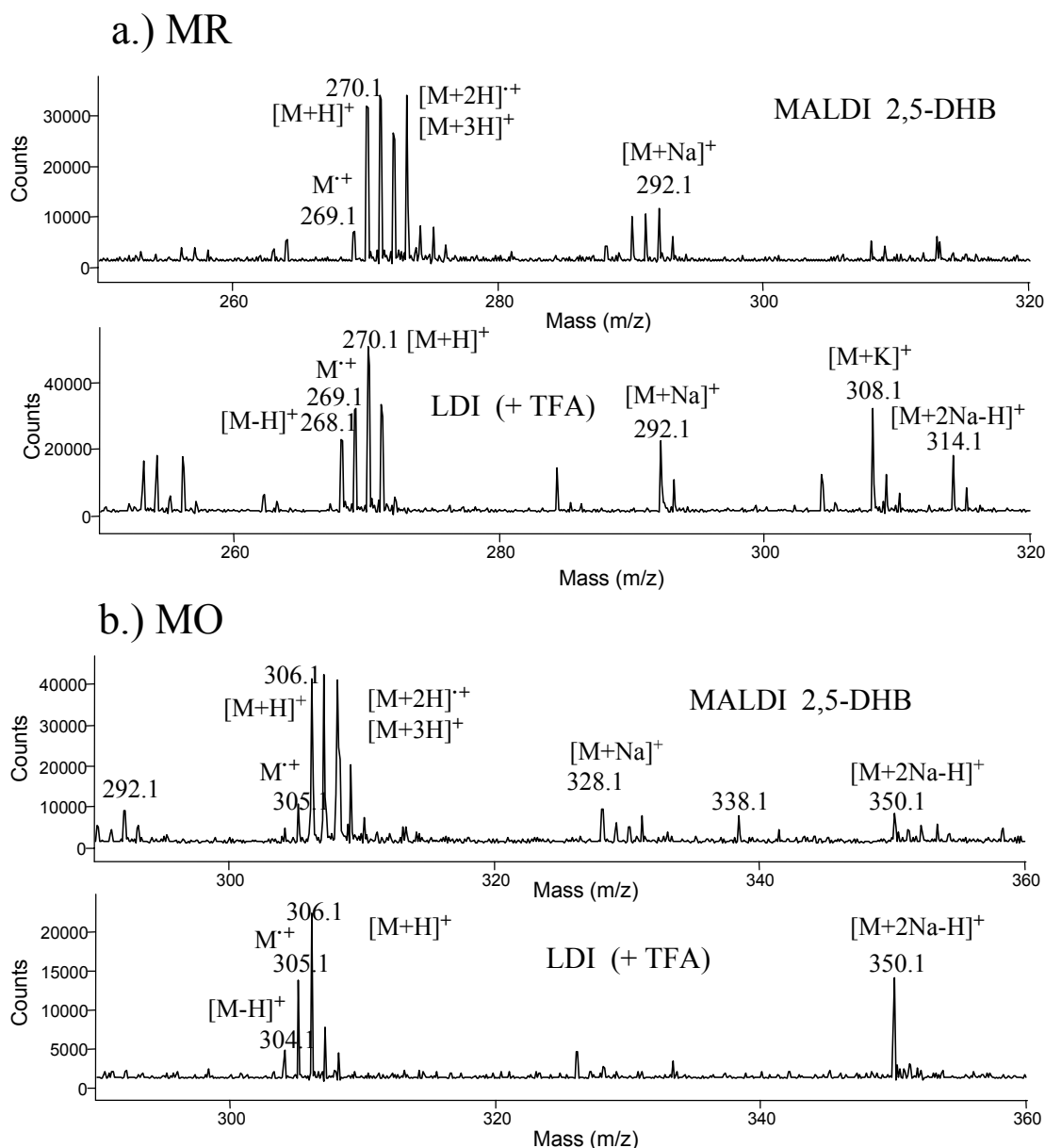
#### D.1.4. Vergleich von LDI und MALDI: Transfer von Protonen und H-Atomen

Alle in diesen Versuchen verwendeten pH-Indikatoren haben einen hohen Absorptionskoeffizienten bei der Wellenlänge des Lasers ( $\lambda = 337$  nm). Daher können von den meisten Indikatoren auch ohne Matrix mit Laserdesorption/Ionisation (LDI) Spektren aufgenommen werden. Der Azofarbstoff Methylrot wurde sogar als Matrix vorgeschlagen [Sch96a], und es gibt eine Reihe weiterer Farbstoffe, die Matrixeigenschaften besitzen, z.B. HABA oder Rhodamin B [Tan92, Sha92, Juh93, Smi95, Liu96, Sch96a]. Allerdings wurden dabei meist Laser im sichtbaren Bereich eingesetzt.

Daher stellt sich die Frage, ob die Versuchsbedingungen der vorgestellten Experimente mit den pH-Indikatoren mit den üblichen Standardbedingungen bei der MALDI-Analyse anderer Verbindungen zu vergleichen ist. Eine Möglichkeit der Überprüfung bietet der direkte Vergleich von LDI- und MALDI-Spektren. Dafür wurden die Analyten jeweils mit 0.1 %TFA angesäuert, um eine vollständige Protonierung zu gewährleisten, und dann einmal mit und einmal ohne Matrix präpariert (*dried droplet*). Die so erhaltenen LDI-Spektren ohne Matrixzusatz unterscheiden sich bei fast allen Farbstoffen erheblich von den mit Matrix aufgenommenen MALDI-Spektren. Von einigen Verbindungen konnten mit LDI gar keine intakten Moleküle detektiert werden (BP, BE, CO), während mit MALDI neben kationisierten Molekülen in erster Linie protonierte Moleküle entstehen (s. Kap. D.1.3). Andere Farbstoffe (MO, MR) bilden bei der LDI hauptsächlich Molekülonen (Radikalkationen), während in den MALDI-Spektren (Matrix 2,5-DHB) neben protonierten Molekülen auch eine Addition von ein oder zwei Wasserstoffatomen beobachtet wird. Ein Vergleich von LDI und MALDI für zwei Farbstoffe (MO und MR) unter Zugabe von TFA ist in Abb. D.1.4.1 dargestellt.

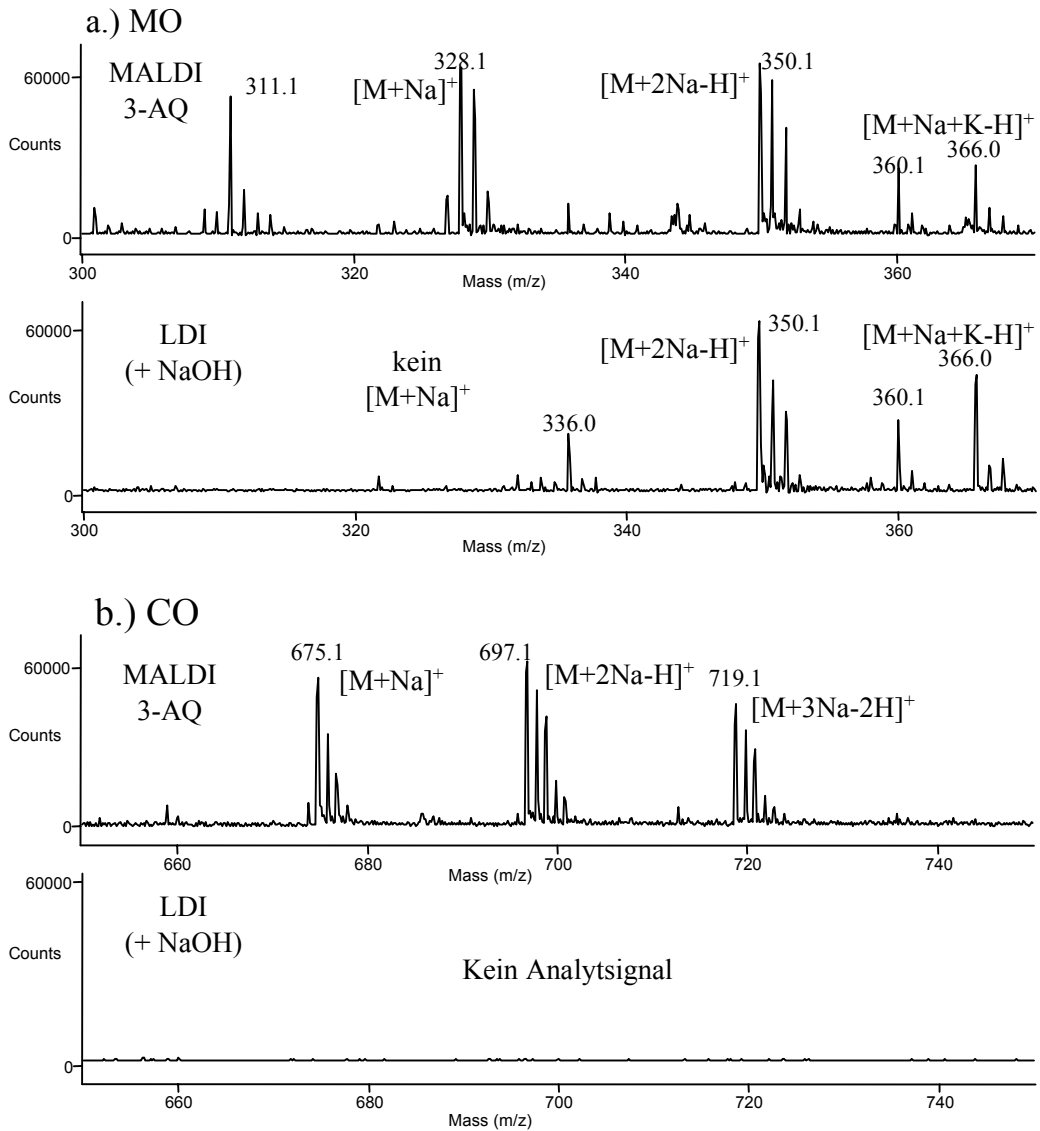
In allen genannten Fällen ist der Unterschied zwischen den LDI- und MALDI-Spektren absolut signifikant, was auf unterschiedliche Ionisationsmechanismen für beide Fälle hinweist. Bei den Indikatoren CV und TB werden dagegen in beiden Fällen hauptsächlich protonierte Moleküle bilden, so daß sich deren Spektren mit und ohne Matrix kaum unterscheiden. Um einen Einfluß der Eigenabsorption der Farbstoffe und damit eine matrixlose, direkte LDI auch unter MALDI-Bedingungen absolut ausschließen zu können, waren weitere Experimente notwendig. Die wesentlich höhere initiale Geschwindigkeit der Ionen bei MALDI erlaubt eine eindeutige Abgrenzung zur direkten LDI, bei der die Ionen initiale Ionengeschwindigkeiten von nahezu Null aufweisen. Zugleich ist eine hohe initiale Geschwindigkeit auch ein gutes Indiz für einen Einbau der Analyte im Matrixkristall. (Bestimmung von Startgeschwindigkeiten s. Kap. D.1.5).

Besonders interessant ist ein Vergleich von LDI- und MALDI-Spektren in alkalischem Milieu. Dazu wurden die Farbstoffe mit Natronlauge ( $c = 0.01$  mol/L) gemischt und jeweils mit einer basischen Matrix (3-AQ) und ohne Matrix präpariert. Saure Matrices können für diesen Versuch nicht verwendet werden, da sie im Alkalischen deprotoniert werden und dadurch ihre Matrixfunktion verlieren. Dies gilt umgekehrt natürlich auch für basische Matrices im Sauren. Durch die Zugabe der Natronlauge liegen die Indikatoren vollständig deprotoniert vor, so daß sie (bis auf CV) ein- oder zweifach negativ geladen sind. In den positiven LDI-Spektren sind daher fast ausschließlich mehrfach kationisierte Analyte zu finden, denn nur durch Anlagerung von mindestens zwei Kationen kann aus einem einfach geladenen Anion eine positive Nettoladung resultieren (s. Abb. D.1.4.2). Eine Protonierung der Anionen ist dagegen bei LDI nicht möglich, da keine sauren Verbindungen vorhanden sind. Daher werden weder einfach kationisierte noch einfach protonierte Spezies gebildet. Die Indikatoren mit zwei deprotonierten Sulfonsäuren (BE, CO) können mit LDI gar nicht ohne Zersetzung detektiert werden.



**Abbildung D.1.4.1:** Vergleich von Spektren mit Matrix (MALDI, 2,5 DHB, oben) und ohne Matrix (LDI, unten), jeweils unter Zusatz von 0.1 %iger TFA. a.): Methylrot (MR), b.): Methylorange (MO).

In den MALDI-Spektren treten zwar auch keine protonierten Analyte auf, dafür werden aber einfach kationisierte Spezies gebildet. Da die Analyte zudem alle eindeutig (mindestens einfach) negativ geladen in der Lösung und im Matrixkristall vorliegen, kann ein einfach kationisierter Analyt nur durch Protonentransfer entstanden sein. Auch die Indikatoren, die ohne Matrix gar keine intakten Moleküle bilden (BE, CO), können mit der Matrix 3-AQ unter Zugabe von NaOH unzersetzt als kationisierte Moleküle detektiert werden. Selbst diese erscheinen trotz der zweifach deprotonierten Vorläuferionen in den Spektren -neben den zu erwartenden dreifach kationisierte Molekülen- auch mit nur ein oder zwei angelagerten Natriumionen. Auch diese Ionen können wiederum nur durch Protonentransfer entstehen. Ein Vergleich von LDI und MALDI für zwei Farbstoffe (MO und CO) unter Zugabe von NaOH ist in Abb. D.1.4.2 gezeigt. Da bei Zugabe von NaOH die Matrix die einzige saure Verbindung bleibt und bei Fehlen der Matrix keine Protonierung erfolgt, kann man sicher davon ausgehen, daß die Matrix die Protonenquelle darstellt. Es sei hier angemerkt, daß dieser Protonentransfer mit der Matrix ANP nicht erfolgt, was ein Grund für die insgesamt schlechtere Matrixeigenschaften dieser Verbindung sein könnte.



**Abbildung D.1.4.2:** Vergleich von Spektren mit der Matrix 3-AQ (MALDI, oben) und ohne Matrix (LDI, unten), jeweils unter Zusatz von 0.01 M NaOH. a.): Methylorange (MO), b.): Congorot (CO).

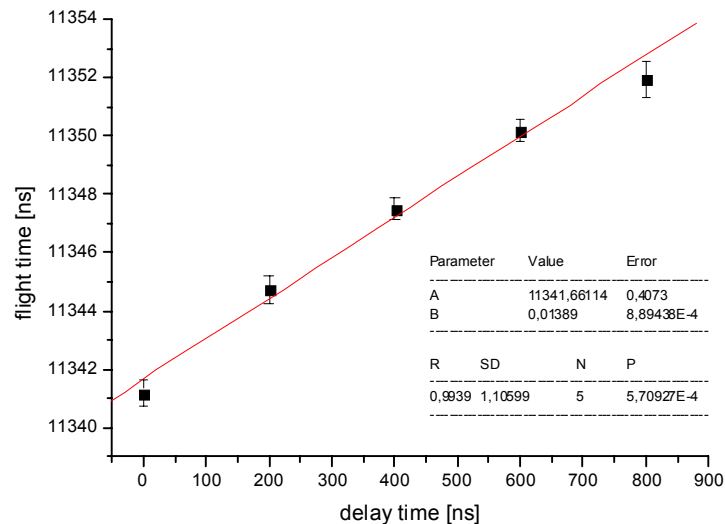
### D.1.5. Initiale Ionengeschwindigkeiten von Farbstoffen und Vergleich mit Peptiden

Von einigen pH-Indikatoren können auch ohne Matrixzusatz LDI-Spektren aufgenommen werden, da die Farbstoffe bei der Laserwellenlänge ( $\lambda = 337$  nm) absorbieren. Obwohl sich die mit und ohne Matrix aufgenommenen Spektren in den meisten Fällen deutlich unterscheiden, ist dies nicht bei allen Kombinationen der Fall. Um die vorgestellten Ergebnisse und Schlußfolgerungen auf andere Analytklassen übertragen zu können, muß aber eindeutig belegt sein, daß es sich auch bei der Analyse der pH-Indikatoren um einen echten MALDI-Prozeß handelt. Eine gute Möglichkeit zur Überprüfung bietet die Bestimmung der initialen axialen Geschwindigkeit der Ionen ( $v_0$ ). Hierbei handelt es sich um eine matrixabhängige Eigenschaft des MALDI-Prozesses, da alle gebildeten Ionen (Matrix und Analyt) in erster Näherung dieselbe initiale Geschwindigkeit aufweisen. Diese Geschwindigkeitskomponente in Richtung der Desorptionsachse, die je nach Matrix zwischen 250 bis zu 800 m/s beträgt, wird durch den kollektiven Ablationsprozeß verursacht und ist damit ein klares Kriterium für den MALDI-Prozeß. Ionen, die durch (thermische) Laserdesorption direkt von einer Oberfläche gebildet werden, haben eine wesentlich geringere axiale Geschwindigkeitskomponente. So wird z.B. für laserdesorbierte Kationen wie  $\text{Na}^+$  eine  $v_0$  von nahezu Null ermittelt [Glü99]. Bei organischen Molekülen, die unzersetzt in die Gasphase überführt werden können, kann die gemessene Geschwindigkeit etwas höher liegen, sie erreicht aber niemals die bei MALDI-Matrizes gefundenen Werte von über 400 m/s.

Darüber hinaus ist eine hohe  $v_0$  der Analytionen auch ein weiteres klares Indiz für einen Einbau der Analytionen in den Matrixkristall, da nur in diesem Fall hohe  $v_0$  auftreten können. Geringere  $v_0$ -Werte, die von den hohen matrixspezifischen Startgeschwindigkeiten abweichen, werden nur in Ausnahmefällen gefunden [Glü01]. Dies ist vor allem bei der Gasphasen-Kationisierung von kleinen, ungeladenen Vorläufermolekülen der Fall. Die  $v_0$ -Werte sind also auch bei diesen Ausnahmen deswegen niedriger, weil es sich nicht um den oben beschriebenen, kollektiven MALDI-Prozeß handelt. Daher erlaubt die Messung von initialen Ionengeschwindigkeiten Rückschlüsse auf den Desorptionsprozeß.

Zur Bestimmung der axialen Startgeschwindigkeit von Ionen oder Neutralmolekülen kommen verschiedene Methoden zum Einsatz (s. Kap. C.2.3.1). Eine dieser Methoden nutzt die Technik der verzögerten Extraktion der Ionen (DE, *delayed extraction*) und basiert auf der Abhängigkeit der Gesamtflugzeit der Ionen im TOF-Massenspektrometer von  $v_0$  und der Verzögerungszeit. Da die initiale Geschwindigkeit in alle Flugzeiten eingeht, die bei verschiedenen DE-Zeiten resultieren, läßt sich durch eine Auftragung der Flugzeiten gegen die Verzögerungszeit aus der Steigung die initiale Ionengeschwindigkeit  $v_0$  berechnen. Diese Methode wurde erstmals von Juhasz et al. vorgeschlagen [Juh97]. Die Autoren verwendeten eine aus der Flugzeitgleichung abgeleitete Näherungsformel zur Berechnung von  $v_0$  aus der Steigung. Eine alternative Möglichkeit der Auswertung ist eine numerische Anpassung, die von Glückmann vorgeschlagen und erfolgreich angewendet wurde [Glü99]. Für die Bestimmung der  $v_0$ -Werte der pH-Indikatoren mit und ohne Matrix wurde auf diese Variante zurückgegriffen. Dazu wurden zunächst die Flugzeiten bei verschiedenen Verzögerungszeiten im Linearmodus bestimmt ( $\tau = 0 - 800$  ns,  $n = 5$ )<sup>25</sup> und gegen die DE-Zeit aufgetragen (Microcal Origin 6.0, s. Abb. D.1.6.1).

<sup>25</sup> Es sei hier angemerkt, daß bei einer Verzögerungszeit von 0 nicht etwa eine prompte Extraktion der Ionen erfolgt, sondern daß es eine gerätebedingte Verzögerung zwischen dem Laserpuls und dem Aufbau der Beschleunigungsspannung gibt, da die elektronische Signalgebung und der Spannungsaufbau eine gewisse Zeit erfordert. Diese "Totzeit" liegt bei dem verwendeten TOF-Massenspektrometer in der Größenordnung von etwa 200 ns. (In Abb. D.1.5.2 sind nur die eingestellten  $\tau$ -Werte angegeben, die Totzeit ist nicht berücksichtigt).



**Abbildung D.1.5.1:** Beispiel einer Auftragung der Ionenflugzeiten gegen die Verzögerungszeit ( $[M+H]^+$  von Methylrot (MR), Matrix 3-AQ). Aus der ermittelten Steigung der Geraden kann  $v_0$  berechnet werden.

Die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit der Ionen aus der Steigung dieser Geraden erfolgte mit einem Programm, das von M. Glückmann im Rahmen seiner Dissertation [Glü01a] entwickelt wurde (TurboPascal 7.0). Zusätzlich zur Quellengeometrie gehen die anliegenden Beschleunigungsspannungen in die Berechnung ein. Die Wahl dieser Parameter, insbesondere die Aufteilung der Extraktionsspannung zwischen erster und zweiter Beschleunigungsstufe, hängt ganz entscheidend von den zu analysierenden Ionen ab. Grundsätzlich ist die Auflösung für ein gegebenes Ion und damit gegebener Masse (bzw.  $m/z$ ) stark von der Verzögerungszeit abhängig. Bei der Auswertung (Bestimmung des Peakmaximums) muß man darauf achten, ob man die Flugzeit der über alle Isotope gemittelten Masse verwendet, oder ob die Auflösung über den gesamten Bereich gut genug ist, um die Flugzeit nur eines Isotops (monoisotopische Masse) verwenden zu können. Bei höheren  $m/z$  ist letzteres in der Regel nicht realisierbar, daher werden die Einstellungen von vorneherein so gewählt, daß die durchschnittliche, gemittelte Masse über alle Isotope bestimmt werden kann. Bei den pH-Indikatoren war aber aufgrund der geringen Masse unter 1000 Da eine Auswertung der monoisotopischen Signale unproblematisch. Dies hat zudem den Vorteil, daß auch eng beieinander liegende Signale interpretiert werden können, wie z.B. Radikalkationen und protonierte Ionen derselben Verbindung. Dazu wurde eine mittlere Grid-Voltage von 96 % gewählt, dies entspricht bei einer Beschleunigungsspannung von +20 kV am Probensteller (positiver Ionenmodus; das Flugrohr ist geerdet) einer Spannung von +19,2 kV am ersten Netz.

Allerdings konnten durch die gewählten Parameter (weiche Extraktion) in einigen Fällen, besonders bei sehr hohen  $v_0$ , die Spektren bei  $\tau = 800$  ns aufgrund der geringen Auflösung und Ionenintensität nicht mehr ausgewertet werden. Bei niedrigen  $v_0$ , also besonders bei der matrixlosen LDI, ist die Isotopenverteilung dagegen aufgrund der fehlenden räumlichen Ausbreitung und der damit einhergehenden Peakverbreiterung auch bis zu  $\tau = 1000$  ns noch recht gut aufgelöst. Bei sehr kleinem  $m/z$  treten dann aber mit hohen DE-Zeiten Verluste durch Feldinhomogenitäten auf.

Für eine Auswahl von pH-Indikatoren wurde auf die beschriebene Weise die initiale Ionengeschwindigkeit jeweils ohne Matrix (LDI) und mit einigen MALDI-Matrizes ermittelt. Die aus drei Kurven gemittelten Werte sind in Tab. D.1.5.1 zusammen mit den Standardabweichungen angegeben. Dabei wurden sowohl protonierte als auch kationisierte Ionen berücksichtigt, und von MR wurde auch die  $v_0$  des radikalischen Molekülions bestimmt.

**Tabelle D.1.5.1: Initiale Geschwindigkeiten von Ionen von pH-Indikatoren mit verschiedenen MALDI-Matrizes und ohne Matrix (LDI).**

pH-Indikator	Ion	m/z	LDI $v_0$ [m/s]	MALDI $v_0$ [m/s]		
				2,5-DHB	3-AQ	ANP
Methylrot	$M^{•+}$	269	$253 \pm 16$	$595 \pm 69$	$284 \pm 42$	-
	$[M+H]^+$	270	$267 \pm 35$	$594 \pm 76$	$288 \pm 62$	$564 \pm 30$
	$[M+Na]^+$	292	$245 \pm 30$	$592 \pm 14$	-	-
Methylorange	$[M+H]^+$	306	$271 \pm 26$	$595 \pm 69$	-	-
	$[M+Na]^+$	328	$253 \pm 12$	$598 \pm 17$	-	-
	$[M+2Na-H]^+$	350	$240 \pm 13$	$650 \pm 37$	-	-
Thymolblau	$[M+H]^+$	467	$244 \pm 44$	$673 \pm 49$	$290 \pm 28$	$669 \pm 84$
	$[M+Na]^+$	489	-	$602 \pm 16$	-	-
	$[M+2Na-H]^+$	511	$234 \pm 22$	$621 \pm 08$	-	-
Kristallviolett	$[M+H]^+$	372	$242 \pm 39$	$596 \pm 94$	$319 \pm 116$	$442 \pm 41$

Zunächst fällt auf, daß die  $v_0$ -Werte für den LDI-Fall mit 200-300 m/s relativ hoch liegen, normalerweise liegen diese ohne Matrix bei unter 100 m/s. Durch die Eigenabsorption der Indikatoren scheint es aber auch bei der Laserdesorption der Farbstoffe ohne Matrix zu einer vorwärtsgerichteten Ausbreitung der Ionen und damit zu einer axialen Geschwindigkeitskomponente zu kommen, in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß einige Farbstoffe auch Matriceigenschaften besitzen. Bei der Ionenbildung durch MALDI sind die Werte allerdings wesentlich höher. Die Startgeschwindigkeit der Ionen ist hier in erster Linie von der Matrix abhängig. Während mit 3-AQ relativ niedrige Geschwindigkeiten ermittelt wurden, die im Schnitt nur etwa 50 m/s über den LDI-Werten liegen, sind die initialen Geschwindigkeiten der Analytionen zumindest bei den Matrizes 2,5-DHB und ANP mit 560-700 m/s deutlich höher. Sowohl protonierte als auch kationisierte Indikatoren weisen dieselbe hohe  $v_0$  auf. Diese wesentlich höheren Geschwindigkeiten der Ionen mit MALDI sind ein klarer Beweis, daß diese Ionen durch einen anderen Mechanismus gebildet worden sind als bei der direkten Laserdesorption. Zugleich ist dies auch ein deutliches Indiz für einen Einbau der pH-Indikatoren im Matrixkristall, wie er bereits für andere Analyte gefunden wurde.

Es sei hier angemerkt, daß sich initiale Geschwindigkeiten, die mit verschiedenen Methoden oder mit unterschiedlichen Geräteparametern bestimmt wurden, generell nur eingeschränkt vergleichen lassen. Aus diesem Grund sind auch die absoluten Werte mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, was sich auch in den sehr unterschiedlichen Startgeschwindigkeiten widerspiegelt, die bisher veröffentlicht wurden (s. Kap. C.2.3.1). Dies spielt bei den hier vorgestellten Messungen aber insofern nur eine untergeordnete Rolle, als es im Wesentlichen um einen Vergleich verschiedener Präparationen und Ionen bei denselben Bedingungen geht und der Trend innerhalb einer Methode eindeutig ist.

Die Geschwindigkeit der Analytionen liegt zudem in der gleichen Größenordnung wie die der Matrixionen. In Tab. D.1.5.2 sind die initialen Geschwindigkeiten einiger Matrixionen angegeben. Bei den Matrizes 2,5-DHB und 3-AQ liegen alle Werte der pH-Indikatoren in einem engen Bereich von ca.  $\pm 100$  m/s um den  $v_0$ -Wert der jeweiligen Matrixionen. Bei ANP ist die Streuung etwas größer, vermutlich spielt hier zumindest bei CV auch die direkte LDI eine Rolle. Da

CV eine extrem hohe Absorption aufweist, während andererseits ANP keine sehr effiziente Matrix ist, kann vermutlich die direkte LDI in Konkurrenz zur Ionenbildung durch MALDI treten und ein gemischtes, niedrigeres  $v_0$  resultiert. In jedem Fall bewirkt aber der Einbau der Analyte in die MALDI-Matrix und der nachfolgende kollektive Ablations- und Ionisationsprozeß je nach Matrix verschiedene Anfangsgeschwindigkeiten der gleichen Analytionen. Man erkennt auch deutlich, daß die geringen  $v_0$ -Werte mit 3-AQ matrixbedingt sind, da auch protoniertes 3-AQ dieselbe geringe  $v_0$  aufweist.

**Tabelle D.1.5.2: Initiale Geschwindigkeiten [m/s] von verschiedenen Matrixionen.**

Matrix	Ion	m/z	$v_0$ [m/s]
3-AQ	$[M+H]^+$	145	$262 \pm 37$
ANP	$[M+H]^+$	183	$491 \pm 95$
2,5-DHB	$[M+H]^+$	155	$572 \pm 17$

Nicht für alle Matrizes sind Literaturwerte bekannt, aber die Werte für die Matrix 2,5-DHB stimmen gut mit bereits veröffentlichten Startgeschwindigkeiten verschiedener Analyte und Matrixionen überein, obwohl diese teilweise unter etwas anderen Bedingungen ermittelt wurden [Juh97, Glü99, Ber02]. Zur Kontrolle wurden die initialen Geschwindigkeiten einiger kleinen Peptide mit der Matrix 2,5-DHB bestimmt (s. Tab. D.1.5.3). Dies ist insofern interessant, als die meisten Messungen in der Literatur mit Analyten mittlerer Masse ab einigen kDa gemacht wurden, die pH-Indikatoren aber wesentlich geringere Molekülmassen haben. Die ermittelten Werte liegen alle in dem erwarteten Bereich von 550-700 m/s.

**Tabelle D.1.5.3: Initiale Geschwindigkeiten von MALDI-Ionen einiger Peptide mit der Matrix 2,5-DHB.**

Peptid	Ion	m/z	$v_0$ [m/s]
Leucin-Enkephalin	$[M+H]^+$	556	$684 \pm 110$
	$[M+Na]^+$	578	$654 \pm 55$
Angiotensin III	$[M+H]^+$	931	$701 \pm 74$
	$[M+Na]^+$	953	$671 \pm 29$
Buccalin	$[M+H]^+$	1053	$659 \pm 79$
	$[M+Na]^+$	1075	$652 \pm 42$

### D.1.6. Diskussion: Einbau von Analytionen in Matrixkristalle

Das wichtigste Ergebnis der Versuche mit den pH-Indikatoren ist sicherlich, daß Analyte geladen im Matrixkristall vorliegen und daß zudem der Ladungszustand im Kristall durch die Ladung in Lösung vorgegeben ist. Der "pH-Wert" der Lösung wird somit beim Kristallisationsprozeß im Festkörper konserviert, und demnach ist die Form, in welcher basische und saure Analyte im Matrixkristall vorliegen, von den Bedingungen in der Lösung und bei der Kristallisation abhängig. Die Versuche mit den pH-Indikatoren zeigen außerdem, daß sich der pH-Wert durch Abdampfen von Lösungsmittel vor der Kristallisation nur wenig ändert, da nur in seltenen Fällen und nur in unmittelbarer Nähe des  $pK_A$ -Wertes ein Farbumschlag kurz vor der Kristallisation zu beobachten war. In diesen Fällen änderte sich die Farbe aber immer bereits in Lösung, und die Kristalle hatten die Farbe der Lösung kurz vor der Kristallisation.

Dieser eindeutige Zusammenhang zwischen Ladungszustand in Lösung und im Matrixkristall hat eine erhebliche Bedeutung für die MALDI-Analyse, da somit fast alle analytisch relevanten Verbindungen auch im Kristall geladene Gruppen tragen. Eine Freisetzung von ungeladenen Analyten erscheint damit im Falle saurer und basischer Verbindungen unwahrscheinlich und wäre erst nach einer Neutralisation möglich. Viel plausibler ist dagegen die Freisetzung dieser "präformierten" Ionen aus dem Matrixkristall, die z.B. durch eine Ladungstrennung oder durch Neutralisation einer Ladung (z.B. durch Photoionisation mit nachfolgendem Protonentransfer) erfolgen könnte.

Darüber hinaus belegen die Inhomogenitäten beim Einbau, daß es zu einer unterschiedlichen Verteilung von Analyten in Matrixkristallen kommen kann, und daß sogar unterschiedliche Protonierungsstufen an verschiedenen Stellen derselben Matrixpräparation auftreten können. Letzteres spricht für zeitliche und/oder örtliche Variationen des pH-Werts bei der Kristallisation. Dies könnte auch eine Erklärung für die starke Positionsabhängigkeit der Signalintensitäten bei einigen MALDI-Matrizes sein.

Die Ionen müssen aber nicht zwangsläufig in die Kristallstruktur eingelagert sein, sie könnten auch in Lösungsmitteltaschen sitzen oder zumindest teilweise solvatisiert sein. Die Voraussetzungen dafür sind bei einer Standard-MALDI-Präparation in jedem Fall gegeben, da Lösungsmittel im Kristall eingeschlossen ist. Neben der in Kap. D.1.2.2 beschriebenen NMR-spektroskopischen Detektion von Acetonitril wurde jüngst auch Wasser in Matrixkristallen mittels Karl-Fischer-Titration nachgewiesen [Dur02]. In dieselbe Richtung weisen auch SEM-Aufnahmen von Matrixkristallen, in denen kleine Löcher entdeckt wurden, die als "*liquid inclusions*" interpretiert wurden [Hor03]. Das Lösungsmittel könnte zudem den Einbau geladener Analyte erleichtern, deren Neutralisation verhindern oder eine Bildung von engen Ionenpaaren erschweren, so daß eine leichtere Ladungstrennung erfolgen kann. Auch ein insgesamt schonenderer MALDI-Prozeß könnte durch eine Hülle aus Lösungsmittel möglich sein. Allerdings bedeutet die Detektion von Lösungsmittel in Matrixkristallen nicht, daß dieses für MALDI absolut notwendig ist. In jüngster Zeit wurden lösungsmittelfreie Präparationsprotokolle vorgestellt [Prz00, Ske00, Tri01, Wan01]. Dabei werden meist Matrix und Analyt in fester Form vermischt, diese Protokolle sind aber bisher nur eingeschränkt anwendbar. Für diese Diskrepanz gibt es zwei Erklärungsansätze. Entweder erfolgt auch bei den lösungsmittelfreien Präparationen eine (partielle) Kristallisation, z.B. durch Feuchtigkeit aus der Laborluft, oder eine MALDI-Analyse ist unter bestimmten Bedingungen auch ohne Lösungsmittel möglich. Dies könnte z.B. dann der Fall sein, wenn Analyt und Matrix sehr fein gemahlen werden und dadurch ein enger Kontakt der Moleküle ermöglicht wird.

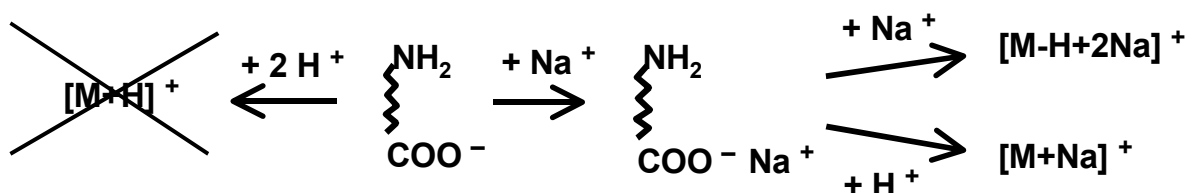
Ein weiteres aussagekräftiges Ergebnis der Untersuchungen ist die deutliche pH-Abhängigkeit der MALDI-Spektren. Diese korreliert eindeutig mit dem Protonierungszustand des Indikators in Lösung. Es scheint somit, daß aus Molekülonen, die in vollständig deprotonierter



Form (in der Regel negativ geladen) im Kristall vorliegen, nur schwer protonierte Molekülonen bzw. kationenfreie Ionen gebildet werden können. Allerdings kann man daraus nicht den umgekehrten Schluß ziehen, daß ein Einbau mit einer positiven Nettoladung eine notwendige Voraussetzung zur Bildung von protonierten Ionen wäre, da die meisten pH-Indikatoren in saurem Milieu als Zwitterionen existieren und in diesen Fällen trotzdem protonierte (und deprotonierte) Moleküle entstehen. Dies bedeutet, daß zwar der Ladungszustand der Analyte im Kristall eine Rolle spielt, daß aber bei der Ionenbildung nicht einfach eine Freisetzung präformierter Ionen erfolgt. Vielmehr findet bei den meisten Analyten ein Ladungstransfer statt, vermutlich hauptsächlich durch Protonentransfer.

Aber selbst eine negative Ladung eines Analyten im Matrixkristall ist kein eindeutiges Ausschlußkriterium für die Bildung protonierter Molekülonen. Einige Farbstoffe, z.B. TB und BP, besitzen in ihrer protonierten Form ebenfalls eine negative Nettoladung. Trotzdem treten protonierte Molekülonen mit relativ hohen Intensitäten in den Spektren auf. Im Unterschied zu den deprotonierten Azofarbstoffen liegen TB und BP aber als Zwitterionen vor (auch bei einfach negativer Nettoladung, z.B. +1/-2), so daß dadurch eine positiv geladene Gruppe im Molekül vorhanden ist, die es in den anderen Verbindungen nicht gibt. Zur Bildung von protonierten Ionen scheint also zumindest eine protonierte Gruppe im Molekül notwendig zu sein, selbst wenn das Molekül insgesamt gar nicht geladen ist oder sogar eine negative Nettoladung trägt. Allerdings haben auch die vollständig deprotonierten Formen von TB und BP (zweifach negativ) einen geringen zwitterionischen Anteil (+1/-3). Die intensive, blaue Farbe der zweifach negativen Ionen (deprotonierte Form) ist aber ein Indiz für eine stärkere Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen und damit für einen reduzierten zwitterionischen Anteil. Die höhere Elektronendichte führt zu längeren Bindungen und damit am zentralen Kohlenstoffatom zu einer geringeren sterischen Hinderung. Dadurch wird die Torsion der Phenylgruppen geringer und eine bessere Überlappung der  $\pi$ -Orbitale möglich. Ob dies wirklich der Grund für die beobachteten Unterschiede ist, ist schwer zu beurteilen. Es bleibt aber festzuhalten, daß mit steigender Zahl der negativen Ladungen und abnehmendem Anteil zwitterionischer Strukturen eindeutig die Tendenz zu Kationisierung unter gleichzeitigem Verschwinden der  $[M+H]^+$ -Ionen erheblich zunimmt. Zum Teil werden stark negativ geladene, deprotonierte Farbstoffe mit basischen Matrices überhaupt nicht mehr als  $[M+H]^+$  detektiert.

Die Vergleiche zwischen der direkten LDI und MALDI belegen eindeutig, daß bei MALDI Protonentransfer stattfindet. Zum einen sind Sulfonsäuren selbst in saurem Milieu negativ geladen, so daß nur durch Protonierung dieser Gruppen ein protoniertes Analyt ion entstehen kann. Zum anderen werden in basischer Umgebung auch aus negativ geladenen Indikatoren einfach kationisierte Ionen gebildet. Dies ist bei der direkten LDI ohne Matrix nicht möglich, da erst bei Anlagerung eines zweiten Kations ein positives Ion entsteht. Die Möglichkeiten der Ionenbildung bei MALDI sind in Abb. D.1.6.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung D.1.6.1:** Möglichkeiten der Bildung eines positiven Ions durch Natriumanlagerung oder Protonentransfer im Falle eines in Lösung deprotonierten Analyten mit basischer Gruppe im Molekül.

Obwohl somit eindeutig belegt ist, daß bei MALDI Protonentransfer stattfindet, ist nicht klar, warum im Basischen (bzw. mit basischen Matrizes) nicht auch eine weitergehende Protonierung bis zum protonierten Analyten erfolgt. Man kann aber vermuten, daß die Indikator-Anionen nicht an der Sulfonsäure protoniert werden, sondern z.B. an der (in Lösung basischeren) Azogruppe. Dies würde bedeuten, daß Natriumionen an den Sulfonaten koordiniert sind, was aufgrund der guten Wechselwirkung der beiden kleinen, "harten" Ionen auch durchaus plausibel ist, und daß im Prinzip eine Protonierung eines neutralen Ionenpaares erfolgt. Daß solche Ionenpaare existieren, beweisen die Spektren der Farbstoffe mit der nicht-sauren Matrix  $\alpha$ CMCA, wo diese Ionenpaare in Form von Radikalkationen (ohne Protonierung) detektiert werden.

Das Fehlen der kationenfremen Analytionen bei hohen pH-Werten könnte demnach zwei Ursachen haben: Zum einen würde ein starke Koordinierung mit den Gegenionen (Kontaktpaare) eine Trennung der Ionen verhindern. Die Art der Ionenpaare wäre dann sowohl vom Analyten als auch von der Matrix und dem Lösungsmittel abhängig. Eine negative Nettoladung würde zudem eine enge Koordination der Ionenpaare begünstigen, während dies bei neutralen Zwitterionen nicht der Fall ist. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, daß im negativen Ionenmodus (aus derselben Präparation) generell viel weniger Natriumanlagerungen auftreten, und das sogar bei mehrfach deprotonierten Molekülen und selbst bei Farbstoffen mit zwei deprotonierten Sulfonsäuren im Molekül. Diese fast kationenfremen Spektren in negativen Ionenmodus zeigen, daß die verstärkten Kationenanlagerungen im positiven Ionenmodus nicht alleine dadurch verursacht sein können, daß keine Trennung der Kationen von der Sulfonsäureanionen möglich ist. Daher spielt wohl neben der Koordination von Gegenionen auch die Säure-Base-Chemie eine Rolle.

Eine Protonierung von Sulfonaten scheint im Basischen bzw. mit basischen Matrizes erschwert zu sein. Dabei könnte die Acidität der (protonierten) Matrix eine Rolle spielen, die im Falle basischer Matrizes (z.B. 3-AQ) zu niedrig sein könnte, um Sulfonsäureanionen zu protonieren. Mit sauren Matrizes ist dies aber eindeutig möglich, da sonst aus neutralen Zwitterionen keine protonierten Analytionen gebildet werden könnten. Eine Protonierung könnte bereits durch neutrale Matrixmoleküle aus dem Grundzustand möglich sein, wahrscheinlicher scheint jedoch eine Protonenübertragung aus dem angeregten Zustand oder von einem protonierten Matrixion, daß wiederum durch Photoionisation und nachfolgendem Protonentransfer entstanden ist. Ein wesentlicher Unterschied zwischen sauren und basischen Matrizes ist, daß im letzteren Fall positive Matrixionen bereits in Lösung entstehen können und sich daher auch an negative (Analyt-)Ionen als Gegenionen anlagern können. Eine solche Anlagerung wird aber normalerweise im Spektrum nicht beobachtet, zumal auch die Neutralisation unter Verlust der neutralen Matrix nur wenig Aktivierungsenergie benötigt und exergonisch ist. Aus sauren Matrizes können dagegen erst durch Laseranregung positive Ionen entstehen, diese Ionen sind dafür wesentlich stärkere Säuren. Ein Einfluß dieser unterschiedlichen Säurestärke kann ebensowenig ausgeschlossen werden wie der oben beschriebene Einfluß der Ladung der Matrixionen in Lösung.

$\alpha$ CMCA ist ein gutes Beispiel für eine Matrix, die zwar eine eingeschränkte Matrixfunktion besitzt, mit der aber unter bestimmten Bedingungen (z.B. basische Analyte in saurem Milieu) trotzdem exzellente Massenspektren aufgenommen werden können. Auch bei der nicht-sauren Matrix  $\alpha$ CMCA wurde eine deutliche pH-Abhängigkeit gefunden. Allerdings treten neben kationisierten Analyten vor allem Radikale auf, die auch in Form von Ionenpaaren detektiert werden. Die plausibelste Erklärung für die Bildung dieser Radikale ist eine direkte Photoionisation der Farbstoffe, da diese alle bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbieren ( $\lambda = 337$  nm). Aber auch eine Elektronenübertragung von den Indikatoren auf (photoionisierte) Matrixmoleküle wäre denkbar, vor allem weil auch im negativen Ionenmodus Radikale auftreten. Abgesehen von der

Radikalbildung bleibt dann nur die Möglichkeit der Freisetzung präformierter Ionen, im Falle der Indikatoren in erster Linie als kationisierte Spezies. Protonierte Moleküle werden dagegen nur aus stark saurer Lösung gebildet.

Radikalkationen der Farbstoffe treten zwar auch mit anderen Matrices auf, aber nur mit vergleichsweise geringer Intensität. Die fehlende Acidität der neutralen Matrix  $\alpha$ CMCA verursacht ganz offensichtlich entweder das Versagen eines wesentlichen Ionisationspfades oder führt zumindest zu anderen nachfolgenden Prozessen (Elektronen- statt Protonentransfer). Es sei angemerkt, daß in den Spektren sowohl Radikalkationen der Matrix als auch protonierte Matrixionen auftauchen, so daß eine Protonierung prinzipiell möglich wäre, zumal auch andere Matrices in der Gasphase relativ schwach sauer sind und trotzdem protonierte Analytionen gebildet werden. Das Auftreten von  $[M+H]^+$ -Ionen bei  $\text{pH} < 2$  ist vermutlich auf die zugegebene Phosphorsäure zurückzuführen. Aufgrund der ähnlichen Säurestärke kann diese die im Analyten vorhandenen Sulfonsäuren protonieren, so daß präformierte, positive Ionen mit Hydrogenphosphaten als Gegenionen entstehen.

Zum Schluß bleibt die Frage, ob die mit den pH-Indikatoren gewonnenen Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlußfolgerungen auch auf andere Analytklassen übertragbar sind. Im Prinzip wäre auch denkbar, daß andere Analyten nicht geladen in Matrixkristalle eingebaut werden, sondern in Abhängigkeit von der Substanzklasse beim Einbau neutralisiert werden. Da aber die Korrelation zwischen pH-Wert der Lösung und Ladungszustand über einen großen pH-Bereich und mit einer Vielzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen konsistent wiedergefunden wurde, scheint eine analytabhängige Neutralisation beim Einbau wenig wahrscheinlich. Weitere Hinweise auf den Einbau von geladenen Analyten und von Ionenpaaren geben auch die Vielzahl von detektierten Addukten und nichtkovalenten Komplexen mit MALDI (s. Kap.C.3.3). Auch weitere Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zur Bildung von Anionenaddukten unterstützen den mit den pH-Indikatoren erhaltenen Befund der Konservierung des Ladungszustandes der Lösung im Kristall (s. Kap.D.3).

Die Unterschiede zwischen den LDI- und MALDI-Spektren, aber vor allem die hohen, MALDI-typischen Startgeschwindigkeiten der Ionen beweisen zudem, daß es sich um einen "echten" MALDI-Prozeß handelt und keine direkte Laserdesorption der Farbstoffe stattfindet. Besonders interessant für den MALDI-Mechanismus und die Interpretation der mit Hilfe der Indikatoren gewonnenen Ergebnisse ist die Tatsache, daß auch kationenangelagerte Analyte dieselbe hohe Startgeschwindigkeit zeigen. Dies bedeutet, daß diese durch den gleichen kollektiven MALDI-Prozeß entstanden sein müssen wie protonierte Analyte. Also werden sie nicht durch einen Gasphasenprozeß gebildet, sondern stammen aus dem Matrixkristall. Schon die Zahl der Anlagerungen, die in etwa mit der Zahl der sauren Funktionen, und hier besonders mit der Zahl der Sulfonsäuren, korreliert, läßt auf einen Einbau dieser Ionenpaare im Matrixkristall schließen. Dasselbe muß demnach auch für kationisierte Peptide gelten, da diese sonst ein geringeres  $v_0$  zeigen müßten. Die besonders effiziente Ionisation vieler Analytklassen, insbesondere von Biopolymeren, ist vor dem Hintergrund des Einbaus dieser Verbindungen in einer geladenen Form leicht verständlich. Zur Freisetzung von Analytionen ist keine Ionisation von neutralen Molekülen erforderlich, sondern es muß nur eine Ladungstrennung zwischen Ionen und/oder eine Neutralisation bereits vorhandener Ladungen erfolgen.

## D.2. Ionenbildung von basischen Analyten bei MALDI

In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen, wie die Anzahl der basischen Gruppen im Analytmolekül sowie deren Basizität sich auf die Ionenbildung bei MALDI auswirken. Anhand einiger Beispiele wird gezeigt, daß die Analyse basischer Verbindungen nicht generell zu einer hohen Intensität positiver Ionen  $[M+H]^+$  bei MALDI führt, sondern daß eine differenziertere Betrachtung notwendig ist. Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, daß basische Analyte im Matrixkristall bei niedrigem pH-Wert protoniert und damit geladen im Matrixkristall vorliegen. Bei einer möglichen Neutralisation dieser positiven Ionen durch Elektroneneinfang oder  $-$ transfer könnte es zu Fragmentierungen kommen. Anhand von ISD-Spektren basischer Peptide sowie eines Vergleichs von ISD- und ECD-Fragmentierungen werden Indizien für und gegen diese Hypothese aufgezeigt. Am Ende des Kapitels wird der Einfluß basischer Gruppen im Analyten auf die Ionisation, den Ladungszustand und Fragmentierungen sowie eine mögliche Relevanz des Elektroneneinfangs bei diesen Prozessen diskutiert.

### D.2.1. Einfluß der Basizität des Analyten

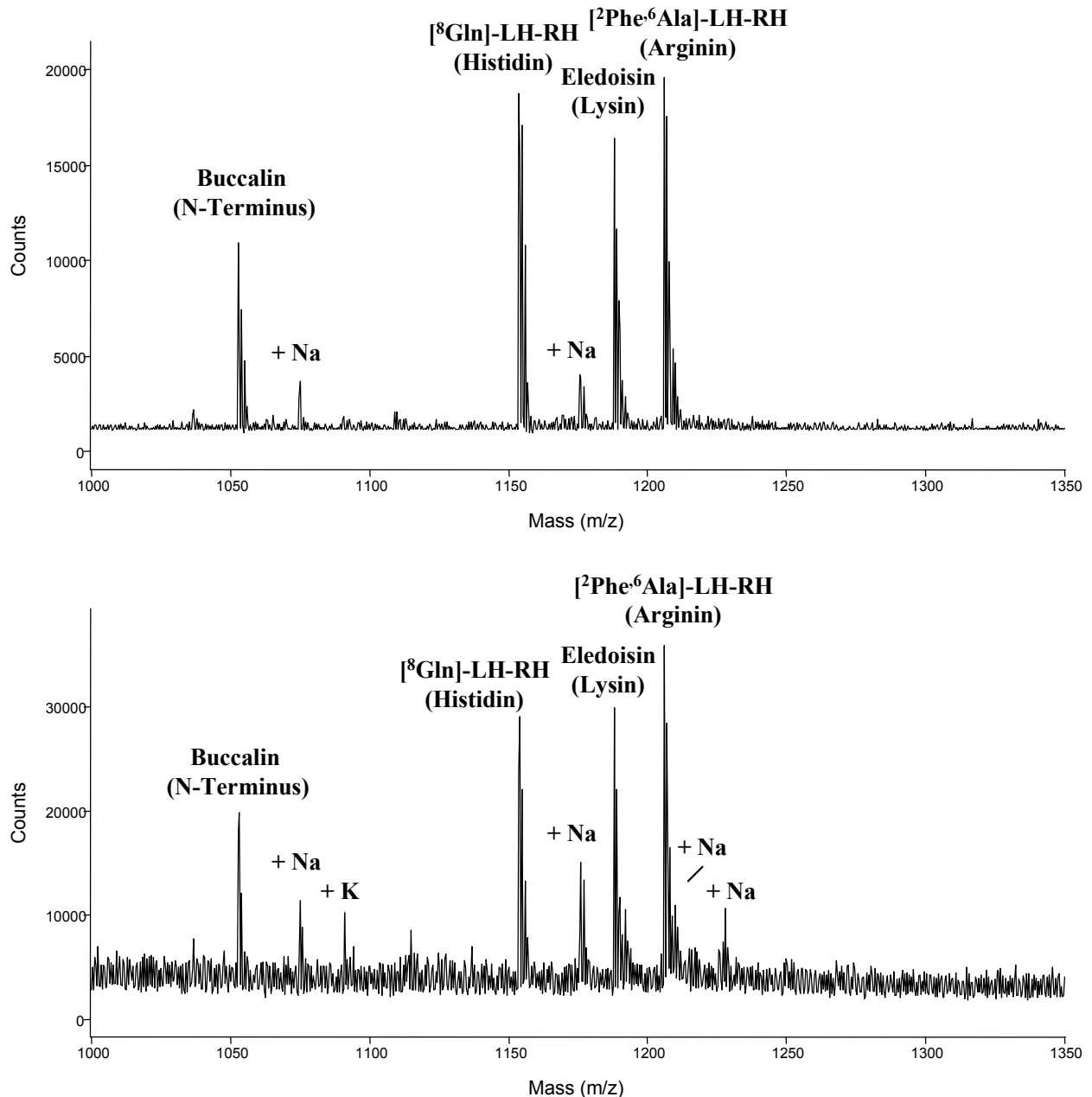
Generell führt bei MALDI, wie bei vielen anderen Ionisationsmethoden für die Massenspektrometrie auch, eine hohe Basizität des Analyten zu einer hohen Signalintensität von  $[M+H]^+$ -Ionen im Spektrum. So werden Peptide, die eine der basischen Aminosäuren Arginin ( $pK_B = 0.80$ ) oder Lysin ( $pK_B = 3.47$ ) enthalten, wesentlich empfindlicher detektiert als Peptide ohne basische Aminosäuren. Peptide, die abgesehen vom N-Terminus keine basischen Gruppen aufweisen, werden mit MALDI weniger empfindlich detektiert, obwohl die N-terminale Aminogruppe nur geringfügig weniger basisch ist ( $pK_B = 4.20-5.20$  je nach Aminosäure) als die Seitenkette von Lysin. Im Falle von Cystein ( $pK_B = 3.22$ ) und Prolin ( $pK_B = 3.40$ ) ist die Basizität des N-Terminus sogar höher als die Basizität von Lysin.

Vor dem Hintergrund möglicher Gasphasenreaktionen bei MALDI ist aber auch die Basizität der Analyte in der Gasphase von Bedeutung. Die Gasphasenbasizität (GB) des N-Terminus ist mit ca. 852 kJ/mol deutlich niedriger als die GB von Lysin (952 kJ/mol) und Arginin (1007 kJ/mol). Dafür ist Histidin in der Gasphase wesentlich basischer als in Lösung (GB = 952 kJ/mol,  $pK_A = 8.00$ ). Zudem liegt Histidin in sauren Lösungen, wie sie bei der MALDI-Präparation verwendet werden, auch in Lösung bereits protoniert vor. In Übereinstimmung damit werden histidinhaltige Peptide ebenfalls sehr empfindlich mit MALDI detektiert. In Abb. D.2.1.1. sind Spektren einer äquimolaren Mischung von Peptiden gezeigt, die jeweils nur eine basische Gruppe haben.<sup>26</sup> Bis auf das Peptid Buccalin, das nur die N-terminale Aminogruppe, aber keine Gruppe mit einer hohen GB hat, zeigen alle Peptide in etwa die gleiche Signalintensität. Das histidinhaltige Peptid [<sup>8</sup>Gln]-LH-RH wird genauso empfindlich detektiert wie die beiden Peptide, die Lysin oder Arginin enthalten. Das gezeigte Beispiel belegt, daß letzten Endes die Gasphasenbasizität eine entscheidende Rolle bei der Ionisation spielt, obwohl alle diese Verbindungen in saurer Lösung bereits protoniert vorliegen und folglich in dieser Form in den Matrixkristall eingebaut werden.

Darüber hinaus ist bei Peptiden ohne Lysin oder Arginin die Tendenz zur Bildung von kationisierten Molekülen besonders ausgeprägt. Sowohl bei Buccalin als auch bei [<sup>8</sup>Gln]-LH-RH sind vergleichsweise hohe Signale von Na-Addukten zu erkennen, während die lysin- oder argininhaltigen Peptide bei höherer Konzentration nur als protonierte Moleküle detektiert werden. Obwohl die Signalintensitäten bei MALDI einer gewissen Schwankung unterliegen, ist die beschriebene Tendenz in allen Spektren wiederzufinden. Von den oben gezeigten Peptiden haben

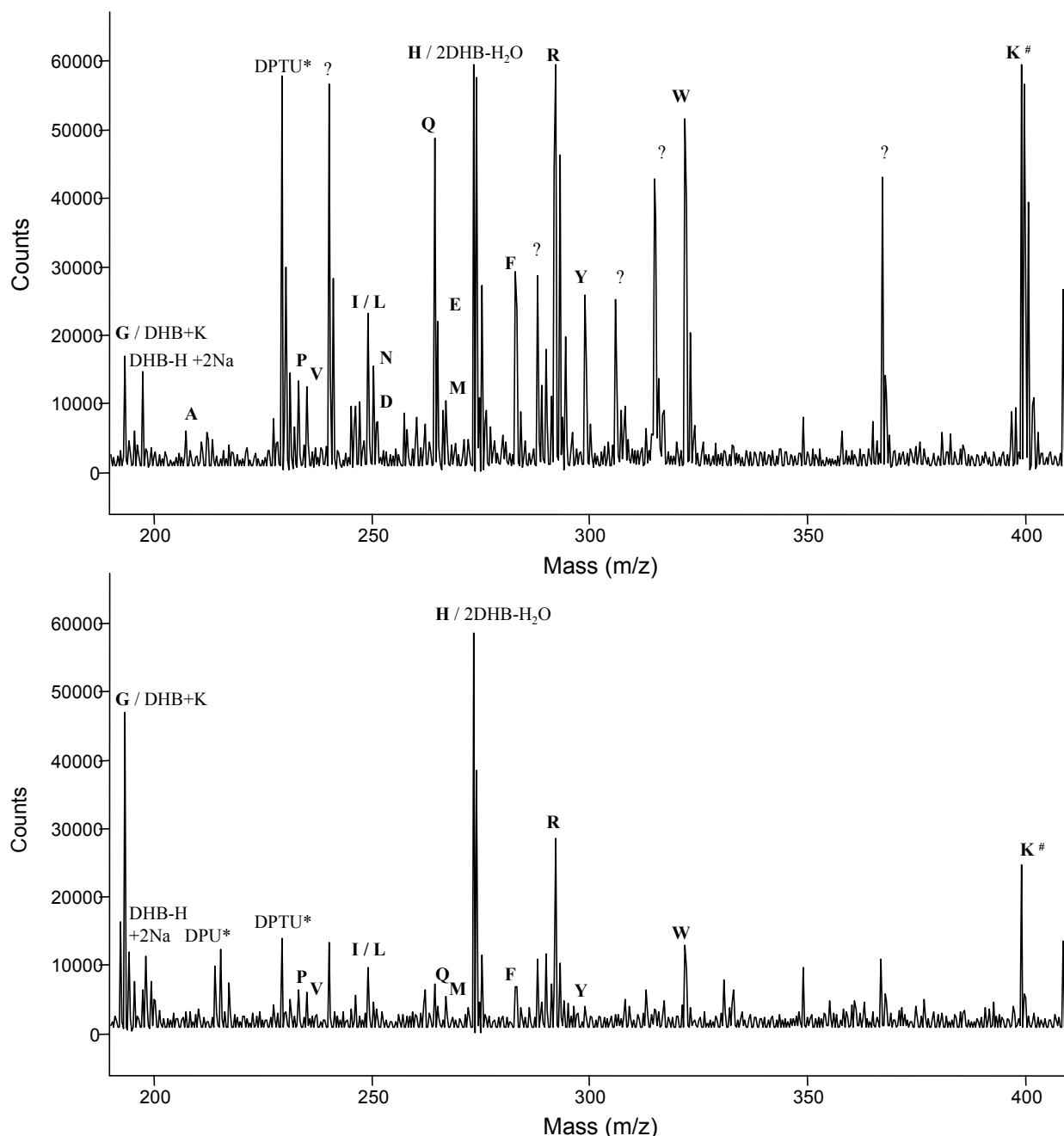
<sup>26</sup> Alle Peptide bis auf Buccalin, das keine basische Aminosäure in der Sequenz hat, sind am N-Terminus modifiziert (Para-Glutaminsäure) und haben daher keine freie N-terminale Aminogruppe.

nur Buccalin und Eledoisin eine saure Asparaginsäure in der Sequenz, während die anderen Peptide keine saure Gruppe tragen. Saure Aminosäuren können also nicht für das Ausmaß der Kationisierung verantwortlich sein, da diese beiden Peptide eine sehr unterschiedliche Tendenz zur Bildung von  $[M+Na]^+$  zeigen.

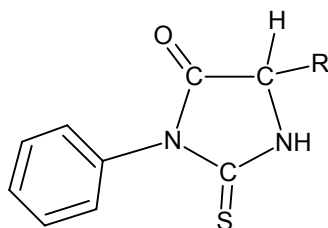


**Abbildung D.2.1.1** : MALDI-Spektren einer äquimolaren Mischung von vier Peptiden, die jeweils nur eine basische Gruppe im Molekül haben: Buccalin (N-Terminus, [8Gln]-LH-RH (Histidin), [2Phe,6Ala]-LH-RH (Arginin), Eledoisin (Lysin). Oben:  $c = 5 \cdot 10^{-6}$  mol/L, unten:  $c = 5 \cdot 10^{-7}$  mol/L. (Matrix 2,5-DHB)

Ein weiteres Beispiel für den Einfluß von basischen Gruppen ist in Abb. D.2.1.2 gezeigt. Bei der chemischen Sequenzierung von Proteinen wird standardmäßig der sogenannte Edman-Abbau verwendet, bei dem die N-terminalen Aminosäuren sukzessive abgespalten und als Phenylhydantoin-Aminosäuren (PTH-AS) detektiert werden (Struktur s. Abb. D.2.1.3).



**Abbildung D.2.1.2** : MALDI-Spektren eines Standards von Phenylhydantoin-(PTH)-Aminosäuren (Matrix 2,5-DHB). Das PTH-Gemisch enthält alle natürlichen Aminosäuren außer Cystein. Oben:  $c = 10^{-5}$  mol/L (10 pmol absolut); unten:  $c = 10^{-6}$  mol/L (1 pmol absolut). Die mit \* gekennzeichneten Peaks stammen von Nebenprodukten des Edman-Abbaus. K<sup>#</sup> (Lysin) wird bei der Edman Reaktion doppelt derivatisiert.



**Abbildung D.2.1.3** : Strukturformel von Phenylhydantoin-Aminosäuren (PTH-AS), die bei der chemischen Sequenzierung von Proteinen entstehen. (R = Seitenkette der Aminosäure)

Abb. D.2.1.2 zeigt MALDI-Spektren einer PTH-Standardmischung aller natürlichen Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein. Die Basizität bzw. Acidität dieser Verbindungen wird von der Seitenkette der jeweiligen Aminosäure dominiert. Das Phenylhydantoin selbst hat nur eine geringe Basizität, da nur eine Amid- bzw. Thioharnstoffgruppe vorhanden ist (s. Abb. D.1.2.3). In diesen Spektren sind mehrere Tendenzen zu erkennen. Zum einen wird deutlich, daß PTH-Arginin (R) mit Abstand am empfindlichsten detektiert wird, in Übereinstimmung mit der hohen Basizität der Guanidinogruppe sowohl in Lösung als auch in der Gasphase. Auch das Signal von PTH-Lysin (K) ist intensiver als die meisten anderen Peaks. Dies kann jedoch nicht mit der Basizität der Verbindung zusammenhängen, da Lysin bei der Edman-Reaktion auch an der Seitenkette derivatisiert wird und daher keine freie Aminogruppe mehr hat. Auch das Amid Glutamin (Q) zeigt eine vergleichsweise hohe Signalintensität, während Asparagin (N) weniger empfindlich detektiert wird.

Somit scheint die Masse bzw. die Größe der PTH-AS bei der Ionisation eine Rolle zu spielen. Der massenabhängige Anstieg der Signalintensität findet sich auch bei anderen Homologen wie z.B. bei Alanin (A) und Valin (V) oder bei Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E). Als weitere Tendenz werden PTH-AS mit aromatischen Seitenketten relativ empfindlich detektiert, und hier besonders Tryptophan (W), das zudem eine relativ hohe Gasphasenbasizität aufweist (GB = 915 kJ/mol). PTH-Histidin (H) als weitere Gasphasenbase wird leider von einem Matrixsignal überdeckt, und mit anderen Matrices als 2,5-DHB können die meisten PTH-AS nicht detektiert werden. PTH-AS mit Alkyl-Seitenketten zeigen eine durchschnittliche Signalintensität, während PTH-AS mit sauren Seitenketten oder Hydroxygruppen nur sehr schwache Signale zeigen.

Diese Aufzählung macht deutlich, daß für eine empfindliche Analyse mit MALDI im positiven Ionenmodus nicht alleine die Basizität der Verbindung ausschlaggebend ist, sondern eine Reihe anderer Parameter wie Polarität, Aromatizität oder Molekülmasse bzw. -größe eine Rolle spielen. Es ist allerdings bisher nicht klar, inwieweit diese Eigenschaften sich direkt auf die Ionisation oder eher auf den Analyteinbau auswirken.

Dennoch führt die Einführung einer basischen Gruppe meist zu einer empfindlicheren Detektion mit MALDI. Dies ist in Abb. D.2.1.4 am Beispiel von acht modifizierten 311-PTH-AS gezeigt. Das hier verwendete Edman-Reagenz hat eine Pyridin- und eine Amidfunktion in der verlängerten Seitenkette (Struktur s. Abb. D.2.1.5).<sup>27</sup>

Die Pyridingruppe ist sowohl in Lösung als auch in der Gasphase basisch ( $pK_A = 5.19$  [Mer89], GB = 898 kJ/mol<sup>28</sup>). Dies führt dazu, daß alle 311-PTH-AS mit nahezu gleicher Intensität detektiert werden.<sup>29</sup> Besonders die PTH-AS von Alanin (A) und Threonin (T) ergeben -im Gegensatz zu den sehr schwachen Signalen der unmodifizierten PTH-AS- als 311-PTH-AS deutlich höhere MALDI-Signale. Einzig das Signal von 311-PTH-Arginin (R) ist etwas höher und das Signal von 311-PTH-Asparaginsäure (D) ist etwas niedriger als im Durchschnitt.<sup>30</sup> Zudem ist die Empfindlichkeit für alle Verbindungen mit Ausnahme von PTH-Arginin (R) um mindestens eine Größenordnung höher als bei Verwendung des unmodifizierten Edman Reagenzes. Dabei spielt

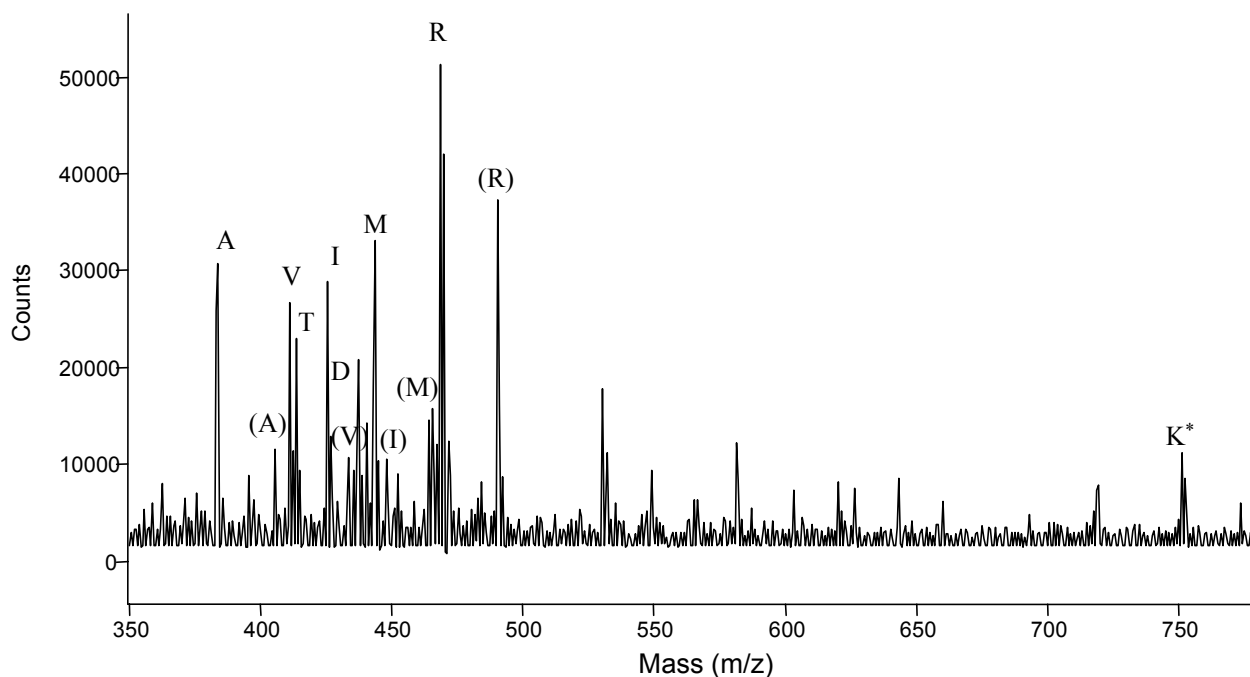
<sup>27</sup> Diese Modifikation wurde von Aebersold und Mitarbeitern für eine empfindlicher Detektion der Edman-Abbauprodukte mit ESI- bzw. LC-MS entwickelt [Bur95,Hes95].

<sup>28</sup> Quelle: <http://webbok.nist.gov>

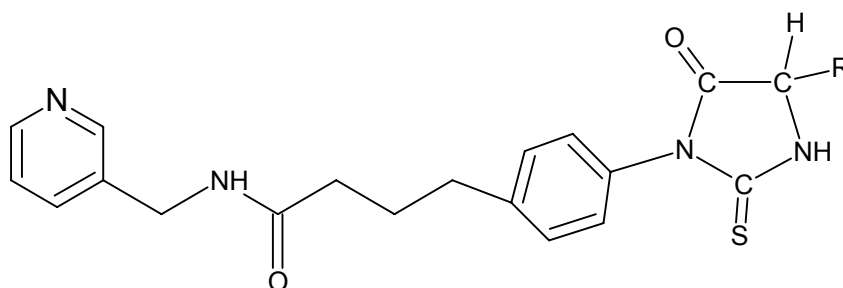
<sup>29</sup> Da die 311-PTH-AS in einer manuellen Edman-Reaktion hergestellt wurden, sind auch die korrespondierenden Phenylthiocarbamoyl-AS (311-PTC-AS, in Abb. C.2.1.4 in Klammern) vorhanden. Diese entstehen bei der Edmanreaktion vor dem Ringschluß zu den PTH-AS durch Kondensation und haben daher eine um 18 Da höhere Masse.

<sup>30</sup> Die geringere Intensität von 311-PTH-Lysin (K) ist auf eine unvollständige Derivatisierung zurückzuführen (geringer Reagenzüberschuß), da auch das Signal des einfach derivatisierten Lysin im Spektrum erscheint.

neben der Erhöhung der Basizität sicherlich auch die Erhöhung der Molekülmasse der PTH-AS eine Rolle.



**Abbildung D.2.1.4** : MALDI-Spektrum eines Standards von acht modifizierten 311-Phenylhydantoin-(311-PTH)-Aminosäuren (Matrix 2,5-DHB),  $c = 5 \cdot 10^{-7}$  mol/L (500 fmol absolut).  $K^*$  wird bei der Edman-Reaktion doppelt derivatisiert. Die Buchstaben in Klammern bezeichnen die durch eine Addition von Wasser entstehenden Phenylthiocarbamoyl-Aminosäuren (PTC-AS).



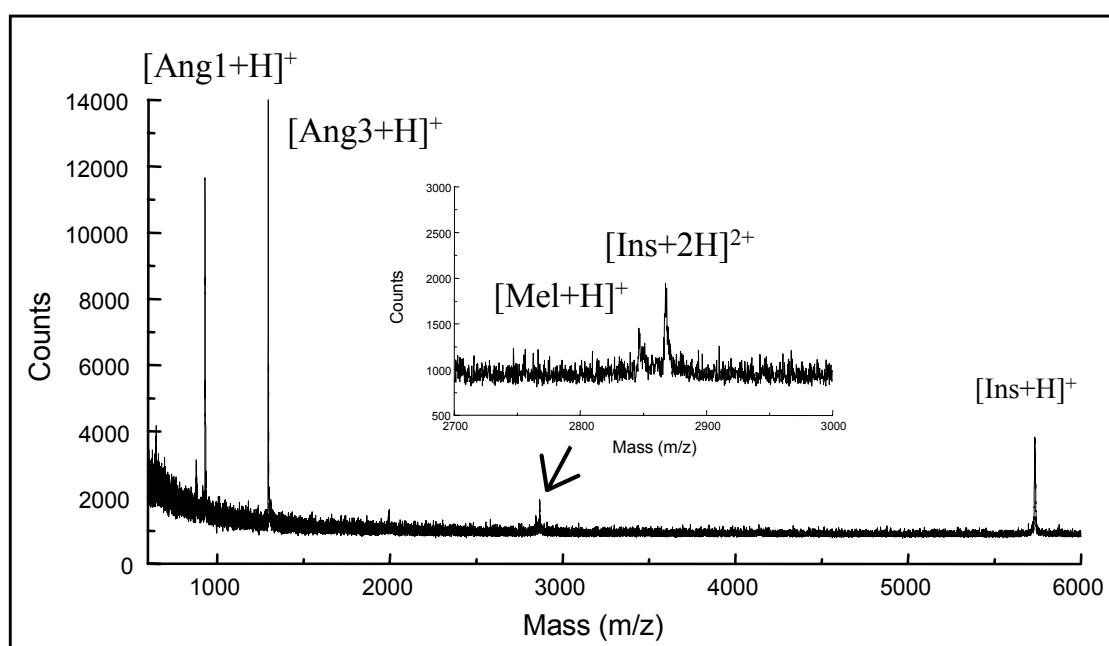
**Abbildung D.2.1.5** : Strukturformel von 4-(3-Pyridinylmethylaminocarboxypropyl)-Phenylhydantoin-Aminosäuren (311-PTH-AS), die mit einem modifizierten Edman-Reagenz erhalten werden. (R = Seitenkette der Aminosäure)



### D.2.2. Einfluß der Anzahl basischer Gruppen im Analyten

Zusätzlich zur Basizität einzelner funktioneller Gruppen spielt auch die Zahl der basischen oder sauren Gruppen im Analytmolekül bei der MALDI-Analyse eine Rolle. Eine höhere Anzahl basischer Gruppen sollte die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von  $[M+H]^+$ -Ionen erhöhen. Gleichzeitig könnte auch die Tendenz zur Bildung mehrfach geladener Ionen zunehmen. Dies ist z.B. bei dem Protein Ubiquitin der Fall, das 13 basische Stellen (davon vier Arginine und sieben Lysine) im Molekül besitzt und eine besonders hohe Intensität des zweifach protonierten Molekülions im MALDI-Spektrum aufweist. In erster Linie werden aber mit MALDI einfach geladene Ionen detektiert, und nur bei höherer Molekülmasse und -größe werden zunehmend mehrfach geladene Analytionen gebildet.

Eine hohe Zahl von basischen Gruppen korreliert zudem nicht unbedingt mit einer empfindlicheren Detektion dieser Analyte mit MALDI. Ein Beispiel dieser Art ist in Abb. D.2.2.1 gezeigt, in der ein MALDI-Spektrum einer äquimolaren Mischung von vier Peptiden zu sehen ist.



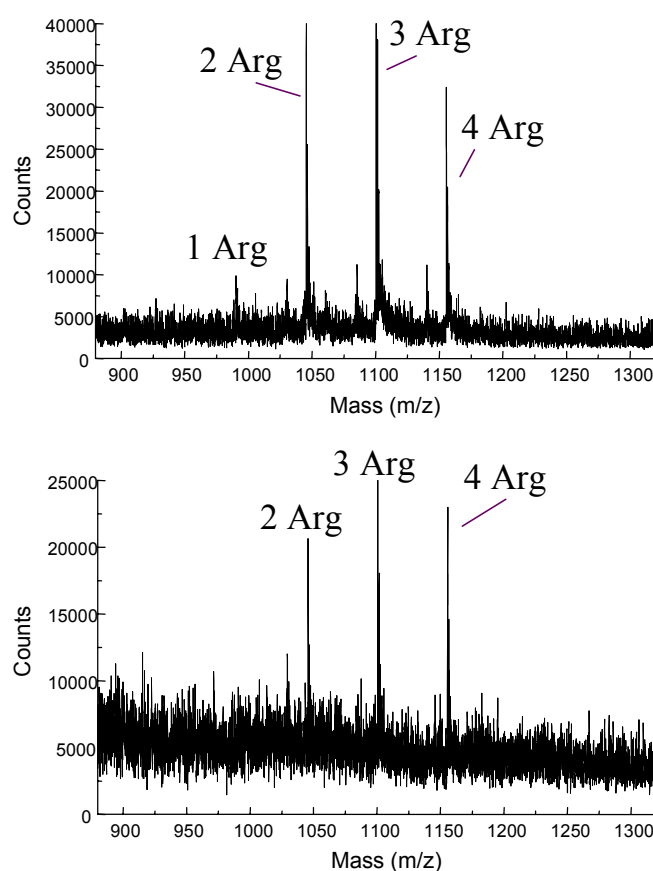
**Abbildung D.2.2.1** : MALDI-Spektrum einer äquimolaren ( $c = 10^{-7}$  mol/L) Mischung von vier Peptiden: Angiotensin I ( $m/z = 1296.68$ ), Angiotensin III ( $m/z = 931.51$ ), Melittin ( $m/z = 2845.76$ ) und Rinderinsulin ( $m/z = 5730.6$ ). (Matrix 2,5-DHB)

Die beiden Peptide Angiotensin I und Angiotensin III zeigen die höchste Signalintensität, während Insulin mit einer etwas geringeren Intensität detektiert wird. Diese massenabhängige Abnahme der Sensitivität wird bei MALDI allgemein bei homologen Verbindungen beobachtet und hängt nicht nur mit dem MALDI-Prozeß selbst, sondern auch mit der zunehmend ineffektiveren Detektion von Ionen höherer Masse zusammen, da mit höherem Verhältnis  $m/z$  die Geschwindigkeit der Ionen im TOF-MS sinkt.

Eine wesentlich geringere Empfindlichkeit weist jedoch das Peptid Melittin auf, das sogar mit geringerer Signalintensität detektiert wird als das zweifach geladene Insulinion, obwohl die Molekülmasse nur etwa die Hälfte von Insulin beträgt. Melittin hat jedoch trotz geringerer Molekülgröße genau wie Insulin sechs basische Gruppen (und zudem keine einzige saure Gruppe) im Molekül. Die Ladungsdichte des mehrfach protonierten Melittin ist demnach wesentlich höher als bei Insulin, was sich in einer geringeren Empfindlichkeit niederschlägt. Fünf der sechs

protonierten Stellen von Melittin sind zudem stark basische Lysin- oder Argininreste, während Insulin nur jeweils ein Arginin und ein Lysin hat. Auch die Angiotensin-Peptide haben zwar drei bzw. vier basische Gruppen, aber jeweils nur ein Arginin in der Sequenz. Das Beispiel belegt, daß eine hohe Zahl stark basischer Stellen im Analytmolekül zu einer geringeren Empfindlichkeit bei der MALDI-Detektion im positiven Ionenmodus führen kann. Dabei scheint auch der Abstand der (in saurer Lösung) positiven Ladungen bzw. die Molekülgröße eine Rolle zu spielen.

Um den Einfluß der Zahl basischer Funktionen im Analytmolekül näher zu untersuchen, wurde eine homologe Reihe von vier Peptiden als Testsubstanzen ausgewählt.<sup>31</sup> Diese Peptide besitzen die Aminosäuresequenz AXG AXG AXG AXG, wobei X entweder Threonin oder Arginin ist. Die Peptide haben daher neben dem N-Terminus nur Arginine als mögliche Protonierungsstellen im Molekül. Es standen vier Peptide zur Verfügung, die zwischen ein und vier Arginine haben. Abgesehen von der unterschiedlichen Anzahl basischer Stellen haben aber alle Peptide eine ähnliche Sequenz, Masse und Polarität.



**Abbildung D.2.2.2** : MALDI-Spektren einer äquimolaren Mischung von vier Peptiden der Sequenz AXG AXG AXG AXG; X steht dabei jeweils entweder für Threonin oder Arginin, die Zahl der Arginine im Peptid ist an jedem Peak angegeben. Oben:  $c = 10^{-7}$  mol/L, unten:  $c = 10^{-8}$  mol/L (Matrix 2,5-DHB).

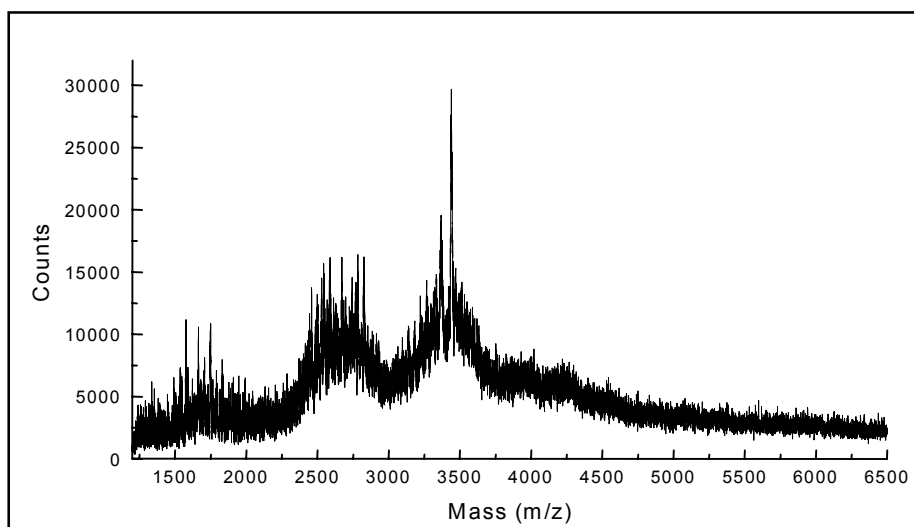
In Abb. D.2.2.2 sind MALDI-Spektren einer äquimolaren Mischung dieser vier Peptide gezeigt. Die Konzentrationen liegen mit  $c = 10^{-7}$  mol/L und  $c = 10^{-8}$  mol/L an der Nachweisgrenze<sup>32</sup> für eine Standardpräparation ohne Aufreinigung oder Aufkonzentrierung. Während für das Peptid mit nur einem Arginin die Nachweisgrenze bei  $c = 10^{-7}$  mol/L bereits erreicht ist (Verhältnis

<sup>31</sup> Die Peptide wurden von der Firma WITA GmbH (Teltow) synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt.

<sup>32</sup> Für das verwendete Voyager-DE Pro, da die Nachweisgrenze auch von instrumentellen Parametern, wie z.B. der Iontenmission, abhängig ist.

Signal/Rauschen (S/N) nur noch 2:1), sind die Peptide mit mehreren Argininen noch gut zu erkennen und werden auch bei  $c = 10^{-8}$  mol/L noch mit mindestens  $S/N = 3:1$  detektiert. Ein zweiter Argininrest führt demnach zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität bei MALDI. Bei einer höheren Anzahl Arginine im Molekül ist jedoch keine weitere Steigerung der Empfindlichkeit zu erkennen. Es scheint sogar so zu sein, daß das Peptid mit vier Argininen in der Sequenz wieder eine geringere Signalintensität hat und daß die optimale Empfindlichkeit bereits bei zwei bis drei Argininen im Molekül erreicht ist. Es sei hier angemerkt, daß diese Intensitätsverteilung so nur bei sehr niedrigen Konzentrationen gefunden wird, und sich auch je nach Matrix etwas unterscheidet. Immer wird aber mit zunehmender Anzahl der Arginine im Molekül eine geringere Steigerung oder sogar ein Absinken der Peakintensität beobachtet.

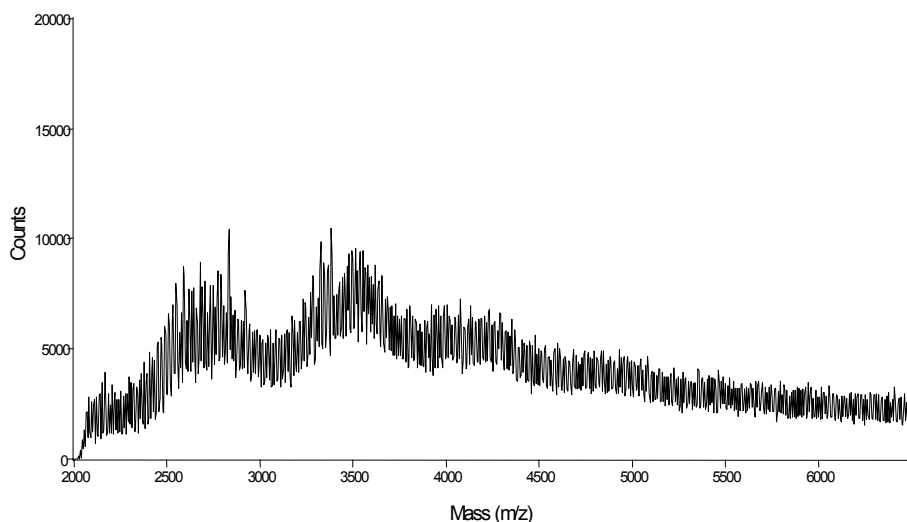
Ein besonders extremes Beispiel basischer Proteine ist die Substanzklasse der Protamine. Diese enthalten ca. 50 % basische Aminosäuren, bevorzugt Arginin. Ein Protamin mit einer Masse von etwa 4000 Da hat demnach in saurer Lösung ca. 20 positive Ladungen. Abb. D.2.2.3 zeigt ein MALDI-Massenspektrum eines handelsüblichen<sup>33</sup> Protamins unbekannter Sequenz im positiven Ionenmodus. Im MALDI-Spektrum sind nur breite, nicht aufgelöste Signale zu finden, und dies auch erst bei sehr hohen Laserintensitäten. Die hohe Zahl der Basen und damit der Ladungen führt augenscheinlich zu Problemen bei der Desorption/Ionisation mit MALDI, so daß die Signale der Protamine (vermutlich eine heterogene Mischung) nicht aufgelöst werden können. Eine geringe Löslichkeit scheidet zudem als mögliche Ursache aus, da sich die Verbindungen sehr gut in Wasser lösen.



**Abbildung D.2.2.3** : MALDI-Spektrum eines Protamins im positiven Ionenmodus (Matrix 2,5-DHB).

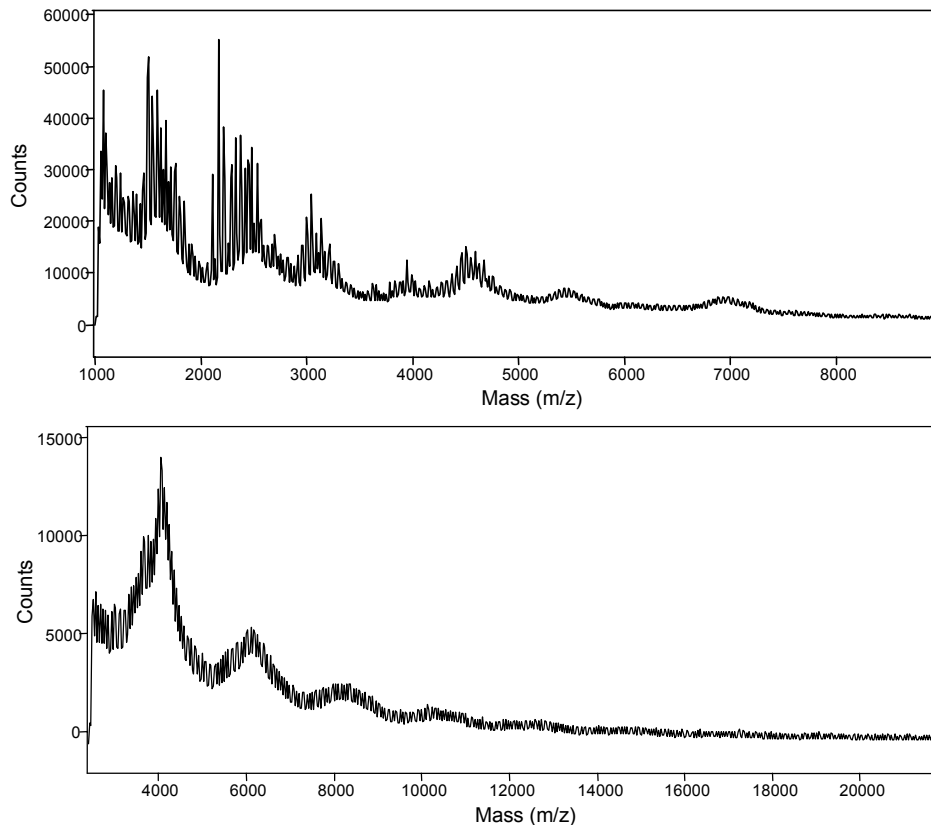
Besonders erstaunlich ist aber, daß nahezu dasselbe Spektrum auch im negativen Ionenmodus erhalten wird, obwohl Protamine in saurer Lösung vielfach positiv geladen sind und daher eine Detektion negativer Ionen nicht möglich sein sollte. Dennoch ist das in Abb. D.2.2.4 gezeigte Spektrum kaum von dem Spektrum in Abb. D.2.2.3 zu unterscheiden, es entstehen ganz ähnliche breite, nicht aufgelöste Signale. Aus den gezeigten Spektren ist aber nicht ersichtlich, ob es sich überhaupt um protonierte bzw. deprotonierte Moleküle handelt. Die breiten Peaks deuten eher auf viele Anlagerungen von Ionen oder Molekülen. Zudem könnte auch eine metastabile Fragmentierung für die breiten Signale verantwortlich sein.

<sup>33</sup> Sigma-Aldrich, Deisenhofen



**Abbildung D.2.2.4 :** MALDI-Spektrum eines Protamins im negativen Ionenmodus (Matrix 2,5-DHB).

Ein Ansatz zur Analyse hochbasischer oder –saurer Verbindungen ist ihre Komplexierung mit mehrfach geladenen Gegenionen (s. Kap. C.3.3) [Juh94]. Ein Versuch einer solchen nicht-kovalenten Komplexierung mit mehrfach negativ geladenen Gegenionen ist in Abb. D.2.2.5 gezeigt. Dazu wurden ein Oligonukleotid (Pentathymidin) und eine mehrfach sulfonierte Verbindung (Suramin) verwendet. Die resultierenden MALDI-Spektren zeigen zwar eine deutliche Verschiebung der Peakmaxima zu höheren  $m/z$ -Werten, trotzdem sind die Signale nach wie vor sehr breit und einzelne Komponenten können auch in komplexierter Form nicht aufgelöst werden.



**Abbildung D.2.2.5 :** MALDI-Spektren eines Protamins unter Zusatz von sauren Verbindungen zur Komplexierung. Oben: Zusatz von Pentathymidin ( $dT_5$ ); unten: Zusatz der mehrfach sulfonierten Verbindung Suramin (Matrix 2,5-DHB, positiver Ionenmodus).

### D.2.3. In-Source Decay (ISD) und Basizität: Indizien für Elektronentransfer ?

Wie im letzten Kapitel gezeigt, führt eine hohe Zahl basischer Gruppen im Analyten nicht unbedingt zu einer höheren Sensitivität oder zu einem höheren Ladungszustand. Die Gründe für das weitgehende Fehlen von mehrfach geladenen Ionen bei MALDI sind nach wie vor unklar. Eine Möglichkeit wäre jedoch eine Neutralisation von mehrfach geladenen Vorläuferionen durch Elektronen [Kar00]. Dieser Elektroneneinfang oder Elektronentransfer könnte auch für eine bestimmte Art der prompten Fragmentierung bei MALDI verantwortlich (*in-source decay*, ISD). In diesem Fall sollte aber eine höhere Zahl basischer Gruppen und die damit einhergehende höhere Ladung des Vorläuferions zu einer verstärkten Bildung von ISD-Fragmenten führen.

Bei Peptiden zeichnet sich die ISD-Fragmentierung durch die Bildung von c-Fragmenten und z-Fragmenten aus. In Abb. D.2.3.1 ist die von Roepstorff und Fohlmann [Roe84] eingeführte Standardnomenklatur der Benennung von Peptidfragmenten gezeigt. Bei ISD erfolgt bevorzugt ein Bruch der Bindung zwischen dem Amid-Stickstoff und dem  $\alpha$ -C-Atom der nächsten Aminosäure. Zusätzlich zu diesen c- und z-Fragmenten sind aber teilweise auch die bei PSD und CID üblichen Fragmente zu finden, insbesondere y-Fragmente und teilweise auch a-Fragmente.

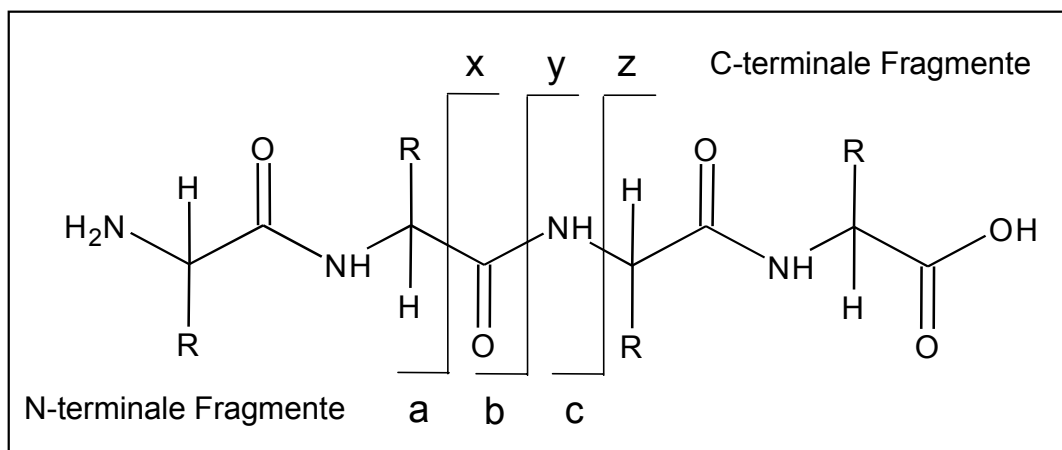
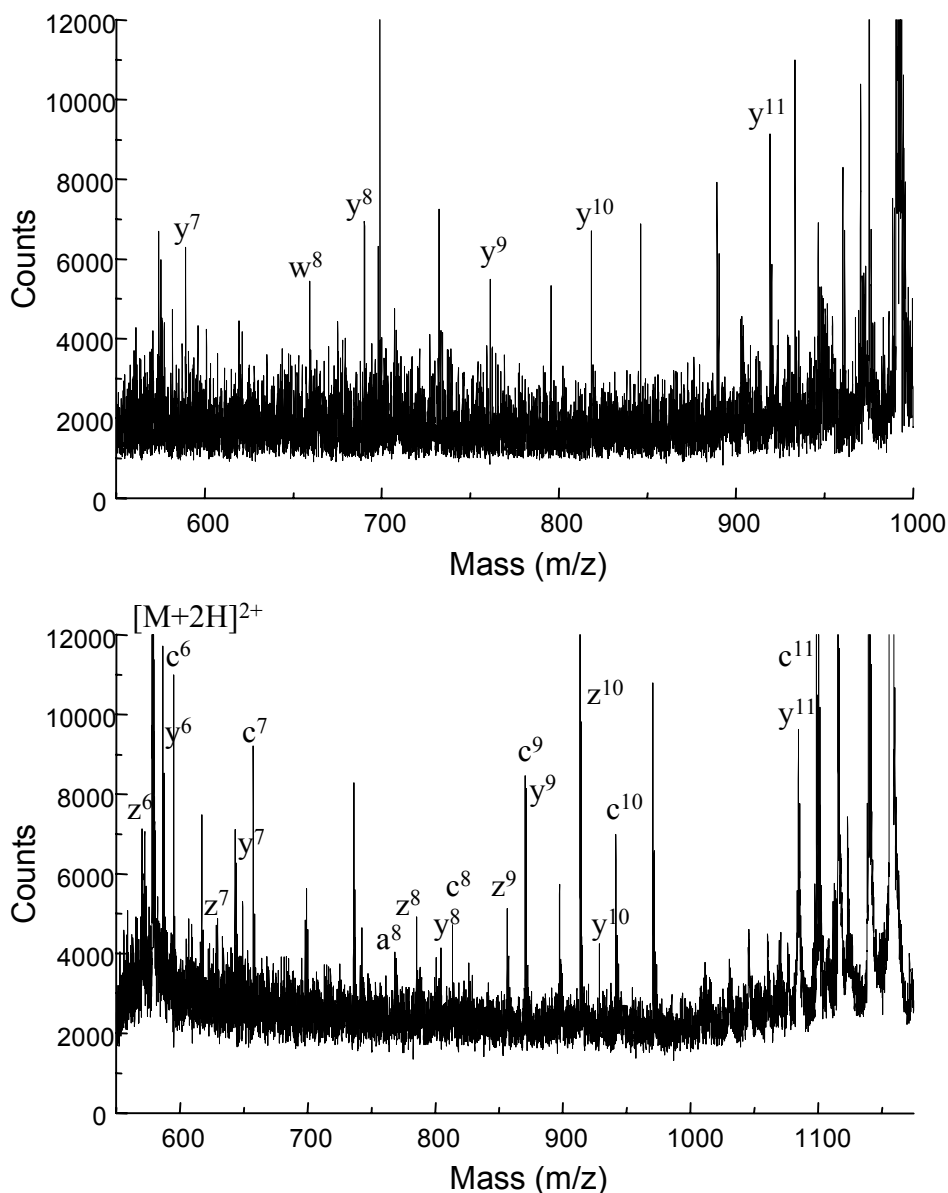


Abbildung D.2.3.1 : Standardnomenklatur für die Bezeichnung von Peptidfragmenten (nach [Roe84]).

Zur Untersuchung der Hypothese des Elektroneneinfangs bei MALDI wurden ISD-Spektren der im vorigen Kapitel vorgestellten argininhaltigen Peptide aufgenommen. Mit steigender Zahl der Arginine im Molekül sollte eine verstärkte ISD-Fragmentierung zu beobachten sein. Abb. D.2.3.2 zeigt die ISD-Spektren von zwei der vier Peptide. Während im oberen Spektrum (ein Arginin im Molekül) nur einige y-Fragmente identifiziert wurden, zeigt das ISD-Spektrum des Peptids mit vier Argininen das typische Fragmentierungsmuster bestehend aus c-, z- und y-Fragmenten. Diese deutlichen Unterschiede sind ein Indiz für einen Einfluß der Ladung des Vorläuferions auf die ISD-Fragmentierung und damit zugleich ein Indiz für einen Elektroneneinfang oder -transfer bei mehrfach geladenen Analyten.



**Abbildung D.2.3.2** : ISD-Spektren von zwei Peptide mit der Sequenz ATG ATG ATG ARG (oben) und ARG ARG ARG ARG (unten) (Matrix 2,5-DHB).

Allerdings wurden bislang keine weiteren Indizien oder gar Beweise für eine Beteiligung von Elektronen an der Ladungsreduktion von Biopolymeren gefunden. Auch eine Zugabe verschiedener Substanzen mit hohen Elektronenaffinitäten (z.B. polyfluorierte Verbindungen) führte weder zu einer Änderung des Ladungszustands noch zu einer meßbaren Änderung der Ionenintensitäten. Obwohl die Indizien bei der ISD-Fragmentierung deutlich für eine Ladungsreduktion durch Elektronen sprechen, gibt es also für Biopolymere nach wie vor keine direkten Beweise für diesen Mechanismus, auch wenn eine Elektronenreduktion bei anderen Verbindungen eindeutig nachgewiesen wurde.

#### D.2.4. Vergleich von MALDI-ISD und ESI-ECD

Die große Ähnlichkeit zwischen der ISD-Fragmentierung von MALDI-Ionen und der Fragmentierung von mehrfach geladenen Elektrospray-Ionen mittels *electron capture dissociation* (ECD) führte zu der Annahme, daß auch bei MALDI ein Elektroneneinfang involviert sein könnte [Kar00]. Im Folgenden werden einige Charakteristika der ISD-Fragmentierung bei Peptiden erläutert sowie ein Vergleich mit ECD vorgenommen, um Ähnlichkeiten und Unterschiede herauszuarbeiten. Vor diesem Hintergrund werden in der nachfolgenden Diskussion die Indizien für oder gegen eine Beteiligung von Elektronen bei MALDI-Reaktionen diskutiert.

Die offensichtlichste Ähnlichkeit der beiden Fragmentierungstechniken ist die Bildung von c- und z-Fragmenten (s. Nomenklatur der Peptidfragmentierung in Abb. D.2.3.1). Üblicherweise werden bei PSD und CID eher Peptidfragmente vom a-, b- und y-Typ gebildet, während c-, x- und z-Fragmente sonst nur bei hochenergetischen Kollisionen entstehen. Sowohl bei ISD als auch bei ECD sind die c-Fragmente die intensivsten Signale, und mit zunehmender Masse werden fast nur noch diese detektiert. Bei ISD findet man aber meist zusätzlich noch y-Fragmente und teilweise auch Fragmente des a- oder b-Typs.

Bei beiden Techniken entstehen zudem nur in sehr geringem Ausmaß Fragmente. Bei allen Aminosäuren besteht aber in etwa die gleiche Wahrscheinlichkeit eines Bindungsbruchs. Die einzige Ausnahme ist Prolin, bei dem aufgrund der zweiten Bindung zum Amidstickstoff weder c- noch z-Fragmente entstehen.

Trotz vieler Ähnlichkeiten bei der Fragmentierung gibt es auch einige Unterschiede, die bei näherer Betrachtung der Ionensignale noch deutlicher zu Tage treten. Während die bei ECD gebildeten z-Fragmente Radikale sind (und demnach ein H-Atom mehr tragen als in der Peptidkette), werden bei ISD größtenteils (z+2)-Fragmente mit einer geraden Elektronenzahl detektiert, die zwei H-Atome mehr aufweisen als in der Peptidkette. Auch bei ECD werden manchmal z"-Fragmente detektiert, dann tritt aber immer das Korrespondierende c-Fragment als Radikal auf. Auch die bei ECD selten gebildeten a-Fragmente sind Radikale. In Abb. D.2.4.1 sind jeweils die radikalischen und nichtradikalischen Strukturen der z- und a-Fragmente bei ECD und ISD gezeigt.

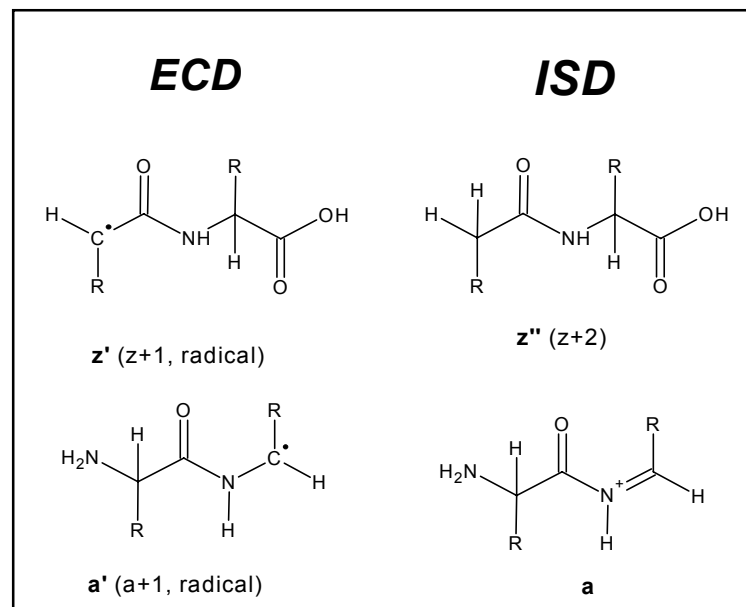
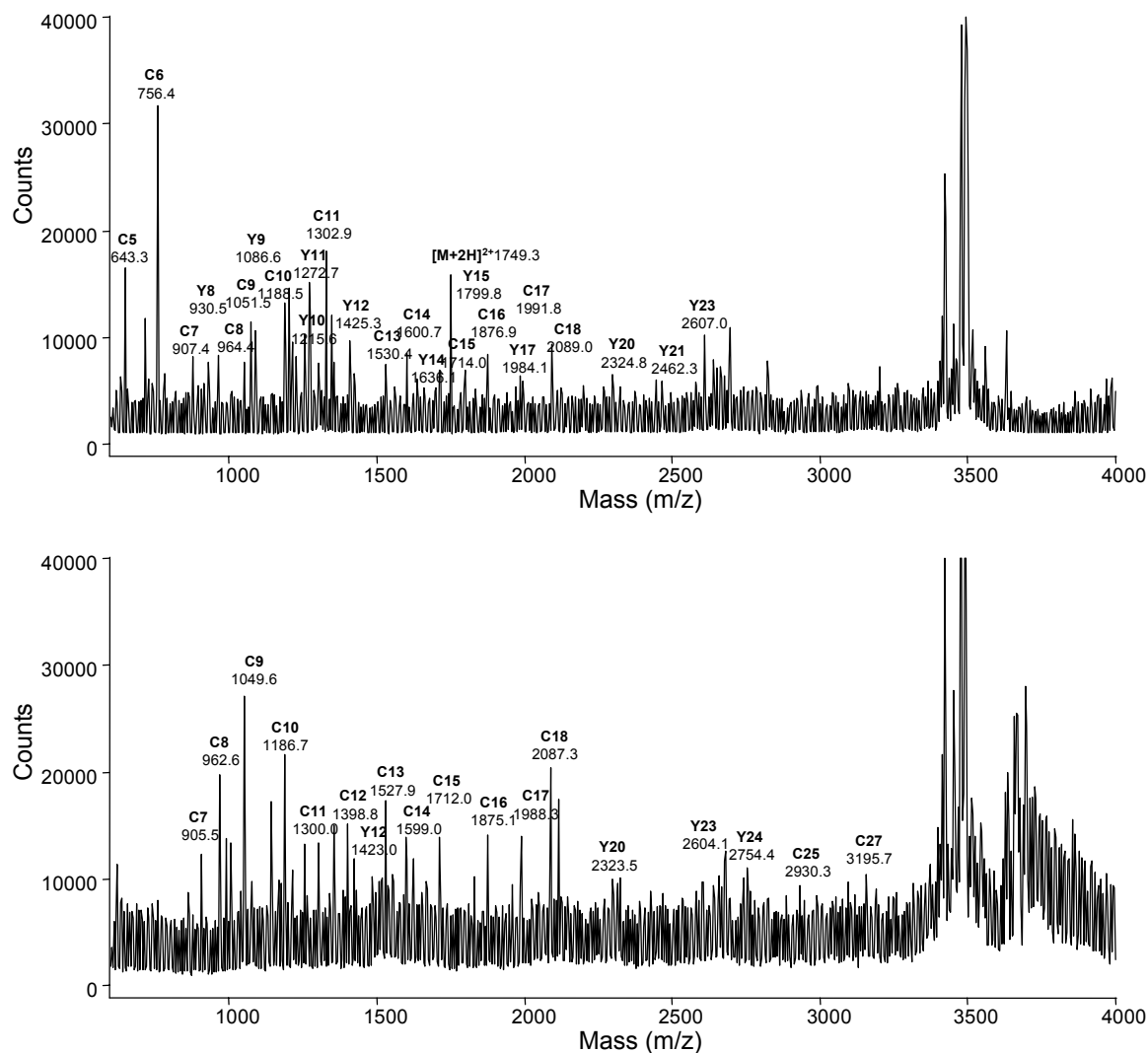


Abbildung D.2.4.1 : Radikalische und nichtradikalische Strukturen der a-Fragmente und z-Fragmente bei ECD und ISD.

Bis auf die bei ISD gebildeten a-Fragmente sind alle Strukturen nicht geladen, so daß an anderer Stelle eine Ladung existieren muß, damit die Fragmente im Massenspektrometer detektiert werden können. Während bei ECD die durch Elektronenreduktion entstandenen, radikalischen Molekülonen die intensivsten Peaks sind, werden bei MALDI keine radikalischen Molekülonen gefunden. Das fast vollständige Fehlen von radikalischen Analytionen bei MALDI ist demnach einer der größten Unterschiede zu ESI-ECD.

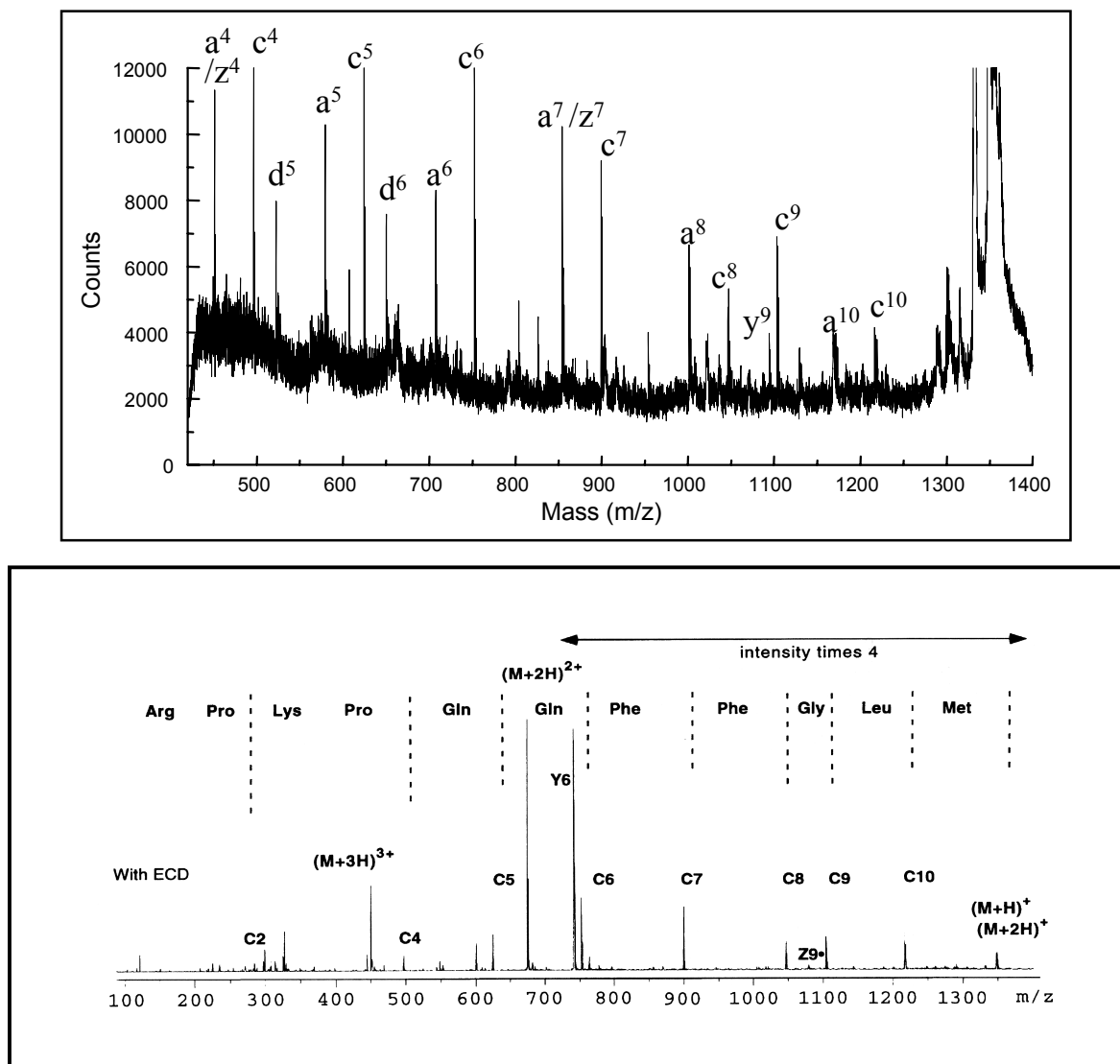
Eine weitere Ähnlichkeit betrifft die geringe Tendenz zur Abspaltung labiler Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen oder Glykolisierungen. Auch kleine Neutalmoleküle wie H<sub>2</sub>O oder NH<sub>3</sub> werden zwar vom intakten Molekülion, nicht jedoch von den Fragmenten abgespalten, wie es oft bei PSD oder CID der Fall ist. Dieser Umstand deutet darauf, daß beide Mechanismen vermutlich nicht durch Kollisionen verursacht werden. Während bei kollisionsinduzierten Fragmentationen meist eine protonierte Amidbindung beteiligt ist und daher direkt an der Stelle des Bindungsbruchs eine Ladung entsteht, scheint dies weder bei ECD noch bei ISD der Fall zu sein. So werden ISD-Fragmente sowohl im positiven wie auch im negativen Ionenmodus gebildet, und es entstehen in beiden Fällen die typischen c-, y- und z-Fragmente. Dies ist in Abb. D.2.4.2 am Beispiel der oxidierten B-Kette von Insulin gezeigt.



**Abbildung D.2.4.2 :** Vergleich von MALDI-TOF-MS-Spektren der oxidierten B-Kette von Rinderinsulin im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus (Matrix 2,5-DHB).



Trotz einiger Unterschiede bei den Intensitäten ist in beiden Spektren fast die gleiche Serie von c-Fragmenten und teilweise auch y-Fragmenten zu sehen. Diese Ähnlichkeit könnte dadurch verursacht sein, daß beim Bindungsbruch keine Ladung beteiligt ist und jeweils nur diejenigen Peptidfragmente in den Spektren detektiert werden, die an einer anderen Stelle eine Ladung tragen. Daß diese Erklärung richtig ist, zeigt sich auch an den in Abb. D.2.4.3 gezeigten ISD- und ECD-Spektren von Substanz P im positiven Ionenmodus. Diese Peptid hat nur am N-Terminus basische Gruppen, kann also auch nur dort protoniert werden (abgesehen von einer Protonierung einer Amidbindung). Dieser Ladungsanker bewirkt, daß sowohl im ISD- als auch im ECD-Spektrum fast nur N-terminale Fragmente zu sehen sind. Augenscheinlich werden die C-terminalen Fragmente entweder nicht gebildet oder sie werden mangels Ladung nicht detektiert. Allerdings ist bei einem Vergleich der Spektren auch ein offensichtlicher Unterschied zu erkennen. Während bei ISD a-Fragmente mit hohen Intensitäten detektiert werden, treten diese bei ECD gar nicht auf.



**Abbildung D.2.4.3** : Vergleich von ISD- und ECD-Spektren des Peptids Substanz P. Oben: MALDI-TOF-ISD (Matrix 2,5-DHB), unten: ESI-FTICR-ECD (reproduziert aus [Axe99]).

Sind in einem Peptid oder Protein Disulfidbrücken vorhanden, werden diese bei ECD bevorzugt gespalten. Dabei entstehen sowohl freie SH-Gruppen als auch Schwefel-Radikale. Die Spaltung der Disulfidbrücken wird auch bei ISD beobachtet (s. Abb. D.2.4.4). Mit weit geringerer

Intensität wird zusätzlich die typische Spaltung der Aminosäureketten in c- und z-Fragmente beobachtet. Diese stoppt jedoch an den Disulfidbrücken, und im gezeigten Beispiel (Insulin) wird die "interne" Aminosäurekette zwischen den beiden Disulfidbrücken nicht mehr gespalten.

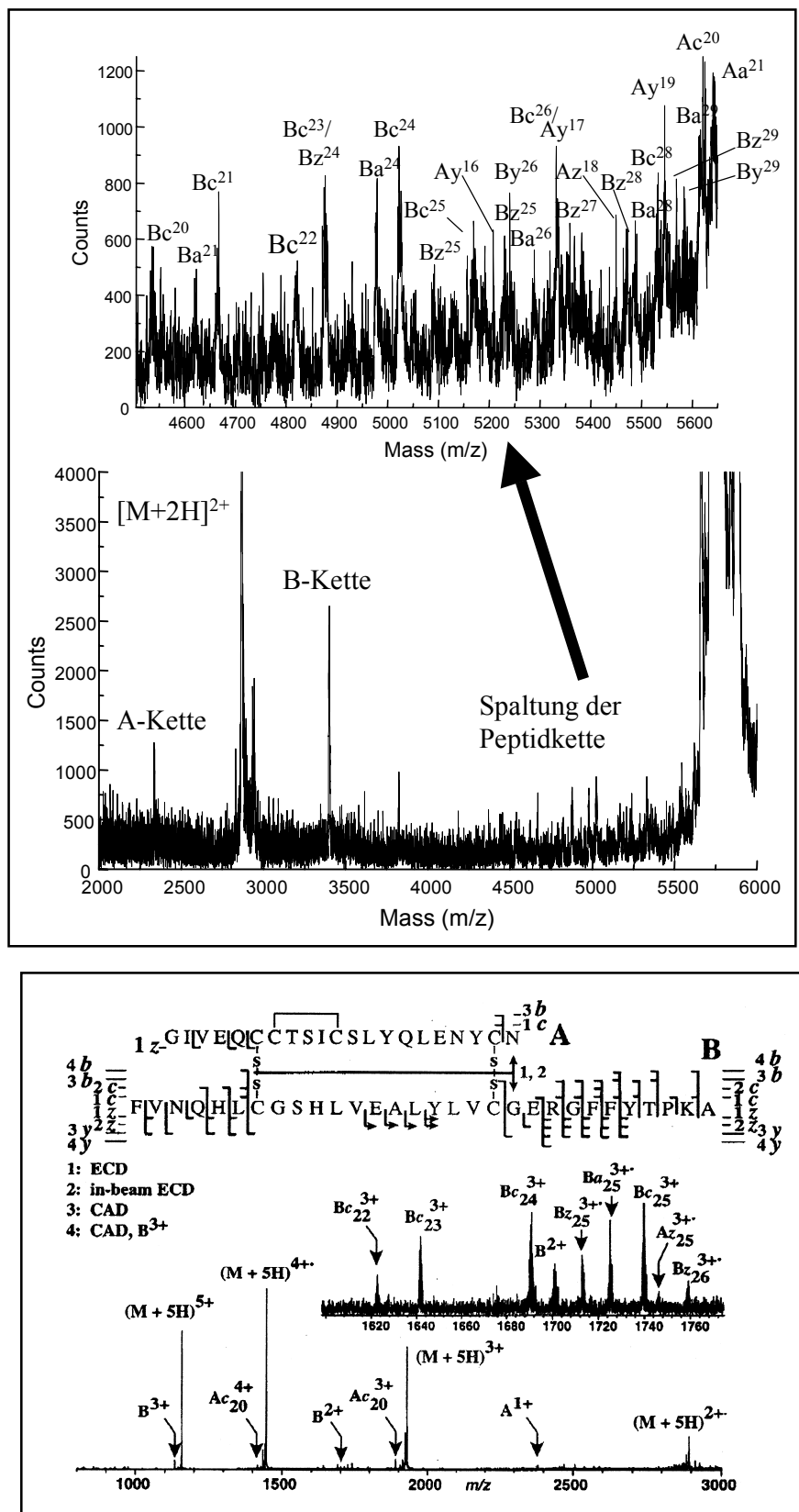


Abbildung D.2.4.4 : Vergleich von ISD- und ECD-Spektren von Rinderinsulin. Oben: MALDI-TOF-ISD (Matrix 2,5-DHB), unten: ESI-FTICR-ECD (reproduziert aus [Zub99]).

### D.2.5. Diskussion: Einfluß basischer Gruppen im Analyten auf Ionisation, Ladungszustand und ISD-Fragmentierungen

Anhand der gezeigten Beispiele wird klar, daß neben der Säure-Base-Chemie eine Reihe von Faktoren die Ionisation bei MALDI beeinflussen, die aber nur zum Teil eindeutig zuzuordnen sind (s. auch Kap. C.1.2). Dazu gehören die Polarität und die Löslichkeit der Verbindungen, aber auch ein aromatischer oder nichtaromatischer Charakter des Analyten scheint einen Einfluß zu haben. Darüber hinaus gibt es einen deutlichen Einfluß der Molekülmasse bzw. -größe, der vor allem bei sehr kleinen Analyten wie den PTH-AS sichtbar wird. Bei sehr viel größeren Analyten (>10 kDa) wird dieser Effekt zunehmend von einer weniger sensitiven Detektion der Ionen überkompensiert. Diese Vielzahl von unterschiedlichen Beobachtungen läßt sich am einfachsten damit erklären, daß fast alle genannten Faktoren die Kristallisation und damit den Analyteinbau beeinflussen. Dabei dürften hauptsächlich zwei Effekte eine Rolle spielen. Zum einen könnte eine zu geringe Löslichkeit zum Ausschluß von Analyten aus dem Matrixkristall führen. Viel häufiger dürften sich die genannten Faktoren aber darauf auswirken, in welcher Form der Analyt eingebaut wird. Diese Unterschiede können z.B. die Solvatation, die Art und Zahl der Gegenionen sowie die Abstände von Ionen im Kristall und den Grad der Separation einzelner Analytmoleküle betreffen. Dies macht deutlich, daß die Bedingungen bei der Kristallisation ein ganz entscheidendes Kriterium für eine erfolgreiche MALDI-Analyse sind. Diesem Umstand wird in der Praxis insofern bereits Rechnung getragen, als für verschiedene Analytklassen eine Reihe von dezidierten Protokollen entwickelt worden sind, die alle auf eine optimierte Probenpräparation und damit auf eine optimierte Kristallisation unter Einschluß der Analyte in der jeweils für die MALDI-Analyse günstigsten Form hinauslaufen.

Die vorgestellten Beispiele zeigen zudem deutlich, daß die Gasphasenbasizitäten der Analyten einen erheblichen Einfluß auf deren Ionenintensität haben. Dieser Umstand deutet zunächst auf eine Beteiligung von Gasphasenreaktionen bei der Ionisation. Die Experimente im ersten Kapitel zeigen aber, daß auch die Basizität in Lösung und damit der Ladungszustand des Analyten zum Zeitpunkt des Einbaus in den Wirtskristall eine entscheidende Rolle spielt. Einen plausiblen Erklärungsansatz für diese widersprüchlichen Effekte liefert die Theorie der Clusterbildung. Dies wird im Folgenden am Beispiel der Bildung eines positiven Analytions kurz erläutert:

Eine Protonierung bereits in Lösung und damit eine Bildung präformierter Ionen begünstigt in jedem Fall die Ionisation, da die positive Ladung bereits vorhanden ist und nur noch eine Ladungstrennung oder eine Neutralisation eines Gegenions notwendig ist. Dieses Kriterium ist aber für die meisten Analyte erfüllt, da sehr viele Analyte in saurer Lösung bereits protoniert sind. Daher kommt es im Wesentlichen auf die nachfolgenden Reaktionen im Cluster an, an welcher Stelle die Ladung verbleibt. Dabei finden im Cluster in erster Linie Neutralisationen und damit im Falle basischer Analyte Deprotonierungen des Analyten statt.<sup>34</sup> Zugleich sinkt durch die Verdampfung von neutralen Matrix- und Lösungsmittelmolekülen die Clustergröße, so daß ein kontinuierlicher Übergang von einer kondensierten Phase in die Gasphase stattfindet. Je später in diesem Prozeß ein Protonentransfer erfolgt, desto mehr sind aufgrund der fehlenden Solvatation die Gasphaseneigenschaften der beteiligten Moleküle von Bedeutung. Deswegen sind letzten Endes die Gasphasenbasizitäten und -aciditäten der beteiligten Verbindungen entscheidend und bestimmen, welches Ion gebildet wird. Dieser gemischte Einfluß von Säure-Base-Reaktionen in Lösung und (nahezu) in der Gasphase mag eine Erklärung dafür sein, daß in der Literatur eine große Uneinigkeit besteht, ob letztendlich die Basizität (bzw. Acidität) einer Verbindung in Lösung oder in der

---

<sup>34</sup> Saure Analyte, die negativ geladen (deprotoniert) vorliegen, werden aber ebenfalls durch Protonentransfer neutralisiert.

Gasphase entscheidend für die Ionenbildung bei MALDI ist [Olu95, Zhu95, Coh96, Dog96, Gim97, Ama97].

Im Prinzip können auch Moleküle, die neutral im Matrixkristall vorliegen, im Cluster protoniert werden. Dazu muß der Analyt aber trotz einer niedrigen Basizität in Lösung eine ausreichend hohe Gasphasenbasizität aufweisen. Dies trifft nur auf sehr wenige Substanzklassen zu. Die meisten Analyte, die in Lösung keine Ladung tragen, sind auch in der Gasphase nicht basisch genug, um protoniert zu werden, so daß sie nur durch Kationisierung oder ggf. als negative Ionen detektiert werden können.

Diese Überlegungen bieten aber keine Erklärung für die mit der Zahl basischer Gruppen zunehmenden Schwierigkeiten bei der MALDI-Analyse von stark basischen Verbindungen. Diese Analyte liegen vielfach positiv geladen im Matrixkristall vor, sofern sie nicht aufgrund der hohen Ladung beim Einbau teilweise neutralisiert werden. Sowohl die Intensität als auch die Auflösung der MALDI-Signale sinken ab einer gewissen Ladungsdichte im Analyten signifikant. Sind die basischen Stellen jedoch relativ weit voneinander entfernt, z.B. bei sehr großen Proteinen, beeinträchtigt dies die MALDI-Analyse kaum.

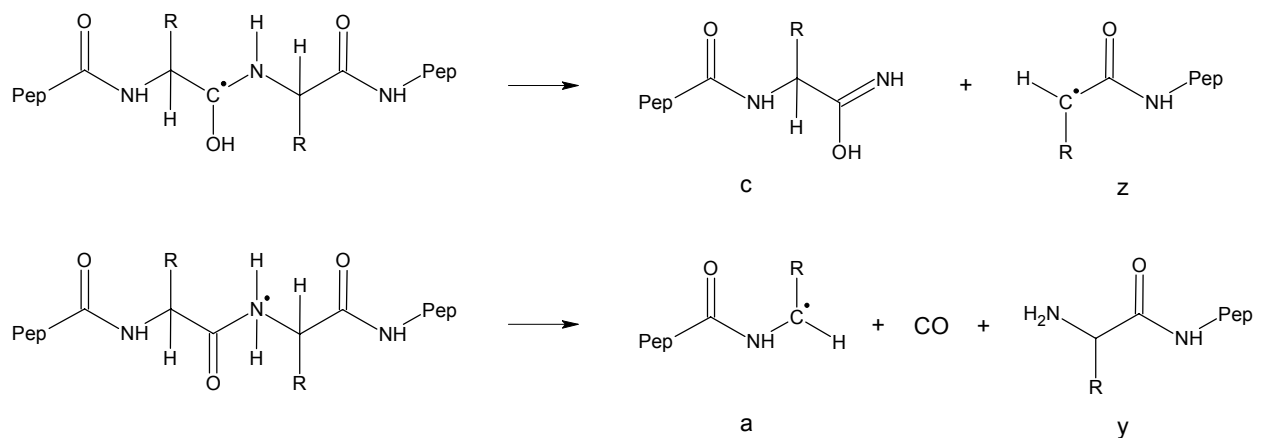
Prinzipiell gibt es dafür zwei Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnten bereits bei der Ionisation weniger Ionen entstehen, zum anderen kann aber auch die Zahl der bereits gebildeten Ionen durch weitere Reaktionen verringert werden. Bei der erstgenannten Möglichkeit spielt besonders der Ionisationsmechanismus eine Rolle. Die Verknüpfung von Ionisation und Clusterbildung bietet auch hier plausible Erklärungsansätze. Geladene Cluster können entweder durch eine Photoionisation oder durch Ladungstrennung entstehen. Bei einer Ladungstrennung ist aber der Abstand der gegensätzlich geladenen Ionen von erheblicher Bedeutung für die Wahrscheinlichkeit einer Ladungstrennung. Eine besonders hohe Nettoladung des Analytions könnte dafür sorgen, daß alle negativ geladenen Gegenionen wesentlich näher an den positiven Ladungen des Analyten koordiniert und daher fester gebunden sind. Dies würde zu einer geringeren Ionisationseffizienz führen.

Die zweite Möglichkeit für eine geringe Ionenzahl von stark basischen Verbindungen wären nachfolgende Reaktionen, insbesondere Fragmentierungen und Neutralisationen. Neutralisationsreaktionen würden zugleich eine Erklärung für das fast vollständige Fehlen von mehrfach geladenen Ionen bei MALDI bieten. Im Rahmen des Cluster-Modells wurde eine Neutralisation von mehrfach geladenen Analytionen durch Elektroneneinfang vorgeschlagen [Kar00]. Für einige Testmoleküle wurde ein Elektroneneinfang (bzw. Elektronentransfer) eindeutig belegt, und auch die Existenz von Elektronen in der MALDI-*plume* wurde einwandfrei bewiesen [Qui94, Sch99, Fra02, Gor02]. (s. Kap. C.3.2.3). Der Elektroneneinfang und nachfolgende Reaktionen könnten gleichzeitig zu Fragmentierungen führen. In der Tat zeigte sich, daß ein Peptid mit einer hohen Zahl Arginine (und damit positiver Ladungen in saurer Umgebung) wesentlich intensivere ISD-Fragmente bildet als ein Peptid mit nur einem Arginin im Molekül. Weitere Indizien für eine Beteiligung von Elektronen auch bei Biopolymeren wurden aber bisher nicht gefunden.

Wie in Kap. D.2.4 ausgeführt wurde, haben prompte Fragmentierungen bei MALDI (ISD) eine große Ähnlichkeit mit ECD-Fragmentierungen bei ESI, weisen jedoch auch einige deutliche Unterschiede auf. Für eine Erklärung der Bildung von ISD-Fragmenten und eine Abschätzung einer möglichen Beteiligung von Elektronen ist ein Blick auf den Reaktionsmechanismus hilfreich, der für ECD vorgeschlagen wurde.

Die primäre Reaktion bei ESI-ECD ist der Einfang von Elektronen durch mehrfach positiv geladene Analytionen. Dabei steigt die Effizienz des Elektroneneinfangs quadratisch mit der Ladung an [Zub98]. Zudem müssen langsame, thermische Elektronen ( $< 2$  eV) vorhanden sein, da nur diese von positiven Ionen eingefangen werden können [Zub98]. Sollte auch bei MALDI-ISD ein

Elektroneneinfang erfolgen, müssen also nicht nur mehrfach geladene Vorläuferionen, sondern auch langsame Elektronen in der *plume* vorhanden sein. Zubarev et al. fanden allerdings, daß die Effizienz der ECD-Fragmentierung überhaupt nicht mit den Elektronenaffinitäten der beteiligten Gruppen korreliert [Zub00]. Durch das überschüssige Elektron entsteht eine hypervalente Verbindung, die besonders leicht H-Radikale abspaltet. Deshalb schlugen sie vor, daß zunächst ein durch Elektroneneinfang gebildetes Molekül eine H-Atom verliert, welches sich dann an einer Stelle hoher H-Affinität anlagert. Dieser Einfang eines H-Radikals führt dann in der Folge zur Fragmentierung. Eine Stelle besonders hoher H-Affinität ist die Peptidbindung, wobei sich das H-Radikal entweder an das Sauerstoff- oder an das Stickstoffatom anlagern kann. Die Peptidbindung wird durch die Anlagerung geschwächt und zerfällt dann in der in Abb. D.2.5.1 angegebenen Weise. Auch Schwefel besitzt eine hohe Affinität zu H-Atomen, weswegen es zur bevorzugten Spaltung von Disulfidbrücken kommt.



**Abbildung D.2.5.1 :** Hypothetischer Mechanismus der ECD-Fragmentierung von Peptiden und Proteinen (reproduziert aus [Zub00]).

Bei dem vorgeschlagenen Mechanismus ist am Bindungsbruch keine Ladung direkt beteiligt. Auch die Fragmente sind also nur geladen, wenn an einer anderen Stelle im Fragment eine Ladung vorhanden ist. Dies erklärt, warum nur Fragmente mit basischen Gruppen im positiven Spektrum auftauchen. Dies ist bei ISD ganz genauso, wie am Beispiel des Peptids Substanz P gut zu erkennen ist (s. Abb. D.2.4.3). Da nur am N-Terminus basische Aminosäuren vorhanden sind, werden auch fast nur N-terminale Fragmente detektiert. Allerdings erklärt dies nicht, warum nur bei ISD a-Fragmente entstehen, bei ECD aber nicht. Aber auch die ganz ähnliche Fragmentierung im positiven und negativen Ionenmodus ist mit diesem Bild plausibel zu erklären (s. Abb. D.2.4.2). Wenn in der Nähe des C-Terminus bzw. des N-Terminus jeweils saure und basische Aminosäuren vorhanden sind, wie dies bei der oxidierten B-Kette von Insulin der Fall ist, können auch die entstehenden Fragmente entweder positiv oder negativ geladen sein, unabhängig von der Entstehung der Fragmente.

Die großen Übereinstimmungen zwischen ISD und ECD sind ein starkes Indiz für ein sehr ähnlichen Mechanismus. Allerdings scheint in beiden Fällen vor allem die Anlagerung von H-Atomen der wesentliche Schritt zu sein, der zur Fragmentierung führt. Daher ist die Beteiligung von Elektronen an einer ECD-ähnlichen Fragmentierung bei MALDI nicht zwingend, auch anderweitig gebildete H-Radikale können zu den gleichen Reaktionen führen. Es ist bekannt, daß in der MALDI-*plume* freie Wasserstoffatome vorhanden sind [Sco94]. Darüber hinaus könnte statt einem Einfang freier H-Atome auch eine direkte Übertragung von H-Atomen erfolgen, zumal

Additionen von Wasserstoff auch bei einigen Molekülen gefunden wird (s. Kap. C.3.2.4 und [Koo00a]). Die wahrscheinlichste Quelle dieser H-Atome ist die Matrix, die zudem in großem Überschuß vorhanden ist. Die Übertragung von H-Atomen von Matrixspezies wurde bereits von Ehring et al. postuliert [Ehr92]. Die einfachste Möglichkeit wäre die direkte H-Übertragung von einem Matrixmolekül auf eine Amidbindung, die dann in der Folge zur Fragmentierung führt, und dieser Weg wurde kürzlich als mögliche Ursache für die ISD-Fragmentierung von Peptiden vorgeschlagen [Tak01]. Eine leichte Übertragung von H-Atomen bei MALDI würde zudem erklären, warum bei MALDI-ISD nahezu keine Radikale detektiert werden, da diese sofort unter  $H^{\bullet}$ -Abstraktion (bzw. Addition) oder  $H^{\bullet}$ -Verlust reagieren.

Der hier vorgestellte Vergleich zeigt deutlich, daß sowohl ISD als auch ECD vermutlich durch Anlagerung eines H-Atoms induziert werden. Dies bedeutet aber nicht, daß die H-Atome in beiden Fällen auf die gleiche Weise gebildet werden, so daß eine Beteiligung von Elektronen bei der ISD-Fragmentierung von Proteinen und Peptiden (und damit bei MALDI von Biomolekülen) auf der Basis der momentan vorliegenden Informationen weder belegbar ist noch völlig ausgeschlossen werden kann.

### D.3. Anionen-Addukte bei MALDI

Durch die Experimente mit den pH-Indikatoren ist bewiesen, daß Analyte in ionischer Form im Matrixkristall konserviert werden. Je nach Zahl der sauren und basischen Gruppen im Molekül und in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung können die Analyten unterschiedliche Nettoladungen aufweisen. Bei einer von Null verschiedenen Nettoladung muß aber zwingend eine entsprechende Anzahl von Gegenionen im Kristall vorhanden sein, um die Ladung des Analyten zu kompensieren. Aber auch, wenn bei "neutralen" Zwitterionen keine Nettoladung existiert, können Gegenionen vorhanden sein.

Im Falle von polyanionischen Verbindungen ist diese Art der Komplexierung mit Gegenionen wohlbekannt. Oligonukleotide werden generell mit einer Verteilung von Kationen detektiert, wenn diese nicht gegen Ammoniumionen ausgetauscht wurden. Sind Metallkationen einmal fest an einer deprotonierten Säurefunktion koordiniert, kann nur noch das Ionenpaar desorbiert werden und ein kationenangelagertes Molekül entsteht. Ist dagegen ein Ammoniumion koordiniert, kann eine Neutralisation durch Protonentransfer stattfinden, und das neutrale Amin kann abdampfen. Dies ist bei Metallkationen nicht möglich.

Im Gegensatz zu den häufig beobachteten Kationenaddukten gibt es bei MALDI normalerweise keine Anionenaddukte. Der Grund dafür wird sofort klar, wenn man die oben erläuterte Neutralisation durch Protonentransfer berücksichtigt. Solange diese Neutralisationsreaktionen möglich sind, kann jedes Anionenaddukt nach der Neutralisation als ungeladene Säure abdampfen und erscheint somit nicht im Spektrum. Eine den Metallkationen analoge Form von Anionen, bei denen kein Protonentransfer möglich ist, gibt es nicht.<sup>35</sup> Dennoch können unter besonderen Umständen Anionenaddukte in MALDI-Spektren auftreten. Dies ist besonders dann der Fall, wenn das an einer positiv geladenen Stelle koordinierte Anion eine geringe Gasphasenbasizität aufweist. In den folgenden Kapiteln werden Versuche mit vergleichsweise schwach basischen Anionen vorgestellt, die je nach Bedingungen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Anionenanlagerungen führen. Anhand dieser Experimente werden Schlußfolgerungen sowohl zum Analyteinbau als auch zu Neutralisationsreaktionen durch Protonentransfer und deren Energetik gezogen.

#### D.3.1. Einfluß der Gasphasen-Basizitäten bei der Neutralisation von Ionenpaaren

Die Neutralisation eines Ionenpaares durch Protonentransfer ist bei alleiniger Betrachtung der Säure-Base-Reaktion immer exergonisch, da Anionen aufgrund ihrer negativen Ladung stets stärkere Gasphasenbasen sind als neutrale Moleküle (einige Gasphasenbasizitäten sind in Tab. D.3.1.1 aufgelistet). Dies ändert sich nur durch Solvation, die die ionischen Formen gegenüber einer Neutralisation stabilisiert. Ist dagegen das Lösungsmittel bereits verdampft oder sind nur wenige Lösungsmittelmoleküle vorhanden, wird der Protonentransfer von einer protonierten Base zum Anion energetisch günstiger.

Trotzdem ist aber die Gesamtbilanz der Reaktion meist endergonisch, da nicht nur die Reaktionsenergie der Neutralisation frei wird, sondern auch die Coulomb-Anziehung der beiden Ionen überwunden werden muß. Daher ist eine Energiezufuhr zur Überwindung dieser Coulomb-Kräfte notwendig, die bei MALDI durch den Desorptions/Ionisations-Prozeß selbst bzw. durch Kollisionen aufgebracht werden muß. Die Höhe der notwendigen Aktivierungsenergie wird ganz wesentlich von der Differenz der Gasphasenbasizitäten der beteiligten Moleküle (Konkurrenz des

<sup>35</sup> Selbst quaternäre organische Anionen wie z.B. Tetraphenylborat weisen eine gewisse, wenn auch geringe Basizität auf, da sie sich unter Freisetzung der Lewis-Säure zersetzen können:  $[B(Ph_4)]^- + H^+ \rightarrow B(Ph_3) + HPh$ .

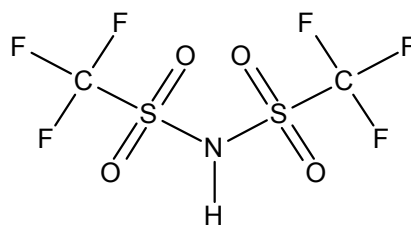
Anions und der neutralen Base um das Proton) bestimmt, da die Coulomb-Anziehung in erster Näherung für alle einfach geladenen Ionen ähnlich hoch ist.

**Tabelle D.3.1.1: Gasphasenbasizitäten einiger Anionen und neutraler Basen.**

Anion	GB (kJ/mol)	Neutrale Base	GB (kJ/mol)
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	1429	Arginin (Seitenkette)	1007
Glycin <sup>-</sup>	1404	Lysin (Seitenkette)	952
Cl <sup>-</sup>	1373	Histidin (Seitenkette)	952
2,5-DHB <sup>-</sup>	1329	Glycin (N-Terminus)	852
CF <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	1325	NH <sub>3</sub>	847
HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1265	H <sub>2</sub> O	685
TFSI <sup>-</sup>	1221	-	-
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1180	-	-

Zahlenwerte entnommen aus <http://webbook.nist.gov/>

Wenn Analyte wirklich in Form von Ionenpaaren im Matrixkristall eingebaut werden und trotzdem keine Addukte im Spektrum detektiert werden, muß die oben beschriebene Freisetzung der Analyte durch Protonentransfer stattgefunden haben. Eine Überprüfung dieser Hypothese ist durch Änderung der Energetik des Protonentransfers möglich. Ein Zusatz von Anionen mit einer besonders geringen Gasphasenbasizität sollte demnach die Neutralisation des entsprechenden Ionenpaares energetisch ungünstiger machen, so daß bei schonenden Bedingungen die Anionen in Form von Anionenaddukten im MALDI-Spektrum detektiert werden können. Eine besonders schwache Gasphasenbase ist Bis-(Trifluormethyl)-Sulfonimid (HTFSI) [For84, Rey98], da die korrespondierende Säure aufgrund der zwei Trifluormethylgruppen eine besonders hohe Gasphasenacidität aufweist. Zusätzlich ist die negative Ladung des TFSI-Anions über vier Sauerstoffatome und ein Stickstoffatom verteilt (s. Strukturformel in Abb. D.3.1.1). Während Anionen wie TFA oder Essigsäure Gasphasenbasizitäten (GB) zwischen 1300 und 1450 kJ/mol aufweisen, beträgt die GB des TFSI-Anions nur 1221 kJ/mol.

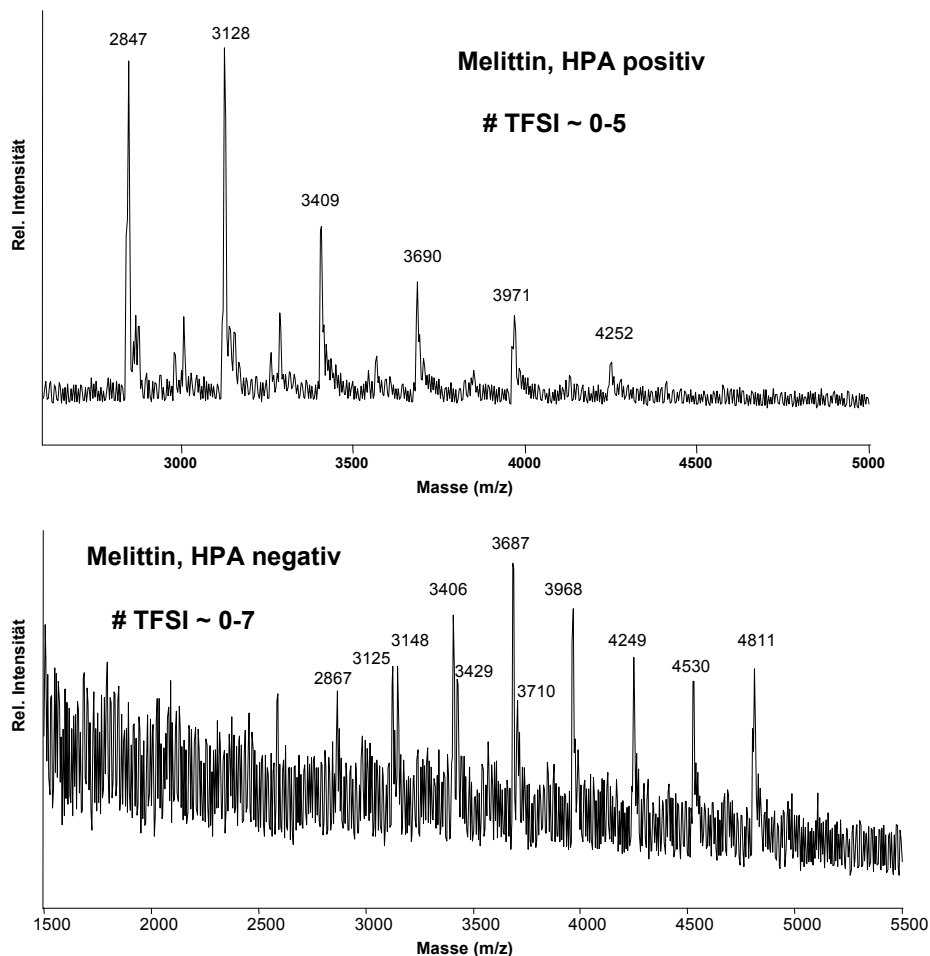


**Abbildung D.3.1.1 :** Struktur von Bis-(Trifluormethyl)-Sulfonimid (HTFSI).

Für die Experimente wurden Matrix ( $c = 0,1$  mol/L) und Analyt ( $c = 10^{-5}$ - $10^{-4}$  mol/L) in Wasser/Acetonitril 1:1 (v:v) ohne den sonst üblichen Zusatz von TFA gelöst, HTFSI wurde in Wasser gelöst ( $c = 0,01$ - $0,1$  mol/L). Der Zusatz der extrem starken Säure HTFSI bei der MALDI-Präparation führte zur Detektion einer Verteilung von Anionenaddukten. Abb. D.3.1.2 zeigt MALDI-Spektren des Peptids Melittin mit Zusatz von HTFSI im positiven und negativen



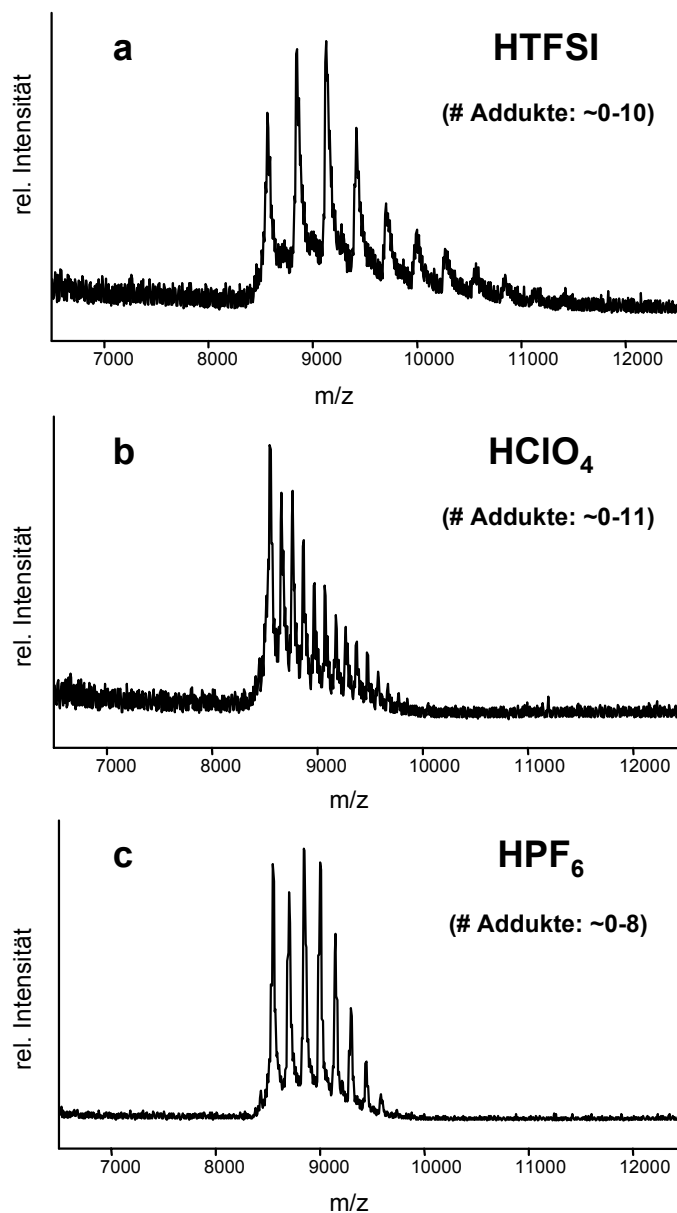
Ionenmodus, aufgenommen mit der Matrix 3-HPA. In beiden Spektren ist deutlich eine Reihe intensiver Peaks zu sehen, deren Abstände ( $m/z = 281$ ) sie als TFSI-Addukte von Melittin ausweisen. Die geringe Basizität des TFSI-Anions führt also tatsächlich zum Auftreten von Anionenaddukten bzw. Ionenpaaren. Während das Spektrum im positiven Ionenmodus ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis aufweist, sind die Peaks im negativen Ionenmodus wesentlich schwächer. Trotzdem ist es bemerkenswert, daß überhaupt intaktes Melittin im negativen Ionenmodus detektiert wird, da Melittin keine sauren Aminosäuren aufweist und daher auch keine deprotonierten Ionen bildet. Ohne TFSI-Zusatz wird nur ein metastabiles Fragment detektiert, dessen Identität bisher nicht geklärt werden konnte [Sch01]. Der Zusatz von TFSI führt jedoch dazu, daß auch Melittin im negativen Ionenmodus in Form seiner Anionenaddukte detektiert werden kann.



**Abbildung D.3.1.2** : MALDI-Spektrum von Melittin unter Zusatz von Bis-(Trifluormethyl)-Sulfonimid (HTFSI) im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus (Matrix 3-HPA).

Auch der Zusatz anderer sehr starker Säuren führt zu Anionenaddukten bei MALDI. Abb. D.3.1.3 zeigt MALDI-Spektren des Proteins Ubiquitin unter Zusatz von HTFSI, Perchlorsäure und Hexafluorphosphorsäure. Alle Zusätze führen zu Verteilungen von sehr intensiven Anionenaddukten, die zudem bei allen Säuren sehr ähnlich sind und sich nur durch die unterschiedlichen Abstände der Addukte und leichte Intensitätsschwankungen unterscheiden. Die GB des Perchlorat-Anions beträgt nur 1180 kJ/mol. Für Hexafluorphosphat ist keine GB bekannt, vermutlich weil es sich bei der Protonierung leicht zu HF und  $\text{PF}_5$  zersetzt.  $\text{PF}_6^-$  ist aber als extrem schwache Base bekannt und wird zur Stabilisierung als Gegenion besonders starker Säuren verwendet. Die bei allen Säurezusätzen gleichermaßen auftretenden Anlagerungen sind ein Beweis

dafür, daß eine niedrige GB -vollkommen unabhängig von anderen Eigenschaften des koordinierten Anions- der entscheidende Faktor für das Auftreten von Anionenaddukte bei MALDI sind.



**Abbildung D.3.1.3** : MALDI-Spektren von Ubiquitin unter Zusatz verschiedener sehr starker Säuren: (a) Bis-(Trifluormethyl)-Sulfonimid (HTFSI), (b) HClO<sub>4</sub>, (c) HPF<sub>6</sub> (Matrix 2,5-DHB, positiver Ionenmodus).

Bei Zusatz mehrerer starker Säuren treten auch gemischte Addukte auf. Dies ist in Abb. D.3.1.4 anhand von zwei Beispielen mit dem Analyten Insulin gezeigt. Dabei treten nahezu alle Kombinationen von Addukten auf, die theoretisch möglich sind. Allerdings sind die Peaks zum großen Teil nicht aufgelöst oder erscheinen nur als Schulter an einem zweiten Peak. Dies liegt in erster Linie daran, daß die Signale generell sehr breit sind. So ist im unteren Spektrum das Signal der Anlagerung von zwei PF<sub>6</sub><sup>-</sup> nicht von der einfachen TFSI-Anlagerung getrennt, obwohl die Massendifferenz 10 Da beträgt. Das bedeutet, daß die Auflösung (FWHM) bei der Masse des Addukts von ca. 6000 Da maximal 600 beträgt. Diese Peakverbreiterung ist ein typisches Merkmal aller Anionenaddukte und ist auch gut in den Spektren in Abb. D.3.1.2 und D.3.1.3 zu erkennen. Auf eine mögliche metastabile Fragmentierung als Ursache für diese Peakverbreiterung wird in Kap. D.3.5 näher eingegangen.

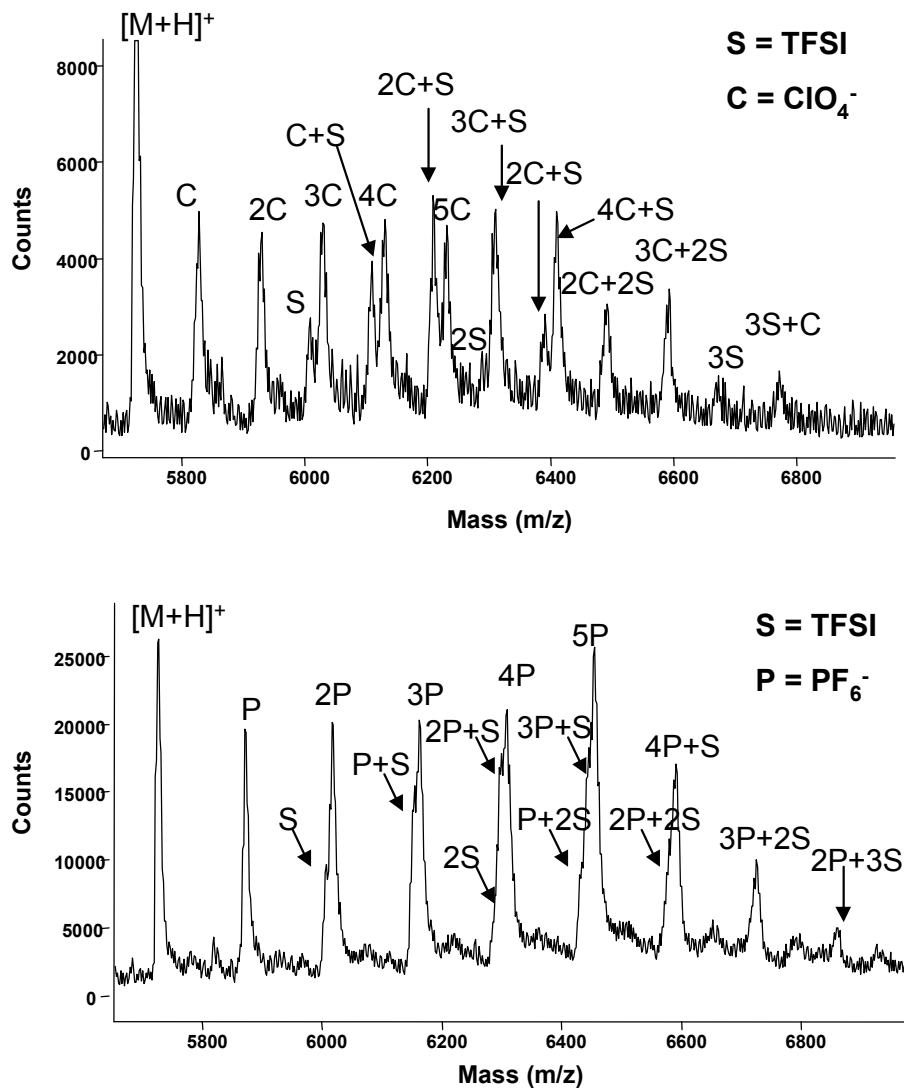
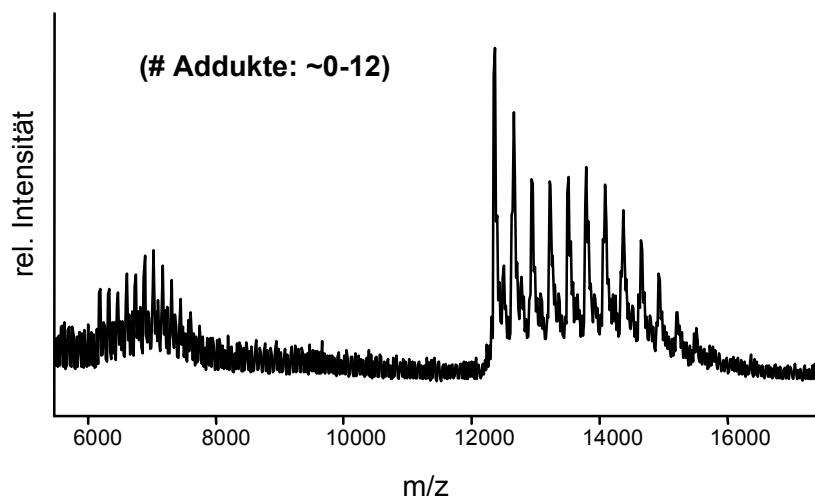


Abbildung D.3.1.4 : MALDI-Spektren von Rinderinsulin unter Zusatz von je zwei sehr starker Säuren.  
 Oben: HTFSI und HClO<sub>4</sub>, unten: HTFSI und HPF<sub>6</sub> (Matrix 3-HPA, positiver Ionenmodus).

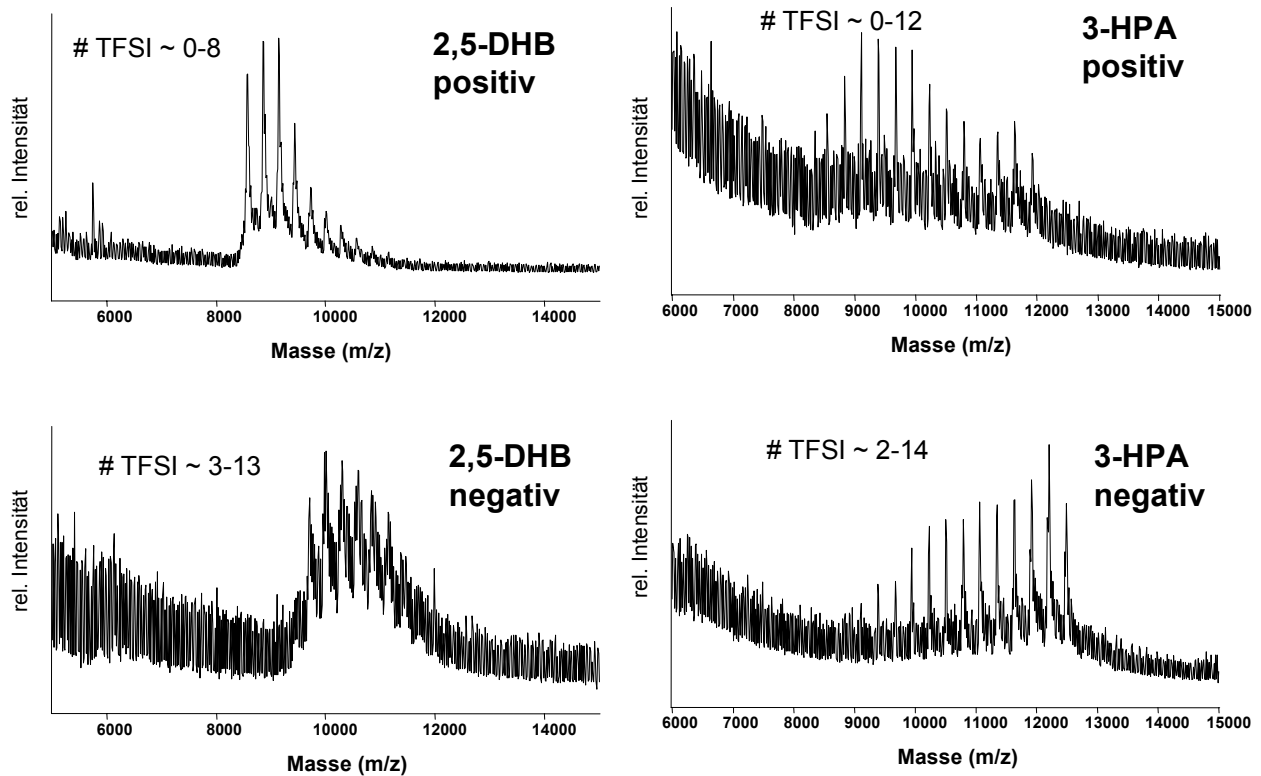
### D.3.2. Einfluß von Matrix und Analyten

Die maximale Anzahl, die Verteilung und die Signalintensitäten der Anionenaddukte sind nicht nur vom Analyten abhängig, sondern auch von der Matrix. Die meisten Matrizes, z.B. 2,5-DHB und  $\alpha$ CHCA, führen zu einer vergleichsweise geringen Anzahl Anionenaddukte pro Analytmolekül. Dabei korrespondiert die Zahl der Addukte in etwa mit der Zahl der Arginine im Peptid/Protein. Die im Spektrum erscheinenden Addukte scheinen somit bevorzugt an Argininresten lokalisiert zu sein. Ähnliche Beobachtungen wurden von Friess et al. bei Anlagerungen von aromatischen Sulfonsäuren an Peptide gemacht [Fri01, Fri02]. Allerdings ist die Anlagerung von Anionen nicht auf Argininreste beschränkt, und mit zunehmender Analytmasse treten vermehrt Addukte auf, deren Zahl erheblich über der Anzahl der Arginine in der Sequenz liegen kann. In Abb. D.3.2.1 ist ein MALDI-Spektrum von Cytochrom C unter Zusatz von HTFSI zu sehen. Obwohl Cytochrom C nur zwei Arginine in der Sequenz hat, werden wesentlich mehr Addukte gebildet, so daß eine Verteilung von bis zu zwölf TFSI-Addukten entsteht. Allerdings ist der zweite Peak, der dem einfachen Addukt entspricht, deutlich höher als die übrigen Adduktsignale.



**Abbildung D.3.2.1** : MALDI-Spektren von Cytochrom C unter Zusatz von HTFSI (Matrix 2,5-DHB, positiver Ionenmodus).

Auch im nächsten Beispiel ist eine über die Zahl der Arginine weit hinausgehende Adduktbildung mit TFSI zu erkennen (s. Abb. D.3.2.2). Ubiquitin hat vier Arginine in der Sequenz, aber die maximale Anzahl Addukte liegt je nach Matrix und Ionenpolarität zwischen acht und 13. Weiterhin erkennt man, daß die Signale mit der Matrix 2,5-DHB im positiven Ionenmodus noch vergleichsweise intensiv sind, während das Signal-Rausch-Verhältnis im negativen Ionenmodus und mit der Matrix 3-HPA wesentlich geringer ist. Generell ist die Adduktverteilung im negativen Ionenmodus zu mehr Addukten verschoben. Aber besonders bei Verwendung der Matrix 3-HPA treten wesentlich mehr Addukte auf als dies bei anderen Matrizes der Fall ist. Die maximale Zahl ist dabei jedoch vom Analyten abhängig.

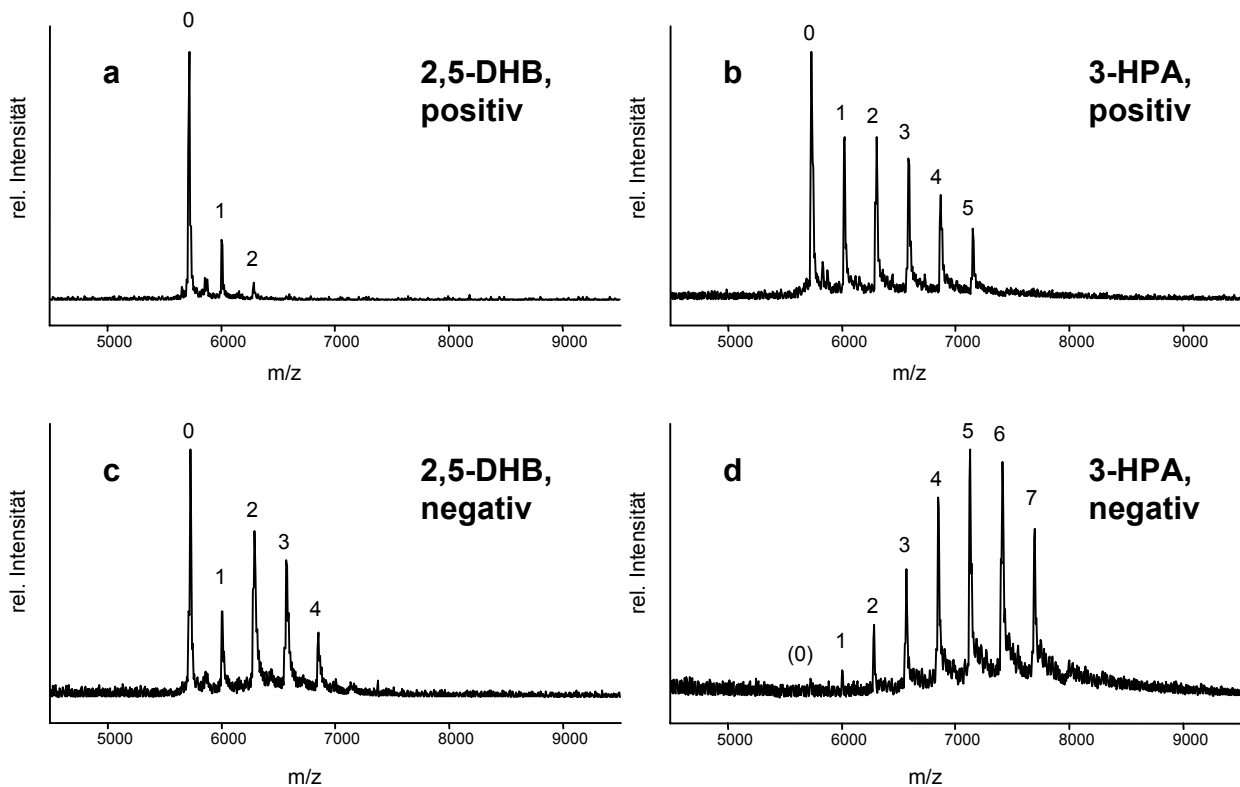


**Abbildung D.3.2.2 :** MALDI-Spektren von Ubiquitin unter Zusatz von HTFSI präpariert mit zwei verschiedenen Matrices im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus. Links: 2,5-DHB, rechts: 3-HPA.

Die wesentlich höhere Zahl der Addukte mit 3-HPA ist in Abb. D.3.2.3 besonders gut zu erkennen, in der MALDI-Spektren von Insulin mit zwei verschiedenen Matrices unter Zusatz von HTFSI gezeigt sind. Während mit 2,5-DHB besonders im positiven Ionenmodus nur eine geringe Adduktbildung beobachtet wird, entspricht die maximale Zahl der Addukte mit 3-HPA der Zahl der basischen Aminosäuren in Insulin minus eins: Insulin hat sechs basische Aminosäuren in der Sequenz,<sup>36</sup> und das Signal mit der höchsten Anzahl Anionenaddukten entspricht einer Anlagerung von fünf TFSI-Anionen. Diese Korrelation wurde bei allen untersuchten Peptiden und Proteinen konsequent wiedergefunden. Demnach werden nur die protonierten basischen Stellen im Molekül durch Anionen komplexiert. Zusätzlich können die Ionenpaare im positiven Ionenmodus nur dann detektiert werden, wenn eine überschüssige positive Ladung vorhanden ist, wofür mindestens eine protonierte Gruppe im Molekül nicht durch ein Gegenion komplexiert sein darf.

Die hohe Zahl der Anlagerungen mit 3-HPA macht bereits die Detektion von Cytochrom C mit dieser Matrix unmöglich. Dabei spielt vermutlich nicht nur die hohe Zahl von 24 basischen Gruppen und die damit einhergehende breite Adduktverteilung eine Rolle, sondern auch eine zunehmende metastabile Fragmentierung dieser Addukte (s. Kap. D.3.5).

<sup>36</sup> Neben einem Argininrest, einem Lysinrest und den zwei N-Termini der beiden Insulin-Untereinheiten (A- und B-Kette) liegen auch die beiden Histidine in der stark sauren HTFSI/Matrix-Lösung vollständig protoniert vor.

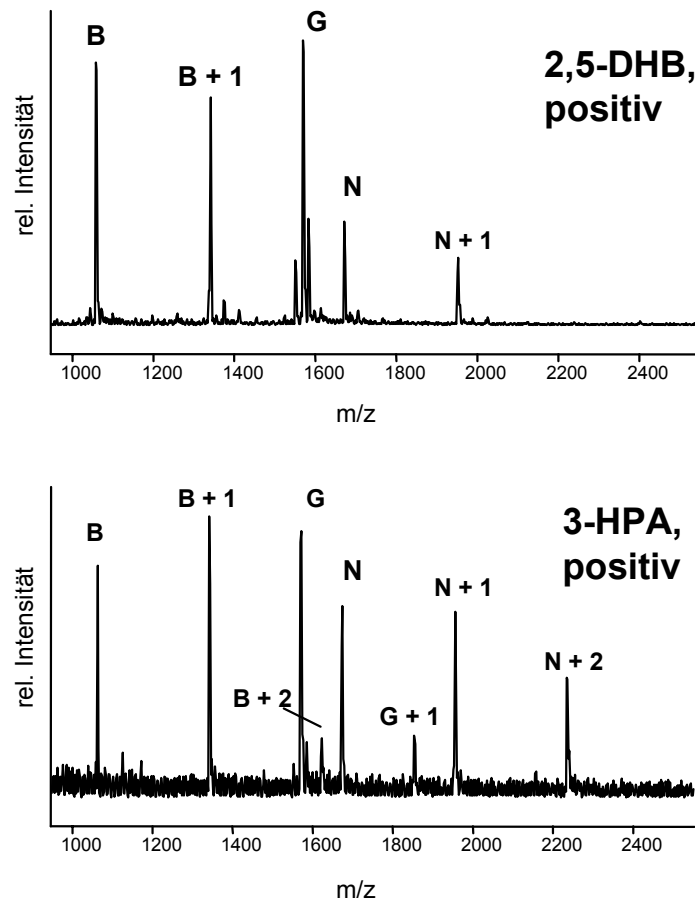


**Abbildung D.3.2.3** : MALDI-Spektren von Rinderinsulin unter Zusatz von HTFSI präpariert mit zwei verschiedenen Matrices im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus. Links: 2,5-DHB, rechts: 3-HPA.

Anhand der maximalen Anionenanlagerung kann die Zahl der Arginine und die Zahl der basischen Stellen in Peptiden abgeschätzt werden. Abb. D.3.2.4 zeigt MALDI-Spektren einer Mischung von drei Peptiden, die unter Zusatz von HTFSI präpariert wurden. Die Peptide haben folgende basische Gruppen:

Bradykinin ( $m/z = 1060.56$ ):	2 Arginine, 1 N-Terminus;
Neurotensin ( $m/z = 1672.91$ ):	2 Arginine, 1 Lysin;
[Glu <sup>1</sup> ]-Fibrinopeptid ( $m/z = 1570.67$ ):	1 Arginin, 1 N-Terminus.

Das obere Spektrum wurde mit 2,5-DHB als Matrix aufgenommen. Von den beiden Peptiden Bradykinin (B) und Neurotensin (N) ist jeweils ein TFSI-Addukt im Spektrum zu finden (charakteristischer Massenshift von  $m/z = 281$ ). Von [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid (G) ist jedoch kein Addukt zu erkennen, da dieses nur ein Arginin in der Sequenz hat. Die Peptide B und N bilden dagegen aufgrund ihres zweiten Arginins genau ein TFSI-Addukt. Die überschüssige positive Ladung scheint somit bevorzugt an Argininresten lokalisiert zu sein. Wenn kein weiterer Argininrest (oder eine andere stark basische Gruppe) im Molekül vorhanden ist, wird bei kleineren Peptiden mit 2,5-DHB kein Addukt detektiert.



**Abbildung D.3.2.4:** MALDI-Spektren einer Peptidmischung unter Zusatz von HTFSI (Matrizes: 2,5-DHB (oben) und 3-HPA (unten), positiver Ionenmodus).

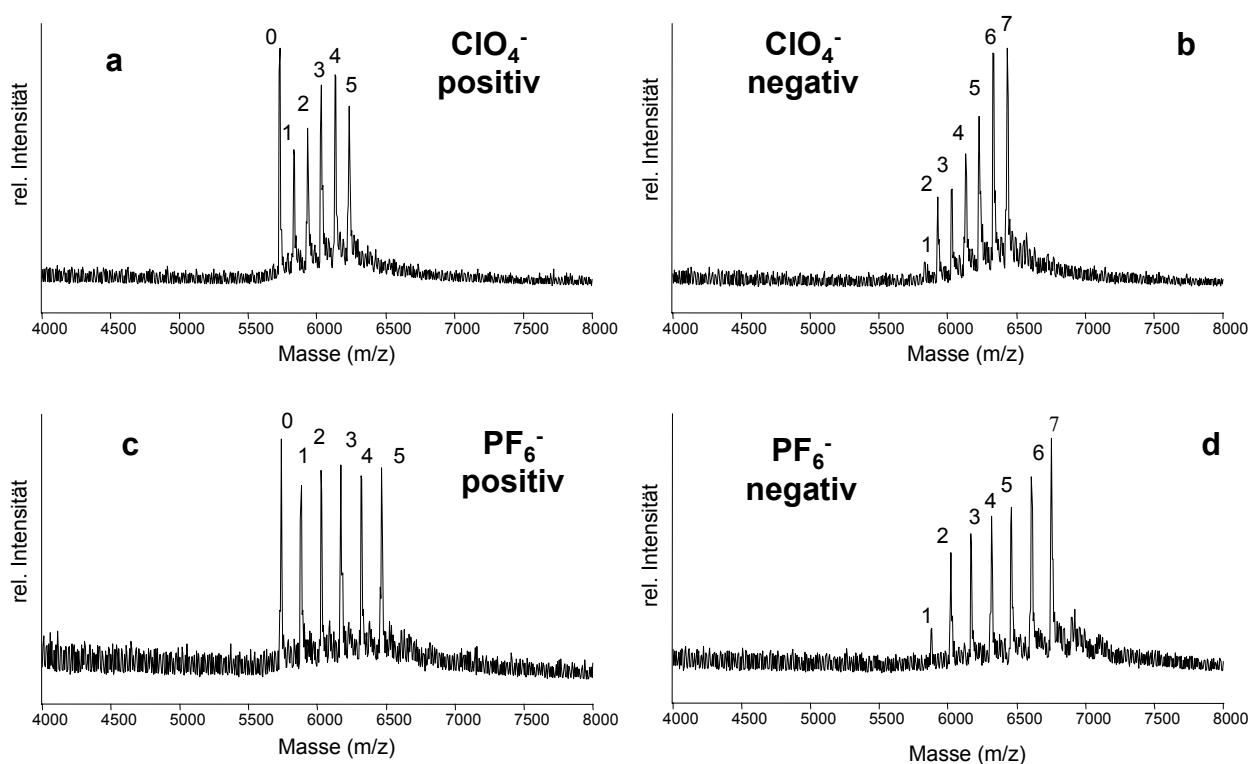
*B = Bradykinin, G = [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid, N = Neurotensin; Zahlen = Anzahl der TFSI-Addukte.*

Das untere Spektrum wurde mit 3-HPA als Matrix aufgenommen. Hier werden von den beiden Peptiden Bradykinin (B) und Neurotensin (N) jeweils zwei Addukte detektiert, in Übereinstimmung mit den in beiden Peptiden vorhandenen drei basischen Gruppen. Dagegen erscheint von [Glu<sup>1</sup>]-Fibrinopeptid (G) nur ein TFSI-Addukt im Spektrum, da G nur zwei basische Stellen im Molekül hat.

Interessanterweise ist in fast allen Spektren mit 3-HPA das Signal, daß der höchsten Anzahl Anionenaddukte entspricht, wesentlich niedriger als die übrigen Peaks. Bei Neurotensin (N) ist dieser (N + 2)-Peak dagegen deutlich intensiver. N hat aufgrund einer Modifikation (Para-Glutaminsäure) keinen basischen N-Terminus, die Anionen können demnach nur an Arginin- oder Lysinreste koordiniert sein. Vermutlich ist bei anderen Peptiden das "letzte" Anion bevorzugt am N-Terminus lokalisiert. Dort ist aber eine Neutralisation innerhalb des Ionenpaares energetisch günstiger, so daß eine geringere Intensität des korrespondierenden Addukts beobachtet wird. Dies würde aber auch bedeuten, daß die überschüssige Ladung bevorzugt an einer anderen Stelle im Molekül lokalisiert ist (Arginin, Lysin, Histidin) und nicht am N-Terminus.

### D.3.3. Einfluß von Ionenpolarität und Nettoladung

Nicht nur der Analyt und die Matrix haben einen Einfluß auf die Anzahl der Addukte, sondern auch die Ionenpolarität. Dabei treten im negativen Ionenmodus fast durchgehend zwei Addukte mehr auf als im positiven Ionenmodus. Besonders konsequent tritt diese Differenz der maximalen Adduktzahl bei der Matrix 3-HPA auf, dort werden im negativen MALDI-Spektrum immer genau zwei Addukte mehr detektiert als im positiven Spektrum (s. Abb. D.3.2.2 und Abb. D.3.2.3). Die Art des zugesetzten Anions spielt dabei keine Rolle, solange dessen Gasphasenbasizität niedrig genug ist. In Abb. D.3.3.1 ist dies am Beispiel von Insulin gezeigt, daß einmal unter Zusatz von  $\text{HClO}_4$  und einmal unter Zusatz von  $\text{HPF}_6$  mit 3-HPA präpariert wurde. Während im positiven Ionenmodus stets maximal fünf Addukte detektiert werden, sind im negativen Ionenmodus in allen Fällen maximal sieben Anionenaddukte im MALDI-Spektrum zu sehen (vgl. auch Abb. B.2.3.b+d). Ein Vergleich der Adduktzahl zwischen positiven und negativen Spektren kann daher zur weiteren Absicherung bei der Bestimmung der Anzahl der basischen Stellen in Peptiden ausgenutzt werden.



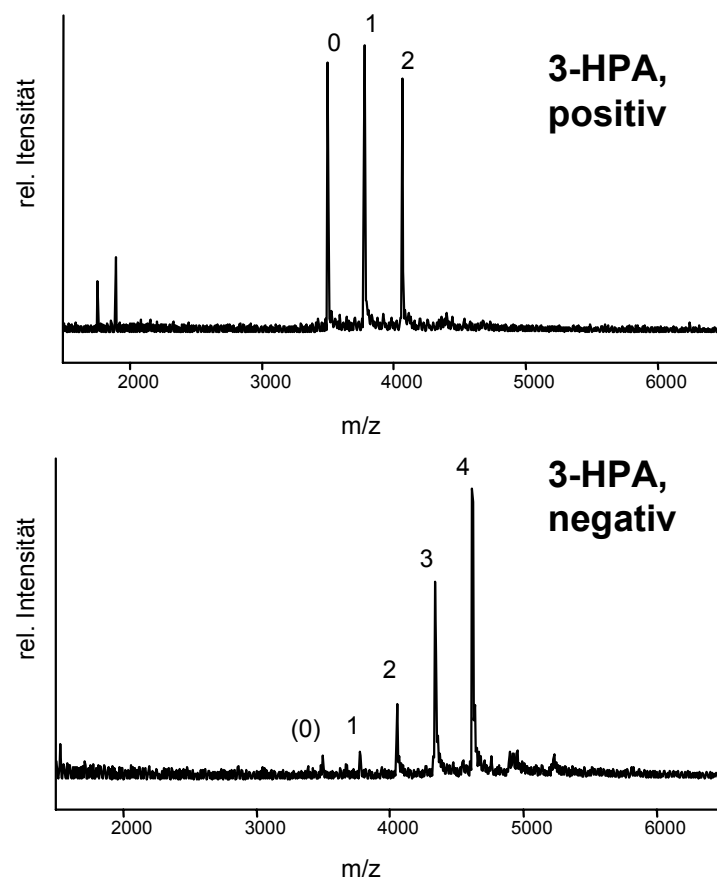
**Abbildung D.3.3.1** : MALDI-Spektren von Rinderinsulin unter Zusatz von Perchlorsäure (oben) und Hexafluorophosphorsäure (unten). (Matrix 3-HPA, jeweils im positiven (links) und negativen (rechts) Ionenmodus).

Trotz unterschiedlicher Zahl der angelagerten Anionen im positiven und negativen Ionenmodus ist aber jeweils dieselbe Zahl basischer Gruppen und damit auch dieselbe maximale Anzahl protonierter Stellen im Analytmolekül vorhanden. Die Nettoladung wird dabei nur durch ein überschüssiges oder ein fehlendes Anion hervorgerufen. Insulin kann maximal sechsfach protoniert und damit sechsfach positiv geladen vorliegen. Zur Bildung eines positiven Ions muß mindestens ein Anion weniger angelagert sein als positive Ladungen im Molekül vorhanden sind. Sind dagegen bereits an allen positiven Stellen Anionen angelagert, kann durch eine weitere Anlagerung eines Anions an das neutrale "Multi-Ionenpaar" eine negative Nettoladung entstehen. Dieses zusätzliche Anion kann nur unspezifisch gebunden sein, so daß durch das zusätzliche Anion eine Anionisierung erfolgt, die der häufiger anzutreffenden Kationisierung (zB. durch  $\text{Na}^+$ ) äquivalent ist. Eine weitere



Anlagerung eines Anions ist aber nicht möglich, vermutlich aufgrund der Abstoßung durch die negative Ladung.

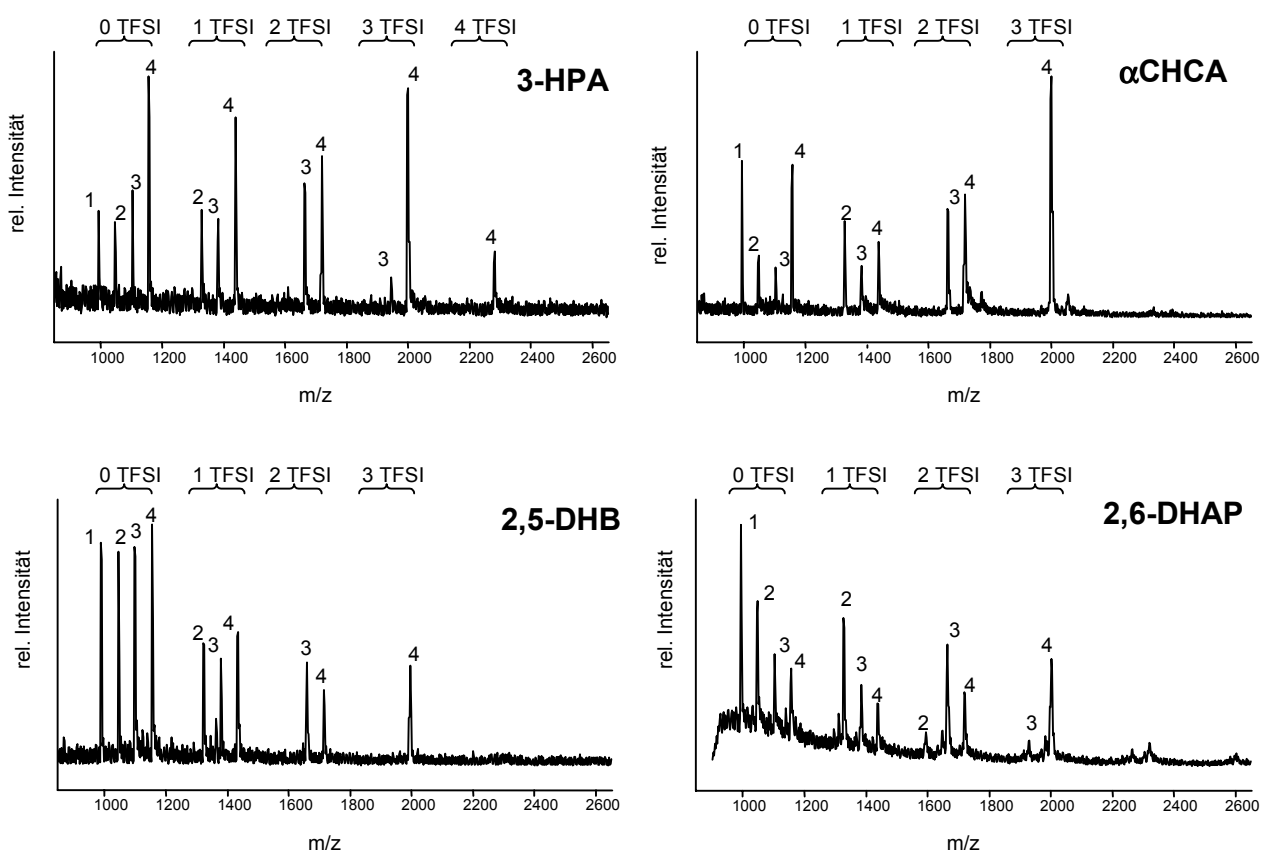
Neben der Ionenpolarität spielt aber auch die Nettoladung des Analyten eine Rolle für die Zahl der gebildeten Addukte. Dies wird an dem in Abb. D.3.3.2 gezeigten Beispiel deutlich, in dem MALDI-Spektren der oxidierten B-Kette von Insulin unter Zusatz von HTFSI gezeigt sind. Obwohl die Insulin-B-Kette fünf basische Gruppen besitzt (1 Arginin, 1 Lysin, 2 Histidin, 1 N-Terminus), erscheinen mit der Matrix 3-HPA im positiven Spektrum maximal zwei Addukte, während im negativen Spektrum maximal vier Addukte detektiert werden. Demnach ist die maximale Zahl der Anionenlagerungen in beiden Ionenmodi um zwei niedriger als erwartet. Die Differenz entspricht damit genau der Anzahl der oxidierten Cysteine (Sulfonsäuren) im Molekül. Dies bedeutet, daß die Sulfonsäuren auch in der stark sauren Umgebung noch deprotoniert vorliegen, so daß die Nettoladung der oxidierten Insulin-B-Kette in Lösung (und im Matrixkristall) nur noch +3 beträgt. Man kann vermuten, daß die Sulfonatgruppen mit positiven Stellen (protonierte Basen) im Moleküle durch ionische Wechselwirkungen Salzbrücken ausbilden, so daß in der Folge weniger Addukte ausgebildet werden können. Carbonsäuren liegen dagegen in der stark sauren Lösung vollständig protoniert vor und können daher keine Salzbrücken ausbilden, so daß die maximale Anzahl von Addukten detektiert wird, bei der noch eine positive oder negative Nettoladung entstehen kann.



**Abbildung D.3.3.2** : MALDI-Spektren der oxidierten B-Kette von Rinderinsulin unter Zusatz von HTFSI im positiven (oben) und negativen (unten) Ionenmodus. (Matrix 3-HPA).

### D.3.4. Konkurrenz mit Matrix-Anionen und Effizienz der Ladungstrennung

Bei Zugabe von sehr starken Säuren zeigen alle Analyten eine Verteilung von Anionenaddukten. Die maximale Zahl der Anlagerungen ist mit Ausnahme von 3-HPA für die meisten Matrizes nahezu gleich. Die Intensitäts-Verteilung der Anionenaddukte kann dagegen sehr unterschiedlich sein. Dies ist in Abb. D.3.4.1 am Beispiel der in Kap. D.2.2 vorgestellten argininhaltigen Peptide gezeigt. Die maximale Zahl der Anlagerungen ist mit allen Matrizes von der Zahl der Arginine und damit von der Zahl der basischen Stellen im Molekül abhängig. Die Höhe der jeweiligen Peaks ist dagegen sehr unterschiedlich. Während mit 3-HPA und  $\alpha$ CHCA die Signale mit einer hohen Zahl angelagerter Anionen besonders intensiv im Spektrum erscheinen, sind bei 2,5-DHB und 2,6-DHAP tendenziell die Signale mit nur wenig oder gar keinen Anlagerungen dominierend.



**Abbildung D.3.4.1 :** MALDI Spektren einer Peptidmischung präpariert mit verschiedenen Matrizes unter Zusatz von HTFSI. Die Peptide haben die Sequenz AXG AXG AXG AXG, wobei X entweder Arginin oder Threonin ist. Die Zahlen entsprechen der Anzahl der Arginine im Peptid, und die Peaks sind nach der Anzahl der TFSI-Addukte sortiert.

(3-HPA = 3-Hydroxypicolinsäure;  $\alpha$ CHCA =  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure; 2,5-DHB = 2,5-Dihydroxybenzoesäure; 2,6-DHAP = 2,6-Dihydroxyacetophenon; positiver Ionenmodus)

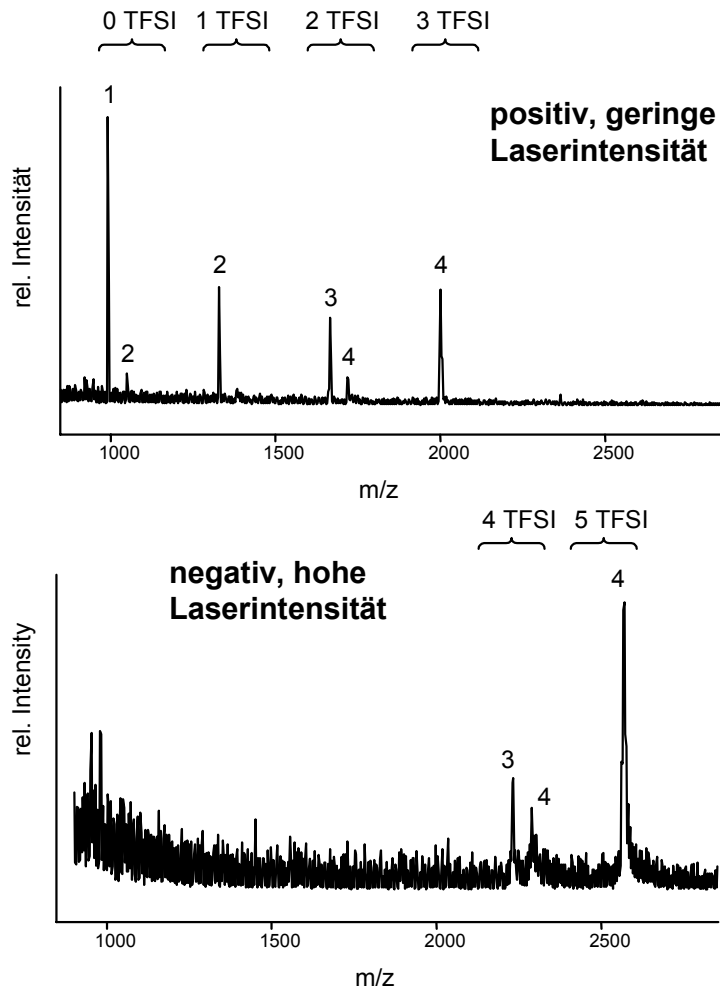
Für diese Intensitätsunterschiede können mehrere Gründe verantwortlich sein. Zum einen könnte bei einer Anregung der Ionenpaare die Energiebarriere für einen Protonentransfer überwunden werden, so daß es zu einer verstärkten Neutralisation der Ionenpaare unter Verlust der Anlagerungen kommt. Hierbei könnte das Ausmaß der Anregung von der Matrix abhängen ("harte" gegenüber "weiche" Matrizes). Je nach pH-Wert kann aber auch die Matrix zumindest zum Teil in anionischer Form vorliegen. Daher könnte ein zweiter Grund für die beobachteten Unterschiede eine Konkurrenz dieser Anionen mit TFSI (oder anderen Anionen in Lösung) sein. Da Matrixanionen

eine höhere Gasphasenbasizität haben, werden Ionenpaare mit Matrixanionen bei der Desorption vollständig neutralisiert und erscheinen daher nicht im Spektrum. Auch diese Verdrängung der schwach basischen Anionen von der positiven Stelle im Analyten durch Matrixanionen würde also zu einer niedrigeren Zahl Anionenaddukte führen. Zusätzlich könnten Unterschiede bei der Kristallisation und beim Analyteinbau eine Rolle spielen, so daß je nach Matrix ein mehr oder weniger effizienter Ausschluß der Testanionen erfolgt.

Um die Hypothese der konkurrierenden Anionen bei der Bildung von Ionenpaaren zu überprüfen, wurden Spektren der oben gezeigten argininhaltigen Peptide unter Zusatz von HTFSI mit  $\alpha$ CMCA aufgenommen. Dieses Derivat der Matrix  $\alpha$ CMCA hat keine sauren Gruppen im Molekül, so daß es keine Matrixanionen bilden kann (s. auch Kap. D.1.3.3). Daher sind nur die zugesetzten TFSI-Anionen in Lösung vorhanden. Dies führt dazu, daß im MALDI-Spektrum fast ausschließlich das Signal der maximal möglichen Zahl von Anionenanlagerungen erscheint (s. Abb. D.3.4.2). Das Peptid mit vier Argininen im Molekül erscheint z.B. fast nur in der Form des vierfach positiv geladenen Analytions, daß durch drei negative TFSI-Anionen komplexiert ist.

Für die Aufnahme des Spektrums im positiven Ionenmodus wurde nur eine geringe Laserintensität benötigt, während im negativen Ionenmodus erst bei wesentlich höherer Laserintensität Signale von Peptiden mit Anionenaddukten auftauchten. Zudem gelang im Negativen nur die Detektion der basischsten Peptide, die mindestens drei Arginine enthalten. Augenscheinlich wird die Bildung negativer Ionen mit zunehmender Zahl der Arginine und damit Zahl der angelagerten Anionen einfacher. Selbst bei der Koordination eines "überschüssigen" Anions an ein formal neutrales Ionenpaar scheint somit die Zahl der positiven Stellen eine Rolle zu spielen, auch wenn die positiven Ladungen vollständig durch Gegenionen kompensiert sind. Dieser Effekt der Anziehung trotz Ladungskompensation könnte dann auftreten, wenn die Gegenionen nicht an der positiven Ladungen, sondern in einem gewissen Abstand koordiniert sind, so daß eine gleichmäßige Anziehung auf alle Gegenionen zustande kommt. Dieselbe Tendenz findet sich auch im positiven Spektrum wieder. Mit zunehmender Zahl der Arginine im Molekül wird die Intensität der gebildeten Ionen geringer oder nimmt zumindest nicht zu. Dies ist mit anderen Matrices anders (s. Abb. D.3.4.1). Besonders wenn man alle zu einem Peptid korrespondierenden Peaks mit verschiedener Adduktzahl zusammenzählt, wird mit steigender Argininzahl im Molekül eine zunehmend höhere Ionenintensität detektiert.

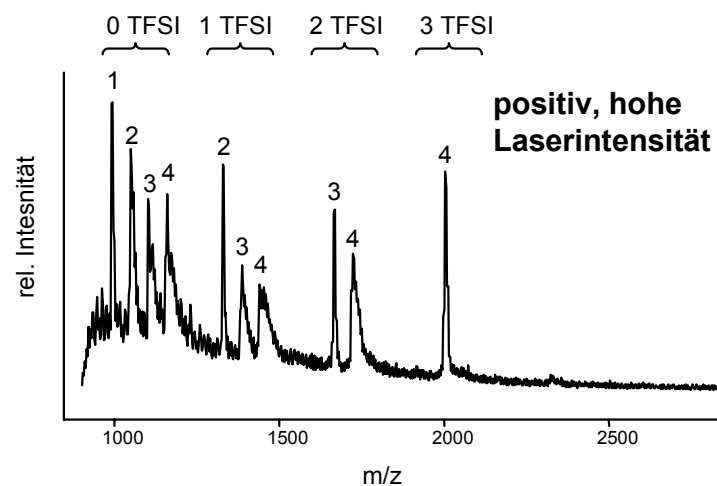
Die Anlagerung von Anionen ist auch mit der Matrix  $\alpha$ CMCA weitgehend auf die stark basischen Argininreste beschränkt. Mit zunehmender Analytmasse wird zudem nicht ausschließlich die maximal mögliche Zahl der Anlagerungen detektiert. Dies kann nur durch die für die MALDI-Detektion dieser Analyte nötige höhere Laserintensität und damit durch eine stärkere Anregung und einen (metastabilen) Zerfall der entsprechenden Addukte verursacht sein.



**Abbildung D.3.4.2 :** MALDI Spektren einer Peptidmischung präpariert mit der Matrix  $\alpha$ -Cyano-4-Methoxyzimtsäureamid ( $\alpha$ CMCA) unter Zusatz von HTFSI. (Die Sequenzen der Peptide sind in Abb. D.3.4.1 angegeben.) Die benötigte Laserintensität ist im negativen Ionenmodus (unten) wesentlich höher als im positiven Ionenmodus (oben).

### D.3.5. Fragmentierung von Anionenaddukten

In den vorangehenden Kapiteln wurden bereits einige Beobachtungen erwähnt, die Hinweise auf mögliche Fragmentierungen von Anionenaddukten geben. Dazu gehört die Peakverbreiterung und generell relativ geringe Auflösung der Adduktionen, die durch metastabile Zerfälle verursacht sein könnte. Auch die bei höheren Analytmassen auftretende Adduktverteilung im Falle der nicht-sauren Matrix  $\alpha$ CMCA könnte durch eine höhere Anregungsenergie verursacht sein, da keine Matrixanionen vorhanden sind und diese somit auch nicht zu einer Adduktverteilung beitragen können. Eine solche Verschiebung der Adduktzahl kann auch bei kleineren Analyten durch eine höhere Laserintensität induziert werden. Dies ist in Abb. D.3.5.1 anhand der bereits bekannten argininhaltigen Peptide gezeigt. Während bei geringer Laserintensität an der Schwellbestrahlungsstärke fast ausschließlich die Signale der maximal möglichen Anionenlagerung detektiert werden (s. Abb. D.3.4.2 oben), erscheint bei höherer Laserintensität wieder eine Adduktverteilung. Dies belegt klar, daß eine Energiezufuhr wirklich zu einer Überwindung der Energiebarriere der Neutralisation und damit zum Verlust von Addukten führt.

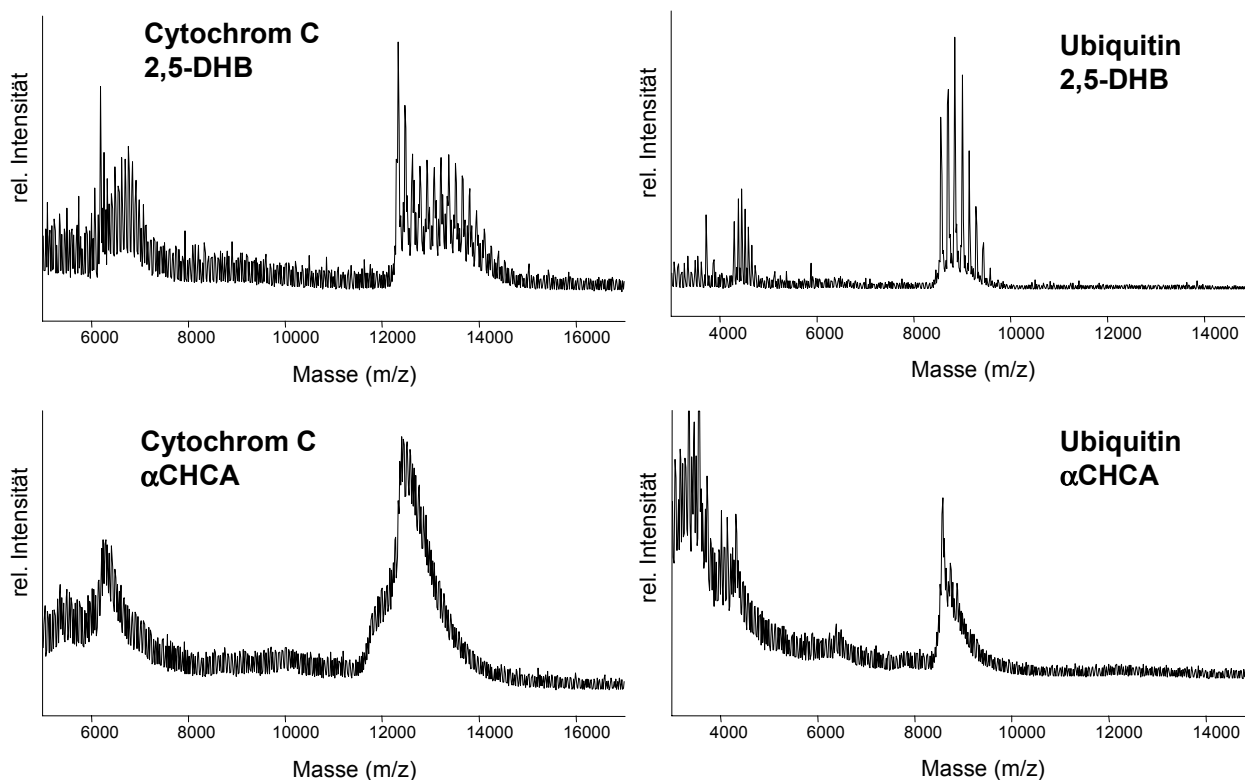


**Abbildung D.3.5.1** : MALDI Spektren einer Peptidmischung präpariert mit der Matrix  $\alpha$ -Cyano-4-Methoxymethylsulfonamid ( $\alpha$ CMCA) unter Zusatz von HTFSI, aufgenommen bei hoher Laserintensität. (Die Sequenzen der Peptide sind in Abb. D.3.4.1 angegeben.)

Insbesondere die Signale, bei denen augenscheinlich eine Neutralisation eines Ionenpaares stattgefunden hat, erscheinen stark verbreitert im Spektrum. Dies ist vor allem bei den Peptiden mit einer hohen Zahl Arginine (drei und vier) der Fall. Die breiten Peaks deuten auf einen erheblichen Anteil metastabiler Fragmentierung. Dennoch muß der größte Teil der Addukte bereits in der Ionenquelle zerfallen sein, da die Spektren im Linearmodus aufgenommen sind und daher die in der feldfreien Flugstrecke gebildeten Fragmente bei der Flugzeit des unzerfallenen Ions den Lineardetektor erreichen. Allerdings ist auch im Linearbetrieb durch verschiedene Effekte (Rückstoß bei der Fragmentierung, unterschiedliche Beschleunigung an Netzen) meist eine Verbreiterung metastabiler Peaks zu beobachten. Da die Peaks zudem ein starkes *tailing* zu höheren  $m/z$ -Werten aufweisen, wird die Fragmentierung vermutlich durch Kollisionen zu Beginn der Beschleunigung verursacht ("früher" Zerfall). Metastabile Fragmentierungen in der feldfreien Flugstrecke führen dagegen zu niedrigeren  $m/z$ -Wert im Vergleich zum Vorläuferion.

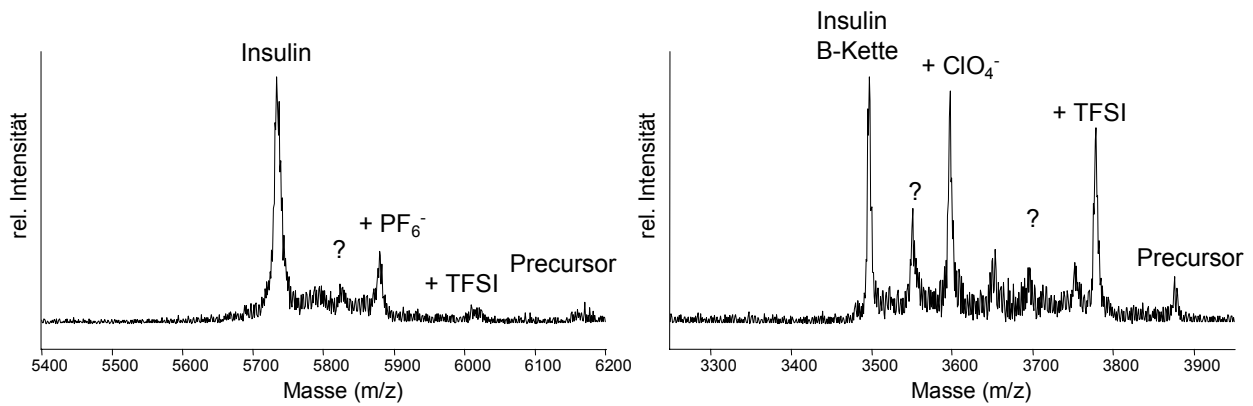
Neben der Laserintensität ist aber für die Zahl der detektierten Anionenaddukte und das Ausmaß von Fragmentierungen vor allem die Matrix entscheidend. Die Matrix 3-HPA, die als besonders schonend bekannt ist, führt zu der höchsten beobachteten Zahl Addukte. Auch mit vielen

anderen Matrices erscheint eine hohe Anzahl Addukte noch gut aufgelöst im Spektrum. Mit der Matrix  $\alpha$ CHCA ist dagegen bei größeren Analyten eine wesentlich stärkere Fragmentierung zu beobachten (s. Abb. D.3.51), so daß bereits bei Ubiquitin ( $m/z = 8565$ ) und Cytochrom C ( $m/z = 12361$ ) eine Auflösung der Adduktensignale nicht mehr möglich ist und nur ein großer, über fast 2000 Da reichendes Signal detektiert wird.



**Abbildung D.3.5.2** : MALDI-Spektren von Cytochrom C (links) und Ubiquitin (rechts) unter Zusatz von  $\text{HPF}_6$ , jeweils präpariert mit zwei verschiedenen Matrices (Oben: 2,5-DHB, unten:  $\alpha$ CHCA, positiver Ionenmodus).

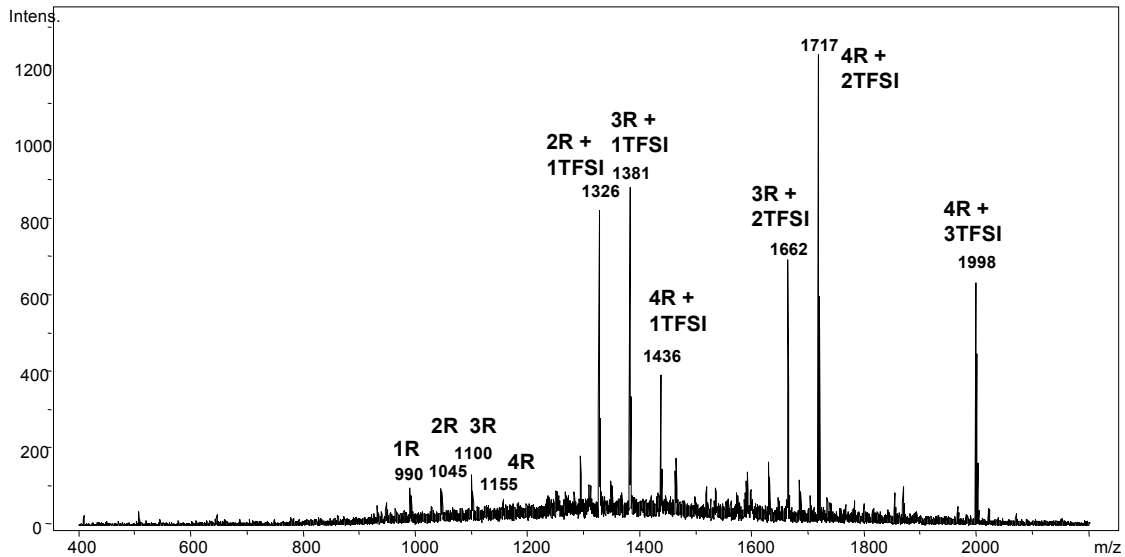
Daß zusätzlich zu Zerfällen in der Ionenquelle auch metastabile Zerfälle stattfinden, läßt sich durch PSD nachweisen. Bei der Selektion eines Adduktions wird schon bei geringen Laserintensitäten eine Abspaltung der Anionen (bzw. der durch Neutralisation entstandenen korrespondierenden Säuren) beobachtet. Dabei können selbst von Ionen, die im normalen MALDI-Spektrum eine sehr niedrige Intensität aufweisen, noch PSD-Spektren erhalten werden. Dies ist in Abb. D.3.5.3 am zwei Beispielen gezeigt, bei denen jeweils gemischte Anionenaddukte selektiert wurden. Trotz der sehr niedrigen Anregungsenergie ist die Intensität der Vorläuferionen in beiden Spektren verschwindend gering, die Intensität der Fragmentionen ist dagegen besonders hoch. Durch Herabsetzen der Reflektorspannung werden die metastabilen Fragmente fokussiert und erscheinen bei ihrem korrekten  $m/z$ -Verhältnis. Die Massendifferenz weißt den Hauptpeak als das eingesetzte Peptid und die Fragmente mit höheren Massen als einfache Anionenaddukte aus. Andere Fragmentierungen als die Neutralisation der Ionenpaare finden dagegen nur begrenzt statt, und unterhalb der Masse des intakten Analyten werden gar keine Fragmente detektiert.



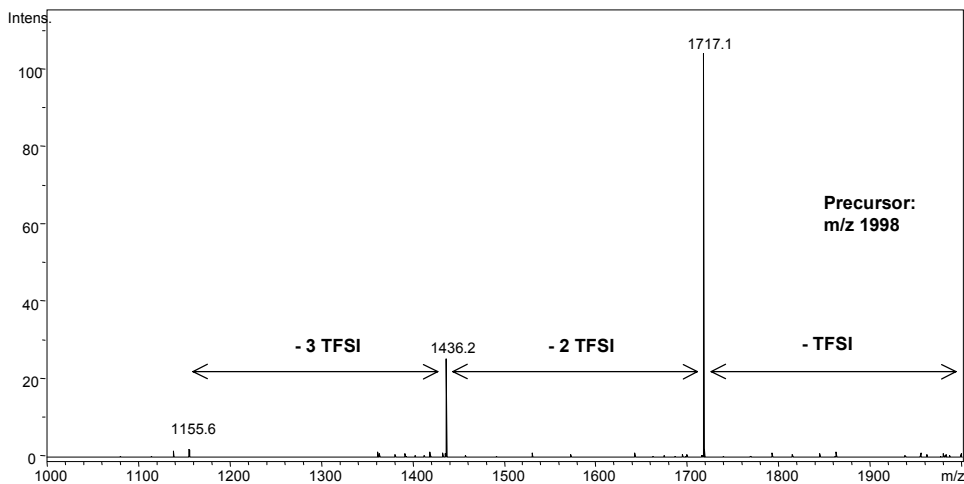
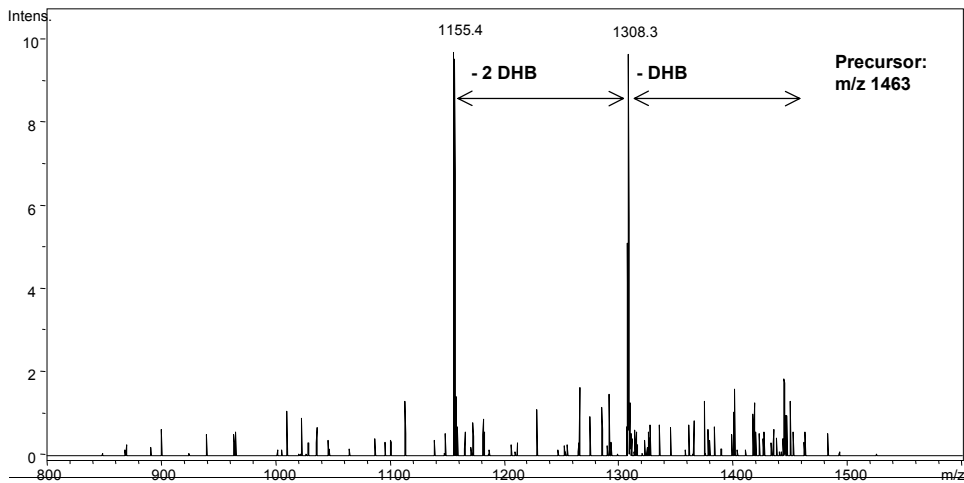
**Abbildung D.3.5.3 :** Metastabiler Zerfall (PSD) von gemischten Anionenaddukten bei MALDI; links: Insulin, rechts Insulin B-Kette. Die Laserintensität lag in beiden Fällen nur knapp über der Schwellbestrahlungsstärke (Matrix 3-HPA, positiver Ionenmodus).

Die gezeigten Versuche sind ein eindeutiger Nachweis des Verlustes von Anionenaddukten durch Fragmentierungen sowohl in der Ionenquelle als auch in der feldfreien Flugstrecke des MALDI-TOF-Massenspektrometers. Damit ist auch klar, daß diese Fragmentierungen und damit das Ausmaß der Anregung bei der MALDI-Analyse zumindest teilweise für die unterschiedlichen beobachteten Adduktverteilungen verantwortlich sind. Eine Verringerung der Anregung bei der Desorption/Ionisation sollte demnach zu einer intensiveren Adduktbildung führen. Abgesehen von der Verwendung besonders schonender Matrices (z.B. 3-HPA) kann dies auch durch instrumentelle Parameter erreicht werden. Obwohl hierzu noch keine eindeutigen Ergebnisse vorliegen, gilt die erst kürzlich eingeführte Bildung von MALDI-Ionen bei Atmosphärendruck (AP-MALDI) und die Detektion dieser Ionen mit einer Quadrupol-Ionenfalle (QIT) als eine sehr schonende Methode. Abb. D.3.5.4 zeigt eine AP-MALDI-QIT-Spektrum der bereits mehrfach in dieser Arbeit verwendeten argininhaltigen Peptide (Matrix 2,5-DHB). Im Vergleich zu der normalen MALDI-TOF Analyse (s. Abb. D.3.4.1) ist die Intensitätsverteilung der Anionenlagerungen in dem mit AP-MALDI erhaltenen Spektrum zu einer deutlich höheren Zahl von Anlagerungen verschoben. Trotzdem wird auch hier nicht ausschließlich die maximale Zahl der Anlagerungen beobachtet, wie dies bei  $\alpha$ CMCA der Fall ist. Dies spricht dafür, daß entweder auch AP-MALDI nicht schonend genug dafür ist, oder daß zusätzlich die weiter oben beschriebene Konkurrenz verschiedener Anionen bei deren Koordination an positiven Gruppen im Analyten eine Rolle spielt. Dies wird dadurch erhärtet, daß neben den TFSI-Addukten auch Matrixaddukte auftreten. Mit 3-HPA werden dagegen gar keine Spektren der argininhaltigen Peptide erhalten, und diese Matrix ist auch generell für AP-MALDI-QIT sehr schlecht geeignet. Dies könnte an der im Vergleich zu anderen Matrices wesentlichen höheren Tendenz zur Adduktbildung liegen.

Ein Vorteil der Ionenfalle ist, daß mit ihr eine genauere Selektion von MALDI-Ionen und deren gezielten CID-Fragmentierung möglich ist. Wie bei PSD führt auch die CID-Analyse von Anionenaddukten nahezu ausschließlich zum Verlust der entsprechenden Addukte. Diese Abspaltung der Anionenaddukte nach deren Neutralisation erfolgt schon bei sehr geringer Anregungsenergie. Zwei Beispiele dafür sind in Abb. D.3.5.5 gezeigt.



**Abbildung D.3.5.4 :** API-MALDI Spektrum eines Peptidgemisches unter Zusatz von HTFSI, aufgenommen mit einer Quadrupol-Ionenfalle. Die Sequenzen der Peptide sind in Abb. D.3.4.1 angegeben (Matrix 2,5-DHB, positiver Ionenmodus). Die Zahl der Arginine und TFSI-Anlagerungen ist an den Peaks angegeben.



**Abbildung D.3.5.5 :** CID-Spektren von zwei Anionenaddukten des Peptids mit der Sequenz ARGARGARGARG (s. Spektrum in Abb. D.3.5.4), aufgenommen mit API-MALDI-QIT. Oben:  $[(\text{ARG})_4 + 2\text{DHB}]$ , unten:  $[(\text{ARG})_4 + 3\text{TFSI}]$  (Matrix 2,5-DHB, positiver Ionenmodus).



### D.3.6. Diskussion: Addukte und Ionenpaare bei MALDI

Die wichtigste Information aus den vorgestellten Experimenten zur Adduktbildung ist die Tatsache, daß die Zahl der Anionenaddukte eindeutig mit der Zahl der basischen Stellen im Analyten korreliert. Dadurch wird klar, daß bei MALDI Ionenpaare zwischen protonierten, positiven Gruppen im Analytmolekül und negativ geladenen Anionen existieren. Die Bildung der Anionenaddukte ist zudem ein Beweis dafür, daß basische Analyte bei einer MALDI-Präparation aus saurer Lösung mehrfach positiv geladen sind und in dieser Form zusammen mit ihren Gegenionen im Matrixkristall eingebaut werden. Die Analyte behalten also ihren Ladungszustand, wie er durch die Bedingungen in Lösung vorgegeben ist, die Ladung wird aber durch Gegenionen kompensiert. Wie eng diese Ionenpaare im Kristall benachbart sind, läßt sich nicht genau sagen. Die Detektion der Addukte läßt jedoch den Schluß zu, daß die Ionenpaare zumindest nicht so weit voneinander entfernt sind, daß bei der Desorption eine vollständige Trennung erfolgt. Unterschiede bei der Bildung von engen und weniger engen Ionenpaaren, die zudem durch Lösungsmittel getrennt sein könnten, könnten jedoch die mit verschiedenen Analyten und Matrices beobachteten Unterschiede bei der Adduktbildung und bei der Ionisation (Ladungszustand) verursachen.

Auf der Basis des Cluster-Modells läßt sich die Bildung von Anionenaddukten anschaulich erklären (s. Abb. D.3.6.1). Der mehrfach positiv geladene Analyt (z.B. ein Peptid) ist zusammen mit seinem Gegenionen im Matrixkristall eingebaut. Durch den Laserpuls werden geladene Cluster freigesetzt, die durch Trennung eines der Ionenpaare entstehen können. Eine zweite Möglichkeit wäre die Photoionisation eines Matrixmoleküls und eine anschließende Neutralisation eines Anions durch Protonentransfer.<sup>37</sup> In beiden Fällen entsteht ein Defizit von genau einem Anion. Der so gebildete geladene Cluster verliert durch Desolvatation (als Folge der durch die Laseranregung im Cluster deponierten Energie oder auch durch Stoßanregung während der Beschleunigung) nach und nach Lösungsmittel und neutrale Matrixmoleküle. Dadurch werden die Ionenpaare zunehmend weniger gegenüber einer Neutralisation stabilisiert, und bei einer ausreichend großen Differenz der Gasphasenbasizitäten erfolgt ein Protonentransfer zwischen den Gegenionen. Die entstehende neutrale Säure ist weit weniger stark gebunden und kann genau wie ein Matrixmolekül verdampfen. Hat ein angelagertes Anion dagegen eine besonders niedrige Gasphasenbasizität, wie dies bei TFSI der Fall ist, wird für die Neutralisation eine wesentlich höhere Energie benötigt. Wenn dazu nicht genügend Energie zur Verfügung steht, erscheint ein Anionenaddukt im Spektrum.

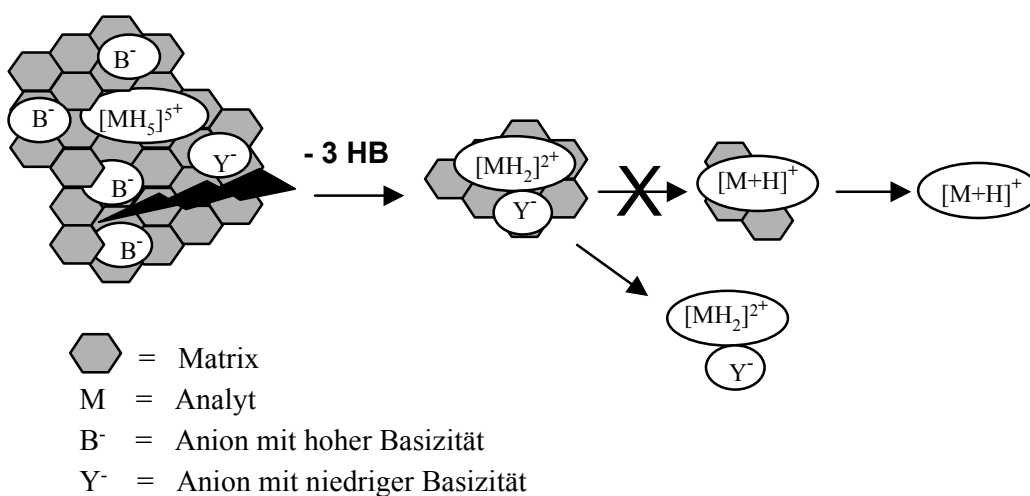


Abbildung D.3.6.1 : Modellvorstellung zur Bildung von Anionenaddukten bei MALDI.

<sup>37</sup> Im Gegensatz zur Ladungstrennung können durch Photoionisation aber nur positive Ionen gebildet werden.

Dies liefert zugleich eine Erklärung für das unter normalen Präparationsbedingungen fast vollständige Fehlen von Anionenaddukten bei MALDI. Ein Protonentransfer ist zwischen nahezu allen möglicherweise vorhandenen Anionen (Matrix, Zusätze, Verunreinigungen) und allen protonierten Analyten nur schwach endergonisch oder sogar exergonisch. Durch die mit MALDI verbundene Anregung erfolgt also in jedem Fall ein Verlust der Addukte. Durch die geringere Anregungsenergie ist dies z.B. bei ESI nicht generell der Fall, so daß dort unter schonenden Bedingungen Anionenaddukte detektiert werden können [Mir94, Wan96].

Die maximale Zahl der Addukte ist durch die Zahl der basischen Gruppen im Analyten bestimmt. Für eine positive Nettoladung des "Multi-Ionenpaares" muß mindestens eine positive Gruppe frei bleiben. Anionen müssen aber nicht direkt an positive Stellen koordiniert sein. Im negativen Ionenmodus wurde mit 3-HPA stets ein Addukt mehr gefunden, als basische Stellen im Molekül vorhanden waren. Dieses "zusätzliche" Anion kann nicht direkt an eine positive Ladung angelagert sein, kann aber trotzdem durch ionische Wechselwirkung gebunden sein. So kann z.B. das in Abb. D.3.6.1 gezeigte fünffach geladene Analyt durch Coulomb-Kräfte maximal sechs Anionen so fest binden, daß diese im MALDI-Spektrum erscheinen, wenn zusätzlich eine Neutralisation der Ionenpaare vermieden werden kann. Eine weitere, unspezifische Anlagerung von Anionen scheint jedoch nicht möglich zu sein. Die einfachste Begründung für diesen Umstand ist eine Coulomb-Abstoßung, da jedes zusätzliche Anion an ein bereits negativ geladenes "Multi-Ionenpaar" angelagert werden müßte. Umgekehrt wird aber auch eine zweite Abtrennung eines Anions von einem bereits positiv geladenen Ionenverband durch die Coulomb-Anziehung schwieriger. Diese Überlegungen bieten eine einfache und nachvollziehbare Erklärung für die bevorzugte Detektion von einfach geladenen Ionen bei MALDI. Darüber hinaus legen die oben vorgestellten Ergebnisse nahe, daß ein großer Teil der Analyte in der Form vollständig neutralisierter Ionenpaare vorliegen und daher in der MALDI-MS nicht detektiert werden.

Es zeigte sich, daß abgesehen von der räumlichen Nähe der Ionen ein erschwerter Protonentransfer innerhalb des Ionenpaares die wesentliche Bedingung für das Auftreten von Addukten ist. Ist die bei dieser Neutralisation freiwerdende Energie geringer als die Coulomb-Anziehung der Ionen, muß zusätzlich Energie aufgebracht werden, um die Energiebarriere für die Gesamtreaktion zu überwinden. Bei MALDI kann diese Energie nur durch eine direkte Anregung von Molekülen durch den Laser, durch thermische Anregung oder durch Kollisionen erfolgen. Da die meisten Analyte bei gängigen Laserwellenlängen nicht absorbieren, dürfte eine Energiezufuhr hauptsächlich durch Anregung innerhalb des Festkörpers (bzw. im Cluster) oder durch Stöße erfolgen. Bei Kollisionen erfolgt eine Umwandlung von kinetischer Energie (die wiederum aus dem MALDI-Prozeß stammt) in interne Energie der Moleküle bzw. Ionenpaare. Diese Sichtweise wird durch die beobachteten Fragmentierungen, z.B. bei höheren Laserintensitäten, bestätigt. Durch die höhere Energiezufuhr hat ein größerer Anteil der Ionenpaare genügend Energie zur Verfügung, um die Barriere der Ionenpaar-Neutralisation zu überwinden, so daß weniger Addukte im Spektrum erscheinen.

Die Energiebarriere für die Neutralisation eines Ionenpaares läßt sich anhand der Gasphasenbasizitäten und der Coulomb-Kräfte bestimmen. Durch einen Vergleich mit den unzersetzt detektierten Anlagerungen lassen sich daraus auch die bei MALDI auftretenden Anregungsenergien abschätzen. Für Modellsysteme aus Formiat und einer organischen Base (Guanidin, Ammonium oder Imidazol) wurden unter Einbeziehung möglicher Wasserstoffbrücken die Coulomb-Kräfte zwischen den Ionenpaaren berechnet [Fül96]. Diese liegen zwischen 490 und 590 kJ/mol bei einem Abstand der Ionen von 250 – 390 pm. Durch partielle Solvation wird die Anziehung auf Werte zwischen 390 und 415 kJ/mol reduziert. Diese Energiebarriere muß durch die Energiefreisetzung beim Protonentransfer aufgebracht werden. Die Reaktionsenthalpie der

Neutralisation beträgt aber z.B. bei einem Ionenpaar zwischen protoniertem Arginin (GB = 1007 kJ/mol) und TFSI (GB = 1221 kJ/mol) nur  $\Delta\text{GB} = 214$  kJ/mol. Die restliche Energie muß daher durch den MALDI-Prozeß aufgebracht werden, was augenscheinlich nicht der Fall ist.

Die bei MALDI auftretende Anregungsenergie ist aber bei den verschiedenen Matrices deutlich unterschiedlich und führt daher auch zu einem unterschiedlichen Ausmaß an Anionenlagerungen. Solange die Differenz der GB weniger als 214 kJ/mol beträgt, scheint die Anregungsenergie bei allen Matrices zu gering für einen Zerfall der entsprechenden Addukte zu sein, da die oben erwähnten Arginin/TFSI-Addukte nahezu immer detektiert werden. Aber auch an Lysin- und Histidin-Resten werden zumindest bei Analyten mit höheren Massen teilweise Anionenaddukte gefunden. Die Differenz der GB beträgt hier 269 kJ/mol. Dies führt zu der Abschätzung, daß ab einer Differenz der Gasphasenbasizitäten von etwa 300 kJ/mol keine Addukte mehr den MALDI-Prozeß überstehen. Nach Abzug der Coulomb-Energie läßt sich daraus die durch die Matrix aufgebrachte Aktivierungsenergie abschätzen. Ohne Solvatationseffekte würde diese 190 bis 290 kJ/mol betragen, bei teilweise solvatisierten Ionenpaaren läge die notwendige Anregungsenergie nur noch bei 50 bis 115 kJ/mol.<sup>38</sup> Diese Rechnungen zeigen aber auch, daß ein großes Maß an Unsicherheit bei der Abschätzung der MALDI-inhärenten Anregungsenergie verbleibt. Außerdem muß man berücksichtigen, daß stets eine Energieverteilung existiert, so daß einige Ionenpaare genügend Energie für die Neutralisation haben und andere nicht.

Die schonendere Matrix 3-HPA führt zu einer vermehrten Anzahl Addukte, gleichbedeutend mit einer etwas höheren Differenz der GB, die gerade noch toleriert wird ohne daß die Addukte zerfallen. Selbst am schwach basischen N-Terminus werden TFSI-Addukte detektiert, obwohl die Differenz der GB immerhin 369 kJ/mol beträgt. 3-HPA scheint also zu einer geringeren Anregung der Analytmoleküle zu führen, die Anregungsenergie ist demnach etwa 70 kJ/mol geringer als bei anderen Matrices. Dies wird auch an der allgemein geringen Fragmentierung mit dieser Matrix sichtbar. Die schonende Natur von 3-HPA könnte mit einer effektiveren Kühlung bei der Expansion ins Vakuum zusammenhängen, in Übereinstimmung mit der bei 3-HPA besonders hohen Startgeschwindigkeit der Ionen. Allerdings kann die Energetik nicht der alleinige Grund für die erhöhte Adduktbildung sein, da auch mit 3-HPA keine Addukte zwischen Arginin und TFA beobachtet werden, obwohl die Differenz der GB nur 318 kJ/mol beträgt. Die unterschiedliche Koordination verschiedener Ionen spielt dabei sicher eine Hauptrolle. Zusätzlich könnten aber weitere energetische Terme wie Wasserstoffbrücken oder Unterschiede bei der Solvatation eine Rolle spielen. Coulomb-Kräfte zwischen solvatisierten Ionen sind wesentlich geringer als bei Kontaktionenpaaren (s. obige Energieabschätzungen), und eine verminderte Solvatation oder ein engerer Kontakt der Ionen könnte zu einer gesteigerten Adduktbildung führen. Zusätzlich könnte die Kinetik des Protonentransfers und die Art des Übergangszustands bzw. dessen Aktivierungsenergie eine Rolle spielen.

Die Höhe des Energieeintrags bzw. der Anregung der Ionen beeinflusst die beobachtete Adduktverteilung. Durch eine stärkere Anregung bei der MALDI-Ionenbildung werden mehr Ionenpaare so weit angeregt, daß sie unter Neutralisation zerfallen. Dabei spielt vor allen Dingen die Laserintensität und der instrumentelle Aufbau des Massenspektrometers (Vakuum, Zeitskala der Ionendetektion, Art der Ionenkühlung) eine Rolle. Sicherlich hat aber auch die Matrix einen entscheidenden Anteil am Ausmaß der metastabilen Fragmentierungen.

---

<sup>38</sup> Solvatisierte Ionenpaare können zudem auch wesentlich stabiler sein als Kontaktionenpaare, z.B. wenn die  $\Delta\text{GB}$  durch Solvatation stark herabgesetzt wird oder wenn H-Brücken und Resonanzeffekte eine Rolle spielen; dies ist auch bei den genannten Modellsystemen der Fall [Fül96]

Wie in Kap. D.3.4 bereits erläutert wurde, gibt es einen weiteren Mechanismus, der eine Änderung der Adduktverteilung bewirkt. Befinden sich verschiedene Anionen in Lösung, so können sich auch unterschiedliche Anionen an eine positive Stelle im Analyt unter Bildung eines Ionenpaares anlagern. Anionen mit hoher GB erscheinen aufgrund der effektiven Neutralisation nicht im Spektrum, während Anionen mit niedriger GB Addukte bilden. Durch "Verdrängung" von schwach basischen Anionen wird also die Anzahl der gebildeten Addukte geringer. Dafür kommen neben Anionen aus Zusätzen (Säuren, Salze) vor allem Matrixanionen in Frage. Da die Adduktverteilung nicht alleine durch die Energetik des Protonentransfer erklärbar ist, liegt ein Einfluß der Konkurrenz verschiedener Anionen nahe. Unterstützt wird diese These durch die großen Unterschiede bei der Adduktbildung zwischen sauren und nicht-sauren Matrices. Letztere können keine Matrixanionen bilden, und konsequenterweise wird auch fast gar keine Adduktverteilung mehr beobachtet. Allerdings sind die bei sauren Matrices beobachteten Intensitätsverteilungen sehr unterschiedlich.

Im Prinzip sind also zwei Parameter entscheidend für die Adduktbildung: Die Koordination im Matrixkristall und die Energetik des Zerfalls. Welche dieser beiden Einflüsse letzten Endes entscheidend ist, ist nicht ohne Weiteres zu sagen. Beide sind auch nicht unabhängig voneinander. Ohne eine Lokalisierung der schwach basischen Anionen (z.B. TFSI) am protonierten Analyten können keine Anionenaddukte gebildet werden, daher ist dies eine notwendige Voraussetzung. Aber auch eine geringe Differenz der Gasphasenbasizitäten in den Ionenpaaren ist eine zwingende Voraussetzung, da es sonst unweigerlich zum Zerfall der Ionenpaare kommt. Im Gegensatz zur Adduktbildung selbst ist aber die Anregungsenergie in Grenzen variabel und läßt sich z.B. durch die Auswahl der Matrix und instrumentelle Parameter anpassen. Die Adduktbildung ist bei AP-MALDI mit QIT-Detektion wesentlich stärker. Dies könnte auch ein Grund für die Schwierigkeiten bei Verwendung von 3-HPA als Matrix für AP-MALDI sein. Da die Art der Koordination von Ionen im Matrixkristall nicht fix ist und bei verschiedenen Präparationen unterschiedlich sein kann, ließe sich auch die Addukt- und Ionenpaarbildung im Kristall prinzipiell beeinflussen, was bislang aber nicht gezielt möglich ist.

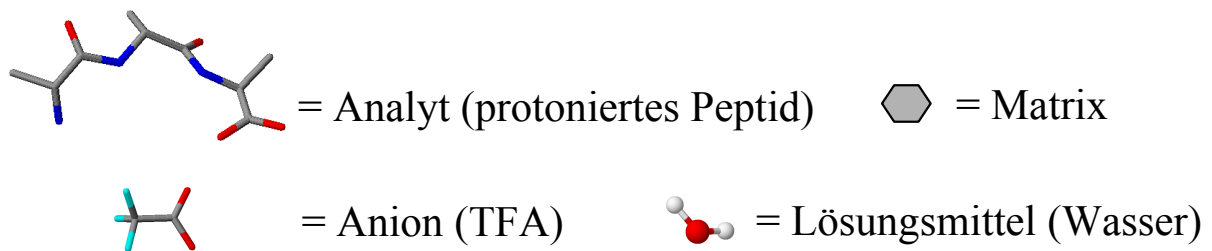
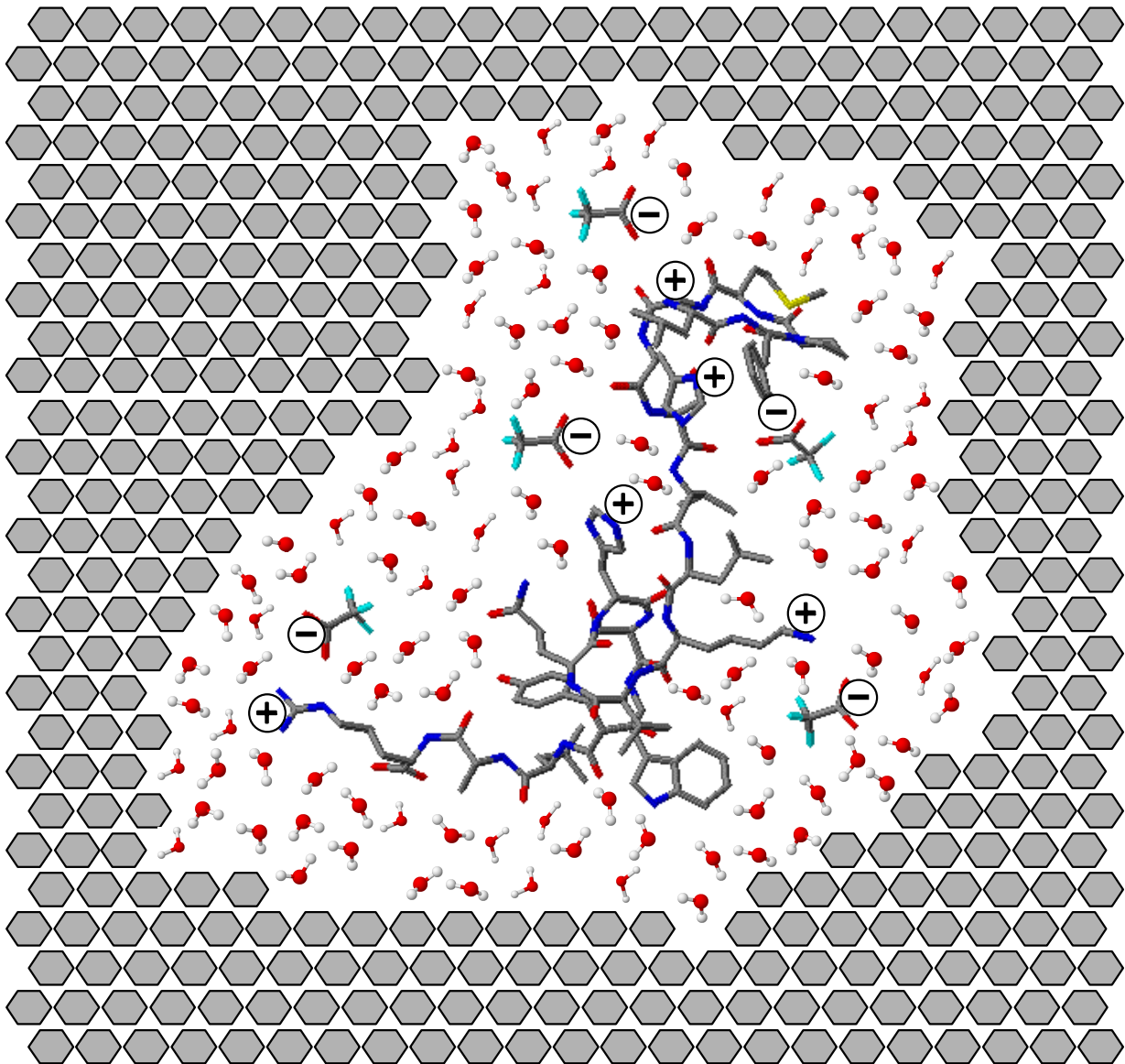
Interessant ist auch ein Vergleich der Anionisierung mit den in Kap. D.2.2 gezeigten Spektren der stark basischen Protamine. Bei einer hohen Zahl Anionenaddukte und zusätzlicher metastabiler Fragmentierung werden die einzelnen Addukte nicht mehr aufgelöst und erscheinen als breites Signal im MALDI-Spektrum (s. z.B. Abb. D.3.5.2). Die in Kap. D.2.2 gezeigten Protamin-Spektren sehen sehr ähnlich aus. Es könnte also gut sein, daß die großen Schwierigkeiten bei der MALDI-Analyse von stark basischen Verbindungen auf eine intensive Adduktbildung und den metastabilen Zerfall dieser Addukte zurückzuführen ist. Bei zunehmender Ladungsdichte des mehrfach positiv geladenen Analytions könnten auch Anionen mit höherer Basizität so fest gebunden sein, daß erst bei vermehrter Energiezufuhr eine Neutralisation möglich wird. Dies würde auch erklären, warum sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus nahezu dieselben Spektren entstehen. Die dann stattfindenden metastabilen Zerfälle machen eine Analyse dieser Verbindungen endgültig unmöglich. Geht man zudem von einer Ladungstrennung als möglichem Ionisationsmechanismus aus, wäre auch diese im Falle einer extrem basischen Verbindung mit einer Unzahl von Gegenionen erschwert. Jedes Gegenion spürt nicht nur die Coulomb-Anziehung einer einzigen positiven Ladung, sondern wird durch das vielfach geladenen Analytion besonders stark angezogen und wird daher auch eine möglichst enge Koordination eingehen. Diese Schlußfolgerung bedeutet aber auch, daß eine Ladungsreduktion durch Elektronentransfer vermutlich eine geringe Rolle spielt, da die Analyten zwar mehrfach positiv im Kristall eingebaut werden, aber eine Trennung von ihren Gegenionen bei MALDI nicht möglich ist.

## **E Diskussion: Konsequenzen für den MALDI-Mechanismus**

Durch die Konservierung der Analyte in ihrem "Lösungszustand" bei ihrem Einbau in Matrixkristalle ist die Ionenbildung über eine Freisetzung präformierter Ionen bei MALDI prinzipiell denkbar. Dies bedeutet allerdings nicht, daß eine "Verdampfung" von Ionen stattfinden kann, da die inkorporierten Ionen bzw. Ionenpaare sich signifikant von den letztendlich detektieren Ionen unterscheiden. Erst nachfolgende Reaktionen führen zu den beobachteten Produkt-Ionen, und auch aus Zwitterionen ohne Nettoladung kann dabei letztendlich ein geladenes Molekül entstehen. Durch die präformierten Ionen(paare) müssen allerdings andere Sekundärreaktionen stattfinden, als dies bei neutralen Molekülen, die weder zwitterionisch sind noch eine Nettoladung tragen, der Fall wäre. Die wesentlichen Schritte der Ionenbildung bei MALDI umfassen den Analyteinbau, die Desorption/Ionisation und nachfolgende Reaktionen, insbesondere Neutralisationen durch Protonentransfer.

### **E.1. Der Analyt im Matrixkristall: Konservierung des Lösungszustandes**

Bei MALDI werden organische Analytmoleküle in die kristalline Matrix eingebaut. Dies gilt für alle Matrices, die für MALDI gut bis sehr gut geeignet sind, und nahezu unabhängig von der Substanzklasse der eingebauten Analyte. Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß die Analyte in der Form eingebaut werden, in der sie bereits in der Lösung vorliegen. Das bedeutet, daß sie in Abhängigkeit vom pH-Wert protoniert oder deprotoniert sind und damit auch im Kristall geladen vorliegen. Geladene Analyte werden mit den vorhandenen Gegenionen als "Multi-Ionenpaare" in die Matrixkristalle eingebaut (s. Abb. E.1.1). Zusätzlich ist bei den meisten Matrices und Präparationsprotokollen restliches Lösungsmittel vorhanden, so daß die Ionen höchstwahrscheinlich (zumindest partiell) solvatisiert sind. Dies ermöglicht die räumliche Trennung von Kationen und Anionen im Matrixkristall, so daß neben engen Kontaktionenpaaren auch Ionenpaare auftreten können, die durch Lösungsmittel und/oder Matrixmoleküle getrennt sind. Das Ausmaß der Solvatation und die Entfernung zwischen den Ionen dürfte einen erheblichen Einfluß auf die Ionisation und auf die Adduktbildung haben. Solche Unterschiede bei der Kristallisation könnten auch eine der Ursachen für unterschiedliche Eigenschaften verschiedener Matrices sein. In jedem Fall liegen aber die Analyte im Matrixkristall in einer Form, vor, die der Ausgangssituation in Lösung weitgehend entspricht. Diese Ausgangssituation ist in Abb. E.1.1 am Beispiel eines fünffach protonierten Peptids mit TFA-Anionen als Gegenionen und Wasser als Lösungsmittel dargestellt.



**Abbildung E.1.1** : Konservierung des gelösten Analyten im Matrixkristall am Beispiel eines fünffach geladenen Peptids mit  $\text{TFA}^-$  als Gegenionen und Wasser als Lösungsmittel.

## E.2. Ionisation bei MALDI

Die Laserenergie wird durch die Matrix absorbiert, und bei ausreichend kurzer Pulsdauer kann der Energieüberschuß in dieser kurzen Zeit weder thermisch noch durch Fluoreszenz in nennenswertem Maße abgebaut werden. Daraus resultiert ein Druckaufbau, der sich ab einer bestimmten Energieschwelle in einer explosiven Auflösung der festen Phase entlädt. Für diesen Prozeß gibt es im Prinzip zwei Modelle. Zum einen könnte eine Sublimation stattfinden (Phasenübergang von fest nach gasförmig bei konstanter Temperatur), zum anderen könnte aber auch eine sog. Phasenexplosion stattfinden. Darunter wird meist eine plötzliche, explosive Auflösung einer festen Phase verstanden, die bei Erreichen einer bestimmten Temperatur durch die plötzliche Instabilität der (überhitzten<sup>39</sup>) Phase verursacht wird (*explosive boiling*) [Vog03, Zhi03]. In jedem Fall entstehen dabei sowohl größere Molekülverbände (Cluster) als auch einzelne Moleküle. Letztere werden allerdings auch schon bei geringerem Energieeintrag gebildet (thermische Desorption), während Cluster nur oberhalb eines matrixspezifischen *threshold* entstehen.

Es gibt mittlerweile viele Hinweise, daß die Ionisation eng mit der Bildung dieser Cluster zusammenhängt und daß ein gewisser Prozentsatz der entstehenden Cluster geladen ist. Verbindet man die oben diskutierte Ausgangssituation des im Matrixkristall "gelösten" Analyten mit der Bildung von Clustern, so ergeben sich eine Reihe von Konsequenzen für den MALDI-Mechanismus. Die geladenen Cluster können auf verschiedenen Wegen gebildet werden. Eine einfache Möglichkeit der Bildung von geladenen Clustern ist die statistische Trennung der im Matrixkristall vorhandenen Ionenpaare bei der Ablation. Die für die Ladungstrennung notwendige Energie könnte durch die angeregten Matrixmoleküle oder durch die bei der Ablation resultierende kinetische Energie aufgebracht werden, zumal die Coulomb-Energie durch Solvation reduziert sein sollte. Die Freisetzung von Ionen erfolgt dann sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus über nachfolgenden Reaktionen, in erster Linie Desolvation durch Verdampfung neutraler Matrixmoleküle und Neutralisationen durch Protonentransfer.

Zum anderen könnte eine Photoionisation eines Matrixmoleküls erfolgen, die eine Erklärung für die auftretenden radikalischen Molekülionen wären. Für die Photoionisation scheint ein *energy pooling* Mechanismus verantwortlich zu sein, bei dem eine Kopplung angeregter Matrixmoleküle zur Ionisation führt. Zusätzlich könnte die Ionisationsenergie im Cluster durch Solvation herabgesetzt sein. Eine Verlegung der Photoionisation in Matrixcluster hätte jedoch zur Folge, daß die nachfolgenden Reaktionen (in erster Linie Protonentransfer) nur innerhalb des Clusters erfolgen können. Ein weiterer Unterschied zu früheren Überlegungen ist, daß durch die Existenz der Analyte als Ionenpaare andere nachfolgende Reaktionen stattfinden müssen als im Falle von neutralen Analyten. Der Protonentransfer erfolgt immer zu der am stärksten basischen Verbindung. Dies sind bei Ionenpaaren die Anionen, die aufgrund ihrer negativen Ladung stets eine höhere Basizität besitzen als neutrale Basen. In der Konsequenz werden also stets Anionen neutralisiert, so daß ein positives Gegenion übrigbleibt. Der so entstandene geladene Cluster ist absolut identisch mit einem positiv geladenen Cluster, der durch Ladungstrennung entstanden ist (s. Abb. E.2.1).

---

<sup>39</sup> Eine überhitzte, metastabile Phase entsteht, wenn der Energieeintrag schneller ist als der Energieverbrauch durch Verdampfen bzw. Sieden. Wird dabei jedoch ein (druck- und temperaturabhängiges) Stabilitätslimit überschritten, relaxiert die übersättigte Phase spontan unter erheblichem Druckanstieg zu einer thermodynamisch stabilen Mischung aus kondensierter und gasförmiger Phase (*spinodal decomposition*).





unterschiedlichen Wellenlängen spricht gegen diese Möglichkeit, sofern man von einem einheitlichen MALDI-Mechanismus für alle Wellenlängen ausgeht.

Neben der Ionisation über die Bildung geladener Cluster, die eine schonende Detektion selbst von hochmolekularen Biopolymeren ermöglicht, scheint aber noch ein zweiter Prozess möglich zu sein. Dieser alternative Weg, die Verdampfung gefolgt von einer Kationisierung in der Gasphase, ist aber nur bei kleinen, neutralen Molekülen (Zucker, technische Polymere) möglich [Glü01]. Die Spektren der pH-Indikatoren mit  $\alpha$ CMCA zeigen, daß auch ein Elektronentransfer oder eine direkte Photoionisation als zusätzlicher Ionisationspfad existieren, wenn die Analyte eine geringe Ionisationsenergie besitzen. In allen diesen Fällen unterstützt die Matrix die Desorption und drängt die Fragmentierung zurück, die z.B. bei den Indikatoren ohne Matrix zum Teil erheblich ist. Diese Hilfsfunktion der Matrix beschränkt sich aber auf die Desorption und ist unabhängig von der Ionisation, so daß man diesen Mechanismus auch als "*matrix-aided desorption*" bezeichnen könnte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse machen deutlich, daß die Art der letztendlich gebildeten Ionen bei MALDI ganz entscheidend von den Ausgangsbedingungen in Lösung und bei der Kristallisation abhängig sind. Darüber hinaus sind aber auch nachfolgende Reaktionen im Cluster von Bedeutung. Die Ergebnisse in Kap. D.2 zeigen, daß außer Säure-Base-Reaktionen auch weitere Kriterien wie Polarität, Löslichkeit und Molekülgröße einen Einfluß haben. Der Hauptgrund dafür dürfte sein, daß alle genannten Faktoren die Kristallisation und demnach die Art des Analyteinbaus ändern.

Die Art der gebildeten Ionen ist jedoch hauptsächlich durch den pH-Wert und die Säure-Base-Chemie der Analyte bestimmt. Dabei spielen sowohl die Basizität/Acidität in Lösung als auch in der Gasphase eine Rolle (s. Kap. D.2.5). Nur Analyte, die bereits in Lösung und damit im Matrixkristall eine geladene Gruppe tragen, werden mit MALDI empfindlich detektiert. Ob die Ladung aber tatsächlich am Analyten bleibt und nicht durch Neutralisationsreaktionen verloren geht, ist durch die Gasphasenbasizitäten bzw. -aciditäten aller beteiligten Verbindungen bestimmt. Aus einem Cluster wird letztendlich das Molekül als Ion hervorgehen, daß die höchste Basizität (bzw. Acidität im negativen Ionenmodus) in einem aus wenigen Molekülen bestehenden Cluster aufweist.

### E.3. Neutralisation von ionischen Addukten durch Protonentransfer

Im Gegensatz zur thermischen Desorption und Gasphasenkationisierung werden die Ionen beim Cluster-Mechanismus nicht direkt gebildet. Vielmehr erfolgen innerhalb des Clusters Reaktionen, die nach und nach zur Freisetzung eines geladenen Moleküls führen. Für die Desolvatation der Cluster ist vermutlich eine zusätzliche Aktivierung durch Stöße erforderlich. Dies trifft insbesondere für die Neutralisation von Ionenpaaren über Protonentransfer zu, die durch die Coulomb-Kräfte eine gewisse Aktivierungsenergie benötigen bzw. oft sogar endotherm sind. Allerdings werden nur dann Addukte detektiert, wenn die Neutralisation sehr stark endotherm ist (je nach Matrix mindestens 50 - 100 kJ/mol, ohne Solvataion sogar 200 – 300 kJ/mol) oder wenn eine solche Neutralisation durch Protonentransfer gar nicht möglich ist (z.B. Addukte mit Metallkationen). Eine stärkere Anregung durch die Erhöhung der Laserenergie, die Verwendung einer weniger schonenderen Matrix oder CID-Aktivierung führt zu einer verstärkten Energiezufuhr, die auch bei stabilen Ionenpaaren zur Neutralisation und damit zu einer geringeren Adduktbildung führen kann. Weitere mögliche nachfolgende Reaktionen im Cluster sind der Transfer von Wasserstoff-Atomen sowie in bestimmten Fällen die Übertragung von Elektronen.

Die Freisetzung der Analytionen aus den Clustern erfolgt nach folgendem Schema (M = Analytmolekül, ma = Matrix, A = Anion, B = Base, {...} = Cluster):

- $\{ (M+nH)^{n+} + (n-1)A^- + x ma \} \rightarrow MH^+ + (n-1)AH + x ma$
- $\{ (M-nH)^{n-} + (n-1)BH^+ + x ma \} \rightarrow (M-H)^- + (n-1)B + x ma$

Die erste Reaktion beschreibt den typischen Fall der Peptid- bzw. Proteinanalyse aus saurer Lösung. Die koordinierten Anionen können entweder Matrixanionen oder Anionen einer zugegebenen Säure sein. Der zweite Fall beschreibt die Analyse von Oligonukleotiden aus nicht zu saurer Lösung.<sup>40</sup> Die Gegenionen können prinzipiell auch hier Matrixionen sein, aber nicht alle Matrices können in protonierter, kationischer Form in Lösung existieren. In der Regel wird daher die Funktion des Gegenions von Ammoniumionen eingenommen, die zu diesem Zweck zugesetzt werden müssen. Geschieht dies nicht, bleiben als Gegenionen nur noch Metallkationen übrig, die aber nicht durch Protonentransfer neutralisiert werden können und daher in Form von Kationenaddukten im Spektrum erscheinen.

Aber auch die Bildung von Ionen mit inverser Polarität ist mit diesem Ansatz einfach zu erklären. Während die Ladung im obigen Fall durch ein fehlendes Gegenion verursacht wird, führt ein überschüssiges Gegenion zu Ionen mit entgegengesetzter Polarität:

- $\{ (M+nH)^{n+} + (n+1)A^- + x ma \} \rightarrow (M + A^-) + x ma \quad [ \rightarrow (M-H)^- + AH ]$
- $\{ (M-nH)^{n-} + (n+1)BH^+ + x ma \} \rightarrow (M + BH^+) + x ma \quad [ \rightarrow MH^+ + B ]$

Dabei werden aus dem gleichen Vorläufer je nach Zahl der Gegenionen positive oder negative Analytionen gebildet. Bei der "Ladungsinversion" wird allerdings die letzte Reaktion, die Freisetzung der geladenen Analyte, durch die Gasphasenbasizitäten der beteiligten Verbindungen bestimmt. Diese Reaktion führt nicht in allen Fällen auch zu Bildung von Analytionen. Unterbleibt der letzte Protonentransfer, kann durch Trennung des verbliebenen ionischen Addukts vom Analyten auch ein neutraler Analyt entstehen. Da Anionen generell schwächer gebunden sind als Kationen,

<sup>40</sup> Etwa ab pH 3 werden Nucleobasen mit Ausnahme von Thymin protoniert, so daß Zwitterionen entstehen.

trifft dies vor allen Dingen auf die Bildung negativer Ionen zu, was zugleich eine mögliche Erklärung für Intensitätsunterschiede zwischen positivem und negativem Ionenmodus sein könnte.

Die Detektion von Addukten ist demnach nur dann gegeben, wenn der Zwischenzustand des oben beschriebenen Prozesses der Ionenpaar-Neutralisation durch energetische oder mechanistische Gründe konserviert wird. Dies führt zu folgender Modifikation der obigen Gleichungen:

- $\{ (M+nH)^{n+} + (n-1)A^- + x ma \} \rightarrow [(M+nH)^{n+} + (n-1)A^-]^+ + x ma$
- $\{ (M+nH)^{n+} + (n+1)A^- + x ma \} \rightarrow [(M+nH)^{n+} + (n+1)A^-]^- + x ma$

Dadurch werden stabile ionische Produkte auf der Stufe von Ionenpaaren gebildet und werden auch als solche im MALDI-Spektrum detektiert.

#### E.4. Unterdrückungseffekte und Ladungszustand



Auf der Basis des dargelegten Modells für die Ionenbildung lassen sich eine Reihe von MALDI-Phänomenen erklären. Besonders charakteristisch für MALDI sind die starken Unterdrückungseffekte, die eine Quantifizierung äußerst schwierig machen, und der insgesamt sehr niedrige Ladungszustand, der im wesentlichen  $\pm 1$  beträgt.

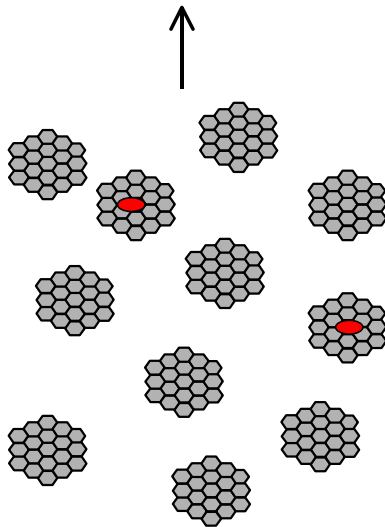
Eine Unterdrückung bestimmter Ionen könnte auf folgende Weise zustande kommen: Erfolgt die Bildung der Molekülcluster statistisch und ist zudem die Matrix in großem Überschuß vorhanden, so ist mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nur ein oder gar kein Analyt pro Cluster vorhanden. Nach einer Ionisation dieser Cluster über einen der genannten Mechanismen kann ein Protonentransfer innerhalb des Clusters erfolgen. Letztendlich landet das Proton an der am stärksten basischen Stelle innerhalb des Clusters. Da aber viele Analyte bereits geladen sind bzw. basische und/oder saure Gruppen im Molekül tragen, entstehen aus diesen Clustern mit einer hohen Wahrscheinlichkeit Analytionen. Die bevorzugte Reaktion ist dabei die Neutralisation eines Anions. Sind dagegen keine Analyte im Cluster vorhanden, können nur Matrixionen oder Ionen von Verunreinigungen entstehen (s. Abb. E.4.1.A).

Ist die Analytkonzentration dagegen so groß, daß statistisch in jedem Cluster ein Analytmolekül vorhanden ist, entstehen nur noch Analytionen und die Bildung von Matrixionen wird unterdrückt (s. Abb. E.4.1.B). Bei noch höherer Analytkonzentration werden vermehrt Multimere detektiert, da pro Cluster mehr als ein Analyt vorhanden ist (s. Abb. E.4.1.C). Wenn zwei unterschiedliche Analyten in einem Cluster vorhanden sind, wird bevorzugt der Analyt mit der basischsten Gruppe ionisiert. Auch Unterdrückungseffekte zwischen protonierten und kationisierten Spezies sind auf diese Weise leicht zu erklären (s. Abb. E.4.1.D). Existiert ein Analyt als Zwitterion im Matrixkristall, so kann an der deprotonierten Säurefunktion ein Kation koordiniert sein. In einem positiv geladenen Cluster würde ein überschüssiges Proton auch in diesem Fall an der basischsten Stelle landen. Dies könnte z.B. die anionische Gruppe am Analyten selbst sein, es könnte aber auch ein an der protonierten Stelle als Gegenion koordiniertes Anion sein (s. Abb. E.4.2). In beiden Fällen entstehen bei hoher Analytkonzentration keine protonierten Matrixionen, sondern nur kationisierte Analytionen. Somit findet formal eine Unterdrückung der Matrixionen durch einen kationisierten Analyten statt.



Bei den in Kap. E.2 betrachteten Ionisationsmechanismen sind nur einfachgeladene Cluster berücksichtigt worden, die bei MALDI den größten Anteil der detektierten Ionen ausmachen. Eine Ladungsreduktion mehrfach geladener Analyte könnte durch Elektronen verursacht werden, aber obwohl Reaktionen mit Elektronen bei bestimmten Analyten eindeutig nachgewiesen wurde, fehlen nach wie vor gesicherte Erkenntnisse zum Elektronentransfer bei Biomolekülen. Die bevorzugte Bildung von einfach geladenen Ionen bei MALDI läßt sich vor dem Hintergrund der Cluster-Ionisation und der Ergebnisse zur Adduktbildung mit Anionen auch wie folgt interpretieren: Durch die Koordination der Ionenpaare wird eine mehrfache Ladungstrennung zunehmend unwahrscheinlicher. Ist ein Gegenion eines mehrfach geladenen Analytions bereits weit entfernt, so wird die Coulomb-Anziehung auf die übrigen Gegenionen durch die positive Nettoladung des Analyten stärker. Daher wird die Tendenz zur Bildung eng benachbarter Ionenpaare in Lösung und nachfolgend im Matrixkristall größer, die in der Folge aufgrund der räumlichen Nähe auch schwieriger zu trennen sind. Aber auch eine mehrfache Photoionisation wird je nach Clustergröße zunehmend unwahrscheinlicher.

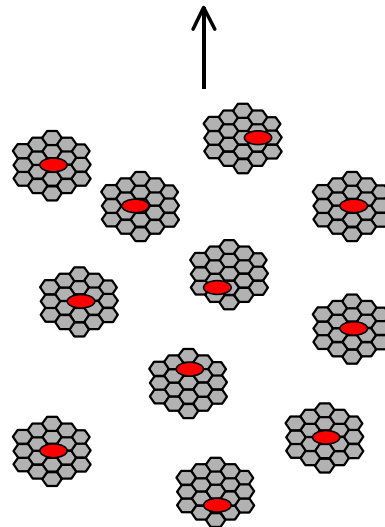
**A: niedrige Analytkonzentration**

2 Analytionen   
 9 andere Ionen   
 (Matrix, Verunreinigungen, Zusätze)







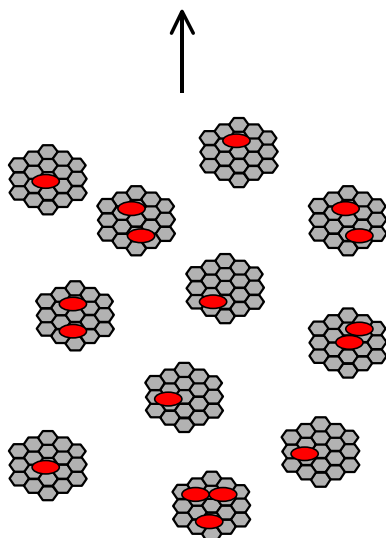
**B: hohe Analytkonzentration**

11 Analytionen   
 keine anderen Ionen 






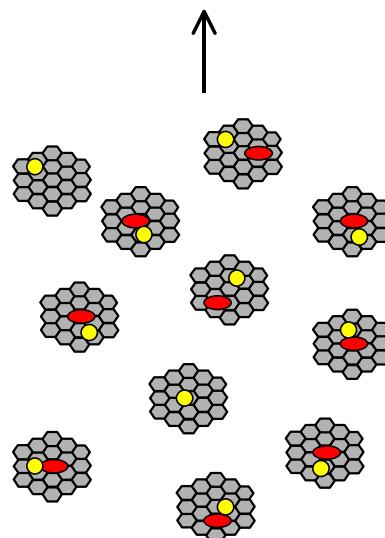
**C: sehr hohe Analytkonzentration**

11 Analytionen:  
 6 Monomere   
 4 Dimere   
 1 Trimer   
 keine anderen Ionen 

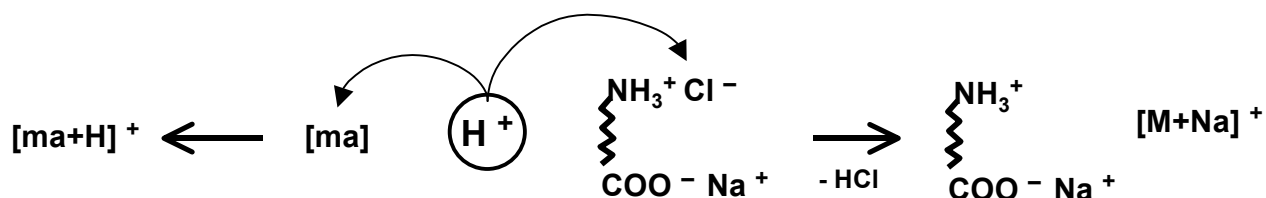


**D: hohe Salzkonzentration**

9 kationisierte Analytionen   
 2 Metallkationen   
 keine anderen Ionen 



**Abbildung E.4.1** : Cluster-abhängige Unterdrückungseffekte bei MALDI: (A) geringe Analytkonzentration: in einigen Clustern keine Analytionen vorhanden, aus diesen entstehen andere Ionen (Matrix, Zusätze, Verunreinigungen); (B) hohe Analytkonzentration: in jedem Cluster sind Analyte vorhanden, es entstehen nur noch Analytionen; (C) sehr hohe Analytkonzentration: es entstehen vermehrt Multimere; (D) hohe Salzkonzentration: es entstehen bevorzugt kationisierte Analyte und Metallkationen.



**Abbildung E.4.2 :** Möglicher Mechanismus der Unterdrückung von protonierten Matrixionen durch kationisierte Analyten am Beispiel eines Zwitterions mit komplexierten Gegenionen: Ein Proton kann entweder die Matrix oder ein Anion protonieren. Letzteres hat aber eine wesentlich höhere Gasphasenbasizität, so daß diese Reaktion bevorzugt abläuft.

Anders wird dies nur, wenn man annimmt, daß beide Ionisationsmöglichkeiten parallel ablaufen können. Die Wahrscheinlichkeit einer Photoionisation sollte für alle Cluster gleich groß sein. Daher kann eine Photoionisation nicht nur in einem neutralem Cluster stattfinden, sondern auch in einem Cluster, der bereits durch Ladungstrennung ionisiert ist. Im Falle eines negativ geladenen Clusters führt dies zur Neutralisation und erklärt so auch die geringere Intensität negativer Ionen. Im Falle eines positiven Clusters würde aber ein zweifach positiv geladener Cluster entstehen, aus dem dann auch mehrfach geladenen Analytionen freigesetzt werden können. Beide Effekte sind in der Tat in MALDI-Spektren zu beobachten. Die Ionenintensität ist im positiven Ionenmodus wesentlich höher als im negativen Ionenmodus. Dagegen werden in negativen MALDI-Spektren so gut wie gar keine mehrfach geladenen Ionen detektiert, während die Tendenz zur Bildung mehrfach positiv geladener Ionen deutlich größer ist.

Im Prinzip sollte sich anhand dieser Unterschiede zwischen positivem und negativem Ionenmodus auch der Anteil von Ladungstrennung und Photoionisation bei der Ionenbildung abschätzen lassen. Dies ist aber deswegen schwierig, da es weitere Mechanismen gibt, die zu einer geringeren oder höheren Ionenintensität im negativen Ionenmodus führen können. Zum einen können negative Ionen durch Elektronentransfer entstehen, zum anderen ist bei dem letzten Schritt der Freisetzung von Ionen immer einer Trennung eines Neutramoleküls von einem Ion notwendig. Während diese Reaktion im Falle positiver Ionen stets zu Analytionen führt, da diese meist wesentlich basischer als die Matrix sind, führt dieselbe Reaktion im Falle negativer Ionen nicht unbedingt zur Bildung von Analytionen. Da die meisten Matrices Säuren sind, kann auch ein Säureanion der Matrix und ein neutraler Analyt entstehen, wenn die Acidität der sauren Gruppen in beiden Molekülen eine ähnliche Größenordnung hat. Dadurch entstehen Matrixanionen auf Kosten von negativen Analytionen. Im der Tat ist das Verhältnis der Signalintensitäten von Matrix- und Analytionen im negativen Ionenmodus meist deutlich höher als im positiven Ionenmodus.

### E.5. Praktische Konsequenzen für die MALDI-Analyse von Biopolymeren

Für die Detektion von protonierten Analyten ist eine saure Lösung aufgrund der Bildung präformierter Ionen vorteilhaft. Gleichzeitig verhindert sie die Koordination von Metallkationen wie Natrium, da die meisten Säurefunktionen (insbesondere Carbonsäuren) bei niedrigen pH-Werten protoniert und damit neutral vorliegen. Neben einer möglichen Aufreinigung der Proben bei der MALDI-Präparation erklärt dies auch die relativ große Toleranz von MALDI gegenüber Salzverunreinigungen. Eine saure Lösung ist nicht nur bei der Bildung protonierter Analyte vorteilhaft, sondern dies gilt gleichermaßen für deprotonierte Ionen im negativen Ionenmodus. Aber selbst bei einfach kationisierten Molekülen im positiven Ionenmodus ist ein niedriger pH-Wert dann vorteilhaft, wenn dadurch eine mehrfache Kationenanlagerung und damit eine starke Aufspaltung des Ionensignals in mehrere Komponenten verhindert werden kann. Auch die Schwierigkeiten bei der Analyse von stark sauren Verbindungen, die selbst bei niedrigem pH-Wert deprotoniert sind, entstehen durch die Koordination von Gegenionen, weswegen in diesen Fällen eine möglichst geringe  $\text{Na}^+$ -Konzentration oder ein Austausch gegen Ammonium notwendig ist.

Neben dem pH-Wert und der Konzentration von Metallkationen sind die Art des Lösungsmittels sowie vorhandene Puffer und Detergentien weitere Parameter bei der Probenpräparation. Solange die Kristallisation der Matrix aber nicht so erheblich gestört ist, daß keine Molekülkristalle mehr gebildet werden können, sind die meisten Matrices relativ tolerant gegenüber Verunreinigungen. Eine moderate Menge von Puffern oder Detergentien kann sogar günstig sein, wenn dadurch Analyte länger in Lösung gehalten werden und verstärkt im Kristall eingebaut werden. Allerdings werden nur sehr wenige Substanzklassen bei der Kristallisation vollständig ausgeschlossen, vielmehr wird eine Reihe sehr unterschiedlicher Analytklassen sehr effizient in vielen verschiedenen Matrices eingebaut. Problematisch sind allenfalls sehr hydrophobe Substanzen, die in den gängigen Matrixlösungen nicht löslich sind.

Bei der Analyse protonierter Verbindungen sollten zudem keine Anionen mit einer geringen Basizität vorhanden sein, da diese an protonierten Stellen koordiniert sind und entweder als Addukte im Spektrum erscheinen oder durch metastabile Fragmentierung zu einer Peakverbreiterung führen. Dies erklärt auch, warum gerade Trifluoressigsäure (TFA) besonders gut als Säurezusatz für MALDI geeignet ist. Zum einen ist TFA in wässriger Lösung eine starke Säure, die zudem (im Gegensatz zu HCl) wenig flüchtig ist. Ein Säurezusatz bewirkt aber nur dann eine stärkere Protonierung der Analyte als durch die Matrixlösung alleine, wenn die Acidität der zugesetzten Säure größer ist als die Säurestärke der Matrix, was z.B. bei Essigsäure für die meisten Matrices nicht gegeben ist. Zum anderen ist aber das TFA-Anion basisch genug, um durch ein protoniertes Matrixmolekül oder durch eine protonierte Analytfunktion neutralisiert zu werden ( $\Delta G = 1325 \text{ kJ/mol}$ ). Neutrale TFA-Moleküle können zudem im Vakuum leicht verdampfen. Zusätzlich könnte noch eine leichte Ladungstrennung zwischen TFA-Anionen und Analytkationen eine Rolle spielen. Die einzige gängige Säure, die ebenfalls diese Kriterien erfüllt, ist Ameisensäure, die in der Tat für MALDI besonders vorteilhaft ist. Dagegen sollten z.B. Schwefelsäure und Phosphorsäure aufgrund der schwachen Basizität der entsprechenden Anionen verstärkt Addukte bilden. Selbst wenn diese nicht in dieser Form im Spektrum auftauchen, weil vorher eine Neutralisation stattfindet, macht sich die Anlagerung aufgrund der metastabilen Fragmentierung durch Peakverbreiterung negativ bemerkbar. Der gleiche Effekt scheint bei Analyten mit einer sehr großen Zahl basischer Gruppen im Molekül eine MALDI-Analyse dieser Substanzen selbst mit TFA unmöglich zu machen.

Aber auch bei der Analyse von Oligonukleotiden könnte eine Peakverbreiterung aufgrund von Neutralisationen eine Rolle spielen. Die Auflösung ist bei der MALDI-Analyse von Oligonukleotiden generell wesentlich geringer als bei Peptiden und Proteinen, und meist werden die

Spektren aufgrund der starken metastabilen Fragmentierung im Linearmodus aufgenommen. Ein erheblicher metastabiler Anteil bei der Neutralisation des Phosphodiester-Rückgrades könnte auch zu der beobachteten Peakverbreiterung führen, selbst wenn intakte Moleküle detektiert werden und weder Fragmentierung noch Adduktbildung beobachtet wird. Hier wären Gegenionen günstig, die eine möglichst hohe Gasphasenacidität besitzen, da dann für die Neutralisation eine geringere Anregungsenergie notwendig ist. Allerdings muß ein solches Kation gleichzeitig eine geringe Acidität in Lösung besitzen, da es sonst nicht in protonierter, geladener Form an Phosphatreste koordiniert werden kann. Deswegen kommen vor allem Ammoniumionen in Frage, deren Gasphasenacidität aber vergleichsweise niedrig ist. Darüber hinaus sind Oligonukleotide in stark saurer Lösung nicht stabil, und eine Protonierung einer Nukleobase bei der Desorption führt zur Fragmentierung. Dies macht die Analyse von Oligonukleotiden im Vergleich zu Polypeptiden bedeutend schwieriger, und die Präparationsbedingungen unterscheiden sich entsprechend. Neben der Verdrängung von Metallkationen durch Protonenquellen (Ammoniumsalze) spielt dabei auch ein moderater pH-Wert eine entscheidende Rolle, weswegen oft Polyhydroxyacetophenone oder 3-HPA eingesetzt werden. 3-HPA könnte auch aufgrund des basischen Pyridin-Stickstoffs besonders vorteilhaft sein, da dadurch -im Gegensatz zu den meisten anderen Matrices- eine Koordination eines positiven, protonierten Matrixmoleküls an Phosphatgruppen möglich ist. Die Matrix könnte somit selbst für eine Neutralisation der Phosphate sorgen, oder könnte zumindest in zwitterionischer Form als "Brücke" zu einem Gegenion fungieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde bei der Analyse modifizierter Oligonukleotide festgestellt, daß die Matrix 3-HPA bevorzugt am Phosphodiester-Rückgrad koordiniert ist [Gut97]. Überlegungen zu einer möglichen zwitterionischen Struktur von 3-HPA finden sich auch bei [Wu94].

Eine besondere Situation stellt sich für die Analyse neutraler Verbindungen dar, die weder saure noch basische Gruppen im Molekül haben. Diese können generell nur in kationisierter Form detektiert werden, dabei scheint es jedoch verschiedene Ionisationspfade zu geben. Während große Moleküle nur durch Anlagerung der Kationen bereits in Lösung und nachfolgend im Matrixkristall ionisiert werden können (Einbau von Analyt und Salz), ist bei kleinen, stabilen Molekülen (Zucker, technische Polymere) auch eine Verdampfung mit nachfolgender Gasphasenkationisierung möglich [Glü01, Glü01a, Kar03]. Ein gradueller Übergang zwischen diesen Prozessen erschwert zudem die Kalibration innerhalb einer Serie mit zunehmender Masse erheblich, da die initialen Ionengeschwindigkeiten bei beiden Mechanismen sehr unterschiedlich sind.



## E.6. Die Rolle der Matrix

Die Rolle der Matrix ist Gegenstand vieler Diskussionen, und es ist nach wie vor umstritten, welche Eigenschaften letztendlich die Matrixfunktion ausmachen. Dabei wird oft zwischen einer "aktiven" und einer "passiven" Rolle der Matrix unterschieden. Mit "aktiv" ist dann meist eine chemische Ionisation, also eine Übertragung einer Ladung von der Matrix auf den Analyten, gemeint. Demnach bedeutet dann "passiv", daß durch die Matrix zwar eine schonende Desorption von Analyten bewirkt wird, aber keine direkte Ionisation durch Ladungstransfer stattfindet. Einige Bedingungen müssen aber in beiden Fällen erfüllt sein, damit MALDI möglich ist. Die wesentlichen Voraussetzungen für die Eignung einer Verbindung als MALDI-Matrix lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Kristallisation in Form von Molekülkristallen.<sup>41</sup>
- Isolation und Einbau der Analyte unter weitgehender Konservierung der Lösungsbedingungen (Ladung, Gegenionen, Lösungsmittel).
- Hoher Absorptionskoeffizient bei der verwendeten Laserwellenlänge.

Daneben gibt es eine Reihe eher technischer Voraussetzungen, z.B. die Löslichkeit in gängigen organischen Lösungsmitteln oder -je nach Druck in der Ionenquelle- eine hinreichende Stabilität im Vakuum (hohe Sublimations- bzw. Siedetemperatur). Weitere Voraussetzungen sind zunächst nicht offensichtlich. Sicherlich sind für die Cluster-Bildung (Phasenexplosion) bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften der Matrix notwendig. Dazu könnten neben hohen Gitterenergien im Molekülkristall auch eine geringe Wärmeleitfähigkeit, eine geringe Fluoreszenz sowie hohe Schmelz-, Siede- und Sublimationstemperaturen gehören.

Eine "aktive" Rolle der Matrix bei der Ionisation scheint vor dem Hintergrund einer möglichen Ladungstrennung ebenfalls nicht notwendig zu sein. Dies ist insofern bemerkenswert, als dadurch eine einheitliche Erklärung für MALDI bei sehr unterschiedlichen Wellenlängen möglich wird (sichtbares Licht bis Infrarot). Allerdings ist dieser Punkt noch nicht endgültig geklärt, da auch eine Photoionisation mit anschließendem Ladungstransfer (Neutralisation eines Anions durch Protonen- oder Elektronentransfer) nicht ausgeschlossen werden kann. Auch die Bildung von Radikalkationen der Matrix und anderer Ionen mit ungerader Elektronenzahl deutet in diese Richtung und müßte bei einem reinem Ladungstrennungsmechanismus auf andere Weise erklärt werden, z.B. durch Transfer von Elektronen oder H-Radikalen. Die Photoionisation von Matrix-Analyt-Clustern könnte zudem ein wesentlicher Unterschied zwischen UV-MALDI und MALDI bei höheren Wellenlängen sein, der sich auch in einer höheren Empfindlichkeit bei UV-MALDI zeigt. Somit ist auch fraglich, ob eine hohe Gasphasenacidität von Matrixionen eine notwendige Matriceigenschaft ist.

Allerdings zeigen die Experimente in Kap. D.3, daß die Matrix in Form von Anionen einen Einfluß auf die Adduktbildung und über eine Ladungstrennung auch auf die Ionenbildung haben kann. Die gleichen Reaktionen sind aber auch mit anderen Anionen möglich, die aus Verunreinigungen oder Säurezusätzen stammen können. Insofern ist auch die Neutralisation von Ionenpaaren und eine mögliche Ladungstrennung keine notwendige Voraussetzung für eine Matrix, solange diese Funktion von anderen Verbindungen in der Präparation wahrgenommen werden kann. Ganz analoge Überlegungen gelten auch für die Koordination von Matrixkationen, die abgesehen von einer erleichterten Ladungstrennung zu einer Neutralisation von negativen Ladungen führen

---

<sup>41</sup> Es gibt auch eine Reihe flüssiger Matrices, amorphe Feststoffe oder Salzkristalle zeigen dagegen keinerlei Matriceigenschaften mehr.

kann. Eine Neutralisation negativer Ladungen ist auch durch Matrixionen möglich, die erst bei der Laserbestrahlung entstehen.

Zum Schluß bleibt die Frage, ob auch offensichtliche Unterschiede zwischen Matrizes anhand bestimmter Moleküleigenschaften erklärt werden können. Solche Unterschiede könnten beim Analyteinbau und bei der Kristallisation bestehen. So sollte eine unterschiedliche Koordination von Gegenionen oder eine unterschiedliche Solvatation einen erheblichen Einfluß auf die Ionenbildung haben. Wesentliche Unterschiede zwischen den Matrizes gibt es auch beim Grad der Fragmentierung. Mit Sicherheit spielen auch dabei Eigenschaften des Matrixkristalls eine Rolle, da durch diese der notwendige Energieeintrag, die Energieverteilung und der Verlauf der Ablation bestimmt wird. Ein gutes Indiz für eine schonende Natur einer Matrix ist eine hohe initiale Geschwindigkeit der gebildeten Ionen. Welche Matrixeigenschaft aber letztendlich für diese hohe Ionengeschwindigkeit verantwortlich ist, konnte bisher nicht ermittelt werden.

### E.7. Offene Fragen und Ausblick

Aus der Diskussion des MALDI-Mechanismus vor dem Hintergrund der bislang bekannten Charakteristika wird deutlich, daß mittlerweile ein plausibles Bild des komplexen Phänomens MALDI entstanden ist. Obwohl viele Effekte im Detail wesentlich komplizierter und differenzierter als in diesem einfachen, qualitativen Bild sind, läßt sich MALDI dennoch auf wenige, charakteristische Parameter zusammenfassen. Dies sind insbesondere:

- die Konservierung und Separierung des "gelösten Analyten" im Matrixkristall (inklusive Ladung und Lösungsmittel),
- die Ablation von größeren Molekülverbänden (Clustern) mit hoher Geschwindigkeit bei gleichzeitig geringer thermischer Belastung der Analyten (*expansional cooling* und geringer Wärmetransfer) sowie
- die nachfolgende Desolvatation unter Einschluß chemischer Reaktionen (Transfer von Protonen, Elektronen und H-Radikalen).

Trotz oder gerade aufgrund dieser schlüssigen, aber bisher qualitativen Phänomenologie bleiben einige wesentliche offene Fragen bestehen, die Gegenstand künftiger Experimente und Überlegungen sein könnten. Insbesondere die vielen Ausnahmen und kleinen Unterschiede zwischen verschiedenen Matrix-Analyt-Systemen, Präparationsprotokollen und Parametern der verwendeten Massenspektrometer (Laser, Ionenquelle, Massenanalysator) sind noch nicht alle erklärbar. Es wird sich zeigen, ob letztendlich alle diese Nuancen Eingang in einen "allgemeingültigen" MALDI-Mechanismus finden, oder ob weitere Spezialfälle bzw. fließende Übergänge zwischen verschiedenen "MALDI-artigen" Mechanismen, wie z.B. die Gasphasenkationisierung von kleinen Neutramolekülen, definiert werden müssen. Die wichtigsten offenen Fragen bezüglich der Ionenbildung bei MALDI sollen an dieser Stelle kurz skizziert werden.

Aus Untersuchungen zum Einbau von Analyten in Matrixkristallen und damit zu den Ausgangsbedingungen bei MALDI sind eine Reihe wertvoller Informationen gewonnen worden. Dazu gehören Lokalisierung und Ladung der Analyte oder auch der Lösungsmittelgehalt. Darüber hinaus wäre aber besonders eine genaue Charakterisierung der molekularen Umgebung verschiedener Analyte in der Matrix wünschenswert. Aufgrund der starken Verdünnung der Analyte im Matrixkristall sind solche Untersuchungen auf molekularer Ebene allerdings schwierig, würden aber wesentlich genauere Aussagen über mögliche nachfolgende Reaktionen erlauben. Dabei sind vor allem folgende Parameter wichtig:

- Wie ist die unmittelbare molekulare Umgebung der Analytmoleküle im Matrixkristall beschaffen ?
- Welche Moleküle sind direkt an Analyt(ionen) koordiniert: Matrix, Lösungsmittel, Gegenionen ?
- Welchen Abstand haben Moleküle und insbesondere Ionenpaare voneinander ?
- Befinden sich die Analyten in einer kristallinen oder einer flüssigen Umgebung ?
- Wie verändert sich die unmittelbare molekulare Umgebung der Analyte in Abhängigkeit von den Präparationsbedingungen ?
- Gibt es -zusätzlich zu unterschiedlichen Bedingungen in Lösung- Unterschiede zwischen verschiedenen Matrices beim Einbau ?
- Korrelieren diese Unterschiede mit der Bildung verschiedener Ionenspezies oder mit Parametern wie Fragmentierungsgrad, initialer Ionengeschwindigkeit oder Ladungszustand ?

Aus der Kenntnis der unmittelbaren Umgebung der Analytmoleküle ließe sich die Energetik der Ablation (Clusterbildung), aber vor allem die Energetik einer möglichen Ionisation durch Trennung von Ionenpaaren abschätzen. Hierbei spielt sicherlich die Art der Solvation eine große Rolle, weswegen die Frage nach einer allgemeinen Anwendbarkeit lösungsmittelfreier Systeme eine erhebliche Bedeutung besitzt. Die genauen Auswirkungen verschiedener Präparationsparameter auf Koordinationen im Kristall würde zudem eine gezielte Optimierung der MALDI-Bedingungen ermöglichen, die letztendlich zu einer sensitiveren und auf verschiedene Analytklassen abgestimmte MALDI-Analyse führen sollte. Falls die Ladungsreduktion durch Elektronentransfer bei Biopolymeren tatsächlich nur eine untergeordnete Rolle spielt, wäre eine Veränderung der Solvation bzw. der Koordination von Gegenionen (insbesondere deren Abstand und Solvation) die einzige Chance, höhergeladenen Ionen zu erhalten. Ein hoher Ladungszustand wäre in mehrfacher Hinsicht ein echter Durchbruch: Zum einen wird die Detektion von Ionen mit großem Verhältnis Masse zu Ladung zunehmend ineffizienter, und auch der Einfang dieser Ionen mit magnetischen oder elektrischen Feldern (Ionenfallen) ist schwierig. Zum anderen ist eine kollisionsinduzierte Fragmentierung mit mehrfach geladenen Ionen wesentlich effektiver und führt zu einer besseren Sequenzinformation. Auch der Einsatz von ECD wäre nur mit hochgeladenen MALDI-Ionen möglich, da die Effizienz des Elektroneneinfangs quadratisch mit der Ladung ansteigt. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß der Zusatz von Glycerin unter bestimmten Bedingungen zu einem höheren Ladungszustand führen kann [Zho95]. Diese Beobachtung könnte mit einer besseren Solvation der Ionen und einer dadurch bedingten besseren Trennung von Ionenpaaren zusammenhängen. Versuche mit schwerflüchtigen, polaren Lösungsmitteln konnten dies aber bisher nicht bestätigen.

Es zeigt sich zunehmend, daß die Ionenbildung bei MALDI eng mit der Ablation verknüpft ist, und daß eine getrennte Betrachtung von Ionisation und Desorption allenfalls historisch oder experimentell begründet werden kann. Das Konzept einer schnellen Expansion von teilweise geladenen Clustern und Molekülen aufgrund des schnellen Energieeintrags erweist sich, bestätigt durch eine Reihe unterschiedlicher experimenteller Ergebnisse, zunehmend als tragfähig. Bei diesem komplexen Ereignis bleiben zwei Hauptfragen, die bisher nicht eindeutig geklärt werden konnten. Dies ist zum einen die genaue Natur des Phasenübergangs, der entweder als Phasenexplosion oder als Sublimation beschrieben wird. Dies mag vor allem daran liegen, daß die bei diesem Übergang gebildeten Cluster je nach Größe weder als kondensierte Phase noch als Gasphase hinreichend beschrieben werden können. Auch die räumliche und zeitliche Energieverteilung während und nach dem Laserpuls ist nur annähernd beschreibbar. Die zweite offene Frage bei diesem Prozeß betrifft die Art der Ladungstrennung. Obwohl diese eindeutig mit der Ablation verknüpft ist, ist sie prinzipiell auf zwei Wegen möglich. Beide Wege, die Trennung von Ionenpaaren und die Photoionisation (mit anschließender Protonen- oder Elektronentransfer) führen zu den gleichen Produkten und sind daher kaum voneinander zu unterscheiden, und könnten zudem parallel stattfinden. Es bleibt abzuwarten, ob es gelingt, klar definierte Versuchsbedingungen zu finden, die eine eindeutige Unterscheidung zwischen diesen beiden Mechanismen erlaubt.

Eng mit dieser Frage verknüpft ist die Relevanz verschiedener sekundärer Reaktionen für die Art der letztendlich gebildeten Ionen. Während die Rolle von Protonentransfer (insbes. zwischen Ionenpaaren) und selbst die Übertragung von H-Radikalen weitgehend geklärt ist, gilt dies nicht für eine mögliche Beteiligung von Elektronen. Obwohl für bestimmte Analyt-Matrix-Kombinationen Elektronenneutralisation eindeutig nachgewiesen wurde, gibt es nach wie vor keine Beweise für eine generelle Rolle solcher Neutralisationen. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten, intensiven Adduktverteilungen lassen eher darauf schließen, daß hochgeladenen Ionen erst gar nicht gebildet

werden, da mit steigender Ladung die Tendenz zur (engen) Ionenpaarbildung ansteigt. Dennoch läßt sich die Beteiligung von Elektronen nicht ausschließen, zumal sie auch bei der Bildung von negativen Ionen eine Rolle spielen könnte. Versuche mit "Elektronenfängern" (Substanzen mit hoher Elektronenaffinität) haben aber bisher keine nennenswerte Veränderung von Ladungszustand oder Ionenintensitäten gezeigt.

Trotz der zunehmenden Kenntnisse über die Ionenbildung bei MALDI bleiben also eine Reihe offener Fragen, für die zunächst definierte experimentelle Bedingungen gefunden werden müssen, um diese abschließend klären zu können. Eine Zusammenfassung des derzeitigen Kenntnistandes wurde kurz vor der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit in einer Reihe von Review-Artikeln vorgestellt. In diesem Sonderband zum Thema "*Laser ablation of molecular substrates*", der sich nicht nur mit MALDI sondern auch mit anderen Anwendungen der Laserablation befaßt, finden sich unter anderem ein Fazit verschiedener Simulationen zur Laserablation von organischen Molekülen [Zhi03] und eine ausführliche Zusammenfassung von Ergebnissen zur Desorption bei MALDI [Dre03]. Auch die wesentlichen Schlußfolgerungen der vorliegenden Arbeit (unter Einschluß vorangegangener Untersuchungen) wurden dort veröffentlicht [Kar03a]. Viele experimentelle Ergebnisse oder theoretische Betrachtungen lassen aber nach wie vor einen großen Freiraum für Interpretationen zu, und eine komplementäre Sichtweise des MALDI-Prozesses findet sich direkt im Anschluß [Kno03]. Die Editoren verstehen diese Gegenüberstellung auch als Aufforderung, durch eindeutige Experimente zu einem einheitlichen Bild von MALDI zu gelangen:

*"The subsequent two articles deal with the most crucial but also the most difficult problem of all, ion formation in MALDI. The two articles take two complementary views. Relying on the postulation that cluster ejection is a fundamental process, Karas and Krüger present the case for MALDI ion formation via an explosive-like separation of the ejected ionized clusters. To establish their point, a detailed analysis of the plausible processes responsible for the primary ionization of matrix and analytes in the condensed phase is presented. In contrast, Knochenmuss and Zenobi argue for the importance of secondary charge-transfer processes in the plume, in which case final ion patterns should be governed by thermodynamic factors. To substantiate their hypothesis, the authors go through an exhaustive correlation of the observed ion patterns with thermochemical data. Certainly, the problem of ion formation remains far from resolved, but the clear and balanced argumentation of the two articles sets the stage for guided experimentation in addressing it."*

**F Zusammenfassung**

Durch die beiden Ionisationstechniken *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) und *Electrospray-Ionization* (ESI) sind Biopolymere für die Massenspektrometrie zugänglich geworden und die Zahl der biochemischen Applikationen ist sprunghaft angestiegen. Dagegen sind die zugrundeliegenden Prozesse der Ionenbildung nur zum Teil bekannt. Bei MALDI wird die Laserstrahlung durch die Matrix absorbiert, wodurch es zur explosiven Auflösung der festen Phase unter Bildung von geladenen Molekülen kommt. Der genaue Mechanismus vom Festkörper zum gasförmigen Ion ist nur teilweise aufgeklärt und Gegenstand vieler Diskussionen. Eine wichtige Funktion der Matrix ist die räumliche Separierung und Isolierung der Analyte beim Einbau in die Matrixkristalle. Während der Einschluß von Molekülen in Wirtskristalle schon früh als wesentliches Merkmal von MALDI erkannt wurde, ist bisher noch nicht systematisch untersucht worden, in welcher Form die Analyte im Kristall vorliegen. Genau diese Information ermöglicht jedoch Aussagen über die Relevanz verschiedener Mechanismen der Ionenbildung bei MALDI.

Die Bestimmung des Ausgangszustandes des Analyten im Matrixkristall und die Abschätzung möglicher Reaktionen bei der nachfolgenden Freisetzung der Analytionen ist das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit. In dieser wurde insbesondere der Ladungszustand der Analyte sowie der Einschluß von Lösungsmittel untersucht. Des Weiteren wurden Experimente zur Zahl und Koordination möglicher Gegenionen, zur Neutralisation dieser Ionenpaare und zur Adduktbildung bei MALDI durchgeführt. Die Ergebnisse erlauben Aussagen über primäre und sekundäre Ionisationsreaktionen, die zu einem stimmigen Bild der Ionenbildung bei MALDI zusammengefaßt wurden. Grundlage des vorgestellten Modells sind bereits veröffentlichte Modelle, deren wesentliche Aspekte teilweise schon in den ersten Jahren nach der Einführung von MALDI, zu einem erheblichen Teil aber erst in jüngster Zeit erkannt wurden. Einen erneuten Anstoß für die Diskussion um den Mechanismus von MALDI gab die Hypothese, daß die Ionisation eng mit der Bildung von Clustern verbunden ist und dabei sowohl eine Freisetzung präformierter Ionen als auch nachfolgende Reaktionen unter Transfer von Protonen und Elektronen erfolgen. Der Ausgangspunkt für all diese Prozesse ist der Analyt im Matrixkristall.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zeigen, daß einige wesentliche Postulate des „Cluster-Modells“ richtig sind. Insbesondere konnte der Beweis geführt werden, daß Analyte geladen im Matrixkristall existieren und daß die gelöste Form des Analyten weitgehend im Matrixkristall konserviert wird. Als einfache Testsysteme wurden Matrixlösungen mit verschiedenen pH-Indikatoren versetzt und die Farbe der Kristalle dokumentiert. Dabei zeigte sich, daß in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung sowohl Moleküle mit einer positiven oder negativen Nettoladung als auch neutrale Zwitterionen gleichermaßen effizient in Matrixkristalle eingebaut werden. Die Ladung aller sauren und basischen funktionellen Gruppen des Analyten im Kristall ist damit durch den pH-Wert der Matrixlösung bestimmt. Wenn eine Nettoladung vorhanden ist, muß zudem diese Ladung durch Gegenionen kompensiert sein, so daß Ionenpaare entstehen. Aber auch bei Zwitterionen können Gegenionen vorhanden sein. Darüber hinaus gelang durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie der Nachweis, daß Lösungsmittel im Kristall eingeschlossen ist und selbst nach Trocknen der Kristalle bei erhöhter Temperatur oder im Vakuum dort verbleibt. Dies führt zu dem anschaulichen Bild, daß Analyte in Abhängigkeit vom pH-Wert als „Multi-Ionenpaare“ und partiell solvatisiert im Matrixkristall konserviert werden.

Ausgehend von diesen präformierten, solvatisierten Ionenpaaren wird durch den plötzlichen Energieeintrag des Laserpulses die explosive Bildung von Clustern ausgelöst. Für die Bildung von geladenem Clustern gibt es zwei plausible Erklärungsansätze. Durch die Existenz der geladenen Analyte im Kristall ist eine besonders einfache Ionisation unter Freisetzung „präformierter“ Ionen durch die Trennung eines Ionenpaares denkbar. Eine zweite Möglichkeit wäre die Photoionisation

eines Matrixmoleküls mit nachfolgendem Protonentransfer. Da aber stets negative Ladungen vorhanden sind (entweder im Analyten selbst oder als Gegenion), wird bevorzugt ein Anion neutralisiert. In beiden Fällen entsteht ein Cluster, der durch ein fehlendes oder neutralisiertes Gegenion geladen ist.

Die Freisetzung des Analytens erfolgt durch Verdampfen von Neutralkmolekülen (Matrix, Lösungsmittel). Ionenpaare werden durch Protonentransfer neutralisiert, so daß kleine Neutralkmoleküle abdampfen und mit Ausnahme von Metallkationen keine ionischen Addukte detektiert werden. Der Protonierungsgrad des Analyten beim Einbau hat einen erheblichen Einfluß auf die detektierten Ionen. Sind bereits in Lösung und damit im Kristall positiv geladene Gruppen vorhanden, werden besonders leicht protonierte Molekülonen gebildet. Dagegen entstehen aus deprotonierten Vorläuferionen (in der Regel negativ geladen) verstärkt kationisierte Molekülonen. Dabei ist nicht die Nettoladung entscheidend, sondern die Existenz und Anzahl positiver und negativer Gruppen im Analyten. Die Kationisierung erfolgt bereits im Kristall, da die Ionen eine hohe, MALDI-typische Anfangsgeschwindigkeit zeigen. Die Koordination der Kationen an der negativen Ladung verhindert die Neutralisation durch Protonierung, die wesentlich für die Freisetzung von protonierter Molekülonen ist.

Diese Neutralisation von Ionenpaaren ist auch die Ursache dafür, daß Anionenaddukte normalerweise nicht nachgewiesen werden. Durch Zugabe einer sehr starken Säure wird jedoch diese Zwischenstufe stabilisiert und erscheint in Form von Anionenaddukten im Spektrum. Dabei zeigte sich, daß die Anzahl der detektierten Addukte mit der Zahl der basischen Stellen im Analytmolekül korreliert, welches den Einbau von (mehrfach) geladenen Analytionen zusammen mit ihren Gegenionen bestätigt. Neben der Koordination der Anionen an positiv geladenen Stellen des Analyten ist die Energiebilanz des Protonentransfers dafür entscheidend, ob die Anionenaddukte den MALDI-Prozeß überstehen, so daß Anionen mit einer vergleichsweise geringen Gasphasenbasizität zur Adduktbildung neigen. Des weiteren kann die Konkurrenz verschiedener Anionen bei der Bildung der Ionenpaare eine Verschiebung der Adduktverteilung bewirken. Aber auch eine höhere Energiezufuhr (z.B. durch höhere Laserenergie) bewirkt eine verstärkte Neutralisation der Ionenpaare, wobei ein erheblicher Anteil metastabiler Fragmentierungen auftritt. Die Koordination von Gegenionen und die „metastabile Neutralisation“ führt bei Verbindungen, die zur Ionenpaarbildung neigen, zur Peakverbreiterung und zu einer begrenzten Auflösung.

Darüber hinaus sind bei MALDI weitere Sekundärreaktionen beteiligt. Dazu zählt die Übertragung von Wasserstoffatomen, die wahrscheinlich auch die Ursache für prompte Fragmentierungen ist (in-source decay, ISD). Ob eine Ladungsreduktion mehrfach geladener Vorläuferionen durch Elektronen auch bei Biopolymeren eine wesentliche Rolle spielt, bleibt dagegen weiterhin offen. Durch die in Abhängigkeit von der Nettoladung zunehmende Coulomb-Anziehung der koordinierten Gegenionen werden vermutlich erst gar keine hochgeladenen Ionen in die Gasphase freigesetzt.

Die vorgestellten Ergebnisse ergeben ein plausibles, qualitatives Bild der Ionenbildung bei MALDI. Es wurde gezeigt, daß die gelöste Form des Analyten inklusive Ladungen, Gegenionen und Solvathülle bei der Kristallisation weitgehend erhalten bleibt, und daß diese Ausgangssituation entscheidend für die Art der letztendlich gebildeten Gasphasenionen ist. Zudem ist nicht die Protonierung neutraler Analyte, sondern eine Neutralisation von Ionen(paaren) durch Protonentransfer ein zentraler Bestandteil von MALDI.

## G Anhang

## G.1. Farbumschlag bei pH-Indikatoren

Obwohl pH-Indikatoren schon seit etwa einem Jahrhundert bekannt sind und verwendet werden, gibt es erstaunlicherweise immer noch einige Unsicherheiten bezüglich ihrer Strukturen. Daher sollen im Folgenden sowohl die allgemeinen Mechanismen des Farbumschlags der beiden Farbstoffklassen als auch Besonderheiten bei einzelnen Verbindungen kurz erläutert werden, wobei insbesondere unterschiedliche tautomere oder mesomere Formen sowie Gleichgewichte zwischen Chiononform, Sulton (Ringschluß) und zwitterionischer Struktur auftreten.

Der Farbumschlag bei Azofarbstoffen kommt durch eine Protonierung der Azogruppe zustande. Im resultierenden Kation ist die positive Ladung durch Mesomerie über das Molekül verteilt, die größte positive Ladungsdichte befindet sich an einem Stickstoff der Azogruppe und an der aromatischen Aminogruppe, die daher kein zweites Proton aufnehmen kann. Durch die stärkere Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen bzw. der Ladung absorbiert das protonierte Molekül bei einer größeren Wellenlänge (niedrigere Energie), so daß die sichtbare Komplementärfarbe sich zu kürzeren Wellenlängen, z.B. von gelb nach rot/violett, verschiebt (bathochromer shift, s. Abb. G.1.1). Zusätzlich existiert bei Azofarbstoffen noch je eine *trans*- und eine *cis*-Form, deren Absorptionseigenschaften ebenfalls leicht unterschiedlich sind, besonders da die *cis*-Form durch sterische Hinderung nicht planar ist.

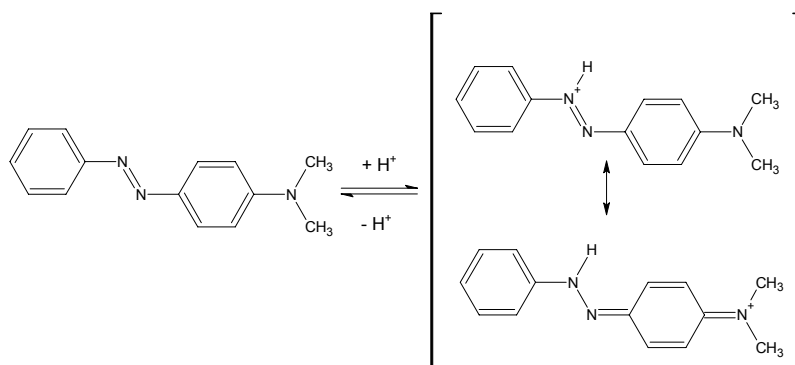


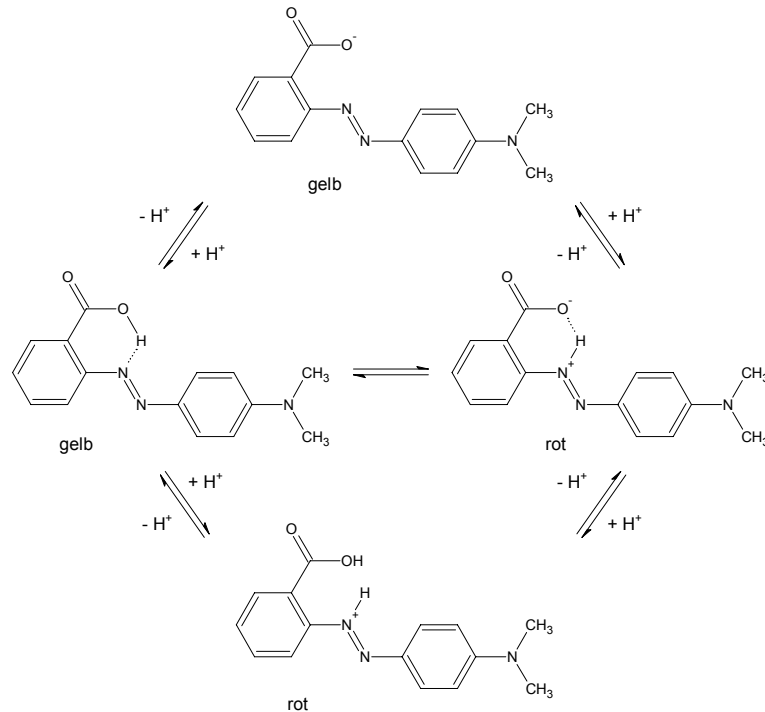
Abbildung G.1.1 : Farbumschlag und mesomere Grenzformen bei der Protonierung von Azofarbstoffen.

Die Farbstoffe CO und BE haben zwei identische, spiegelbildliche Azogruppen, weswegen beide Azogruppen fast bei dem gleichen pH-Wert protoniert werden und nur ein gemeinsamer Farbumschlag zu erkennen ist. Die beiden spiegelbildlichen mesomeren Systeme sind aufgrund der sterischen Hinderung durch die Wasserstoffatome an den beiden mittleren Aromaten nicht vollkommen planar, was zu einer Drehung der beiden spiegelbildlichen Hälften und einer dadurch bedingten schwachen Konjugation der  $\pi$ -Orbitale führt (s. Strukturen in Abb. D.1.1.).

Wenn an einem Aromaten eine weitere funktionelle Gruppe ohne freie Elektronenpaare vorhanden ist, ist diese normalerweise nicht an der Protonierung und/oder Mesomerie beteiligt, allerdings erhöht oder erniedrigt eine solche Gruppe insgesamt die Elektronendichte im aromatischen System. Dies ist z.B. bei einer Sulfonsäure der Fall, die über den gesamten pH-Bereich deprotoniert ist. Eine besondere Situation tritt aber dann auf, wenn eine funktionelle Gruppe in ortho-Position zur Azogruppe vorhanden ist, die Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Dies gilt z.B. für die Carbonsäurefunktion von Methylrot (MR). Da zudem die Carbonsäure wesentlich schwächer sauer ist als eine Sulfonsäure, existieren für die neutrale Form von MR zwei tautomere Formen (jeweils in *cis*- und *trans*-Form), von denen eine ungeladen und eine zwitterionisch ist, die aber beide H-Brücken zwischen der Carboxylgruppe und der Azogruppe ausbilden ([Muk98], s. Abb.



G.1.2). Da aber nur eine der beiden Formen an der Azogruppe protoniert ist, liegt der Farbumschlag bei MR nicht am ersten Halbäquivalenzpunkt, sondern zwischen den beiden Halbäquivalenzpunkten im Bereich des ersten Äquivalenzpunktes, wo beide tautomere Formen etwa im Verhältnis 1:1 vorliegen. Daher findet man in der Literatur manchmal einen „virtuellen“  $pK_A$ -Wert von 5.0 [Crc95].

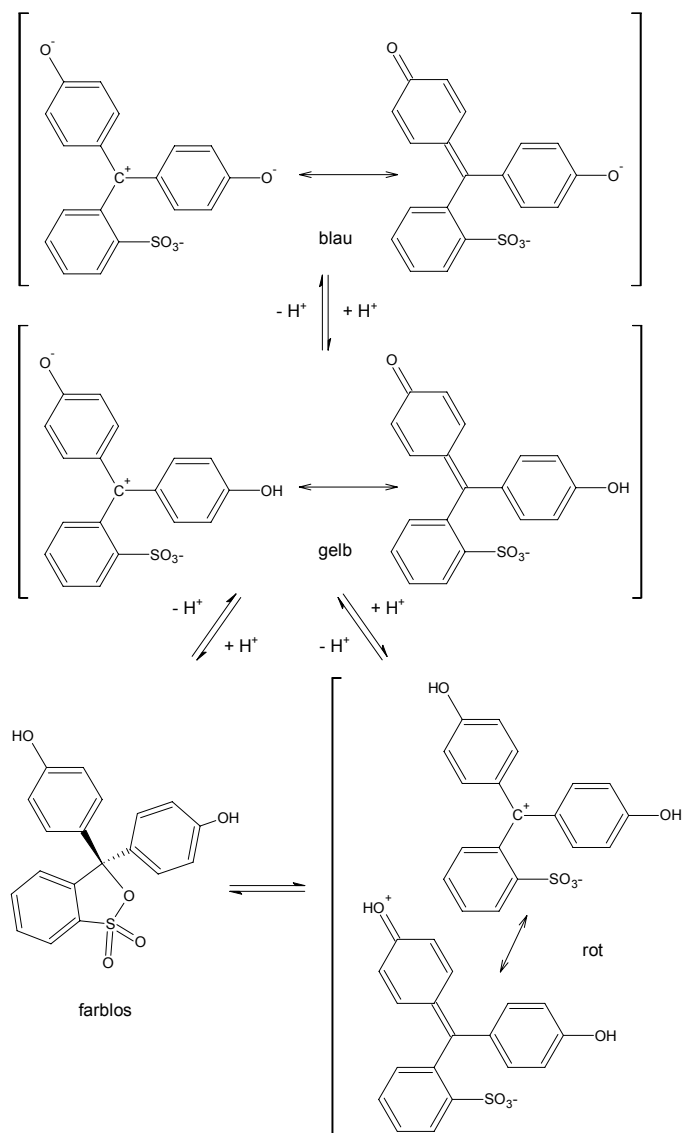


**Abbildung G.1.2 :** Farbumschlag bei der Protonierung von Methylrot, inkl. Tautomerie-Gleichgewicht und Wasserstoff-Brücken.

Der Farbumschlag bei den Triphenylmethanfarbstoffen erfolgt ebenfalls durch Änderung der Mesomerie, wobei bereits Moleküle mit zwei Aromaten am zentralen Kohlenstoff farbig sind. Durch den dritten Aromaten mit der orthoständigen Säurefunktion ist aber bei den Triphenylmethanen im Gegensatz zu den Azofarbstoffen eine vollständige Unterbrechung der Mesomerie möglich, und zwar indem ein Lacton oder ein Sulton gebildet wird. Dabei entsteht ein zentrales C-Atom mit vier Einfachbindungen, daß keine  $\pi$ -Bindungen mehr eingehen kann, daher ist diese Struktur farblos (Abb. G.1.3). Bei der Abspaltung eines phenolischen Protons wird der Ring geöffnet und es entsteht ein Carboxylat bzw. Sulfonat. Die Acidität des phenolischen Protons wird wesentlich durch die vinyloge Säurefunktion bestimmt, und der Umschlagbereich liegt bei sulfonierten Triphenylmethanen daher bei deutlich niedrigerem pH-Wert als bei carboxylierten Triphenylmethanen (z.B. Phenolphthalein). Durch elektronenziehende Gruppen an den Aromaten erhöht sich die Acidität weiter, so daß der Farbumschlag von gelb nach blau bei BP durch die Bromatome um etwa fünf pH-Einheiten niedriger liegt als bei TB. Allerdings liegt die geschlossene Lacton- oder Sultonform immer auch im Gleichgewicht mit einer offenen, chinoiden Form vor, bei der es außerdem mehrere mesomere Grenzformen gibt. Dabei kann der Anteil der farblosen Ringform sehr unterschiedlich sein, bei TB spielt er z.B. fast gar keine Rolle, während ein großer Teil des neutralen BP in der Sultonform vorliegt. Daher erfolgt bei BP im stark Säuren (z.B. mit 2,5-DHB) kein Farbumschlag nach rot, sondern durch die vermehrte Bildung des farblosen Sultons wird die gelbe Farbe des Monoanions immer schwächer. Die Reaktionsmechanismen des

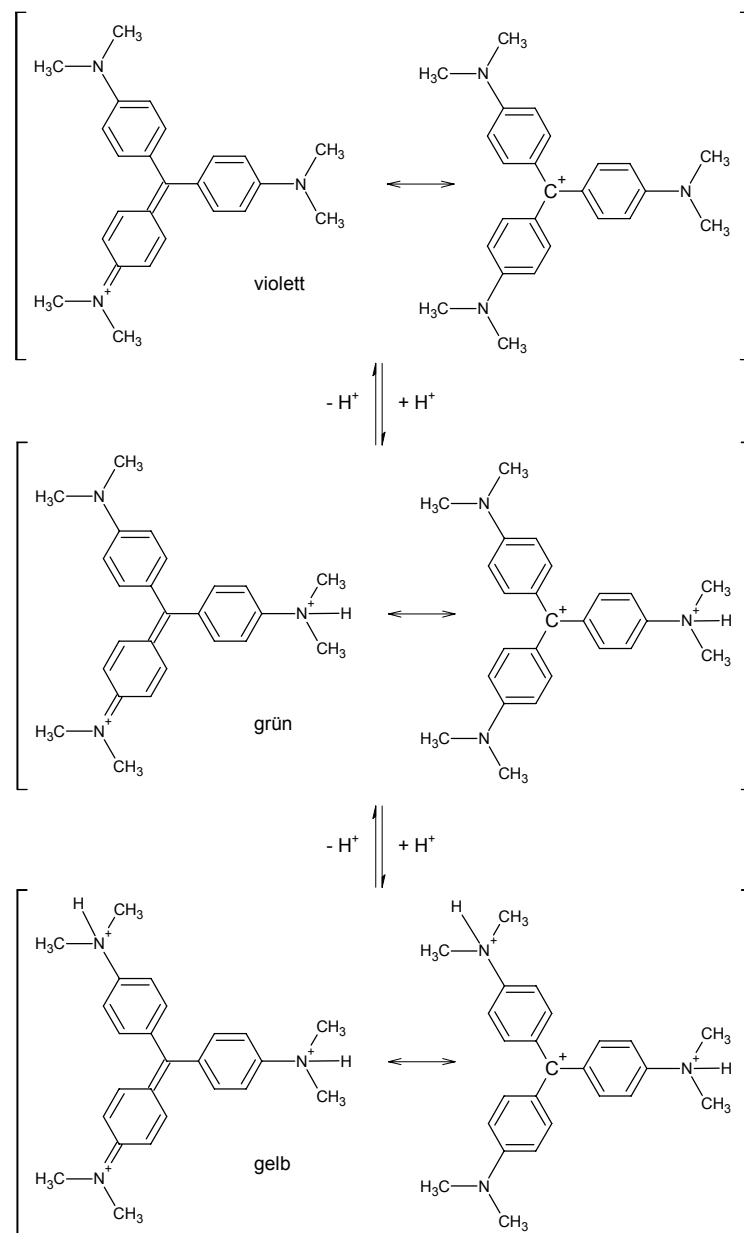
Farbumschlags bei der Protonierung von sulfonierten Triphenylmethanfarbstoffen sind in Abb. G.1.3 dargestellt.

Die Überlappung der Orbitale wird sowohl durch elektronenziehende oder -schiebende funktionelle Gruppen als auch durch sterische Effekte beeinflusst. Auch die Triphenylmethane können aufgrund der sterischen Hinderung durch die ortho-Wasserstoffe nicht vollkommen planar sein, so daß niemals eine vollkommene Überlappung der  $\pi$ -Orbitale erfolgen kann. Diese „Torsion“ des Moleküls (etwa wie bei einem Propeller) wird natürlich noch stärker, wenn große, sperrige Gruppen in ortho-Position vorhanden sind, wie es z.B. bei TB der Fall ist. Daher ist hier die chinoide Form noch ungünstiger und die zwitterionische Form hat einen wesentlich größeren Anteil, was auch mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte [San98]. Die deprotonierte Sulfonsäure hat zunächst keinen Einfluß auf die Mesomerie, solange keine Ringbildung erfolgt. Bei einer weiteren Deprotonierung eines Phenols wird aber die Überlappung der  $\pi$ -Orbitale besser, da sich aufgrund der negativen Ladung des mesomeren Systems die Bindungen verlängern und dadurch weniger sterische Hinderungen auftreten, so daß die Torsion der Phenylgruppen kleiner wird. Daher erfolgt ein Farbumschlag, z.B. von gelb nach blau.



**Abbildung G.1.3 :** Farbumschlag und mesomere Grenzformen bei der Protonierung von sulfonierten Triphenylmethanfarbstoffen, inkl. Sultonbildung (unten links).

Kristallviolett (Crystal Violet, CV) kann aufgrund der fehlenden orthoständigen Säurefunktion keinen Ring ausbilden. CV existiert im gesamten pH-Bereich, bei dem Proben für MALDI präpariert werden, als Kation, zumal eine Deprotonierung nicht möglich ist. In stark alkalischem Milieu wird der Farbstoff durch Angriff von  $\text{OH}^-$  am zentralen C-Atom und anschließender Retro-Carbonylreaktion zersetzt. Aufgrund der stark basischen vinylogenen Guanidinstruktur erfolgt erst unterhalb von ca. pH 1 eine (maximal zweifache) Protonierung der Aminogruppen (Farbumschlag nach grün und gelb, s. Abb. G.1.4). Allerdings sind diese (mehrfach) protonierten Formen nicht stabil, und die Farbe bleicht in Lösung innerhalb weniger Minuten aus. Interessanterweise hängt die Beständigkeit der Farbe von der zugegebenen Säure ab, daher reagiert vermutlich auch hier ein Anion mit dem zentralen C-Atom, wodurch die Mesomerie der Phenylgruppen unterbrochen ist und die Verbindung farblos erscheint. Auch dabei wird der Farbstoff teilweise zersetzt.



**Abbildung G.1.4 :** Farbumschlag und mesomere Grenzformen bei der Protonierung von Kristallviolett.

## G.2. Titration und pH-Wert-Bestimmung

Für die Titration wurden jeweils 0.001 mol der Matrix in 20 mL Wasser gelöst und mit Natronlauge ( $c = 0.1 \text{ mol/L}$ ) titriert. Die Titrationskurve wurde mittels einer pH-sensitiven Elektrode aufgezeichnet (Hanna Instruments, Woonsocket, RI). Bei Matrizes mit basischen Gruppen wurde zunächst eine äquimolare Menge Salzsäure zugegeben (1 mL 1-molare HCl pro Basenfunktion), um alle Dissoziationsstufen mit derselben Titration erfassen zu können (Rücktitration mit Natronlauge). Aus den Titrationskurven wurde der Halbäquivalenzpunkt (= Säurekonstante  $pK_A$ ) sowie der Äquivalenzpunkt entnommen (Genauigkeit  $\pm 0.1 - 0.3 \text{ pH-Einheiten}$ ). Sehr nahe beieinander liegende  $pK_A$ -Werte wurden dabei nicht getrennt erfaßt.

Die bei der Titration verwendete Konzentration ist geringfügig niedriger als in üblichen Matrixlösungen für die MALDI-Präparation. Der Äquivalenzpunkt für die höhere Konzentration wurde rechnerisch mit der Näherungsformel für schwache Säuren bzw. Basen aus der Säurekonstante ermittelt ( $\text{pH} = \frac{1}{2}(\text{p}K_A - \log c_0)$  bzw.  $\text{pOH} = \frac{1}{2}(\text{p}K_B - \log c_0)$ ), jeweils für die am Äquivalenzpunkt vorliegende Verbindung). Im Falle einer zweibasigen Säure wurde der dazwischen liegende Äquivalenzpunkt nach der Formel  $\text{pH} = \frac{1}{2}(\text{p}K_{A1} + \text{p}K_{A2})$  berechnet.

Der intrinsische pH-Wert der Matrixlösungen wurde ebenfalls aus den zugehörigen Säure- bzw. Basekonstanten berechnet ( $c = 0.1 \text{ mol/L}$ , Berechnung wie oben). Zusätzlich wurde der intrinsische pH-Wert direkt mittels pH-Elektrode bestimmt (3-AQ 10 g/L in Wasser; ANP 10 g/L in Ethanol/Wasser (1:1); alle anderen Matrizes 20 g/L in Acetonitril/Wasser 1:1/V:V). Da fast alle Matrixlösungen etwa 50% organische Lösungsmittel enthalten, ergibt diese Messung nicht den  $pK_A$ -Wert, sondern einen für die gegebene Lösungsmittelzusammensetzung definierten  $pK$ -Wert. In Acetonitril haben Indikatoren z.B. dann deutlich höhere  $pK_A$ -Werte, wenn aus neutralen Molekülen bei der Dissoziation Ionen entstehen (die Dissoziation wird zurückgedrängt) [Kol67, De86]. Solange aber genug Wasser vorhanden ist, ist der Fehler relativ klein und kann in erster Näherung vernachlässigt werden. Dies zeigt auch die relativ gute Übereinstimmung der errechneten und gemessenen Werte, die nur im Falle von 3-AQ um gut eine pH-Einheit differieren.

Für die Titration der pH-Indikatoren wurde  $10^{-4} \text{ mol}$  des Farbstoffs in 20 mL Wasser gelöst und mit  $0.01 \text{ mol/L}$  NaOH (ggf. nach Zugabe von HCl) titriert. Trotz der um den Faktor zehn niedrigeren Konzentration ( $c = 0.05 \text{ mol/L}$ ), war aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit in einigen Fällen ein vorgelagertes Löslichkeitsgleichgewicht zu erkennen, vor allem wenn die Löslichkeit von zwei Formen des Indikators stark unterschiedlich war. Zusätzlich stellte sich das Säure-Base-Gleichgewicht teilweise nur sehr langsam ein, vermutlich ebenfalls aufgrund vorgelagerter Gleichgewichte. Teilweise sind auch mehr als zwei Formen des Farbstoffs beteiligt, z.B. durch ein Gleichgewicht zwischen neutraler und zwitterionischer Form oder zwischen einem Lacton und der offenen Form. In diesen Fällen ergeben sich komplizierte Gleichgewichte, die durch Titration nur unzureichend erfaßt werden können. Daher wurden für die Auswertung und die Ermittlung der Äquivalenzpunkte die Literaturdaten herangezogen, wo immer dies möglich war. Die Berechnung der  $pK_A$ -Werte und Äquivalenzpunkte erfolgte wie oben bei den Matrizes beschrieben.

**H Literatur**

- [Aeb01] R. Aebersold, D. R. Goodlett, *Chem. Rev.* **101**, **2001**, 269-295. "Mass spectrometry in proteomics"
- [Aks95] F. Aksouh, P. Chaurand, C. Deprun, S. Della-Negra, J. Hoyes, Y. LeBeyec, R. R. Pinho, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, **1995**, 515-518. "Influence of the laser beam direction on the molecular ion ejection angle in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [All96] D. A. Allwood, I. K. Perera, J. Perkins, P. E. Dyer, G. A. Oldershaw, *Appl. Surface Science* **103**, **1996**, 231-244. "Preparation of 'near' homogeneous samples for the analysis of matrix-assisted laser desorption/ionisation processes"
- [All96a] D. A. Allwood, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, P. E. Dyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 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 Science* **109/110**, **1997**, 154-157. "Optical absorption of matrix compounds for laser-induced desorption and ionization (MALDI)"
- [All97a] D. A. Allwood, P. E. Dyer, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, *Appl. Surface Science* **109/110**, **1997**, 616-620. "Plasma modelling of matrix assisted UV laser desorption ionisation (MALDI)"
- [All97b] D. A. Allwood, P. E. Dyer, R. W. Dreyfus, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 499-503. "Ionization modelling of matrix molecules in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [All00] D. A. Allwood, P. E. Dyer, *Chem. Phys.* **261**, **2000**, 457-467. "Quantitative fluorescence measurements performed on typical matrix molecules in matrix-assisted laser desorption/ionisation"
- [Ama97] F. M. L. Amado, P. Domingues, M. G. Santana –Marques, A. J. Ferrer-Correira, K. B. Tomer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 1347-1352. "Discrimination effects and sensitivity variations in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Ams96] I. J. Amster, *J. Mass Spectrom.* **31**, **1996**, 1325-1337. "Fourier transform mass spectrometry"
- [Arm01] D. W. Armstrong, L.-K. Zhang, L. He, M. L. Gross, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 3679-3686. "Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Asa99] J. M. Asara, J. Allison, *Anal. Chem.* **71**, **1999**, 2866-2870. "Enhanced detection of oligonucleotides in UV MALDI MS using tetraamine spermine as a matrix additive"
- [Asf02] N. L. Asfandiarov, S. A. Pshenichnyuk, A. I. Fokin, V. G. Lukin, V. S. Fal'ko, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, **2002**, 1760-1765. "Electron capture negative ion mass spectra of some typical matrix-assisted laser desorption/ionization matrices"
- [Ast20] F. W. Aston, *Phil. Mag.* **39**, **1920**, 611-625. "The mass-spectra of chemical elements"
- [Axe99] J. Axelsson, M. Palmblad, K. Håkansson, P. Håkansson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, **1999**, 474-477. "Electron capture dissociation of substance P using a commercially available Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer"
- [Bah92] U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **64**, **1992**, 2866-2869. "Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Bah97] U. Bahr, J. Stahl-Zeng, E. Gleitsmann, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* **32**, **1997**, 1111-1116. "Delayed extraction time-of-flight MALDI mass spectrometry of proteins above 25 000 Da"

- [Bai94] J. Bai, Y.-H. Liu, T. C. Cain, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* **66**, **1994**, 3423-3430. "Matrix-assisted laser desorption/ionization using an active perfluorosulfonated ionomer film substrate"
- [Bal01] M. A. Baldwin, K. F. Medzihradzky, C. M. Lock, B. Fisher, T. A. Settineri, A. L. Burlingame, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 1707-1720. "Matrix-assisted laser desorption/ionization coupled with quadrupole/orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry for protein discovery, identification, and structural analysis"
- [Bar81a] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1981**, 325-327. "Fast atom bombardement of solids (F.A.B.): A new ion source for mass spectrometry"
- [Bar81b] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *Nature* **293**, **1981**, 270-275. "Fast atom bombardement of solids as an ion source in mass spectrometry"
- [Bas02] S. Bashir, W. I. Burkitt, P. J. Derrick, A. E. Giannakopoulos, *Int. J. Mass Spectrom.* **219**, **2002**, 697-701. "Iodine-assisted matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Bau02] B. J. Bauer, C. M. Guttman, D.-W. Liu, W. R. Blair, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, **2002**, 1192-1198. "Tri- $\alpha$ -naphthylbenzene as a crystalline or glassy matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization: a model system for the study of effects of dispersion of polymer samples at a molecular level"
- [Bea88] R. C. Beavis, J. Lindner, J. Grottemeyer, E. W. Schlag, *Chem. Phys. Lett.* **146**, **1988**, 310-314. "Sample-matrix effects in infrared laser neutral desorption, multiphoton-ionization mass spectrometry"
- [Bea89a] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**, **1989**, 233-237. "Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins"
- [Bea89b] R.C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**, **1989**, 432-435. "Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins"
- [Bea89c] R.C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**, **1989**, 436-439. "Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation"
- [Bea91] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Chem. Phys. Lett.* **181**, **1991**, 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.* **27**, **1992**, 156-158. " $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry"
- [Bea92a] R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* **27**, **1992**, 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.* **26**, **1993**, 442-447. "Epitaxial protein inclusion in sinapic acid crystals"
- [Bec77] H. D. Beckey, "Principles of field ionization and field desorption mass spectrometry, **1977**, Pergamon Press, London"
- [Bec95] C. H. Becker, K. J. Wu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, **1995**, 883-888. "On the photoionization of large molecules"
- [Bel96] A. M. Belu, J. M. DeSimone, R. W. Linton, G. W. Lange, R. M. Friedman, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, **1996**, 11-24. "Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for polymer characterization"
- [Bel98] M. E. Belov, C. P. Myatt, P. J. Derrick, *Chem. Phys. Lett.* **284**, **1998**, 412-418. "Chemical ionization of neutral peptides produced by matrix-assisted laser desorption"

- [Ben78] A. Benninghoven, W. K. Sichterhmann, *Anal. Chem.* **50**, **1978**, 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.* **53**, **1983**, 85-99. "Some aspects of secondary ion mass spectrometry of organic compounds"
- [Ben95] A. Bencsura, A. Vertes, *Chem. Phys. Lett.* **247**, **1995**, 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.* **11**, **1997**, 679-682. "Matrix-guest energy transfer in matrix-assisted laser desorption"
- [Ber99] K. Berlin, I. G. Gut, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **13**, **1999**, 1739-1743. "Analysis of negatively 'charge tagged' DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry"
- [Ber02] S. Berkenkamp, C. Menzel, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, **2002**, 209-220. "Measurements of mean initial velocities of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry"
- [Bil93] T. M. Billeci, J. T. Stults, *Anal. Chem.* **65**, **1993**, 1709-1716. "Tryptic mapping of recombinant proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Bir00] G. H. Bird, A. R. Lajmi, J. A. Shin, *Anal. Chem.* **74**, **2002**, 219-225. "Manipulation of temperature to improve solubility of hydrophobic proteins and cocrystallization with matrix for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry"
- [Bök95] V. Bökelmann, B. Spengler, R. Kaufmann, *Eur. Mass Spectrom.* **1**, **1995**, 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.* **11**, **1997**, 603-609. "Influence of solvents and detergents on matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry measurements of proteins and oligonucleotides"
- [Boo89] G. Booth, H. Zollinger, K. McLaren, W. G. Sharpless, A. Westwell, in *Ullman's Encyclopedia of industrial chemistry, Vol. A 9*, **1989**, 73-124, 5<sup>th</sup> Edition (Ed.: T. Campbell, R. Pfeffkorn, J.F. Rounsaville), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. "Dyes, general survey"
- [Bre98] K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* **176**, **1998**, 149-159. "Matrix-assisted laser desorption/chemical ionization with reagent ion generation directly from a liquid matrix"
- [Bre99] K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* **184**, **1999**, 25-38. "Gas-phase basicities of deprotonated matrix-assisted laser desorption/ionization matrix molecules"
- [Bre99a] K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, **1999**, 1111-1123. "Proton transfer reactions of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix monomers and dimers"
- [Bre00] G. A. Breaux, K. B. Green-Church, A. France, P. A. Limbach, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 1169-1174. "Surfactant-aided, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of hydrophobic and hydrophilic peptides"
- [Bre03] K. Breuker, R. Knochenmuss, J. Zhang, A. Stortelder, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* **226**, **2003**, 211-222. "Thermodynamic control of final ion distributions in MALDI: in-plume proton transfer reactions"

- [Bro95] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Anal. Chem.* **67**, **1995**, 1998-2003. "Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer"
- [Bro95a] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Anal. Chem.* **67**, **1995**, 3990-3999. "Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions"
- [Bro96] R. S. Brown, B. L. Carr, L. L. Lennon, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, **1996**, 225-232. "Factors that influence the observed fast fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption"
- [Bro97] A. H. Brockman, B. S. Dodd, R. Orlando, *Anal. Chem.* **69**, **1997**, 4716-4720. "A desalting approach for MALDI-MS using on-probe hydrophobic self-assembled monolayers"
- [Bro97a] R.S. Brown, J. Feng, D. C. Reiber, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **169/170**, **1997**, 1-18. "Further studies of in-source fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption-ionization"
- [Bro01] T. Brown, N. L. Clipston, N. Simjee, H. Luftmann, H. Hungerbühler, T. Drewello, *Int. J. Mass Spectrom.* **210/211**, **2001**, 249-263. "Matrix-assisted laser desorption/ionization of amphiphilic fullerene derivatives"
- [Bur95] E. J. Bures, H. Nika, D. T. Chow, H. D. Morrison, D. Hess, R. Aebersold, *Anal. Biochem.* **224**, **1995**, 364-372. "Synthesis of the protein-sequencing reagent 4-(3-pyridinylmethylaminocarboxypropyl) phenyl isothiocyanate and characterization of 4-(3-pyridinylmethylaminocarboxypropyl) phenylthiohydantoins"
- [Bur97] R. D. Burton, C. H. Watson, J. R. Eyler, G. L. Lang, D. H. Powell, M. Y. Avery, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 443-446. "Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Cad00] M. Cadene, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 5655-5658. "A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins"
- [Cai02] Y. Cai, R. B. Cole, *Anal. Chem.* **74**, **2002**, 985-991. "Stabilization of anionic adducts in negative ion electrospray mass spectrometry"
- [Cai02a] Y. Cai, W.-P. Peng, S. J. Kuo, S. Sabu, C.-C. Han, H.-C. Chang, *Anal. Chem.* **74**, **2002**, 4434-4440. "Optical detection and charge-state analysis of MALDI-generated particles with molecular masses larger than 5 MDa"
- [Cal97] P. J. Calba, J. F. Muller, A. Hachimi, P. Laréginie, R. Guglielmetti, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 1602-1611. "Spirooxazines as a molecular probe for the study of matrix-assisted laser desorption/ionization processes. Part I: Study of the interaction effect between the molecular probe and the matrix"
- [Cal98] P. J. Calba, J. F. Muller, M. Inouye, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, **1998**, 1727-1731. "H-atom transfer following analyte photoionization in matrix-assisted laser desorption/ionization processes"
- [Cas92] J. A. Castro, C. Köster, C. Wilkins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, **1992**, 239-241. "Matrix-assisted laser desorption/ionization of high-mass molecules by Fourier-transform mass spectrometry"
- [Cer85] R. L. Cerny, M. L. Gross, *Anal. Chem.* **57**, **1985**, 1163-1165. "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, G. J. Gardiner, M. Bowden, *Org. Mass Spectrom.* **27**, **1992**, 188-194. "Suppression of matrix ions in ultraviolet laser desorption: Scanning electron microscopy and Raman spectroscopy of the solid samples"



- [Cha94] T.-W. D. Chan, I. Thomas, A. W. Colburn, P. J. Derrick, *Chem. Phys. Lett.* **222**, **1994**, 579-585. "Initial velocities of positive and negative protein molecule-ions produced in matrix-assisted ultraviolet laser desorption using a liquid matrix"
- [Cha99] P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, **1999**, 91-103. "Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry"
- [Che96] S.-W. Cheng, T.-W. D. Chan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **6**, **1992**, 239-241. "Use of ammonium halides as co-matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization studies of oligonucleotides"
- [Che98] X. Chen, J. A. Carroll, R. C. Beavis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, **1998**, 885-891. "Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength"
- [Che01] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, *J. Mass Spectrom.* **36**, **2001**, 849-865. "An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry"
- [Chi93] M. P. Chiarelli, A. G. Sharkey, D. M. Hercules, *Anal. Chem.* **65**, **1993**, 307-311. "Excited-state proton transfer in laser mass spectrometry"
- [Cho99] C.-W. Chou, P. Williams, P. A. Limbach, *Int. J. Mass Spectrom.* **193**, **1999**, 15-27. "Matrix influence on the formation of positively charged oligonucleotides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Chr96] N. P. Christian, L. Giver, A. D. Ellington, J. P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 1980-1986. "Effects of matrix variations and the presence of iron on matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra of DNA"
- [Cla93] J. Claereboudt, M. Claeys, H. Geise, R. Gijbels, A. Vertes, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, **1993**, 78-812. "Laser microprobe mass spectrometry of quaternary phosphonium salts: Direct versus matrix-assisted laser desorption"
- [Coh96] S. L. Cohen, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **68**, **1996**, 31-37. "Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins"
- [Coh97] L. R. H. Cohen, K. Strupat, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, **1997**, 1046-1052. "Analysis of quaternary protein ensembles by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Col94] S. M. Colby, T. B. King, J. P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, **1994**, 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"
- [Con01] A. Conneely, S. McClean, W. F. Smyth, G. McMullan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, **2001**, 2076-2084. "Study of the mass spectrometric behaviour of phthalocyanine and azo dyes using electrospray ionisation and matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Cor92] D. S. Cornett, M. A. Duncan, I. J. Amster, *Org. Mass Spectrom.* **27**, **1992**, 831-832. "Matrix-assisted laser desorption/ionization at visible wavelengths using a two-component matrix"
- [Coo83] R. G. Cooks, K. L. Busch, G. L. Glish, *Science* **222**, **1983**, 273-291. "Mass spectrometry: Analytical capabilities and potentials"
- [Cot87] R. J. Cotter, *Anal. Chim. Acta* **195**, **1987**, 45. "Laser mass spectrometry: An overview of techniques, instruments and applications"
- [Cre95] *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, **1995**, 76<sup>th</sup> Edition, CRC Press, Boca Raton, FL, (Ed.: D. R. Lide).

- [Cur93] G. J. Currie, Y. R. Yares, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, **1993**, 955-963. "Analysis of oligonucleotides by negative-ion matrix-assisted laser desorption mass spectrometry"
- [Dai96] Y. Dai, R. M. Whittal, L. Li, *Anal. Chem.* **68**, **1996**, 2494-2500. "Confocal fluorescence microscopic imaging for investigating the analyte distribution in MALDI matrices"
- [Dai99] Y. Dai, R. M. Whittal, L. Li, *Anal. Chem.* **71**, **1999**, 1087-1091. "Two-layer sample preparation: a method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures"
- [Dan93] P. O. Danis, D. E. Karr, *Org. Mass Spectrom.* **28**, **1993**, 923. "A facile sample preparation for the analysis of synthetic organic polymers by matrix-assisted laser desorption"
- [De86] A. L. De, A. K. Atta, *Can. J. Chem.* **64**, **1986**, 1521-1526. "Solute-solvent effects in the dissociation of thymolsulfonephthalein (an uncharged acid) in aqueous mixtures of acetonitrile (ACN), urea, and dimethyl sulfoxide (DMSO)"
- [Dea93] P. A. Dean, R. M. O'Malley, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **7**, **1993**, 53-57. " $\text{Au}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Cu}^+$  attachment to polybutadiene in laser desorption at 1064 nm"
- [Dee97] M. J. Deery, K. R. Jennings, C. B. Jasieczek, D. M. Haddleton, A. T. Jackson, H. T. Yates, J. H. Scivens, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 57-62. "A study of cation attachment to polystyrene by means of matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry"
- [Dem18] A. J. Dempster, *Phys. Rev.* **11**, **1918**, 316-324. "A new method of positive ray analysis"
- [Dem92] P. Demirev, A. Westman, C. T. Reimann, P. Håkansson, D. Barofsky, B. U. R. Sundqvist, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **6**, **1992**, 187-191. "Matrix-assisted laser desorption with ultra-short laser pulses"
- [Dis01] A. M. Distler, J. Allison, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 5000-5003. "Improved MALDI-MS analysis of oligonucleotides through the use of fucose as a matrix additive"
- [Dog96] D. Dogruel, R. W. Nelson, P. Williams, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 801-804. "The effects of matrix pH and cation availability on the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of poly(methyl methacrylate)"
- [Dok91] S. Doktycz, P. J. Savickas, D. A. Krueger, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **5**, **1991**, 145-148. "Matrix/Sample interactions in ultraviolet laser-desorption of proteins"
- [Dor02] V. M. Doroshenko, V. V. Laiko, N. I. Taranenko, V. D. Berkout, H. S. Lee, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **221**, **2002**, 39-58. "Recent developments in atmospheric pressure MALDI mass spectrometry"
- [Dre95] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **141**, **1995**, 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"
- [Dre95] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **154**, **1996**, 171-178. "Matrix-assisted laser desorption/ionization with nitrogen lasers of different pulse widths"
- [Dre03] K. Dreisewerd, *Chem. Rev.* **103**, **2003**, 395-425. "The desorption process in MALDI"
- [Dub96] F. Dubois, R. Knochenmuss, R. J. J. M. Steenvoorden, K. Breuker, R. Zenobi, *Eur. Mass Spectrom.* **2**, **1996**, 167-172. "On the mechanism and control of salt-induced resolution loss in matrix-assisted laser desorption/ionization"

- [Dur02] E. D. Durrant, R. S. Brown, *Proceedings of the 50<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, 2002*. "Ionization in MALDI: Do solvent occlusions in matrix crystals play a role?"
- [Dwo97] R. Dworschak, W. Ens, K. G. Standing, *Proceedings of the 45<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm Springs, CA, 1997*. "Initial velocity measurements in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Dwo98] R. Dworschak, V. Spicer, W. Ens, K. G. Standing, *Proceedings of the 46<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, 1998*. "Simultaneous initial velocity distribution measurements of matrix ions and their fragments"
- [Edm96] R. D. Edmondson, D. H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, **1996**, 995-1001. "Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass measurement by using delayed extraction"
- [Ehr92] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, *Org. Mass Spectrom.* **270**, **1992**, 472-480. "Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry"
- [Ehr95] H. Ehring, B. U. R. Sundqvist, *J. Mass Spectrom.* **30**, **1995**, 1303-1310. "Studies of the MALDI process by luminescence spectroscopy"
- [Ehr96] H. Ehring, C. Costa, P. A. Demirev, B. U. R. Sundqvist, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 821-824. "Photochemical versus thermal mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization probed by back side desorption"
- [Ehr96a] H. Ehring, B. U. R. Sundqvist, *Appl. Surface Science* **96-98**, **1996**, 577-580. "Excited state relaxation processes of MALDI-matrices studied by luminescence spectroscopy"
- [Eks01] S. Ekström, D. Ericsson, P. Önnarfjord, M. Bennngtsson, J. Nilsson, G. Marko-Varga, T. Laurell, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 214-219. "Signal amplification using "spot-on-a-chip" technology for the identification of proteins via MALDI-TOF MS"
- [Ens91] W. Ens, Y. Mao, F. Mayer, K. G. Standing, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **5**, **1991**, 117-123. "Properties of matrix-assisted laser desorption. Measurements with a time-to-digital converter"
- [Ewi01] N. P. Ewing, G. A. Pallante, X. Zhang, C. J. Cassady, *J. Mass Spectrom.* **36**, **2001**, 875-881. "Gas-phase basicities for ions from bradykinin and its des-arginine analogues"
- [Far98] T. B. Farmer, R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.* **33**, **1998**, 697-704. "Determination of protein-protein interactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Fen87] C. Fenselau, R. J. Cotter, *Chem. Rev.* **87**, **1987**, 501-512. "Chemical aspects of fast atom bombardment"
- [Fen89] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **246**, **1989**, 64-71. "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules"
- [Fig98] I. D. Figueroa, O. Torres, D. H. Russell, *Anal. Chem.* **70**, **1998**, 4527-4533. "Effects of the water content in the sample preparation for MALDI on the mass spectra"
- [Fit93] M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **65**, **1993**, 3204-3211. "Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides"
- [For84] J. Foropoulos, D. D. DesMarteau, *Inorg. Chem.* **23**, **1984**, 3720-3723. "Synthesis, properties, and reactions of bis((trifluoromethyl)sulfonyl) imide, (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH"

- [Fou97] I. Fournier, R. C. Beavis, J. C. Blais, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 169/170, **1997**, 19-29. "Hysteresis effects observed in MALDI using oriented, protein-doped matrix crystals"
- [Fou98] I. Fournier, A. Brunot, J. C. Blais, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Proceedings of the 46<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL*, **1998**. "Some dynamical aspects in the MALDI-TOF-MS ion formation"
- [Fou01] I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, *Proceedings of the 49<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL*, **2001**. "Investigation of the MALDI process studying large crystals of MALDI matrices"
- [Fou02] I. Fournier, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Int. J. Mass Spectrom.* 219, **2002**, 515-523. "Irradiation effects in MALDI and surface modifications. Part I: Sinapinic acid monocrystals"
- [Fou02a] I. Fournier, A. Brunot, J. C. Tabet, G. Bolbach, *Int. J. Mass Spectrom.* 213, **2002**, 203-215. "Delayed extraction experiments using a repulsive potential before extraction: evidence of clusters as ion precursors in UV-MALDI. Part I: Dynamical effects with the matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid"
- [Fra02] V. Frankevich, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* 220, **2002**, 11-19. "The origin of electrons in MALDI and their use for sympathetic cooling of negative ions in FTICR"
- [Fre00] R. Frey, A. LaRotta, A. Holle, C. Köster, J. Franzen, *Proceedings of the 48<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA*, **2000**. "A reflector TOF system with MS/MS capability"
- [Fri01] S. D. Friess, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12, **2001**, 810-818. "Protein structure information from mass spectrometry? Selective titration of arginine residues by sulfonates"
- [Fri02] S. D. Friess, J. M. Daniel, R. Hartmann, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* 219, **2002**, 269-281. "Mass spectrometric noncovalent probing of amino acids in peptides and proteins"
- [Fül96] M. Fülcher, E. L. Mehler, *Chem. Phys.* 204, **1996**, 403-410. "The effect of hydrogen bonding on protonation energies and ion pair formation"
- [Gal86] P. J. Gale, B. L. Bentz, B. T. Chait, F. H. Field, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* 58, **1996**, 1070-1076. "Reduction in liquid secondary ion mass spectrometry. Comparison of the fission fragment and liquid secondary ion mass spectra of organic dyestuffs"
- [Gal01] J.-F. Gal, P.-C. Maria, W. D. Raczynska, *J. Mass. Spectrom.* 36, **2001**, 699-716. "Thermochemical aspects of proton transfer in the gas phase"
- [Gal02] M. C. Galicia, A. Vertes, J. H. Callahan, *Anal. Chem.* 74, **2002**, 1891-1895. "Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization in transmission geometry"
- [Gar00] R. W. Garden, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* 72, **2000**, 30-36. "Heterogeneity within MALDI samples as revealed by mass spectrometric imaging"
- [Gar02] B. A. Garcia, P. J. Heaney, K. Tang, *Anal. Chem.* 74, **2002**, 2083-2091. "Improvement of the MALDI-TOF analysis of DNA with thin-layer matrix preparation"
- [Gev00] K. Gevaert, J. Vandekerckhove, *Electrophoresis* 21, **2000**, 1145-1154. "Protein identification methods in proteomics"
- [Gim92] M. E. Gimón, L. M. Preston, T. Solouki, M. A. White, D. H. Russell, *Org. Mass Spectrom.* 27, **1992**, 827. "Are proton transfer reactions of excited states involved in UV laser desorption/ionization?"

- [Gim97] M. Gimon-Kinsel, L. M Preston-Schaffter, G. R. Kinsel, D. H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, **1997**, 2534-2540. "Effects of matrix structure/acidity on ion formation in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry"
- [Glü99] M. Glückmann, M. Karas, *J. Mass Spectrom.* **34**, **1999**, 467-477. "The initial velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Glü01] M. Glückmann, A. Pfenninger, R. Krüger, M. Thierolf, M. Karas, V. Horneffer, F. Hillenkamp, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom.* **210/211**, **2001**, 121-132. "Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes ?"
- [Glü01a] M. Glückmann, Dissertation, J.-W. Goethe Universität Frankfurt, **2001**. "Untersuchungen zur Ablation und Ionenbildung bei matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation (MALDI)"
- [Gob99] J. Gobom, E. Nordhoff, E. Migorodskaya, R. Ekman, P. Roepstorff, *J. Mass Spectrom.* **34**, **1999**, 105-116. "Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Gob01] J. Gobom, N. Schuerenberg, M. Mueller, D. Theiss, H. Lehrach, E. Nordhoff, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 434-438. " $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics"
- [Gor02] M. V. Gorshkov, V. E. Frankevich, R. Zenobi, *Eur. Mass Spectrom.* **8**, **2002**, 67-69. "Characteristics of photoelectrons emitted in matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance experiments"
- [Gre00] K. B. Green-Church, P. A. Limbach, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, **2000**, 24-32. "Mononucleotide gas-phase proton affinities as determined by the kinetic method"
- [Gré00] G. Grégoire, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, A. Peremans, D. Solgadi, *J. Phys. Chem. A* **104**, **2000**, 9087-9090. "Picosecond hydrogen transfer in the phenol-(NH<sub>3</sub>)<sub>n=1-3</sub> excited state"
- [Gri96] G. Grigorean, R. I. Carey, I. J. Amster, *Eur. Mass Spectrom.* **2**, **1996**, 139-143. "Studies of exchangeable protons in the matrix-assisted laser desorption/ionization process"
- [Gri01] T. J. Griffin, S. P. Gygi, B. Rist, R. Aebersold, A. Loboda, A. Jilkine, W. Ens, K. G. Standing, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 978-986. "Quantitative proteomic analysis using a MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometer"
- [Gro97] J. Gross, K. Strupat, *Trends in Analytical Chemistry* **17**, **1998**, 470-483. "Matrix-assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry applied to biological macromolecules"
- [Gro99] S. Gronert, *J. Mass Spectrom.* **34**, **1999**, 787-796. "Determining the gas-phase properties and reactivities of multiply charged ions"
- [Gro01] J. Gross, F. Hillenkamp, K. X. Wan, M. L. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, **2001**, 180-192. "Metastable decay of negatively charged oligodeoxynucleotides analyzed with ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay and deuterium exchange"
- [Gui95] M. Guilhaus, *J. Mass Spectrom.* **30**, **1995**, 1519-1532. "Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry"
- [Gus95] A. I. Gusev, W. R. Wilkinson, A. Procter, D. M. Hercules, *Anal. Chem.* **67**, **1995**, 1035-1041. "Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in MALDI analysis"

- [Gut97] I. G. Gut, W. A. Jeffery, D. J. C. Pappin, S. Beck, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 43-50. "Analysis of DNA by 'charge tagging' and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Hal00] J. E. Hale, J. P. Butler, M. D. Knierman, G. W. Becker, *Anal. Biochem.* **287**, **2000**, 110-117. "Increased sensitivity of tryptic peptide detection by MALDI-TOF mass spectrometry is achieved by conversion of lysine to homoarginine"
- [Han97] G. S. Hanan, D. Volkmer, U. S. Schubert, J.-M. Lehn, G. Baum, D. Fenske, *Angew. Chem.* **109**, **1997**, 1929-1931. "Koordinationsarchitekturen: Vierkern-Cobalt(II)-Komplexe mit [2 x 2]-Gitterstruktur"
- [Han99] S. D. Hanton, P. A. C. Clark, K. G. Owens, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, **1999**, 104-111. "Investigations of matrix-assisted laser desorption/ionization sample preparation by time-of-flight secondary ion mass spectrometry"
- [Han99a] M. Handschuh, S. Nettesheim, R. Zenobi, *Appl. Surface Sci.* **137**, **1999**, 125-135. "Laser-induced molecular desorption and particle ejection from organic films"
- [Han01] S. D. Hanton, *Chem. Rev.* **101**, **2001**, 527-569. "Mass spectrometry of polymers and polymer surfaces"
- [Har97] A. G. Harrison, *Mass Spectrom. Rev.* **16**, **1997**, 201-217. "The gas-phase basicities and proton affinities of amino acids and peptides"
- [Har99] D. J. Harvey, *Mass Spectrom. Rev.* **18**, **1999**, 349-451. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates"
- [Har99a] D. J. Harvey, A. P. Hunter, R. H. Bateman, J. Brown, G. Critchley, *Int. J. Mass Spectrom.* **188**, **1999**, 131-146. "Relationship between in-source and post-source fragment ions in the matrix-assisted laser desorption (ionization) mass spectra of carbohydrates recorded with reflectron time-of-flight mass spectrometers"
- [Hes95] D. Hess, H. Nika, D. T. Chow, E. J. Bures, H. D. Morrison, R. Aebersold, *Anal. Biochem.* **224**, **1995**, 373-381. "Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of 4-(3-pyridinylmethylaminocarboxypropyl) phenylthiohydantoins"
- [Hil83] F. Hillenkamp, in *Ion Formation from Organic Solids*, **1983**, 25, 190-205, Springer Verlag, Berlin (Ed.: A. Benninghoven). "Laser induced ion formation from organic solids"
- [Hil90] F. Hillenkamp, M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, in *Ion Formation from Organic Solids (IFOS V)*, **1990**, 111-118, John Wiley and Sons, Chichester (Eds.: A. Hedin, B. U. R. Sundqvist, A. Benninghoven). "On popping corn, erupting volcanoes, tasting wine, massive proteins and related matters"
- [Hil00] F. Hillenkamp, M. Karas, *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, **2000**, 71-77. "Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience"
- [Hob98] A.-M. Hoberg, D. M. Haddleton, P. J. Derrick, *Eur. Mass Spectrom.* **4**, **1998**, 435-440. "The effect of counter ions in matrix-assisted laser desorption/ionization of poly(methyl methacrylate)"
- [Hor99] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **185/186/187**, **1999**, 859-870. "Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acids"
- [Hor01] V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 1016-1022. "Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy"

- [Hor03] V. Horneffer, R. Reichelt, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 226, **2003**, 117-131. "Protein incorporation into MALDI-matrix crystals investigated by high resolution field emission scanning electron microscopy"
- [Hun98] K. C. Hung, H. Ding, B. Guo, *Anal. Chem.* 70, **1998**, 3088-3093. "Use of paraffin wax film in MALDI-TOF analysis of DNA"
- [Hun99] K. C. Hung, H. Ding, B. Guo, *Anal. Chem.* 71, **1999**, 518-521. "Use of poly(tetrafluoroethylene)s as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins"
- [Hur94] G. B. Hurst, T. J. Czartoski, M. V. Buchanan, *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL*, **1994**. "Alternative sample preparation methods for MALDI-MS"
- [Hut91] T. Huth-Fehre, C. H. Becker, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 5, **1991**, 378-382. "Energetics of Gramicidin S after UV laser desorption from a ferulic acid matrix "
- [Ing94] A. Ingendoh, M. Karas, F. Hillenkamp, U. Giessmann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 131, **1994**, 345-354. "Factors affecting the resolution in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry"
- [Iti02] T. E. Itina, L. V. Zhigilei, B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B* 106, **2002**, 303-310. "Microscopic mechanisms of matrix assisted laser desorption of analyte molecules: insights from molecular dynamics simulation"
- [Jac01] A. Jacobs, O. Dahlman, *Anal. Chem.* 73, **2001**, 405-410. "Enhancement of the quality of MALDI mass spectra of highly acidic oligosaccharides by using a Nafion-coated probe"
- [Jes98] S. Jespersen, W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Mass Spectrom.* 33, **1998**, 1088-1093. "Basic matrices in the analysis of non-covalent complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Jør98] T. J. D. Jørgensen, G. Bojesen, H. Rahbek-Nielsen, *Eur. Mass Spectrom.* 4, **1998**, 39-45. "The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions"
- [Joh91] R. E. Johnson, B. U. R. Sundqvist, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5, **1991**, 574-578. "Laser-pulse ejection of organic molecules from a matrix: lessons from fast-ion-induced ejection"
- [Joh98] R. E. Johnson, Y. LeBeyec, *Int. J. Mass Spectrom.* 177, **1998**, 111-118. "Angular distribution of the ejecta in matrix-assisted laser desorption/ionization: model dependence"
- [Joh01] T. Johnson, J. Bergquist, R. Ekman, E. Nordhoff, M. Schürenberg, K.-D. Klöppel, M. Müller, H. Lehrach, J. Gobom, *Anal. Chem.* 73, **2001**, 1670-1675. "A CE-MALDI interface based on the use of prestructured sample supports"
- [Jon93] K. Jonscher, G. Currie, A. L. McCormack, J. R. Yates, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 7, **1993**, 20-26. "Matrix-assisted laser desorption of peptides and proteins on a quadrupole ion trap mass spectrometer"
- [Jon93a] R. B. Jones, S. L. Allman, K. Tang, W. R. Garrett, C. H. Chen, *Chem. Phys. Lett.* 212, **1993**, 451-457. "Neutralization of negatively charged oligonucleotides"
- [Juh93] P. Juhasz, C. E. Costello, K. Biemann, *J. Am. Chem. Soc.* 115, **1993**, 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. USA* 91, **1994**, 4333-4337. "Mass spectrometric molecular-weight determination of highly acidic compounds of biological significance via their complexes with basic polypeptides"

- [Juh97] P. Juhasz, M. L. Vestal, S. A. Martin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, **1997**, 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"
- [Kah93] M. S. Kahr, C. L. Wilkins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, **1993**, 453-460. "Silver nitrate chemical ionization for analysis of hydrocarbon polymers by laser desorption Fourier transform mass spectrometry"
- [Kam97] J. Kampmeier, K. Dreisewerd, M. Schürenberg, K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **169/170**, **1997**, 31-41. "Investigations of 2,5-DHB and succinic acid matrices for IR and UV MALDI. Part I: UV and IR laser ablation in the MALDI process"
- [Kar85] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **57**, **1985**, 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.* **87**, **1987**, 53-68. "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds"
- [Kar88] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **60**, **1988**, 2301-2303. "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.* **92**, **1989**, 231-242. "UV laser matrix desorption/ionization mass spectrometry of proteins in the 100 000 dalton range"
- [Kar90] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, F. Hillenkamp, *Anal. Chim. Acta* **241**, **1990**, 175-185. "Principles and applications of matrix-assisted UV-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.* **28**, **1993**, 1476-1481. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid"
- [Kar93a] M. Karas, in *Fundamental Processes in Sputtering of Atoms and Molecules (SPUT92)*, Symposium on the Occasion of the 250<sup>th</sup> 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.* **67**, **1995**, 675-679. "Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI TOF mass spectrometry"
- [Kar96] M. Karas, U. Bahr, J.-R. Stahl-Zeng, in *Large ions: their vaporization, detection and structural analysis*, **1996**, 27-48, John Wiley and Sons (Ed.: T. Baer, C. Y. Ng, I. Powis). "Steps towards a more refined picture of the matrix function in UV MALDI"
- [Kar98] V. Karbach, R. Knochenmuss, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **12**, **1998**, 968-974. "Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization?"
- [Kar00] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer, *J. Mass Spectrom.* **35**, **2000**, 1-12. "Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors"
- [Kar03] M. Karas, U. Bahr, I. Fournier, M. Glückmann, A. Pfenninger, *Int. J. Mass Spectrom.* **226**, **2003**, 239-248. "The initial-ion velocity as a marker for different desorption-ionization mechanisms in MALDI"
- [Kar03a] M. Karas, R. Krüger, *Chem. Rev.* **103**, **2003**, 427-439. "Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism"



- [Kat98] V. Katta, D. T. Chow, M. F. Rohde, *Anal. Chem.* **70**, **1998**, 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.* **10**, **1996**, 1199-1208. "Post-source decay and delayed extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization-reflectron time-of-flight mass spectrometry. Are they trade-offs?"
- [Kel01] B. O. Keller, L. Li, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 2929-2936. "Nanoliter solvent extraction combined with microspot MALDI TOF mass spectrometry for the analysis of hydrophobic biomolecules"
- [Kin97] G. R. Kinsel, R. D. Edmonson, D. H. Russell, *J. Mass Spectrom.* **32**, **1997**, 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.* **34**, **1999**, 684-690. "Investigations of the dynamics of matrix-assisted laser desorption/ionization ion formation using an electrostatic analyzer/time-of-flight mass spectrometer"
- [Kin00] T. Kinumi, H. Niwa, H. Matsumoto, *Anal. Biochem.* **277**, **2000**, 177-186. "Phosphopeptide sequencing by in-source decay spectrum in delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry"
- [Kim01] Y. Kim, G. B. Hurst, M. J. Doktycz, M. V. Buchanan, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 2617-2624. "Improving spot homogeneity by using polymer substrates in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligonucleotides"
- [Kno96] R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, R. Zenobi, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 871-877. "The matrix suppression effect and ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Kno98] R. Knochenmuss, V. Karbach, U. Wiesli, K. Breuker, R. Zenobi, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **12**, **1998**, 529-534. "The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: Application to negative ions and further characteristics"
- [Kno98a] R. Knochenmuss, E. Lehmann, R. Zenobi, *Eur. Mass Spectrom.* **4**, **1998**, 421-426. "Polymer cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Kno00] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi, *J. Mass Spectrom.* **35**, **2000**, 1237-1245. "Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Kno00a] R. Knochenmuss, A. Vertes, *J. Phys. Chem. B* **104**, **2000**, 5406-5410. "Time-delayed 2-pulse studies of MALDI matrix ionisation mechanisms"
- [Kno02] R. Knochenmuss, *Proceedings of the 50<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Orlando, FL, 2002*. "A quantitative model for UV-MALDI ionization: inclusion of plume expansion and clusters"
- [Kno02a] R. Knochenmuss, *J. Mass Spectrom.* **37**, **2002**, 867-877. "A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Kno03] R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Chem. Rev.* **103**, **2003**, 441-452. "MALDI ionization: The role of in-plume processes"
- [Koe92] C. Köster, J. A. Castoro, C. L. Wilkins, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, **1992**, 7572-7574. "High-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization of biomolecules by Fourier transform mass spectrometry"

- [Koe95] H. J. Köchling, K. Biemann, *Proceedings of the 43<sup>rd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GE, 1995*. "Novel sample preparation for MALDI"
- [Kol67] I. M. Kolthoff, M. K. Chantooni Jr., S. Bhowmik, *Anal. Chem.* **39**, **1967**, 315-320. "Acid-base indicator constants in acetonitrile"
- [Koo00] J. M. Koomen, W. K. Russell, J. M. Hettick, D. H. Russell, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 3860-3866. "Improvement of resolution, mass accuracy, and reproducibility in reflected mode DE-MALDI-TOF analysis of DNA using fast evaporation-overlay sample preparations"
- [Koo00a] J. M. Koomen, D. H. Russell, *J. Mass Spectrom.* **35**, **2000**, 1025-1034. "Ultraviolet/matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric characterization of 2,5-dihydroxybenzoic acid-induced reductive hydrogenation of oligonucleotides on cytosine residues"
- [Kra96] J. Krause, M. Stoeckli, U. P. Schlunegger, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 1927-1933. "Studies on the selection of new matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry"
- [Kra99] E. Krause, H. Wenschuh, P. R. Jungblut, *Anal. Chem.* **71**, **1999**, 4160-4165. "The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins"
- [Kru95] A. N. Krutchinsky, A. I. Dolguine, M. A. Khodorkovski, *Anal. Chem.* **67**, **1995**, 1963-1967. "Matrix-assisted laser desorption ionization of neutral clusters composed of matrix and analyte molecules"
- [Kru98] A. N. Krutchinsky, A. V. Loboda, V. L. Spicer, R. Dworschak, W. Ens, K. G. Standing, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **12**, **1998**, 508-518. "Orthogonal injection of matrix-assisted laser desorption/ionization ions into a time-of-flight spectrometer through a collisional damping interface"
- [Kru01] A. N. Krutchinsky, M. Kalkum, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 5066-5077. "Automatic identification of proteins with a MALDI-quadrupole ion trap mass spectrometer"
- [Kru02] A. N. Krutchinsky, B. T. Chait, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, **2002**, 129-134. "On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra"
- [Krü01] R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 5812-5821. "Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes"
- [Krü02] R. Krüger, M. Karas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, **2002**, 1218-1226. "Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes"
- [Kus97] M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Migorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm, P. Roepstorff, *J. Mass Spectrom.* **32**, **1997**, 593-601. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes"
- [Lah00] H.-W. Lahm, H. Langen, *Electrophoresis* **21**, **2000**, 2105-2114. "Mass spectrometry: A tool for the identification of proteins separated by gels"
- [Lai00a] V. V. Laiko, M. A. Baldwin, A. L. Burlingame, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 652-657. "Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Lai00b] V. V. Laiko, S. C. Moyer, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 5239-5243. "Atmospheric pressure MALDI/ion trap mass spectrometry"

- [Lan98] C. M. Land, G. R. Kinsel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, **1998**, 1060-1067. "Investigation of the mechanism of intracluster proton transfer from sinapinic acid to biomolecular analytes"
- [Lan00] F. Landry, C. R. Lombardo, J. W. Smith, *Anal. Biochem.* **279**, **2000**, 1-8. "A method for application of samples to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight targets that enhances peptide detection"
- [Lan01] C. M. Land, G. R. Kinsel, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, **2001**, 726-731. "The mechanism matrix to analyte proton transfer in clusters of 2,5-dihydroxybenzoic acid and the tripeptide VPL"
- [Lec95a] P. Lecchi, H. M. T. Le, L. K. Pannell, *Nucl. Acids Res.* **23**, **1995**, 1276-1277. "6-Aza-2-thiothymine: a matrix for MALDI spectra of oligonucleotides"
- [Lec95b] P. Lecchi, L. K. Pannell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **6**, **1995**, 972-975. "The detection of intact double-stranded DNA by MALDI"
- [Leh97] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 1483-1492. "Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Contribution of pre-formed ions"
- [Len99] J. J. Lennon, K. A. Walsh, *Protein Sci.* **8**, **1999**, 2487-2493. "Locating and identifying posttranslational modifications by in-source decay during MALDI-TOF mass spectrometry"
- [Leh99] E. Lehmann, R. Zenobi, S. Vetter, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, **1999**, 27-34. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra reflect solution-phase zinc finger peptide complexation"
- [Lia95] P.-C. Liao, J. Allison, *J. Mass Spectrom.* **30**, **1995**, 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 mechanistical comments"
- [Lin01] Q. Lin, R. Knochenmuss, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **15**, **2001**, 1422-1426. "Two-photon ionization threshold of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix clusters"
- [Lit94] D. P. Little, J. P. Speir, M. W. Senko, P. B. O'Connor, F. W. McLafferty, *Anal. Chem.* **66**, **1994**, 2809-2815. "Infrared multiphoton dissociation of large multiply charged ions for biomolecule sequencing"
- [Lit97] D. P. Little, T. J. Cornish, M. J. O'Donnell, A. Braun, R. J. Cotter, H. Köster, *Anal. Chem.* **69**, **1997**, 4540-4546. "MALDI on a chip: Analysis of arrays of low-femtomole to subfemtomole quantities of synthetic oligonucleotides and DNA diagnostic products dispensed by a piezoelectric pipet"
- [Liu81] L. K. Liu, K. L. Busch, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* **53**, **1981**, 109-113. "Matrix-assisted secondary ion mass spectra of biological compounds"
- [Liu96] H. M. Liu, U. P. Schlunegger, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 483-489. "Matrix-assisted laser desorption/ionization of synthetic polymers with Azo compound matrices"
- [Liv00] V. Livadaris, J.-C. Blais, J.-C. Tabet, *Eur. Mass Spectrom.* **6**, **2000**, 409-413. "Formation of non-specific protein cluster ions in matrix-assisted laser desorption/ionization: abundances and dynamical aspects"
- [Lle92] C. F. Llenes, R. M. O'Malley, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **6**, **1992**, 564-570. "Cation attachment in the analysis of polystyrene and polyethylene glycol by laser-desorption time-of-flight mass spectrometry"
- [Lob00] A. V. Loboda, A. N. Krutchinsky, M. Bromirski, W. Ens, K. G. Standing, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **14**, **2000**, 1047-1057. "A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance"

- [Lüd02] H.-C. Lüdemann, R. W. Redmond, F. Hillenkamp, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **16**, **2002**, 1287-1294. "Singlet-singlet annihilation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization studied by fluorescence spectroscopy"
- [Luo02] G. Luo, I. Marginean, A. Vertes, *Anal. Chem.* **74**, **2002**, 6185-6190. "Internal energy of ions generated by matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Mar98] A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, G. S. Jackson, *Mass Spectrom. Rev.* **17**, **1998**, 1-35. "Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry: a primer"
- [Mar00] A. G. Marshall, *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, **2000**, 331-356. "Milestones in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development"
- [Mar00a] L. A. Marzilli, T. R. Golden, R. J. Cotter, A. S. Woods, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, **2000**, 1000-1008. "Peptide sequence information derived by pronase digestion and ammonium sulfate in-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry"
- [Mas99] C. Masselon, B. Salih, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, **1999**, 19-26. "Matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry of luteinizing hormone releasing hormone-metal ion complexes"
- [Mcf76] R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, *Science* **191**, **1976**, 920-925. "Californium-252-plasma desorption mass spectrometry"
- [Med00] K. F. Medzihradsky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal, A. L. Burlingame, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 552-558. "The characteristics of peptide collision-induced dissociation using high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer"
- [Mef95] A. Meffert, J. Grotemeyer, *Eur. Mass Spectrom.* **1**, **1995**, 594-598. "Reactions in molecular clusters: proton transfer to small amino acids"
- [Mef01] A. Meffert, J. Grotemeyer, *Int. J. Mass Spectrom.* **210/211**, **2001**, 521-530. "Dissociative proton transfer in cluster ions: clusters of aromatic carboxylic acids with amino acids"
- [Men99] C. Menzel, F. Hillenkamp, *Proceedings of the 47<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, TX*, **1999**. "Comparison of in-source fragmentation in UV- and IR-MALDI"
- [Mer89] *Merck Index*, **1989**, 11<sup>th</sup> Edition, Merck & Co. Inc., Rahway, NJ.
- [Met94] J. O. Metzger, R. Woisch, W. Tuszyński, R. Angermann, *Fresenius J. Anal. Chem.* **349**, **1994**, 473-474. "New type of matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of polysaccharides and proteins"
- [Mil02] T. Miliotis, S. Kjellström, J. Nilsson, T. Laurell, L.-E. Edholm, G. Marko-Varga, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **16**, **2002**, 117-126. "Ready-made matrix-assisted laser desorption/ionization target plate coated with thin matrix layer for automated sample deposition in high-density array format"
- [Mir94] U. A. Mirza, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **66**, **1994**, 2898-2904. "Effects of anions on the positive ion electrospray ionization mass spectra of peptides and proteins"
- [Mon97] M. Moniatte, C. Lesieur, B. Vécsey-Semjén, J. T. Buckley, F. Pattus, F. G. van der Goot, A. van Dorsselaer, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **169/170**, **1997**, 179-199. "Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry in the subunit stoichiometry study of high-mass non-covalent complexes"
- [Mor00] M. Mormann, S. Bashir, P. J. Derrick, D. Kuck, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, **2000**, 544-552. "Gas-phase basicities of the isomeric dihydroxybenzoic acids and gas-phase acidities of their radical cations"

- [Mow93] C. D. Mowry, M. V. Johnston, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **7**, **1993**, 569-575. "Simultaneous detection of ions and neutrals produced by matrix-assisted laser desorption"
- [Mow94] C. D. Mowry, M. V. Johnston, *J. Phys. Chem.* **98**, **1994**, 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.* **11**, **1997**, 89-98. "Enhanced cationization of polymers using delayed ion extraction with matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Muk98] S. Mukherjee, S. C. Bera, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **94**, **1998**, 67-71. "Low temperature laser flash photolysis and spectral studies of Methyl Red"
- [Nav97] T. J. P. Naven, D. J. Harvey, J. Brown, G. Critchley, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 1681-1686. "Fragmentation of complex carbohydrates following ionization by matrix-assisted laser desorption with an instrument fitted with time-lag-focusing"
- [Nel92] R. W. Nelson, T. W. Hutchens, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **6**, **1992**, 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"
- [Ngu95] D. N. Nguyen, G. W. Becker, R. M. Riggin, *J. Chromatogr. A* **705**, **1995**, 21-45. "Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology"
- [Nie99] M. W. F. Nielen, *Mass Spectrom. Rev.* **18**, **1999**, 309-344. "MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers"
- [Nie02] H. Nierengarten, E. Leize, E. Breuning, A. Garcia, F. Romero-Salguero, J. Rojo, J.-M. Lehn, A. Van Dorsselaer, *J. Mass Spectrom.* **37**, **2002**, 56-62. "Characterization of multimetallic grid-type complexes by electrospray mass spectrometry"
- [Niu98] S. Niu, W. Zhang, B. T. Chait, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, **1998**, 1-7. "Direct comparison of infrared and ultraviolet wavelength matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins"
- [Non97] H. Nonami, S. Fukui, R. Erra-Balsells, *J. Mass Spectrom.* **32**, **1997**, 287-296. "β-carboline alkaloids as matrices for matrix-assisted ultraviolet laser desorption time-of-flight mass spectrometry of proteins and sulfated oligosaccharides: a comparative study using phenylcarbonyl compounds, carbazoles and classical matrices"
- [Nor92] E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. F. Crain, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **6**, **1992**, 771-776. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared"
- [Nor93] E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, K. Kristiansen, P. Roepstorff, *Nucleic Acid. Res.* **21**, **1993**, 3347-3357. "Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Nor95] E. Nordhoff, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, A. Lezius, J. Muth, C. Meier, J. W. Engels, *J. Mass Spectrom.* **30**, **1995**, 99-112. "Direct mass spectrometric sequencing of low-picomole amounts of oligonucleotides with up to 21 bases by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Nor96] E. Nordhoff, F. Kirpekar, P. Roepstorff, *Mass Spectrom. Rev.* **15**, **1996**, 67-138. "Mass spectrometry of nucleic acids"

- [Odo97] M. J. O'Donnell, K. Tang, H. Köster, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Anal. Chem.* **69**, **1997**, 2438-2443. "High-density, covalent attachment of DNA to silicon wafers for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry"
- [Oha02] G. Ohanessian, *Int. J. Mass Spectrom.* **219**, **2002**, 577-592. "Interaction of MALDI matrix molecules with Na<sup>+</sup> in the gas phase"
- [Olu95] Z. Olumee, M. Sadeghi, X. Tang, A. Vertes, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **9**, **1995**, 744-752. "Amino acid composition and wavelength effects in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Ove90] A. Overberg, M. Karas, U. Bahr, R. Kaufmann, F. Hillenkamp, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **4**, **1990**, 293-296. "Matrix-assisted infrared-laser (2.94  $\mu\text{m}$ ) desorption/ionization mass spectrometry of large biomolecules"
- [Ove91] A. Overberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **5**, **1991**, 128-131. "Matrix-assisted laser desorption of large biomolecules with a TEA-CO<sub>2</sub>-laser"
- [Pac87] S. J. Pachuta, R. G. Cooks, *Chem. Rev.* **87**, **1987**, 647-669. "Mechanisms in molecular SIMS"
- [Pan92] Y. Pan, R. J. Cotter, *Org. Mass Spectrom.* **27**, **1992**, 3-8. "Measurement of the initial translational energies of peptide ions in laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Per95] I. K. Perera, J. Perkins, S. Kantartzoglou, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **9**, **1995**, 180-187. "Spin-coated samples for high resolution matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of large proteins"
- [Pfe99] A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, B. Stahl, G. Sawatzki, *J. Mass Spectrom.* **34**, **1999**, 98-104. "Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk"
- [Pie96] U. Piele, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser, *Nucl. Acids Res.* **21**, **1993**, 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, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 1786-1788. "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of sialylated glycopeptides and proteins using 2,6-dihydroxyacetophenone as a matrix"
- [Pre94] L. M. Preston-Schaffter, G. R. Kinsel, D. H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, **1994**, 800-806. "Effects of heavy-atom substituents on matrices used for matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry"
- [Pri99] D. M. Price, S. Bashir, P. R. Derrick, *Thermochim. Acta* **327**, **1999**, 167-171. "Sublimation properties of x,y-dihydroxybenzoic acid isomers as model matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) matrices"
- [Prz00] L. Przybilla, J.-D. Brand, K. Yoshimura, H. J. Räder, K. Müllen, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 4591-4597. "MALDI-TOF mass spectrometry of insoluble giant polycyclic aromatic hydrocarbons by a new method of sample preparation"
- [Pur98] A. A. Poretzky, D. B. Geohegan, *Chem. Phys. Lett.* **286**, **1998**, 425-432. "Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid maldi-matrix plumes"
- [Pur98a] A. A. Poretzky, D. B. Geohegan, *Appl. Surface Science* **127-129**, **1998**, 248-254. "LIF-imaging and gas-phase diagnostics of laser desorbed MALDI-matrix plumes"

- [Pur99] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, G. B. Hurst, M. V. Buchanan, *Phys. Rev. Lett.* **83**, **1999**, 444-447. "Imaging of vapor plumes produced by matrix assisted laser desorption: A plume sharpening effect"
- [Qin96] J. Qin, R. J. J. M. Steenvoorden, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **68**, **1996**, 1784-1791. "A practical ion trap mass spectrometer for the analysis of peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Qui94] A. P. Quist, T. Huth-Fehre, B. U. R. Sundqvist, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **8**, **1994**, 149-154. "Total yield measurements in matrix-assisted laser desorption using a quartz crystal microbalance"
- [Ras98] H. Rashidzadeh, B. Guo, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, **1998**, 724-730. "Investigation of metal attachment to polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization"
- [Ras98a] H. Rashidzadeh, B. Guo, *Eur. Mass Spectrom.* **4**, **1998**, 429-433. "Probing polystyrene cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Ras00] H. Rashidzadeh, Y. Wang, B. Guo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, **2000**, 439-443. "Matrix effects on selectivities of poly(ethyleneglycol)s for alkali metal ion complexation in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Ray01] S. S. Ray, S. K. Singh, P. Balaram, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, **2001**, 428-438. "An electrospray ionization mass spectrometry investigation of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS) binding to proteins"
- [Rec02] J. Rechthaler, G. Allmaier, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **16**, **2002**, 899-902. "One-way hydrophobic surface foil for UV matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides"
- [Rei98] D. C. Reiber, T. A. Grover, R. S. Brown, *Anal. Chem.* **70**, **1998**, 673-683. "Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching"
- [Rei98a] D. C. Reiber, R. S. Brown, S. Weinberger, J. Kenny, J. Bailey, *Anal. Chem.* **70**, **1998**, 1214-1222. "Unknown peptide sequencing using matrix-assisted laser desorption/ionization and in-source decay"
- [Rey98] I. Rey, P. Johansson, J. Lindgren, J. C. Lassègues, J. Grondin, L. Servant, *J. Phys. Chem. A* **102**, **1998**, 3249-3258. "Spectroscopic and theoretical study of  $(CF_3SO_2)_2N^-$  and  $(CF_3SO_2)_2NH$  (HTFSI)"
- [Rin82] K. L. Rinehart, *Science* **218**, **1982**, 254-260. "Fast atom bombardment mass spectrometry"
- [Roe84] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, **1984**, 601. "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides"
- [Ros89] E. Ross, J. Köthe, R. Naumann, W. Fischer, U. Jäschke, W.-D. Mayer, G. Wieland, E. J. Newman, C. M. Wilson, in *Ullman's Encyclopedia of industrial chemistry, Vol. A 14*, **1989**, 127-148, 5<sup>th</sup> Edition (Ed.: T. Campbell, R. Pfeffkorn, J.F. Rounsaville), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. "Indicator reagents"
- [Ros95] B. Rosinke, K. Strupat, F. Hillenkamp, J. Rosenbusch, N. Dencher, U. Krüger, H.-J. Galla, *J. Mass Spectrom.* **30**, **1995**, 1462-1468. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) of membrane proteins and non-covalent complexes"
- [Sad98] M. Sadeghi, A. Vertes, *Appl. Surface Science* **127-129**, **1998**, 226-234. "Crystallite size dependence of volatilization in matrix-assisted laser desorption ionization"
- [Sad01] M. Sadeghi, X. Wu, A. Vertes, *J. Phys. Chem. B* **105**, **2001**, 2578-2587. "Conformation changes, complexation, and phase transition in matrix-assisted laser desorption"
- [Sal98] B. Salih, R. Zenobi, *Anal. Chem.* **70**, **1998**, 1536-1543. "MALDI mass spectrometry of dye-peptide and dye-protein complexes"

- [Sal98a] B. Salih, C. Masselon, R. Zenobi, *J. Mass Spectrom.* 33, **1998**, 994-1002. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of noncovalent protein-transition metal ion complexes"
- [San98] R. Santillan, N. Farfán, D. Castillo, A. Gutiérrez, H. Höpfl, *Chem. Eur. J.* 4, **1998**, 1904-1909. "<sup>13</sup>C-NMR and crystallographic study of Thymolsulfonephthalein"
- [Sch93] J. C. Schwartz, M. E. Bier, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 7, **1993**, 27-32. "Matrix-assisted laser desorption of peptides and proteins using a quadrupole ion trap mass spectrometer"
- [Sch93a] K. Schneider, B. T. Chait, *Org. Mass Spectrom.* 28, **1993**, 1353-1361. "Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of homopolymer oligodeoxyribonucleotides. Influence of base composition on the mass spectrometric response"
- [Sch96] M. Schuerenberg, T. Schulz, K. Dreisewerd, F. Hillenkamp, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 10, **1996**, 1873-1880. "Matrix-assisted laser desorption/ionization in transmission geometry: Instrumental implementation and mechanistic implications"
- [Sch96a] M. Schürenberg, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, **1996**. "Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) in optischer Invertgeometrie und mit Wellenlängen im sichtbaren Spektralbereich"
- [Sch99] J. Schäfer, Dissertation, J.-W. Goethe Universität Frankfurt, **1999**. "Untersuchungen zur Bildung von negativen Ionen bei der matrixgestützten Laser-Desorptions/Ionisation Massenspektrometrie"
- [Sch00] M. Schuerenberg, C. Luebbert, H. Eickhoff, M. Kalkum, H. Lehrach, E. Nordhoff, *Anal. Chem.* 72, **2000**, 3436-3442. "Prestructured MALDI-MS sample supports"
- [Sch00a] A. Schmidt, M. Karas, *Proceedings of the 48<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA*, **2000**. "Characterization of peptide-anion-adducts by nano-ESI QIT MS"
- [Sch01] M. Schäfer, H. Budzikiewicz, *J. Mass Spectrom.* 36, **2001**, 1062-1068. "A fast atom bombardment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry study of doubly charged porphyrins"
- [Sco94] C. T. J. Scott, C. Kosmidis, W. J. Jia, K. W. D. Ledingham, R. P. Singhal, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 8, **1994**, 829-832. "Formation of atomic hydrogen in matrix-assisted laser desorption ionization"
- [Sha96] T. A. Shaler, J. N. Wickham, K. A. Sannes, K. J. Wu, C. H. Becker, *Anal. Chem.* 68, **1996**, 576-579. "Effect of impurities on the matrix-assisted laser desorption mass spectra of single-stranded oligodeoxynucleotides"
- [She01] Z. Shen, J. J. Thomas, C. Averbuj, K. M. Broo, M. Engelhard, J. E. Finn, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* 73, **2001**, 612-619. "Porous silicon as a versatile platform for laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Shi99] S. J. Shields, B. K. Bluhm, D. H. Russell, *Int. J. Mass Spectrom.* 182/183, **1999**, 185-195. "Novel method for [M+Cu]<sup>+</sup> ion formation by matrix-assisted laser desorption ionization"
- [Sim97] T. A. Simmons, P. A. Limbach, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 11, **1997**, 567-572. "The use of a co-matrix for improved analysis of oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry"
- [Sjö95] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectromchim. Acta A* 51, **1995**, L7-L21. "Absorption and fluorescence properties of fluorescein"
- [Ske00] R. Skelton, F. Dubois, R. Zenobi, *Anal. Chem.* 72, **2000**, 1707-1710. "A MALDI sample preparation method suitable for insoluble polymers"



- [Smi95] C. J. Smith, S. Y. Chang, E. S. Yeung, *J. Mass Spectrom.* 30, **1995**, 1765-1767. "Characterization of Neutral Red as a visible-wavelength MALDI matrix"
- [Smi01] I. P. Smirnov, L. R. Hall, P. L. Ross, L. A. Haff, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 11, **2001**, 1427-1432. "Application of DNA-binding polymers for preparation of DNA for analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Spe87] B. Spengler, M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *J. Phys. Chem.* 91, **1987**, 6502-6506. "Excimer laser desorption mass spectrometry of biomolecules at 248 and 193 nm"
- [Spe88] B. Spengler, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Instrumentation* 17, **1988**, 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.* 62, **1990**, 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.* 5, **1991**, 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.* 6, **1992**, 105-108. "Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry"
- [Spe93] B. Spengler, V. Bökelmann, *Nucl. Instrum. Methods B82*, **1993**, 379-385. "Angular and time resolved intensity distributions of laser-desorbed matrix ions"
- [Spe94] B. Spengler, M. Hubert, R. Kaufmann, *Proceedings of the 42<sup>nd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, 1994*, 1041. "MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe"
- [Spe97] B. Spengler, *J. Mass Spectrom.* 32, **1997**, 1019-1036. "Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules"
- [Spe02] B. Spengler, D. Kirsch, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, **2002**, 735-748. "Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: Instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis"
- [Spe03] B. Spengler, M. Hubert, *Int. J. Mass Spectrom.* 226, **2003**, 71-83. "On the formation of initial velocities in matrix-assisted laser desorption ionization: Virtual desorption time as an additional parameter describing ion ejection dynamics"
- [Sta91] B. Stahl, M. Steup, M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 63, **1991**, 1463-1466. "Analysis of neutral oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Ste00] E. Stevenson, K. Breuker, R. Zenobi, *J. Mass Spectrom.* 35, **2000**, 1035-1041. "Internal energies of analyte ions generated from different matrix-assisted laser desorption/ionization matrices"
- [Sto02] M. M. Stone, A. H. Franz, C. B. Lebrilla, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, **2002**, 964-974. "Non-covalent calixarene-amino acid complexes formed by MALDI-MS"
- [Stö01] R. Stöckle, P. Setz, V. Deckert, T. Lippert, A. Wokaun, R. Zenobi, *Anal. Chem.* 73, **2001**, 1399-1402. "Nanoscale atmospheric pressure laser ablation-mass spectrometry"
- [Str91] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 111, **1991**, 89-96. "2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry"

- [Str94] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, *Anal. Chem.* **66**, **1994**, 464-470. "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins electroblotted after polyacrylamide gel electrophoresis"
- [Str97] K. Strupat, J. Kampmeier, V. Horneffer, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **169/170**, **1997**, 43-50. "Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for UV and IR MALDI. Part II: Crystallographic and mass spectrometric analysis"
- [Str02] A. V. Streletskiy, I. V. Kouvitckho, S. E. Episov, O. V. Boltalina, *J. Mass Spectrom.* **16**, **2002**, 99-102. "Application of sulfur as a matrix for laser desorption/ionization in the characterization of halogenated fullerenes"
- [Sun88] J. Sunner, A. Morales, P. Kebarle, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **86**, **1988**, 169-186. "Mechanism of formation of FAB spectra"
- [Sun95] J. Sunner, E. Dratz, Y.-C. Chen, *Anal. Chem.* **67**, **1995**, 4335-4342. "Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions"
- [Tak98] M. Takayama, A. Tsugita, *Int. J. Mass Spectrom.* **181**, **1998**, L1-L6. "Does in-source decay occur independent of the ionization process in matrix-assisted laser desorption ?"
- [Tak00] M. Takayama, A. Tsugita *Electrophoresis* **21**, **2000**, 1670-1677. "Sequence information of peptides and proteins with in-source decay in matrix assisted laser desorption/ionization-time- of flight-mass spectrometry"
- [Tak01] M. Takayama, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, **2001**, 1044-1049. "N-C<sub>α</sub> bond cleavage of the peptide backbone via hydrogen abstraction"
- [Tan88] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2**, **1988**, 151-153. "Protein and polymer analysis up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry"
- [Tan92] K. Tang, S. L. Allman, R. B. Jones, C. H. Chen, *Org. Mass Spectrom.* **27**, **1992**, 1389-1392. "Comparison of Rhodamine dyes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Tan94] K. Tang, N. I. Taranenko, S. L. Allman, C. H. Chen, L. Y. Cháng, K. B. Jacobson, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2**, **1988**, 151-153. "Picolinic acid as a matrix for laser mass spectrometry of nucleic acids and proteins"
- [Tan97] X. Tang, M. Sadeghi, Z. Olumee, A. Vertes, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 484-488. "Matrix-assisted laser desorption/ionization by two collinear subthreshold laser pulses"
- [Tan97a] W. Tang, J. Krause, L. Zhu, L. M. Smith, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **169/170**, **1997**, 301-311. "Factors influencing oligonucleotide stability in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry"
- [Tan97b] W. Tang, C. Nelson, L. Zhu, L. M. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, **1997**, 218-224. "Positive ion formation in the ultraviolet matrix-assisted laser desorption / ionization analysis of oligonucleotides by using 2,5-dihydroxybenzoic acid"
- [Thi98] B. Thiede, M. von Janta-Lipinski, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **12**, **1998**, 1889-1894. "Noncovalent RNA-peptide complexes detected by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Thi99] M. Thierolf, M. Karas, *Proceedings of the 47<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, TX*, **1999**, 2612. "Incorporation and detectability of noncovalent complexes in MALDI MS"
- [Tho11] J. J. Thomson, *Phil. Mag.* **6 (20)**, **1911**, 752-767. "Rays of positive electricity"

- [Tod01] P. J. Todd, T. G. Schaaff, P. Chaurand, R. M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.* **36**, **2001**, 355-369. "Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Tri01] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H.J. Räder, K. Müllen, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **15**, **2001**, 1364-1373. "New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation"
- [Ulm00] L. Ulmer, J. Mattay, H. G. Torres-Garcia, H. Luftmann, *Eur. Mass Spectrom.* **6**, **2000**, 49-52. "The use of 2-[(2E)-3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methylprop-2-enylidene]malonitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Vék95] K. Vékey, *Mass Spectrom. Rev.* **14**, **1995**, 195-225. "Multiply charged ions"
- [Ver90] A. Vertes, R. Gijbels, R. D. Levine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, **1990**, 228-233. "Homogeneous bottleneck model of matrix-assisted laser desorption of large molecules"
- [Ver90a] A. Vertes, R. D. Levine, *Chem. Phys. Lett.* **171**, **1990**, 284-290. "Sublimation versus fragmentation in matrix-assisted laser desorption"
- [Ver91] A. Vertes, in *Methods and mechanisms for producing ions from large molecules*, **1991**, 275-285, Plenum Press, New York (Ed.: K. G. Standing, W. Ens). "Laser desorption of large molecules: mechanisms and models"
- [Ver92] A. Verentchikov, W. Ens, J. Martens, K. G. Standing, *Proceedings of the 40<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC*, **1992**. "Experimental study of ion ejection processes in matrix assisted laser desorption"
- [Ver93] A. Vertes, G. Irinyi, R. Gijbels, *Anal. Chem.* **65**, **1993**, 2389-2393. "Hydrodynamic model of matrix-assisted laser desorption mass spectrometry"
- [Ver99] A. Verentchikov, I. Smirnov, M. L. Vestal, *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, TX*, **1999**. "Collisional cooling and ion formation processes in orthogonal MALDI at intermediate gas pressure"
- [Ver01] P. Verhart, S. Uttenweiler-Joseph, M. de Vries, A. Loboda, W. Ens, K. G. Standing, *Proteomics 1*, **2001**, 118-131. "Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: an elegant tool for peptidomics"
- [Ver02] R. L. Vermillion-Salsbury, D. M. Hercules, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, **2002**, 1575-1581. "9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Ves83] M. L. Vestal, *Mass Spectrom. Rev.* **2**, **1983**, 447-480. "Ionization techniques for nonvolatile molecules"
- [Ves94] M. M. Vestling, C. Fenselau, *Anal. Chem.* **66**, **1994**, 471-477. "Poly(vinylidene difluoride) membranes as the interface between laser desorption mass spectrometry, gel electrophoresis, and in situ proteolysis"
- [Ves95] M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, **1995**, 1044-1050. "Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry"
- [Vog99] T. Vogl, J. Roth, C. Sorg, F. Hillenkamp, K. Strupat, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, **1999**, 1124-1130. "Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 detected by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"

- [Vog03] A. Vogel, V. Venugopalan, *Chem. Rev.* **103**, **2003**, 577-644. "Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues"
- [Vor94] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Anal. Chem.* **66**, **1994**, 3281-3287. "Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation"
- [Wan93] B. H. Wang, K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, **1993**, 393-398. "Gas-phase cationization and protonation of neutrals generated by matrix-assisted laser desorption"
- [Wan96] G. Wang, R. B. Cole, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, **1996**, 1050-1058. "Effects of solvent and counterion on ion pairing and observed charge states of diquaternary ammonium salts in electrospray ionization mass spectrometry"
- [Wan97] B. H. Wang, C. E. Hopkins, A. B. Belenky, A. S. Cohen, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **169/170**, **1997**, 331-350. "Sequencing of modified oligonucleotides using in-source fragmentation and delayed pulsed ion extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight"
- [Wan01] M. Z. Wang, M. C. Fitzgerald, *Anal. Chem.* **73**, **2001**, 625-631. "A solid sample preparation method that reduces signal suppression effects in the MALDI analysis of peptides"
- [Wei99] J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature* **399**, **1999**, 243-246. "Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon"
- [Wen98] H. Wenschuh, P. Halada, S. Lamer, P. Jungblut, E. Krause, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **12**, **1998**, 115-119. "The ease of peptide detection by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: the effect of secondary structure on signal intensity"
- [Wes94] A. Westman, P. Demirev, T. Huth-Fehre, J. Bielawski, B. U. R. Sundqvist, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **130**, **1994**, 107-115. "Sample exposure effects in matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry of large biomolecules"
- [Wes95] A. Westman, T. Huth-Fehre, P. Demirev, B. U. R. Sundqvist, *J. Mass Spectrom.* **30**, **1995**, 206-211. "Sample morphology effects in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins"
- [Wes02] A. Westmacott, W. Ens, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, M. Schürenberg, *Int. J. Mass Spectrom.* **221**, **2002**, 67-81. "The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Whi85] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **57**, **1995**, 675-679. "Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers"
- [Whi91] M. A. White, F. H. Strobel, D. H. Russell, *Proceedings of the 39<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN*, **1991**. "Temporal profiles of ions produced by matrix-assisted laser desorption"
- [Whi92] M. A. White, F. H. Strobel, D. H. Russell, *Proceedings of the 40<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington, DC*, **1992**. "Comparison of arrival time distributions of mass-selected ions produced using matrix-assisted laser desorption ionization"
- [Wil55] W.C. Wiley, I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* **26**, **1955**, 1150-1157, reprinted in *J. Mass Spectrom.* **32**, **1997**, 4-11. "Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution"
- [Wil96] E. R. Williams, *J. Mass Spectrom.* **31**, **1996**, 831-842. "Proton transfer reactivity of large multiply charged ions"

- [Won97] C. K. L. Wong, T.-W. D. Chan, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **11**, **1997**, 513-519. "Cationization processes in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Attachment of divalent and trivalent metal ions"
- [Won98] C. K. L. Wong, M. P. So, T.-W. D. Chan, *Eur. Mass Spectrom.* **4**, **1998**, 223-232. "Origins of proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Won99] A. W. Wong, M. T. Cancilla, L. R. Voss, C. B. Lebrilla, *Anal. Chem.* **71**, **1999**, 205-211. "Anion dopant for oligosaccharides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Won00] A. W. Wong, H. Wang, C. B. Lebrilla, *Anal. Chem.* **72**, **2000**, 1419-1425. "Selection of anionic dopant for quantifying desialylation reactions with MALDI-FTMS"
- [Woo92] T. D. Wood, L. Schweikhard, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* **64**, **1992**, 1461-1469. "Mass-to-charge ratio upper limits for matrix-assisted laser desorption Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry"
- [Woo95] A. S. Woods, J. C. Buchsbaum, T. A. Worrall, J. M. Berg, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **67**, **1995**, 4462-4465. "Matrix-assisted laser desorption/ionization of noncovalently bound compounds"
- [Woo01] A. S. Woods, M. A. Huestis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **12**, **2001**, 88-96. "A study of peptide-peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionization"
- [Wri85] L. G. Wright, R. G. Cooks, K. V. Wood, *Biomed. Mass Spectrom.* **12**, **1985**, 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.* **7**, **1993**, 142-146. "Matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix"
- [Wu94] K. J. Wu, T. A. Shaler, C. H. Becker, *Anal. Chem.* **66**, **1994**, 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* **102**, **1998**, 4770-4778. "Molecular dynamics of matrix-assisted laser desorption of leucine enkephalin guest molecules from nicotinic acid host crystals"
- [Xia93] F. Xiang, R. C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* **28**, **1993**, 1424-1429. "Growing protein-doped sinapic acid crystals for laser desorption: an alternative preparation method for difficult samples"
- [Xia94a] F. Xiang, R. C. Beavis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, **1994**, 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 42<sup>nd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL*, **1994**. "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.* **8**, **1997**, 116-124. "Mercaptobenzothiazoles: A new class of matrices for laser desorption ionization mass spectrometry"
- [Yal98] T. Yalcin, Y. Dai, L. Li, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9**, **1998**, 1303-1310. "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer analysis: solvent effect in sample preparation"
- [Yam84] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **88**, **1984**, 4451-4459. "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme"

- [Yan00] Z. Yan, G. W. Caldwell, W. J. Jones, J. A. Masucci, *Anal. Biochem.* 277, **2000**, 267-270. "A simple method to improve spectral quality in matrix-assisted laser/desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis by using Micro Mate labeling tape as a sample support"
- [Yao98] J. Yao, J. R. Scott, M. K. Young, C. L. Wilkins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9, **1998**, 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"
- [Yon98] H. Yong, D. H. Russell, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 175, **1998**, 187-204. "Photochemistry and proton transfer reaction chemistry of selected cinnamic acid derivatives in hydrogen bonding environments"
- [Zec02] C. Zechmann, T. Muskat, J. Grotemeyer, *Eur. Mass Spectrom.* 8, **2002**, 287-293. "Wavelength and time-resolved luminescence spectroscopy for investigation of the matrix assisted laser desorption process (MALDI)"
- [Zen97] R. Zenobi, *Chimia* 51, **1997**, 801-803. "Laser-assisted mass spectrometry"
- [Zen98] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrom. Rev.* 17, **1998**, 337-366. "Ion formation in MALDI mass spectrometry"
- [Zha99] L. Zhang, R. Orlando, *Anal. Chem.* 71, **1999**, 4753-4757. "Solid-phase extraction/MALDI-MS: Extended ion-pairing surfaces for the on-target cleanup of protein samples"
- [Zha02] J. Zhang, R. Knochenmuss, E. Stevenson, R. Zenobi, *Int. J. Mass Spectrom.* 213, **2002**, 237-250. "The gas-phase sodium basicities of common matrix-assisted laser desorption/ionization matrices"
- [Zha03] J. Zhang, V. Frankevich, R. Knochenmuss, S. D. Friess, R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, **2003**, 42-50. "Reduction of Cu(II) in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Zhi97] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, B. Garrison, *Chem. Phys. Lett.* 276, **1997**, 269-273. "On the threshold behaviour in laser ablation of organic solids"
- [Zhi97a] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, B. Garrison, *J. Phys. Chem. B* 101, **1997**, 2028-2037. "Molecular dynamics model for laser ablation and desorption of organic solids"
- [Zhi98] L. V. Zhigilei, B. Garrison, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, **1998**, 1273-1277. "Velocity distributions of analyte molecules in matrix-assisted laser desorption from computer simulations"
- [Zhi00] L. V. Zhigilei, B. Garrison, *J. Appl. Phys.* 88, **2000**, 1281-1298. "Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes"
- [Zhi03] L. V. Zhigilei, E. Leveugle, B. J. Garrison, M. I. Zeifman, *Chem. Rev.* 103, **2003**, 321-347. "Computer simulations of laser ablation of molecular substrates"
- [Zhi03a] L. V. Zhigilei, Y. G. Yingling, T. E. Itina, T. A. Schoolcraft, B. Garrison, *Int. J. Mass Spectrom.* 226, **2003**, 85-106. "Molecular dynamics simulations of matrix-assisted laser desorption-connections to experiment"
- [Zho92] J. Zhou, W. Ens, K. G. Standing, A. Verentchikov, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, **1992**, 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.* 6, **1995**, 1183-1189. "Charge state distribution shifting of protein ions observed in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"

- [Zho95a] F. Zhong, S. Zhao, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **9**, **1995**, 570-572. "A study of factors influencing the formation of singly charged oligomers and multiply charged monomers by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry"
- [Zhu95] Y. F. Zhu, K. L. Lee, K. Tang, S. L. Allman, N. I. Taranenko, C. H. Chen, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **9**, **1995**, 1315-1320. "Revisit of MALDI for small proteins"
- [Zhu95a] L. Zhu, G. R. Parr, M. C. Fitzgerlad, C. M. Nelson, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, **1995**, 6048-6056. "Oligodeoxynucleotide fragmentation in MALDI/TOF mass spectrometry using 355-nm radiation"
- [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.* **10**, **1996**, 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"
- [Zhu96a] Y. F. Zhu, N. I. Taranenko, S. L. Allman, S. A. Martin, L. Haff, C. H. Chen, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **10**, **1996**, 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"
- [Zub98] R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, **1998**, 3265-3266. "Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process"
- [Zub99] R. A. Zubarev, N. A. Kruger, E. K. Fridriksson, M. A. Lewis, D. M. Horn, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, **1999**, 2857-2862. "Electron capture dissociation of gaseous multiply-charged proteins is favored at disulfide bonds and other sites of high hydrogen atom affinity"
- [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.* **72**, **2000**, 563-573. "Electron capture dissociation for structural characterization of multiply charged protein cation"

## Lebenslauf

Ralf Krüger  
Oppelner Str. 19  
69124 Heidelberg  
geboren 10.10.1969 in Bonn

---

### Schule und Zivildienst:

8 / 1976 – 5 / 1989	Schulbesuch in Bonn und St. Augustin
5 / 1989	Abitur am Rhein-Sieg-Gymnasium, St. Augustin
8 / 1989 – 10 / 1990	Zivildienst: mobiler sozialer Hilfsdienst, Johanniter-Unfallhilfe, Neunkirchen-Seelscheid

---

### Wissenschaftlicher Werdegang:

4 / 1991 – 12 / 1994	Grundstudium Chemie an der Universität Bonn
12 / 1994	Vordiplom, Universität Bonn
1 / 1994 - 10 / 1997	Hauptstudium Chemie an der Universität Marburg mit Wahlpflichtfach "Analytische Chemie"
8 / 1996 – 9 / 1996	Praktikum beim eco-Umweltinstitut, Köln <i>Thema: "HPLC/DAD Methodenentwicklung zum Nachweis verbotener Azofarbstoffe in Textilien"</i>
1 / 1998 – 10 / 1998	Diplomarbeit am Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie (ISAS), Dortmund, bei Dr. Jürgen Nolte (ISAS) und PD Dr. Ute Pyell (Universität Marburg) <i>Thema: "Bestimmung von Phenoxy-carbonsäure-Herbiziden mit GC/MS nach Anreicherung mittels SPE"</i>
10 / 1998	Chemie-Diplom, Universität Marburg
10 / 1998 – 1 / 2003	Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Karas, Universität Frankfurt <i>Thema: "Untersuchungen zum Einbau von Analytionen in MALDI Matrices sowie zur Ionisation und Adduktbildung in der MALDI-Massenspektrometrie"</i>
seit 1 / 2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, bei Prof. Dr. Wolf D. Lehmann (zentrale Spektroskopie) <i>Thema: "Analyse von posttranslationalen Proteinmodifikationen mittels ESI- und Element(ICP)-Massenspektrometrie"</i>

---

### Lehrtätigkeit:

10 / 1998 – 9 / 2001	Praktikum „Chemie für Mediziner und Zahnmediziner“, Universität Frankfurt
10 / 2001 – 12 / 2002	Praktikum "Allgemeine und Analytische Chemie für Pharmazeuten" und Seminar "Stöchiometrie", Universität Frankfurt



## Liste der Publikationen

### Zeitschriftenartikel:

Michael Karas, Ralf Krüger  
*Chem. Rev.* 103, **2003**, 427-439.

"Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism"

Ralf Krüger, Michael Karas  
*J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, **2002**, 1218-1226.

"Formation and Fate of Ion Pairs during MALDI Analysis: Anion Adduct Generation as an Indicative Tool to Determine Ionization Processes"

Christian Hoffmann, Dierk Blechschmidt, Ralf Krüger, Michael Karas, Christian Griesinger  
*J. Comb. Chem.* 4, **2002**, 79-86

"Mass Spectrometric Sequencing of Individual Peptides from Combinatorial Libraries via Specific Generation of Chain-Terminated Sequences"

Ralf Krüger, Anja Pfenninger, Isabelle Fournier, Matthias Glückmann, Michael Karas  
*Anal. Chem.* 73 (24), **2001**, 5812-5821

"Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes"

Matthias Glückmann, Anja Pfenninger, Ralf Krüger, Michael Thierolf, Michael Karas, Verena Horneffer, Franz Hillenkamp, Kerstin Strupat  
*Int. J. Mass Spectrom.* 210/211, **2001**, 121-132

"Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes?"

Jürgen Nolte, Ralf Krüger  
*Fresenius J. Anal. Chem.* 365, **1999**, 610-614

„Direct methylation at the surface of Carbo-pack B Part II: Determination of phenoxyalkanoic acid herbicides"

Konferenzbeiträge:

Ralf Krüger, Michael Karas

*50<sup>th</sup> ASMS Conference, Orlando, FL, 2.-6. 6. 2002*

"Anionization as a tool to investigate MALDI processes"

Ralf Krüger, Michael Karas

*DGMS Jahrestagung, Heidelberg, 3.-6. 3. 2002*

"Anionenlagerungen in der MALDI-MS"

Ralf Krüger, Anja Pfenninger, Isabelle Fournier, Matthias Glückmann, Michael Karas

*49<sup>th</sup> ASMS Conference, Chicago, IL, 27.-31. 5. 2001*

"PH-indicators as molecular probes to evaluate the relevance of different processes in UV-MALDI-Ionization"

Matthias Glückmann, Isabelle Fournier, Ralf Krüger, Anja Pfenninger, Michael Karas, Verena Horneffer, Kerstin Strupat, Franz Hillenkamp

*49<sup>th</sup> ASMS Conference, Chicago, IL, 27.-31. 5. 2001*

"The initial velocity of MALDI ions as a marker for different desorption-ionization mechanisms in MALDI"

Michael Karas, Isabelle Fournier, Matthias Glückmann, Ralf Krüger, Anja Pfenninger

*49<sup>th</sup> ASMS Conference, Chicago, IL, 27.-31. 5. 2001*

"Is the "Lucky-Survivor" Model Still Alive ?"

Ralf Krüger, Anja Pfenninger, Michael Karas

*DGMS Jahrestagung, München, 4.-7. 3. 2001*

"Untersuchungen zum Analyteinbau in MALDI-Matrices mit Hilfe von pH-Indikatoren"

Ralf Krüger, Michael Karas, Peter Juhasz

*48<sup>th</sup> ASMS Conference, Long Beach, CA, 11.-15. 6. 2000*

„Similarities of ECD and ISD as a hint for electron capture in MALDI“

Ralf Krüger, Jürgen Nolte

*GDCh Umwelttagung, Karlsruhe, 27.-30. 9. 1998:*

„Direkte Methylierung von Phenoxy-carbonsäuren auf Carbo-pack B nach Anreicherung aus Wässern“

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen für die offene, herzliche und diskussionsfreudige Atmosphäre in der "Iachem-Gruppe". Prof. Michael Karas danke ich sowohl für die hervorragende Betreuung als auch dafür, daß er diese Diskussionskultur nicht nur ermöglicht, sondern auch immer gefördert hat. Ohne die vielen kontroversen Gespräche -ob im Kaffeeraum, beim Stammtisch oder auf einem der "Wanderseminare"- hätten sich manche Ideen sicher erst gar nicht entwickelt.

Dem "MALDI-Team" möchte ich an dieser Stelle für viele fruchtbare Diskussionen über MALDI (und andere Dinge) danken. Besonders erwähnen möchte ich Jürgen Schäfer, mit dem ich am Anfang meiner Iachem-Zeit das "Exil" im 3. Stock teilen durfte, Anja Pfenninger, die ihre "FTICR-Wartezeit" für gemeinsame MALDI-Experimente nutzte, sowie Matthias Glückmann, der zusammen mit Prof. Karas die "Cluster-Theorie" entwickelt hat, ohne die meine Arbeit nicht denkbar gewesen wäre. Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Michael Thierolf, "Mlle." Isabelle Fournier, Eric Schulz und Thomas Russ sowie dem "ESI-Team", Andrea Schmidt und Ute Bahr. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich ausdrücklich für die angenehme Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre.

Koun und Magda (die mich zusammen mit Anja bei Kristallisationsexperimenten unterstützt hat), danke ich für ihre Hilfe während ihres Laborpraktikums. Sebastian Sonntag und Herrn Zimmermann danke ich für ihre Hilfe bei der NMR-Analyse von Matrixkristallen.

Für die gute und intensive Zusammenarbeit, viele intensive Diskussionen (nicht nur über Edman-Chemie) sowie die freundliche Aufnahme in Berlin möchte ich mich bei Christian Wurzel bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch Vladimir Collado erwähnen, dessen Besuche in Frankfurt mir sehr viel Spaß gemacht haben.

Bei Andrea Schmidt und Jan Keller möchte ich mich für die herzliche und angenehme Atmosphäre in unserem gemeinsamen Büro in Niederursel bedanken ("Guten Tag, Sekretariat Keller").

Andrea und Matthias danke ich für wertvolle Kommentare zu meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Hürol danken, die mich stets liebevoll unterstützt hat und mir vor allem in der "Schreibphase" den Rücken freigehalten hat.