

**Anwendung und Optimierung der  
lösungsmittelfreien Probenvorbereitung in der  
MALDI-(TOF)-Massenspektrometrie zur  
quantitativen Analyse**

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

- Doktor der Naturwissenschaften -

(Dr. rer. nat.)



vorgelegt von

**Lukas Markus Hyzak**

(M.Sc.)

aus Ruda Slaska, Polen

Wuppertal, Juli 2013

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20140115-125233-5

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20140115-125233-5>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit  
von November 2010 bis Juli 2013  
im Arbeitskreis Analytische Chemie  
der Bergischen Universität Wuppertal  
unter der Leitung von  
**HERRN PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ.**

**DIE IN DIESER ARBEIT BESCHRIEBENE FORSCHUNG  
WURDE FINANZIERT VON DER  
BASF PERSONAL CARE AND NUTRITION GMBH  
UND DER  
SHIMADZU EUROPA GMBH.**



Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig im Arbeitskreis der Analytischen Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. O. J. Schmitz durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, 29. Juli 2013

---

(Lukas Markus Hyzak)



## Danksagung

Mein größter Dank geht an Herrn PROF. DR. OLIVER J. SCHMITZ für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Analytischen Chemie, die interessante Aufgabenstellung dieser Arbeit sowie seine Ratschläge bei jeglichem Diskussionsbedarf.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PROF. DR. HANS-WILLI KLING für die gute Zusammenarbeit in dieser Zeit, für die Übernahme des Korreferats sowie für die zahlreichen Ratschläge.

Bei Frau DR. MICHAELA WIRTZ, Herrn DR. DAVID MELCHIOR und Herrn DR. VOLKER WULF von der BASF Personal Care and Nutrition GmbH bedanke ich mich für die interessanten Diskussionen sowie die Koordination des gesamten Projektes.

Herrn DR. MARCUS MREYEN sowie Herrn DR. MARTIN RESCH danke ich für die Hilfestellung jeglicher Art hinsichtlich der MALDI-Massenspektrometrie seitens des Kooperationspartners Shimadzu Europa GmbH.

Bei Frau SUSANNE GIESE und Frau ANNIKA HIRTZ bedanke ich mich sehr für die Unterstützung während der Durchführung ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten. Durch ihr Engagement war es möglich, detaillierte Fragestellungen für diese Arbeit intensiver zu betrachten.

Für die Anfertigung und Modifikation einiger Geräteteile danke ich Herrn AXEL BRAKELMANN und seinen Mitarbeitern aus der Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal.

Ich bedanke mich auch bei Herrn DR. WALTER TURNER für seine Hilfe und seine geduldige Korrektur des Englischen bei sämtlichen Veröffentlichungen.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises der Analytischen Chemie sowie der Gruppe Management chemischer Prozesse in der

Industrie für das außerordentlich gute Arbeitsklima, viele Gespräche und Anregungen bedanken.

Meiner Freundin VICTORIA ELSNER danke ich sehr für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft auf fachlicher sowie auf persönlicher Ebene und ihre Unterstützung in jeglicher Art.

Schlussendlich danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, deren Unterstützung in vielen Bereichen für mich von unschätzbarem Wert ist.

## Abkürzungsverzeichnis

3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
A	Peakfläche
ACN	Acetonitril
ACTH	Adrenocorticotropin
AP-MALDI	Atmosphärendruck-MALDI
AP	Aminopyrazin
AG	Alkylpolyglucosid
AQ	3-Aminochinolin
Brad	Bradykinin
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CS	<i>Compressed-Sample</i>
Cyto	Cytochrom C
Da	Dalton
DABP	3,4-Diaminobenzophenon
DD	<i>Dried-Droplet</i>
DHAP	2',6'-Dihydroxyacetophenon
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHC	6,7-Dihydroxycumarin
DP	<i>Degree of Polymerization</i> (Polymerisationsgrad)
engl.	englisch
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAEO	Fettalkoholethoxylate
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyklotronresonanz
Glc	Glucose
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure
HT-GC	Hochtemperatur-Gaschromatographie
I	Peakintensität
Ins	Insulin
IR	Infrarot
IS	interner Standard
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt

LDI	Laser-Desorption/Ionisation
M/A	Matrix-zu-Analyt-Verhältnis
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization</i> (Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MCP	<i>Microchannel Plates</i> (Vielkanalplatten)
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
PC	<i>Principal Component</i> (Hauptkomponente)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PEG	Polyethylenglycol
QIT	Quadrupol-Ionenfalle
rel. s	relative Standardabweichung
RP-LC	Umkehrphasenflüssigchromatographie
RR <sub>f</sub>	relativer Responsefaktor
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SA	Sinapinsäure
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Festphasenextraktion)
TFA	Trifluoressigsäure
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenon
TOF	<i>Time-Of-Flight</i> (Flugzeitanalysator)
UV	Ultraviolett

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>2</b>
2.1 Funktionsweise der MALDI-Massenspektrometrie .....	2
2.2 Aufbau eines MALDI-(TOF)-Massenspektrometers .....	2
2.2.1 MALDI-Ionenquelle .....	2
2.2.2 TOF-Massenanalysator .....	4
2.2.3 Detektoreinheit .....	6
2.3 Einflussnehmende Parameter in der MALDI-MS.....	7
2.4 Probenvorbereitung.....	10
2.5 Stand der Technik in der MALDI-(TOF)-MS.....	11
2.5.1 Parameteroptimierung .....	11
2.5.2 Probenhomogenisierung .....	12
2.5.3 Probenauftragung auf das Target .....	14
2.5.4 Weiterentwicklung der lösungsmittelfreien Probenauftragung .....	15
2.6 Quantifizierung in der MALDI-Massenspektrometrie .....	17
2.7 Übersicht über die eingesetzten Proben.....	18
<b>3. Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>23</b>
4.1 Einfluss des elektrischen Feldes auf die Ionenbeschleunigung.....	23
4.1.1 Entstehende Problematik verursacht durch das Target-Design.....	23
4.1.2 Einsatz unterschiedlicher Laserraster .....	25
4.1.3 Optimierung durch Verwendung von Metallpulvern als Füllmaterial ..	26
4.1.4 Metallpulver in der Probe .....	28
4.1.4.1 Einfluss des eingesetzten Metalls .....	28
4.1.4.2 Optimierung der eingesetzten Metallpulvermenge .....	30
4.2 Untersuchung des verwendeten Probenträgers.....	32
4.2.1 Problematik des durchbohrten Shimadzu-Targets .....	32
4.2.2 Anfertigung eines neuen Probenträgers .....	35
4.3 Vermahlung mit Kugelmøhlen unterschiedlicher Hersteller .....	38
4.3.1 Bisherige Technik .....	38

4.3.2	C3 Prozess- und Analysetechnik Freezer Mill 6770.....	40
4.3.3	Omni Bead Ruptor Homogenizer .....	42
4.3.4	Mahlwerk.....	45
4.3.5	Retsch MM.....	48
4.3.6	Vergleich der Ergebnisse der Mühlen mit Mörser und Pistill .....	49
4.4.	Optimierung der Vermahlung mit Schwingmühle Retsch MM .....	50
4.4.1	Herstellung geeigneter Gefäße .....	50
4.4.2	Einsatz unterschiedlicher Mahlkugeln.....	50
4.4.3	Optimierung der Vermahlungsdauer .....	54
4.4.4	Anwendung unter optimierten Bedingungen .....	58
4.5	Analytik von Peptidstandards.....	62
4.5.1	Quantifizierung niedermolekularer Peptide.....	62
4.5.2	Anwendung auf höhermolekulare Peptide.....	65
4.5.2.1	Qualitativer Vergleich von CS und DD .....	65
4.5.2.2	Einfluss des Lösungsmittels bei der CS-Methode.....	71
4.5.2.3	Reproduzierbarkeit der Analysen .....	77
4.5.2.4	Optimierung der Analysen durch Entsalzen.....	86
4.6	Analytik von Realproben.....	89
4.6.1	Systematische Untersuchungen zur Analyse von Kohlenhydraten .....	89
4.6.2	Analytik von Peptiden.....	97
4.6.2.1	Einfluss der Entsalzung auf die Proben.....	97
4.6.2.2	Analyse von Peptidproben mit Kohlenhydratanteil.....	102
4.6.3	Analytik von Alkylpolyglucosiden mit der CS-Technik.....	105
4.6.3.1	Reproduzierbarkeit der Massenspektren .....	105
4.6.3.2	Optimierung der Matrix.....	108
4.7	Responsefaktoren in der MALDI-Massenspektrometrie.....	111
4.7.1	Abhängigkeit von der Komplexität der Probe.....	111
4.7.2	Abhängigkeit von der Analytkonzentration.....	115
4.7.3	Vergleich zwischen CS- und DD-Probenaufgabe.....	124
<b>5.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>126</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>127</b>
<b>7.</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>130</b>
7.1	Kalibrierung des MALDI-(TOF)-Massenspektrometers.....	130

7.1.1	DD-Probenvorbereitung.....	130
7.1.2	Lösungsmittelfreie Probenvorbereitung.....	130
7.2	Probenvorbereitung.....	131
7.2.1	Lösungsmittelbasierte Analytzugabe.....	131
7.2.2	Lösungsmittelfrei im Mörser mit Pistill.....	131
7.2.3	Lösungsmittelfrei mit der Schwingmühle Retsch MM.....	131
7.2.4	Probenauftragung.....	132
7.2.5	Entsalzung mittels ZipTip®-Pipettenspitzen.....	133
7.2.6	Entsalzung mittels SPE-Kartuschen.....	133
7.3	Aufnahme der Massenspektren.....	134
7.4	Geräte und Materialien.....	135
7.4.1	Massenspektrometer.....	135
7.4.2	Geräte und Materialien zur Probenvorbereitung.....	136
7.5	Chemikalien.....	138
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>141</b>
8.1	Weitere Abbildungen.....	141
8.2	Weitere Tabellen.....	145
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	146
8.4	Tabellenverzeichnis.....	151
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis und Anmerkungen.....</b>	<b>154</b>



## Abstract

Matrix-assisted laser-desorption ionization (MALDI) is a very powerful and widely used mass spectrometric technique for ionizing high-molecular-weight compounds. The most commonly used, dried-droplet (DD) technique can lead to a concentration distribution of the analyte on the sample carrier and is therefore often not suitable for reproducible analyses. A newly developed solvent-free deposition, called the compressed-sample technique (CS), prevents the uneven distribution of the analytes caused by the crystallization of the compounds and allows the quantitative analysis of various compound classes with high correlation coefficients.

In the present work, the CS technique for MALDI mass spectrometry was optimized for mass resolution and reproducibility. The drilled sample carrier showed a significant loss in mass resolution due to the inhomogeneous electrical field. In contrast, the addition of metal powder greatly improved the mass resolution in analyzing at greater laser raster widths and gave an increase in intensity.

Furthermore, the drilled targets with a groove present were replaced by a new target design with a completely flat surface. Simultaneously, the drill diameter was reduced from two millimeters to one. This reduced the amount of sample and generated stabler sample surfaces. MALDI-Imaging analyses showed that the metal-powder additive and the smooth surface of the new target design resulted in a highly homogeneous sample surface. Thus, the shot-to-shot reproducibility could be further increased over the entire sample surface.

In addition, the extremely user-dependent and time-consuming sample preparation by grinding in a mortar was replaced by a new grinding method. Several ball mills of various manufacturers were implemented to optimize the grinding process for reproducibility and the ability to handle 20-mg samples. Only one ball mill was suitable to achieve reproducible analyses and to allow the use of small grinding vessels. Therefore, stainless steel vessels were made with an inner volume of 400  $\mu\text{L}$ .

The grinding time and the material and size of the balls were optimized. Under optimized conditions, six samples can be ground simultaneously within 15 minutes; this delivers reproducible results from sample to sample as well as from day to day.

After optimization as described, the CS method was used for the quantification of low-molecular-weight peptides as well as derivatized carbohydrates; it provided correlation coefficients of at least 0.99. Comparison of the dried-droplet and the compressed-sample techniques for the analysis of a peptide mixture showed that two of seven peptides could not be detected by the DD technique. Only an increase of the concentration showed signals, still weak, for these two peptides. The results also demonstrated that with the DD technique the reproducibility from well to well is not guaranteed, the relative standard deviations being as much as 60%. In contrast, relative standard deviations of as little as 11% can be achieved with the CS technique.

The large uncertainty of the results obtained with the DD technique because of the different degrees of crystallization of the analytes during the sample application confirmed that no quantitative and only in a limited manner qualitative statements can be made with this technique. Even the analysis of chemically closely related molecules such as fatty alcohol ethoxylates proved the weaknesses of the solvent-based sample preparation technique, while the solvent-free technique provided reproducible and reliable results. The CS method, however, achieved a relative standard deviation of less than 9% and proved the applicability of this method.

Furthermore, carbohydrate-containing real samples were analyzed, and the parameters cationization agent and matrix, which must always be determined empirically for a MALDI analysis, were optimized by means of the principal-component analysis. With both the CS and the DD techniques, mass spectra of high quality could be achieved with the principal-component analysis. In addition, peptide-containing real samples obtained by extraction from plants were also analyzed successfully when the sample was desalinated in a pretreatment.

Finally, relative response factors were determined for the analysis of carbohydrates and their derivatized homologues, as well as for fatty alcohol ethoxylates by the CS technique. The ionization in a MALDI analysis takes place for all substances simultaneously. Thus, competing reactions among the analytes and the matrix used can quickly lead to ion suppression. However, the addition of further ionizable components in competition with the analyte does not affect the determination of the relative response factors, so that constant relative response factors can be obtained in this way.



## 1. Einleitung

Die Anfänge der Massenspektrometrie gehen zurück auf Arbeiten von WIEN, THOMSON, ASTON und GOLDSTEIN zu Beginn des 19. Jahrhunderts. Erst in den 1930er Jahren konstruierten MATTAUCH und HERZOG eines der ersten doppelt fokussierenden Massenspektrometer. In den 1940er Jahren wurde die petrochemische Industrie aufmerksam und setzte die Massenspektrometrie sehr erfolgreich in der quantitativen Analyse von Kohlenwasserstoffgemischen ein. Jedoch konnten die aufgrund von Molekülzerfall komplex aufgebauten Massenspektren nur schwer mit den eigentlichen Strukturen in Verbindung gebracht werden, weswegen der Einsatz auf thermisch stabile und verdampfbare niedermolekulare Substanzen beschränkt war. [1]

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Massenspektrometrie schritten immer weiter voran, doch die massenspektrometrische Analyse hochmolekularer Verbindungen wurde erst in den späten 1980er Jahren mit der Entwicklung der weichen Ionisationsarten, wie der Elektrospray-Ionisation (ESI) durch DOLE et al. und FENN et al. [2-4] oder der matrixunterstützten Laser-Desorption/Ionisation (engl. *Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization*, MALDI) durch KARAS/HILLENKAMP und TANAKA et al. [5-7], ermöglicht. So konnten mit dieser Technik Molekulargewichte synthetischer Polymere von über 1.000.000 Dalton nachgewiesen werden [8]. Auch konnten Endgruppen [9], die Reinheit synthetischer Polymere [9, 10] und die Aminosäuresequenz von Peptiden [11] mit dieser Technik erfolgreich bestimmt werden. Dennoch befindet sich das Verständnis der Mechanismen bei der MALDI-MS noch immer in den Anfängen [12]. So ist für eine erfolgreiche MALDI-Analyse zunächst eine empirische Vorgehensweise zur Ermittlung der optimalen Parameter notwendig [13], da die Ergebnisse eine sehr große Abhängigkeit von den verwendeten Analysebedingungen zeigen. Jedoch ist es trotz optimaler Bedingungen äußerst schwierig, reproduzierbare Analysen zu erhalten [14] und damit quantitative Aussagen zu treffen [15].

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Funktionsweise der MALDI-Massenspektrometrie

In einer MALDI-Ionenquelle generierte Ionen können mit unterschiedlichen Typen an Massenanalysatoren untersucht werden. Die Möglichkeit reicht von einem kostengünstigen Quadrupol-Ionenfallen-Analysator (QIT-MS) [16-19] mit Massenspektren geringer Qualität bis hin zu der Kopplung mit einem kostenintensiven Fourier-Transform-Ionencyklotronresonanz-Analysator (FT-ICR-MS) [20-23], welches qualitativ extrem hochwertige Massenspektren liefert.

Der Flugzeitanalysator (engl. *Time-Of-Flight*, TOF) [24-27] stellt das mit Abstand am häufigsten eingesetzte Massenspektrometer bei der MALDI-MS dar [28]. Das MALDI-(TOF)-MS besteht aus drei Hauptkomponenten: einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einer Detektoreinheit.

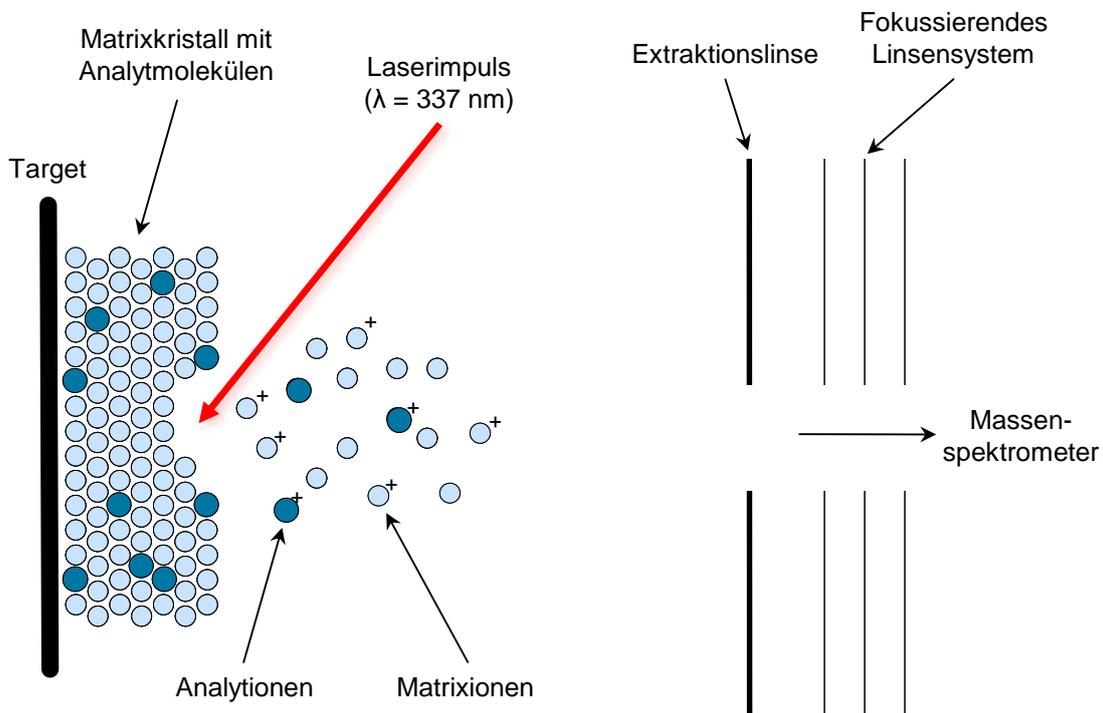
Zunächst werden beim MALDI-Prozess die auf dem Probenträger applizierten Substanzen mit einem fokussierten Laserstrahl illuminiert und es kommt zu einer Mobilisierung sowie Ionisierung dieser Substanzen. Anschließend werden die Ionen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes beschleunigt, nach ihrer Flugzeit in einer feldfreien Driftstrecke aufgetrennt und im letzten Schritt von einer Detektoreinheit registriert.

### 2.2 Aufbau eines MALDI-(TOF)-Massenspektrometers

#### 2.2.1 MALDI-Ionenquelle

Der grundlegende Aufbau einer MALDI-Ionenquelle besteht aus einem als (MALDI-)Target bezeichneten Probenträger, welcher ebenfalls als geladene Metallelektrode dient, und einer geerdeten Beschleunigungselektrode. Die mit einer Matrix vermengte Probe wird auf das Target appliziert und in die Probenkammer

eingbracht. Eine klassische MALDI-Ionenquelle wird im Hochvakuum bei einem Druck kleiner  $10^{-6}$  mbar betrieben, wobei aber ebenfalls Atmosphärendruck-MALDI-Ionenquellen (AP-MALDI) zur Verfügung stehen [29-31]. Die Matrix, welche meist in einem 100 bis 100.000-fachen Überschuss vorliegt, wird gemeinsam mit dem Analyten in einem diskontinuierlichen Prozess durch gepulstes Laserlicht bestrahlt [13]. Der Laserpuls wird typischerweise auf eine im Durchmesser 0,05 bis 0,2 mm kleine Fläche fokussiert [32]. Für jede Analyse wird die Intensität des Laserlichts mittels eines rotierbaren Absorptionsfilters angepasst [33]. Der Laser kann sowohl im ultravioletten (UV) als auch im infraroten (IR) Wellenlängenbereich betrieben werden. Allerdings stellt der UV-Laser, insbesondere der Stickstofflaser bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 337$  nm, die wichtigste Lichtquelle für die analytische MALDI-Massenspektrometrie dar [28, 33]. Abbildung 1 zeigt schematisch den in der MALDI ablaufenden Ionisationsprozess.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung einer MALDI-Ionenquelle nach WULF [34]

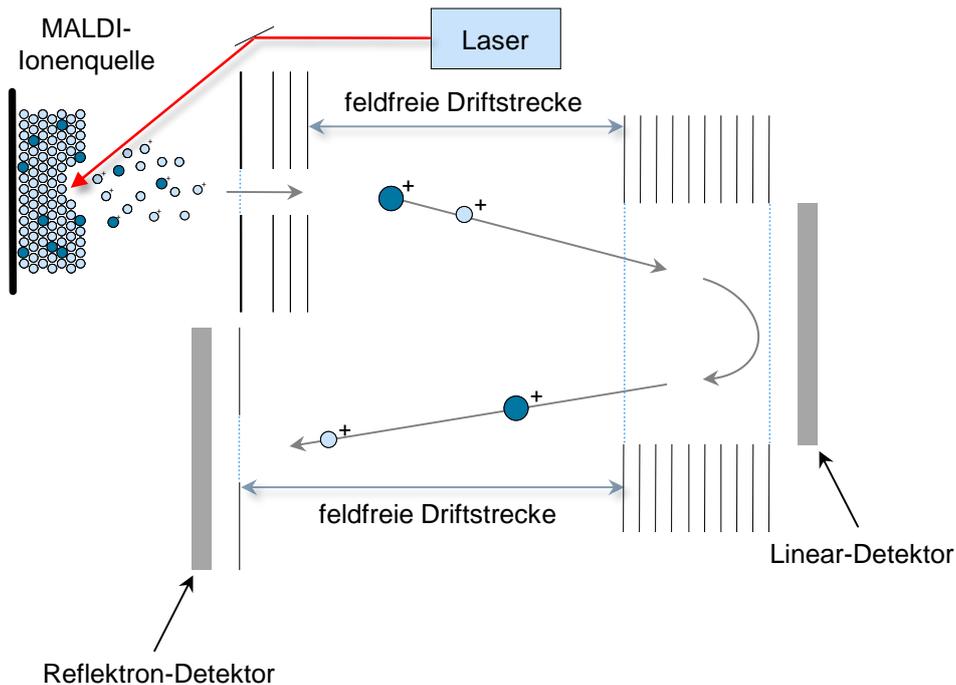
Der Ionisationsmechanismus in der MALDI-MS ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung [35-38]. Es wird angenommen, dass die Matrix durch das eingestrahlte Laserlicht energetisch angeregt wird und die Energie von der Matrix

auf den in ihr eingebetteten Analyten übertragen wird. Daraufhin geht der Analyt ionisiert in die Gasphase über. Unmittelbar nach der Ionenbildung wird die Beschleunigungsspannung zwischen Target und Extraktionslinse angelegt und die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt. Nach dem Passieren eines geerdeten Gitters gelangen die Ionen zur feldfreien Driftstrecke. [13, 33]

### 2.2.2 TOF-Massenanalysator

Der Flugzeitanalysator wurde in den 1950er Jahren kommerzialisiert und fand zunächst gekoppelt mit der Gaschromatographie Anwendung [39]. Die Entwicklung der Quadrupol-Analysatoren verdrängte den Flugzeitanalysator allerdings aus diesem Bereich. Erst die Entwicklung der gepulsten Ionisationsmethoden in den späten 1980er Jahren, unter anderem der matrixunterstützten Desorptions/Ionisations-Ionenquellen, und insbesondere die Entwicklung der orthogonalen Beschleunigung in den TOF-Massenspektrometern verhalfen dem TOF-Analysator zu einem erneuten Aufschwung [40]. In der MALDI-Massenspektrometrie wird der Flugzeitanalysator am häufigsten eingesetzt [41], da hier der Massenbereich theoretisch unbegrenzt ist [42, 43] und sich dieser durch kurze Analysenzeiten, eine hohe Empfindlichkeit und die simultane Analyse des gesamten Massenbereiches auszeichnet [33, 44].

MALDI-Ionenquellen und TOF-Analysatoren weisen beide eine diskontinuierliche Funktionsweise auf, weswegen durch die Kommerzialisierung der MALDI-Ionenquellen eine große Nachfrage nach gepulsten Massenanalysatoren gestellt wurde. Seitdem haben die Flugzeitanalysatoren eine enorme Entwicklung unter anderem hinsichtlich der Massenauflösung erfahren [33, 44]. Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau eines TOF-Massenspektrometers für den Linear- sowie den Reflektron-Modus.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines Linear-/Reflektron-MALDI-TOF-MS nach WULF [34]

Die diskontinuierliche Funktionsweise eines Massenanalysators fordert für jede Messung ein Startsignal, welches in der MALDI-MS durch den Laserpuls generiert wird. Daraufhin werden die Ionen nach ihrer Flugzeit getrennt, die sie benötigen, um die feldfreie Driftstrecke zu passieren und auf die Detektoreinheit zu treffen. Die Flugzeit der Ionen ist bei einer festgelegten Beschleunigungsspannung proportional zur Quadratwurzel des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ). Dieser Zusammenhang wird mit Gleichung 1, welche zur Bestimmung des  $m/z$ -Verhältnisses herangezogen wird, beschrieben. [28]

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U \cdot t^2}{s^2} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Mit:  $m$  = Masse des Ions  
 $z$  = Anzahl der Ladungen  
 $e$  = Elementarladung  
 $U$  = Beschleunigungsspannung  
 $t$  = Flugzeit  
 $s$  = Driftstrecke

Die meisten TOF-Analysatoren erlauben den Betrieb sowohl im Linear- als auch im Reflektron-Modus. Das Reflektron verhält sich wie ein Ionenspiegel, durch welchen

Ionen unterschiedlicher kinetischer Energie, jedoch mit gleichem Molekulargewicht, fokussiert werden. In dem Reflektron, welches meist kurz vor dem Linear-Detektor angebracht wird, werden die Ionen durch ein mehrstufiges, elektrisches Feld umgelenkt und gelangen anschließend zum Reflektron-Detektor. [28, 45-47] Bei abgeschaltetem Reflektron werden die Ionen nicht umgelenkt und gelangen somit auf einer geraden Flugbahn von der Ionenquelle zum Linear-Detektor. Während der Reflektron-Modus zur Erhöhung der Massenauflösung niedermolekularer Verbindungen beiträgt, dient der Linear-Modus vor allem zur Analyse hochmolekularer Verbindungen, jedoch geht dies mit einer geringeren Massenauflösung einher.

### 2.2.3 Detektoreinheit

Nachdem die Ionen in einer feldfreien Driftstrecke nach ihrer Flugzeit aufgetrennt wurden, werden diese im letzten Schritt von einer Detektoreinheit erfasst. Als Detektoren werden meist *Microchannel Plates* (MCP) eingesetzt und seltener finden auch diskrete Dynoden-Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) Anwendung. Beide Detektoren basieren auf dem gleichen Prinzip, bei welchem durch auftreffende Ionen Sekundärelektronen emittiert werden und diese im Anschluss über eine Reaktionskaskade um einige Größenordnungen bis zu einem messbaren Strom verstärkt werden. Ein MCP besteht aus einer großen Anzahl an Mikrokanälen, die von innen mit einem Halbleitermaterial beschichtet sind. [28, 48] Die Verstärkung solch einer Platte beträgt  $10^3$  bis  $10^4$  und ist damit deutlich geringer, als die eines Sekundärelektronenvervielfachers mit  $10^6$  bis  $10^8$  [33]. Anstelle eines einzelnen MCP können zwei oder drei solcher Platten in einer Sandwich-Formation kombiniert werden, um Verstärkungen von bis zu  $10^8$  zu erreichen [33].

## 2.3 Einflussnehmende Parameter in der MALDI-MS

Die ablaufenden Desorptions- sowie Ionisations-Prozesse in der MALDI-Massenspektrometrie sind noch nicht vollständig verstanden und daher ist es erforderlich für jeden Analyten die relevanten Parameter empirisch zu ermitteln und zu optimieren [13]. Zu den Parametern zählen die Präparationstechnik, die eingesetzte Matrix und unter Umständen das Kationisierungssalz sowie die Geräteparameter selbst. Nur nach Optimierung dieser Parameter können qualitativ hochwertige Massenspektren erhalten werden. Im Folgenden werden die unterschiedlichen Parameter ausführlicher betrachtet.

Zur Absorption des Laserlichts wird in der MALDI-Massenspektrometrie eine geeignete Matrix benötigt [41, 49], welche möglichst viel Energie in der vom Laser ausgestrahlten Wellenlänge absorbiert. Daher werden in der UV-MALDI Matrices eingesetzt, die ein aromatisches System aufweisen [41]. Eine weitere Eigenschaft der Matrices ist das Vorhandensein acider Wasserstoffatome beispielsweise in Form einer Carbonsäure- oder einer Hydroxy-Funktion. Diese begünstigen unter anderem den Prozess der Protonenübertragung bei der Ionisation von Biomolekülen [8, 33] und zeigen zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Kristallisation der Matrix [8, 50].

Die Literatur liefert eine sehr umfangreiche Übersicht über die empirisch ermittelten Matrices bzw. Matrixkombinationen für die unterschiedlichsten Substanzklassen. Insbesondere der Review-Artikel von NIELEN [51] und die Fachbücher von GROSS [33], PASCH/SCHREPP [41] und HILLENKAMP/PETER-KATALINIC [52] stellen umfangreiche Werke über die Probenvorbereitungsbedingungen dar. Klassische Vertreter der UV-MALDI-Matrices sind 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [53-55],  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure (HCCA) [56-59], 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) [60, 61] sowie 1,8,9-Anthracenatriol (Dithranol) [62-65].

Zur Analyse niedermolekularer Verbindungen bis etwa 2.000 Dalton kann ebenfalls die matrixfreie Probenvorbereitung, also der Laser Desorption/Ionisations-Prozess (LDI), verwendet werden [34, 66-68]. Dabei wird vollständig auf eine Matrix verzichtet und die Probe lediglich durch das eingestrahlte Laserlicht ionisiert. Des Weiteren konnten mit dem Einsatz von Matrix-Alternativen, wie beispielsweise Aluminiumoxidpulver und Oxalsäure, durch VON RATH und WULF hohe Ionenausbeuten und qualitativ hochwertige Massenspektren mit hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnissen (S/N) erzielt werden [34, 67]. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Energieübertragung im unteren Molekulargewichtsbereich beim LDI-Prozess sowohl von aromatischen funktionellen Gruppen als auch von aciden Wasserstoffatomen unabhängig ist [34, 67]. Weitere LDI-Analysen niedermolekularer Verbindungen, appliziert auf der Oberfläche von porösem Silicium [69, 70] oder Nanopulvern und Nanopartikeln [71-75], haben gezeigt, dass qualitativ hochwertige Massenspektren auch ohne den Einsatz einer Matrix erzielt werden können. Entscheidend ist hierbei lediglich die Oberflächenstruktur, an welcher das Laserlicht gestreut wird und an der der anschließende Desorption-/Ionisations-Prozess abläuft [34].

Ein weiterer Parameter in der MALDI-Massenspektrometrie ist der Einsatz eines Kationisierungssalzes, welches bevorzugt bei synthetischen Polymeren Anwendung findet. Meist werden einwertige Kationen wie Natrium-, Kalium- oder Silberionen an das Analytmolekül angelagert [76-84]. Die Anwesenheit von mehreren einwertigen Kationen kann zu zwei oder mehr Molekulargewichtsverteilungen in der MALDI-MS führen und so die Interpretation der Massenspektren erschweren. Beispielsweise weisen alkoxylierte Polymere bereits durch den Herstellungsprozess Alkalimetallionen in erheblichen Konzentrationen auf [85]. Die Zugabe eines Kations im Überschuss, welches zum Polymer eine große Affinität aufweist, kann weitere Addukte durch die in der Probe enthaltenen Kationen unterdrücken und so die Ausbildung lediglich einer Verteilung fördern [8, 34]. Der Ionisationsmechanismus der Adduktbildung wird in der Literatur über zwei grundlegend unterschiedliche

Ansätze weiterhin diskutiert. Während ein Ansatz postuliert, dass die Ionen bereits in der Matrix/Analyt-Mischung gebildet werden [86], beschreibt der zweite Mechanismus die Theorie der Gasphasenkationisierung [84, 87-90], bei dem Addukte durch Stöße der Analytmoleküle mit den Metallionen gebildet werden.

Im Gegensatz dazu kann die Anwesenheit von Alkalimetallionen jedoch bei anderen Substanzklassen zu Problemen führen. Oligonukleotide besitzen mehrere acide Wasserstoffatome, welche durch Alkalimetallionen ausgetauscht werden können, und wodurch ein einzelner Analyt eine Vielzahl ionischer Spezies bilden kann. Aus diesem Grund kann der Wasserstoff-Metall-Austausch in der vollständigen Unterdrückung eines Signals resultieren [91]. Peptide und Proteine unterliegen einem vergleichbaren Problem [92]. Anstatt des Wasserstoff-Metall-Austausches bilden die Moleküle Addukte mit den Metallionen. Somit werden pro Analyt mehrere Signale erhalten [92], wodurch die Sensitivität des Systems stark reduziert wird [93]. Eine Entsalzung der Proben vor der Analyse ist somit unumgänglich.

Zur Entfernung der Kationen haben sich zahlreiche Methoden etabliert. Zum einen können Kationen durch Waschen der Probenoberfläche mit entsalztem Wasser, welches mit 0,1 - 1% Ameisensäure oder Trifluoressigsäure versetzt wird, entfernt werden [94]. Alternativ können die Kationen während der Probenvorbereitung durch Zugabe eines Kationenaustauscherharzes zur Probe entfernt werden [95]. Ein weiterer Ansatz zur Entsalzung ist die Verwendung von Mikroliterpipettenspitzen [91, 93, 96], welche beispielsweise mit einem C<sub>18</sub>-Umkehrphasenmaterial gefüllt werden [97]. Dazu werden die Biomoleküle an das Phasenmaterial adsorbiert, mit Wasser gewaschen und im Anschluss vom Phasenmaterial eluiert, sodass keine Störionen mehr in der Probe vorhanden sind.

## 2.4 Probenvorbereitung

Der mit Abstand bedeutsamste Parameter der Probenvorbereitung einer MALDI-Analyse ist die Präparationstechnik, mit welcher die Matrix sowie der Analyt auf den Probenträger appliziert werden. Mittlerweile stehen zahlreiche lösungsmittelbasierte Probenaufgabetechniken, wie die *Dried-Droplet-* (DD) [13, 41, 98], die *Spin-Coated-* [99], die *Thin-Layer-* [100, 101] oder die Elektrospray-Methode [102], zur Wahl. Die am häufigsten eingesetzte Präparationstechnik ist die *Dried-Droplet-*Technik [13], bei welcher die Matrix, der Analyt und gegebenenfalls das Kationisierungssalz in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und gemeinsam in Form eines Tropfens von 0,5 - 1  $\mu\text{L}$  der Mischung auf das Target appliziert werden. Bei der *Thin-Layer-*Technik hingegen wird zunächst die Matrix auf das Target aufgebracht und anschließend wird die Probenlösung auf die Matrixkristalle appliziert und getrocknet. Vorteilhaft hierbei ist, dass zum einen die verwendeten Substanzen nicht in einem gemeinsamen Lösungsmittel löslich sein müssen und zum anderen auf diese Weise verbesserte Ergebnisse aufgrund einer homogeneren Kristallisation erhalten werden [101, 103].

Generell stellen die lösungsmittelbasierten Probenaufgabetechniken sehr schnelle und einfache Methoden dar, um eine erfolgreiche massenspektrometrische Analyse der unterschiedlichsten Moleküle zu erhalten. Allerdings bergen diese Probenaufgabetechniken erhebliche Risiken durch den Verdampfungsprozess des Lösungsmittels auf dem Target, wodurch die Kristalle ungleichmäßig und punktuell, als sogenannte *sweet-spots* [104] oder *hot spots* [105] bezeichnet, verteilt sind, sodass bei der Analyse gezielt nach den *sweet-spots* gesucht werden muss. Zusätzlich kann es beim Verdampfen des Lösungsmittels zu einem Konzentrationsgefälle des Analyten auf der Targetoberfläche kommen und zum Teil eine Auftrennung des Analyten, der Matrix sowie des Kationisierungssalzes auftreten, weshalb eine inhomogene Verteilung des Analyten erhalten wird. WEIDNER et al. konnten durch Betrachtung der vom Laser illuminierten Fläche des gesamten Wells (MALDI-Imaging) zeigen, dass sogar eine örtliche Auftrennung der Oligomere eines Polymers

innerhalb des Wells deutlich erkennbar ist [14, 15, 106, 107]. Dies ist insofern verwunderlich, da die Oligomere eines Polymers lediglich geringe Unterschiede im Polymerisationsgrad aufweisen und chemisch ansonsten identisch aufgebaut sind.

Zusätzlich sind zwei weitere Schlüsselfaktoren für eine Separation bei der Probenvorbereitung von Bedeutung. COHEN und CHAIT zeigten bei der Analyse von Peptiden und Proteinen eine Abhängigkeit von der Proben- und Matrix-Lösungszusammensetzung sowie vom pH-Wert [108]. Die Analyse eines Proteinverdaus ergab grundlegend unterschiedliche Massenspektren, wenn lediglich das Lösungsmittelsystem von Ameisensäure/Wasser/Isopropanol zu 0,1% Trifluoressigsäure/Acetonitril oder Wasser/Acetonitril verändert wurde. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Probenvorbereitung in der MALDI-MS einen bedeutenden Schritt für das Erzielen reproduzierbarer sowie aussagekräftiger Massenspektren darstellt. Deshalb werden in den meisten Fällen unter lösungsmittelbasierten Bedingungen weder reproduzierbare noch – hinsichtlich Quantifizierung – vertrauenswürdige Ergebnisse erzielt [107, 109-111].

Das Problem der Separation kann effektiv nur durch den Einsatz der lösungsmittelfreien Probenvorbereitung behoben werden, wodurch eine homogene Probenoberfläche geschaffen wird. Zusätzlich erlaubt die lösungsmittelfreie Probenvorbereitung die Analyse unlöslicher Proben. [66, 107, 112-119]

## **2.5 Stand der Technik in der MALDI-(TOF)-MS**

### **2.5.1 Parameteroptimierung**

Um eine Analyse unter optimalen Bedingungen durchführen zu können, müssen die zuvor beschriebenen Parameter für jede Substanzklasse empirisch ermittelt werden. BURSA und WULF konnten bei der Analyse vier unterschiedlicher synthetischer Polymerklassen unter Einsatz der *Dried-Droplet*-Methode zeigen, dass die Matrix, das

Kationisierungssalz, die Laserleistung und die Ionenblende einen sehr großen Einfluss auf die Qualität der Massenspektren haben. Des Weiteren wurde der Einfluss des Lösungsmittels als gering eingestuft und dem Lösungsmittel lediglich die Funktion zugeteilt, die untersuchten Komponenten zu lösen und eine gleichmäßige Verteilung der Matrix/Analyt-Mischung auf dem Target zu gewährleisten. [34, 120]

WEIDNER et al. hingegen beobachteten einen sehr großen Einfluss auf die Analyse des bei der *Dried-Droplet*-Probenvorbereitung eingesetzten Lösungsmittels. Mit Hilfe der MALDI-Imaging-Technik wurde bei der Analyse verschiedener Polymerklassen eine Auftrennung des Analyten von der Matrix und sogar eine Separation der Homologen eines Polymers auf der Targetoberfläche beobachtet. Es wurde festgestellt, dass eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen ohne die zuvor beschriebenen chromatographischen Effekte nicht bei jedem Lösungsmittel gegeben ist und dass das Lösungsmittel einen großen Einfluss auf die Qualität der Massenspektren hat. [14, 15, 106, 107]

### 2.5.2 Probenhomogenisierung

Als Bedingung für einen erfolgreichen Quantifizierungsansatz muss die Reproduzierbarkeit sowohl von Probe zu Probe als auch von Laserschuss zu Laserschuss gewährleistet werden [121, 122]. Bei der Anwendung lösungsmittelbasierter Probenvorbereitungstechniken wird meist allerdings durch das Auftreten chromatographischer Effekte diese Bedingung nicht erfüllt. Lösungsmittelfreie Probenpräparationen dagegen schaffen unabhängig vom Lösungsmittel eine deutlich homogenere Probenoberfläche [14, 15, 106, 123].

Bei lösungsmittelfreien Probenvorbereitungstechniken wird der Analyt nicht in die Kristalle der Matrix eingelagert, was anfangs in der MALDI-Massenspektrometrie als Bedingung für eine erfolgreiche MALDI-Analyse vorausgesetzt wurde und noch

immer in der Literatur diskutiert wird. GLÜCKMANN et al. [124] beschreiben beispielsweise, dass bei Peptiden und Proteinen eine Einbettung des Analyten in den Matrixkristall die Ausbildung von Alkali-Addukten verhindert. Während bei Analysen, bei denen die Probe nicht in Kontakt mit einem Lösungsmittel kam, in Massenspektren mit geringen oder sogar in gar keinen Signalintensitäten resultierten. Daher wird angenommen, dass Salze bei der Kristallisation der organischen Matrix ausgeschlossen werden und dadurch eine gewisse Aufreinigung des Analyten stattfindet.

Vergleichbare Ergebnisse erzielten YAO et al. [125] bei der Analyse von Insulin. Hierbei wurde die Probe vorher mit einer größeren Menge eines Puffers versetzt, wodurch Massenspektren ohne detektierbare Signale erhalten wurden. Erst nachdem die auf das Target applizierte getrocknete Probe mit einem Tropfen Aceton versetzt wurde, konnte ein Signal für Insulin detektiert werden. Das zugesetzte Aceton bewirkte einen erneuten Kristallisationsprozess, bei welchem größere Kristalle gebildet wurden und vermutlich der Puffer aus den Kristallen ausgeschlossen wurde.

Die Einbettung des Analyten in die Matrixkristalle ist zudem sehr stark von der Matrix abhängig. Eine Einlagerung wurde bereits für die beiden Zimtsäurederivate Sinapinsäure [126-129] und  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure [130] sowie für 3-Hydroxypicolinsäure [130] oder aber auch für 2,5-Dihydroxybenzoesäure [129, 131] beschrieben. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Einkristalle der 2,6-Dihydroxybenzoesäure keine Analyten einlagern [132, 133], obwohl der einzige Unterschied zu DHB in der Position von einer der beiden Hydroxy-Funktionen liegt.

Im Gegensatz zu den bisher geschilderten Beobachtungen zeigten TRIMPIN et al., dass möglichst geringe Partikelgrößen und der enge Kontakt zwischen Analyt und Matrix den MALDI-Ionisationsprozess fördern, jedoch eine Einlagerung des Analyten in die Matrixkristalle nicht erforderlich ist [134]. Werden lösungsmittelfreie Proben- aufgabetechniken eingesetzt, so müssen Matrix, Analyt und falls notwendig das

Kationisierungsagens im festen Zustand homogen vermennt und zerkleinert werden. Die resultierende Korngröße stellt dabei den limitierenden Faktor für die Homogenität dar [15, 121]. Daher müssen Korngrößen erzielt werden, welche sehr viel kleiner sind, als die vom Laser illuminierte Fläche, die typischerweise 0,05 bis 0,2 mm im Durchmesser beträgt [32].

Zur Homogenisierung der Substanzen ohne den Einsatz eines Lösungsmittels können der Literatur unterschiedliche Techniken entnommen werden. Bei der sogenannten *Vortex*-Methode wird das Probenmaterial in einem kleinen Glasvial mit Metallkugeln oder mit Glasperlen [34, 67] versetzt und auf einem Vortexer für 30 bis 60 Sekunden homogenisiert [135, 136]. Da lediglich ein geringer Teil der Probe mit den Metallkugeln in Kontakt tritt und ein Großteil der Probe – ohne zerkleinert worden zu sein – am Gefäßboden verbleibt, konnten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden [137]. Mit dieser Methode sind somit lediglich qualitative Aussagen möglich.

WEIDNER et al. versprühten eine angesetzte Lösung des Matrix/Analyt-Gemisches mittels eines Spray-Interfaces auf das Target unter Einhaltung bestimmter Parameter wie dem Abstand vom Interface zum Target [15, 106].

Des Weiteren können die Substanzen in einem Mörser mit einem Pistill vermennt und zerkleinert werden [121, 123, 135, 137-139]. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz einer Kugelmühle mit kleinen Gefäßen [112, 114, 118].

### **2.5.3 Probenauftragung auf das Target**

Nachdem der Analyt mit der Matrix homogen vermennt und zerkleinert wurde, muss die Mischung mit einer der zahlreichen zur Verfügung stehenden Methoden auf den Probenträger aufgebracht werden. Zum einen kann eine geringe Menge der Probe mit einem Spatel auf dem Target verrieben und anschließend das überschüssige nicht haftende Probenmaterial etwa mit einem leichten Stickstoffstrom

entfernt werden [67, 112, 135, 140]. Die Spatel-Technik ist zwar eine sehr schnelle und einfache Methode, allerdings ist bei mehreren Proben auf dem Target eine Kontamination durchaus wahrscheinlich. Die Kontamination der Proben wird durch die nicht fest angebrachten Substanzen und das Entfernen der überschüssigen Probe gefördert und stellt somit ein großes Problem dar.

Eine weitere Möglichkeit zur Probenaufgabe ist die Herstellung eines Presslings [112, 123, 141], bekannt aus der Infrarotspektroskopie, welcher mittels doppelseitigem Klebeband auf dem Target fixiert wird. Der Pressling liefert bei der Analyse eine deutlich geringere Auflösung sowie eine niedrigere Qualität in den Massenspektren im Vergleich zur Spatel-Technik [112]. Die höhere Dichte des Probenmaterials im Pressling scheint den Desorptionsprozess – möglicherweise durch eine höhere notwendige Oberflächenenergie – zu erschweren [112]. Des Weiteren werden bei Verwendung von Presslingen deutlich höhere Analytkonzentrationen benötigt, als gewöhnlich in der MALDI-Massenspektrometrie üblich ist [112, 123].

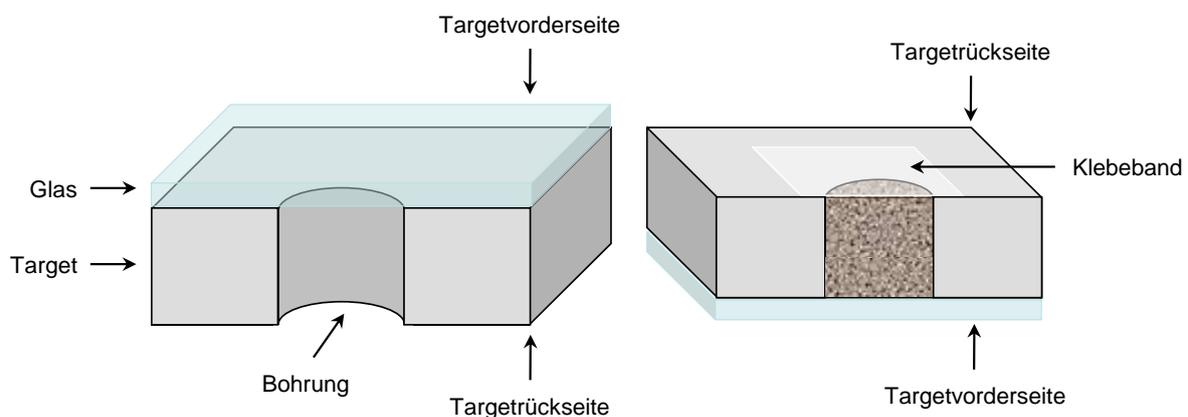
#### **2.5.4 Weiterentwicklung der lösungsmittelfreien Probenauftragung**

Eine weitere Entwicklung der lösungsmittelfreien Probenauftragung sieht eine Veränderung des Targets vor. Bei dieser Methode wurden von WULF und VON RATH runde Löcher mit einer Tiefe von 500  $\mu\text{m}$  in den Probenträger gefräst, anschließend die Ausfräsung mit dem Probengemisch gefüllt und der Überschuss mit einem Mikrospatel glatt abgezogen. Diese Technik erzeugt relativ glatte Oberflächen und beugt, je nach Abstand der Löcher, Querkontaminationen vor, welche durch die Proben entstehen können. [34, 67]

Aufgrund der Stoßempfindlichkeit feinkörniger Pulver treten allerdings bei Erschütterungen Probleme auf. Bei den nicht verdichteten Proben entstehen bei Erschütterungen Veränderungen an der Oberflächenstruktur und zusätzlich kann es dadurch je nach Abstand der Löcher zur Kontamination kommen. Daher wurde die

Probe mittels eines Stempelwerkzeugs verdichtet. Die Glätte der Probenoberfläche, welche abhängig von der Oberfläche des Stempelkopfes ist, konnte nochmals verbessert werden, jedoch treten dabei Probleme bei der Massengenauigkeit auf. Die Probenoberfläche weist nicht an jeder Stelle den gleichen Abstand zum Detektor auf, da beim Verdichten der Probe unterschiedliche Neigungswinkel, verursacht durch den unterschiedlichen Durchmesser der Ausfräsung und des Stempelkopfes, erzeugt werden. [121]

Daraufhin wurde die Ausfräsung im Target von MOOS weiterentwickelt und damit durchgehende Löcher in den Probenträger gebohrt. Zur Probenauftragung wird auf der Targetvorderseite temporär ein Objektträger fixiert und das zerkleinerte Probengemisch mit einem Stempelwerkzeug von der Rückseite des durchbohrten MALDI-Targets gegen die auf der Vorderseite angebrachte Glasplatte gefüllt (Abbildung 3). Auf diese Weise werden die Bohrungen vollständig unter mehrmaligem Verdichten mit der Probe ohne Lufteinschlüsse befüllt. Diese Probenaufgabetechnik wird als *Compressed-Sample* (CS, verdichtete Probe) bezeichnet.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung einer Bohrung im Target mit aufgesetzter Glasplatte und einer mit Probengemisch gefüllten Targetbohrung nach MOOS [121]

Nach erfolgter Probenaufgabe wird die Probe auf der Targetrückseite mit einem handelsüblichen Klebeband verschlossen und der Objektträger entfernt, sodass die Oberfläche der Probe von der Vorderseite mittels MALDI-MS analysiert werden kann. Durch das Befüllen und Verdichten von der Rückseite können Quer-

kontaminationen verhindert werden. Zusätzlich können auf diese Weise glatte Probenoberflächen gewährleistet werden, die zu einer Massengenauigkeit von  $\pm 0,5$  Dalton im Molekulargewichtsbereich von 4.000 Dalton beitragen. [121]

## 2.6 Quantifizierung in der MALDI-Massenspektrometrie

Nach wie vor werden jedoch nahezu alle aus der Literatur bekannten Quantifizierungsansätze in der MALDI-Massenspektrometrie unter Einsatz der lösungsmittelbasierten Techniken durchgeführt. Allerdings kann, bedingt durch den Kristallisationsprozess bei der Probenaufgabe, keine homogene und vergleichbare Verteilung der Probe gewährleistet werden und so sind quantitative Aussage nicht möglich [15]. Auch eine Analyse des gesamten Wells ermöglicht keine aussagekräftige Quantifizierung, da sich die Analyten an bestimmten Positionen des Wells anreichern können und dort aufgrund der sehr hohen Konzentrationen eine starke Ionensuppression der Analyten auftreten kann.

Das gleiche Kristallisationsverhalten kann lediglich von isotoopenmarkierten Standards erwartet werden. Werden diese als interne Standards zur Analyse eingesetzt, so können bei der Quantifizierung relative Standardabweichungen von etwa 10% erhalten werden [74, 142, 143]. So konnte beispielsweise eine niedermolekulare pharmazeutische Verbindung mit dem entsprechenden deuterierten Standard unter Anwendung der *Dried-Droplet*-Probenaufgabe in einer unbekannt Probe quantifiziert werden [74].

Isotoopenmarkierte Standards sind jedoch in den meisten Fällen nicht verfügbar und werden durch Strukturanaloga ersetzt, wodurch die relative Standardabweichung stark ansteigt [143, 144]. Deshalb existieren bislang nur sehr wenige geeignete Ansätze zur Quantifizierung mittels MALDI-Massenspektrometrie [74, 145-151], da der Einsatz strukturell unterschiedlicher Standards zur Quantifizierung unter

Anwendung der *Dried-Droplet*-Methode in den meisten Fällen keine aussagekräftigen Ergebnisse liefert [109, 137, 152].

Verlässliche Ergebnisse bei der Quantifizierung können lediglich mit lösungsmittelfreien Probenpräparationen erhalten werden. CRISTADORO, RÄDER und MÜLLEN [145] konnten unter Einsatz der Spatel-Technik anhand einer Kalibriergeraden die Konzentration eines C<sub>60</sub>-Fullerens bestimmen. GUTTMAN et al. [153] beschrieben ebenfalls einen lösungsmittelfreien Ansatz zur Quantifizierung von *n*-Octyl- und *n*-Butyl-initiierten Polystyrolen unter Einsatz der Elektrospray-Deposition und auch SZYSZKA et al. [110] nutzten die Elektrospray-Deposition, um die nicht umgesetzte Polyethylenglycol-Menge in ethoxylierten Tensiden zu quantifizieren. Beide Gruppen erzielten zufriedenstellende Korrelationskoeffizienten und relative Standardabweichungen im einstelligen Bereich.

## 2.7 Übersicht über die eingesetzten Proben

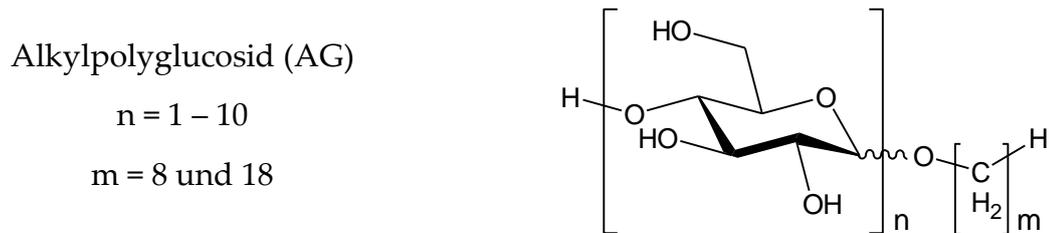
Der folgende Abschnitt stellt eine Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten synthetischen Polymere und Biopolymere dar.

Alkylpolyglucoside (AG) werden zu den nichtionischen Tensiden gezählt und werden in einer Direktsynthese aus einem Fettalkohol und Glucose hergestellt, wobei die Alkylkette mit der Zucker-Einheit *O*-glucosidisch verknüpft wird. Die beiden Komponenten sind jedoch kaum ineinander löslich, sodass der Zucker zunächst mit Butanol umgesetzt wird und anschließend in einem zweiten Schritt mit dem Fettalkohol umglucosidiert wird. [154]

Die Analyse der AG kann entweder nach Silylierung der freien Hydroxylgruppen mittels der Hochtemperatur-Gaschromatographie (HT-GC) oder underivatisiert mittels der Umkehrphasenflüssigchromatographie (RP-LC) erfolgen [155]. Beide Analysenmethoden erlauben jedoch lediglich die Charakterisierung der Mono- sowie

Diglucoside, wobei die höheren Homologen damit nur als Summe erfasst werden können [155].

Abbildung 4 zeigt den generellen Aufbau eines AG mit einer variablen Alkylkettenlänge von 8 bis 18 je nach eingesetztem Fettalkohol und einem Polymerisationsgrad (DP) zwischen 1 und 10.



**Abbildung 4:** Allgemeine Strukturformel eines Alkylpolyglucosids

Fettalkoholethoxylate (FAEO) basieren ebenfalls, wie auch die Alkylpolyglucoside, auf dem Einsatz von Fettalkoholen. Diese werden meist mit Ethylenoxid unter Basen- oder Säure-Katalyse umgesetzt und resultieren in einer Verteilung von homologen Polyethylenglycolthern. Es werden je nach eingesetztem Fettalkohol und Polymerisationsgrad Produkte mit einer flüssigen, wachsartigen bis hin zu einer festen Konsistenz erhalten.[154]

Abbildung 5 zeigt den generellen Aufbau eines FAEO mit einer variablen Alkylkettenlänge von 8 bis 18 je nach eingesetztem Fettalkohol und einem Polymerisationsgrad zwischen 1 und 30.



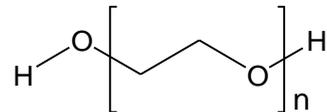
**Abbildung 5:** Allgemeine Strukturformel eines Fettalkoholethoxylates

Polyethylenglycole (PEG) werden zur Klasse der Polyether gezählt und lassen sich durch Homopolymerisation von Ethylenoxid darstellen. Meist wird in Gegenwart geringer Mengen Wasser oder Alkalimetallhydroxiden die anionische Ringöffnungspolymerisation durchgeführt. Durch Einstellen der Reaktionsbedingungen können,

abhängig von der Kettenlänge, flüssige über wachsartige bis feste wasserlösliche Produkte erhalten werden.[156] Abbildung 6 stellt das verwendete Polyethylenglycol 2.000 dar.

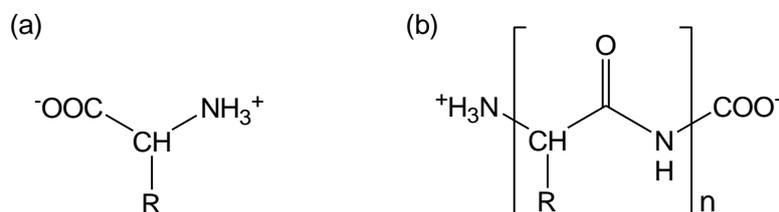
Polyethylenglycol 2.000 (PEG)

$$n = 27 - 62^*$$



**Abbildung 6:** Strukturformel des eingesetzten Polyethylenglycols

Aminosäuren sind neben Nukleinsäuren, Kohlenhydraten und Lipiden eine der bedeutendsten natürlichen Stoffklassen und werden aufgrund der Fähigkeit Peptide bzw. Proteine zu bilden, als „Bausteine des Lebens“ bezeichnet [157]. Natürliche Proteine und Peptide ergeben eine extrem große Bandbreite an unterschiedlichen Makromolekülen, obwohl diese lediglich aus 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut werden. Die allgemeine Struktur einer Aminosäure ist in Abbildung 7a dargestellt und unterscheidet sich bei den 20 proteinogenen Aminosäuren lediglich in der Seitenkette R [158].



**Abbildung 7:** Allgemeine Struktur einer Aminosäure (a) und eines Peptids (b)

Aminosäuren lassen sich nach der Art der Seitenkette in unpolare, polare, saure und basische Aminosäuren einteilen und werden durch Kondensation der  $\alpha$ -Carboxylgruppe mit der  $\alpha$ -Aminogruppe über Amidbindungen zu Polypeptiden verknüpft (Abbildung 7b) [158]. Eine Einteilung der Peptide kann nach ihrer Größe erfolgen. So werden bis zu 10 kondensierte Aminosäuren zu den Oligopeptiden gezählt, während ab etwa 100 Aminosäuren bzw. 10.000 Dalton eine Unterscheidung von Polypeptiden zu Proteinen getroffen wird [159]. In dieser Arbeit wurden Oligopeptide, zahlreiche Polypeptide, bis hin zu Proteinen mittels der *Compressed-Sample-Methode* untersucht

---

\* Auf Grundlage von MALDI-Massenspektren bestimmt

und überprüft, inwiefern sich die Präparationstechnik zur Analyse dieser Substanzklasse eignet.

### 3. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einsatz der *Compressed-Sample*-Probenpräparation hinsichtlich des quantitativen Einsatzes in der MALDI-Massenspektrometrie zu untersuchen und wichtige Parameter bei dieser Probenvorbereitung zu optimieren. Weiterhin soll die Analyse von Realproben die Eignung der CS-Technik demonstrieren.

Die durchbohrten Probenträger bei der *Compressed-Sample*-Methode zeigen bei der Analyse der Proben aufgrund des inhomogenen elektrischen Feldes einen starken Verlust an Massenauflösung. Dieses Problem soll näher charakterisiert und eine Lösung zur Steigerung der Massenauflösung trotz Bohrung gefunden werden. Weiterhin soll ein neuer Probenträger mit kleineren Bohrungen entworfen werden, um auf diese Weise die Probenmengen zu reduzieren und die Stabilität der Probenoberfläche beim Abnehmen des Objektträgers nach erfolgtem Einfüllen des Probenmaterials zu erhöhen.

Die Vermahlung der Probe in einem Mörser soll durch den Einsatz einer Kugelmühle ersetzt werden, da die Vermahlung im Mörser zeitintensiv und insbesondere benutzerabhängig ist. Dazu soll geprüft werden, inwiefern sich Kugelmühlen zur Vermahlung von Probenmengen von nur 20 mg eignen. Des Weiteren soll eine Optimierung der Vermahlungszeit und der eingesetzten Mahlkugeln hinsichtlich des Materials und der Größe durchgeführt werden. Ein Vergleich der Vermahlung im Mörser und in einer Kugelmühle bezüglich der Reproduzierbarkeit sowie der quantitativen Anwendbarkeit soll die Tauglichkeit bestätigen.

Ein Vergleich der *Dried-Droplet*- und der *Compressed-Sample*-Technik soll die Grenzen der lösungsmittelbasierten Probenvorbereitung charakterisieren und damit die Relevanz der lösungsmittelfreien Technik aufzeigen.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

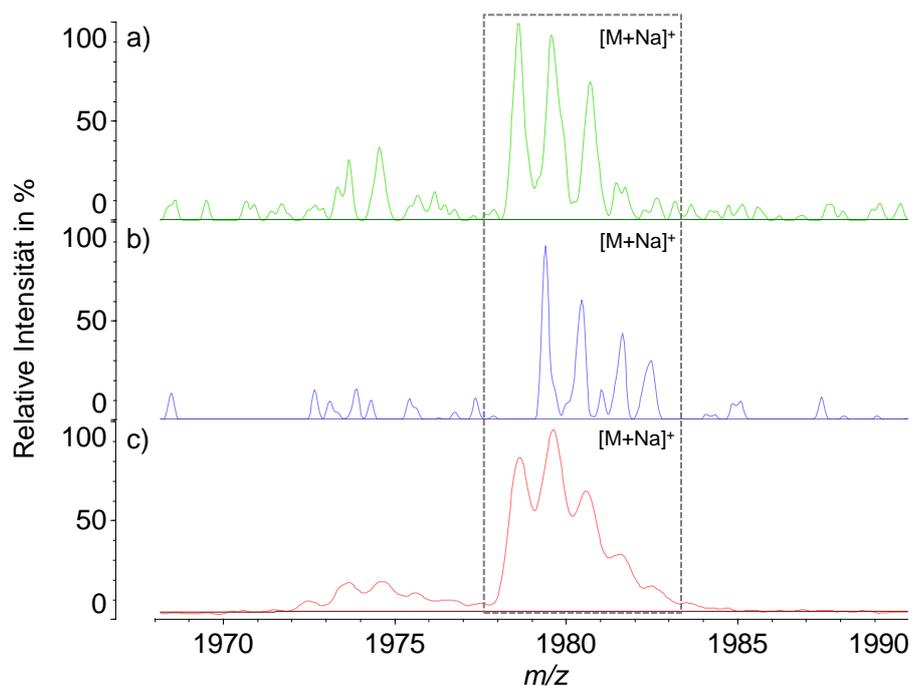
### 4.1 Einfluss des elektrischen Feldes auf die Ionenbeschleunigung

#### 4.1.1 Entstehende Problematik verursacht durch das Target-Design

Die Präparationstechnik, mit welcher die Matrix sowie der Analyt auf das Target appliziert werden, ist der mit Abstand bedeutsamste Parameter der Probenvorbereitung einer MALDI-Analyse. Generell stellen die lösungsmittelbasierten Probenaufgabetechniken für eine massenspektrometrische Analyse sehr schnelle und einfache Methoden dar. Allerdings treten bei diesen Probenaufgabetechniken erhebliche Probleme durch den Verdampfungsprozess des Lösungsmittels auf dem Target auf, wodurch die sogenannten *sweet-spots* [104] oder *hot spots* [105] erhalten werden. Zusätzlich kann zum Teil eine Auftrennung des Analyten, der Matrix sowie des Kationisierungssalzes auftreten, weshalb ebenfalls eine inhomogene Verteilung des Analyten erhalten wird. Das Problem der Separation kann effektiv nur durch den Einsatz der lösungsmittelfreien Probenvorbereitung behoben werden, wodurch eine homogene Probenoberfläche geschaffen wird [66, 107, 112-115, 117, 118, 160, 161]. In dieser Arbeit wird deshalb die lösungsmittelfreie *Compressed-Sample*-Technik eingesetzt und optimiert, sodass anschließend die Reproduzierbarkeit dieser Probenvorbereitung am Beispiel von Biomolekülen und synthetischen Polymeren nachgewiesen werden kann.

Bei der *Compressed-Sample*-Probenvorbereitung wird der eingesetzte Probenträger durchbohrt und die Proben anschließend in diese Bohrungen gefüllt. In der Ionenquelle des MALDI-Massenspektrometers dient das Target sowohl als Probenträger als auch als Beschleunigungselektrode. Bei der Analyse wird ein Beschleunigungspotential zwischen dem Target und einer gegenüberliegenden Elektrode angelegt. Das erzeugte elektrische Feld, welches zur Beschleunigung der gebildeten Ionen benötigt wird, ist bedingt durch die Bohrung nicht homogen verteilt, sodass die Ionen nicht an jeder Position des Wells gleichmäßig beschleunigt

werden [137]. Dadurch erfahren die Ionen, welche sich am Rand des Wells befinden, eine erhöhte Beschleunigung und resultieren in kleineren  $m/z$ -Verhältnissen im Vergleich zu denen, welche im Zentrum des Wells gebildet werden [137]. Wird bei der MALDI-Analyse das gesamte an der Oberfläche liegende Probenmaterial aus einem Well analysiert, wird diese Problematik besonders deutlich (Abbildung 8a, b).

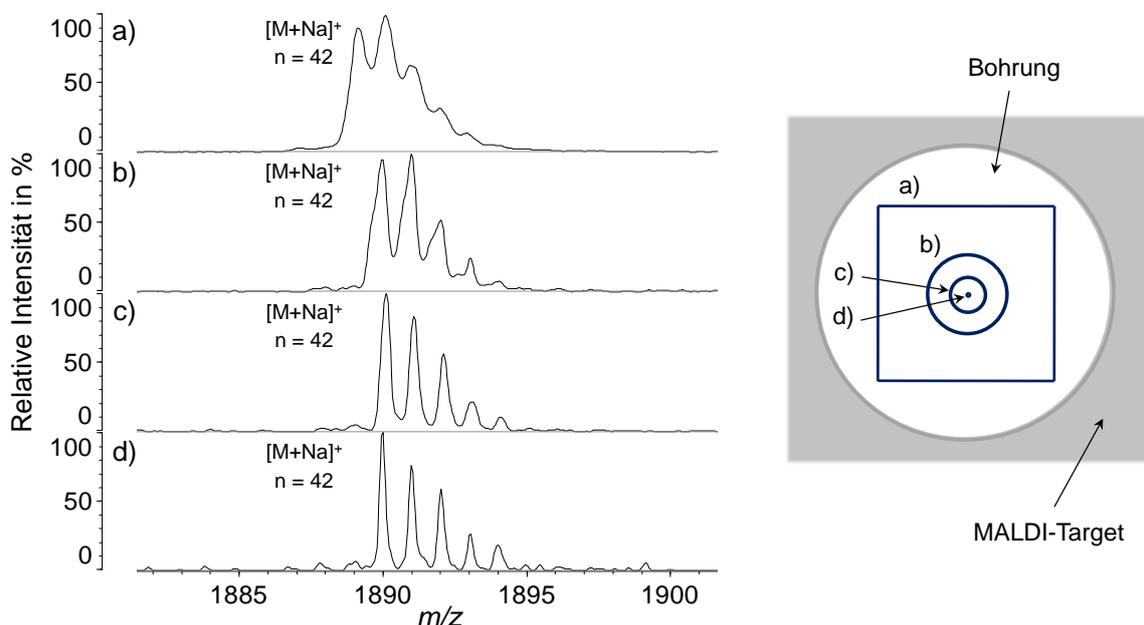


**Abbildung 8:** MALDI-(TOF)-Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP:  $n = 44$ ) erzielt durch die Analyse einer Position im äußeren Bereich des Wells (a), einer Position im Zentrum des Wells (b) und des gesamten Wells unter Einsatz eines quadratischen Rasters  $1,5 \times 1,5$  mm mit 961 Positionen (c)

In Abbildung 8a und b sind die Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers dargestellt, welche an zwei unterschiedlichen Positionen aufgenommen wurden. Der Vergleich der beiden Massenspektren zeigt eine deutliche Verschiebung des  $m/z$ -Verhältnisses im markierten Bereich bedingt durch das inhomogene elektrische Feld. Da die an den unterschiedlichen Positionen erhaltenen Massenspektren zu einem gemeinsamen Massenspektrum aufsummiert werden, wird ein Massenspektrum mit einer reduzierten Massenauflösung erhalten (Abbildung 8c), obwohl die Massenauflösung an jeder einzelnen Position (Abbildung 8a und b) und somit die Auflösung des verwendeten Massenspektrometers deutlich größer ausfällt.

### 4.1.2 Einsatz unterschiedlicher Laserraster

Die Analyse einer einzelnen Position auf einem Well zeigt die größtmögliche, erzielbare Auflösung des verwendeten Massenspektrometers. Somit kann durch eine Verkleinerung des eingesetzten Laserrasters unter Berücksichtigung einer notwendigen Mindestanzahl an Positionen die Massenaufklärung deutlich erhöht werden. Abbildung 9 zeigt die Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers ( $n = 42$ ), welches eine mittlere Molekülmasse von etwa 2.000 aufweist, erzielt aus der Analyse mit unterschiedlichen Laserrastergrößen.



**Abbildung 9:** Massenspektrum eines PEG 2.000 Oligomers (DP:  $n = 42$ ) erzielt durch den Einsatz unterschiedlicher Laserraster. Quadratisches Raster  $1 \times 1$  mm mit 4489 Positionen (a), rundes Raster  $\varnothing 450 \mu\text{m}$  mit 199 Positionen (b), rundes Raster  $\varnothing 200 \mu\text{m}$  mit 163 Positionen (c) und 163 Laserschüsse manuell eingestellt im Zentrum des Wells (d)

Der Einsatz eines großen Rasters, welches nahezu das gesamte Well bedeckt, zeigt hierbei keine Isotopenauflösung (Abbildung 9a). Wird das illuminierte Raster verkleinert, so steigt die Auflösung drastisch an (Abbildung 9b – d). Abbildung 9d zeigt die mit dem eingesetzten Massenspektrometer höchstmögliche erzielbare Auflösung, da hierbei lediglich wenige Positionen einer sehr kleinen Fläche illuminiert wurden und eine Homogenität des erzeugten elektrischen Feldes in diesem kleinen Bereich gegeben ist. Das Massenspektrum aus Abbildung 9c wurde

durch Einsatz eines runden Rasters mit einem Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$  erhalten. Die erzielte Massenauflösung ist vergleichbar mit der in Abbildung 9d und ist somit geeignet für die Analyse von Proben mit hoher Massenauflösung. Im Gegensatz zur *Dried-Droplet*-Probenaufgabe ist der Einsatz kleiner Laserraster bei der CS-Technik für das Erzielen reproduzierbarer und aussagekräftiger Analysen hinreichend. Die Erhöhung der Laserpositionen erhöht lediglich die Analysenzeit und den Datensatz, hat aber keine signifikante Änderung der Reproduzierbarkeit zur Folge.

Zusätzlich zeigt der Vergleich der Massenspektren aus Abbildung 9 eine leichte Verschiebung des jeweiligen Peaks zu kleineren  $m/z$ -Verhältnissen bei Vergrößerung der Rastergröße aufgrund des inhomogenen elektrischen Feldes. Dieser Effekt wird bei einem Vergleich der Spektren a und c bzw. d besonders deutlich.

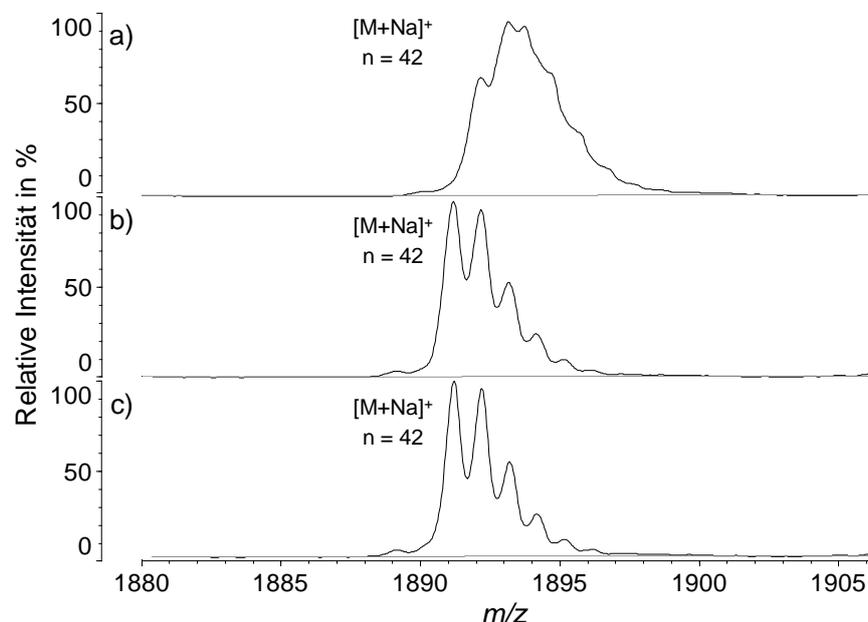
### 4.1.3 Optimierung durch Verwendung von Metallpulvern als Füllmaterial

Das elektrische Feld wird aufgrund des fehlenden Metalls bedingt durch die Bohrung im Target stark beeinflusst. Bei Verwendung der *Compressed-Sample*-Technik wird eine relativ große Probenmenge in das Target eingefüllt. Die generierte Probentiefe bei Einsatz der CS-Technik beträgt, bedingt durch die Targettiefe, beim verwendeten Target 2 mm. Bei einer MALDI-Analyse werden in der Literatur allerdings Eindringtiefen des Lasers von wenigen Hundert Nanometern beschrieben [162], weswegen bei der Ablation der Großteil der Probe unangetastet bleibt.

Zur Generierung eines homogenen elektrischen Feldes wurde Metallpulver als Füllmaterial eingesetzt. Dafür wird die Bohrung zunächst mit Probe gefüllt und lediglich einmal mit einem Metallstift verdichtet. Die ausgebildete Probenschicht weist eine bereits ausreichende Tiefe für die MALDI-Analyse auf. Anschließend wird das restliche freie Volumen der Bohrung vollständig mit einem Metallpulver gefüllt und mit dem Metallstift verdichtet, sodass auf der Oberfläche des MALDI-Targets die Probe mit dem Laser bestrahlt werden kann und unterhalb der Probenschicht

eine erhebliche Menge an Metallpulver vorhanden ist. Dieses Vorgehen führt zu einer deutlichen Verbesserung bezüglich der Ausbildung eines homogenen elektrischen Feldes und hat somit einen sehr großen Einfluss auf die erzielbare Massenauflösung bei der Analyse größerer Laserraster. [137]

Abbildung 10 zeigt die Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers ( $n = 42$ ) durch Verwendung eines Laserrasters, welches über das gesamte Well hinausragt. Bei a) wurde ohne den Einsatz eines metallischen Pulvers lediglich das Probenmaterial in eine Bohrung gefüllt. Der Einsatz von Aluminium (b) bzw. Kupfer (c) als Füllmaterial zeigt eine deutliche Erhöhung der Massenauflösung unter Verwendung gleicher Bedingungen. Hierbei ist ebenfalls zu erkennen, dass das eingesetzte Metallpulver eine Verschiebung des Peaks zu kleineren  $m/z$ -Verhältnissen verursacht. Das zugesetzte Metallpulver führt zur Homogenisierung des elektrischen Feldes und dazu, dass im Zentrum des Wells ebenfalls der Kontakt von Probe zu Metall aufgebaut wird und so die Ionen eine erhöhte Beschleunigung erfahren, was letztendlich in kleineren  $m/z$ -Verhältnissen resultiert.



**Abbildung 10:** Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP:  $n = 42$ ) ohne metallisches Pulver (a), mit Aluminium (b) und Kupfer (c) als Füllmaterial. Quadratisches Laserraster  $2 \times 2$  mm mit 1681 Positionen

Die Verwendung des Metallpulvers als Füllmaterial zeigt einen entscheidenden Nachteil bezüglich der Reproduzierbarkeit der Massenauflösung. Die eingefüllte und verdichtete Menge des Probenmaterials in der Bohrung ist von Präparation zu Präparation nicht exakt reproduzierbar, sodass die eingesetzte Metallpulvermenge ebenfalls von Probe zu Probe variiert. Jedoch zeigt die in der Bohrung enthaltene Menge des Metallpulvers aufgrund eines homogenen elektrischen Feldes zur Beschleunigung der Ionen einen sehr großen Einfluss auf die Massenauflösung, weshalb es unbedingt notwendig ist, eine reproduzierbare Menge des Metallpulvers in die Bohrung zu füllen.

### **4.1.4 Metallpulver in der Probe**

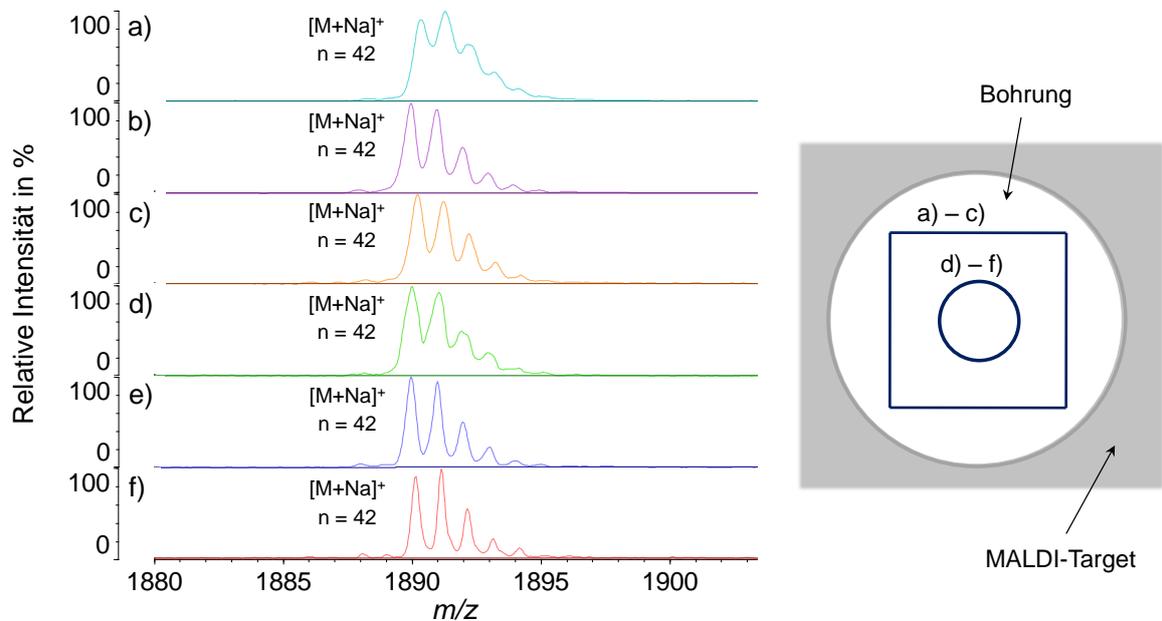
#### 4.1.4.1 Einfluss des eingesetzten Metalls

Um stets eine reproduzierbare Menge an Metallpulver einzusetzen, wurde die Probe direkt mit einer definierten Menge des Metallpulvers homogenisiert. So kann bei jeder Probe eine konstante Menge des metallischen Zusatzes realisiert werden. Zusätzlich wird das Metall in der Bohrung durch die homogene Vermahlung gleichmäßig verteilt.

Im Gegensatz zu der Verwendung des Metalls als Füllmaterial müssen bei dieser Probenvorbereitung die eingesetzten Metalle eine möglichst vergleichbare Korngröße sowie eine ähnliche Korngrößenverteilung in einem Bereich von etwa 10  $\mu\text{m}$  aufweisen, da davon auszugehen ist, dass die Metalle beim Vermahlungsprozess aufgrund ihrer erhöhten mechanischen Widerstandsfähigkeit im Vergleich zur Matrix und zum Analyten kaum zerkleinert werden.

Als Metalle wurden Aluminiumpulver mit einer Korngrößenverteilung von 7 bis 14  $\mu\text{m}$  sowie Kupferpulver mit 7 bis 10  $\mu\text{m}$  verwendet. Abbildung 11 zeigt den Vergleich der Massenspektren bei Einsatz eines quadratischen sowie eines runden Laserrasters zwischen der Probe ohne metallischen Zusatz (a und d) und der Probe,

welche mit Aluminium- (b und e) bzw. Kupferpulver (c und f) homogenisiert wurde. Der prozentuale Anteil der beiden Metalle betrug dabei etwa 10%. Es ist eine enorme Zunahme der Massenauflösung bei beiden Laserrastern im Vergleich zu der Probe ohne Metallpulver festzustellen.

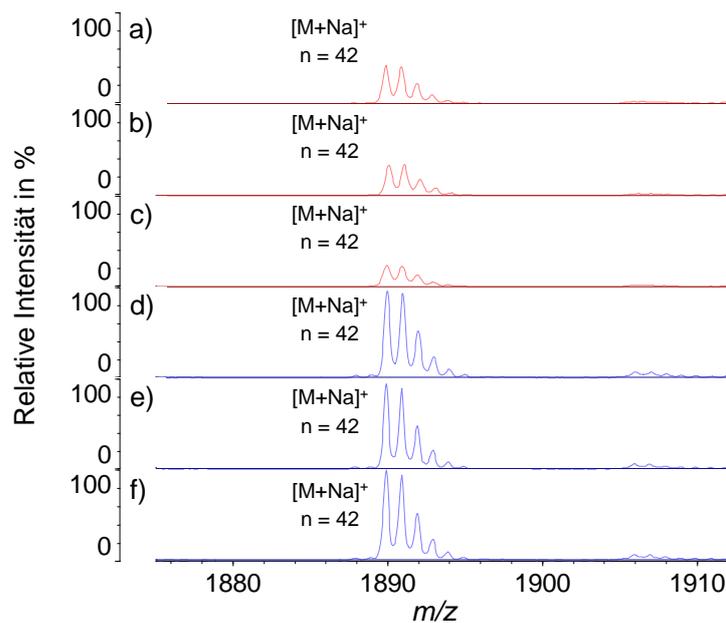


**Abbildung 11:** Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP:  $n = 42$ ) ohne metallisches Pulver (a) und (d), mit Aluminiumpulver (b) und (e) und mit Kupferpulver (c) und (f) in der Probe. Quadratisches Laserraster  $1 \times 1$  mm mit 4489 Positionen (a) – (c) und rundes Laserraster  $\varnothing 450 \mu\text{m}$  mit 199 Positionen (d) – (f)

Da die Vermahlung von Analyt und Matrix nicht mit beliebig kleinen Mengen durchgeführt werden kann und gleichzeitig biologische Proben lediglich in äußerst kleinen Mengen verfügbar sind, kann durch eine erhöhte Menge des Metallpulvers die Menge an Matrix und Analyt reduziert und auf diese Weise eine Verdünnung der Probe erzielt werden. Eine homogene und reproduzierbare Vermahlung wurde in früheren Arbeiten mit Mengen von etwa 20 mg durchgeführt. Die Menge ließe sich möglicherweise noch weiter reduzieren, jedoch ist die Bearbeitung solch kleiner Mengen nicht mehr mit kommerziell erhältlichen Kugelmøhlen oder Mørsern möglich. Durch Einsatz des Metallpulvers und bei einer konstant bleibenden Gesamtmenge von 20 mg kann so der Anteil an Matrix und Analyt verringert und eine Verdünnung erzielt werden.

## 4.1.4.2 Optimierung der eingesetzten Metallpulvermenge

Es wurde untersucht, welchen Einfluss das Metallpulver auf die Sensitivität der Analyse hat. Die folgenden Versuche wurden lediglich mit Aluminium durchgeführt, da sowohl mit Aluminium als auch mit Kupfer bei der Massenauflösung vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Abbildung 12 zeigt einen Vergleich der Massenspektren, welche ohne metallischen Zusatz (a – c) und mit Aluminiumpulver in der Probe (d – f) erzielt wurden, wobei alle Spektren hinsichtlich der Intensität auf das Spektrum von (f) skaliert wurden. Es ist zum einen ersichtlich, dass die Sensitivität durch den Zusatz deutlich gesteigert und außerdem die Reproduzierbarkeit der Peakintensität erhöht werden konnte. Des Weiteren zeigt ein Vergleich von Spektrum (d – f), dass auch die Massenauflösung durch den metallischen Zusatz reproduzierbar ist.



**Abbildung 12:** Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP:  $n = 42$ ) ohne metallisches Pulver (a) bis (c) und mit Aluminiumpulver (d) bis (f) in der Probe. Alle Spektren sind skaliert auf das Massenspektrum von Probe (f)

Die höhere Sensitivität lässt sich mit zwei Theorien erklären. Zum einen ist aufgrund des eingesetzten Metallpulvers das elektrische Feld homogener verteilt und es können daher mehr Ionen in die feldfreie Driftstrecke gelangen, während die gebildeten Ionen bei der Analyse ohne Einsatz von Metallpulver keine homogene, in

eine Richtung ausgeübte Beschleunigung erfahren und somit lediglich ein geringerer Teil der Ionen durch die Ionoptik in den Massenanalysator gelangt. Als zweite Theorie zur Erklärung der höheren Sensitivität kann unter Umständen die fehlende Leitfähigkeit der Bohrung durch das zugesetzte Aluminiumpulver kompensiert werden, sodass die bei der Ionisation entstehende entgegengesetzte elektrische Ladung abgeführt werden kann und somit an allen Positionen des Wells eine vergleichbare Menge an Analytionen in das Flugrohr des Massenspektrometers gelangen können. Abschließend kann allerdings nicht beurteilt werden, welche der beiden Theorien für die höhere Sensitivität verantwortlich ist.

Als nächstes wurde das optimale Verhältnis zwischen Probe und Metallpulver bestimmt. Als Matrix wurde DHB und als Kationisierungssalz Natriumchlorid verwendet. Dabei wurde die Menge an Matrix und Salz konstant belassen und nur die Aluminiummenge variiert. Da bei MALDI-Analysen, bedingt durch die Eindringtiefe des Lasers, lediglich wenige hundert Nanometer der Oberfläche erfasst werden, wurde der Anteil des Analyten an die Gesamtprobenmenge – inklusive der Metallpulvermenge – angepasst. Auf diese Weise konnte die absolute an der Oberfläche zur Verfügung stehende Menge an Analyt konstant gehalten werden, lediglich das Matrix/Analyt/Salz-Verhältnis änderte sich. Wird ein kritisches Matrix/Analyt/Salz-Verhältnis überschritten, kann dies zwar einer erfolgreichen MALDI-Analyse entgegen wirken, allerdings steht bei MALDI-Analysen stets ein ausgedehnter Bereich des Matrix/Analyt/Salz-Verhältnisses für erfolgreiche Analysen zur Verfügung, sodass hier der Einfluss durch die geringen Änderungen vernachlässigt werden kann [112].

Tabelle 1 zeigt die Peakintensität sowie das  $m/z$ -Verhältnis mit den jeweiligen Standardabweichungen bei Einsatz unterschiedlicher Mengen an Aluminiumpulver als Zusatz in der Probe. Die Ergebnisse wurden mit einem ausgewählten PEG 2.000 Oligomer ( $n = 42$ ) ausgewertet. Der Einsatz von 5% und 8% Aluminiumpulver in der Probe zeigt die geringsten relativen Standardabweichungen der Peakintensität. Bei

Erhöhung der Aluminiummenge ist zwar ein weiterer Anstieg der Peakintensität zu verzeichnen, aber gleichzeitig steigt die relative Standardabweichung der Peakintensität von 3% auf 17%. Dies könnte unter Umständen mit dem veränderten Matrix/Analyt-Verhältnis zusammenhängen, was jedoch nicht näher untersucht wurde. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine hohe Reproduzierbarkeit durch die Zugabe von maximal 10% Aluminiumpulver zu erreichen ist.

**Tabelle 1:** Auswertung eines PEG 2.000 Peaks  $[M + Na]^+$  (DP:  $n = 42$ ) mit unterschiedlichen Mengen an Aluminiumpulver

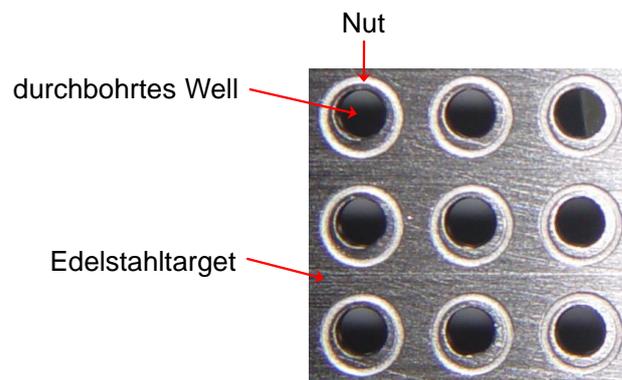
Probe mit	Peakintensität	rel. s [%]	$m/z$	rel. s [ppm]
5% Al	$67.859 \pm 2.047$	3	$1.892,710 \pm 0,078$	41
8% Al	$78.744 \pm 2.273$	3	$1.892,837 \pm 0,038$	20
15% Al	$102.485 \pm 9.583$	9	$1.892,420 \pm 0,056$	29
30% Al	$98.301 \pm 17.110$	17	$1.891,847 \pm 0,081$	43

## 4.2 Untersuchung des verwendeten Probenträgers

### 4.2.1 Problematik des durchbohrten Shimadzu-Targets

Die verwendeten Shimadzu-Targets, welche innerhalb der eingestanzten Wells durchbohrt wurden (Abbildung 13), zeigen bei der Analyse einen weiteren Nachteil. Die Targets weisen eine Vertiefung auf, welche jedes einzelne Well umgibt. Die Vertiefung ist für die lösungsmittelbasierten Probenvorbereitungstechniken notwendig, da hierbei die Probe als Tropfen auf das Target appliziert wird und der Tropfen, bedingt durch die Oberflächenspannung des eingesetzten Lösungsmittels, ansonsten auf glatten Oberflächen keine definierte Fläche bedecken würde. Die Vertiefung wirkt einer Kontamination entgegen, konzentriert den Tropfen innerhalb eines Wells und erzeugt auf diese Weise eine definierte Probenfläche innerhalb eines Wells. Die *Compressed-Sample-Technik* ist im Gegensatz dazu auf das Vorhandensein

einer Vertiefung nicht angewiesen, da die Probe im festen Aggregatzustand auf das Target appliziert wird. Die Bohrung durch das Shimadzu-Target wurde innerhalb der eingestanzten Wells platziert, befindet sich allerdings nicht exakt in der Mitte (Abbildung 13) [137]. Daraus ergibt sich ein inhomogen verteiltes elektrisches Feld zur Beschleunigung der Ionen [137].

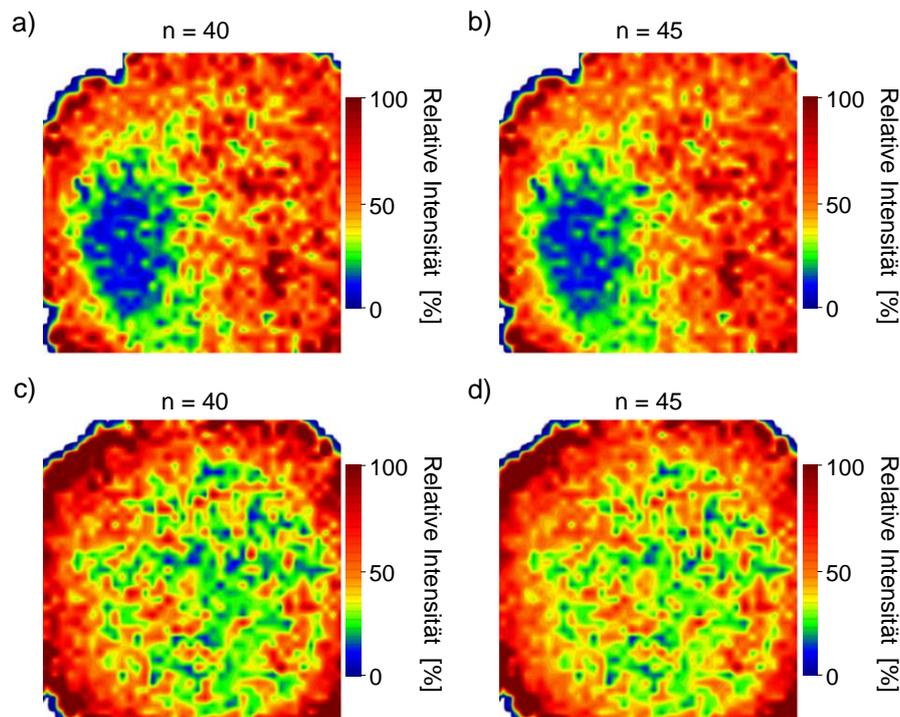


**Abbildung 13:** Fotografie eines Targetausschnitts mit ungleichmäßig gefrästen Bohrungen aus [137]

Mit Hilfe von Imaging-Analysen wurde der Einfluss der nicht zentral um die Bohrung verlaufenden Vertiefung betrachtet. Bei Imaging-Analysen kann jede einzelne Position eines zuvor ausgewählten Laserrasters auf dem Target analysiert und mit Ortskoordinaten hinterlegt werden, wobei TOF-Massenanalysatoren hierbei den gesamten Massenbereich simultan aufzeichnen. Aus dieser Art der Analyse können wertvolle Informationen bezüglich der Ortsverteilung einzelner ausgewählter Substanzen, wie der Matrix oder des Analyten, gewonnen werden. Zusätzlich zu der Ortsverteilung lässt sich die Intensitätsverteilung der Analyten im gesamten Laserraster darstellen, weswegen eine Imaging-Analyse eine sehr leistungsfähige Methode darstellt, um Aussagen über die Homogenität einer Probe zu treffen.

Abbildung 14a und b zeigt die MALDI-Imaging-Ergebnisse zweier unterschiedlicher PEG 2.000 Oligomere bei Analyse eines Laserrasters, welches über das gesamte Well hinausragt. Aus dieser Darstellung ist anhand der Farben die Intensitätsverteilung des ausgewählten  $m/z$ -Verhältnisses ersichtlich. Dabei fällt auf, dass abseits des Wellzentrums ein Bereich mit sehr geringer Intensität zu verzeichnen ist (blau),

während der restliche Bereich eine deutlich erhöhte Intensität aufweist [137]. Diese Beobachtung ist durch die nicht zentrierte Vertiefung um die Bohrung zu erklären. Je nach betrachtetem Well liegt das Intensitätsminimum an einer anderen Stelle, da die Vertiefung nicht identisch angeordnet ist und so einen anderen Einfluss auf das elektrische Feld ausübt.



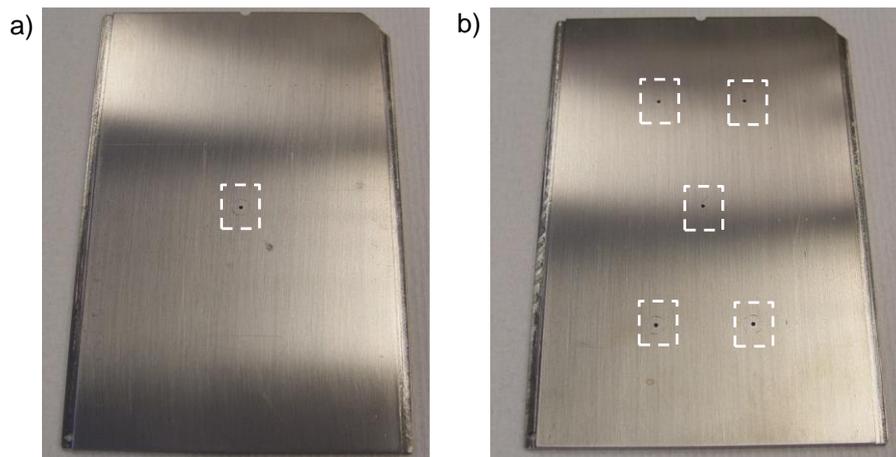
**Abbildung 14:** MALDI-Imaging eines PEG 2.000 Oligomers mit den angegebenen Polymerisationsgraden. Analysen (a) und (b) aus [137] wurden ohne metallischen Zusatz und (c) und (d) unter Einsatz von Aluminiumpulver als Füllmaterial erhalten

Das elektrische Feld kann mit Metallpulvern, entweder als Füllmaterial (Abschnitt 4.1.3) oder direkt in der Probe (Abschnitt 4.1.4), beeinflusst werden. Somit verhindert die Zugabe von Metallpulver das Entstehen eines Intensitätsminimums auf dem Well. Abbildung 14c und d zeigt die MALDI-Imaging-Ergebnisse zwei unterschiedlicher PEG 2.000 Oligomere eines über das gesamte Well hinausragenden Laserrasters. Es ist kein ausgeprägtes Intensitätsminimum festzustellen, da hier Aluminiumpulver als Füllmaterial eingesetzt wurde. Der Außenbereich des Wells weist dennoch im Vergleich zum inneren Bereich eine um Faktor zwei erhöhte Intensität auf. Aufgrund der Nähe zum metallischen Target ist das elektrische Feld

im Außenbereich möglicherweise homogener verteilt. Daher gelangen im Außenbereich mehr Ionen nach dem Passieren eines geerdeten Gitters zur feldfreien Driftstrecke, während die im Zentrum gebildeten Ionen keine homogene, in eine Richtung, ausgeübte Beschleunigung erfahren und somit lediglich ein geringerer Teil der Ionen durch die Ionenoptik in den Massenanalysator gelangt.

#### 4.2.2 Anfertigung eines neuen Probenträgers

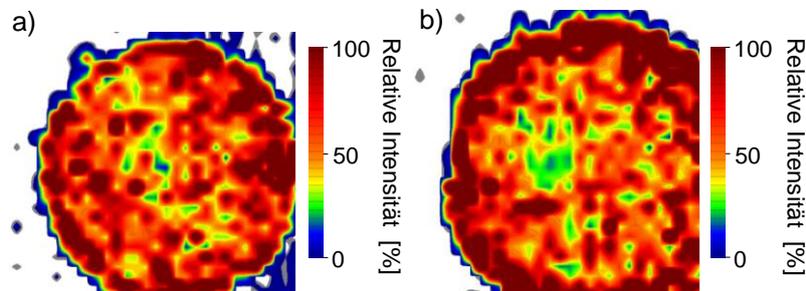
Um den Einfluss der Bohrung auf die Analyse genauer zu untersuchen, wurden zunächst zwei neue Targets entwickelt, welche keine Vertiefungen auf der Vorderseite des Targets aufweisen. Bei einem Target wurde ein Design mit lediglich einer Bohrung im Zentrum gewählt (Abbildung 15a), um überprüfen zu können, ob weitere Bohrungen in unmittelbarer Nachbarschaft das elektrische Feld beeinflussen. Das zweite Target wurde mit fünf Bohrungen erstellt, dabei befindet sich eine Bohrung erneut im Zentrum des Targets, während die weiteren vier Bohrungen einen größeren Abstand zu den jeweils anderen Bohrungen aufweisen (Abbildung 15b).



**Abbildung 15:** Fotografie der Targets mit einer Bohrung im Zentrum (a) und mit fünf Bohrungen (b)

Abbildung 16a zeigt ein MALDI-Imaging-Bild eines PEG 2.000 Oligomers bei der Analyse des gesamten Wells. Die Analyse wurde dabei in dem Target mit einer Bohrung durchgeführt. Es ist festzustellen, dass die fehlende Nut kein

Intensitätsminium in einem bestimmten Bereich, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben wurde, verursacht. Lediglich die leicht erhöhte Intensität am äußeren Rand des Wells, verursacht durch den näheren Kontakt zum Edelmetalltarget, ist zu beobachten.

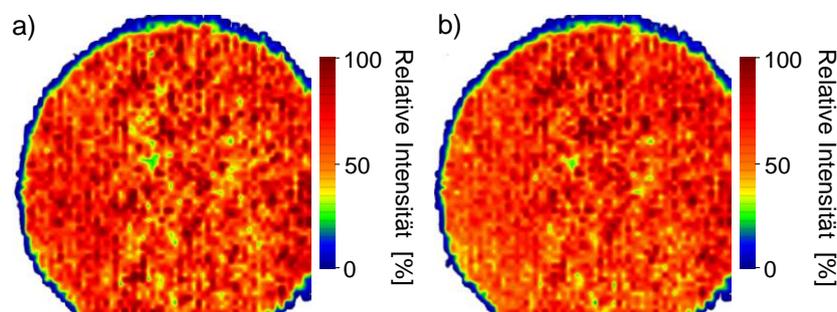


**Abbildung 16:** MALDI-Imaging eines PEG 2.000 Oligomers mit einem Polymerisationsgrad von  $n = 43$  bei Einsatz des Targets mit einer Bohrung (a) und mit fünf Bohrungen (b)

Die Verwendung des Targets mit fünf Bohrungen zeigt vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 16b). Bei der Analyse des zentralen Wells scheinen die übrigen im Target vorhandenen Bohrungen keinen Einfluss auf das elektrische Feld auszuüben, da auch hier kein ausgeprägtes Intensitätsminium beobachtet wird. Lediglich im Außenbereich des Wells tritt erneut eine höhere Intensität auf, was erneut durch den näheren Kontakt zum metallischen Probenträger verursacht wird.

Als nächstes wurde die Probe mit Aluminiumpulver versetzt und das Probenmaterial gemeinsam vermahlen. Für die Analyse wurde ein Raster gewählt, welches über das gesamte Well hinausragt, um die Homogenität der gesamten Probe darzustellen. Das MALDI-Imaging-Bild aus Abbildung 17 zeigt eine extrem homogene Verteilung des Probenmaterials bei Verwendung von Aluminiumpulver als Zusatz. Es wird lediglich an den Rändern des Wells ein sehr enger Bereich mit geringer Intensität beobachtet, während das übrige Well eine hohe bis sehr hohe Peakintensität aufweist. Sowohl Abbildung 17a als auch b belegt die homogene Verteilung der zwei PEG 2.000 Oligomere mit den Polymerisationsgraden von 42 bzw. 52 und zeigt die erfolgreiche Anwendung des neu entwickelten Targets sowie den erfolgreichen Einsatz des metallischen Zusatzes in der Probe. Die Analysen zeigen ebenfalls, dass keine erhöhte Intensität im Außenbereich des Wells auftritt.

Daher scheint die fehlende Leitfähigkeit der Bohrung durch das zugesetzte Aluminiumpulver kompensiert zu sein, sodass entweder das elektrische Feld homogener verteilt ist und an allen Positionen aufgrund der in eine Richtung ausgeübten Beschleunigung die gleiche Menge an Analytationen in die feldfreie Driftstrecke gelangen oder die bei der Ionisation entstehende entgegengesetzte elektrische Ladung abgeführt werden kann und somit an allen Positionen des Wells eine vergleichbare Menge an Analytationen in das Flugrohr des Massenspektrometers gelangen kann. Abschließend kann allerdings nicht beurteilt werden, welcher Effekt hier mehr zum Tragen kommt.



**Abbildung 17:** MALDI-Imaging eines PEG 2.000 Oligomers mit einem Polymerisationsgrad von  $n = 42$  (a) und  $n = 52$  (b) bei Einsatz des Targets mit einer Bohrung und 11% Aluminiumpulver in der Probe

Für den routinemäßigen Einsatz des neu entwickelten Targets wird ein Target mit mehr Bohrungen benötigt. Deshalb wurde das bestehende Design an diese Anforderung angepasst und ein Target mit  $4 \times 8$  (Abbildung 18) sowie ein Target mit  $4 \times 10$  Bohrungen angefertigt. Diese beiden Targets sind bei einer Vierfach-Bestimmung für die Analyse von 8 bzw. 10 Proben geeignet.



**Abbildung 18:** Fotografie eines Targets mit einem Design bestehend aus 4 x 8 Bohrungen

Die entwickelte Probenaufgabe, bei der das Probenmaterial von der Rückseite des Targets gegen einen Objektträger verdichtet wird, führt beim Ablösen des Objektträgers bei manchen Proben zu starken Adhäsionskräften zwischen Probe und Träger. Je kleiner der Durchmesser der erzeugten Probenoberfläche ist, desto kleiner sind auch die anziehenden Adhäsionskräfte und desto stabiler und homogener ist die Probenoberfläche. Bei den neu entwickelten Targets wurde daher eine Bohrung mit einem Innendurchmesser von lediglich 1,0 mm gewählt. Im Vergleich dazu weisen die durchbohrten Shimadzu-Targets Bohrungen mit einem Innendurchmesser von etwa 2,0 mm auf. Das neue Design fördert die Ausbildung stabilerer Probenoberflächen und reduziert ebenfalls die benötigte Probenmenge um den Faktor vier für jede Bohrung. Vor allem jedoch ist das erzeugte elektrische Feld deutlich homogener verteilt und unterdrückt die Ausbildung der bei den durchbohrten Shimadzu-Targets beobachteten Intensitätsminima.

## **4.3 Vermahlung mit Kugelmøhlen unterschiedlicher Hersteller**

### **4.3.1 Bisherige Technik**

Im folgenden Abschnitt soll die Probenvermahlung näher betrachtet werden, da diese einen entscheidenden Einfluss für eine erfolgreiche MALDI-Analyse mit einer lösungsmittelfreien Probenvorbereitung darstellt. Die bisher eingesetzte Methode

zur Zerkleinerung sowie Homogenisierung des Probenmaterials beruht auf der Vermahlung der Probe in einem kleinen Achatmörser mit zugehörigem Pistill [137].

Bei diesem Vorgehen wird die Vermahlungszeit mit einer Stoppuhr kontrolliert, um eine möglichst gleichbleibende Homogenisierung zu gewährleisten. Der durch den Pistill ausgeübte Druck auf die Probe kann allerdings nur nach persönlichem Empfinden eingeschätzt werden, sodass dieser Parameter benutzerabhängig und nicht vollständig reproduzierbar ist und daher zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Zusätzlich kann die eingesetzte Vermahlungstechnik, also das Vermahlen von der Außenwand zum Mörserinneren oder in kreisenden Bewegungen, einen großen Einfluss auf das Ergebnis haben. Nachteilig ist auch der Zeitaufwand für die Vermahlung, da lediglich eine Probe im Mörser gleichzeitig bearbeitet werden kann. Des Weiteren wird bei der Verwendung eines Mörsers in einem offenen System gearbeitet. Daher muss sehr sorgfältig darauf geachtet werden, dass es zu keinem Verlust von Probenbestandteilen während der Vermahlung im Mörser kommt. Diese Bestandteile könnten möglicherweise je nach Vermahlungsgrad zu diesem Zeitpunkt mehr Analyt oder Salz enthalten und könnten durch den Verlust die Zusammensetzung der Probe stark verändern.

Aufgrund der erwähnten nicht beeinflussbaren Parameter kann gesagt werden, dass die bislang verwendete Probenhomogenisierung keine optimale Probenpräparation darstellt und diese durch eine automatisierte Methode, welche möglichst benutzerunabhängig sein sollte, ersetzt werden muss. Die Automatisierung des Mahlvorgangs stellt allerdings sehr hohe Anforderungen an die Gerätehersteller, da lediglich sehr kleine Probenmengen verarbeitet werden müssen. Die Probenmengen, bestehend aus den Hauptkomponenten Matrix und Salz, sollten maximal etwa 20 mg betragen. Bei der Analyse von Biomolekülen stellt die Probenmenge des Analyten den limitierenden Faktor dar, sodass hier die Vermahlung einer noch geringeren Probenmenge wünschenswert wäre.

Zur Automatisierung des Mahlvorgangs wurden unterschiedliche Kugelmöhlen getestet, welche im Folgenden genauer beschrieben werden.

### 4.3.2 C3 Prozess- und Analystechnik Freezer Mill 6770

Die Kryomühle Freezer Mill 6770 der C3 Prozess- und Analystechnik GmbH bietet Gefäße mit einem Innenvolumen von 0,5 mL an. Es können parallel 3 bzw. 6 Gefäße dieser Größe zur Vermahlung eingesetzt werden und zusätzlich ist eine Kühlung der Gefäße mit flüssigem Stickstoff möglich. Es wurde eine Testvermahlung mit permanenter Kühlung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden in die Gefäße etwa 20 mg Probenmaterial eingefüllt und anschließend mit 5  $\mu$ L einer methanolischen Analytlösung, bestehend aus Raffinose (Standard), *n*-Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid sowie *n*-Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid, versetzt. Die Proben wurden in zwei Schritten von jeweils 3 Minuten vermahlen, wobei vor jedem Vermahlungsschritt eine Kühlperiode von 2 Minuten eingelegt wurde, sodass die Probe durch die entstehende Reibungswärme permanent gekühlt vorlag und so die Sprödigkeit der Probe erhöht wurde. Insgesamt wurden 6 Proben mit identischen Mengen an Matrix und Analyt vermahlen. Durch die Schlagwirkung der eingesetzten Edelmahlkörper wurde nach der Vermahlung ein deutlicher Abrieb des Metalls beobachtet, welcher allerdings metallischer Natur war und keinen Einfluss auf die MALDI-Analyse zeigen sollte (Abschnitt 4.1.4).

Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Intensitätsverhältnisse von Analyt zu Standard, wobei deutlich wird, dass sich die Ergebnisse von Probe zu Probe stark voneinander unterscheiden und somit keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt wurden. Die relativen Standardabweichungen liegen im Bereich zwischen 8% und 28%, was auf eine unzureichende Vermahlung schließen lässt.

**Tabelle 2:** Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen

Probe	Verhältnis Peakintensität (n = 4)			
	C <sub>9</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]	C <sub>11</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]
1	1,05 ± 0,15	14,3	0,99 ± 0,07	7,1
2	0,93 ± 0,07	7,5	1,00 ± 0,07	7,0
3	1,48 ± 0,41	27,7	1,91 ± 0,48	25,1
4	0,68 ± 0,07	10,3	0,74 ± 0,12	16,2
5	0,77 ± 0,06	7,8	0,80 ± 0,06	7,5
6	0,57 ± 0,08	14,0	0,58 ± 0,09	15,5
<b>MW</b>	0,91 ± 0,13	14,3	1,00 ± 0,19	19,0

Die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse können vermutlich auf ungeeignete Gefäße bei diesem System zurückgeführt werden. Die Probe wird durch einen schmalen, länglichen magnetischen Edelstahlstift innerhalb der Gefäße mittels eines magnetischen Feldes hin und her bewegt. Dadurch wird die Probe einerseits durch die Schlagwirkung an den Außenwänden und andererseits durch die Reibung des Metallstiftes an der Gefäßwand zerkleinert. Allerdings konnte nach der Vermahlung beim Öffnen der Gefäße beobachtet werden, dass die Probe sehr stark an den Gefäßwänden haftete und so vermutlich nicht hinreichend homogenisiert wurde. Ein weiteres mögliches Problem könnte die zugeführte Menge an Lösungsmittel darstellen. Die Analyten wurden zu Beginn als 5 µL-Aliquot auf die Gefäßwand pipettiert, wobei 5 Minuten gewartet wurde, bis die Gefäße luftdicht verschlossen wurden. Da die Gefäße einen geringen Innendurchmesser aufweisen und daher lediglich eine geringe Oberfläche zum Abdampfen des Lösungsmittels zur Verfügung stellen, könnte die Wartezeit zum vollständigen Entfernen des

Lösungsmittels zu kurz gewählt worden sein, um ein lösungsmittelfreies Probenmaterial zu erhalten. Die Lösungsmittelreste bewirkten möglicherweise, dass die Probe stark an der Gefäßwand anhaftete und so eine unzureichende Vermahlung erzielt wurde.

### 4.3.3 Omni Bead Ruptor Homogenizer

Der Bead Ruptor Homogenizer der Omni International wird mit kommerziell erhältlichen Mikroreaktionsgefäßen betrieben, weswegen sich dieser für kleine Probenmengen sehr gut eignet. Das Gerät erlaubt die simultane Vermahlung von 96 Gefäßen, was eine enorme Zeitersparnis gegenüber den übrigen Kugelmøhlen darstellt.

In die Gefäße wurden etwa 20 mg Probenmaterial eingefüllt und anschließend mit 5 µL einer methanolischen Analytlösung, bestehend aus Raffinose (Standard), *n*-Nonyl-β-D-Maltosid sowie *n*-Undecyl-β-D-Maltosid, versetzt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden 7 Proben mit identischen Mengen an Matrix und Analyt vermahlen. Im Idealfall sollte das Verhältnis der Peakintensität zwischen Analyt und verwendetem Standard, in diesem Fall Raffinose, bei allen Proben das gleiche Ergebnis liefern. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch keine vergleichbaren Werte (Tabelle 3) was ein Anzeichen für eine unzureichende Vermahlung darstellt.

**Tabelle 3:** Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen

Probe	Verhältnis Peakintensität (n = 4)			
	C <sub>9</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]	C <sub>11</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]
1	0,73 ± 0,06	8,2	0,69 ± 0,09	13,0
2	0,79 ± 0,06	7,6	0,80 ± 0,09	11,3
3	0,84 ± 0,16	19,0	0,78 ± 0,10	12,8
4	1,15 ± 0,11	9,6	1,20 ± 0,19	15,8
5	0,87 ± 0,05	5,7	0,90 ± 0,03	3,3
6	0,82 ± 0,11	13,4	0,79 ± 0,12	15,2
7	0,95 ± 0,13	13,7	0,95 ± 0,11	11,6
<b>MW</b>	0,88 ± 0,05	5,7	0,87 ± 0,06	6,9

Das Probenmaterial haftete bei diesen Versuchen ebenfalls sehr stark an der Gefäßwand, weswegen zusätzlich noch eine Nassvermahlung durchgeführt wurde. Eine Trockenvermahlung wird maßgeblich durch das Agglomerationsverhalten der Einzelkomponenten bestimmt. Übersteigen die interpartikulären Bindungskräfte die Gewichtskraft sowie die deagglomerierenden interpartikulären Kräfte der Partikel, so treten Agglomerate auf [163]. Für die Bildung von Agglomeraten sind verschiedene Kräfte verantwortlich [163], wobei nachfolgend die beiden wichtigsten kurz erläutert werden. Kommt die Probe mit Wasser in Kontakt, so können bewegliche Flüssigkeitsbrücken zwischen den einzelnen Partikeln durch Flüssigkeit auf der Partikeloberfläche entstehen [164, 165]. Meist reicht der Kontakt mit kondensiertem Wasser aus der Umgebungsluft aus, um die Flüssigkeitsbrücken zu bilden [165]. Den relevantesten Agglomerationsmechanismus bei einer Trocken-

vermahlung stellen aber die Van-der-Waals-Kräfte, also die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Molekülen von zwei Partikeln, dar [163, 165]. Bei einer Nassvermahlung werden die auftretenden Kräfte der beiden beschriebenen Agglomerationsmechanismen aufgehoben, sodass die Probe in der Regel weiter zerkleinert werden kann ohne Agglomerate auszubilden [163]. Eine Agglomeration verhindert ansonsten das Zerkleinern des Probenmaterials im Korngrößenbereich von etwa 5  $\mu\text{m}$  [166]. Zusätzlich ist die Temperaturerhöhung bei einer Trockenvermahlung nicht zu vernachlässigen [167], wobei diese durchaus zu unerwünschten Reaktionen führen kann [168]. Der Kühlungseffekt des umgebenden Lösungsmittels bei der Nassvermahlung kann eine extreme Erwärmung des Probenmaterials verhindern.

Bei einer Nassvermahlung wird die Probe, nachdem diese mit entsprechenden Mahlkugeln bestückt wurde, mit einem Lösungsmittel versetzt, in welchem die Probe vorzugsweise nicht löslich ist. In diesem Fall wurde Cyclohexan, ein sehr unpolares Lösungsmittel, verwendet, da die zu vermahlenden Komponenten einen extrem polaren Charakter aufweisen und somit bevorzugt in polaren Lösungsmitteln löslich sind. Nach der Vermahlung wurde die Probe zentrifugiert und das eingesetzte Lösungsmittel mit einer feinen Injektionsnadel vorsichtig entnommen, sodass eine möglichst trockene Probe erhalten wurde. Die verbleibenden Lösungsmittelreste wurden mit einer Vakuumzentrifuge entfernt.

Tabelle 4 zeigt die erhaltenen Verhältnisse der Peakintensitäten von Analyt zu Standard aus der Nassvermahlung. Die erzielten relativen Standardabweichungen der einzelnen Proben liegen, mit einer Ausnahme, zwischen 4% und 9%. Alle Proben wurden mit der gleichen methanolischen Lösung, bestehend aus den Analyten und dem Standard versetzt. Dennoch zeigen die erhaltenen Ergebnisse deutliche Abweichungen zwischen den Analysen, sodass die Proben entweder nicht identisch vermahlen wurden oder das eingesetzte Cyclohexan einen Einfluss auf die Vermahlung ausübt.

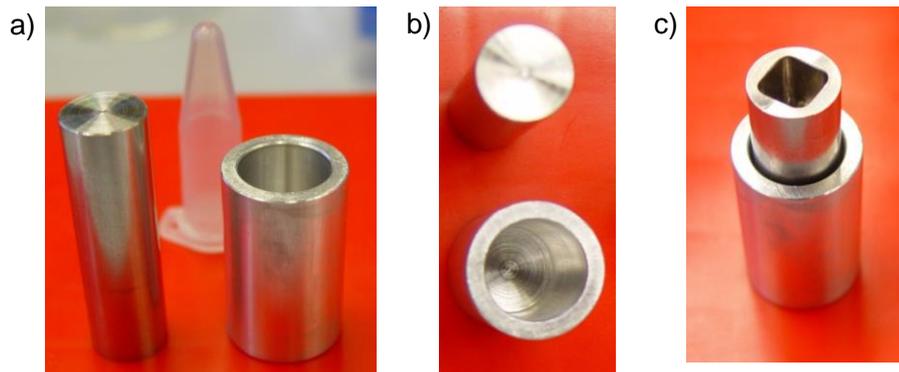
**Tabelle 4:** Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen

Probe	Verhältnis Peakintensität (n = 4)			
	C <sub>9</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]	C <sub>11</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]
1	1,70 ± 0,13	7,6	1,75 ± 0,10	5,7
2	1,52 ± 0,08	5,3	1,43 ± 0,21	14,7
3	1,40 ± 0,08	5,7	1,34 ± 0,05	3,7
4	1,14 ± 0,06	5,3	1,14 ± 0,10	8,8
5	1,14 ± 0,10	8,8	1,14 ± 0,06	5,3
<b>MW</b>	1,38 ± 0,11	8,0	1,36 ± 0,11	8,1

Zur Überprüfung der Löslichkeit der Probe in Cyclohexan wurde das nach der Vermahlung entnommene Cyclohexan mit einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingedampft. Im Gefäß verblieb eine nicht unerhebliche Menge eines Feststoffes, sodass das eingesetzte Cyclohexan, obwohl dieses im Gegensatz zur Probe einen deutlich unpolaren Charakter aufweist, Probenbestandteile während des Mahlvorgangs gelöst hat und damit möglicherweise die Ergebnisse der Analyse beeinflusst wurden.

#### 4.3.4 Mahlwerk

RILEY et al. [169] beschreiben eine Vermahlungsmethode unter Verwendung einer Hülse und eines Stempels, welche sich allerdings nicht für die gewünschten Probenmengen von 20 mg eignet. Daher wurde dieses Modell in einer deutlich kleineren Ausführung angefertigt (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Fotografie der Hülse mit Stempel von der Seite (a), von oben (b) und von der Seite bei eingesetztem Stempel in der Hülse (c)

Bei dieser Methode wird die Probe in die Hülse gefüllt und der Stempel innerhalb der Hülse auf die Probe gesetzt. Anschließend wird der Stempel mit einer kommerziell erhältlichen Handbohrmaschine in Rotation gebracht, wobei die Probe durch den Druck des rotierenden Stempels zwischen zwei Oberflächen verrieben wird. Zerkleinert wird die Probe hierbei nach dem Prinzip der Reibung, welches vergleichbar mit dem eines Mörsers mit einem Pistill ist.

Das Mahlwerk stellt eine kostengünstige und sehr einfache Alternative zu den Kugelmøhlen dar. Die erzielten Ergebnisse, in Tabelle 5 zusammengestellt, zeigen bei den einzelnen Proben meist, mit einer Ausnahme, relative Standardabweichungen von 3% bis 8%. Auch die Verhältnisse zwischen den einzelnen Proben zeigen keine großen Abweichungen. So werden für das *n*-Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid Peakintensitätsverhältnisse von 0,68 bis 0,83 erhalten.

**Tabelle 5:** Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen

Probe	Verhältnis Peakintensität (n = 4)			
	C <sub>9</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]	C <sub>11</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]
1	0,68 ± 0,05	7,4	0,79 ± 0,03	3,8
2	0,69 ± 0,02	2,9	0,77 ± 0,04	5,2
3	0,81 ± 0,06	7,4	0,86 ± 0,06	7,0
4	0,83 ± 0,04	4,8	0,91 ± 0,12	13,2
5	0,65 ± 0,05	7,7	0,70 ± 0,04	5,7
6	0,72 ± 0,02	2,8	0,75 ± 0,05	6,7
<b>MW</b>	0,73 ± 0,03	4,1	0,80 ± 0,03	3,8

Durch die Verwendung des Mahlwerks kommt es allerdings zu einer starken Wärmeentwicklung. Werden thermolabile Substanzen eingesetzt, kann die Vermahlung eventuell zur Zersetzung der Substanzen führen, da bereits bei einer kurzen Vermahlungszeit die Temperatur der Probe durch die Reibungskräfte zwischen Hülse und Stempel stark angestiegen ist. Des Weiteren wurde bei den ersten Experimenten ein starker Abrieb der Hülse beobachtet, was zwar die MALDI-Analysen nicht beeinflusst (Abschnitt 4.1.4), allerdings wurden bereits nach kurzer Zeit Abnutzungserscheinungen an der Hülse beobachtet, was einem häufigen Einsatz der Gefäße entgegenwirkt.

### 4.3.5 Retsch MM

Die Schwingmühle MM der Retsch GmbH ermöglicht den simultanen Einsatz von zwei Mahlgefäßen, welche horizontal in Bewegung gesetzt werden. Die Probe wird auf diese Weise von den verwendeten Mahlkugeln durch die Schlagwirkung auf die Gefäßoberfläche und durch Reibungskräfte zerkleinert. Die für dieses Gerät kommerziell erhältlichen Mahlbecher eignen sich lediglich für große Probenvolumina, da das Gefäß mit dem kleinsten Innenvolumen ein Fassungsvermögen von 5 mL aufweist. Eine Vermahlung von 20 mg Probenmaterial ist daher nicht möglich.

Die ersten Experimente wurden dennoch mit diesen Gefäßen und Probenmengen von etwa 100 mg durchgeführt, um die Eignung dieser Schwingmühle zu überprüfen. Es wurden 104 mg des Probenmaterials in einem Edelstahlgefäß mit 25 µL methanolischer Analyt-Lösung versetzt. Die Probe wurde mit maximaler Schwingung 10 Minuten vermahlen und anschließend auf acht Bohrungen des Targets verteilt. Tabelle 6 zeigt den Mittelwert des Intensitätsverhältnisses von Analyt zum Standard aus den acht Analysen. Als relative Standardabweichung für die beiden eingesetzten Analyten wurden 4% und 6% ermittelt, weshalb von einer homogenen Probe ausgegangen werden kann. Die Vergleichbarkeit von Probe zu Probe wurde bei Verwendung der 5-mL-Gefäße aufgrund der enormen Probenmengen nicht überprüft.

**Tabelle 6:** Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen

<b>Verhältnis Peakintensität (n = 8)</b>				
	C <sub>9</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]	C <sub>11</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]
<b>MW</b>	1,33 ± 0,06	4,5	1,40 ± 0,08	5,7

#### 4.3.6 Vergleich der Ergebnisse der Mühlen mit Mörser und Pistill

Die Kryomühle von C3 Prozess- und Analysetechnik GmbH zeigte aufgrund der sehr schmalen Gefäße keine reproduzierbaren Ergebnisse. Ein weiteres Problem dieser Mühle liegt darin, dass lediglich magnetische Mahlkörper sowie nicht magnetische Gefäße eingesetzt werden können, da bei dieser Mühle die Mahlkörper durch ein magnetisches Feld in Bewegung versetzt werden. Dieses Funktionsprinzip schließt den Einsatz nicht-magnetischer Mahlkörper aus. Aufgrund der erwähnten Problematik kam diese Mühle nicht weiter zum Einsatz.

Bei dem Bead Ruptor Homogenizer von Omni International ist lediglich der Einsatz von kleinen Reaktionsgefäßen vorgesehen, wobei die 0,6 mL Reaktionsgefäße konisch zulaufend aufgebaut sind und diese enge Wandung möglicherweise zu einem Festsetzen der Mahlkugeln führen kann. Dieser Effekt wirkt einer optimalen Vermahlung entgegen und daher erscheint diese Schwingmühle als nicht geeignet für die weiteren Experimente.

Das nach RILEY et al. [169] angefertigte Mahlwerk konnte aufgrund der erzielten Ergebnisse sowie der nicht widerstandsfähigen Gefäße nicht überzeugen. Daher wurde diese Technik bei den weiteren Experimenten ebenfalls nicht beachtet.

Die Schwingmühle MM der Retsch GmbH zeigte in den ersten Versuchen sehr erfolgsversprechende Ergebnisse, welche hinsichtlich der relativen Standardabweichung sowie der Spektrenqualität mit der Mörser-Methode vergleichbar sind. Außerdem erlaubt der Geräteaufbau den Einsatz selbstangefertigter, kleinerer Mahlgefäße. Im folgenden Abschnitt werden der Einsatz der Schwingmühle sowie die weitere Optimierung dieser Methode beschrieben.

## 4.4. Optimierung der Vermahlung mit Schwingmühle Retsch MM

### 4.4.1 Herstellung geeigneter Gefäße

Es sollte eine reproduzierbare sowie benutzerunabhängige schnelle Vermahlung kleiner Probenmengen von etwa 20 mg realisiert werden.

Zu diesem Zweck wurden Edelstahlgefäße mit einem Innenvolumen von 0,4 mL angefertigt. Aufgrund des geringen Innenvolumens und des kugelförmigen Hohlraums eignen sich diese Gefäße für die Vermahlung kleiner Probenmengen. Abbildung 20 stellt die für die weiteren Experimente verwendeten Gefäße dar.



**Abbildung 20:** Fotografie der Edelstahlgefäße mit einem Volumen von 0,4 mL neben einem kommerziell erhältlichen 2-mL-Mikroreaktionsgefäß

### 4.4.2 Einsatz unterschiedlicher Mahlkugeln

Als Mahlkugeln können sowohl sehr widerstandsfähige schwere als auch leichte, weiche Materialien eingesetzt werden. Die Wahl der Mahlkugeln ist in erster Linie abhängig vom Material des Mahlbeckers und von der Beschaffenheit der Probe. Zu den kommerziell erhältlichen Materialien zählen Edelstahl, Glas, Wolframcarbid und Zirkonoxid. Auf den Einsatz von Wolframcarbid und Zirkonoxid wurde aus Kostengründen verzichtet.

Beim Mahlprozess in einer Kugelmühle wird durch mechanische Beanspruchung, also durch die entstehenden Reibungskräfte zwischen Mahlbecher und Mahlkugeln, ein sehr feiner Abrieb des Mahlbechers sowie der Mahlkugeln hervorgerufen. Dieser wird mit dem Mahlgut vermischt und ist anschließend aufgrund der geringen Korngröße des Abriebs nicht mehr abtrennbar.

In der MALDI-Massenspektrometrie werden nahezu ausschließlich organische Verbindungen analysiert, welche zum Teil, abhängig von den funktionellen Gruppen des Moleküls, mit Alkalimetall-, Silber- oder Kupferionen Addukte bilden können. Die verwendeten Mahlbecher sowie Mahlkugeln bestehen aus anorganischen Bestandteilen, sodass die Analyse organischer Moleküle dadurch nicht gestört werden sollte. Die beim Abrieb freigesetzten Metallionen könnten höchstens eine Konkurrenzsituation zur Adduktbildung mit den zugesetzten Metallsalzen darstellen. Die zugesetzten Metallionen liegen allerdings in einem deutlichen Überschuss vor, sodass die Menge an Abrieb von Mahlbecher und Metallkugeln vernachlässigt werden kann.

Es wurden Vermahlungen in den in Abbildung 20 dargestellten Edelstahlgefäßen mit Edelstahlkugeln durchgeführt. Die Probe setzte sich allerdings bereits nach einer sehr kurzen Vermahlungsdauer an der Gefäßwand fest und konnte nur durch sehr große Kraftausübung mit einem Spatel abgelöst werden, sodass Teile der Probe verloren gingen und die Probe lediglich eine kurze Zeit vermischt und zerkleinert wurde. Dies hängt damit zusammen, dass die Edelstahlkugeln eine hohe Masse besitzen und durch die Schwingungsbewegung des Mahlbechers einen sehr großen Impuls auf die Wand übertragen und die Probe dabei stark verdichtet wird. Daher sind diese Mahlkugeln nicht für die Vermahlung feinkristalliner organischer Pulver geeignet.

Als nächstes wurden Molekularsieb-Perlen mit einem Durchmesser von 2 mm zur Vermahlung eingesetzt. Diese weisen ein geringes Eigengewicht auf, wodurch ein geringerer Impulsübertrag auf das Mahlgut ausgeübt wird. Molekularsieb-Perlen

zeichnen sich vorwiegend durch ihre hygroskopischen Eigenschaften aus. Dadurch sollte der Probe verbliebenes Wasser entzogen und somit die bereits beschriebenen Flüssigkeitsbrücken zwischen den Partikeln aufgehoben werden, was wiederum eine Auswirkung auf die Endfeinheit des Probenmaterials hat. Allerdings wurde die Probe ebenfalls sehr stark verdichtet und konnte nicht ohne weiteres von der Gefäßwand abgelöst werden. Zusätzlich wurde bei der darauf folgenden MALDI-Analyse eine deutliche Abnahme der Signalintensitäten mit gleichzeitiger Zunahme der relativen Standardabweichung auf über 10% beobachtet. Aus diesen Gründen wurden im weiteren Verlauf der Arbeit keine Molekularsieb-Perlen als Mahlkugeln mehr verwendet.

Anschließend wurden Glasperlen mit unterschiedlichen Durchmessern eingesetzt. Diese sind kostengünstig in der Anschaffung und können deshalb nach jeder Anwendung entsorgt werden, sodass kein aufwendiges Reinigen der Glasperlen notwendig ist. Des Weiteren weisen Glasperlen, wie auch Molekularsieb-Perlen, ein geringes Eigengewicht auf. Bei der Vermahlung ist ein leichtes Anhaften der Probe an der Gefäßwand zu beobachten, allerdings lässt sich das Probenmaterial ohne weiteres mit einem Mikrospatel von der Gefäßwand ablösen.

Tabelle 7 stellt das Verhältnis der Peakintensität des Analyten zum Standard und der zugehörigen relativen Standardabweichung in Abhängigkeit vom Glasperlendurchmesser dar. Die Anzahl der Glasperlen wurde abhängig vom Durchmesser der Glasperlen gewählt, sodass das innere Volumen der Mahlgefäße zu etwa fünfzig bis siebzig Prozent mit der Probe und den Glasperlen gefüllt war. Für die Analysen, welche mit einem Glasperlendurchmesser von 4 mm durchgeführt wurden, wurden andere Konzentrationen des Standards und der Analyten eingesetzt, weswegen sich die Intensitätsverhältnisse im Vergleich zu den anderen Glasperlendurchmessern unterscheiden. Allerdings liegt an dieser Stelle der Fokus auf dem Vergleich der relativen Standardabweichung bei Variation des Glasperlendurchmessers und nicht auf dem Vergleich der Intensitätsverhältnisse.

**Tabelle 7:** Intensitätsverhältnisse von Analyt zu Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen in Abhängigkeit vom Glasperlendurchmesser. Die Analysen mit 4 mm Perlendurchmesser wurden mit anderen Analyt-Konzentrationen durchgeführt

Glasperlen- durchmesser (mm)	Anzahl Glasperlen	Verhältnis Peakintensität (n = 4)			
		C <sub>9</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]	C <sub>11</sub> -Maltosid / Raffinose	rel. s [%]
0,75 – 1,00	27	1,21 ± 0,21	17,4	0,94 ± 0,16	17,0
1,25 – 1,65	7	1,01 ± 0,08	7,9	0,75 ± 0,06	8,0
2,85 – 3,30	2	1,09 ± 0,04	3,7	0,87 ± 0,04	4,6
~ 4	1	0,65 ± 0,04	6,1	0,69 ± 0,05	7,2
		0,67 ± 0,04	6,0	0,67 ± 0,01	1,5
		0,70 ± 0,04	5,7	0,71 ± 0,04	5,6

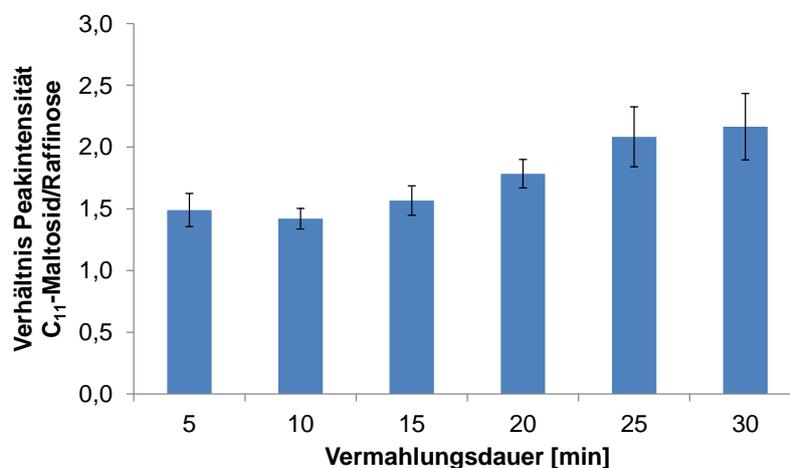
Bei Einsatz der kleinsten Glasperlen wird eine relative Standardabweichung von nahezu 20% erzielt. Demgegenüber weisen die Analysen die geringste relative Standardabweichung auf, welche auf der Vermahlung mit den höchsten Glasperlendurchmessern basieren. Dieses Verhalten lässt sich damit erklären, dass die Glasperlen mit großen Durchmessern aufgrund ihrer höheren Masse das Probenmaterial an der Gefäßoberfläche durch die Schlagwirkung zerkleinern. Im Gegensatz dazu wird bei den kleinen Glasperlen und den Einsatz mehrerer Perlen das Probenmaterial weniger durch den Einschlag auf der Gefäßoberfläche, als durch die zwischen den Glasperlen und der Probe wirkenden Reibungskräfte zerkleinert und daher bleibt ein nicht unerheblicher Anteil der Probe an der Oberfläche der Glasperlen haften. Bei steigender Anzahl an Glasperlen nimmt gleichzeitig die Oberfläche der Glasperlen zu. Anhaftendes Probenmaterial kann aufgrund der geringen Schlagwirkung der kleinen, leichten Glasperlen nicht wirkungsvoll von der Oberfläche abgelöst werden, sodass das Probenmaterial nicht effektiv vermahlen wird. Bei den Glasperlen mit einem Durchmesser von 4 mm wurden drei Proben

vermahlen und diese jeweils viermal analysiert. Die Ergebnisse zeigen bei allen drei Analysen identische Intensitätsverhältnisse und relative Standardabweichungen von etwa 6%, weswegen diese Glasperlen zur weiteren Verwendung geeignet sind.

Nach der Vermahlung der Probe müssen die Glasperlen aus den Mahlgefäßen entnommen werden. Da sich eine geringere Anzahl an Glasperlen mit größerem Durchmesser leichter aus dem Mahlgefäß entnehmen lässt, weisen diese Glasperlen einen erheblichen Vorteil in der Handhabung im Vergleich zu den kleinen Perlen auf. Auch hier bestätigt sich der Vorteil der großen Mahlkugeln, welche daher für alle weiteren Analysen eingesetzt wurden.

### 4.4.3 Optimierung der Vermahlungsdauer

Nach der Wahl geeigneter Mahlkugeln wurde als nächstes die Vermahlungsdauer optimiert, um eine möglichst homogene Vermahlung zu erhalten. Dafür wurde eine Standardmischung, bestehend aus Raffinose und C<sub>11</sub>-Maltosid, eingesetzt und die Vermahlungsdauer zwischen fünf und dreißig Minuten in Fünf-Minuten-Schritten variiert. Abbildung 21 stellt das Verhältnis der Peakintensität von C<sub>11</sub>-Maltosid zu Raffinose sowie die dazugehörige Standardabweichung in Abhängigkeit der Vermahlungsdauer in Minuten dar.



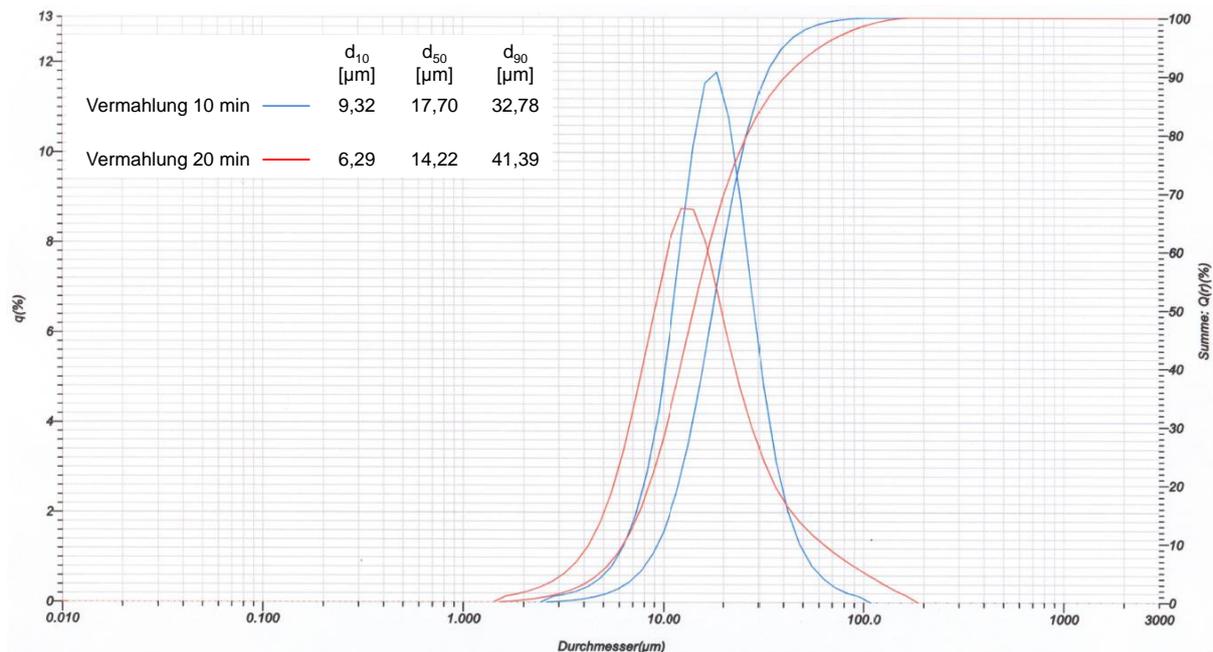
**Abbildung 21:** Intensitätsverhältnis von C<sub>11</sub>-Maltosid zu Raffinose in Abhängigkeit der Vermahlungsdauer

Die Ergebnisse zeigen, dass eine vergleichbare Vermahlung mit relativen Standardabweichungen von etwa sieben Prozent bei einer Vermahlungsdauer von fünf bis fünfzehn Minuten erreicht wird und nach dieser Zeit die relative Standardabweichung auf etwa zwölf Prozent ansteigt. Des Weiteren steigt das Verhältnis der Peakintensität der beiden Substanzen mit zunehmender Vermahlungsdauer stetig an. Das Signal von Raffinose scheint bei längerem Vermahlen abzunehmen, was für eine Zersetzung oder Agglomeration von Raffinose spricht. Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass eine optimale Vermahlung bereits nach fünf Minuten erreicht wird und somit eine längere Vermahlungsdauer nicht notwendig ist.

Zur weiteren Charakterisierung der Vermahlungsbedingungen wurde eine Analyse der Partikelgrößenverteilung mit einem Laser-Streulichtspektrometer durchgeführt. Dafür wurde das Probenmaterial mit einer Vermahlungsdauer von zehn sowie zwanzig Minuten analysiert. Die Vermahlung wurde hierbei jedoch in einem 2-mL-Reaktionsgefäß aus Polypropylen unter Einsatz von zwanzig Mahlkugeln mit einem Durchmesser von 3 mm durchgeführt, da eine deutlich größere Probenmenge für die Analyse der Partikelgrößenverteilung notwendig war. Es wurden insgesamt etwa 500 mg Probe, bestehend aus Matrix und Salz sowie einer geringen Menge an Analyt in das Reaktionsgefäß eingefüllt und mit der Kugelmühle vermahlen. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen Analyt und Matrix sowie Salz dem von realen MALDI-Analysen angepasst.

Abbildung 22 zeigt die graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilung einer vermahlenen Probe nach 10 sowie 20 Minuten Vermahlungszeit. Die Analyse zeigt, dass 50% des Probenmaterials nach einer Vermahlungsdauer von 10 Minuten Korngrößen kleiner  $17,7 \mu\text{m}$  aufweisen und 10% des Materials kleiner als  $9,3 \mu\text{m}$  ist. Wird die Vermahlungsdauer auf 20 Minuten erhöht, kommt es zu einer weiteren Zerkleinerung des Probenmaterials. Es befinden sich nun 50% der Probenmaterials im Größenbereich kleiner  $14,2 \mu\text{m}$  und 10% sind sogar kleiner als  $6,3 \mu\text{m}$ . Demnach

kann durch das Erhöhen der Vermahlungsdauer das Probenmaterial weiter zerkleinert werden. Aus Abbildung 22 ist allerdings auch ersichtlich, dass die Verteilungsbreite bei steigender Vermahlungszeit deutlich zunimmt. Der  $d_{90}$ -Wert gibt an, welche Korngröße 90% des Probenmaterials maximal aufweisen. Nach 10 Minuten Vermahlungszeit besitzt das Probenmaterial einen  $d_{90}$ -Wert von 32,8  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz dazu weist die Probe nach 20 Minuten Vermahlungszeit einen Wert von 41,4  $\mu\text{m}$  auf. Dieses Verhalten lässt sich damit erklären, dass das Probenmaterial zwar weiter zerkleinert wird, aber die entstehenden Grenzflächenkräfte eine Agglomeration des Materials bewirken und die Korngröße der erhaltenen Partikel letztendlich ansteigt. Dieses Verhalten bei längeren Vermahlungen bestätigt sich ebenfalls bei Betrachtung des Probenmaterials. Das Probenmaterial erfährt eine stärkere statische Aufladung, sodass die fein pulverisierte Probe sehr starke Anziehungskräfte von der Gefäßwand oder der restlichen Probe aufweist und sich zusammenlagert.



**Abbildung 22:** Graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilung einer Probe, bestehend aus Matrix, Salz und Raffinose, nach einer Vermahlungszeit von 10 Minuten (blau) und 20 Minuten (rot)

Die Partikelgrößenverteilung wird breiter, was sich schließlich in einer geringeren Homogenität der Probe widerspiegelt. Zur Beschreibung der relativen Breite einer Partikelgrößenverteilung wird die Spanne nach Gleichung 2 berechnet [165]. Für die Probe mit einer Vermahlungszeit von 10 Minuten ergibt sich eine Spanne von 1,33, im Vergleich dazu steigt die Spanne nach einer Vermahlungszeit von 20 Minuten auf 2,47 an. Dies entspricht nahezu einer Verdopplung der Spanne bei doppelter Vermahlungszeit.

$$\text{Spanne} = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Vermahlungsdauer einen sehr großen Einfluss auf die Qualität des Probenmaterials hat und kurze Vermahlungszeiten in geringeren Verteilungsbreiten resultieren. Die Zerkleinerung sowie die Agglomeration des Probenmaterials sind zusätzlich von den Probenbestandteilen, also der eingesetzten Matrix und des Salzes, sowie deren Ausgangskorngrößenverteilung abhängig. Die Ausgangskorngrößenverteilung der Substanzen kann sich je nach eingesetzter Matrix oder eingesetztem Salz deutlich voneinander unterscheiden [170]. Daher können manche Substanzen nach der Vermahlung deutlich geringere Korngrößen aufweisen, bei anderen wiederum kann eine Agglomeration schneller einsetzen, weswegen unterschiedliche Breiten in der Partikelgrößenverteilung erhalten werden [170, 171]. Um eine möglichst effektive Vermahlung für unterschiedlichste Proben gewährleisten zu können und eine mögliche Agglomeration des Probenmaterials zu unterbinden, wurde für die Vermahlung eine Vermahlungsdauer bestehend aus 3 Zyklen von jeweils 5 Minuten gewählt. Nach jedem Vermahlungszyklus kann so die an der Gefäßwand anhaftende Probe mit einem Mikrospatel abgelöst werden, sodass das gesamte Probenmaterial im nächsten Vermahlungsschritt erneut homogenisiert werden kann und auf diese Weise sichergestellt ist, dass eine vollständige Vermahlung des Probenmaterials erreicht wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Vermahlung von etwa 20 mg Probenmaterial in den angefertigten Edelstahlgefäßen mit einem Innenvolumen von 0,4 mL durch den Einsatz von Glasperlen mit einem Durchmesser von etwa 4 mm und einer Vermahlungsdauer bestehend aus 3 Zyklen von jeweils 5 Minuten bewerkstelligt werden kann.

### 4.4.4 Anwendung unter optimierten Bedingungen

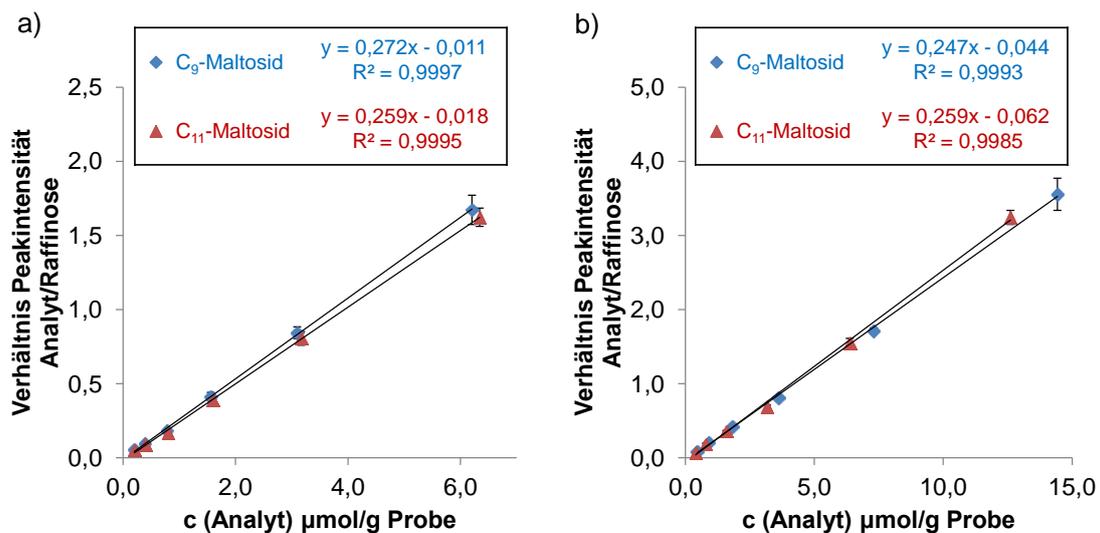
Nachdem die bei einer Vermahlung in einer Kugelmühle wichtigen Parameter, also die Vermahlungszeit und die eingesetzten Mahlkugeln, optimiert wurden, wurde als nächstes die Reproduzierbarkeit dieser Methode untersucht und der Vermahlung in einem Achatmörser mit einem Pistill gegenübergestellt. Dazu wurde jeweils eine Probe in der Kugelmühle und eine in einem Mörser vermahlen. Die Ergebnisse aus Tabelle 8 belegen aufgrund identischer Mittelwerte und Standardabweichungen eine vergleichbare Vermahlung mit beiden Methoden.

**Tabelle 8:** Vergleich der Intensitätsverhältnisse und der zugehörigen Standardabweichungen zwischen der Vermahlung mittels Mörser und Kugelmühle

	<b>Intensitätsverhältnis Analyt / Standard MW (n = 4)</b>	<b>rel. s [%]</b>
<b>Mörser und Pistill</b>	0,68 ± 0,03	4,4
<b>Kugelmühle</b>	0,64 ± 0,04	6,3

Nach erfolgreicher Optimierung aller relevanten Parameter der Kugelmühle wurde die Mühle zur Erstellung von Kalibriergeraden angewandt. Hierfür wurden unterschiedliche Konzentrationen zweier Maltoside als Analyten sowie Raffinose als Standard eingesetzt (Abbildung 23a). Die Analyse der Proben zeigte eine Korrelation zwischen Konzentration und Intensitätsverhältnis von Analyt zu Standard mit

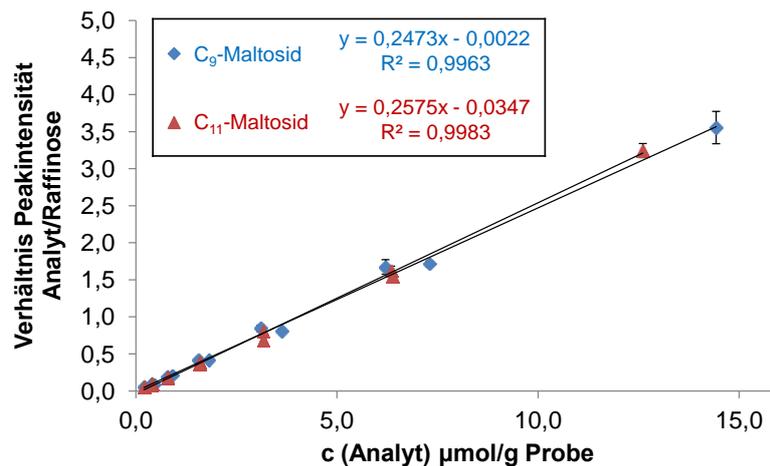
geringen Standardabweichungen und bestätigt so eine hinreichende Homogenisierung der Proben bei der Vermahlung in der Mühle. Die zwei Analyten sind strukturell nahezu identisch, unterscheiden sich lediglich in der Alkylkettenlänge des Fettalkohols, und liefern deshalb vergleichbare Steigungen sowie Ordinatenabschnitte. Des Weiteren wurde ein Korrelationskoeffizient von nahezu eins für beide Geraden erhalten.



**Abbildung 23:** Kalibriergerade von  $n$ -Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid und  $n$ -Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid mit Raffinose als interner Standard und etwa 20 mg der Matrix-Salz-Mischung an zwei Tagen (a) und (b)

Anschließend wurde überprüft, inwiefern dieses Ergebnis an einem anderen Tag reproduziert werden kann (Abbildung 23b). Bei dieser Analyse wurde außerdem die Lösung der Analyten mit der geringsten Konzentration gegen eine Lösung mit höherer Konzentration ausgetauscht, um den Konzentrationsbereich auszuweiten. Ansonsten wurden alle weiteren Bedingungen der Analysen konstant gehalten.

Die Ergebnisse des  $C_9$ - und des  $C_{11}$ -Maltosids sind an beiden Tagen nahezu identisch. Bei der graphischen Darstellung aller Analysenergebnisse in einem Diagramm (Abbildung 24) bleibt der Korrelationskoeffizient nahezu unverändert. Somit führt die Vermahlung in der Kugelmühle auch an verschiedenen Tagen zu aussagekräftigen und reproduzierbaren Ergebnissen.

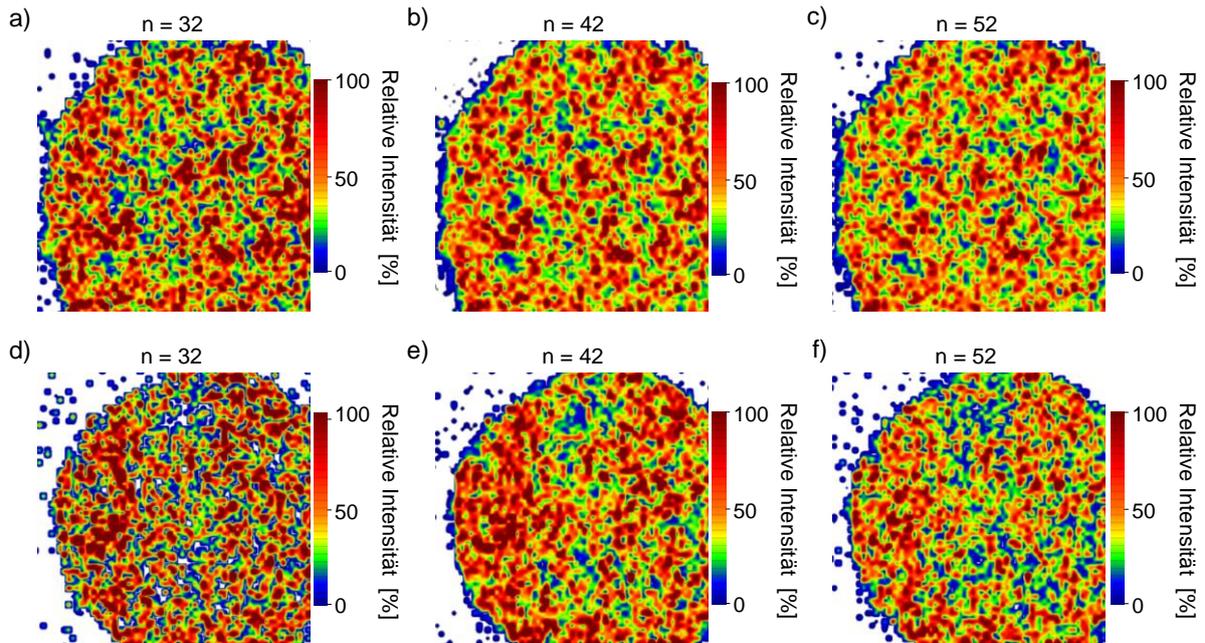


**Abbildung 24:** Kalibriergerade von  $n$ -Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid und  $n$ -Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid mit Raffinose als interner Standard und etwa 20 mg der Matrix-Salz-Mischung (Daten an zwei Tagen aufgenommen)

Eine weitere Möglichkeit zur Beschreibung der Probenhomogenität ist der Einsatz der Imaging-Technik. Dazu wird eine möglichst große Fläche der Probe mit einer meist großen Anzahl an Punkten analysiert, mit den Ortskoordinaten abgespeichert und anschließend die Intensitätsverteilung dieser Fläche graphisch dargestellt. Bei der Auswertung können verschiedene  $m/z$ -Verhältnisse, wie die der Matrix oder des Analyten, ausgewählt werden und die Intensitätsverteilung dieser Substanzen betrachtet werden. Daher eignet sich die Imaging-Analyse als einfache Methode zur Darstellung der Probenhomogenität. Bei der Analyse einer polydispersen Probe lässt sich zusätzlich zeigen, ob die Verteilung der einzelnen Oligomere vergleichbar ist.

Es wurde Polyethylenglycol (PEG 2.000) mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 2.000 Dalton als Analyt ausgewählt und dieses im Anschluss an die zuvor beschriebene Probenvorbereitung mit Hilfe der Imaging-Technik analysiert.

Abbildung 25 zeigt die MALDI-Imaging-Aufnahmen von drei ausgewählten PEG 2.000 Oligomeren aus zwei separat vermahlenden Proben. Aus den Aufnahmen wird deutlich, dass die Verteilung für alle drei Oligomere identisch ist (Abbildung 25a – c). Der Vergleich der beiden Proben ergibt ebenfalls eine vergleichbare Verteilung der einzelnen Oligomere.



**Abbildung 25:** MALDI-Imaging drei verschiedener PEG 2.000 Oligomere von 2 Proben (a) – (c) und (d) – (f) mit einem Polymerisationsgrad von n = 32 (a) und (d), n = 42 (b) und (e) und n = 52 (c) und (f)

Die Zerkleinerung und Homogenisierung in der Kugelmühle Retsch MM liefert homogene Proben hinsichtlich der Verteilung des Matrix-Analyt-Salz-Gemisches als auch der Reproduzierbarkeit an unterschiedlichen Tagen. Des Weiteren wurde die Kugelmühle dahingehend optimiert, dass Mahlbecher mit einem inneren Volumen von 400  $\mu\text{L}$  eingesetzt werden können und damit Probenmengen von 20 mg zugänglich sind.

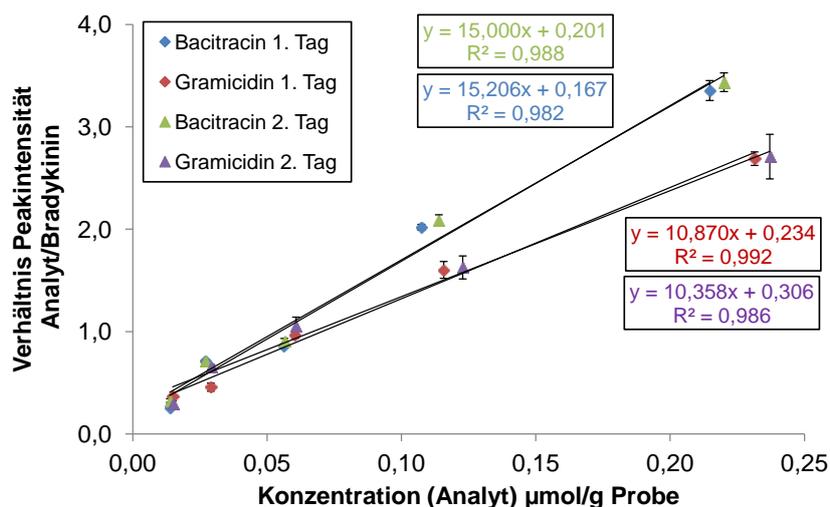
Nachdem mittels MALDI-Imaging-Aufnahmen am Beispiel von synthetischen Polymeren visualisiert werden konnte, dass eine sehr hohe Laserschuss-zu-Laserschuss-Reproduzierbarkeit mit der CS-Technik unter Einsatz einer Kugelmühle erreicht werden kann und die quantitative Analyse von derivatisierten Kohlenhydraten Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,99 hervorbrachte, wird als nächstes das Einsatzgebiet durch die Analyse von Peptiden und Proteinen um den Life-Science-Bereich ausgeweitet.

## 4.5 Analytik von Peptidstandards

### 4.5.1 Quantifizierung niedermolekularer Peptide

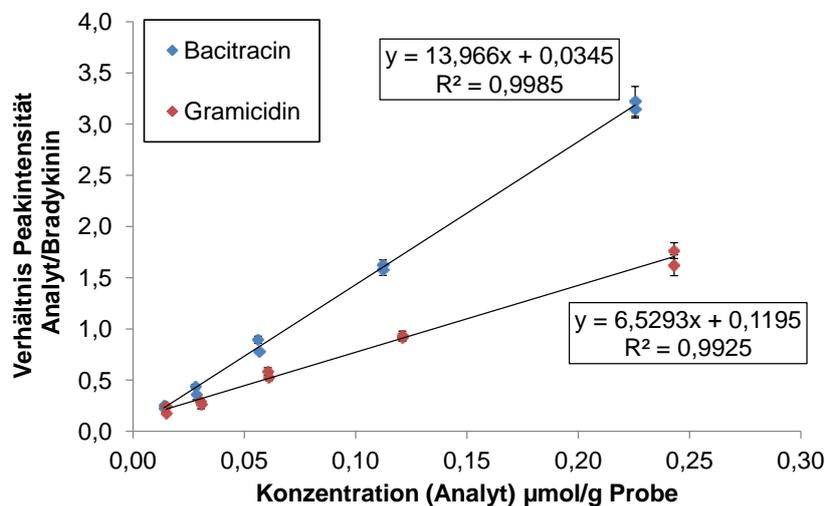
Die MALDI-Massenspektrometrie wurde anfangs zur Analyse von Biomolekülen entwickelt, sodass dieses Gebiet immer noch von großer Bedeutung ist. Daher wird in diesem Abschnitt die Analytik von Peptiden unter Verwendung der zuvor optimierten *Compressed-Sample*-Methode näher betrachtet.

Es wurden drei Peptide unter gleichen Bedingungen an zwei Tagen in der Kugelmühle homogenisiert und daraufhin mit der *Compressed-Sample*-Technik für die MALDI-Analyse vorbereitet. Das Peptid (Bradykinin) mit dem geringsten Molekulargewicht diente dabei als interner Standard. Die graphische Auswertung der Analysen von Bacitracin und Gramicidin an zwei Tagen zeigt Korrelationskoeffizienten zwischen 0,982 und 0,992 (Abbildung 26) und auch die geringen Standardabweichungen weisen auf reproduzierbare Massenspektren hin. Die Steigungen der Kalibriergeraden für beide Peptide sind nicht identisch, da sich die Peptide strukturell unterscheiden und sich daher auch das Desorptions- und das Ionisationsverhalten unterscheiden.



**Abbildung 26:** Kalibriergerade von Bacitracin und Gramicidin mit Bradykinin als interner Standard und etwa 20 mg der vorab unzerkleinerten Matrix Sinapinsäure an zwei Tagen

Bei der in Abbildung 26 dargestellten Auswertung wurde die Matrix Sinapinsäure aus dem Gebinde entnommen und ohne weitere Vorbehandlung für die Analysen verwendet. In der lösungsmittelfreien Probenvorbereitung ist allerdings die Korngrößenverteilung der Ausgangssubstanzen nicht unbedeutend. Wird also die Matrix nicht genügend zerkleinert und Partikelgrößen größer 30 µm erreicht, so verliert die Analyse an Reproduzierbarkeit. Um dieses Problem zu verhindern, kann die Matrix vorab separat zerkleinert werden, sodass die anschließende Probenvorbereitung mit Matrix und Analyt überwiegend für die Homogenisierung der Komponenten verantwortlich ist. Durch die weitere Zerkleinerung der Matrix kann sichergestellt werden, dass die resultierenden Korngrößen im gewünschten Bereich liegen. Abbildung 27 zeigt die graphische Auftragung einer Analyse mit vorab zerkleinerter Sinapinsäure. Die Ergebnisse mit der vorab zerkleinerten Matrix weisen geringere Abweichungen zur Geraden auf und werden daher mit Korrelationskoeffizienten größer 0,9925 beschrieben, was somit den positiven Effekt bei Verwendung der vorab zerkleinerten Matrix bestätigt.



**Abbildung 27:** Kalibriergerade von Bacitracin und Gramicidin mit Bradykinin als interner Standard und etwa 20 mg der vorab zerkleinerten Matrix Sinapinsäure an zwei Tagen

Die Steigungen der Kalibriergeraden unterscheiden sich bei beiden Versuchen stark voneinander. Sowohl Bacitracin als auch Gramicidin weisen bei der Analyse mit vorab zerkleinerter Matrix geringere Steigungen auf. Dies hängt damit zusammen,

dass bei der Analyse mit vorab zerkleinerter Matrix deutlich geringere Laserintensitäten, möglicherweise aufgrund einer geringeren Korngröße des Probenmaterials, zur Analyse notwendig waren und die Laserintensität einen starken Einfluss auf die resultierenden Ergebnisse hat [34]. Zur Auswertung wurde die Intensität des Analyten zum Standard aufgetragen und da die Molekulargewichte der beiden Analyten deutlich größer sind als das des Standards, ist bei höherer Laserintensität eine verstärkte Desorption der Analyten zu erwarten.

Da viele Biomoleküle oftmals bei Raumtemperatur eine begrenzte chemische Stabilität aufweisen, wurde im Anschluss die Stabilität der Peptidproben untersucht. Dafür wurde eine größere Menge der Matrix Sinapinsäure mit drei Peptiden versetzt und anschließend vermahlen. Mit dieser Probenmenge konnten insgesamt 16 Bohrungen des Targets gefüllt werden, sodass zur Analyse 16 Probenspots zur Verfügung standen. Vier der Probenspots wurden am ersten Tag, jeweils vier zu Beginn und am Ende des zweiten Tages und weitere vier Probenspots am dritten Tag analysiert. Tabelle 9 stellt das Verhältnis der Peakintensitäten der beiden Analyten zum Standard Bradykinin in Abhängigkeit der Lagerungszeit mit den zugehörigen Standardabweichungen dar. Die Analysen sind sowohl von Well zu Well als auch von Tag zu Tag reproduzierbar, was anhand der geringen Standardabweichung des Mittelwerts deutlich wird. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst bei Biomolekülen keine Abhängigkeit der Probenqualität von der Lagerungszeit vorliegt. Präparierte Proben können somit ohne Bedenken einen Tag bei Raumtemperatur gelagert werden, um am Folgetag analysiert zu werden.

**Tabelle 9:** Verhältnis der Peakintensität und der zugehörigen Standardabweichung von Bacitracin und Gramacidin zum Standard Bradykinin in Abhängigkeit der Lagerungszeit und Sinapinsäure als Matrix

Tag	Verhältnis Peakintensität (n = 4)			
	Bacitracin / Bradykinin	rel. s [%]	Gramacidin / Bradykinin	rel. s [%]
1	0,85 ± 0,03	3,5	0,66 ± 0,03	4,5
2 (früh)	0,84 ± 0,03	4,1	0,73 ± 0,03	3,5
2 (spät)	0,82 ± 0,04	5,0	0,61 ± 0,03	4,3
3	0,82 ± 0,03	3,9	0,63 ± 0,02	3,9
<b>MW</b>	0,83 ± 0,02	1,8	0,66 ± 0,05	8,0

## 4.5.2 Anwendung auf höhermolekulare Peptide

### 4.5.2.1 Qualitativer Vergleich von CS und DD

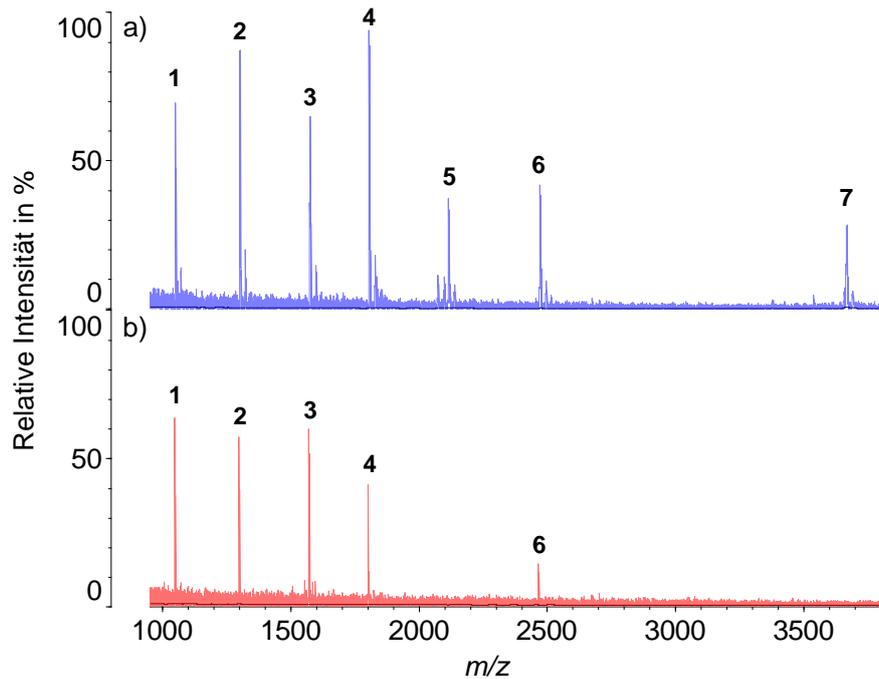
Im Folgenden soll nun die *Dried-Droplet*-Methode mit der *Compressed-Sample*-Technik verglichen werden. Als Analyten dienen dazu sieben nieder- bis höhermolekulare Peptide, welche einen Molekulargewichtsbereich von etwa 1.000 bis 3.700 Dalton abdecken. Die eingesetzten Peptide liegen alle, bis auf das Fragment 7-38 des Adrenocorticotropins (ACTH), in gleicher Konzentration vor. Diese Information ist aus dem Matrix-zu-Analyt-Verhältnis (M/A) ersichtlich, welches für beide Techniken in Tabelle 10 dargestellt ist. Das M/A-Verhältnis ist für alle Analyten größer als eine Million zu eins und unterscheidet sich zwischen beiden Techniken um einen Faktor von etwa 1,5. Bei der DD-Methode fällt das M/A-Verhältnis höher aus, da es aus praktischen Gründen schwer zu realisieren war für beide Techniken gleiche M/A-Verhältnisse zu wählen.

**Tabelle 10:** Übersicht über die sieben eingesetzten Peptide mit Angabe des Molekulargewichts und des molaren Matrix-zu-Analyt-Verhältnisses (M/A) für die DD- und die CS-Technik

Peptid	Molekulargewicht [Da]	DD M/A	CS M/A
1 Angiotensin II	1.046	2.480k : 1	1.586k : 1
2 Angiotensin I	1.296	2.480k : 1	1.586k : 1
3 Glu-1-Fibrinopeptid	1.571	2.480k : 1	1.586k : 1
4 N-Acetyl-Renin Substrat	1.801	2.480k : 1	1.586k : 1
5 ACTH (Fragment 1-17)	2.093	2.480k : 1	1.586k : 1
6 ACTH (Fragment 18-39)	2.466	2.480k : 1	1.586k : 1
7 ACTH (Fragment 7-38)	3.659	1.640k : 1	1.057k : 1

Abbildung 28 zeigt einen qualitativen Vergleich anhand der Massenspektren unter Einsatz der CS- (a) und der DD-Technik (b). Bei der CS-Methode konnten alle sieben Peptide eindeutig zugeordnet werden, während bei der lösungsmittelbasierten Methode (DD) für die beiden Fragmente des Adrenocorticotropins (ACTH) mit den zugehörigen Molekulargewichten von 2.093 und 3.659 Dalton kein Signal im Massenspektrum detektierbar war. Somit können mit der DD-Methode lediglich fünf der sieben Peptide eindeutig zugeordnet werden.

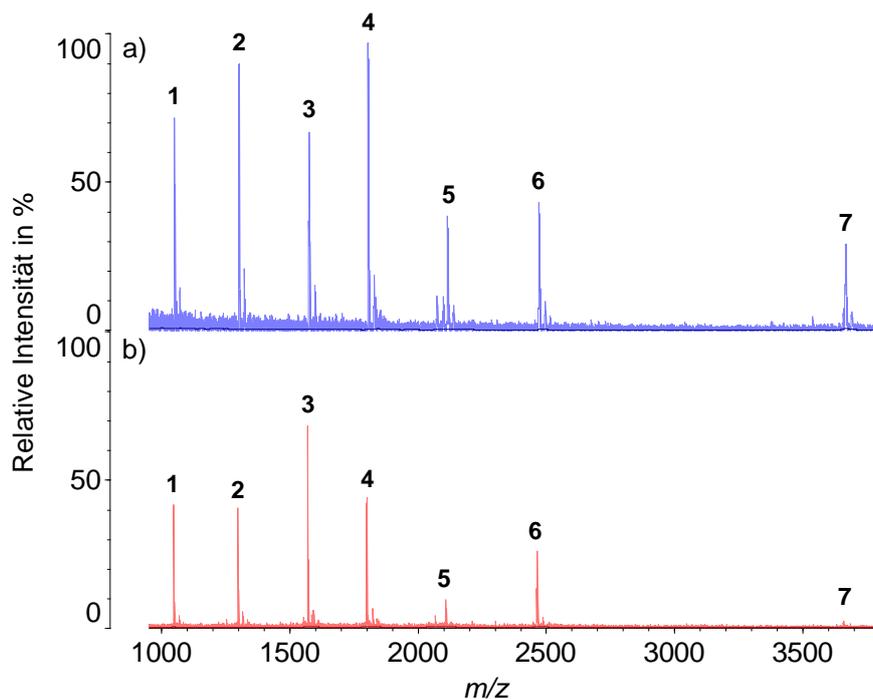
Das Fehlen der beiden Signale kann zum einen durch die bei der DD-Probenauftragung entstandene inhomogene Kristallisation der Probe, also die sogenannten *sweet-spots*, erklärt werden, welche nicht vollständig illuminiert wurden und somit das Ergebnis verfälscht haben. Allerdings wurde bei der Analyse von vier unabhängig voneinander aufgetragenen Proben ein vergleichbares Ergebnis erzielt. Zusätzlich wurde gezielt nach den *sweet-spots* gesucht, wobei die beiden Peptide dennoch nicht detektiert werden konnten.



**Abbildung 28:** Vergleich zwischen der CS- (a) und der DD-Methode (b) anhand der Massenspektren von 7 Peptiden mit HCCA als Matrix

Ein anderer Ansatz zur Erklärung der fehlenden Signale, beruht auf der geringeren Sensitivität der lösungsmittelbasierten Technik im Vergleich zur *Compressed-Sample-Methode*. Allerdings ist die geringere Sensitivität lediglich bei zwei Fragmenten des ACTH zu beobachten. Möglicherweise ist das Fragment 1-17, welches zum Teil auch im Fragment 7-38 enthalten ist, verantwortlich für die geringe Sensitivität bei der DD-Methode.

Für die folgende Messung wurde die Konzentration der Peptide bei der DD-Methode um Faktor 40 erhöht, um so die zuvor fehlenden Signale detektieren zu können. Abbildung 29b stellt das erhaltene Massenspektrum dem der CS-Methode (a) mit der ursprünglichen Konzentration gegenüber. Zwar hat das Rauschen nach Erhöhung der Peptid-Konzentration deutlich abgenommen und die zuvor nicht detektierbaren Fragmente des ACTH können nun zugeordnet werden, allerdings sind die Signale im Vergleich zur CS-Methode bei diesen beiden Peptiden noch immer deutlich kleiner.



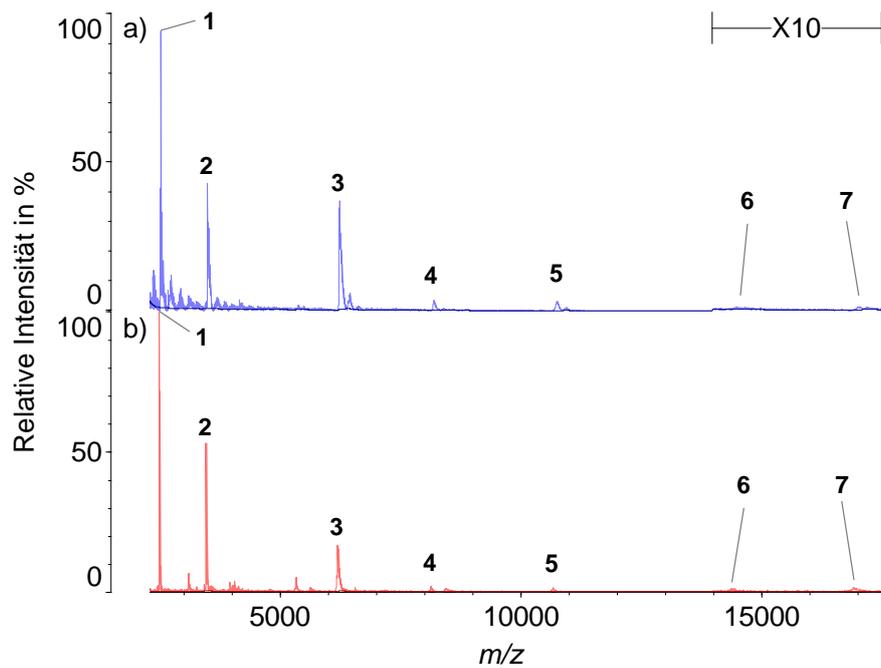
**Abbildung 29:** Vergleich zwischen der CS- (a) und der DD-Methode (b) anhand der Massenspektren von 7 Peptiden mit 40-fach höherer Konzentration bei der DD-Methode mit HCCA als Matrix

Die Analyse einer weiteren Peptid-Mischung mit höheren Molekulargewichten wird im Folgenden beschrieben und soll den Massenbereich ausweiten sowie einen Vergleich zwischen der CS- und der DD-Technik aufzeigen. Diese Mischung, bestehend aus sieben Peptiden mit einer Molekulargewichtsverteilung zwischen 2.400 und 17.500 Dalton, wurde mit beiden Techniken vorbereitet und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Tabelle 11 zeigt die eingesetzte, kommerziell erworbene Peptid-Mischung mit den jeweiligen Molekulargewichten. Es lagen keine Angaben zur Konzentration der einzelnen Peptide vor.

**Tabelle 11:** Übersicht über die sieben eingesetzten Peptide mit Angabe des Molekulargewichts

<b>Peptid</b>	<b>Molekulargewicht [Da]</b>
1 Myoglobin III (Fragment 132-153)	2.510
2 Glucagon	3.480
3 Myoglobin II (Fragment 1-55)	6.210
4 Myoglobin I (Fragment 56-131)	8.160
5 Myoglobin I + III (Fragment 56-153)	10.600
6 Myoglobin I + II (Fragment 1-131)	14.440
7 Myoglobin (Fragment 1-153)	16.950

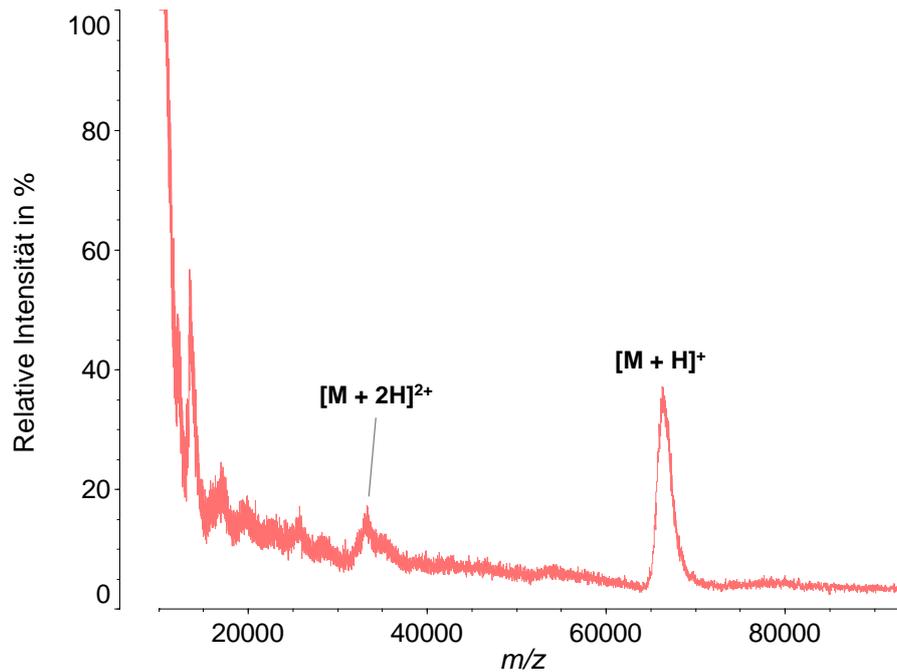
Aus den Massenspektren beider Techniken lassen sich zunächst lediglich fünf der Peptide eindeutig zuordnen (Abbildung 30). Die zwei Peptide mit dem größten Molekulargewicht werden im Massenspektrum erst bei zehnfacher Vergrößerung sichtbar. Dies lässt sich entweder mit der geringeren Sensitivität aufgrund der verminderten Desorption bei höhermolekularen Verbindungen oder mit einer geringeren Konzentration in der Peptid-Mischung erklären. Der Effekt der verminderten Desorption mit zunehmendem Molekulargewicht ist ebenfalls bei den übrigen Peptiden dieser Mischung zu beobachten, da die Signalintensität mit steigendem Molekulargewicht stetig abnimmt. Der Vergleich zeigt jedoch, dass höhermolekulare Peptide der Analyse mit der CS-Technik zugänglich gemacht werden können und hinsichtlich der qualitativen Analyse vergleichbare Ergebnisse mit der DD- und der CS-Methode erzielt werden.



**Abbildung 30:** Vergleich der Massenspektren mit der CS- (a) und der DD-Methode (b) von 7 Peptiden im Molekulargewichtsbereich 2.400 – 17.500 Da

Als nächstes wurde eine einzelne hochmolekulare Verbindung zur Analyse herangezogen, da die höhermolekularen Verbindungen bisher kaum detektierbare Signale lieferten. Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob auch Proteine mit der CS-Technik der Analyse zugänglich gemacht werden können, wurde das Protein Bovin Serum Albumin (BSA) mit einem Molekulargewicht von etwa 66.000 Dalton mit der *Compressed-Sample-Technik* vorbereitet.

Das Massenspektrum in Abbildung 31 zeigt die erfolgreiche Analyse des BSA mit Signalen sowohl für das einfach- als auch für das zweifachgeladene Protein. In der MALDI-Massenspektrometrie werden zwar vorwiegend Einfachladungen erhalten, allerdings treten bei hochmolekularen Verbindungen, insbesondere bei Biomolekülen, ebenfalls Mehrfachladungen auf [87]. Das Massenspektrum zeigt noch weitere Signale, welche allerdings aufgrund des hohen Rauschens im Massenbereich von 10 bis 30 kDa nicht eindeutig zugeordnet werden können.



**Abbildung 31:** Massenspektrum von BSA erzielt mit der CS-Methode und Sinapinsäure als Matrix

Es konnte gezeigt werden, dass die CS-Technik ebenfalls zur Analyse von Proteinen, also hochmolekularen Verbindungen, geeignet ist, wodurch der Anwendungsbereich deutlich vergrößert wird.

#### 4.5.2.2 Einfluss des Lösungsmittels bei der CS-Methode

Lösungsmittelfreie Probenvorbereitungstechniken in der MALDI-MS ermöglichen die Analyse schwer löslicher bzw. unlöslicher Proben und bieten gegenüber den lösungsmittelbasierten Probenvorbereitungstechniken den Vorteil einer deutlich reproduzierbareren Analyse.

Die von HYZAK et al. [109, 137, 152] entwickelte und optimierte *Compressed-Sample*-Methode beinhaltet die lösungsmittelbasierte Analytzugabe, bei welcher ein Aliquot von 5  $\mu\text{L}$  einer hergestellten Analytlösung zu etwa 20 mg der festen Matrix pipettiert wird. Nach kurzer Wartezeit kann die Vermahlung durchgeführt werden, da das geringe Volumen des Lösungsmittels innerhalb kürzester Zeit verdampft. Die lösungsmittelbasierte Analytzugabe ermöglicht den Einsatz sowie die exakte Dosierung geringer Analytmengen.

Bei der Zugabe des gelösten Analyten tritt das Lösungsmittel in Kontakt zur festen Matrix und kann gegebenenfalls auch einen Teil der Matrix lösen, wenn diese im verwendeten Lösungsmittel löslich ist. Beide Komponenten liegen dann zusammen in Lösung vor, sodass der Analyt anschließend beim Kristallisationsprozess in die Matrix eingebettet werden kann. Über die Relevanz der Einbettung des Analyten in den Matrixkristall wird in der Literatur noch immer diskutiert [124, 125, 172, 173].

Die Notwendigkeit der Einbettung des Analyten in den Matrixkristall wurde in Abschnitt 2.5.2 ausführlich betrachtet und ist der Literatur zufolge abhängig von den Verunreinigungen der Probe, von dem Molekulargewicht und der Substanzklasse des Moleküls sowie der Ionisationsart, bei welcher entweder die Protonierung oder die Metall-Adduktbildung bevorzugt wird.

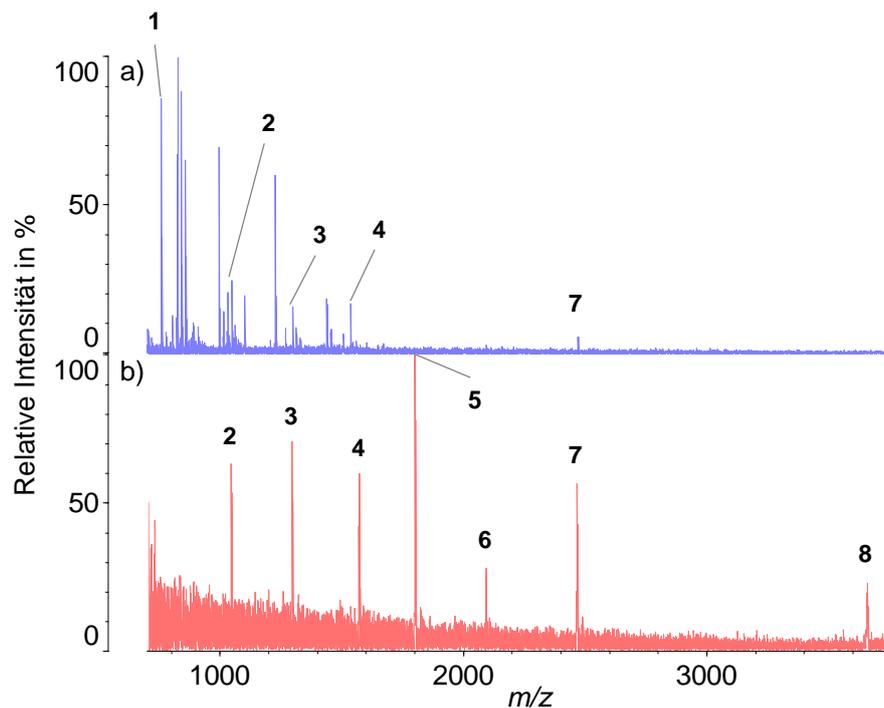
Die lösungsmittelbasierte Analytzugabe bewirkt nun unter Umständen die Einbettung des Analyten in den Matrixkristall. Zusätzlich können dabei Verunreinigungen aus den Kristallen ausgeschlossen werden. Die Einbettung der Analyten in den Matrixkristall sollte jedoch eine Abhängigkeit von dem eingesetzten Lösungsmittel zeigen, da Matrix und Analyt nicht immer im gleichen Lösungsmittel vergleichbare Lösungseigenschaften aufweisen.

Um diese Problematik näher zu untersuchen, wurde deshalb der Einfluss des Lösungsmittels auf die Spektrenqualität bei Einsatz der *Compressed-Sample*-Technik betrachtet. Dazu wurde ein Gemisch aus acht Peptiden mit einem Molekulargewichtsbereich von etwa 700 bis 3.700 Dalton analysiert. Als Lösungsmittel dienten eine wässrige und eine methanolische 0,1% Trifluoressigsäure-Lösung (TFA-Lösung). Die Probenvorbereitung erfolgte nach der CS-Methode mit  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizinsäure als Matrix. In Tabelle 12 sind die Peptide der eingesetzten Mischung unter Angabe der Molekulargewichte, der Konzentrationen und der Matrix-zu-Analyt-Verhältnisse dargestellt. Die Konzentrationen der Peptide liegen alle in einem ähnlichen Bereich, sodass vergleichbare Signalintensitäten aller Peptide erwartet wurden.

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der verwendeten Peptid-Mischung mit Angabe des Molekulargewichts, der Konzentration und des molaren Matrix/Analyt-Verhältnisses

Peptid	Molekulargewicht [Da]	c [pmol/ $\mu$ L]	M/A
1 Bradykinin (Fragment 1-7)	757	16,0	793k : 1
2 Angiotensin II	1.046	8,0	1.586k : 1
3 Angiotensin I	1.296	8,0	1.586k : 1
4 P14R	1.533	8,0	1.586k : 1
5 N-Acetyl-Renin Substrat	1.801	6,4	1.982k : 1
6 ACTH (Fragment 1-17)	2.093	8,0	1.586k : 1
7 ACTH (Fragment 18-39)	2.466	8,0	1.586k : 1
8 ACTH (Fragment 7-38)	3.659	14,4	881k : 1

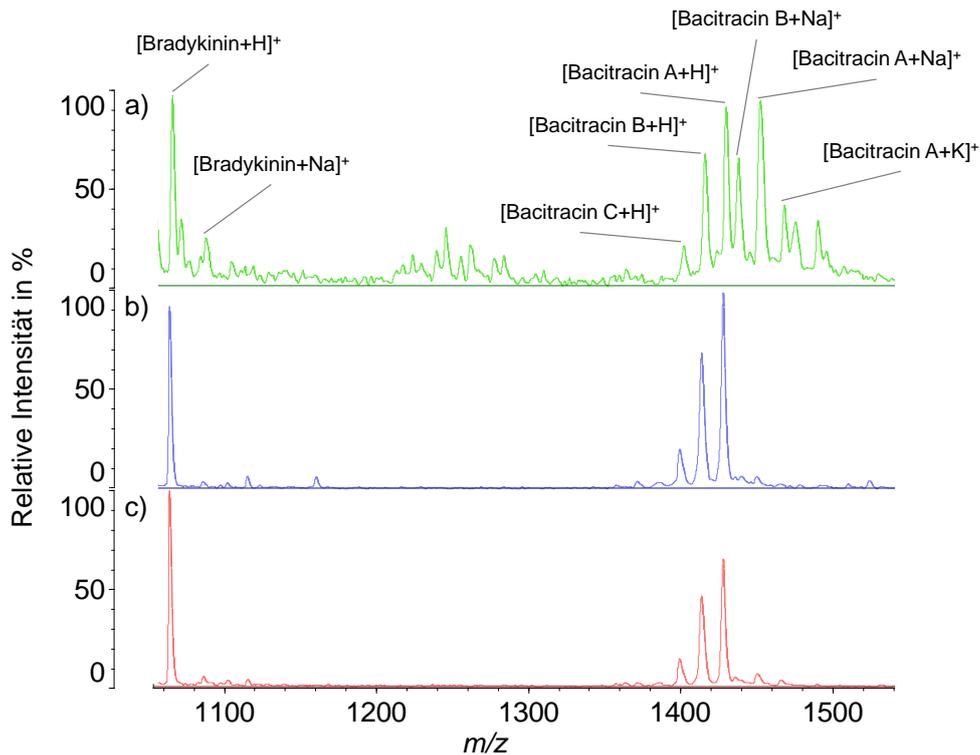
Abbildung 32 zeigt die Massenspektren der Peptid-Mischung, welche aus einer wässrigen Lösung (a) und einer methanolischen Lösung (b) erhalten wurden. Der Vergleich der beiden Massenspektren zeigt große Unterschiede. Aus der wässrigen Lösung können lediglich 5 der 8 Peptide zugeordnet werden, während vor allem im unteren Massenbereich viele nicht identifizierbare Signale zu beobachten sind. Bei diesen Signalen handelt es sich weder um Salzaddukte der Peptide noch um Matrixsignale. Des Weiteren weisen die Verbindungen 3 und 7 lediglich sehr kleine Signale auf. Im Gegensatz dazu wird mit der Probe aus der methanolischen Lösung ein qualitativ höherwertiges Massenspektrum erhalten. Hier sind alle detektierten Signale den eingesetzten Peptiden zuzuordnen. Lediglich das Fragment 1-7 des Bradykinins kann nicht detektiert werden, da das Signal vermutlich durch das starke Rauschen in dem entsprechenden Molekulargewichtsbereich verdeckt wird. Durch den Einsatz von Methanol statt Wasser als Lösungsmittel lässt sich die Spektrenqualität der Analyse somit deutlich erhöhen.



**Abbildung 32:** Massenspektren der Peptid-Mischung gelöst in einer wässrigen (a) und einer methanolischen (b) 0,1% TFA-Lösung mit HCCA als Matrix

In weiteren Analysen wurde mit einer Mischung aus den vier Peptiden Bradykinin und Bacitracin A, B und C überprüft, inwiefern diese Beobachtungen ebenfalls auf andere Biomoleküle übertragbar sind. Hierzu wurden die Peptide in drei unterschiedlichen Lösungsmitteln mit jeweils 0,1% TFA gelöst und zu der Matrix HCCA pipettiert.

Abbildung 33 zeigt die Spektren der Peptid-Mischung, gelöst in wässriger (a), methanolischer (b) und ethanolischer (c) Lösung. In allen Spektren lassen sich die eingesetzten Peptide Bradykinin und Bacitracin A, B und C eindeutig als protonierte Spezies identifizieren. Während bei Verwendung der beiden organischen Lösungsmittel im dargestellten Molekulargewichtsbereich keine weiteren Signale vorkommen, sind im Massenspektrum der wässrigen Lösung zusätzlich die Alkalimetalladdukte der Peptide mit Natrium und Kalium zu beobachten. Die Signale der Salzaddukte erreichen im Vergleich zu den protonierten Verbindungen eine relative Intensität von bis zu 50%, was schließlich in einer geringeren Sensitivität resultiert.



**Abbildung 33:** Massenspektren der Peptide Bradykinin und Bacitracin A, B und C unter Einsatz einer wässrigen (a), methanolischen (b) und ethanolischen (c) 0,1% TFA-Lösung mit HCCA als Matrix

Die Löslichkeit von HCCA in Methanol beträgt 50 mg/mL, in Wasser dagegen lediglich 6 mg/mL [174]. Die Löslichkeit von HCCA in Ethanol ist in der Literatur nicht beschrieben, allerdings ist eine Löslichkeit in Acetonitril (ACN) von 36 mg/mL [174] angegeben. Da der Polaritätsindex nach SNYDER [175] von Ethanol mit 4,3 mit den Polaritätsindices von ACN (5,8) und Methanol (5,1) vergleichbar ist, befindet sich die Löslichkeit von HCCA in Ethanol wahrscheinlich in einem ähnlichen Bereich wie für Methanol und ACN. Es ist somit durchaus wahrscheinlich, dass die Matrixkristalle in den organischen Lösungsmitteln deutlich schneller in Lösung gehen und die Analyten beim Auskristallisieren in die Matrixkristalle eingebettet werden. Aufgrund der geringeren Polarität der Matrix werden bei diesem Prozess ionische Verbindungen wie Salze aus den Matrixkristallen ausgeschlossen. Bei Wasser hingegen findet nahezu keine Einbettung statt und da die Analyten stark mit Salzen kontaminiert sind, ist im Massenspektrum eine Adduktbildung mit den Alkalimetallionen zu beobachten.

Der beschriebene Effekt der Salzadduktbildung in Abhängigkeit unterschiedlicher Lösungsmittel wurde nicht bei allen Wiederholmessungen im gleichen Ausmaß beobachtet. Manche Analysen mit Methanol als Lösungsmittel zeigten zum Teil ebenfalls Alkalimetalladdukte während bei den Analysen mit Wasser als Lösungsmittel die Adduktbildung teilweise weniger stark ausgeprägt war. Dieses Verhalten könnte allerdings damit erklärt werden, dass ein großer Teil der organischen Lösung beim Pipettieren aufgrund der geringen Oberflächenspannung an der Gefäßwand entlang läuft und daher kaum in Kontakt mit der Matrix kommt. Der geringe Siedepunkt von Methanol bzw. Ethanol lässt das Lösungsmittel deutlich schneller verdampfen als Wasser und daher ist hier auch eine geringere Kontaktzeit zur Matrix festzustellen. Wasser bildet aufgrund seiner höheren Oberflächenspannung und Dichte einen großen Tropfen im Zentrum des Gefäßes und steht durch den höheren Siedepunkt eine erheblich längere Zeit mit der Matrix in Kontakt, weshalb trotz der geringeren Löslichkeit ein gewisser Teil der Matrix gelöst werden kann.

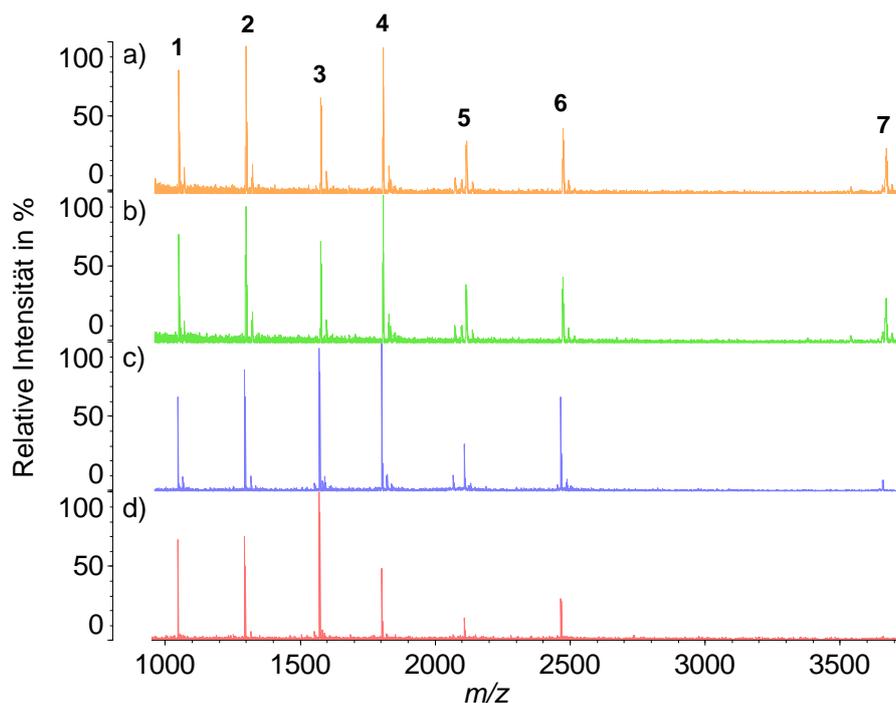
Zusammenfassend geben die Analysen der Peptide mit der *Compressed-Sample-Technik* Aufschluss darüber, dass die Wahl des Lösungsmittels die Qualität der Massenspektren beeinflusst. Es zeigen sich insbesondere Unterschiede bezüglich der Adduktbildung mit den in den Proben enthaltenen Salzen. Bei der zuvor verwendeten Mischung der acht Peptide (Abbildung 32) wurden bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel zwar keine Salzaddukte beobachtet, jedoch war das Resultat eine vollständige Unterdrückung einiger Signale, was vermutlich auf die Komplexität der Probenmischung zurückzuführen ist.

Nach TRIMPIN et al. [134] ist eine Einbettung des Analyten aber eher hinderlich, da für eine erfolgreiche Ionisation des Analyten beim MALDI-Prozess die Kristallstruktur der Matrix zunächst aufgebrochen werden muss, damit der Analyt für die Ionisation zugänglich ist. Das Aufbrechen des Kristalls benötigt jedoch eine höhere Energie, weswegen für einen sanfteren MALDI-Prozess lediglich ein enger Kontakt

zwischen Matrix und Analyt wünschenswert ist. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde nach der Zugabe des gelösten Analyten eine Vermahlung durchgeführt, weswegen keine intakten Matrixkristalle mit den eingeschlossenen Analyten vorliegen sollten. Damit fördert der Einsatz des Lösungsmittels lediglich die Ausbildung eines engen Kontaktes zwischen Matrix und Analyt während die störenden Salze ausgeschlossen werden.

#### 4.5.2.3 Reproduzierbarkeit der Analysen

Nachdem gezeigt wurde, dass Methanol bei der Analyse von Peptiden unter Einsatz der CS-Technik die Ausbildung von Salzaddukten unterdrückt und somit das optimale Lösungsmittel darstellt, wurde als nächstes die Reproduzierbarkeit der Analysen hinsichtlich der Signalintensität unter Anwendung der CS- sowie DD-Methode betrachtet. Es wurden sieben Peptide, welche bereits in Tabelle 10 des Abschnittes 4.5.2.1 beschrieben wurden, jeweils viermal mit beiden Probenvorbereitungstechniken, in Methanol gelöst, präpariert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Abbildung 34 zeigt jeweils zwei der erzielten Massenspektren des Peptid-Gemisches mit der CS-Technik (a und b) und der DD-Technik (c und d). Zur Auswertung wurde das Glu-1-Fibrinopeptid als interner Standard gewählt.



**Abbildung 34:** Massenspektren des Peptid-Gemisches unter Anwendung der CS- (a), (b) und der DD-Technik (c), (d) mit HCCA als Matrix

Tabelle 13 enthält die mit beiden Techniken erhaltenen Mittelwerte (MW) der Peakintensitätsverhältnisse (Analyt/Standard) und die zugehörigen relativen Standardabweichungen der vier Analysen. Die eingesetzten Matrix/Analyt-Verhältnisse der Peptide sind in Tabelle 10 gezeigt. Für die DD-Technik wurde eine um Faktor 40 höhere Peptid-Konzentration gewählt und dadurch eine geringere Laserintensität eingesetzt, da, wie bereits im Abschnitt 4.5.2.1 beschrieben, bei einer geringeren Konzentration nicht alle Peptide detektiert werden konnten.

Aus den Ergebnissen der beiden Techniken wird deutlich, dass die Intensitätsverhältnisse stark voneinander abweichen, was möglicherweise mit der großen Unsicherheit der Ergebnisse der DD-Methode und der unterschiedlichen Empfindlichkeit beider Methoden zusammenhängt. Bei der DD-Methode schwankt die relative Standardabweichung der Analysen in einem Bereich zwischen 12% und 60% mit einer durchschnittlichen Standardabweichung von 42%. Im Vergleich dazu wird bei Anwendung der CS-Methode eine durchschnittliche relative Standardab-

weichung von nur 9% erzielt, wobei die Werte lediglich zwischen 6% und 11% schwanken.

**Tabelle 13:** Verhältnis der Peakintensitäten der Peptide zum Standard Glu-1-Fibrinopeptid mit der zugehörigen relativen Standardabweichung erzielt mit der CS- und der DD-Technik

Peptid	Molekulargewicht [Da]	DD MW (n = 4)	DD rel. s [%]	CS MW (n = 4)	CS rel. s [%]
1 Angiotensin II	1.046	0,68 ± 0,08	12	1,23 ± 0,13	11
2 Angiotensin I	1.296	0,75 ± 0,13	17	1,37 ± 0,12	9
3 Glu-1-Fibrinopeptid	1.571	Interner Standard			
4 N-Acetyl-Renin Substrat	1.801	0,77 ± 0,25	32	1,35 ± 0,15	11
5 ACTH (Fragment 1-17)	2.093	0,21 ± 0,09	43	0,57 ± 0,05	9
6 ACTH (Fragment 18-39)	2.466	0,48 ± 0,18	38	0,63 ± 0,06	10
7 ACTH (Fragment 7-38)	3.659	0,05 ± 0,03	60	0,48 ± 0,03	6

Die Peptide weisen Unterschiede in der Polarität und im Molekulargewicht auf. Daraus ergibt sich bei der DD-Probenaufgabe ein unterschiedliches Verhalten im Kristallisationsprozess der einzelnen Peptide, sodass keine homogene Verteilung der Peptide auf dem Probenträger erhalten wird, was letztendlich zu der beobachteten Unsicherheit der Ergebnisse führt. Bei der *Compressed-Sample*-Technik hingegen hat die Kristallisation keinen Einfluss auf die Analysen und führt zu reproduzierbaren Ergebnissen.

Als nächstes wurde unter Verwendung der DD-Technik die Analyse der gleichen Peptid-Mischung unter Einsatz eines größeren Laserrasters wiederholt. Durch die Erhöhung der Anzahl an Laserpositionen bei Verwendung der *Dried-Droplet*-Technik wird meist die Standardabweichung verringert, da bei kleinen Laserrastern möglicherweise kein repräsentativer Ausschnitt der gesamten Probe erfasst wird und damit der Analysenfehler steigt.

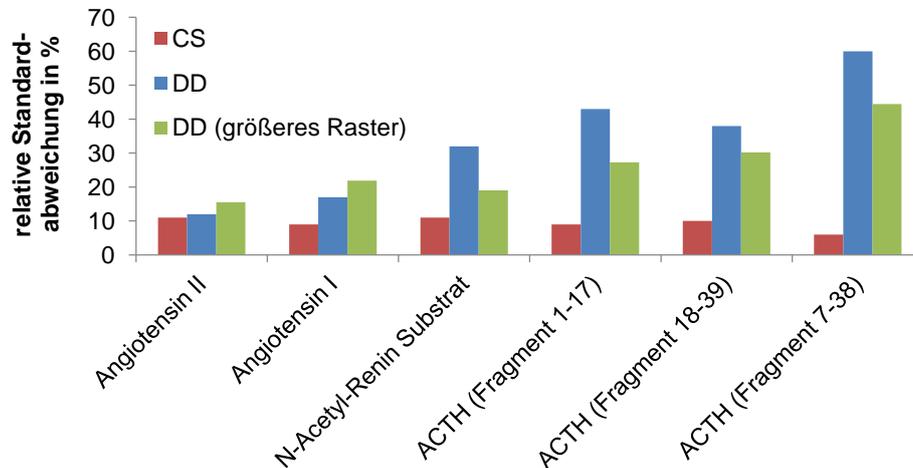
Ein Vergleich mit den zuvor erzielten Ergebnissen zeigt, dass die Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse immer noch sehr stark voneinander abweichen und die relativen Standardabweichungen in einem ähnlichen Bereich liegen (Tabelle 14). Somit hat in diesem Fall die Anzahl der vom Laser illuminierten Positionen keinen Einfluss auf die Sicherheit der Ergebnisse. Dies verdeutlicht erneut den Vorteil der CS-Methode auch bei Biomolekülen.

**Tabelle 14:** Verhältnis der Peakintensität der Peptide zum Standard Glu-1-Fibrinopeptid mit der zugehörigen relativen Standardabweichung erzielt mit der DD-Technik unter Einsatz eines größeren Laserrasters

Peptid	MW (n = 4)	rel. s [%]
1 Angiotensin II	0,58 ± 0,09	16
2 Angiotensin I	0,73 ± 0,16	22
3 Glu-1-Fibrinopeptid	Interner Standard	
4 N-Acetyl-Renin Substrat	1,47 ± 0,28	19
5 ACTH (Fragment 1-17)	0,33 ± 0,09	27
6 ACTH (Fragment 18-39)	0,96 ± 0,29	30
7 ACTH (Fragment 7-38)	0,09 ± 0,04	44

Für eine genauere Fehlerbetrachtung wurden die relativen Standardabweichungen aller erzielten Ergebnisse in Abhängigkeit der Peptide in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 35). Aus den Ergebnissen wird die starke Abhängigkeit der relativen Standardabweichung vom eingesetzten Peptid sichtbar. Während bei Angiotensin II, also dem Peptid mit dem geringsten Molekulargewicht, bei allen Versuchsreihen nahezu vergleichbare Werte erzielt werden, steigen bei der lösungsmittelbasierten Technik die relativen Standardabweichungen mit zunehmendem Molekulargewicht stark an. Dies kann mit einem unterschiedlichen Verhalten im Kristallisationsprozess bei der DD-Probenaufgabe begründet werden.

Je größer der strukturelle Unterschied zwischen Standard und Analyt ist, desto mehr unterscheidet sich der Kristallisationsprozess der Verbindungen, sodass keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden können.



**Abbildung 35:** Auftragung der relativen Standardabweichung für 7 Peptide erzielt mit der CS- und der DD-Technik bei unterschiedlichen Bedingungen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die DD-Technik zur quantitativen Analyse von Peptiden aufgrund der großen Unsicherheit der Ergebnisse nicht geeignet ist, obwohl Peptide sich in ihrem chemischen Aufbau sehr ähnlich sind und lediglich die Seitenketten der Aminosäuren unterschiedlich sein können. Trotz der Analyse eines engen Molekulargewichtsbereiches und der Verwendung eines internen Standards konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden. Auch die Vergrößerung des Laserrasters lieferte Ergebnisse mit vergleichbarer Unsicherheit. Die Verwendung der CS-Technik zeigt dagegen bei der Analyse der gleichen Mischung keine Abhängigkeit vom Molekulargewicht und so werden auf diese Weise reproduzierbare Analysen mit relativen Standardabweichungen von maximal 11% erhalten. Nachfolgend wird deshalb die Reproduzierbarkeit der Analysen unter Verwendung der CS-Technik zur Analytik größerer Peptide untersucht.

Um auch die Reproduzierbarkeit der Analyse eines höhermolekularen Peptids zu untersuchen, wurden die zwei Peptide Bradykinin und Insulin, welche sich im

Molekulargewicht um den Faktor fünf unterscheiden, eingesetzt. Tabelle 15 zeigt die Zusammensetzung der Peptid-Mischung mit den eingesetzten Konzentrationen, welche experimentell angepasst wurden, sodass für beide Peptide vergleichbare Peakintensitäten erzielt werden. Bei äquimolaren Mengen weist Insulin eine deutlich geringere Peakintensität auf, was vermutlich durch das höhere Molekulargewicht und den damit verbundenen schlechteren Desorptionseigenschaften verursacht wird. Des Weiteren steigt die Isotopenverteilung mit steigender Anzahl an Kohlenstoffatomen im Molekül, was bei Insulin bereits ein deutlich breiteres Signal verursacht.

**Tabelle 15:** Zusammensetzung der Peptid-Mischung aus Bradykinin und Insulin

Peptid	Molekulargewicht [Da]	c [mg/mL]	c [ $\mu\text{mol/mL}$ ]
Bradykinin	1.060	0,090	0,085
Insulin	5.808	2,181	0,376

Insgesamt wurden sechs Proben an zwei Tagen vermahlen und jede Probe jeweils viermal analysiert. Das Massenspektrum zeigt von Bradykinin lediglich die einfach protonierte Spezies und von Insulin zusätzlich noch das zweifach protonierte Ion (Abbildung 54, Abschnitt 8.1). Durch die Anwesenheit von zwei unterschiedlich geladenen Ionen bei Insulin sinkt die Sensitivität für diesen Analyten. Dies wird allerdings durch die im Vorfeld angepasste Konzentration kompensiert.

Das Verhältnis der Intensität sowie der Peakfläche zum Bradykinin (Standard) wurde für beide Insulin-Signale berechnet und in Tabelle 33 (Abschnitt 8.2) zusammengestellt. Da die Verhältnisse für beide Signale bei allen sechs Analysen konstant sind, wurde zur Auswertung lediglich die Peakintensität sowie die Peakfläche der einfach geladenen Ionen in Relation gesetzt und die zugehörigen Standardabweichungen bestimmt (Tabelle 16).

Bei den Intensitäten zeigen vier der sechs Proben eine relative Standardabweichung kleiner 5%, während der Mittelwert aller Analysen eine relative Abweichung von 9% aufweist. Das breitere Signal des Insulins, welches durch die Isotopenverteilung hervorgerufen wird, verursacht bei der Auswertung einen größeren Analysenfehler im Vergleich zu einem schmalen, isotopenaufgelösten Signal, weswegen zusätzlich die Peakflächenverhältnisse bestimmt wurden. Die Auswertung liefert allerdings ähnliche Ergebnisse, sodass eine Auswertung sowohl über die Intensitäten als auch über die Flächen möglich erscheint. Mit einer relativen Standardabweichung von maximal 11,7% für das Intensitätsverhältnis und 13,3% für das Peakflächenverhältnis belegen die Ergebnisse eine ausreichende Reproduzierbarkeit unter Einsatz der CS-Technik zur Analyse von Peptiden mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Zur weiteren Charakterisierung der CS-Technik wurde der Molekulargewichtsbereich zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit ausgeweitet.

**Tabelle 16:** Auswertung der Peakintensität (I) sowie der Peakflächen (A) von Insulin (Ins) zu Bradykinin (Brad) aus 6 unterschiedlichen Probenpräparationen an 2 Tagen

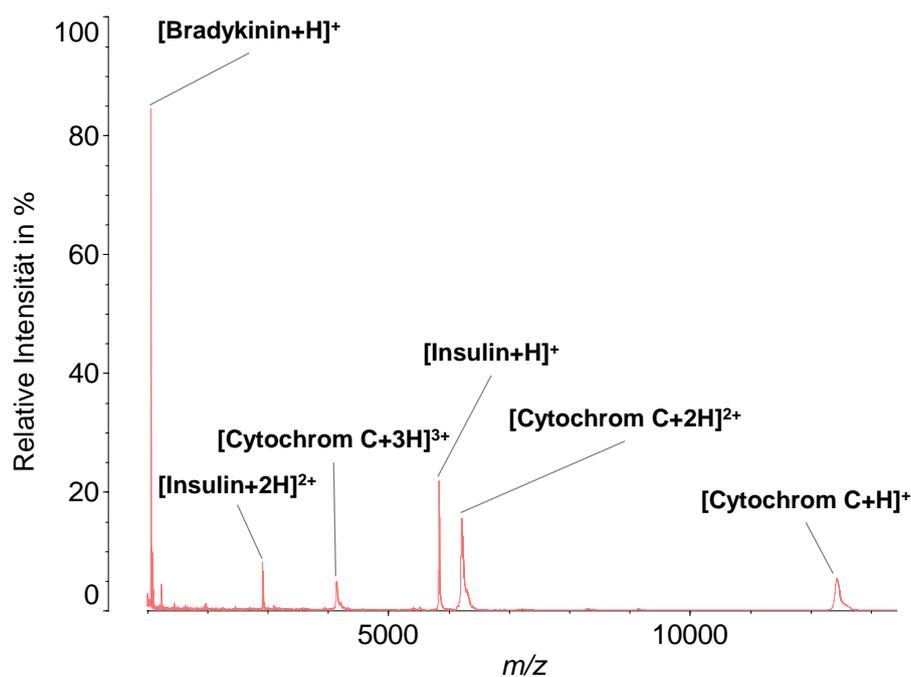
<b>Probe</b>	<b>I (Ins) / I (Brad) (n = 4)</b>	<b>rel. s [%]</b>	<b>A (Ins) / A (Brad) (n = 4)</b>	<b>rel. s [%]</b>
1a	0,86 ± 0,08	9,3	3,39 ± 0,42	12,4
1b	0,77 ± 0,09	11,7	2,79 ± 0,23	8,2
1c	0,78 ± 0,01	1,3	2,71 ± 0,36	13,3
2a	0,77 ± 0,03	3,9	2,74 ± 0,05	1,8
2b	0,74 ± 0,03	4,1	2,56 ± 0,04	1,6
2c	0,69 ± 0,03	4,3	2,35 ± 0,02	0,9
<b>MW</b>	0,77 ± 0,02	3,0	2,76 ± 0,14	5,2

Es wurde nun der Mischung der beiden Peptide Cytochrom C, welches ein Molekulargewicht von etwa 12 kDa aufweist, zugesetzt. Die Konzentration wurde in

Vorversuchen so angepasst, dass alle drei Peptide eine vergleichbare Peakfläche ergeben. Es wurde die Peakfläche betrachtet, da die Signale mit steigendem Molekulargewicht breiter und flacher werden, sodass bei Analyten mit stark unterschiedlichem Molekulargewicht der Vergleich der Peakintensität stärker fehlerbehaftet ist. Tabelle 17 enthält Angaben zum Molekulargewicht der Peptide und zu den eingesetzten Konzentrationen. Abbildung 36 zeigt das Massenspektrum dieser Mischung, in welchem ebenfalls die mehrfach geladenen Spezies von Insulin und Cytochrom C zu erkennen sind.

**Tabelle 17:** Zusammensetzung der Peptid-Mischung aus Bradykinin [176, 177], Insulin [178, 179] und Cytochrom C [180, 181] unter Angabe des Molekulargewichts, der Aminosäureanzahl und der Konzentration

Peptid	Molekulargewicht [Da]	Anzahl Aminosäuren	c [mg/mL]	c [μmol/mL]
Bradykinin	1.060	9	0,151	0,143
Insulin	5.808	51	0,380	0,064
Cytochrom C	12.384	104	4,283	0,366



**Abbildung 36:** Massenspektrum der Peptid-Mischung bestehend aus Bradykinin, Insulin und Cytochrom C mit HCCA als Matrix

Die Auswertung der Peakflächenverhältnisse der vier Proben, welche an verschiedenen Tagen analysiert wurden, ist in Tabelle 18 zusammengestellt. Die Analysen zur Well-zu-Well-Reproduzierbarkeit weisen eine relative Standardabweichung von bis zu 67% auf. Ein vergleichbares Ergebnis zeigen die Analysen von Probe zu Probe an verschiedenen Tagen. Die geringsten Abweichungen treten bei der Auswertung von Cytochrom C mit Insulin auf, was vermutlich mit dem geringsten Unterschied im Molekulargewicht begründet werden kann. Die beiden Peptide weisen vermutlich keine großen Unterschiede in ihrem chemischen Verhalten auf, da die Aminosäuresequenz aufgrund der Vielzahl enthaltener Aminosäuren statistisch betrachtet vergleichbar ist. Während Insulin nahezu fünf Mal mehr Aminosäuren enthält als Bradykinin, liegt zwischen Insulin und Cytochrom C lediglich ein Faktor von etwa zwei. Daher sind auch größere Unterschiede im Ionisationsverhalten zwischen Bradykinin und Insulin wahrscheinlich.

**Tabelle 18:** Verhältnisse der Peakflächen von Bradykinin (Brad), Insulin (Ins) und Cytochrom C (Cyto) von 4 Proben an verschiedenen Tagen

Probe	A (Ins) / A (Brad) (n = 4)	rel. s [%]	A (Cyto) / A (Brad) (n = 4)	rel. s [%]	A (Cyto) / A (Ins) (n = 4)	rel. s [%]
1	1,01	29	1,18	40	1,14	13
2	0,99	11	0,98	11	0,99	8
3	1,69	49	2,41	67	1,33	22
4	1,13	31	1,52	42	1,31	12

Selbst die zuvor beschriebene Reproduzierbarkeit der Peakflächenverhältnisse von Insulin zu Bradykinin ist in dieser Mischung, die zusätzlich Cytochrom C enthält, nicht mehr gegeben. Bei der Analyse der Proben wurde außerdem eine starke Schwankung des Totalionenstroms beobachtet, was durchaus ein Grund für die geringe Reproduzierbarkeit sein könnte. Möglicherweise beeinflussen sich die

Analyten durch das eingebrachte Cytochrom C beim Desorptions- bzw. Ionisationsprozess gegenseitig oder aber die Reproduzierbarkeit wird durch die Anwesenheit von Salzen reduziert. Die Salze können einen Einfluss auf die Bildung der protonierten Molekülonen haben, weswegen je nach Größe und Polarität des Moleküls das Signal unterschiedlich stark unterdrückt wird. Cytochrom C wird im Vergleich zu den anderen beiden Peptiden in einer deutlich höheren Konzentration eingesetzt, sodass Verunreinigungen einen erheblichen Einfluss auf die Ionisation haben können. Der Hersteller gibt für Cytochrom C eine Reinheit von mindestens 95% an, jedoch werden keine Angaben zum restlichen Gehalt gemacht. Es ist allerdings sehr wahrscheinlich, dass ebenfalls Alkalimetallionen enthalten sind. Daher wurden Versuche zur Entsalzung der Proben unternommen, um so eine eventuelle Verbesserung der Reproduzierbarkeit zu erzielen.

### 4.5.2.4 Optimierung der Analysen durch Entsalzen

Zur Entsalzung von Biomolekülen stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung. Ein zeitsparendes und bereits in der MALDI-Massenspektrometrie etabliertes Verfahren stellt die Entsalzung mit ZipTip®-Pipettenspitzen dar [93, 96]. Dazu werden Pipettenspitzen mit einer geringen Menge eines Umkehrphasenmaterials gefüllt und nach einer Konditionierung mehrfach mit der wässrigen Probe benetzt. Dadurch wird der Analyt an das Phasenmaterial adsorbiert und durch das Spülen mit Wasser von Salzen und weiteren polaren Bestandteilen befreit. Im letzten Schritt wird die Pipettenspitze mehrfach mit einer Elutionslösung, die einen hohen organischen Anteil enthält, gespült, um die Analyten vom Phasenmaterial zu desorbieren.

Für das Entsalzen der Peptide wurden die ursprünglich eingesetzten Proben mit den in Tabelle 17 angegebenen Konzentrationen um den Faktor zehn verdünnt, um einer Überladung des Phasenmaterials der ZipTip®-Pipettenspitzen vorzubeugen und so die Diskriminierung zwischen Peptiden mit unterschiedlicher Affinität zum Phasenmaterial zu verhindern. Die Ergebnisse der Peakflächenverhältnisse, die von

86

zwei entsalzten und im Anschluss vermahlene Proben erhalten wurden, sind in Tabelle 19 dargestellt.

**Tabelle 19:** Verhältnisse der Peakflächen von Bradykinin (Brad), Insulin (Ins) und Cytochrom C (Cyto) von zwei entsalzten Proben

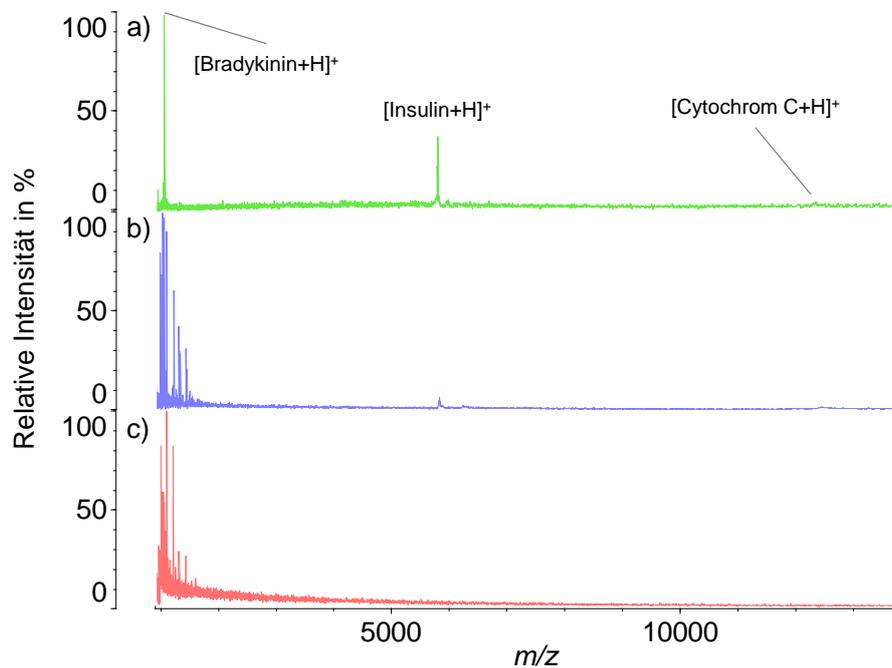
Probe	A (Ins) / A (Brad) (n = 4)	rel. s [%]	A (Cyto) / A (Brad) (n = 4)	rel. s [%]	A (Cyto) / A (Ins) (n = 4)	rel. s [%]
1	0,74	1,4	1,07	6,6	1,45	6,2
2	0,90	6,7	1,08	10,2	1,20	4,2

Die Analysen wurden an zwei Tagen durchgeführt und zeigen, dass die Reproduzierbarkeit von Well zu Well mit einer maximalen relativen Standardabweichung von etwa 10% deutlich verbessert wurde.

Es wurden noch weitere Proben vermahlen und massenspektrometrisch untersucht, jedoch ergaben die Massenspektren entweder Signale mit sehr geringen Signalintensitäten oder es wurden im Molekulargewichtsbereich zwischen 1.000 und 1.500 Dalton viele Signale beobachtet, welche jedoch nicht zugeordnet werden konnten. Daher ließen sich aus diesen Proben nur zwei Analysen auswerten, womit jedoch keine eindeutige Aussage über die Reproduzierbarkeit von Probe zu Probe getroffen werden kann.

Eine unzureichende Adsorption bzw. Desorption der Analyten am Phasenmaterial der ZipTip®-Pipettenspitzen kann als Ursache für die geringen Signalintensitäten ausgeschlossen werden, da bei der Elution der Probe vom Phasenmaterial eine schwach braun gefärbte Lösung erhalten wurde, was ein Indiz für das Vorhandensein von Cytochrom C darstellt. Zudem konnten durch eine Analyse der entsalzten Probe mit der DD-Probenaufgabe alle zu erwartenden Signale zugeordnet werden (Abbildung 37a). Es ist daher wahrscheinlich, dass die durch die Reibung

entstehende Wärme bei der Vermahlung die Peptide zersetzt, was sich in zusätzlichen Signalen im Massenspektrum äußert.



**Abbildung 37:** Massenspektren der Peptid-Mischung aus Bradykinin, Insulin und Cytochrom C nach der Entsalzung mit ZipTip®-Pipettenspitzen. Analyse der Probe mit der DD-Technik (a), der vermahlenden Probe mit der CS-Technik (b) und der vermahlenden Probe mit der DD-Technik (c) mit HCCA als Matrix

Zur weiteren Untersuchung wurde ein Teil der entsalzten Probe vermahlen und im Anschluss mit der CS- sowie der DD-Probenaufgabe analysiert. Die Massenspektren aus Abbildung 37 zeigen, dass in den Spektren der vermahlenden Probe sowohl mit der CS- als auch der DD-Technik (b und c) nur geringe Signale der drei eingesetzten Peptide zu beobachten sind. Allerdings können im Molekulargewichtsbereich zwischen 1.000 und 1.500 Dalton viele zusätzliche nicht identifizierbare Signale beobachtet werden. Die Peptide scheinen somit nach der Entsalzung keine ausreichende Stabilität mehr für die Vermahlung zu besitzen und werden infolgedessen zerstört. Eine Lösung für dieses Problem könnte der Einsatz einer Kryomühle sein, bei welcher die Proben vor und während der Vermahlung mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden, wodurch die thermische Belastung auf die Peptide deutlich reduziert wird.

Zusammenfassend zeigten die Analysen der Peptide und der Proteine das große Potential der CS-Technik hinsichtlich qualitativer und quantitativer Fragestellungen. Die Ergebnisse belegten mit Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,99 und relativen Standardabweichungen von maximal 11% die hohe Reproduzierbarkeit dieser Technik, wohingegen der Vergleich zur DD-Technik mit relativen Standardabweichungen von 60% zeigt, dass hier selbst die Analyse chemisch verwandter Moleküle keine verlässlichen Aussagen zulässt. Der Anwendungsbereich der CS-Technik wird daher im Folgenden auf Realproben ausgeweitet.

## **4.6 Analytik von Realproben**

### **4.6.1 Systematische Untersuchungen zur Analyse von Kohlenhydraten**

In Kosmetika werden Peptidextrakte und Peptidhydrolysate in Lösung oder in getrockneter Form eingesetzt. Zur Trocknung der Biomoleküle findet meist eine Sprühtrocknung in Verbindung mit Kohlenhydraten, welche als stabilisierende Adjuvantien dienen, Verwendung. Daher ist es nötig eine Methode zu entwickeln, bei welcher sowohl die Peptide als auch die zugesetzten Maltodextrine ohne gegenseitige Beeinflussung analysiert werden können.

Zunächst sollen die Kohlenhydrate betrachtet und durch ein Screening die optimalen Parameter ermittelt werden. Für eine MALDI-Analyse unter optimalen Bedingungen werden verschiedene Matrices, Salze und TFA-Konzentrationen mit der *Dried-Droplet*-Technik untersucht und von jeder Kombination zwei MALDI-Massenspektren aufgezeichnet.

Kohlenhydrate werden in der MALDI-Massenspektrometrie unter Adduktbildung mit Alkalimetallionen ionisiert. Durch Zugabe eines Alkalimetallsalzes wird die Ionisation gefördert und meistens auch nur das Signal des gewünschten Adduktes erhalten. Um die Bildung von Salzaddukten aktiv zu beeinflussen, wurde das Target

zunächst mit einer 0,1 molaren Salzlösung vorbeschichtet. Der Einsatz von Trifluoressigsäure (TFA) ist zur Analytik von Kohlenhydraten nicht notwendig, allerdings kommt TFA in der Peptid- und Proteinanalytik zur Protonierung der Analyten zum Einsatz. Daher wird zusätzlich der Einfluss von TFA auf die Analytik von Kohlenhydraten untersucht. Aus der Variation der in Tabelle 20 angegebenen Komponenten wurden 45 Kombinationen erhalten. Die Analytkonzentration sowie die Geräteeinstellungen wurden dabei konstant gehalten.

**Tabelle 20:** Übersicht über die eingesetzten Matrices, die Salze und die TFA-Konzentrationen

Matrix	Salz	TFA
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	ohne	ohne
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (HCCA)	NaCl	0,1
3,4-Diaminobenzophenon (DABP)	KCl	0,5
Sinapinsäure (SA)	-	-
2',4',6'-Trihydroxyacetophenon (THAP)	-	-

Zur Auswertung wurde die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) herangezogen. Ziel der Hauptkomponentenanalyse ist es, viele Messgrößen (Variablen) zu möglichst wenigen Hauptkomponenten (*principal components*, PC) zusammenzufassen und so die Datenmenge zu reduzieren. Eine Achsentransformation bestimmt die Hauptkomponenten, die ein neues Koordinatensystem darstellen, in welchem für jedes Objekt neue Koordinaten berechnet und als *Scores* bezeichnet werden. Um zu bestimmen, wie groß der Beitrag für jede Hauptkomponentenachse ist, werden sogenannte *Loadings* berechnet. Ein großer Beitrag zur Hauptkomponente resultiert somit in hohen Werten für die *Loadings*. Da die Matrix und das Salz zu Kategorievariablen gezählt und diese nicht schrittweise verändert werden können, kann kein faktorieller Teilversuchsplan angewendet

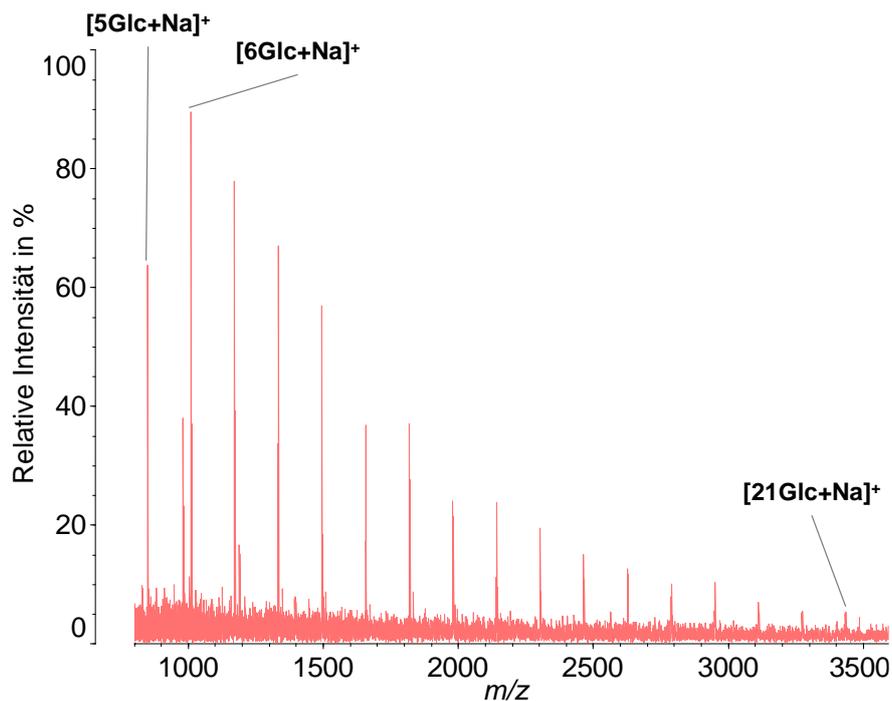
werden. Für das Screening wurde daher ein *full factorial design* gewählt, bei welchem zunächst alle Kombinationen gemessen werden müssen.

Zur Auswertung wurden folgende Messgrößen aus den Massenspektren bestimmt:

- S/N-Verhältnis (Signal Hexasaccharid)
- Auflösung (Signal Hexasaccharid)
- Anzahl sichtbarer Signale mit unterschiedlichen Glucoseeinheiten
- Salzverteilung (Bewertung mit 1-3)
  - 1: zwei große Verteilungen
  - 2: eine große und eine kleine Verteilung
  - 3: eine Verteilung

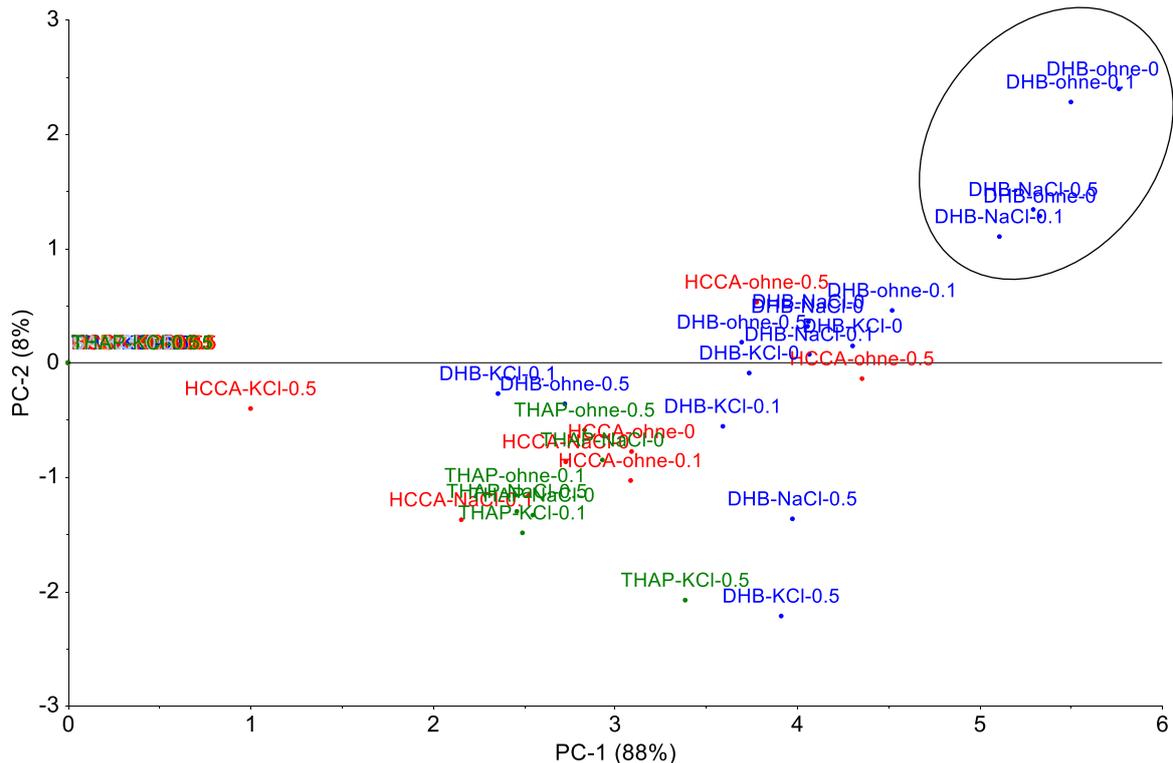
Die absoluten Werte der vier beschriebenen Messgrößen für die Auswertung können nicht direkt miteinander verglichen werden und werden deshalb standardisiert.

Ein qualitativ hochwertiges Spektrum zeichnet sich durch ein großes S/N-Verhältnis, eine hohe Massenauflösung sowie viele Analytmoleküle mit einer großen Diversität an Glucoseeinheiten aus. Zusätzlich sollte jeder Analyt lediglich in einem Signal eines Analyt-Salz-Adduktes resultieren, sodass nur eine Verteilung sichtbar ist. Abbildung 38 zeigt ein qualitativ hochwertiges Massenspektrum einer Analyse von Kohlenhydraten mit lediglich einer Verteilung und detektierbaren Kohlenhydraten mit 5 bis 21 Glucoseeinheiten.



**Abbildung 38:** Qualitativ hochwertiges Massenspektrum einer kohlenhydrathaltigen Probe mit DHB als Matrix ohne Salz- und TFA-Zusatz

Abbildung 39 zeigt in einem Diagramm die Hauptkomponentenanalyse mit den berechneten *Scores* der ersten beiden Hauptkomponenten. Die verwendeten Matrizes sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Sinapinsäure und 3,4-Diaminobenzophenon lieferten qualitativ minderwertige Massenspektren mit sehr schwachen oder gar keinen Signalen für die Maltodextrine, was sich auch in der PCA mit *Scores* von Null widerspiegelt. Durch die erste Hauptkomponente werden 88% der Varianz in den Daten beschrieben, wobei der Beitrag der Originalvariablen zu den Hauptkomponenten durch *Loadings* angegeben wird. Den größten Einfluss in der ersten Hauptkomponente üben die drei Variablen Salzverteilung, Auflösung und Glucoseeinheiten aus (*Loadings*-Werte: 0,521; 0,510; 0,502). Die zweite Hauptkomponente wird hauptsächlich durch das S/N-Verhältnis mit einem *Loadings*-Wert von 0,629 bestimmt.



**Abbildung 39:** Hauptkomponentenanalyse zu Versuchsplan 1. Darstellung der Matrices in unterschiedlichen Farben, DHB (blau), HCCA (rot), THAP (grün), SA (hellblau) und DABP (orange)

Rechts oben im Diagramm kann die Kombination aus Matrix, Salz und TFA-Konzentration mit dem höchsten *Score* und somit dem qualitativ hochwertigsten Massenspektrum abgelesen werden. Es handelt sich dabei um die Kombination aus DHB ohne den Einsatz von Salz. Der Einsatz von Natriumchlorid liefert allerdings vergleichbare Ergebnisse. Demnach steht der Probe also bereits ausreichend Salz für eine erfolgreiche Ionisation zur Verfügung, sodass die weitere Zugabe von Salz keinen positiven Effekt auf die Ionisation zeigt. Ein Einfluss von Trifluoressigsäure kann aus den Ergebnissen nicht erkannt werden.

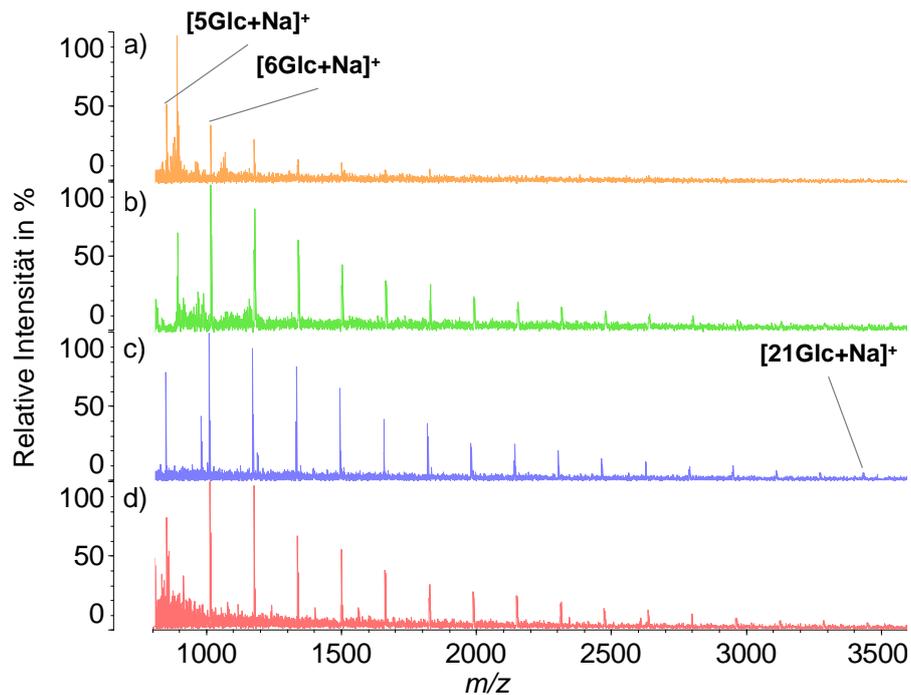
Es wurde ein zweiter Versuchsplan lediglich mit Variation von Matrix und der TFA-Konzentration ohne den Einsatz von Salz erstellt, da das zugesetzte Salz keine Auswirkung auf die Analyse zeigte. Der Versuchsplan besteht aus neun Matrices, welche in Tabelle 34 (Abschnitt 8.2) zusammengefasst sind. Daraus ergeben sich 27 Kombinationen für den zweiten Versuchsplan. Das Diagramm der Haupt-

komponentenanalyse mit den entsprechenden *Scores* ist in Abbildung 55 (Abschnitt 8.1) dargestellt und zeigt, dass erneut DHB als Matrix die höchsten *Scores* liefert. Des Weiteren scheint der Zusatz von TFA zu einer Verschlechterung der Massenspektren zu führen. Dies lässt sich jedoch aufgrund der durch die *Dried-Droplet*-Probenaufgabe verursachten Streuung nicht sicher belegen. Auf den Einsatz der lösungsmittelfreien Probenaufgabetechniken wurde an dieser Stelle allerdings aufgrund der vielen zu analysierenden Kombinationen und den bereits ausreichenden Aussagen verzichtet.

Zusammenfassend kann herausgestellt werden, dass die optimalen Parameter der Einsatz von DHB als Matrix und eine maximale TFA-Konzentration von 0,1% sind. Die Probe enthält bereits eine ausreichende Salzmenge, weshalb auf die Zugabe von Salz verzichtet werden kann.

Zur Analyse von Realproben mit der CS-Technik wurde die Probe nun unter Verwendung der optimierten Parameter mit der *Compressed-Sample*-Technik vorbereitet. Es wurde ebenfalls ein qualitativ hochwertiges Massenspektrum mit hohem S/N-Verhältnis, Isotopenauflösung, lediglich einer Verteilung und einer möglichst großen Anzahl an Oligomeren erwartet.

Abbildung 40 zeigt den Vergleich der Massenspektren erzielt mit der CS- (a, b und d) und der DD-Technik (c). Unter identischen Bedingungen liefert das Massenspektrum a deutlich schlechtere Ergebnisse bezüglich aller für ein qualitativ hochwertiges Massenspektrum relevanter Parameter. Im Massenspektrum können nur wenige der Kohlenhydrate zugeordnet werden, da das Massenspektrum von lediglich einem Signal dominiert wird, welches vermutlich durch die Matrix verursacht wird. Wird das *Ion-Gate* auf ein *m/z*-Verhältnis von mindestens 900 gesetzt, sodass *m/z*-Verhältnisse kleiner 900 nicht mehr in die Flugröhre des Massenspektrometers gelangen, so kann die Laserintensität heraufgesetzt werden, was in einer sensitiveren Detektion resultiert.



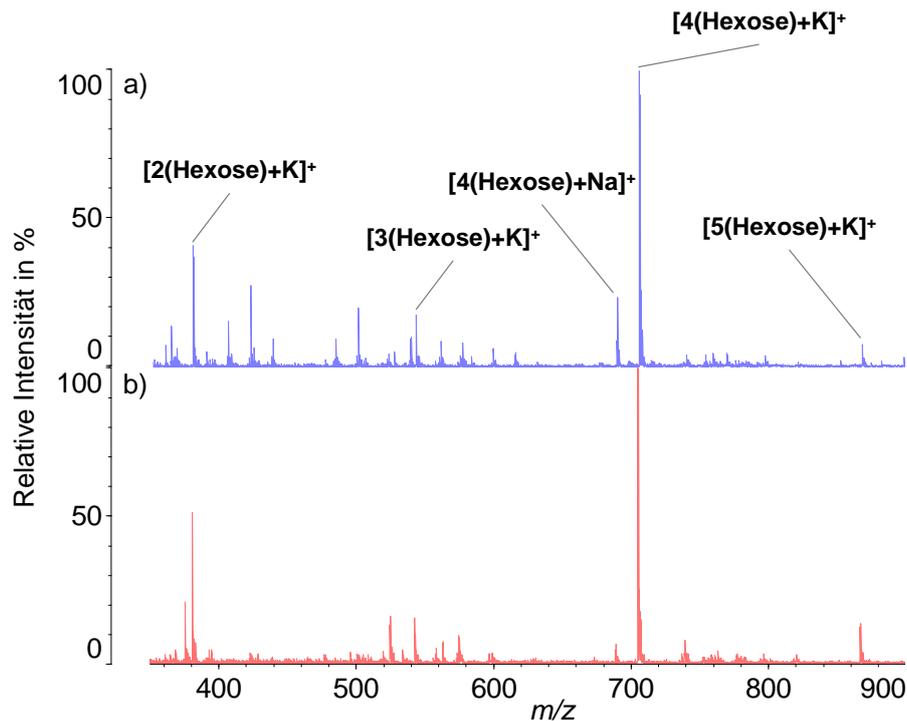
**Abbildung 40:** Vergleich der Massenspektren einer kohlenhydrathaltigen Probe erzielt mit der CS-Technik (a) und mit *Ion-Gate* ab 900 (b), der DD-Technik (c) mit DHB als Matrix ohne Salz- und ohne TFA-Zusatz und der CS-Technik mit DABP als Matrix ohne Salz- und ohne TFA-Zusatz (d)

In Massenspektrum b (Abbildung 40) können nun deutlich mehr Oligomere zugeordnet werden, aber auch hier wird mit 17 detektierten Glucoseeinheiten kein identisches Ergebnis im Vergleich zur *Dried-Droplet*-Probenaufgabe (c) mit 21 detektierten Einheiten erhalten. Zusätzlich hat das erhöhte *Ion-Gate* zur Folge, dass das Oligomer mit fünf Glucoseeinheiten nicht detektiert werden kann, sodass Informationen aus dem Massenspektrum verloren gehen.

Durch den Einsatz von 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix können keine zufriedenstellenden Ergebnisse unter Anwendung der CS-Technik erhalten werden. Wird allerdings DHB durch DABP ersetzt, so lässt sich ohne weitere Optimierung die Qualität des Massenspektrums deutlich erhöhen. In Massenspektrum d (Abbildung 40) lassen sich die Oligomere mit Glucoseeinheiten von 5 bis 20 eindeutig zuordnen und zusätzlich werden nur sehr wenige Störsignale beobachtet.

Während des Matrixscreenings unter Einsatz der DD-Probenaufgabe wurden mit DABP als Matrix ausschließlich qualitativ minderwertige Massenspektren erhalten, in welchen teilweise keine Signale für die Maltodextrine detektiert werden konnten. Bei der Hauptkomponentenanalyse wurden daher für DABP die geringsten *Scores* erzielt, während bei Verwendung der CS-Technik völlig gegensätzliche Ergebnisse erhalten wurden. Als Begründung lassen sich an dieser Stelle nur Vermutungen anstellen, welche die Kristallmorphologie von DABP bei der DD-Technik betreffen. So könnte durch eine unterschiedliche Kristallisation von Matrix und Analyt, möglicherweise auch bedingt durch die Wahl des Lösungsmittels, der notwendige Kontakt zwischen den beiden Komponenten ausbleiben, weshalb bei der MALDI-Analyse keine hinreichende Desorption des Analyten von der Targetoberfläche stattfindet. Bei der *Compressed-Sample*-Technik hingegen wird durch die Vermahlung von Matrix und Analyt der Kontakt zwischen den Komponenten hergestellt, sodass der klassische MALDI-Prozess zum Tragen kommen kann.

Allerdings ergab die Analyse eines Pflanzenextrakts, der ausschließlich Kohlenhydrate enthalten sollte, mit beiden Probenaufgabetechniken – unter Einsatz der optimierten Bedingungen und DHB als Matrix – sowohl mit der DD- als auch der CS-Technik qualitativ hochwertige und vergleichbare Massenspektren (Abbildung 41). In beiden Spektren kann das Hauptsignal dem Kaliumaddukt eines Tetrasaccharids, welches aus vier Hexosen besteht, zugeordnet werden. Bis auf die Signale für das Di-, Tri- und Pentasaccharid lassen sich ohne weitere Optimierung keine weiteren Kohlenhydrate in dieser Probe nachweisen. Die weiteren Signale im Massenspektrum können entweder der Matrix oder dem Pflanzenextrakt zugeordnet werden.



**Abbildung 41:** Vergleich der Massenspektren eines Pflanzenextrakts erzielt mit der CS- (a) und der DD-Technik (b) mit DHB als Matrix ohne Salz- und ohne TFA-Zusatz

Die Ergebnisse zeigen, dass bei zukünftigen chemometrischen Versuchsoptimierungen immer die jeweils zu optimierende Technik (DD oder CS) eingesetzt werden sollte, da eine erfolgreiche Übertragung der optimierten Bedingungen auf eine andere Probenvorbereitungstechnik nicht bei jeder Probe gewährleistet ist. Nachdem nun die in Kosmetika zur Sprühtrocknung eingesetzten Kohlenhydrate mit beiden Probenvorbereitungstechniken erfolgreich analysiert werden konnten, werden als nächstes die in den Kosmetika eingesetzten Peptidextrakte sowohl mit der CS- als auch der DD-Technik analysiert.

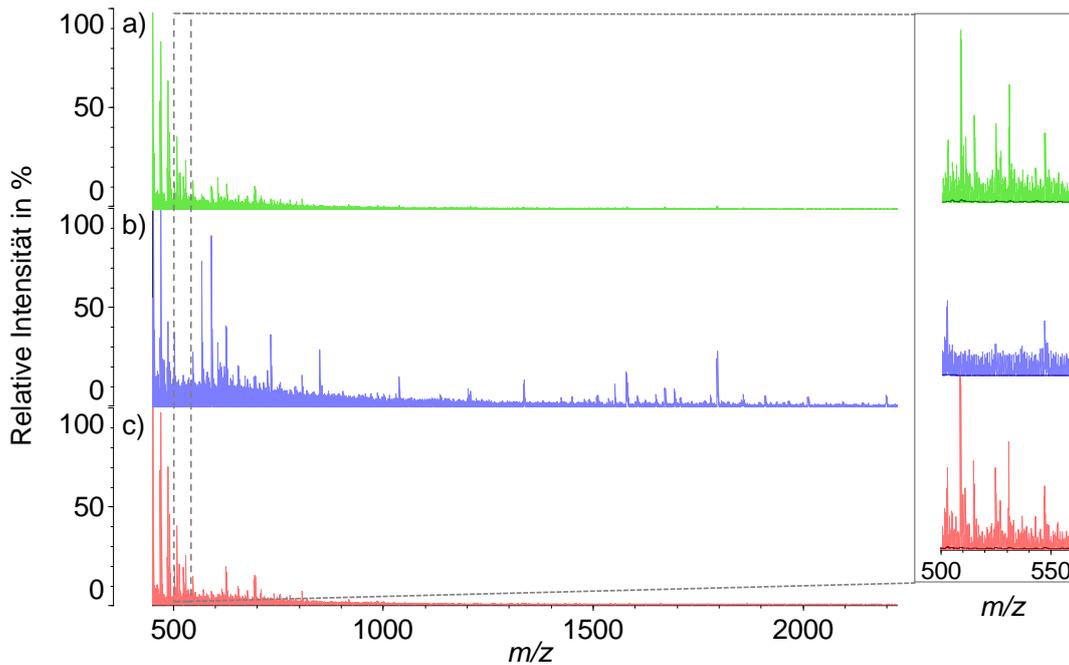
## 4.6.2 Analytik von Peptiden

### 4.6.2.1 Einfluss der Entsalzung auf die Proben

Mit der DD-Technik sollte ebenfalls ein Screening unter Einsatz einer PCA für Peptidproben, welche einem Proteinhydrolysat entstammen, ohne zugesetzte Kohlenhydrate durchgeführt werden. Allerdings sind hierbei die Kriterien für die

Beurteilung nicht eindeutig festlegbar, da in Vorversuchen bereits bei einer Änderung der Matrix keine vergleichbaren Ergebnisse mehr erzielt werden konnten (Abbildung 56, Abschnitt 8.1). Da die eingesetzten Realproben bisher nicht charakterisiert worden sind, liegt keine Auskunft über die tatsächlich enthaltenen Verbindungen vor, womit ein Vergleich nur schwer möglich ist. Des Weiteren zeigen die Massenspektren aus den Vorversuchen keine Signale bei  $m/z$ -Verhältnissen größer 1.000 (Abbildung 56, Abschnitt 8.1), obwohl bei Proteinhydrolysaten solche Verbindungen durchaus zu erwarten sind. Es ist möglich, dass die Komplexität der Probe die massenspektrometrische Analyse beeinflusst. Die Probe stellt ein pflanzliches Extrakt mit einer großen Anzahl an Komponenten, welche durch die Hydrolyse der darin enthaltenen nativen Proteine entstanden sind, dar. Zudem können in dem Extrakt Salze und andere störende Substanzen enthalten sein, welche die Signale der Analyten unterdrücken [108, 125, 182, 183]. Daher wurden die Peptidproben zunächst mit den bereits in Abschnitt 4.5.2.4 eingesetzten ZipTip®-Pipettenspitzen entsalzt, mit einer Lösung (0,1% TFA in ACN/H<sub>2</sub>O 50/50), welche bereits 10 mg/mL Sinapinsäure enthielt, eluiert und auf die Targetoberfläche pipettiert.

Abbildung 42 zeigt die Massenspektren der nicht entsalzten Probe (a), der entsalzten Probe (b) und des Rückstandes nach der Entsalzung (c). Die nicht entsalzte Probe und der Rückstand weisen vergleichbare Spektren auf, wobei im Vergleich zu Massenspektrum 41b im markierten Molekulargewichtsbereich zusätzliche Signale sichtbar sind. Demnach gehen im unteren Massenbereich durch die Entsalzung vermutlich aufgrund unzureichender Adsorption am Phasenmaterial Analyten verloren und verbleiben somit im Rückstand, was auch das Massenspektrum 41c belegt. Allerdings zeigt lediglich die entsalzte Probe im Molekulargewichtsbereich von 800 bis 2.200 Dalton Signale, was bedeutet, dass viele zuvor unterdrückte Signale nun detektiert werden können. Nach erfolgter Entsalzung wurde die Analyse unter Einsatz einer anderen Matrix wiederholt (Abbildung 57, Abschnitt 8.1), allerdings liefert Sinapinsäure als Matrix die eindeutigeren Ergebnisse.



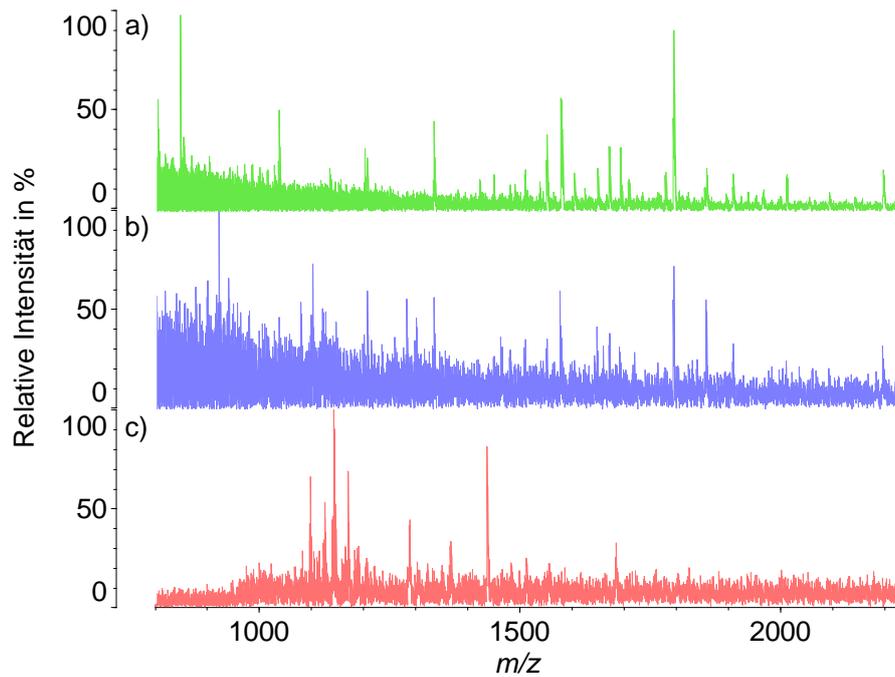
**Abbildung 42:** Massenspektrum einer nicht entsalzten (a) und einer entsalzten (b) Peptidprobe und des Rückstandes nach der Entsalzung der Peptidprobe (c) ohne Zusatz von Kohlenhydraten unter Einsatz von SA als Matrix

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Probenvorbereitung mit ZipTip®-Pipettenspitzen zu einer deutlichen Qualitätssteigerung der MALDI-Massenspektren mit der DD-Technik führt. Die erfolgreiche Entsalzung der Proben resultiert in der Detektion von Substanzen mit  $m/z$ -Verhältnissen größer 1.000.

Die Entsalzung größerer Substanzmengen, wie sie für den Einsatz der CS-Probenaufgabe notwendig ist, ist mit ZipTip®-Pipettenspitzen, die zu lediglich wenigen Mikrolitern entsalzter Probe führen, nicht zu bewerkstelligen. Andere Verfahren zur Entsalzung größerer Mengen sind die *spin and pellet*-Methode [93, 184] oder der Einsatz von Membranen [93]. Ohne weitere Optimierung konnten mit diesen beiden Methoden jedoch keine vergleichbaren Ergebnisse wie mit den Pipettenspitzen erzielt werden. Die meisten Massenspektren zeigten Signale in regelmäßigen  $m/z$ -Abständen, welche aber nicht zugeordnet werden konnten. Des Weiteren wurde die Spektreninterpretation durch ein erhöhtes Rauschen erschwert, weshalb diese beiden Methoden wieder verworfen wurden.

Eine weitere Möglichkeit zur Entsalzung bzw. Anreicherung von Proben größerer Volumina ist die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) [185], bei welcher mit einem festen Phasenmaterial gefüllte Kartuschen verwendet werden. Die Durchführung der Festphasenextraktion gliedert sich in vier Stufen. Zunächst wird das Phasenmaterial konditioniert und anschließend werden die Probenbestandteile durch Aufgabe der Probe adsorbiert. Im nächsten Schritt wird das Phasenmaterial in der Regel wässrig gewaschen und auf diese Weise die Störsubstanzen entfernt. Zum Schluss wird der Analyt mit einem entsprechenden Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch von der Festphase eluiert. Für die Festphasenextraktion sind zahlreiche Phasenmaterialien mit unterschiedlichen Beladungsmengen kommerziell erhältlich.

Für die Entsalzung der Peptidprobe wurden diverse Phasenmaterialien untersucht. Proben, die mit den Phasenmaterialien Varian ABS Elut – Nexus, Varian Bond Elut PH, Merck LiChrolut RP18 E und Macherey-Nagel Chromabond C18 ec entsalzt und mit der DD-Technik vorbereitet wurden, resultierten in Massenspektren mit geringer Qualität. Die Phase Oasis HLB von Waters stellt laut Hersteller ein Umkehrphasenmaterial mit einer hydrophilen-lipophilen Balance zur Adsorption pharmazeutischer Wirkstoffe sowie deren polaren Metaboliten dar und zeigte das größte Potential in diesem Screening. Abbildung 43 zeigt einen Massenspektrenvergleich zwischen der Entsalzung mit einer ZipTip®-Pipettenspitze (a) und einer SPE Waters Oasis HLB Kartusche (b) unter gleichen Bedingungen. Beide Massenspektren wurden zunächst unter Verwendung der DD-Probenaufgabe erzielt, um eine Vergleichbarkeit in den Ergebnisse zu garantieren. Die Massenspektren weisen zahlreiche identische Signale auf, allerdings ist bei der Festphasenextraktion ein erhöhtes Rauschen und somit ein geringeres S/N-Verhältnis zu beobachten. Zu beachten ist dabei, dass das verwendete Phasenmaterial der Festphasenextraktion aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Gruppen eventuell zusätzliche Substanzen adsorbiert und dadurch der Ionisationsprozess nicht vergleichbar ist, was letztendlich das S/N-Verhältnis vermindert.



**Abbildung 43:** Vergleich der Massenspektren einer Peptidprobe entsalzt mit einer ZipTip®-Pipettenspitze (a) und einer SPE-Kartusche Waters HLB (b) unter Einsatz von SA als Matrix mit der DD-Technik. Entsalzung mit SPE-Kartusche Waters HLB erzielt mit der CS-Technik (c)

Abbildung 43c zeigt das mit der *Compressed-Sample-Methode* und mittels Festphasenextraktion erhaltene Massenspektrum. Im Massenspektrum sind zwar diverse Signale zu erkennen, jedoch zeigen die Massenspektren b und c keine Gemeinsamkeiten. Bei Anwendung der DD-Technik liegen Probe und Matrix in einem Lösungsmittel gelöst vor und werden gemeinsam auf das Target appliziert, sodass die Matrix mit den Analyten unter Ausschluss von Störsubstanzen auf der Targetoberfläche auskristallisiert. Substanzen mit einer zur Matrix unterschiedlichen Polarität werden aus den Kristallen ausgeschlossen, sodass neben der Entsalzung ein zusätzlicher Reinigungsschritt abläuft. Im Gegensatz dazu findet bei Anwendung der CS-Technik unter Einsatz der lösungsmittelbasierten Analytzugabe dieser Reinigungsschritt in einem deutlich geringeren Maße statt. Außerdem werden die Kristalle anschließend vermahlen, sodass der Kontakt zu den Störsubstanzen weiterhin gegeben ist und diese Substanzen bei der Ionisation um die Ladungsaufnahme mit den Analyten konkurrieren.

Des Weiteren ist eine Unterdrückung der Ionisation durch die Anwesenheit von Salzen nicht auszuschließen. Laut Herstellerangaben enthält Sinapinsäure bei einer Menge von 20 mg jeweils 1 µg Natrium und Kalium. Selbst die Massenspektren unter Einsatz der DD-Technik weisen bereits ein erhöhtes Rauschen auf (Abbildung 43b), sodass bei der CS-Technik aufgrund der geringen Konzentrationen der Analyten die Salzmenge bereits ausreichen kann, um die Analyt-Signale zu unterdrücken. Auch der Einsatz größerer Mengen entsalzter Probe ergab keine vergleichbaren Massenspektren zu Abbildung 43b.

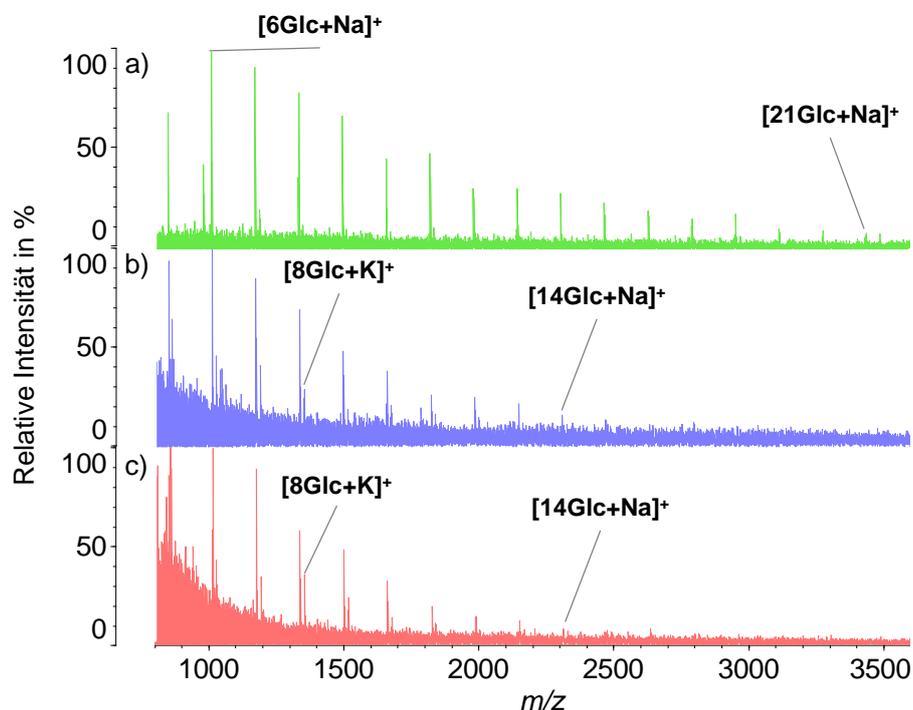
Weiterhin werden zur Vermahlung Glasperlen aus Kalk-Natron-Glas eingesetzt, welche unter anderem Natriumoxid enthalten, sodass bei der Vermahlung durch Abrieb der Glasperlen geringe Mengen Natriumionen in die Probe gelangen. Der Hersteller gibt keine Analysenwerte hinsichtlich der Zusammensetzung des Glases an, allerdings besteht Kalk-Natron-Glas meist aus bis zu 16% Natriumoxid [186], weshalb bereits kleine Mengen des Abriebs zu einer Kontamination der Probe durch Natriumionen führen können.

Es konnte nicht abschließend aufgeklärt werden, worauf letztendlich die schlechte Qualität des Massenspektrums bei dieser Probe beruht. Nachdem jedoch für die kohlenhydrathaltigen Realproben optimale Analysenbedingungen für beide Probenvorbereitungstechniken ermittelt wurden und bei den peptidhaltigen Proben lediglich die DD-Technik eine größere Anzahl an Signalen im höheren Molekulargewichtsbereich lieferte, werden diese Erkenntnisse nun auf die Mischproben angewendet und untersucht, welchen Einfluss die Substanzklassen aufeinander ausüben.

### 4.6.2.2 Analyse von Peptidproben mit Kohlenhydratanteil

Es wurde eine getrocknete Mischprobe, welche jeweils zu 50% aus Maltodextrinen und Peptiden besteht, mit den zuvor ermittelten Parameter für die jeweiligen

Substanzklassen mit der DD- sowie der CS-Probenaufgabe analysiert. Die Analyse der Kohlenhydrate wurde ohne jegliche Vorbehandlung der Mischproben mit DHB für die DD-Methode und mit DABP im Falle der CS-Technik durchgeführt. Zum Vergleich wurde zusätzlich das Massenspektrum der reinen kohlenhydrathaltigen Probe gegenübergestellt (Abbildung 44a). Die Massenspektren b und c zeigen ein etwas anderes Ergebnis, da dort ein erhöhtes Rauschen unterhalb von 1.000 Dalton, Oligomere mit maximal 14 Glucoseeinheiten sowie eine zweite Verteilung, welche den Kaliumaddukten entspricht, zu beobachten ist.



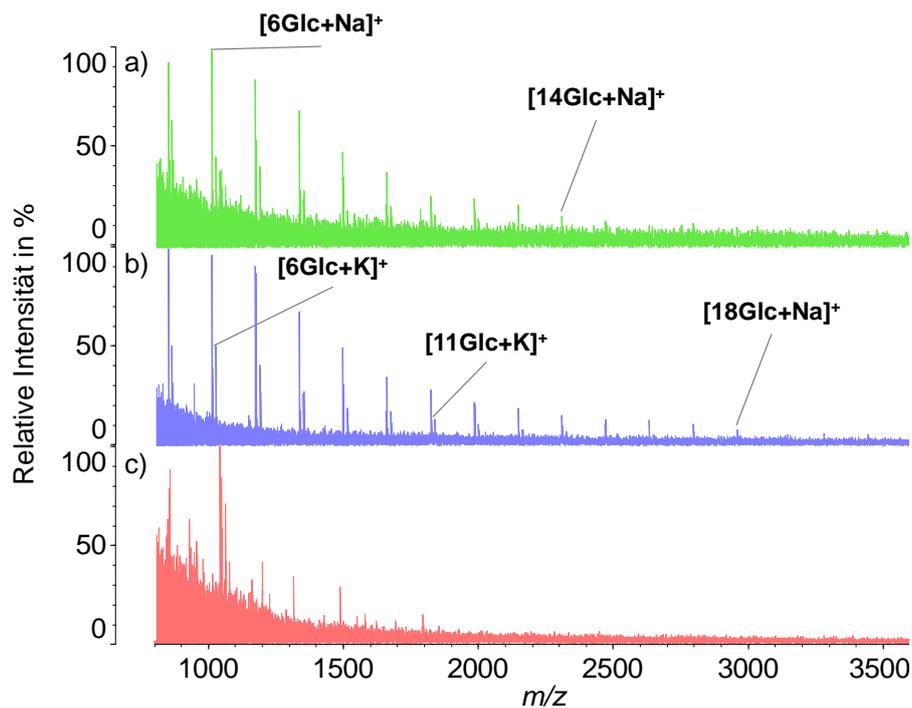
**Abbildung 44:** Vergleich der Massenspektren der reinen kohlenhydrathaltigen Probe (a) und einer Mischprobe (b) mit der DD-Technik und DHB als Matrix und einer Mischprobe mit der CS-Technik und DABP als Matrix (c)

Der Verlust an Spektrenqualität ist vermutlich der Komplexität der Probe geschuldet, da im pflanzlichen Extrakt durchaus verschiedene Salze enthalten sind und die Massenspektren der Maltodextrine im Screening bei Anwesenheit von Kaliumionen die niedrigste Qualität hervorgebracht haben. Bei einem 50 prozentigen Anteil an Peptiden in der Probe ist des Weiteren ein negativer Einfluss bei der Ionisation der

Maltodextrine nicht auszuschließen. Trotzdem konnte die Probe ohne jegliche Probenvorbehandlung analysiert werden.

Anschließend wurde zur Analyse der Peptide die entsalzte Probe mit Sinapinsäure als Matrix untersucht. Es wurden erneut Signale mit einem  $m/z$ -Verhältnis zwischen 800 und 2.200 und ein identisches Muster des Massenspektrums der reinen Peptidprobe sowie der Mischprobe erhalten (Abbildung 58, Abschnitt 8.1). Lediglich die Intensitätsverhältnisse der Signale sind nicht identisch, was zum einen auf die komplexere Probe zurückgeführt werden kann, aber vor allem durch die geringe Reproduzierbarkeit der DD-Technik verursacht wird. Die Analyse der Mischprobe mit der CS-Probenaufgabe resultierte, wie bereits die Analyse der reinen Peptidprobe, in Massenspektren ohne erkennbare Signale.

Des Weiteren wurden der Rückstand nach der Entsalzung sowie die entsalzte Mischprobe mit DHB auf das Target aufgebracht, um den Verbleib der Maltodextrine zu untersuchen. Damit bei der entsalzten Probe die Adduktbildung der Analyten mit Natriumionen gewährleistet werden kann, wurde das Target zuvor mit Natriumchlorid vorbeschichtet. Die erhaltenen Massenspektren sind in Abbildung 45 dargestellt. Es sind lediglich in der nicht entsalzten Probe (a) und im Rückstand nach der Entsalzung (b) Signale der Maltodextrine zu erkennen. Im Spektrum der entsalzten Probe (c) sind keine Signale für die Oligomere zu finden, was darauf hinweist, dass die Kohlenhydrate entweder gar nicht am Phasenmaterial adsorbiert werden oder beim Waschprozess verloren gehen. Der Rückstand nach der Entsalzung zeigt gegenüber der nicht entsalzten Probe eine deutlich größere Anzahl an Oligomeren und auch das Rauschen unterhalb von 1.000 Dalton nimmt merklich ab. Zusätzlich zu den Natriumaddukten werden auch die Kaliumaddukte der Oligomere detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die Komplexität der Probe einen größeren Einfluss auf die Spektrenqualität hat, als die Anwesenheit der Kaliumionen.



**Abbildung 45:** Massenspektren der Mischprobe mit DHB von der nicht entsalzten Probe (a), dem Rückstand nach der Entsalzung (b) und der entsalzten Probe (c)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mischproben hinsichtlich der Kohlenhydrate und der Peptide durch die geeignete Wahl der Matrix separat voneinander analysiert werden können. Während bei den Peptiden ein Entsalzungsschritt unumgänglich ist, um auch Peptide in höheren Molekulargewichtsbereichen detektieren zu können, ist bei der Analyse der Kohlenhydrate dieser Schritt nicht zwingend erforderlich. Allerdings gehen auch hier durch die höhere Probenkomplexität Informationen im Massenspektrum verloren, sodass die Analyse des Rückstandes nach der Entsalzung eine deutliche Qualitätssteigerung im Massenspektrum mit sich bringt.

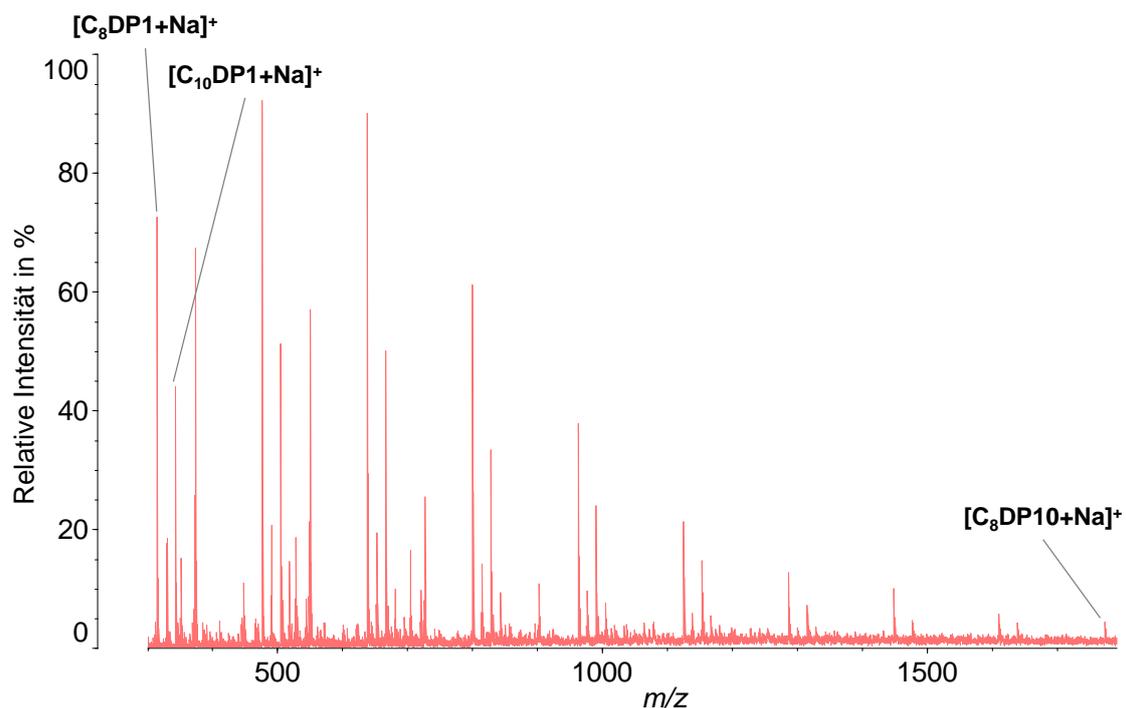
### 4.6.3 Analytik von Alkylpolyglucosiden mit der CS-Technik

#### 4.6.3.1 Reproduzierbarkeit der Massenspektren

Zusätzlich zu den Peptiden und den Mischproben wurden Alkylpolyglucoside (AG), welche aus der Reaktion von Fettalkoholen mit Kohlenhydraten dargestellt werden,

als Realproben analysiert. Die in dieser Arbeit zur Verfügung gestellten Proben bestanden meist aus Fettalkoholen mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen und einer unterschiedlichen Anzahl an Glucoseeinheiten.

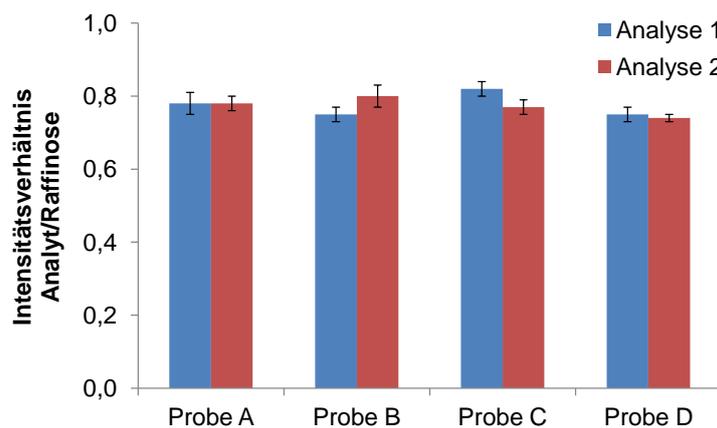
Hohe Ionenausbeuten lassen sich bei den AG-Proben unter Einsatz der Matrixkombination 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und Aminopyrazin (AP) erzielen [137]. Als Kationisierungssalz eignet sich Natriumchlorid. Das Massenspektrum in Abbildung 46 zeigt die Oligomere des Octylfettalkohols mit einem  $m/z$ -Unterschied der einzelnen Oligomere von 162 Dalton, was dem Molekulargewicht einer Glucoseeinheit entspricht. Zusätzlich ist noch eine zweite Verteilung mit einem Abstand von 28 Dalton zur Hauptverteilung zu beobachten, welche den Glucosiden des Decylfettalkohols entspricht. Für beide Verteilungen ist ein Polymerisationsgrad (DP) von 1 bis 9 festzustellen.



**Abbildung 46:** Massenspektrum einer AG-Probe mit DHB/AP als Matrix und NaCl als Kationisierungssalz

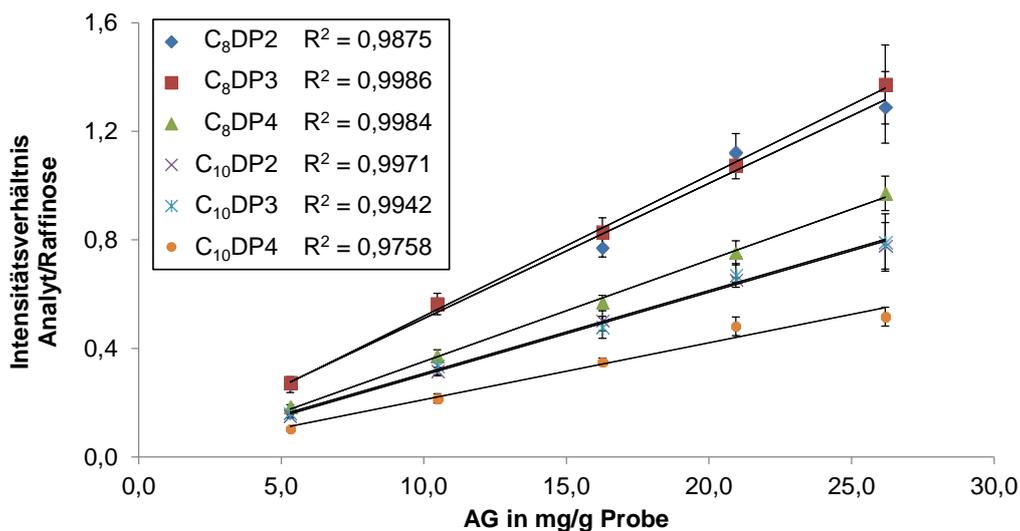
Für die Quantifizierung der AG-Proben muss sichergestellt sein, dass die Massenspektren reproduzierbar sind und eine lineare Abhängigkeit des Analyt-signals von der Konzentration gegeben ist. Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit

der Polymerprobe hinsichtlich des Signals des C<sub>8</sub>-Triglucosids betrachtet. Es wurden vier separate Proben mit Raffinose als internem Standard vermahlen, jede einzelne Probe anschließend mit der CS-Methode in vier Wells gefüllt und alle Wells zweimal analysiert. Die Intensitätsverhältnisse zeigen eine hinreichende Reproduzierbarkeit mit relativen Standardabweichungen kleiner 5% für die vier vorbereiteten Proben sowie von Probe zu Probe (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Diagramm der Intensitätsverhältnisse des C<sub>8</sub>-Dreifachzuckers zum internen Standard Raffinose der Proben A bis D mit der Standardabweichung aus jeweils 4 Analysen

Als nächstes wurde die Abhängigkeit des Analytsignals von der Konzentration einer AG-Probe mit einem Polymerisationsgrad von 2 bis 4 betrachtet. Es wurden Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse der einzelnen Oligomere zum internen Standard Raffinose aus vier Analysen bestimmt und graphisch aufgetragen (Abbildung 48). Das Diagramm zeigt für alle Analyten mit Korrelationskoeffizienten von größer 0,98 eine lineare Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses zur Konzentration des Polymers. Mit relativen Standardabweichungen kleiner 5% und einer linearen Abhängigkeit des Analytsignals von der Konzentration sind somit die für eine erfolgreiche Quantifizierung der AG-Proben notwendigen Bedingungen erfüllt.



**Abbildung 48:** Auftragung des Intensitätsverhältnisses einer AG-Probe von Analyt zu Standard in Abhängigkeit der Polymerkonzentration mit DHB/AP als Matrix und NaCl als Kationisierungssalz

#### 4.6.3.2 Optimierung der Matrix

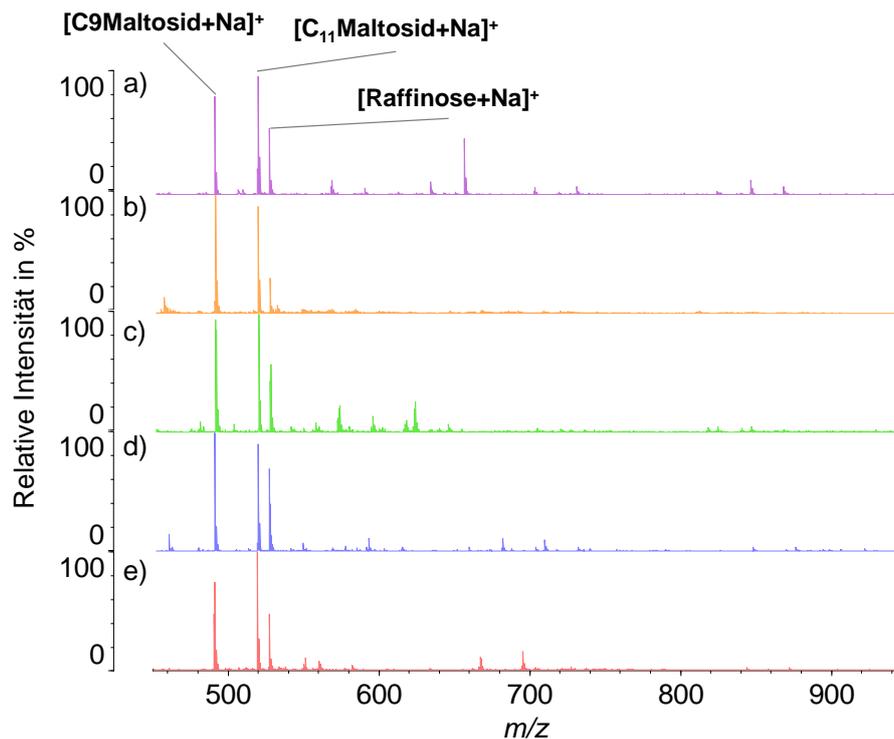
Die Analyse von Kohlenhydraten und deren Derivaten zeigt bei Einsatz von DHB/AP als Matrixkombination bei der CS-Technik eine Clusterbildung der Analyten mit der Matrix [137]. Eine vergleichbare Clusterbildung wurde ebenfalls unter Einsatz der DD-Probenaufgabe zur Analyse von Flavonoiden [187] und Kohlenhydraten [146, 188] mit DHB als Matrix beobachtet. Werden Kohlenhydrate mit DHB/AP als Matrixkombination analysiert, so lagert sich Natriumdihydroxybenzoat teilweise mehrfach an den Analyten an und überlappt mit den Signalen der höheren Homologen des Polymers, sodass es zu einer Überinterpretation der höheren Homologen kommt.

Die analysierten AG-Proben weisen meist zwei unterschiedliche Fettalkohol-Fractionen auf, welche sich um zwei Kohlenstoffatome und somit um 28 Dalton unterscheiden. Natriumdihydroxybenzoat besitzt ein Molekulargewicht von 176 Dalton. Lagern sich nun beispielsweise zwei dieser Moleküle an das Octylglucosid an, so ergibt sich ein zusätzliches Molekulargewicht von 352 Dalton,

wodurch ein gesamtes  $m/z$ -Verhältnis von 667 resultiert. Das gleiche  $m/z$ -Verhältnis besitzt das Decyloligomer mit drei Glucoseeinheiten, sodass es zu einer Überlagerung der Signale kommt. Daher ist es notwendig, eine Alternative für die bisher verwendete Matrix zu finden, um eine Clusterbildung zu unterbinden.

In der Literatur sind diverse Matrices bzw. Matrixkombinationen bestehend aus zwei oder drei Komponenten für die Analyse von Kohlenhydraten beschrieben [189-203]. So zeigten SNOVIDA et al. [190], dass der Einsatz von DHB/Anilin statt nur DHB zu einer deutlichen Steigerung der Spektrenqualität bei der Analyse von Kohlenhydraten führt, was mit der Ausbildung einer feinkristallinen Schicht der Matrixkombination, begründet wurde. Die Verwendung einer Kombination aus Matrices, um bei der DD-Technik eine homogenere Kristallstruktur der Probe zu erhalten, ist bei Verwendung der CS-Probenaufgabe allerdings in der Regel nicht notwendig. Die nach dem Verflüchtigen des Lösungsmittels gebildeten Kristalle werden bei der CS-Technik vermahlen, sodass die Kristalle nicht intakt sind, wenn diese mit dem Laserlicht bestrahlt werden. Daher sind Zusätze wie Anilin oder anderer Substanzen bei Einsatz der CS-Technik nicht förderlich. Die Zugabe weiterer Substanzen kann sogar hinderlich sein, da beispielsweise Anilin bei Raumtemperatur flüssig ist, was eine erfolgreiche Vermahlung je nach zugesetzter Menge verhindern kann.

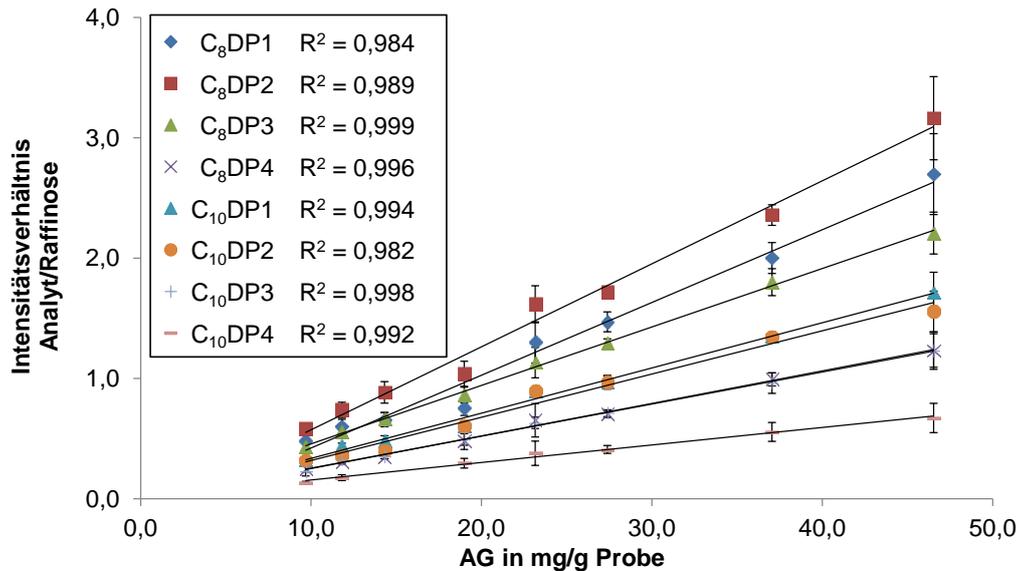
Es wurden die beiden Maltoside *n*-Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid und *n*-Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid sowie Raffinose mit HCCA, THAP, 2',6'-Dihydroxyacetophenon (DHAP), 6,7-Dihydroxycumarin (DHC) und 3-Aminochinolin (AQ) als Matrix und Natriumchlorid als Kationisierungssalz mit der CS-Probenaufgabe analysiert. Abbildung 49 zeigt einen Ausschnitt der Massenspektren der drei Analyten im Molekulargewichtsbereich von 450 bis 900 Dalton unter Einsatz der bereits beschriebenen Matrices. Die Massenspektren mit 3-Aminochinolin (b) und DHAP (e) als Matrix zeigen lediglich wenig Matrixsignale mit geringer Intensität. Daher wurden diese beiden Matrices für die folgenden Analysen der AG-Proben ausgewählt.



**Abbildung 49:** Massenspektren zweier Maltoside und Raffinose mit HCCA (a), AQ (b), DHC (c), THAP (d) und DHAP (e) als Matrix

Die Analyse der AG-Proben mit AQ als Matrix zeigte, dass hohe Laserintensitäten zur Ionisation notwendig sind und relative Standardabweichungen von etwa 20% erzielt werden. Des Weiteren ließ sich das Probenmaterial bei der Probenvorbereitung nicht optimal vermahlen. DHAP zeigte bei der Vermahlung ein besseres Verhalten, weswegen diese Matrix für die weiteren Analysen der AG-Proben ausgewählt wurde.

Es wurden Mittelwerte der Intensitätsverhältnisse der einzelnen Oligomere zum internen Standard C<sub>11</sub>-Maltosid aus vier Analysen bestimmt und graphisch aufgetragen (Abbildung 50). Das Diagramm zeigt für alle Analyten mit Korrelationskoeffizienten von größer 0,98 eine lineare Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses zur Konzentration des Polymers. Anhand der Standardabweichung ist lediglich eine geringe Streuung der Analysen zu beobachten.



**Abbildung 50:** Auftragung des Intensitätsverhältnisses einer AG-Probe von Analyt zu Standard in Abhängigkeit der Analytkonzentration mit DHAP als Matrix und NaCl als Kationisierungssalz

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass DHAP als Matrix hinsichtlich der Reproduzierbarkeit vergleichbare Ergebnisse zur Matrixkombination DHB/AP liefert. Es ist jedoch keine Clusterbildung zwischen der Matrix und den Analyten zu beobachten, weshalb die Quantifizierung der Alkylpolyglucoside mit dem Einsatz von DHAP als Matrix ohne Einschränkungen möglich ist.

## 4.7 Responsefaktoren in der MALDI-Massenspektrometrie

### 4.7.1 Abhängigkeit von der Komplexität der Probe

In der Massenspektrometrie werden zur Quantifizierung meist interne Standards benötigt, da die Ionisationsausbeute der zu untersuchenden Analyten extrem stark von den Ionisationsbedingungen abhängig ist. Zudem werden in der MALDI-Massenspektrometrie sowohl die Matrix als auch alle eingesetzten Analyten zur gleichen Zeit ionisiert, wodurch Effekte wie Ionensuppression noch stärker zum Vorschein kommen als in der ESI-Massenspektrometrie, bei welcher aufgrund der meist vorgeschalteten Chromatographie jeder Analyt – eine optimale Trennung vorausgesetzt – separat ionisiert wird.

Werden in der MALDI-MS Analyten quantifiziert von denen isotoopenmarkierte Standards kommerziell erhältlich sind, so können diese der Probe zugesetzt und anschließend die Analytkonzentration aus der bekannten Konzentration des Standards berechnet werden. Allerdings sind isotoopenmarkierte Standards meist nicht verfügbar oder kostenintensiv, sodass Strukturanaloga als interne Standards verwendet werden müssen. Werden Strukturanaloga eingesetzt, so muss vorab der relative Responsefaktor ( $RR_f$ ) des Analyten zum eingesetzten Standard bestimmt werden, wozu zunächst die Konzentration des Analyten sowie des Standards bekannt sein müssen. Der relative Responsefaktor kann nach Gleichung 3 bestimmt werden [204].

$$RR_f = \frac{S_{IS} \times C_A}{S_A \times C_{IS}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Mit:  $S_{IS}$  = Signal des internen Standards  
 $C_A$  = Konzentration des Analyten  
 $S_A$  = Signal des Analyten  
 $C_{IS}$  = Konzentration des internen Standards

Der relative Responsefaktor ist ein Maß für die Ionisation des Analyten im Vergleich zum Standard. Somit kann daraus abgeleitet werden, wie sich die Ionisationsausbeute des Analyten zum Standard verhält. Für eine erfolgreiche Quantifizierung ist es entscheidend, dass der relative Responsefaktor in einem bestimmten Konzentrationsbereich konstant und zudem unabhängig von weiteren Einflüssen ist. Insbesondere in der MALDI-Massenspektrometrie ist dies von großer Relevanz, da die simultane Ionisation mehrerer Substanzen zu einer Ionensuppression führen kann.

Daher wurden zunächst drei Mischungen mit einer unterschiedlichen Anzahl an Analyten hergestellt (Tabelle 21), anhand welcher die relativen Responsefaktoren bestimmt wurden, um die Abhängigkeit des Responsefaktors von unterschiedlichen Analytbedingungen zu untersuchen. Während Mischung 1 lediglich aus derivatisierten Kohlenhydraten mit unterschiedlicher Alkylkettenlänge des

eingesetzten Fettalkohols besteht, sind in Mischung 2 und 3 sowohl derivatisierte als auch nicht derivatisierte Kohlenhydrate enthalten.

**Tabelle 21:** Übersicht über die hergestellten Mischungen 1 – 3

Mischung 1	Mischung 2	Mischung 3
C <sub>8</sub> -Glucosid	-	-
C <sub>10</sub> -Glucosid	-	C <sub>10</sub> -Glucosid
C <sub>11</sub> -Maltosid	C <sub>11</sub> -Maltosid	C <sub>11</sub> -Maltosid
C <sub>12</sub> -Maltosid	-	-
C <sub>14</sub> -Maltosid	C <sub>14</sub> -Maltosid	-
-	-	Glucose
-	Maltose	Maltose
-	-	Raffinose

Zunächst sollten einzelne relative Responsefaktoren ermittelt werden. Als Matrix wurde DHAP und als interner Standard für die drei Mischungen das C<sub>11</sub>-Maltosid, welches in allen Mischungen anwesend ist, ausgewählt. Tabelle 22 stellt zunächst einige der ermittelten relativen Responsefaktoren aus den zuvor beschriebenen Mischungen als Mittelwerte dar. Die relativen Responsefaktoren der nicht derivatisierten Kohlenhydrate berechnet zum C<sub>11</sub>-Maltosid zeigen, dass bei steigender Anzahl an Kohlenhydrateinheiten im Molekül der relative Responsefaktor deutlich abnimmt und somit die Ionisationsausbeute mit zunehmender Größe des Moleküls steigt. Die Derivatisierung des Zuckers mit einem Fettalkohol hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Ionisationsausbeute. Dies wird besonders bei Betrachtung des relativen Responsefaktors von Maltose deutlich, da hier ein Wert von etwa fünf erhalten wird und somit der derivatisierte Zucker eine ca. fünffach höhere Ionisationsausbeute als die nicht derivatisierte Spezies zeigt. Ein ähnliches Ergebnis wird beim Vergleich der relativen Responsefaktoren von Glucose und

C<sub>10</sub>-Glucosid beobachtet. Dort wird die Ionisationsausbeute durch die Derivatisierung des Zuckers mit einem Fettalkohol um einen Faktor von etwa zwei gesteigert.

**Tabelle 22:** Relative Responsefaktoren der Analyten zum Standard C<sub>11</sub>-Maltosid bestimmt aus der Analyse von 3 Proben und jeweils 4 Messungen

	Glucose	Maltose	Raffinose	C <sub>10</sub> - Glucosid	C <sub>12</sub> - Maltosid	C <sub>14</sub> - Maltosid
<b>RR<sub>f</sub></b>	9,02	5,38	3,01	5,18	1,32	1,06
	± 0,30	± 0,06	± 0,29	± 0,03	± 0,00	± 0,00

Die relativen Responsefaktoren der beiden Maltoside sollten einen Wert von etwa eins ergeben, da sich im Vergleich zum Standard lediglich die Alkylkettenlänge des Fettalkohols ändert. Der berechnete relative Responsefaktor aus Tabelle 22 des C<sub>14</sub>-Maltosids bestätigt diese Überlegung, allerdings weist das C<sub>12</sub>-Maltosid einen Wert von 1,32 auf und zeigt somit eine ca. 30 prozentige Abweichung. Dieses Verhalten kann zunächst mit den bisher gewonnenen Erkenntnissen nicht erklärt werden.

Tabelle 23 zeigt vergleichend die berechneten relativen Responsefaktoren mit zugehöriger Standardabweichung aus den drei Mischungen. Es wird deutlich, dass bei den Analysen zwar geringe Standardabweichungen erhalten werden, jedoch die relativen Responsefaktoren aus den unterschiedlichen Mischungen nicht übereinstimmen. Insbesondere steigt der relative Responsefaktor von Maltose von 2,9 auf 5,4, sobald die Mischung mehr Substanzen enthält. Der Analyt Maltose weist somit eine geringere Ionisationsausbeute auf, während die Ionisationsausbeute des Standards ansteigt. Diese Tendenz ist ebenfalls bei dem C<sub>10</sub>-Glucosid zu beobachten, allerdings ist der Unterschied mit einer Abweichung von etwa 10% nicht signifikant. Die ähnlichen Werte können hier daraus resultieren, dass Mischung 1 und Mischung 3 die gleiche Anzahl an Substanzen enthalten und daher die Ionisations-

ausbeuten durch Konkurrenzsituationen keine nennenswerte Beeinflussung erfahren.

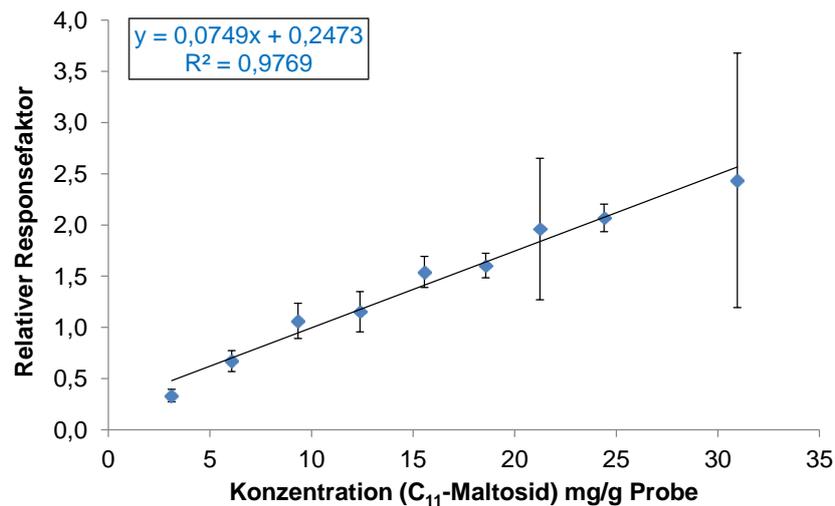
**Tabelle 23:** Relative Responsefaktoren der Analyten zum Standard C<sub>11</sub>-Maltosid in den angegebenen Mischungen bestimmt aus der Analyse von 3 Proben und jeweils 4 Messungen

	Mischung 1	Mischung 2	Mischung 3
<b>RR<sub>f</sub> C<sub>10</sub>-Glucosid</b>	5,18 ± 0,03	-	5,74 ± 0,03
<b>RR<sub>f</sub> C<sub>14</sub>-Maltosid</b>	1,06 ± 0,00	1,09 ± 0,00	-
<b>RR<sub>f</sub> Maltose</b>	-	2,92 ± 0,07	5,38 ± 0,06

Für das C<sub>14</sub>-Maltosid wurden aus Mischung 1 und 2 vergleichbare relative Responsefaktoren erhalten, welche Werte von etwa eins aufweisen. Da der Analyt und der Standard Strukturanaloga darstellen und sich chemisch lediglich durch drei Methylengruppen in der Alkylkette des Fettalkohols unterscheiden, weisen diese im Ionisationsverhalten keine signifikanten Unterschiede auf und erfahren bei Veränderung der Mischungszusammensetzung den gleichen Einfluss.

#### 4.7.2 Abhängigkeit von der Analytkonzentration

Aufgrund der auftretenden Ionensuppression, welche möglicherweise für die nicht vergleichbaren relativen Responsefaktoren verantwortlich ist, müsste ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit des relativen Responsefaktors vorliegen. Daher wurde C<sub>11</sub>-Maltosid in unterschiedlicher Konzentration und Raffinose als interner Standard eingesetzt, um diese Abhängigkeit zu demonstrieren (Abbildung 51).



**Abbildung 51:** Auftragung des relativen Responsefaktors in Abhängigkeit der C<sub>11</sub>-Maltosid-Konzentration. Raffinose (18,6 mg/mL, 4,7 mg/g Probe) wurde als interner Standard verwendet. 10 mg NaCl und 10 mg DHAP als Matrix in jeder Probe

Die lineare Abhängigkeit des relativen Responsefaktors von der Analytkonzentration bestätigt die Annahme, dass die Ionisationsausbeute des Analyten aufgrund von Ionensuppression beeinflusst wird, was zu einem konzentrationsabhängigen relativen Responsefaktor führt. Mit steigender Analytkonzentration nimmt der relative Responsefaktor zu, was bedeutet, dass das Intensitätsverhältnis Standard zu Analyt steigt und sich das Analytsignal somit nicht proportional zur Konzentrationserhöhung verhält.

Anschließend wurde der interne Standard Raffinose durch C<sub>9</sub>-Maltosid ersetzt, sodass sich der interne Standard chemisch kaum vom Analyten unterscheidet. Es wurde erneut eine Konzentrationsabhängigkeit des relativen Responsefaktors bestimmt. Tabelle 24 zeigt die erhaltenen relativen Responsefaktoren aus den einzelnen Proben und bestätigt die zuvor gemachte Annahme, dass bei Einsatz chemisch ähnlicher Moleküle der relative Responsefaktor keine Abhängigkeit von der Analytkonzentration aufweist.

**Tabelle 24:** Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C<sub>11</sub>-Maltosid-Konzentration. C<sub>9</sub>-Maltosid als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHAP als Matrix in jeder Probe

<b>Probe</b>	<b>n (C<sub>9</sub>) [nmol]</b>	<b>n (C<sub>11</sub>) [nmol]</b>	<b>RR<sub>f</sub> (n = 4)</b>
1	58,9	152,2	1,07 ± 0,15
2	58,9	76,1	0,95 ± 0,06
3	58,9	38,1	1,08 ± 0,12
4	58,9	19,0	1,09 ± 0,06
5	58,9	9,5	0,96 ± 0,08
6	58,9	4,8	0,93 ± 0,09
<b>MW</b>			1,01 ± 0,05

Vorerst lässt sich zusammenfassen, dass der relative Responsefaktor lediglich eine Abhängigkeit von der Probenzusammensetzung sowie von der Analytkonzentration zeigt, wenn sich Analyt und Standard chemisch unterscheiden. Wird allerdings eine Substanz als Standard gewählt, welche mit dem Analyten chemisch eng verwandt ist, so kann keine Abhängigkeit mehr beobachtet werden.

Die Matrix liegt in der Mischung meist in einem etwa 100.000-fachen Überschuss zum Analyten bzw. Standard vor [13]. Der Großteil der Matrixmoleküle ist dafür verantwortlich, dass zunächst eine Ablationswolke entsteht und so die Matrix sowie der Analyt von der Oberfläche des Probenträgers desorbiert werden und in die Gasphase gelangen [41, 49, 205]. Eine weitere Funktion der Matrix besteht darin, dass die Analytmoleküle durch Stöße mit den Matrixmolekülen einen Protonenaustausch erfahren und auf diese Weise ionisiert werden [8, 33, 206]. Werden allerdings die Analytmoleküle durch Adduktbildung mit einem Metallion ionisiert, so ist die Matrix lediglich für die Desorption des Analyten notwendig. Dadurch befindet sich eine große Anzahl neutraler Matrixmoleküle in der Gasphase, welche mit den Analytmolekülen um die Ladungsaufnahme eines Natriumions konkurrieren,

während gleichzeitig auch Analyt und Standard in Konkurrenz um Ladungsträger stehen.

Daher wurde nun nochmals die Abhängigkeit des relativen Responsefaktors von der Analytkonzentration unter Einsatz einer anderen Matrix, nämlich der Kombination aus DHB/AP, betrachtet. Tabelle 25 zeigt den relativen Responsefaktor von C<sub>9</sub>-Maltosid in Abhängigkeit von der Konzentration. Lediglich die höchste eingesetzte Analytkonzentration weist einen erhöhten relativen Responsefaktor auf, während ansonsten keine Abhängigkeit des relativen Responsefaktors von der Analytkonzentration festzustellen ist.

**Tabelle 25:** Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C<sub>9</sub>-Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHB/AP als Matrix in jeder Probe

Probe	n (Raffinose) [nmol]	n (C <sub>9</sub> ) [nmol]	RR <sub>f</sub>
1	7,1	37,4	6,05 ± 0,69
2	7,1	18,7	4,90 ± 0,10
3	7,1	9,3	4,75 ± 0,09
4	7,1	4,7	4,34 ± 0,27
5	7,1	2,3	4,59 ± 0,34
<b>MW</b>			4,92 ± 0,31

Bei der Analyse mit der höchsten Analytkonzentration (Abbildung 59a, Abschnitt 8.1) stellt das Analytsignal die dominierende Verbindung im Massenspektrum dar. Daher wird vermutlich das Signal durch die Ionensuppression stärker beeinflusst, zeigt kein lineares Ansprechverhalten von der Konzentration und resultiert in kleineren Signalen als erwartet, weswegen der relative Responsefaktor ansteigt.

Im Vergleich zum zuvor ermittelten Wert (Tabelle 25) resultiert eine Erhöhung der Konzentration des Standards in einem um etwa 21% reduzierten relativen Responsefaktor (Tabelle 26). Die Ionensuppression führt bei Erhöhung der Konzentration des Standards zu einem nicht linearen Anstieg der Intensität des Standardsignals, was zu einem signifikant geringeren relativen Responsefaktor führt. Die Variation der Analytkonzentration zeigt wiederum keinen signifikanten Einfluss auf den relativen Responsefaktor. Die Ergebnisse bestätigen nochmals die Annahme, dass die auftretende Ionensuppression durch ein einziges Signal dominiert werden kann und bei einem konstanten Signal des Standards kein Einfluss auf die Ionisationsausbeute des Analyten (in einem gewissen Konzentrationsbereich; vergleichbar mit dem linearen dynamischen Bereich) beobachtet wird, was in konstanten relativen Responsefaktoren resultiert.

**Tabelle 26:** Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C<sub>9</sub>-Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHB/AP als Matrix

Probe	n (Raffinose) [nmol]	n (C <sub>9</sub> ) [nmol]	RR <sub>f</sub>
1	22,7	64,0	4,21 ± 0,53
2	22,7	42,7	4,07 ± 0,28
3	22,7	21,3	3,69 ± 0,81
4	22,7	10,7	4,12 ± 0,58
5	22,7	5,3	3,37 ± 0,55
MW			3,89 ± 0,27

Als nächstes soll überprüft werden, ob der Zusatz einer weiteren ionisierbaren Komponente Einfluss auf die Ionisation der beiden relevanten Substanzen nimmt. Dazu wurde C<sub>11</sub>-Maltosid ebenfalls in unterschiedlicher Konzentration zur Mischung hinzugefügt. Durch das C<sub>11</sub>-Maltosid kommt es zu einer weiteren Konkurrenz-situation zum Standard sowie zum Analyten. Falls die Ionisation des Analyten und

des Standards abhängig von der Zusammensetzung der Mischung ist, so sollte der relative Responsefaktor von der Menge des Zusatzes beeinflusst werden und keine konstanten Werte ergeben.

Tabelle 27 zeigt den relativen Responsefaktor des C<sub>9</sub>-Maltosids in zusätzlicher Abhängigkeit von der Konzentration des Zusatzes C<sub>11</sub>-Maltosid. Es werden auch hier konstante relative Responsefaktoren erhalten, welche ebenfalls reproduzierbar sind.

**Tabelle 27:** Relative Responsefaktoren des C<sub>9</sub>- und C<sub>11</sub>-Maltosids in Abhängigkeit der C<sub>9</sub>- und C<sub>11</sub>-Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHB/AP als Matrix in jeder Probe

Probe	n (Raffinose) [nmol]	n (C <sub>9</sub> ) [nmol]	RR <sub>f</sub> C <sub>9</sub>	n (C <sub>11</sub> ) [nmol]	RR <sub>f</sub> C <sub>11</sub>
1	21,9	61,4	3,80 ± 0,21	73,0	4,24 ± 0,17
2	21,9	40,9	3,73 ± 0,30	48,7	4,07 ± 0,45
3	21,9	20,5	3,79 ± 0,17	24,3	4,01 ± 0,26
4	21,9	10,2	4,26 ± 0,08	12,2	4,34 ± 0,14
5	21,9	5,1	4,12 ± 0,28	6,1	4,16 ± 0,22
<b>MW</b>			3,94 ± 0,13		4,16 ± 0,12

Der Vergleich der relativen Responsefaktoren aus Tabelle 26 und Tabelle 27 zeigt, dass der Zusatz des C<sub>11</sub>-Maltosids, welcher bei der Ionisation in direkter Konkurrenz zum C<sub>9</sub>-Maltosid sowie zur Raffinose steht, keinen Einfluss auf den relativen Responsefaktor ausübt. Dies spiegelt sich in den erhaltenen relativen Responsefaktoren wieder, welche einen identischen Mittelwert liefern.

Damit wird die Annahme bestätigt, dass ein konstantes Signal, bevorzugt das Signal des Standards, die Ionisation dominieren muss und bei einer Verdünnungsreihe nicht verändert werden darf, um konstante relative Responsefaktoren zu erhalten. In diesem Fall ist es möglich, selbst in Anwesenheit weiterer ionisierbarer

Komponenten konstante und auch vergleichbare relative Responsefaktoren zu erhalten. Denkbar wäre auch die Zugabe einer weiteren Substanz, welche die Ionisation dominiert und im Massenspektrum das höchste Signal aufweist, sodass keine Beeinflussung der relativen Responsefaktoren auftritt. Jedoch sollte dabei auch überprüft werden, inwiefern die Substanzklasse dieser Verbindung bei der Bestimmung der relativen Responsefaktoren des Analyten zum Standard eine Rolle spielt.

Im Folgenden wurden die Konzentrationen von Standard und Analyt aus dem Beispiel aus Abbildung 51 mit DHAP als Matrix angepasst, sodass der Standard Raffinose das dominierende Signal im Massenspektrum darstellt. Dazu wurden sechs Proben mit konstanter Raffinose-Konzentration und mit unterschiedlicher C<sub>9</sub>-Maltosid-Konzentration vorbereitet. Während bei den ersten drei Proben das Analyt-Signal die Massenspektren dominierte und daher auch hier kein konstanter relativer Responsefaktor erhalten wurde, überragt das Signal des Standards bei den übrigen drei Proben das Analyt-Signal. Hier ergab der relative Responsefaktor nun keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit mehr (Tabelle 28). Bei den Proben mit abnehmender Analytkonzentration wurde allerdings eine steigende Schwankung des Totalionenstroms beobachtet, die zu einem Anstieg der Standardabweichungen des Responsefaktors führte.

**Tabelle 28:** Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C<sub>9</sub>-Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHAP als Matrix

Probe	n (Raffinose) [nmol]	n (C <sub>9</sub> ) [nmol]	RR <sub>f</sub>	Höchstes Signal im Massenspektrum
1	67,3	133,5	1,45 ± 0,11	Analyt
2	67,3	89,0	0,95 ± 0,04	Analyt
3	67,3	44,5	0,74 ± 0,19	Analyt
4	67,3	22,3	0,50 ± 0,10	Standard
5	67,3	11,1	0,35 ± 0,10	Standard
6	67,3	5,6	0,42 ± 0,10	Standard

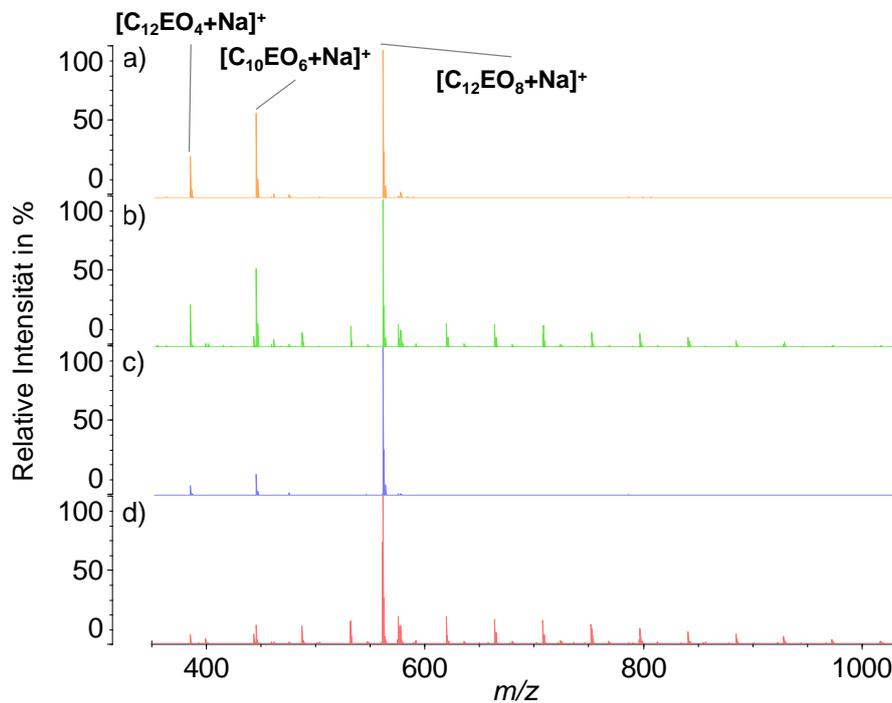
Um das zuvor beschriebene Verhalten für andere Matrices zu bestätigen, wurde unter ähnlichen Bedingungen eine weitere Substanzklasse analysiert. Dabei wurde Dithranol als Matrix verwendet und zwei einzelne Verbindungen eines Fettalkoholethoxylates als Analyten ( $C_{12}EO_4$  und  $C_{10}EO_6$ ) sowie eine weitere als Standard ( $C_{12}EO_8$ ) eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Fettalkoholethoxylat-Polymer hinzugefügt, um die Abhängigkeit des relativen Responsefaktors von der Komplexität der Probe zu beschreiben. Es wurde ein Polymer gewählt, welches auf dem  $C_{13}$ -Fettalkohol basiert, damit die Signale der Analyten und des Standards nicht mit denen des Polymers überlagern. Tabelle 29 zeigt den Vergleich der relativen Responsefaktoren der beiden Analyten  $C_{12}EO_4$  und  $C_{10}EO_6$  mit und ohne Zugabe des Fettalkoholethoxylat-Polymers.

**Tabelle 29:** Vergleich der relativen Responsefaktoren des  $C_{12}EO_4$  und des  $C_{10}EO_6$  mit und ohne FAOE-Polymer in der Mischung.  $C_{12}EO_8$  als interner Standard (104,1 nmol), 10 mg NaCl und 10 mg Dithranol als Matrix in jeder Probe

Probe	n ( $C_{12}EO_4$ ) [nmol]	RR <sub>f</sub> $C_{12}EO_4$	RR <sub>f</sub> mit FAEO	n ( $C_{10}EO_6$ ) [nmol]	RR <sub>f</sub> $C_{10}EO_6$	RR <sub>f</sub> mit FAEO
1	483,4	7,57 ± 1,21	8,76 ± 1,75	260,7	1,91 ± 0,40	2,08 ± 0,29
2	322,3	8,91 ± 0,66	8,12 ± 0,73	173,8	2,16 ± 0,18	2,20 ± 0,09
3	214,9	8,83 ± 1,35	7,72 ± 0,63	115,9	2,07 ± 0,10	2,04 ± 0,04
4	107,4	10,09 ± 1,42	9,22 ± 0,62	57,9	2,32 ± 0,20	2,33 ± 0,34
5	53,7	9,15 ± 1,31	8,83 ± 0,69	29,0	2,15 ± 0,15	2,17 ± 0,02
<b>MW</b>		8,91 ± 0,61	8,56 ± 0,47		2,12 ± 0,11	2,17 ± 0,10

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Anwesenheit weiterer Verbindungen, in diesem Fall eines Polymers, keine Auswirkung auf die Bestimmung des relativen Responsefaktors hat. Die Anwesenheit des Polymers, welches zur gleichen Substanzklasse wie der Analyt und der Standard gehört, beeinflusst die Ionisation der Analyten und des Standards nicht, obwohl deutlich mehr Substanzen in die

Gasphase gebracht werden, was in einer Zunahme der Anzahl der Signale im Massenspektrum deutlich wird (Abbildung 52).



**Abbildung 52:** Massenspektren der zwei FAEO-Analyten bei hoher Konzentration ohne Polymer (a) und mit Polymer (b) sowie bei niedriger Konzentration der Analyten ohne Polymer (c) und mit Polymer (d)

Zusammenfassend geht aus den Untersuchungen hervor, dass die Konzentration des internen Standards so gewählt werden sollte, dass der Standard das höchste Signal im Massenspektrum ausbildet. Es ist bei der Bestimmung von relativen Responsefaktoren mit anschließender Quantifizierung notwendig, die gleiche Konzentration des Standards für alle Analysen zu nutzen. Weitere Zusätze anderer Analyten oder sogar polydisperser Komponenten zeigen keinen Einfluss auf die Bestimmung der relativen Responsefaktoren und daher auch keinen negativen Einfluss auf das Ionisationsverhalten der Probe.

### 4.7.3 Vergleich zwischen CS- und DD-Probenaufgabe

Die Beobachtungen und die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen gelten aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der Massenspektren lediglich für lösungsmittelfreie Probenaufgabetechniken. Lösungsmittelbasierte Probenaufgabetechniken, wie die *Dried-Droplet*-Methode, lassen keine Bestimmung der relativen Responsefaktoren zu. Ein Vergleich der beiden Techniken soll zeigen, wie schnell die DD-Technik bei Einsatz chemisch ähnlicher Substanzen an ihre Grenzen stößt. Hierfür wurden drei Fettalkoholethoxylat-Homologe des gleichen Ethoxylierungsgrades eingesetzt. Für beide Techniken wurde eine Verdünnungsreihe aus einer Mischung aus C<sub>10</sub>EO<sub>8</sub> als interner Standard sowie C<sub>12</sub>EO<sub>8</sub> und C<sub>16</sub>EO<sub>8</sub> als Analyten angesetzt.

Tabelle 30 stellt die aus den Analysen berechneten relativen Responsefaktoren dar. Beide Techniken liefern bei den zwei höchsten Analytkonzentrationen vergleichbare Werte für die Responsefaktoren und Standardabweichungen.

**Tabelle 30:** Relative Responsefaktoren des C<sub>12</sub>EO<sub>8</sub> und des C<sub>16</sub>EO<sub>8</sub> erzielt mit der CS- und der DD-Probenaufgabe. C<sub>10</sub>EO<sub>8</sub> als interner Standard (105,9 nmol)

n (C <sub>12</sub> EO <sub>8</sub> ) [nmol]	CS RR <sub>f</sub> n = 4	DD RR <sub>f</sub> n = 8	n (C <sub>16</sub> EO <sub>8</sub> ) [nmol]	CS RR <sub>f</sub> n = 4	DD RR <sub>f</sub> n = 8
121,2	0,99 ± 0,04	0,98 ± 0,03	113,6	1,04 ± 0,08	0,99 ± 0,07
80,8	0,94 ± 0,04	0,97 ± 0,05	75,7	0,96 ± 0,03	0,98 ± 0,11
53,9	0,99 ± 0,08	0,85 ± 0,07	50,5	0,98 ± 0,01	0,85 ± 0,08
26,9	0,97 ± 0,04	0,77 ± 0,08	25,2	1,00 ± 0,03	0,78 ± 0,14
13,5	0,89 ± 0,03	0,79 ± 0,14	12,6	1,07 ± 0,09	0,88 ± 0,21

Wird die Konzentration der Analyten auf weniger als die Hälfte des Standards verringert, so weichen die relativen Responsefaktoren für die DD-Probenaufgabe deutlich von eins ab und auch die Standardabweichungen steigen merklich an. Die

---

CS-Methode hingegen liefert weiterhin konstante Responsefaktoren mit vergleichbarer Sicherheit.

Die Analyten unterscheiden sich chemisch lediglich in der Anzahl der Methylengruppen des Fettalkohols und weisen daher ein identisches Ionisationsverhalten auf, was sich in den relativen Responsefaktoren von eins widerspiegelt. Dennoch liefert die DD-Technik kristallisationsbedingt keine konstanten Responsefaktoren und auch die Standardabweichungen von bis zu 24% zeigen eine erhöhte Unsicherheit dieser Methode. Die Ergebnisse belegen somit, dass die DD-Technik trotz geringer struktureller Unterschiede zwischen Analyt und Standard keine zuverlässigen Aussagen zulässt. Die mit der CS-Technik erzielten Ergebnisse zeigen jedoch bei allen Analysen einen relativen Responsefaktor von nahezu eins und auch die relativen Standardabweichungen liegen bei maximal 9%, sodass diese Methode zur Quantifizierung in der MALDI-MS herangezogen werden kann.

## 5. Ausblick

Die Optimierung und Anwendung der CS-Technik zeigt das große Potential dieser Probenaufgabe insbesondere im Vergleich zur klassischen *Dried-Droplet*-Technik.

Zur Bestimmung des Polymerisationsgrades von Alkylpolyglucosiden sollten Standards mit einer höheren und definierten Anzahl an Kohlenhydrateinheiten synthetisiert werden, da diese kommerziell nicht erhältlich sind. Mit den entsprechenden Standards könnten anschließend die relativen Responsefaktoren bestimmt werden, um auf diese Weise eine AG-Probe quantifizieren zu können.

Die Bestimmung von relativen Responsefaktoren unter Einsatz weiterer Matrices und Analyten ist notwendig, um zu beschreiben, ob die Abhängigkeit der Responsefaktoren von der Matrix oder von den Analyten ausgeht.

Weiterhin führten nicht alle Analysen von Cytochrom C, Insulin und Bradykinin zu hinreichenden Ergebnissen. Aufgrund der thermischen Belastung während der Vermahlung werden die Analyten möglicherweise zerstört, sodass im Massenspektrum nahezu ausschließlich Fragmente beobachtet werden. Eine Vermahlung unter Kühlung mit einer Kryomühle könnte die Stabilität der Proben gewährleisten und so eine erfolgreiche Analyse ermöglichen.

Die Analyse der peptidhaltigen Realproben zeigte bei den mit der CS-Technik vorbereiteten Proben keine vergleichbaren Ergebnisse zur DD-Technik. Eine mögliche Erklärung stellt trotz durchgeführter Entsalzung der Proben eine zu hohe Salzfracht dar, welche entweder durch die Matrix oder durch die eingesetzten Glasperlen eingetragen wird. Daher sollten die Analysen nach einer Aufreinigung der Matrix und nach Austausch der Glasperlen durch Mahlkugeln, welche keine Alkalimetallionen enthalten, wiederholt werden.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Compressed-Sample*-Probenpräparation hinsichtlich der Massenauflösung und der Reproduzierbarkeit optimiert. Die durchbohrten Probenträger zeigten bei der Analyse der Proben aufgrund des inhomogenen elektrischen Feldes einen starken Verlust an Massenauflösung. Durch den Zusatz von Metallpulver (Kupfer oder Aluminium) konnte die Massenauflösung und zusätzlich die Sensitivität der Analyse deutlich gesteigert werden.

Weiterhin wurden die durchbohrten Targets mit den vorhandenen Vertiefungen durch ein neues Target-Design mit vollständig glatter Oberfläche ersetzt. Gleichzeitig wurde der Durchmesser der Bohrung von zwei Millimeter auf einen Millimeter verringert, wodurch die benötigte Probenmenge reduziert und zugleich die Stabilität der Probenoberfläche beim Entfernen des Objektträgers erhöht wurde. Mit Imaging-Analysen konnte gezeigt werden, dass der Metallpulver-Zusatz und die glatte Oberfläche des neuen Target-Designs zu einer äußerst homogenen Probenoberfläche führen und damit konnte die Laserschuss-zu-Laserschuss-Reproduzierbarkeit über die gesamte Probenoberfläche nochmals deutlich erhöht werden.

Des Weiteren wurden zur Vermahlung des Probenmaterials Kugelmøhlen unterschiedlicher Hersteller eingesetzt, um die stark benutzerabhängige, zeitintensive Vermahlung im Mørser zu ersetzen. Die Møhlen wurden auf die Eignung hinsichtlich einer reproduzierbaren Vermahlung geringer Probenmengen untersucht und lediglich eine Schwingmøhle kam für die weiteren Untersuchungen in Betracht. Für diese Møhle wurden zur Reduktion des notwendigen Mahlguts EdelstahlgefäÙe mit einem Innenvolumen von 400 µL angefertigt und die Vermahlungszeit sowie die eingesetzten Kugeln hinsichtlich Material und GrøÙe optimiert. Unter optimierten Bedingungen können sechs Proben zeitgleich innerhalb von 15 Minuten vermahlen werden und liefern sowohl von Probe zu Probe als auch von Tag zu Tag reproduzierbare Ergebnisse.

Anschließend wurden die ermittelten optimierten Bedingungen der CS-Methode zur Quantifizierung von niedermolekularen Peptiden sowie derivatisierten Kohlenhydraten eingesetzt und lieferten Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden von mindestens 0,99. Ein Vergleich der *Dried-Droplet*- (DD) und der *Compressed-Sample*-Technik zur Analyse einer Peptid-Mischung hat gezeigt, dass bei gleicher Konzentration bei der DD-Technik 2 von 7 Peptiden nicht detektiert werden konnten. Erst bei drastischer Erhöhung der Konzentration konnten schwache Signale für diese beiden Peptide erzielt werden. Die Ergebnisse belegten außerdem, dass bei der DD-Technik die Reproduzierbarkeit von Well zu Well mit relativen Standardabweichungen von bis zu 60% nicht gegeben ist. Bei der CS-Technik hingegen werden bereits bei der geringeren Konzentration relative Standardabweichungen von maximal 11% erreicht.

Die große Unsicherheit der Ergebnisse, welche mit der DD-Technik aufgrund der unterschiedlichen Kristallisation der Analyten bei der Probenaufgabe erhalten werden, bestätigt damit, dass keine quantitativen und nur im beschränkten Maße qualitative Aussagen mit dieser Technik getroffen werden können. Auch die Analyse chemisch eng verwandter Moleküle belegt am Beispiel der Fettalkoholethoxylate die Schwächen der lösungsmittelbasierten Probenvorbereitungstechniken, während die lösungsmittelfreie Technik reproduzierbare und zuverlässige Analysenergebnisse liefert. Die CS-Methode zeigte mit einer relativen Standardabweichung von kleiner 9% die Relevanz dieser Methode.

Des Weiteren wurden kohlenhydrathaltige Realproben analysiert und die Parameter Matrix und Kationisierungssalz, welche für eine MALDI-Analyse stets empirisch ermittelt werden müssen, unter Einsatz der Hauptkomponentenanalyse für diese Proben optimiert. Sowohl mit der CS- als auch der DD-Technik konnten mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse qualitativ hochwertige Massenspektren erzielt werden. Außerdem wurden peptidhaltige Realproben, welche durch Extraktion aus Pflanzen

gewonnen werden, durch eine Entsalzung als Probenvorbereitung erfolgreich analysiert.

Weiterhin wurden unter Einsatz der CS-Technik relative Responsefaktoren sowohl von Kohlenhydraten und deren derivatisierten Homologen als auch von Fettalkoholethoxylaten bestimmt. Die Ionisation bei einer MALDI-Analyse erfolgt für alle Substanzen zeitgleich, sodass Konkurrenzreaktionen unter den Analyten und der eingesetzten Matrix schnell zu einer Ionensuppression führen können. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Zusatz weiterer in Konkurrenz zum Analyten stehender ionisierbarer Komponenten die Bestimmung der relativen Responsefaktoren nicht beeinflusst und somit konstante relative Responsefaktoren erhalten werden.

## 7. Experimenteller Teil

### 7.1 Kalibrierung des MALDI-(TOF)-Massenspektrometers

#### 7.1.1 DD-Probenvorbereitung

Die Massenkalisierung des MALDI-(TOF)-MS für die DD-Probenvorbereitung erfolgte meist mit Polyethylenglycol 2.000. Dazu wurde PEG 2.000 in Methanol in einer Konzentration von 2 mg/mL gelöst und mit einer methanolischen Lösung von DHB ( $c = 10 \text{ mg/mL}$ ) in einem Verhältnis von 1 zu 1 gemischt. Von dieser Mischung wurden  $0,5 \mu\text{L}$  auf die Targetoberfläche pipettiert.

Die Aufnahme des Massenspektrums erfolgte immer bei einer festgesetzten Laserenergie und bei gleicher Einstellung des *Ion-Gates*. Die Massenkalisierung wurde mit Hilfe der Kalibrierfunktion der Shimadzu Software anhand der  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ionenreihe durchgeführt. Die gemessenen Oligomere im Massenbereich zwischen  $1.449,8 \text{ Da}$  ( $n = 32$ ) und  $2.418,4 \text{ Da}$  ( $n = 54$ ) wurden mit den berechneten Massen der Software verglichen und korrigiert, wobei die Toleranz der Peakerkennung bei  $\pm 0,5 \text{ Da}$  lag. Wurde eine Kalibrierung für den unteren Massenbereich benötigt, so wurde die beschriebene PEG-Kalibrierung um die registrierten Massen von Natrium ( $23 \text{ Da}$ ) bzw. Kalium ( $39 \text{ Da}$ ) erweitert oder ein PEG 1.000 bzw. ein PEG 600 zur Massenkalisierung verwendet.

#### 7.1.2 Lösungsmittelfreie Probenvorbereitung

Die Massenkalisierung des MALDI-(TOF)-MS für die lösungsmittelfreie Probenvorbereitung erfolgte ebenfalls mit Polyethylenglycol 2.000. Dazu wurde PEG 2.000 in Methanol (Konzentration  $200 \text{ mg/mL}$ ) gelöst,  $5 \mu\text{L}$  dieser Lösung zu  $20 \text{ mg}$  DHB pipettiert und die Probe homogenisiert. Anschließend wurde das Target von der Rückseite mit dem Probenmaterial gefüllt.

Die Aufnahme des Massenspektrums erfolgte bei einer festgesetzten Laserenergie und bei konstanter *Ion-Gate*-Einstellung. Die Massenkalisierung erfolgte analog zu der in Abschnitt 7.1.1 beschriebenen Methode.

## **7.2 Probenvorbereitung**

### **7.2.1 Lösungsmittelbasierte Analytzugabe**

Es wurde eine Stammlösung des Analyten in dem für den Analyten bevorzugten Lösungsmittel, meist Methanol, hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden die benötigten Verdünnungen angesetzt und anschließend wurden 5  $\mu\text{L}$  auf die Matrix und das Kationisierungssalz pipettiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels, also nach einer kurzen Wartezeit, wurde das Probengemisch homogenisiert.

### **7.2.2 Lösungsmittelfrei im Mörser mit Pistill**

Zu 10 – 20 mg Matrix und gegebenenfalls 10 mg Kationisierungssalz wurden 5  $\mu\text{L}$  der Probenlösung in einen Achatmörser pipettiert und insgesamt vier Minuten mit einem Pistill von außen nach innen homogenisiert. Nach 75 Sekunden, gemessen mit einer Stoppuhr, wurde die Probe im Achatmörser mit einem Mikrospatel von außen nach innen zusammengekratzt. Anschließend wurde die Probe erneut für 75 Sekunden in der gleichen Weise verrieben und erneut zusammengetragen. Zum Schluss wurde die Probe nochmals für 90 Sekunden homogenisiert und zusammengekratzt.

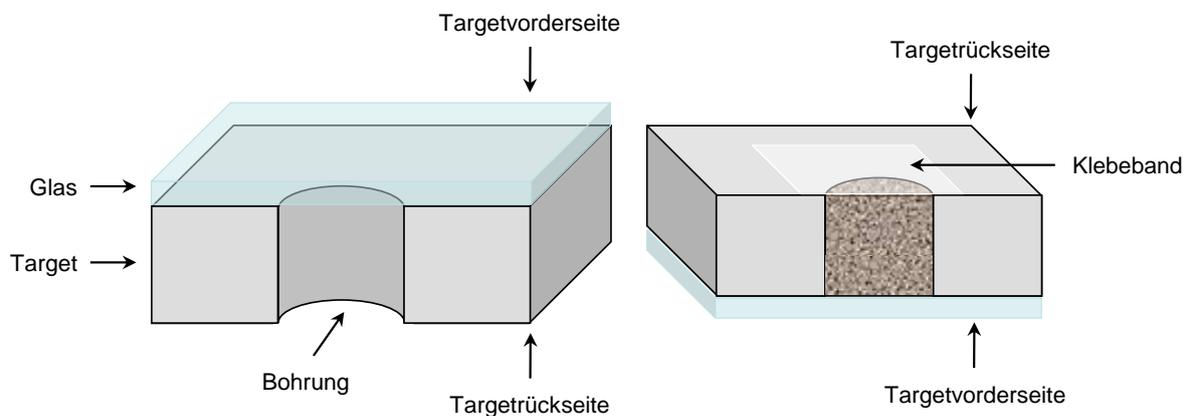
### **7.2.3 Lösungsmittelfrei mit der Schwingmühle Retsch MM**

Zu 10 – 20 mg Matrix und gegebenenfalls 10 mg Kationisierungssalz wurden 5  $\mu\text{L}$  der Probelösung in die hergestellten Edelstahlgefäße pipettiert, eine Glasperle

hinzugefügt und das Gefäß mit einem Deckel verschlossen. Anschließend wurde die Probe in der Schwingmühle 15 Minuten auf der höchsten Stufe vermahlen, wobei die Vermahlung immer nach 5 Minuten unterbrochen wurde, um das an den Gefäßwänden anhaftende Probenmaterial mit einem Mikrospatel zusammenzukratzen. Nach der Vermahlung wurde die Glasperle entnommen und die Probe mit einem Mikrospatel zusammengekratzt.

### 7.2.4 Probenauftragung

Für die Probenauftragung wurde ein Target mit durchbohrten Wells verwendet, auf welchem auf der Targetvorderseite temporär ein Objektträger fixiert wurde. Vier Bohrungen wurden mit einer homogenisierten Probe von der Rückseite des Targets unter mehrmaligem Verdichten mit einem Metallstab gefüllt. Abbildung 53 zeigt eine schematische Darstellung des durchbohrten Targets und eine mit Probengemisch gefüllte Targetbohrung.



**Abbildung 53:** Schematische Darstellung eines durchbohrten Wells und einer mit Probengemisch gefüllten Targetbohrung nach MOOS [121]

Anschließend wurden die Bohrungen ohne Lufteinschluss mit einem Klebeband verschlossen und der Objektträger von der Targetvorderseite abgenommen.

### 7.2.5 Entsalzung mittels ZipTip®-Pipettenspitzen

Die ZipTip®-Pipettenspitzen mit C<sub>18</sub>-Phasenmaterial wurden zunächst durch dreimaliges Spülen mit ACN sowie durch sechsmaliges Spülen mit einer 0,1% wässrigen TFA-Lösung konditioniert. Die Probenlösung (10 µL) wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend 20 mal in die ZipTip®-Pipettenspitze aufgezogen und erneut abgelassen. Die Pipettenspitze wurde im nächsten Schritt 6 mal mit 0,1% wässriger TFA-Lösung gespült. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 5 µL der Elutionslösung (0,1% TFA in ACN/H<sub>2</sub>O 50/50) vorgelegt, wobei im Fall der DD-Technik die Lösung bereits mit Matrix versetzt wurde (10 mg/mL). Die Elutionslösung wurde 20 mal in die Pipettenspitze aufgezogen und abgelassen und im Fall der DD-Technik wurden 0,5 µL der Lösung aus der Pipettenspitze direkt auf die Targetoberfläche appliziert. Bei der CS-Technik wurden 5 µL der entsalzten Probe ohne Matrix auf die feste Matrix pipettiert und anschließend wurde die Probe vermahlen.

### 7.2.6 Entsalzung mittels SPE-Kartuschen

Die Durchführung der Entsalzung orientiert sich an der von GILAR et al. [207] vorgestellten Methode. Die SPE-Kartuschen, gefüllt mit dem entsprechenden Phasenmaterial, wurden zunächst mit ACN und mit 0,1% wässriger TFA-Lösung konditioniert. Das verwendete Volumen der Lösungen wurde je nach Kartusche angepasst. Die Probe wurde in 0,1% wässriger TFA-Lösung gelöst und anschließend durch die SPE-Kartusche gesaugt. Nach erfolgter Adsorption wurde das Phasenmaterial zunächst mit 0,1% wässriger TFA-Lösung und in einem zweiten Schritt mit Reinstwasser gespült. Zur Desorption wurde das Phasenmaterial mit einem Gemisch aus ACN/Wasser (70/30) gespült und diese Lösung anschließend mit einer Vakuumzentrifuge auf ein kleineres Volumen eingengt.

### 7.3 Aufnahme der Massenspektren

Die Aufnahme, Auswertung und Archivierung der MALDI-Massenspektren erfolgte mit der Software Shimadzu Biotech Launchpad™ (Version 2.9.1.20100121, Shimadzu Biotech, Manchester, UK).

Tabelle 31 stellt eine Übersicht über die wichtigsten Parameter zur Aufnahme der MALDI-Massenspektren dar. Meist wurden die angegebenen Bedingungen verwendet, allerdings kamen auch andere Laserraster zum Einsatz.

**Tabelle 31:** Optimierte Geräteeinstellungen für die Aufnahme der MALDI-Massenspektren

Detektor-Modus	Reflektron	Linear
Massenbereich	0,0 – 5.000,0 Da	0 – 70.000 Da
maximale Laserfrequenz	5 Hz	5 Hz
Profile	241 pro Well	241 pro Well
Laserschüsse	2 akkumuliert pro Profil	2 akkumuliert pro Profil
Rastertyp	rund	rund
Anzahl der Spektren	482	482
delayed extraction	optimiert für 2.500 Da	optimiert für 2.500 Da

Ein zusätzlicher Parameter, welcher aufgrund seiner individuellen Einstellungen nicht in Tabelle 31 dargestellt ist, ist die Laserenergie. Die Laserenergie konnte mit Hilfe der Software in ganzen Zahlen von 0 - 180 variiert werden. Bei den meisten Messungen lag dieser Wert zwischen 30 und 60.

Zur Aufnahme der Imaging-Analysen wurden die vielen Parameter stets variiert, jedoch stellt Tabelle 32 die am häufigsten verwendeten Geräteeinstellungen dar. Je nach Fragestellung wurde lediglich die Rastergröße verändert. Die Auswertung und Visualisierung der Imaging-Aufnahmen wurde mit der Software BioMap 3.7.5.6 durchgeführt.

**Tabelle 32:** Geräteeinstellungen für die Aufnahme der Imaging-MALDI-Massenspektren

Detektor-Modus	Reflektron
Massenbereich	0,0 – 5.000,0 Da
maximale Laserfrequenz	25 Hz
Profile	1.681 pro Well
Laserschüsse	50 akkumuliert pro Profil
Raster	41 x 41 Profile
Rastertyp	quadratisch
Anzahl der Spektren	84.050
delayed extraction	optimiert für 2.500 Da

## 7.4 Geräte und Materialien

### 7.4.1 Massenspektrometer

Die Daten des verwendeten Massenspektrometers AXIMA Performance™ entstammen dem technischen Datenblatt des Geräts:

Ionenquelle	MALDI, gepulst, Positiv-Modus, <i>Pulsed Extraction</i>
Laser	Stickstofflaser, 337 nm, fixierter Fokus Pulsbreite 3 ns Nominal-Laserenergie 100 µJ/Laserschuss
Massenanalysator	Reflektron-TOF, Driftstrecke 2,0 m Linear-TOF, Driftstrecke 1,2 m
Stoßkammer	20 keV Hochenergie CID MS/MS
Detektor	MCP (Reflektron-Modus)
Analysenbetrachtung	monochromatische CCD Kamera (25-fache Vergrößerung)
Probenteller (Targets)	Targets mit Vertiefung: Edelstahl-Target, 2 mm dick (384 Wells) Edelstahl-Target, 2 mm dick, 96 Bohrungen (Ø 2 mm) Edelstahl-Target, 2 mm dick, 40 Bohrungen (Ø 2 mm)

Targets ohne Vertiefung:

Edelstahl-Target, 2 mm dick, 32 Bohrungen ( $\varnothing$  1 mm)

Edelstahl-Target, 2 mm dick, 40 Bohrungen ( $\varnothing$  1 mm)

PC-System

Intel® Core™2 6600; 2,4 GHz; 2,0 GB RAM

#### 7.4.2 Geräte und Materialien zur Probenvorbereitung

- Feinwaage BA 210 S (210 g/max, d = 0,1 mg), Sartorius, Göttingen, D
- Feinwaage BP 221 S (220 g/max, d = 0,1 mg), Sartorius, Göttingen, D
- Analysenwaage M2P (2 g/max), Sartorius, Göttingen, D
- Schwingmühle Freezer Mill 6770, C3 Prozess- und Analysentechnik, Haar, D
- Schwingmühle Bead Ruptor Homogenizer, Omni International, Kennesaw, US
- Schwingmühle MM, Retsch Technology, Haan, D
- Laser-Streulichtspektrometer LA-950, Retsch Technology, Haan, D
- Zentrifuge Minispin, Eppendorf, Hamburg, D
- Vortex Schüttler Minishaker MS2, IKA®-Labortechnik, Staufen, D
- Trockenschrank Function Line T6, Heraeus®-Instruments, Hanau, D
- Ultraschallbad USR 30 H, Merck eurolab, Bruchsal, D
- Wasseraufbereitungssystem, GenPure UV-TOC/UF, TKA, Niederelbert, D
- Vakuumzentrifuge, RC 10.22, Thermo Scientific, Dreieich, D
- Kältefalle, RCT 90, Thermo Scientific, Dreieich, D
- SPE-Vorrichtung LiChrolut, Merck, Darmstadt, D
- Multi®-Reaktionsgefäß 0,65 mL, Roth, Karlsruhe, D
- Rotilabo®-Reaktionsgefäß 1,5 mL, Roth, Karlsruhe, D
- Transferpetten®, 0,1 - 1  $\mu$ L, 0,5 - 10  $\mu$ L, 10 - 100  $\mu$ L und 100 - 1000  $\mu$ L Brand, Wertheim, D
- Pipettenspitzen für Transferpetten®:
  - 0,1 - 20  $\mu$ L (farblos), Brand, Wertheim, D
  - 0,5 - 10  $\mu$ L (farblos), Sarstedt, Nümbrecht, D
  - 1 - 200  $\mu$ L (gelb), Roth, Karlsruhe, D

- 
- 100 - 1000  $\mu\text{L}$  (blau), Roth, Karlsruhe, D
  - Pipettenspitzen ZipTip<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, Merck Millipore, Billerica, MA, USA
  - Stahlkugeln, Fabrikat Martin, nach DIN 5401, Material 1,3505, Abmessungen 2,0 mm, 2,5 mm, 3,0 mm, 3,5 mm und 4,0 mm, Isometall, Pleidelsheim, D
  - Glasperlen, Roth, Karlsruhe, D
    - Durchmesser: 0,75 – 1,0 mm
    - Durchmesser: 1,25 – 1,65 mm
    - Durchmesser: 2,85 - 3,3 mm
  - Glasperlen, Durchmesser 4 mm ,Assistent, Sondheim, D
  - MahlgefäÙe, Edelstahl, Durchmesser 1,4 cm, Innenvolumen 0,4 mL, Bergische Universität Wuppertal, D
  - Stahlstift, Länge 9,4 cm, Durchmesser 0,5 cm, Durchmesser an der Spitze 0,5 mm, Bergische Universität Wuppertal, D
  - KIMTECH<sup>®</sup> Science Präzisionstücher (weiß; 11,4 x 21,3 cm), Kimberly-Clark, Koblenz, D
  - Klebeband Magic<sup>™</sup> Scotch<sup>®</sup>, 19 mm breit, 3M, Neuss, D
  - Rührspatel (klar, PS), Roth, Karlsruhe, D
  - Einmal-Wägeschiffchen (klar, PS), Roth, Karlsruhe, D
  - Mörser und Pistill aus Achat, Roth, Karlsruhe, D
  - Objektträger (geschnitten), Roth, Karlsruhe, D
  - SPE-Kartuschen
    - ABS Elut – Nexus, 200 mg, 6 mL, Agilent, Böblingen, D
    - Oasis HLB 3cc, 60 mg, Waters, Eschborn, D
    - Bond Elut PH, 1 g, 6 mL, Agilent, Böblingen, D
    - LiChrolut RP-18 E, 500 mg, Merck, Darmstadt, D
    - Chromabond C18 ec, 500 mg, Macherey-Nagel, Düren, D

## 7.5 Chemikalien

Verwendete Standards:

- Bacitracin, AppliChem, Darmstadt, D
- Bovin Serum Albumin (BSA),
- Bradykinin,  $\geq 99,0\%$ , Merck, Darmstadt, D
- Cytochrom C from equine heart,  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- D-(+)-Raffinose Pentahydrat,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Gramicidin, AppliChem, Darmstadt, D
- Insulin human, rekombinant, exprimiert aus Hefe, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- *n*-Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid, AppliChem, Darmstadt, D
- *n*-Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid, AppliChem, Darmstadt, D
- Peptid-Mischung (Calibration Mixture for PMF reflectron calibrations), Shimadzu Europa, Duisburg, D
- Peptid-Mischung, Peptide Molecular Weight Marker 2.500 – 17.000 Da, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Polyethylenglycol 2.000 (PEG 2.000), Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
- *n*-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid,  $\geq 98\%$  (GC), Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- *n*-Decyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid,  $\geq 98\%$  (GC), Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid,  $\geq 98\%$  (GC), Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- *n*-Tetradecyl- $\beta$ -D-Maltosid,  $\geq 99,0\%$  (DC), Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- D-(+)-Glucose, wasserfrei, Merck, Darmstadt, D
- Maltose-Monohydrat, Merck, Darmstadt, D
- Hexaethylenglycol-Monodecylether (C<sub>10</sub>EO<sub>6</sub>), Nikko Chemicals, Tokyo, JP
- Octaethylenglycol-Monodecylether (C<sub>10</sub>EO<sub>8</sub>), Nikko Chemicals, Tokyo, JP
- Tetraethylenglycol-Monododecylether (C<sub>12</sub>EO<sub>4</sub>), Nikko Chemicals, Tokyo, JP
- Octaethylenglycol-Monododecylether (C<sub>12</sub>EO<sub>8</sub>), Nikko Chemicals, Tokyo, JP
- Octaethylenglycol-Monohexadecylether (C<sub>16</sub>EO<sub>8</sub>), Nikko Chemicals, Tokyo, JP

## Matrices:

- 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 99%, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), puriss. p.a., Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 2',4',6'-Trihydroxyacetophenon (THAP),  $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- 2',6'-Dihydroxyacetophenon (DHAP), 98%, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- 3,4-Diaminobenzophenon (DABP), 97%, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- 3-Aminochinolin (AQ), 98%, Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- 6,7-Dihydroxycumarin (DHC),  $\geq 98\%$ , Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- Aminopyrazin (AP),  $> 99\%$ , Acros Organics, Geel, B
- Dithranol,  $\geq 98,5\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Sinapinsäure (SA),  $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycimtsäure (HCCA),  $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, D

## Salze:

- Kaliumchlorid,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Natriumchlorid, puriss. p.a., Sigma-Aldrich, Steinheim, D

## Lösungsmittel:

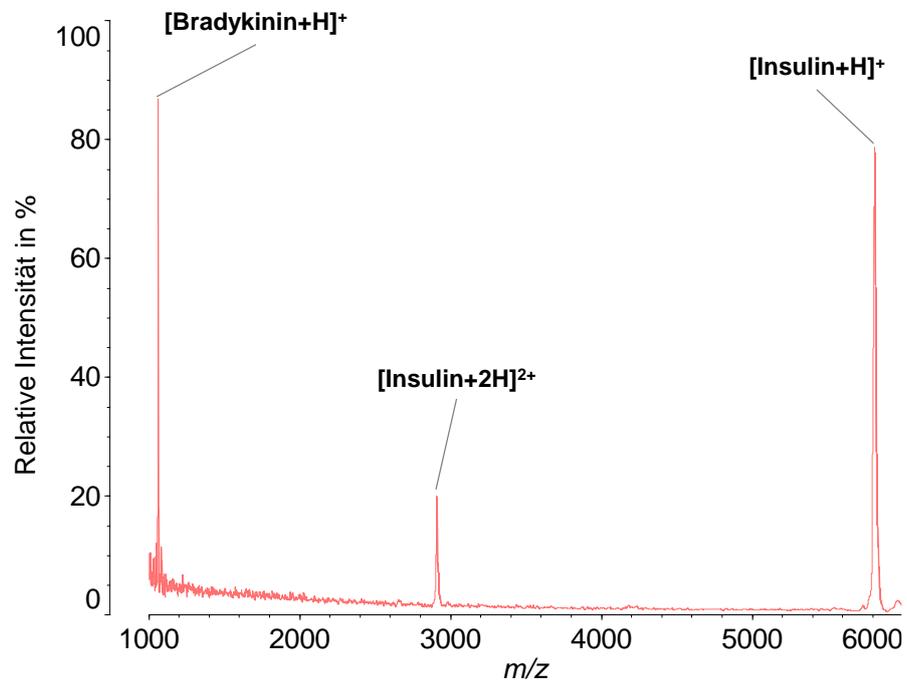
- Aceton, HiPerSolv CHROMANORM (HPLC), VWR, Darmstadt, D
- Aceton, ROTIPURAN<sup>®</sup>,  $\geq 99,8\%$  p.a., Roth, Karlsruhe, D
- Acetonitril, ROTIPURAN<sup>®</sup>,  $\geq 99,5\%$  p.a., Roth, Karlsruhe, D
- Ethanol, ROTIPURAN<sup>®</sup>,  $\geq 99,8\%$  p.a., Roth, Karlsruhe, D
- Methanol (HPLC), Acros Organics, Geel, B
- Methanol, ROTIPURAN<sup>®</sup>,  $\geq 99,9\%$  p.a., Roth, Karlsruhe, D
- Millipore-Wasser (Wasseraufbereitungssystem, GenPure UV-TOC/UF, TKA, Niederelbert, D)

### Weitere Chemikalien:

- Aluminium, Pulver, (7 – 15  $\mu\text{m}$ ), Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- Aluminium, Pulver, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Aluminiumoxid, Pulver (< 10  $\mu\text{m}$ ), 99,7 %, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Ameisensäure, puriss. p.a., Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Helium, Reinheit 5.0, Messer, Sulzbach, D
- Kupfer , Pulver, sphärisch, (10  $\mu\text{m}$ ), Alfa Aesar, Karlsruhe, D
- Kupfer, Pulver (< 63  $\mu\text{m}$ ), Merck, Darmstadt, D
- Trifluoressigsäure (TFA),  $\geq 99,0\%$  (GC), Sigma-Aldrich, Steinheim, D

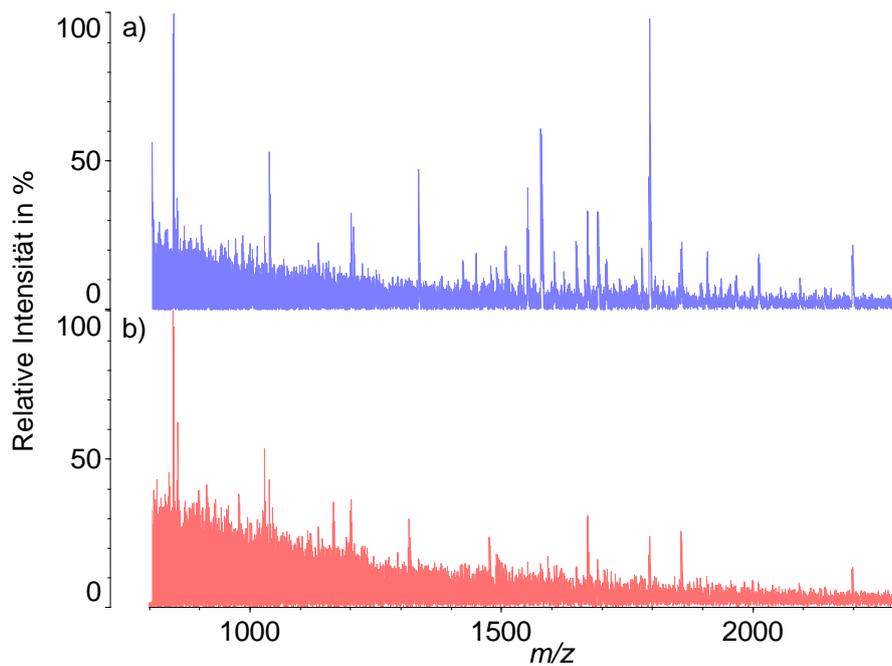
## 8. Anhang

### 8.1 Weitere Abbildungen

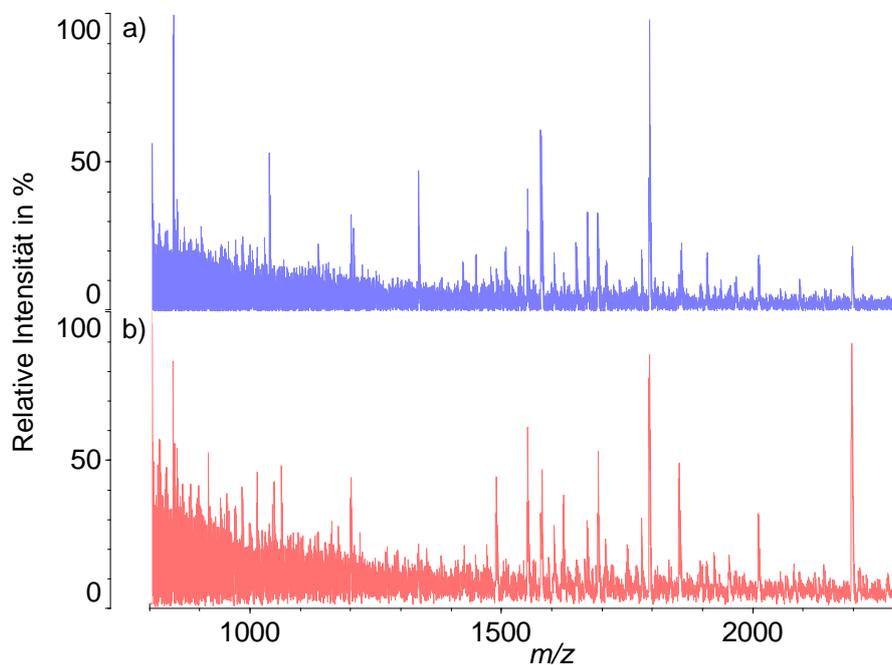


**Abbildung 54:** Massenspektrum der Peptid-Mischung aus Bradykinin und Insulin

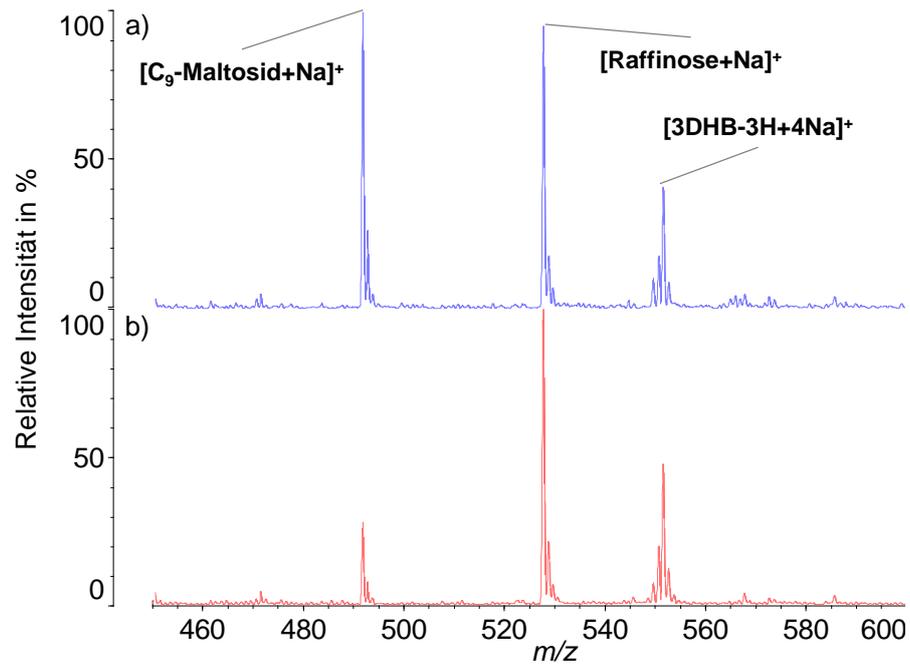




**Abbildung 57:** Massenspektren einer entsalzten Peptidprobe ohne Zusatz von Kohlenhydraten unter Einsatz von SA (a) und HCCA (b) als Matrix



**Abbildung 58:** Massenspektren einer entsalzten Peptidprobe ohne Kohlenhydrate (a) und mit Kohlenhydraten (b) unter Einsatz von SA als Matrix



**Abbildung 59:** Massenspektrum der ersten Probe (a) und der dritten Probe (b) aus Tabelle 25.

Zuordnung des Matrix-Signals nach [146, 208, 209]

## 8.2 Weitere Tabellen

**Tabelle 33:** Auswertung der Peakintensität (I) sowie der Peakfläche (A) des einfach geladenen Ions zum zweifach geladenen Ion von Insulin (Ins) aus 6 unterschiedlichen Probenpräparationen an 2 Tagen

Probe	$I(\text{Ins}^+) / I(\text{Ins}^{2+})$	rel. s [%]	$A(\text{Ins}^+) / A(\text{Ins}^{2+})$	rel. s [%]
	$\times 10^{-2}$ (n = 4)		$\times 10^{-2}$ (n = 4)	
1a	29,2 ± 2,86	9,8	18,9 ± 2,06	10,9
1b	27,9 ± 1,90	6,8	18,4 ± 1,41	7,7
1c	28,6 ± 0,43	1,5	17,9 ± 0,73	4,1
2a	24,3 ± 0,79	3,3	16,3 ± 0,49	3,0
2b	24,4 ± 1,13	4,6	15,4 ± 0,87	5,6
2c	25,5 ± 1,02	4,0	16,2 ± 0,85	5,2
MW	26,7 ± 0,89	3,3	17,2 ± 0,57	3,3

**Tabelle 34:** Übersicht über die eingesetzten Matrices und die TFA-Konzentrationen

Matrix	TFA
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	ohne
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizsäure (HCCA)	0,1
3,4-Diaminobenzophenon (DABP)	0,5
Sinapinsäure (SA)	-
2',4',6'-Trihydroxyacetophenon (THAP)	-
2',6'-Dihydroxyacetophenon (DHAP)	-
DHB + Aminopyrazin (AP)	-
3-Aminochinolin (AQ)	-
6,7-Dihydroxycumarin (DHC)	-

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer MALDI-Ionenquelle nach WULF [34].....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Linear-/Reflektron-MALDI-TOF-MS nach WULF [34] .....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Bohrung im Target mit aufgesetzter Glasplatte und einer mit Probengemisch gefüllten Targetbohrung nach MOOS [121] .....	16
Abbildung 4: Allgemeine Strukturformel eines Alkylpolyglucosids.....	19
Abbildung 5: Allgemeine Strukturformel eines Fettalkoholethoxylates .....	19
Abbildung 6: Strukturformel des eingesetzten Polyethylenglycols .....	20
Abbildung 7: Allgemeine Struktur einer Aminosäure (a) und eines Peptids (b) .....	20
Abbildung 8: MALDI-(TOF)-Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP: n = 44) erzielt durch die Analyse einer Position im äußeren Bereich des Wells (a), einer Position im Zentrum des Wells (b) und des gesamten Wells unter Einsatz eines quadratisches Rasters 1,5 x 1,5 mm mit 961 Positionen (c).....	24
Abbildung 9: Massenspektrum eines PEG 2.000 Oligomers (DP: n = 42) erzielt durch den Einsatz unterschiedlicher Laserraster. Quadratisches Raster 1 x 1 mm mit 4489 Positionen (a), rundes Raster Ø 450 µm mit 199 Positionen (b), rundes Raster Ø 200 µm mit 163 Positionen (c) und 163 Laserschüsse manuell eingestellt im Zentrum des Wells (d) .....	25
Abbildung 10: Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP: n = 42) ohne metallisches Pulver (a), mit Aluminium (b) und Kupfer (c) als Füllmaterial. Quadratisches Laserraster 2 x 2 mm mit 1681 Positionen.....	27
Abbildung 11: Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP: n = 42) ohne metallisches Pulver (a) und (d), mit Aluminiumpulver (b) und (e) und mit Kupferpulver (c) und (f) in der Probe. Quadratisches Laserraster 1 x 1 mm mit 4489 Positionen (a) – (c) und rundes Laserraster Ø 450 µm mit 199 Positionen (d) – (f).....	29
Abbildung 12: Massenspektren eines PEG 2.000 Oligomers (DP: n = 42) ohne metallisches Pulver (a) bis (c) und mit Aluminiumpulver (d) bis (f) in der Probe. Alle Spektren sind skaliert auf das Massenspektrum von Probe (f).....	30
Abbildung 13: Fotografie eines Targetausschnitts mit ungleichmäßig gefrästen Bohrungen aus [137] .....	33

---

Abbildung 14: MALDI-Imaging eines PEG 2.000 Oligomers mit den angegebenen Polymerisationsgraden. Analysen (a) und (b) aus [137] wurden ohne metallischen Zusatz und (c) und (d) unter Einsatz von Aluminiumpulver als Füllmaterial erhalten .....	34
Abbildung 15: Fotografie der Targets mit einer Bohrung im Zentrum (a) und mit fünf Bohrungen (b).....	35
Abbildung 16: MALDI-Imaging eines PEG 2.000 Oligomers mit einem Polymerisationsgrad von $n = 43$ bei Einsatz des Targets mit einer Bohrung (a) und mit fünf Bohrungen (b).....	36
Abbildung 17: MALDI-Imaging eines PEG 2.000 Oligomers mit einem Polymerisationsgrad von $n = 42$ (a) und $n = 52$ (b) bei Einsatz des Targets mit einer Bohrung und 11% Aluminiumpulver in der Probe.....	37
Abbildung 18: Fotografie eines Targets mit einem Design bestehend aus $4 \times 8$ Bohrungen ...	38
Abbildung 19: Fotografie der Hülse mit Stempel von der Seite (a), von oben (b) und von der Seite bei eingesetztem Stempel in der Hülse (c).....	46
Abbildung 20: Fotografie der Edelstahlgefäße mit einem Volumen von 0,4 mL neben einem kommerziell erhältlichen 2-mL-Mikroreaktionsgefäß .....	50
Abbildung 21: Intensitätsverhältnis von $C_{11}$ -Maltosid zu Raffinose in Abhängigkeit der Vermahlungsdauer.....	54
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Partikelgrößenverteilung einer Probe, bestehend aus Matrix, Salz und Raffinose, nach einer Vermahlungszeit von 10 Minuten (blau) und 20 Minuten (rot).....	56
Abbildung 23: Kalibriergerade von $n$ -Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid und $n$ -Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid mit Raffinose als interner Standard und etwa 20 mg der Matrix-Salz-Mischung an zwei Tagen (a) und (b) .....	59
Abbildung 24: Kalibriergerade von $n$ -Nonyl- $\beta$ -D-Maltosid und $n$ -Undecyl- $\beta$ -D-Maltosid mit Raffinose als interner Standard und etwa 20 mg der Matrix-Salz-Mischung (Daten an zwei Tagen aufgenommen).....	60
Abbildung 25: MALDI-Imaging drei verschiedener PEG 2.000 Oligomere von 2 Proben (a) – (c) und (d) – (f) mit einem Polymerisationsgrad von $n = 32$ (a) und (d), $n = 42$ (b) und (e) und $n = 52$ (c) und (f).....	61

Abbildung 26: Kalibriergerade von Bacitracin und Gramicidin mit Bradykinin als interner Standard und etwa 20 mg der vorab unzerkleinerten Matrix Sinapinsäure an zwei Tagen.....	62
Abbildung 27: Kalibriergerade von Bacitracin und Gramicidin mit Bradykinin als interner Standard und etwa 20 mg der vorab zerkleinerten Matrix Sinapinsäure an zwei Tagen.....	63
Abbildung 28: Vergleich zwischen der CS- (a) und der DD-Methode (b) anhand der Massenspektren von 7 Peptiden mit HCCA als Matrix .....	67
Abbildung 29: Vergleich zwischen der CS- (a) und der DD-Methode (b) anhand der Massenspektren von 7 Peptiden mit 40-fach höherer Konzentration bei der DD-Methode mit HCCA als Matrix .....	68
Abbildung 30: Vergleich der Massenspektren mit der CS- (a) und der DD-Methode (b) von 7 Peptiden im Molekulargewichtsbereich 2.400 – 17.500 Da.....	70
Abbildung 31: Massenspektrum von BSA erzielt mit der CS-Methode und Sinapinsäure als Matrix .....	71
Abbildung 32: Massenspektren der Peptid-Mischung gelöst in einer wässrigen (a) und einer methanolischen (b) 0,1% TFA-Lösung mit HCCA als Matrix .....	74
Abbildung 33: Massenspektren der Peptide Bradykinin und Bacitracin A, B und C unter Einsatz einer wässrigen (a), methanolischen (b) und ethanolischen (c) 0,1% TFA-Lösung mit HCCA als Matrix .....	75
Abbildung 34: Massenspektren des Peptid-Gemisches unter Anwendung der CS- (a), (b) und der DD-Technik (c), (d) mit HCCA als Matrix .....	78
Abbildung 35: Auftragung der relativen Standardabweichung für 7 Peptide erzielt mit der CS- und der DD-Technik bei unterschiedlichen Bedingungen.....	81
Abbildung 36: Massenspektrum der Peptid-Mischung bestehend aus Bradykinin, Insulin und Cytochrom C mit HCCA als Matrix.....	84
Abbildung 37: Massenspektren der Peptid-Mischung aus Bradykinin, Insulin und Cytochrom C nach der Entsalzung mit ZipTip®-Pipettenspitzen. Analyse der Probe mit der DD-Technik (a), der vermahlenden Probe mit der CS-Technik (b) und der vermahlenden Probe mit der DD-Technik (c) mit HCCA als Matrix...	88
Abbildung 38: Qualitativ hochwertiges Massenspektrum einer kohlenhydrathaltigen Probe mit DHB als Matrix ohne Salz- und TFA-Zusatz .....	92

---

Abbildung 39: Hauptkomponentenanalyse zu Versuchsplan 1. Darstellung der Matrices in unterschiedlichen Farben, DHB (blau), HCCA (rot), THAP (grün), SA (hellblau) und DABP (orange) .....	93
Abbildung 40: Vergleich der Massenspektren einer kohlenhydrathaltigen Probe erzielt mit der CS-Technik (a) und mit <i>Ion-Gate</i> ab 900 (b), der DD-Technik (c) mit DHB als Matrix ohne Salz- und ohne TFA-Zusatz und der CS-Technik mit DABP als Matrix ohne Salz- und ohne TFA-Zusatz (d) .....	95
Abbildung 41: Vergleich der Massenspektren eines Pflanzenextrakts erzielt mit der CS- (a) und der DD-Technik (b) mit DHB als Matrix ohne Salz- und ohne TFA-Zusatz .....	97
Abbildung 42: Massenspektrum einer nicht entsalzten (a) und einer entsalzten (b) Peptidprobe und des Rückstandes nach der Entsalzung der Peptidprobe (c) ohne Zusatz von Kohlenhydraten unter Einsatz von SA als Matrix .....	99
Abbildung 43: Vergleich der Massenspektren einer Peptidprobe entsalzt mit einer ZipTip®-Pipettenspitze (a) und einer SPE-Kartusche Waters HLB (b) unter Einsatz von SA als Matrix mit der DD-Technik. Entsalzung mit SPE-Kartusche Waters HLB erzielt mit der CS-Technik (c) .....	101
Abbildung 44: Vergleich der Massenspektren der reinen kohlenhydrathaltigen Probe (a) und einer Mischprobe (b) mit der DD-Technik und DHB als Matrix und einer Mischprobe mit der CS-Technik und DABP als Matrix (c) .....	103
Abbildung 45: Massenspektren der Mischprobe mit DHB von der nicht entsalzten Probe (a), dem Rückstand nach der Entsalzung (b) und der entsalzten Probe (c) .....	105
Abbildung 46: Massenspektrum einer AG-Probe mit DHB/AP als Matrix und NaCl als Kationisierungssalz .....	106
Abbildung 47: Diagramm der Intensitätsverhältnisse des C <sub>8</sub> -Dreifachzuckers zum internen Standard Raffinose der Proben A bis D mit der Standardabweichung aus jeweils 4 Analysen .....	107
Abbildung 48: Auftragung des Intensitätsverhältnisses einer AG-Probe von Analyt zu Standard in Abhängigkeit der Polymerkonzentration mit DHB/AP als Matrix und NaCl als Kationisierungssalz .....	108
Abbildung 49: Massenspektren zweier Maltoside und Raffinose mit HCCA (a), AQ (b), DHC (c), THAP (d) und DHAP (e) als Matrix .....	110

Abbildung 50: Auftragung des Intensitätsverhältnisses einer AG-Probe von Analyt zu Standard in Abhängigkeit der Analytkonzentration mit DHAP als Matrix und NaCl als Kationisierungssalz .....	111
Abbildung 51: Auftragung des relativen Responsefaktors in Abhängigkeit der C <sub>11</sub> -Maltosid-Konzentration. Raffinose (18,6 mg/mL, 4,7 mg/g Probe) wurde als interner Standard verwendet. 10 mg NaCl und 10 mg DHAP als Matrix in jeder Probe .....	116
Abbildung 52: Massenspektren der zwei FAEO-Analyten bei hoher Konzentration ohne Polymer (a) und mit Polymer (b) sowie bei niedriger Konzentration der Analyten ohne Polymer (c) und mit Polymer (d).....	123
Abbildung 53: Schematische Darstellung eines durchbohrten Wells und einer mit Probengemisch gefüllten Targetbohrung nach MOOS [121] .....	132
Abbildung 54: Massenspektrum der Peptid-Mischung aus Bradykinin und Insulin.....	141
Abbildung 55: Hauptkomponentenanalyse zu Versuchsplan 2. Darstellung der Matrices in unterschiedlichen Farben: DHB (blau), HCCA (rot), DHC (hellgrün), AQ (grau), DHB+AP (rosa), THAP (braun), DHAP (dunkelgrün), SA (hellblau) und DABP (orange) .....	142
Abbildung 56: Massenspektren einer Peptidprobe ohne Zusatz von Kohlenhydraten unter Einsatz von DHB (a), HCCA (b), DABP (c) und SA (d) als Matrix.....	142
Abbildung 57: Massenspektren einer entsalzten Peptidprobe ohne Zusatz von Kohlenhydraten unter Einsatz von SA (a) und HCCA (b) als Matrix.....	143
Abbildung 58: Massenspektren einer entsalzten Peptidprobe ohne Kohlenhydrate (a) und mit Kohlenhydraten (b) unter Einsatz von SA als Matrix .....	143
Abbildung 59: Massenspektrum der ersten Probe (a) und der dritten Probe (b) aus Tabelle 25. Zuordnung des Matrix-Signals nach [146, 208, 209] .....	144

---

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auswertung eines PEG 2.000 Peaks $[M + Na]^+$ (DP: $n = 42$ ) mit unterschiedlichen Mengen an Aluminiumpulver.....	32
Tabelle 2:	Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen.....	41
Tabelle 3:	Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen.....	43
Tabelle 4:	Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen.....	45
Tabelle 5:	Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen.....	47
Tabelle 6:	Auswertung der Peakintensitäten des Analyten zum Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen.....	48
Tabelle 7:	Intensitätsverhältnisse von Analyt zu Standard (Raffinose) mit den zugehörigen relativen Standardabweichungen in Abhängigkeit vom Glasperlendurchmesser. Die Analysen mit 4 mm Perlendurchmesser wurden mit anderen Analyt-Konzentrationen durchgeführt .....	53
Tabelle 8:	Vergleich der Intensitätsverhältnisse und der zugehörigen Standardabweichungen zwischen der Vermahlung mittels Mörser und Kugelmühle .....	58
Tabelle 9:	Verhältnis der Peakintensität und der zugehörigen Standardabweichung von Bacitracin und Gramicidin zum Standard Bradykinin in Abhängigkeit der Lagerungszeit und Sinapinsäure als Matrix .....	65
Tabelle 10:	Übersicht über die sieben eingesetzten Peptide mit Angabe des Molekulargewichts und des molaren Matrix-zu-Analyt-Verhältnisses (M/A) für die DD- und die CS-Technik.....	66
Tabelle 11:	Übersicht über die sieben eingesetzten Peptide mit Angabe des Molekulargewichts .....	69
Tabelle 12:	Zusammensetzung der verwendeten Peptid-Mischung mit Angabe des Molekulargewichts, der Konzentration und des molaren Matrix/Analyt-Verhältnisses.....	73

Tabelle 13:	Verhältnis der Peakintensitäten der Peptide zum Standard Glu-1-Fibrinopeptid mit der zugehörigen relativen Standardabweichung erzielt mit der CS- und der DD-Technik .....	79
Tabelle 14:	Verhältnis der Peakintensität der Peptide zum Standard Glu-1-Fibrinopeptid mit der zugehörigen relativen Standardabweichung erzielt mit der DD-Technik unter Einsatz eines größeren Laserrasters .....	80
Tabelle 15:	Zusammensetzung der Peptid-Mischung aus Bradykinin und Insulin .....	82
Tabelle 16:	Auswertung der Peakintensität (I) sowie der Peakflächen (A) von Insulin (Ins) zu Bradykinin (Brad) aus 6 unterschiedlichen Probenpräparationen an 2 Tagen	83
Tabelle 17:	Zusammensetzung der Peptid-Mischung aus Bradykinin [176, 177], Insulin [178, 179] und Cytochrom C [180, 181] unter Angabe des Molekulargewichts, der Aminosäureanzahl und der Konzentration .....	84
Tabelle 18:	Verhältnisse der Peakflächen von Bradykinin (Brad), Insulin (Ins) und Cytochrom C (Cyto) von 4 Proben an verschiedenen Tagen .....	85
Tabelle 19:	Verhältnisse der Peakflächen von Bradykinin (Brad), Insulin (Ins) und Cytochrom C (Cyto) von zwei entsalzten Proben.....	87
Tabelle 20:	Übersicht über die eingesetzten Matrices, die Salze und die TFA-Konzentrationen.....	90
Tabelle 21:	Übersicht über die hergestellten Mischungen 1 – 3 .....	113
Tabelle 22:	Relative Responsefaktoren der Analyten zum Standard C <sub>11</sub> -Maltosid bestimmt aus der Analyse von 3 Proben und jeweils 4 Messungen .....	114
Tabelle 23:	Relative Responsefaktoren der Analyten zum Standard C <sub>11</sub> -Maltosid in den angegebenen Mischungen bestimmt aus der Analyse von 3 Proben und jeweils 4 Messungen.....	115
Tabelle 24:	Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C <sub>11</sub> -Maltosid-Konzentration. C <sub>9</sub> -Maltosid als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHAP als Matrix in jeder Probe .....	117
Tabelle 25:	Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C <sub>9</sub> -Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHB/AP als Matrix in jeder Probe .....	118

---

Tabelle 26:	Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C <sub>9</sub> -Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHB/AP als Matrix .....	119
Tabelle 27:	Relative Responsefaktoren des C <sub>9</sub> - und C <sub>11</sub> -Maltosids in Abhängigkeit der C <sub>9</sub> - und C <sub>11</sub> -Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHB/AP als Matrix in jeder Probe.....	120
Tabelle 28:	Relativer Responsefaktor in Abhängigkeit der C <sub>9</sub> -Maltosid-Konzentration. Raffinose als interner Standard, 10 mg NaCl und 10 mg DHAP als Matrix ..	121
Tabelle 29:	Vergleich der relativen Responsefaktoren des C <sub>12</sub> EO <sub>4</sub> und des C <sub>10</sub> EO <sub>6</sub> mit und ohne FAOE-Polymer in der Mischung. C <sub>12</sub> EO <sub>8</sub> als interner Standard (104,1 nmol), 10 mg NaCl und 10 mg Dithranol als Matrix in jeder Probe ....	122
Tabelle 30:	Relative Responsefaktoren des C <sub>12</sub> EO <sub>8</sub> und des C <sub>16</sub> EO <sub>8</sub> erzielt mit der CS- und der DD-Probenaufgabe. C <sub>10</sub> EO <sub>8</sub> als interner Standard (105,9 nmol) .....	124
Tabelle 31:	Optimierte Geräteeinstellungen für die Aufnahme der MALDI-Massenspektren .....	134
Tabelle 32:	Geräteeinstellungen für die Aufnahme der Imaging-MALDI-Massenspektren .....	135
Tabelle 33:	Auswertung der Peakintensität (I) sowie der Peakfläche (A) des einfach geladenen Ions zum zweifach geladenen Ion von Insulin (Ins) aus 6 unterschiedlichen Probenpräparationen an 2 Tagen.....	145
Tabelle 34:	Übersicht über die eingesetzten Matrices und die TFA-Konzentrationen .....	145

## 9. Literaturverzeichnis und Anmerkungen

- [1] K. R. Jennings, A History of European Mass Spectrometry, **2012**, IM Publications LLP
- [2] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, Molecular Beams of Macroions, *Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*, 2240 - 2249
- [3] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn, Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers, *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 675 - 679
- [4] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray Ionization-Principles and Practice, *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, *9*, 37 - 70
- [5] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons, *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299 - 2301
- [6] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2*, 151 - 153
- [7] F. Hillenkamp, M. Karas, Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience, *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *200*, 71 - 77
- [8] L. Li, MALDI-MS for Polymer Characterization, in: MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, **2007**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [9] H. Pasch, W. Schrepp, MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers, **2003**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- [10] L. Li, MALDI-MS for Polymer Characterization, in: MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, **2007**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [11] K. Hjerno, O. N. Jensen, MALDI-MS in Protein Chemistry and Proteomics, in: MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, **2007**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [12] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, Preface, in: MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, **2007**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- 
- [13] F. Hillenkamp, M. Karas, The MALDI Process and Method, in: MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, **2007**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [14] S. M. Weidner, K. Hoffmann, J. Falkenhagen, A. Thünemann, Polymer Segregation in MALDI Spots Investigated by MALDI-TOF Imaging MS, **2010**, Poster, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Salt Lake City
- [15] S. M. Weidner, J. Falkenhagen, Imaging mass spectrometry for examining localization of polymeric composition in matrix-assisted laser desorption/ionization samples, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 653 - 660
- [16] W. Paul, H. Steinwedel, \*Ein Neues Massenspektrometer Ohne Magnetfeld, *Zeitschrift für Naturforschung Section A-A Journal of Physical Sciences* **1953**, *8*, 448 - 450
- [17] R. E. March, J. F. J. Todd, Quadrupole ion trap mass spectrometry, **2005**, J. Wiley
- [18] R. E. March, Quadrupole ion trap mass spectrometry: Theory, simulation, recent developments and applications, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 1543 - 1554
- [19] R. E. March, Quadrupole Ion Traps, *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 961 - 989
- [20] M. B. Comisarow, A. G. Marshall, Fourier-Transform Ion-Cyclotron Resonance Spectroscopy, *Chemical Physics Letters* **1974**, *25*, 282 - 283
- [21] J. D. Baldeschwieler, Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy, *Science* **1968**, *159*, 263 - 273
- [22] A. G. Marshall, Milestones in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development, *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *200*, 331 - 356
- [23] R. T. McIver Jr., A Trapped Ion Analyzer Cell for Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy, *Review of Scientific Instruments* **1970**, *41*, 555 - 558
- [24] W. C. Wiley, I. H. McLaren, Time-Of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution, *Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*, 1150 - 1157
- [25] W. E. Stephens, A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion, *Physical Review* **1946**, *69*, 691 - 691

- [26] A. E. Cameron, D. F. Eggers, An Ion Velocitron, *Review of Scientific Instruments* **1948**, 19, 605 - 607
- [27] M. M. Wolff, W. E. Stephens, A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion, *Review of Scientific Instruments* **1953**, 24, 616 - 617
- [28] P. B. O'Connor, F. Hillenkamp, MALDI Mass Spectrometry Instrumentation, in: MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, **2007**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [29] V. V. Laiko, S. C. Moyer, R. J. Cotter, Atmospheric pressure MALDI/ion trap mass spectrometry, *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 5239 - 5243
- [30] S. C. Moyer, L. A. Marzilli, A. S. Woods, V. V. Laiko, V. M. Doroshenko, R. J. Cotter, Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization.(AP MALDI) on a quadrupole ion trap mass spectrometer, *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 226, 133 - 150
- [31] V. M. Doroshenko, V. V. Laiko, N. I. Taranenko, V. D. Berkout, H. S. Lee, Recent developments in atmospheric pressure MALDI mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 221, 39 - 58
- [32] K. Dreisewerd, M. Schurenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, 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, *International Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 141, 127 - 148
- [33] J. H. Gross, *Mass Spectrometry - A Textbook*, **2004**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- [34] V. Wulf, Neue methodische Konzepte beim Einsatz der MALDI-(TOF)-Massenspektrometrie zur Analyse technischer Polymere sowie tensidischer Produkte auf Basis nachwachsender Rohstoffe, **2009**, Dissertation, Bergische Universität Wuppertal
- [35] C. Menzel, K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp, Mechanisms of energy deposition in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 207, 73 - 96
- [36] K. Dreisewerd, S. Berkenkamp, A. Leisner, A. Rohlfing, C. Menzel, Fundamentals of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with pulsed infrared lasers, *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 226, 189 - 209

- 
- [37] M. Karas, R. Kruger, Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 427 - 439
- [38] R. Knochenmuss, L. V. Zhigilei, What determines MALDI ion yields? A molecular dynamics study of ion loss mechanisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *402*, 2511 - 2519
- [39] R. S. Gohlke, F. W. McLafferty, Early Gas-Chromatography Mass-Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4*, 367 - 371
- [40] M. Guilhaus, V. Mlynski, D. Selby, Perfect timing: Time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 951 - 962
- [41] H. Pasch, W. Schrepp, MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers, **2003**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- [42] S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, Molecular weight determination of megadalton DNA electrospray ions using charge detection time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 1528 - 1538
- [43] S. D. Fuerstenau, W. H. Benner, J. J. Thomas, C. Brugidou, B. Bothner, G. Siuzdak, Mass spectrometry of an intact virus, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 542 - 544
- [44] C. Weickhardt, F. Moritz, J. Grotemeyer, Time-of-flight mass spectrometry: State-of-the-art in chemical analysis and molecular science, *Mass Spectrometry Reviews* **1996**, *15*, 139 - 162
- [45] H. Pasch, A. Pizzi, Considerations on the macromolecular structure of chestnut ellagitannins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Applied Polymer Science* **2002**, *85*, 429 - 437
- [46] T. J. Cornish, R. J. Cotter, A Curved-Field Reflectron for Improved Energy Focusing of Product Ions in Time-Of-Flight Mass-Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, *7*, 1037 - 1040
- [47] B. A. Mamyrin, Laser-Assisted Reflectron Time-Of-Flight Mass-Spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1994**, *131*, 1 - 19
- [48] M. Wolf, Multi-Channel-Plates, *Physik in unserer Zeit* **1981**, *12*, 90 - 95

- [49] D. A. Allwood, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, P. E. Dyer, Optical absorption of matrix compounds for laser-induced desorption and ionization (MALDI), *Applied Surface Science* **1997**, *110*, 154 - 157
- [50] R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 337 - 366
- [51] M. W. F. Nielen, MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers, *Mass Spectrometry Reviews* **1999**, *18*, 309 - 344
- [52] F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, **2007**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [53] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 2,5-Dihydroxybenzoic Acid - A New Matrix for Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1991**, *111*, 89 - 102
- [54] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Biopolymers, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, A1193 - A1202
- [55] J. Kampmeier, K. Dreisewerd, M. Schurenberg, K. Strupat, Investigations of 2,5-DHB and succinic acid as matrices for IR and UV MALDI. Part I: UV and IR laser ablation in the MALDI process, *International Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *169*, 31 - 41
- [56] R. C. Beavis, T. Chaudhary, B. T. Chait, Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid As A Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry, *Organic Mass Spectrometry* **1992**, *27*, 156 - 158
- [57] M. George, J. M. Y. Wellemans, R. L. Cerny, M. L. Gross, K. Li, E. L. Cavalieri, Matrix Design for Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization - Sensitive Determination of PAH-DNA Adducts, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1994**, *5*, 1021 - 1025
- [58] R. Lidgard, M. W. Duncan, Utility of Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry for the Analysis of Low-Molecular-Weight Compounds, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 128 - 132
- [59] F. O. Ayorinde, E. Elhilo, C. Hlongwane, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of canola, castor and olive oils, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 737 - 739

- 
- [60] K. J. Wu, A. Steding, C. H. Becker, Matrix-Assisted Laser Desorption Time-Of-Flight Mass-Spectrometry of Oligonucleotides Using 3-Hydroxypicolinic Acid As An Ultraviolet-Sensitive Matrix, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, 7, 142 - 146
- [61] K. J. Wu, T. A. Shaler, C. H. Becker, Time-Of-Flight Mass-Spectrometry of Underivatized Single-Stranded-Dna Oligomers by Matrix-Assisted Laser-Desorption, *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 1637 - 1645
- [62] C. M. Kassis, J. M. DeSimone, E. W. Linton, G. W. Lange, R. M. Friedman, An investigation into the importance of polymer-matrix miscibility using surfactant modified matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, 1462 - 1466
- [63] R. H. Carr, A. T. Jackson, Preliminary matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight and field desorption mass spectrometric analyses of polymeric methylene diphenylene diisocyanate, its amine precursor and a model polyether prepolymer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12, 2047 - 2050
- [64] A. M. Belu, J. M. DeSimone, R. W. Linton, G. W. Lange, R. M. Friedman, Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry for Polymer Characterization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, 7, 11 - 24
- [65] P. Juhasz, C. E. Costello, Generation of Large Radical Ions from Oligometallocenes by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, 7, 343 - 351
- [66] L. Przybilla, J. D. Brand, K. Yoshimura, H. J. Rader, K. Mullen, MALDI-TOF mass spectrometry of insoluble giant polycyclic aromatic hydrocarbons by a new method of sample preparation, *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 4591 - 4597
- [67] F. von Rath, Systematische Untersuchung bestimmter Einflussgrößen bei der MALDI-MS Analyse von oleochemischen, technischen Polymeren für Reinigungs- und Pflegeprodukte, **2009**, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Bergische Universität Wuppertal
- [68] C. C. Lai, L. R. Phillips, L. L. Smith, J. A. Kelley, How Low Can We Go? An Evaluation of Strategies for Small-Molecule Analysis by MALDI, **2009**, Poster, 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia (PA)
- [69] J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon, *Nature* **1999**, 399, 243 - 246

- [70] M. P. Stewart, J. M. Buriak, Chemical and biological applications of porous silicon technology, *Advanced Materials* **2000**, *12*, 859 - 869
- [71] D. S. Peterson, Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 19 - 34
- [72] Z. Guo, Q. C. Zhang, H. F. Zou, B. C. Guo, J. Y. Ni, A method for the analysis of low-mass molecules by MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1637 - 1641
- [73] S. F. Ren, Y. L. Guo, Oxidized carbon nanotubes as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of biomolecules, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 255 - 260
- [74] N. Amini, M. Shariatgorji, G. Thorsen, SALDI-MS Signal Enhancement Using Oxidized Graphitized Carbon Black Nanoparticles, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 1207 - 1213
- [75] P. Lorkiewicz, M. C. Yappert, Titania Microparticles and Nanoparticles as Matrixes for in Vitro and in Situ Analysis of Small Molecules by MALDI-MS, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 6596 - 6603
- [76] A. T. Jackson, H. T. Yates, W. A. MacDonald, J. H. Scrivens, G. Critchley, J. Brown, M. J. Deery, K. R. Jennings, C. Brookes, Time-lag focusing and cation attachment in the analysis of synthetic polymers by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 132 - 139
- [77] A. K. Chaudhary, G. Critchley, A. Diaf, E. J. Beckman, A. J. Russell, Characterization of synthetic polymers using matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of flight mass spectrometry, *Macromolecules* **1996**, *29*, 2213 - 2221
- [78] A. R. Hortal, P. Hurtado, B. Martinez-Haya, A. Arregui, L. Banares, Poly(ethylene glycol) cationization with alkali metals in matrix-assisted laser desorption ionization investigated with the solvent-free method, *Applied Physics A-Materials Science & Processing* **2008**, *92*, 859 - 863
- [79] A. R. Hortal, P. Hurtado, B. Martinez-Haya, A. Arregui, L. Banares, Solvent-free MALDI investigation of the cationization of linear polyethers with alkali metals, *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 8530 - 8535
- [80] X. W. Lou, R. W. Sinkeldam, W. van Houts, Y. Nicolas, P. G. A. Janssen, J. L. J. van Dongen, J. A. J. M. Vekemans, E. W. Meijer, Double cation adduction in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass

- spectrometry of electron deficient anthraquinone derivatives, *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 293 - 303
- [81] H. Rashidezadeh, B. C. Guo, Investigation of metal attachment to polystyrenes in matrix-assisted laser desorption ionization, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 724 - 730
- [82] X. F. Shen, X. R. He, G. Q. Chen, P. Zhou, L. Huang, MALDI-TOF mass spectrometry characterization of C-60 end-capped polystyrene prepared by ATRP, *Macromolecular Rapid Communications* **2000**, *21*, 1162 - 1165
- [83] R. Nagahata, K. Shimada, K. Kishine, H. Sato, S. Matsuyama, H. Togashi, S. Kinugasa, Interlaboratory comparison of average molecular mass and molecular mass distribution of a polystyrene reference material determined by MALDI-TOF mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *263*, 213 - 221
- [84] J. Zhang, R. Zenobi, Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 808 - 816
- [85] M. Brahm, Polymerchemie Kompakt: Grundlagen - Struktur der Makromoleküle - Technisch wichtige Polymere und Reaktivsysteme, **2005**, S. Hirzel Verlag
- [86] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: Contribution of pre-formed ions, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1483 - 1492
- [87] R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion formation in MALDI mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 337 - 366
- [88] W. J. Erb, S. D. Hanton, K. G. Owens, A study of gas-phase cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 2165 - 2169
- [89] T. Wyttenbach, G. von Helden, M. T. Bowers, Conformations of alkali ion cationized polyethers in the gas phase: polyethylene glycol and bis[(benzo-15-crown-5)-15-ylmethyl] pimelate, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, *165/166*, 377 - 390
- [90] J. Gidden, T. Wyttenbach, A. T. Jackson, J. H. Scrivens, M. T. Bowers, Gas-phase conformations of synthetic polymers: Poly(ethylene glycol), poly(propylene glycol), and poly(tetramethylene glycol), *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 4692 - 4699

- [91] J. Salplachta, P. Rehulka, J. Chmelik, Identification of proteins by combination of size-exclusion chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and comparison of some desalting procedures for both intact proteins and their tryptic digests, *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 1395 - 1401
- [92] J. F. Leite, M. R. Hajivandi, T. Diller, R. M. Pope, Removal of sodium and potassium adducts using a matrix additive during matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of peptides, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 2953 - 2959
- [93] M. Andre, M. Karas, Investigation of sample-purification procedures for MALDI-based proteomic studies, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1047 - 1053
- [94] P. Rehulka, J. Salplachta, J. Chmelik, Improvement of quality of peptide mass spectra in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and post-source decay analysis of salty protein digests by using on-target washing, *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38*, 1267 - 1269
- [95] E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. F. Crain, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Nucleic-Acids with Wavelengths in the Ultraviolet and Infrared, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, *6*, 771 - 776
- [96] D. E. Terry, E. Umstot, D. M. Desiderio, Optimized sample-processing time and peptide recovery for the mass spectrometric analysis of protein digests, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15*, 784 - 794
- [97] J. Gobom, E. Nordhoff, E. Mirgorodskaya, R. Ekman, P. Roepstorff, 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, *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 105 - 116
- [98] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons, *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299 - 2301
- [99] I. K. Perera, J. Perkins, S. Kantartzoglou, Spin-Coated Samples for High-Resolution Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry of Large Proteins, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 180 - 187

- 
- [100] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, Improved Resolution and Very High-Sensitivity in Maldi Tof of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 3281 - 3287
- [101] M. A. R. Meier, U. S. Schubert, Evaluation of a new multiple-layer spotting technique for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 713 - 716
- [102] J. Axelsson, A. M. Hoberg, C. Waterson, P. Myatt, G. L. Shield, J. Varney, D. M. Haddleton, P. J. Derrick, Improved reproducibility and increased signal intensity in matrix-assisted laser desorption/ionization as a result of electrospray sample preparation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 209 - 213
- [103] R. Milberg, R. W. Garden, A thin-film MALDI matrix loading technique for water insoluble compounds, **1996**, Poster, 44th ASMS Conference Mass Spectrom Allied Topics, Portland, Oregon
- [104] A. B. Jemere, L. W. Bezuidenhout, M. J. Brett, D. J. Harrison, Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry using silicon glancing angle deposition (GLAD) films, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24*, 2305 - 2311
- [105] D. S. Peterson, Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 19 - 34
- [106] S. M. Weidner, Sample Spot Heterogeneity Investigated by MALDI - Imaging Mass Spectrometry, **2009**, Vortrag, 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Philadelphia
- [107] S. Weidner, P. Knappe, U. Panne, MALDI-TOF imaging mass spectrometry of artifacts in "dried droplet" polymer samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *401*, 127 - 134
- [108] S. L. Cohen, B. T. Chait, Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins, *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 31 - 37
- [109] L. Hyzak, R. Moos, F. von Rath, V. Wulf, M. Wirtz, D. Melchior, H. W. Kling, M. Kohler, S. Gab, O. J. Schmitz, Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Synthetic Polymers and Peptides, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 9467 - 9471
- [110] R. Szyszka, S. D. Hanton, D. Henning, K. G. Owens, Development of a Combined Standard Additions/Internal Standards Method to Quantify

Residual PEG in Ethoxylated Surfactants by MALDI TOFMS, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, 22, 633 - 640

- [111] S. M. Weidner, J. Falkenhagen, Imaging mass spectrometry for examining localization of polymeric composition in matrix-assisted laser desorption/ionization samples, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23, 653 - 660
- [112] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H. J. Rader, K. Mullen, New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, 15, 1364 - 1373
- [113] S. Trimpin, A. C. Grimsdale, H. J. Rader, K. Mullen, Characterization of an insoluble poly(9,9-diphenyl-2,7-fluorene) by solvent-free sample preparation for MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 3777 - 3782
- [114] S. Trimpin, M. L. Deinzer, Solvent-free MALDI-MS for the analysis of biological samples via a mini-ball mill approach, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16, 542 - 547
- [115] S. Trimpin, S. Keune, H. J. Rader, K. Mullen, Solvent-free MALDI-MS: Developmental improvements in the reliability and the potential of MALDI in the analysis of synthetic polymers and giant organic molecules, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, 17, 661 - 671
- [116] S. Trimpin, S. M. Weidner, J. Falkenhagen, C. N. Mcewen, Fractionation and solvent-free MALDI-MS analysis of polymers using liquid adsorption chromatography at critical conditions in combination with a multisample on-target homogenization/transfer sample preparation method, *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 7565 - 7570
- [117] S. Trimpin, M. L. Deinzer, Solvent-free MALDI-MS for the analysis of a membrane protein via the mini ball mill approach: Case study of bacteriorhodopsin, *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 71 - 78
- [118] S. Trimpin, M. L. Deinzer, Solvent-free MALDI-MS for the analysis of beta-amyloid peptides via the mini-ball mill approach: Qualitative and quantitative advances, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18, 1533 - 1543
- [119] S. Trimpin, C. N. Mcewen, Multisample preparation methods for the solvent-free MALDI-MS analysis of synthetic polymers, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18, 377 - 381

- 
- [120] J. Bursa, Optimierung der MALDI-TOF-MS Analyse von polydispersen Aktivkomponenten für Reinigungs- und Pflegeprodukte, **2009**, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Bergische Universität Wuppertal
- [121] R. K. Moos, Weiterentwicklung der lösungsmittelfreien Probenvorbereitung bei der MALDI-(TOF) MS Analyse von oleochemischen, technischen Polymeren für Reinigungs- und Pflegeprodukte, **2010**, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Bergische Universität Wuppertal
- [122] S. M. Weidner, J. Falkenhagen, R. D. Schulze, Sample Spot Heterogeneity Investigated by MALDI - Imaging Mass Spectrometry, **2009**, Poster, 18th ICMS Conference, Bremen
- [123] R. Skelton, F. Dubois, R. Zenobi, A MALDI sample preparation method suitable for insoluble polymers, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1707 - 1710
- [124] M. Gluckmann, A. Pfenninger, R. Kruger, M. Thierolf, M. Karas, V. Horneffer, F. Hillenkamp, K. Strupat, Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes?, *International Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *210*, 121 - 132
- [125] J. Yao, J. R. Scott, M. K. Young, C. L. Wilkins, 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, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 805 - 813
- [126] R. C. Beavis, J. N. Bridson, Epitaxial Protein Inclusion in Sinapic Acid Crystals, *Journal of Physics D-Applied Physics* **1993**, *26*, 442 - 447
- [127] X. Fan, R. C. Beavis, Growing Protein-Doped Sinapic Acid Crystals for Laser-Desorption - An Alternative Preparation Method for Difficult Samples, *Organic Mass Spectrometry* **1993**, *28*, 1424 - 1429
- [128] I. Fournier, R. C. Beavis, J. C. Blais, J. C. Tabet, G. Bolbach, Hysteresis effects observed in MALDI using oriented, protein-doped matrix crystals, *International Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *169*, 19 - 29
- [129] Y. Q. Dai, R. M. Whittal, L. Li, Confocal fluorescence microscopic imaging for investigating the analyte distribution in MALDI matrices, *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 2494 - 2500
- [130] V. Horneffer, Matrix-Analyt-Wechselwirkungen bei der Matrix-Unterstützten Laserdesorptions/ionisations Massenspektrometrie (MALDI-MS), **2002**, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

- [131] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 2,5-Dihydroxybenzoic Acid - A New Matrix for Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1991**, *111*, 89 - 102
- [132] V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck, Localization of analyte molecules in MALDI preparations by confocal laser scanning microscopy, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 1016 - 1022
- [133] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H. C. Ludemann, F. Hillenkamp, M. Lage, K. Strupat, 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 acid, *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *187*, 859 - 870
- [134] S. Trimpin, H. J. Rader, K. Mullen, Investigations of theoretical principles for MALDI-MS derived from solvent-free sample preparation - Part I. Preorganization, *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *253*, 13 - 21
- [135] S. D. Hanton, D. M. Parees, Extending the solvent-free MALDI sample preparation method, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 90 - 93
- [136] S. D. Hanton, J. R. Stets, Determining the Time Needed for the Vortex Method for Preparing Solvent-Free MALDI Samples of Low Molecular Mass Polymers, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 1115 - 1118
- [137] L. Hyzak, Optimierung der lösungsmittelfreien Probenvorbereitung in der MALDI-(TOF)-Massenspektrometrie zur (semi-)quantitativen Analyse von Alkylpolyglycosiden, **2010**, Master Thesis, Bergische Universität Wuppertal
- [138] J. K. Pruns, J. P. Vietzke, M. Strassner, C. Rapp, U. Hintze, W. A. König, Characterization of low molecular weight hydrocarbon oligomers by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a solvent-free sample preparation method, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 208 - 211
- [139] A. Sroka-Bartnicka, W. Ciesielski, J. Libiszowski, A. Duda, M. Sochacki, M. J. Potrzebowski, Complementarity of Solvent-Free MALDI TOF and Solid-State NMR Spectroscopy in Spectral Analysis of Polylactides, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 323 - 328
- [140] S. D. Hanton, T. M. Mcevoy, J. R. Stets, Imaging the morphology of solvent-free prepared MALDI samples, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*, 874 - 881

- 
- [141] L. Hughes, M. F. Wyatt, B. K. Stein, A. G. Brenton, Investigation of Solvent-Free MALDI-TOFMS Sample Preparation Methods for the Analysis of Organometallic and Coordination Compounds, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 543 - 550
- [142] E. Szajli, T. Feher, K. F. Medzihradzsky, Investigating the Quantitative Nature of MALDI-TOF MS, *Molecular & Cellular Proteomics* **2008**, *7*, 2410 - 2418
- [143] M. Bucknall, K. Y. C. Fung, M. W. Duncan, Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 1015 - 1027
- [144] W. Y. Yan, J. A. Gardella, T. D. Wood, Quantitative analysis of technical polymer mixtures by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 914 - 920
- [145] A. Cristadoro, H. J. Rader, K. Mullen, Quantitative analyses of fullerene and polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures via solvent-free matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 2463 - 2470
- [146] A. Nimptsch, S. Schibur, M. Schnabelrauch, B. Fuchs, D. Huster, J. Schiller, Characterization of the quantitative relationship between signal-to-noise (S/N) ratio and sample amount on-target by MALDI-TOF MS: Determination of chondroitin sulfate subsequent to enzymatic digestion, *Analytica Chimica Acta* **2009**, *635*, 175 - 182
- [147] S. I. Snovida, J. M. Rak-Banville, H. Perreault, On the use of DHB/aniline and DHB/N,N-dimethylaniline matrices for improved detection of carbohydrates: Automated identification of oligosaccharides and quantitative analysis of sialylated glycans by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*, 1138 - 1146
- [148] J. Wang, P. Sporns, N. H. Low, Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: Quantification of fructooligosaccharides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 1549 - 1557
- [149] M. Persike, M. Zimmermann, J. Klein, M. Karas, Quantitative Determination of Acetylcholine and Choline in Microdialysis Samples by MALDI-TOF MS, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 922 - 929

- [150] M. C. L. Gay, I. Mullaney, D. Trinder, J. K. Olynyk, R. D. Trengove, Quantitative assay of urinary hepcidin using MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical Methods* **2010**, 2, 268 - 274
- [151] E. Szajli, T. Feher, K. F. Medzihradzsky, Investigating the Quantitative Nature of MALDI-TOF MS, *Molecular & Cellular Proteomics* **2008**, 7, 2410 - 2418
- [152] L. Hyzak, S. Giese, H. W. Kling, V. Wulf, D. Melchior, M. Kohler, O. J. Schmitz, Improvements to the compressed-sample (CS) technique for MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405, 1417 - 1424
- [153] C. M. Guttman, K. M. Flynn, W. E. Wallace, A. J. Kearsley, Quantitative Mass Spectrometry and Polydisperse Materials: Creation of an Absolute Molecular Mass Distribution Polymer Standard, *Macromolecules* **2009**, 42, 1695 - 1702
- [154] K. Kosswig, H. Stache, *Die Tenside*, **1993**, Carl Hanser Verlag
- [155] K. Hill, W. v. Rybinski, G. Stoll, K. G. Henkel, *Alkyl polyglycosides technology, properties, and applications*, **1997**, VCH
- [156] W. Caseri, A. Weber-Mußmann, *Polyethylenglycole*, **2009**, Thieme RÖMPP Online, Abruf am 20.07.2010
- [157] B. Hoppe, J. Martens, *Amino-Acids - the Building-Blocks of Life*, *Chemie in Unserer Zeit* **1983**, 17, 41 - 53
- [158] H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, J. D. Rawn, *Biochemie*, **2008**, Pearson Studium
- [159] H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food chemistry*, **2009**, Springer
- [160] S. Trimpin, S. M. Weidner, J. Falkenhagen, C. N. Mcewen, Fractionation and solvent-free MALDI-MS analysis of polymers using liquid adsorption chromatography at critical conditions in combination with a multisample on-target homogenization/transfer sample preparation method, *Analytical Chemistry* **2007**, 79, 7565 - 7570
- [161] S. Trimpin, C. N. Mcewen, Multisample preparation methods for the solvent-free MALDI-MS analysis of synthetic polymers, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, 18, 377 - 381
- [162] A. Rohlfing, C. Menzel, L. M. Kukreja, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, Photoacoustic analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization

- processes with pulsed infrared lasers, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 12275 - 12286
- [163] W. Scheibe, Agglomeration on Dry Grinding of Fines, *Chemie Ingenieur Technik* **1989**, *61*, 756 - 757
- [164] M. Peglow, Beitrag zur Modellbildung von eigenschaftsverteilten dispersen Systemen am Beispiel der Wirbelschicht-Sprühagglomeration, **2005**, Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- [165] M. P. Hofmann, Physikalische Charakterisierung von Calciumphosphat-Pulvern zur Einstellung von Prozessparametern für die Herstellung von Knochenzement, **2003**, Dissertation, Julius-Maximilian-Universität Würzburg
- [166] T. Hartmann, Agglomeration feiner Pulver - Ein neues Verfahren zur Softpellet-Produktion, **2008**, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel
- [167] S. Paul, A. B. Chattopadhyay, Determination and control of grinding zone temperature under cryogenic cooling, *International Journal of Machine Tools & Manufacture* **1996**, *36*, 491 - 501
- [168] M. Otsuka, H. Ohtani, N. Kaneniwa, S. Higuchi, Isomerization of Lactose in Solid-State by Mechanical-Stress During Grinding, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1991**, *43*, 148 - 153
- [169] L. W. Riley, S. M. Baker, E. J. Philips, A new device for use in crushing rigid biomass and geological materials prior to compositional analysis, *Journal of Paleolimnology* **2010**, *44*, 737 - 739
- [170] O. de Vegt, H. Vromans, F. Faassen, K. V. Maarschalk, Milling of organic solids in a jet mill. Part 2: Checking the validity of the predicted rate of breakage function, *Particle & Particle Systems Characterization* **2006**, *22*, 261 - 267
- [171] V. A. P. Rodriguez, S. K. Xia, E. Baggiosaitovitch, C. Larica, Comparison of Ball-Milling of Fe Cr Powders and Fe-Cr Crystalline Alloy, *Hyperfine Interactions* **1994**, *83*, 271 - 274
- [172] S. Trimpin, H. J. Rader, K. Mullen, Investigations of theoretical principles for MALDI-MS derived from solvent-free sample preparation - Part I. Preorganization, *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *253*, 13 - 21
- [173] T. W. Jaskolla, M. Karas, U. Roth, K. Steinert, C. Menzel, K. Reihls, Comparison Between Vacuum Sublimed Matrices and Conventional Dried

Droplet Preparation in MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, 1104 - 1114

- [174] Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid - Product Information:  
[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c2020pis.Par.0001.File.tmp/c2020pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c2020pis.Par.0001.File.tmp/c2020pis.pdf), **2013**, Sigma Aldrich, Abruf am 30.04.2013
- [175] L. R. Snyder, Classification of Solvent Properties of Common Liquids, *Journal of Chromatographic Science* **1978**, 16, 223 - 234
- [176] D. F. Elliott, G. P. Lewis, E. W. Horton, The Structure of Bradykinin - A Plasma Kinin from Ox Blood, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1960**, 3, 87 - 91
- [177] D. M. Bunk, R. D. Macfarlane, Fragmentation Analysis of Bradykinin by Cf-252-Plasma Desorption Mass-Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1991**, 2, 379 - 386
- [178] U. Derewenda, Z. Derewenda, G. G. Dodson, R. E. Hubbard, F. Korber, Molecular-Structure of Insulin - the Insulin Monomer and Its Assembly, *British Medical Bulletin* **1989**, 45, 4 - 18
- [179] Insulin human, recombinant - Certificate of Analysis:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=I2643&LotNo=019K1092&brandTest=SIGMA>, **2013**, Sigma Aldrich, Abruf am 03.06.2013
- [180] Cytochrom C from equine heart - Certificate of Analysis:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbol=C7752&LotNo=71K7050&brandTest=SIGMA>, **2013**, Sigma Aldrich, Abruf am 03.06.2013
- [181] E. F. Gordon, B. A. Mansoori, C. F. Carroll, D. C. Muddiman, Hydropathic influences on the quantification of equine heart cytochrome c using relative ion abundance measurements by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 34, 1055 - 1062
- [182] A. Amini, S. J. Dormady, L. Riggs, F. E. Regnier, The impact of buffers and surfactants from micellar electrokinetic chromatography on matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry of peptides - Effect of buffer type and concentration on mass determination by MALDI-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **2000**, 894, 345 - 355

- [183] F. Xiang, R. C. Beavis, A Method to Increase Contaminant Tolerance in Protein Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization by the Fabrication of Thin Protein-Doped Polycrystalline Films, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1994**, 8, 199 - 204
- [184] R. L. Winston, M. C. Fitzgerald, Concentration and desalting of protein samples for mass spectrometry analysis, *Analytical Biochemistry* **1998**, 262, 83 - 85
- [185] J. Pawliszyn, H. L. Lord, Handbook of sample preparation, **2010**, Wiley
- [186] M. Yamane, T. Sakaino, Chemical Composition of Phase-Separated Droplets in Soda-Lime-Silica Glass, *Journal of the American Ceramic Society* **1968**, 51, 178 - 179
- [187] P. J. A. Madeira, M. H. Florencio, Flavonoid - matrix cluster ions in MALDI mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, 44, 1105 - 1113
- [188] A. Mele, L. Malpezzi, Noncovalent association phenomena of 2,5-dihydroxybenzoic acid with cyclic and linear oligosaccharides. A matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric and X-ray crystallographic study, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 11, 228 - 236
- [189] M. D. Mohr, K. O. Bornsen, H. M. Widmer, Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry - Improved Matrix for Oligosaccharides, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, 9, 809 - 814
- [190] S. I. Snovida, J. M. Rak-Banville, H. Perreault, On the use of DHB/aniline and DHB/N,N-dimethylaniline matrices for improved detection of carbohydrates: Automated identification of oligosaccharides and quantitative analysis of sialylated glycans by MALDI-TOF mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, 19, 1138 - 1146
- [191] M. A. Hashir, G. Stecher, R. Bakry, S. Kasemsook, B. Blassnig, I. Feuerstein, G. Abel, M. Popp, O. Bobleter, G. K. Bonn, Identification of carbohydrates by matrix-free material-enhanced laser desorption/ionisation mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, 2759 - 2769
- [192] M. A. Hashir, G. Stecher, G. K. Bonn, Identification of low molecular weight carbohydrates employing new binary mixtures for matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2008**, 22, 2185 - 2194

- [193] H. J. Yang, A. Lee, M. K. Lee, W. Kim, J. Kim, Detection of Small Neutral Carbohydrates Using Various Supporting Materials in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2010**, *31*, 35 - 40
- [194] C. Przybylski, F. Gonnet, D. Bonnaffe, Y. Hersant, H. Lortat-Jacob, R. Daniel, HABA-based ionic liquid matrices for UV-MALDI-MS analysis of heparin and heparan sulfate oligosaccharides, *Glycobiology* **2010**, *20*, 224 - 234
- [195] T. I. Williams, D. A. Saggese, R. J. Wilcox, J. D. Martin, D. C. Muddiman, Effect of matrix crystal structure on ion abundance of carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 807 - 811
- [196] B. Finke, B. Stahl, A. Pfenninger, M. Karas, H. Daniel, G. Sawatzki, Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS, *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 3755 - 3762
- [197] A. Pfenninger, M. Karas, B. Finke, B. Stahl, G. Sawatzki, Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk, *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 98 - 104
- [198] B. Stahl, M. Steup, M. Karas, F. Hillenkamp, Analysis of Neutral Oligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption - Ionization Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 1463 - 1466
- [199] M. Karas, H. Ehring, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, M. Grehl, B. Krebs, Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry with Additives to 2,5-Dihydroxybenzoic Acid, *Organic Mass Spectrometry* **1993**, *28*, 1476 - 1481
- [200] P. Chen, A. G. Baker, M. V. Novotny, The use of osazones as matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates, *Analytical Biochemistry* **1997**, *244*, 144 - 151
- [201] J. O. Metzger, R. Woisch, W. Tuszynski, R. Angermann, New-Type of Matrix for Matrix-Assisted Laser-Desorption Mass-Spectrometry of Polysaccharides and Proteins, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1994**, *349*, 473 - 474
- [202] D. J. Harvey, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates, *Mass Spectrometry Reviews* **1999**, *18*, 349 - 450
- [203] F. Fenaille, M. Le Mignon, C. Groseil, L. Siret, N. Bihoreau, Combined use of 2,4,6-trihydroxyacetophenone as matrix and enzymatic deglycosylation in

- organic-aqueous solvent systems for the simultaneous characterization of complex glycoproteins and N-glycans by, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 812 - 816
- [204] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*, **2001**, Spektrum Akademischer Verlag
- [205] D. A. Allwood, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, P. E. Dyer, UV optical absorption of matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 1575 - 1578
- [206] J. Krause, M. Stoeckli, U. P. Schlunegger, Studies on the selection of new matrices for ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 1927 - 1933
- [207] M. Gilar, A. Belenky, B. H. Wang, High-throughput biopolymer desalting by solid-phase extraction prior to mass spectrometric analysis, *Journal of Chromatography A* **2001**, *921*, 3 - 13
- [208] M. Petkovic, J. Schiller, M. Muller, S. Benard, S. Reichl, K. Arnold, J. Arnhold, Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: Phosphatidylcholine prevents the detection of further species, *Analytical Biochemistry* **2001**, *289*, 202 - 216
- [209] J. Schiller, R. Suss, B. Fuchs, M. Muller, M. Petkovic, O. Zschornig, H. Waschipky, The suitability of different DHB isomers as matrices for the MALDI-TOF MS analysis of phospholipids: which isomer for what purpose?, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2007**, *36*, 517 - 527