



David Fast

Untersuchungen zur Probenpräparation für MALDI-TOF-MS

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Diplom-Ingenieurs

der Studienrichtung Technische Chemie
erreicht an der Technischen Universität Graz

Dezember 2010

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Robert Saf
Institut für Chemische Technologie von Materialien
Technische Universität Graz

Deutsche Fassung:
Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom 10.11.2008
Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....
(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....
date

.....
(signature)

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Robert Saf für die Ermöglichung und Betreuung dieser Masterarbeit und für die zahlreichen Gespräche, in denen er mir immer wieder sehr hilfreiche Anregungen und Ideen geliefert hat.

Mein Dank gilt auch Karin, Olivia und Dorith, für das freundliche Arbeitsklima und ihre technische und organisatorische Unterstützung.

Dipl.-Ing. Andreas Pein möchte ich für das zur Verfügung stellen der CuInS₂-Nanopartikel danken.

Des Weiteren möchte ich mich beim Institutsvorstand Herrn Prof. Franz Stelzer dafür bedanken, dass ich meine Masterarbeit am Institut für Chemische Technologie von Materialien durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich genau wie meine beiden Schwestern und der Rest meiner Familie immer unterstützt haben.

Kurzfassung

Eine der wichtigsten Ionisationsmethoden der modernen Massenspektrometrie (MS) ist Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI), die insbesondere für höhermolekulare Verbindungen wie z.B. Oligomere, Polymere, Peptide und andere Biomoleküle von Bedeutung ist. Einer der kritischsten Faktoren für erfolgreiche MALDI-MS Untersuchungen ist die sogenannte Probenpräparation.

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Parameter auf die Probenpräparation durch vergleichende Studien mittels Rasterelektronenmikroskopie und MALDI-TOF-MS untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die vorherrschende Luftfeuchtigkeit während der Probenpräparation erheblichen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten hat, und damit auch die Desorptions- und Ionisationseigenschaften beeinflusst. Sowohl zu hohe, als auch zu niedrige Luftfeuchtigkeit wirkt sich bei dem untersuchten Modellsystem negativ aus.

Weiters wurde der Einfluss der Targettemperatur auf das Kristallisationsverhalten untersucht. Hierbei konnte eine Abnahme der Kristallgröße mit zunehmender Targettemperatur und für einen Analyt eine Verbesserung der Signalintensität und somit Nachweisgrenze beobachtet werden.

Weiters wurde versucht, durch Zugabe von Nanopartikeln (CuInS_2 , ZnO , ITO), das Kristallisationsverhalten ausgewählter Matrix/Analyt-Paare gezielt zu beeinflussen. Dies gelang, es konnte jedoch keine Verbesserung der Desorptions-/Ionisationseigenschaften festgestellt werden.

Abschließende Versuche zielten darauf ab, eine ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure in THF) für die Charakterisierung synthetischer Polymere zu verwenden. Hierbei konnte die Eignung für hydrophile Polymere wie Polyethylenglykole gezeigt werden.

Abstract

One of the most important ionization methods in modern mass spectrometry (MS) is matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI), which is particularly useful for compounds with higher molecular weights such as oligomers, polymers, peptides and other biomolecules. One of the most critical parameters for successful MALDI-MS analysis is the sample preparation.

In the course of this work the influences of different parameters on sample preparation have been analyzed via comparative studies with scanning electron microscopy and MALDI-MS.

It could be shown that air moisture has a considerable influence on crystallization behavior and desorption/ionization characteristics. Both too high and too low values of air moisture exhibited negative effects on the model system investigated.

The influence of the target temperature on the crystallization behavior was investigated too.

With increasing target temperature a decrease in crystal size was observed which led to an improvement of signal intensity and limit of detection for one analyte.

Furthermore, experiments to influence the co-crystallization of selected matrix/analyte couples by addition of nanoparticles (CuInS₂, ZnO, ITO) have been carried out. This has been accomplished, but an improvement of desorption and ionization characteristics couldn't be determined.

Conclusive experiments have been targeted at the utilization of an unusual combination of matrix and solvent (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in THF) for the characterization of synthetic polymers. An applicability could be determined for hydrophilic polymers like polyethylene glycol.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen.....	2
2.1	MALDI-TOF-MS.....	2
2.2	Rasterelektronenmikroskop (REM).....	7
3	Probenpräparation für MALDI-TOF-MS.....	10
3.1	Matrizes.....	10
3.2	Auftragungstechniken.....	12
3.3	Umgebungseinflüsse.....	13
4	Problemstellung.....	14
5	Experimentelles.....	15
5.1	Geräte.....	15
5.2	Chemikalien.....	15
6	Durchführung, Ergebnisse und Diskussion.....	17
6.1	Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit.....	17
6.1.1	Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf Untersuchungen von PEG1000.....	17
6.1.2	Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf Untersuchungen von Angiotensin I.....	26
6.2	Einfluss der Targettemperatur.....	32
6.2.1	Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von Angiotensin I aus CHCA/Methanol.....	32
6.2.2	Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von Angiotensin I aus CHCA/Acetonitril/H ₂ O (v/v=7:3).....	37
6.2.3	Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von Insulin chain B oxidized (in H ₂ O) aus CHCA/Methanol.....	39
6.2.4	Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von ACTH (in Acetonitril/H ₂ O) aus CHCA/Methanol.....	42
6.2.5	Diskussion.....	45
6.3	Zusatz von Nanopartikeln.....	46
6.3.1	Zusatz von CuInS ₂ -Nanopartikeln bei der Untersuchung von PEG1000.....	46
6.3.2	Zusatz von ZnO-Nanopartikeln bei der Untersuchung von Angiotensin I.....	49
6.3.3	Zusatz von ITO-Nanopartikeln bei der Untersuchung von PEG1000 und Angiotensin I.....	53
6.3.4	Zusammenfassung.....	59

Inhaltsverzeichnis

6.4	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von synthetischen Polymeren	60
6.4.1	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG1000	61
6.4.2	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG2000	64
6.4.3	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG4600	66
6.4.4	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG8000	68
6.4.5	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG-ME2000	70
6.4.6	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PMMA1000.....	72
6.4.7	Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von Polystyrol 2000.....	74
6.4.8	Zusammenfassung.....	76
7	Zusammenfassung	77
8	Anhang.....	79
8.1	Tabellenverzeichnis	79
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	79

1 Einleitung

Matrixunterstützte Laser-Desorptions/Ionisations (MALDI) – Massenspektrometrie (MS) ist seit den späten 80er-Jahren eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung von vor allem höhermolekularen Biomolekülen¹ und synthetischen Polymeren.^{2,3}

Der große Vorteil im Vergleich zu anderen Ionisationsmethoden wie z.B. Elektrospray-Ionisation (ESI)⁴, welche auch in der Lage ist höhermolekulare Verbindungen zu ionisieren, liegt darin, dass MALDI hauptsächlich zur Bildung von einfach geladenen Pseudomolekülonen führt. Dies resultiert in einer deutlichen Vereinfachung der Spektren, vor allem bei der Untersuchung von synthetischen Polymeren.

Den größten Einfluss auf die Ergebnisse von MALDI-MS – Untersuchungen hat die Probenpräparation, bei der im ersten Schritt üblicherweise Lösungen des Analyten, der gewählten Matrix und optionaler Additive vermischt werden. Anschließend wird das Gemisch auf ein Target aufgebracht und getrocknet, wobei Co-Kristallisation stattfindet. Die Probenpräparation bestimmt, welches Kristallisat erhalten wird, und somit nachfolgend das Desorptions- und Ionisationsverhalten während des Beschusses mit Laser-Pulsen, was wiederum Empfindlichkeit, Nachweisgrenzen, etc. determiniert.

Da für unterschiedliche Analyten die Art der Probenpräparation oft stark differiert, ist sie eines der meistuntersuchten Gebiete im Bereich der MALDI-Massenspektrometrie. So gibt es zahlreiche verschiedene Methoden und Ansätze, welche darauf abzielen, durch Änderungen in der Probenpräparation, Ergebnisse zu optimieren.

¹ Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.

² Bahr, U.; Deppe, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2866-2869.

³ Nielen, M. W. F. *Mass Spectrom. Rev.* **1999**, *18*, 309.

⁴ Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64-71.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen von MALDI-TOF-MS und Rasterelektronenmikroskopie kurz erläutert.

2.1 MALDI-TOF-MS

Der MALDI-Prozess nützt kurze, intensive Laser-Pulse zur Formierung von intakten gasförmigen Ionen aus. Dies funktioniert allerdings nur bei der Verwendung von, in der Regel, organischen Matrixmolekülen, welche eine hohe Absorption bei der verwendeten Laserwellenlänge aufweisen und die Energie auf den Analyten übertragen. Hierfür ist ein inniger Kontakt von Matrix und Analyt vonnöten, welcher durch eine Co-Kristallisation erreicht wird. Die Auftrennung der Analytmoleküle nach Masse pro Ladung (m/z) erfolgt dann mithilfe eines sogenannten time-of-flight (TOF) Massenanalysators. Zur Detektion werden typischerweise Microchannel-Plates herangezogen. Die einzelnen Prozesse und Funktionsweisen werden nun im Folgenden eingehender erläutert.

Im ersten Schritt der Probenpräparation werden üblicherweise zunächst Lösungen vom Analyten, der Matrix und eventueller Additive gemischt und auf ein Target aufgetragen. Im Zuge des Trocknungsprozesses kommt es zu Co-Kristallisation und somit zu einem Einbetten der Analyt- in die Matrixmoleküle. Nach vollständiger Trocknung erfolgt der Transfer des Targets ins Hochvakuum, in welchem die nachfolgenden Prozesse durchgeführt werden.

Das Kristallinat wird dann im Massenspektrometer mit kurzen, intensiven Laser-Pulsen, mit einer Wellenlänge von üblicherweise 337 nm (Stickstofflaser), beschossen, was aufgrund der hohen Absorption der Matrixmoleküle in diesem Bereich zu einer schnellen Verdampfung (Desorption) von Matrix- und Analytmolekülen führt (Abb. 1). Im Zuge dessen werden die Moleküle auch ionisiert, jedoch ist der Mechanismus dazu noch nicht vollständig verstanden. Eine Zusammenfassung der Arbeiten zum Thema Ionisationsmechanismus findet sich in der Literatur.⁵

⁵ Knochenmuss, R. *Analyst* **2006**, *131*, 966-986.

2 Theoretische Grundlagen

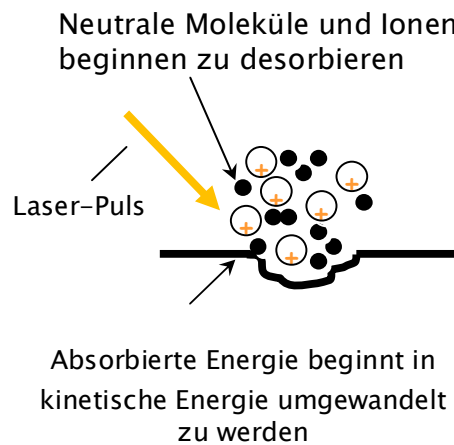


Abb. 1: Schematische Darstellung der Desorption/Ionisation bei MALDI⁶

Bei der Ionisation kommt es zur Bildung von in der Regel einfach geladenen sogenannten Pseudomolekülionen in einer protonierten bzw. kationisierten Form. Bei Biomolekülen dient zumeist die Matrix zur Ionisierung via Protonentransfer ($[M+H]^+$). Bei synthetischen Polymeren übernehmen dies (meistens) die angesprochenen Additive, z.B. Salze wie Natriumtrifluoracetat, die eine Kationisierung des Analyten zur Folge haben (z.B. $[M+Na]^+$).

Anschließend werden die Pseudomolekülionen mittels eines gepulsten elektrischen Potentialunterschiedes zwischen Target und der elektrostatischen Linsen bzw. einem auf Erdpotential befindlichen Grid in den Massenanalysator beschleunigt (Abb. 2).

⁶ Gertraude Hayn, *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Functional Polymers (Dissertation)*, TU Graz, 2003.

2 Theoretische Grundlagen

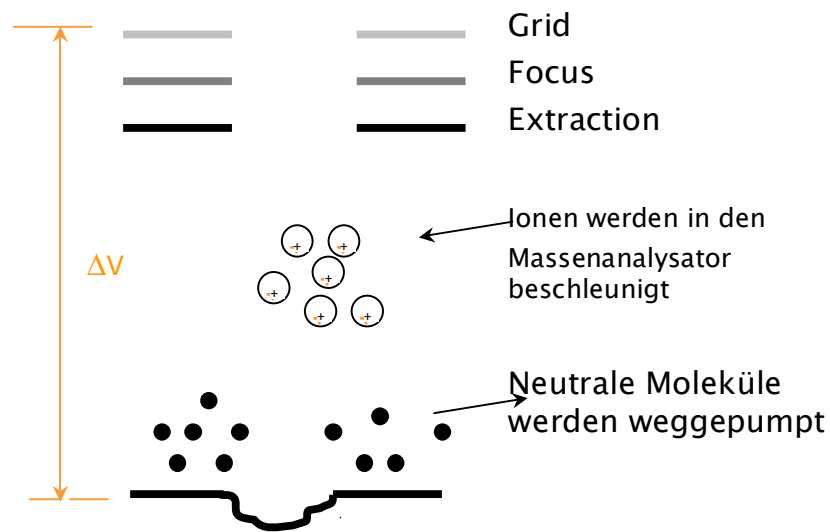


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ionenbeschleunigung bei MALDI⁶

Im Time-of-flight Massenanalysator erfolgt dann eine Auftrennung der Ionen nach Masse pro Ladung. Diese beruht auf der Tatsache, dass alle Molekülionen nach der Desorption aufgrund der Beschleunigungsspannung dieselbe kinetische Energie besitzen. Abhängig vom m/z -Wert ergeben sich bei gleicher kinetischer Energie unterschiedliche Geschwindigkeiten, und damit unterschiedlich lange Flugzeiten der Ionen bis zum Detektor. Ionen mit hohen m/z -Werten besitzen längere Flugzeiten. Das Quadrat der Flugzeit ist dem m/z -Wert proportional, wie nachfolgende Gleichung zeigt (Glg. 1).

$$m/z = 2 V t^2 / l^2 \quad (1)$$

m	Masse des Ions
z	Anzahl der Ladungen
V	Beschleunigungsspannung
t	Flugzeit
l	Weglänge zum Detektor

Somit kann durch Messung der Flugzeit und durch das Wissen um die Größen der einstellbaren Beschleunigungsspannung und der Weglänge zum Detektor der m/z -Wert berechnet werden. Für einen TOF-Massenanalysator gibt es nun 2 verschiedene Betriebsmöglichkeiten: Linear

2 Theoretische Grundlagen

(Abb. 3) und Reflectron (Abb. 4). Beide weisen Vor- und Nachteile auf. So kann im Reflectron Modus eine höhere Auflösung erreicht werden, wohingegen der Linear Modus eine höhere Empfindlichkeit (vor allem im Bereich von höheren Molekulargewichten) aufweist.

Im Linear Modus fliegen sowohl Molekülonen, als auch Neutralteilchen, welche durch den Zerfall von Ionen entstehen können, auf direktem Wege zum Detektor (Abb. 3, MCP steht für Multichannel Plate). Die Auflösung wird durch einige Faktoren limitiert. Und zwar starten nicht alle Ionen bei der Beschleunigung in den Massenanalysator an derselben Stelle, wodurch Molekülonen mit gleichem m/z -Wert aufgrund dieses Positionsunterschiedes leicht veränderte kinetische Energien aufweisen können. Demnach erfährt ein Ion, welches sich näher am Target befindet eine höhere Beschleunigung, als ein weiter entferntes. Diese kleinen Unterschiede in den kinetischen Energien der Ionen führen somit zu einer Verschlechterung der Auflösung, da Ionen mit gleichem m/z -Wert nicht exakt gleichzeitig am Detektor ankommen und dies somit eine Verbreiterung der Peaks zur Folge hat. Des Weiteren kann es vorkommen, dass später gebildete leichtere Ionen, schwerere Ionen sozusagen überholen. Diesem Phänomen wird durch „delayed-extraction“ Rechnung getragen, bei welcher alle Ionen erst einige Nanosekunden nach Ende des Laser-Pulses beschleunigt werden.

Im Linear Modus ist die Empfindlichkeit höher als im Reflectron Modus, da alle einmal beschleunigten Ionen – auch wenn selbige im Flug zerfallen – den Detektor erreichen und zur Signalintensität beitragen.

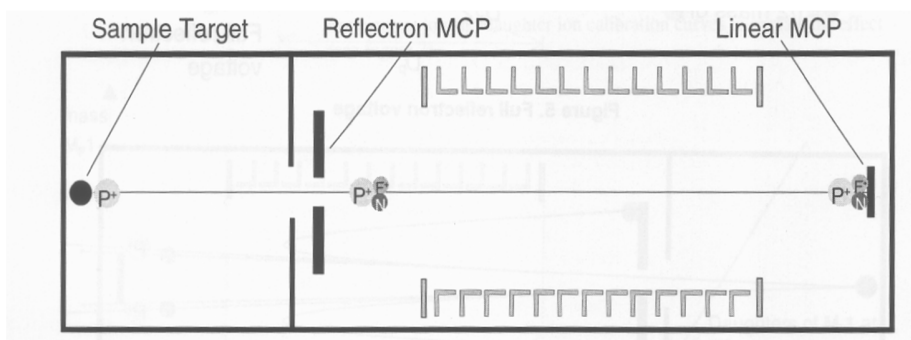


Abb. 3: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS im Linear Modus⁶

Die auflösungslimitierenden Effekte können durch den Betrieb im Reflectron-Modus zum Teil ausgeglichen werden. Hierbei wird innerhalb der Flugröhre ein elektrostatisches Feld erzeugt,

2 Theoretische Grundlagen

Ansprechverhalten und hohe Verstärkung auf und sind somit bestens für die Anwendung in MALDI-TOF Massenspektrometern geeignet. Typisch für MCPs ist jedoch, dass sie schnell übersättigen. Um dies zu verhindern muss entweder die Analytkonzentration oder die Laserenergie gesenkt werden. Die an der MCP austretende Elektronenwolke wird als Strom/Signal erfasst und dann an ein Datenerfassungssystem übermittelt.^{6,8}

2.2 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Elektronenmikroskopie ist eine der wichtigsten bildgebenden Methoden, die sowohl in der Biologie und Medizin, als auch in den Werkstoffwissenschaften Anwendung findet. Das Prinzip beruht auf einem Beschuss der Proben mit beschleunigten Elektronen und im Falle der Rasterelektronenmikroskopie der Detektion von Sekundärelektronen, rückgestreuten Elektronen (backscattered electrons – kurz: BSE) bzw. Röntgenstrahlen, welche durch Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe entstehen.

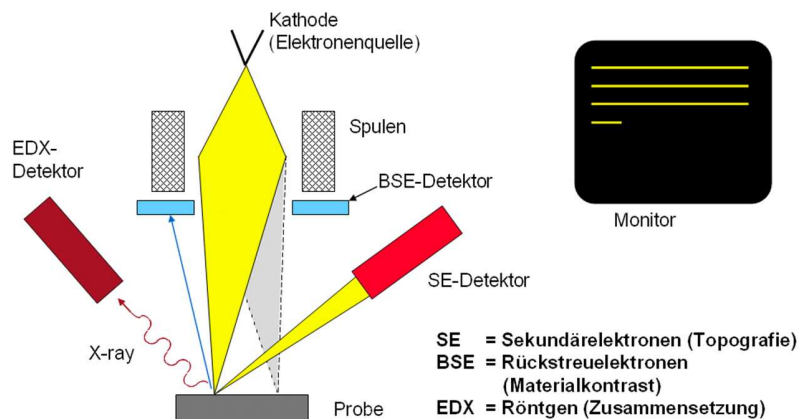


Abb. 5: Aufbau und Funktionsprinzip eines Rasterelektronenmikroskops⁹

In Abb. 5 sind Aufbau und Funktionsprinzip schematisch dargestellt. Zunächst wird eine Elektronenquelle zur Erzeugung des Elektronenstrahls benötigt. Diese besteht aus einer Kathode (Wolfram-Haarnadel- oder Lanthanhexaborid-Kristallelektrode), welche durch Anlegen eines Stromes erhitzt wird und Elektronen emittiert. Eine weitere Möglichkeit ist die

⁸ Montaudo, Giorgio / Lattimer, Robert (Editors): *Mass Spectrometry of Polymers*, S. 419-431, CRC Press, 2002.

⁹ www.ims-analytics.de/wp-content/uploads/2009/07/REM-Funktionsprinzip_REM.gif (am 11.11.2010)

2 Theoretische Grundlagen

Verwendung einer Feldemissionskathode, bei der Elektronen durch eine angelegte Spannung aus einer Wolframspitze herausgezogen werden. Des Weiteren besteht die Elektronenquelle aus einem Wehnelt-Zylinder mit negativer Vorspannung, welcher als elektrostatische Linse fungiert und die Elektronen vor der Anode konzentriert. Diese werden zur Anode hin beschleunigt, die meisten passieren die Anodenöffnung und bilden den Elektronenstrahl. Hier gilt es zu erwähnen, dass nur in einem geeigneten Hochvakuum ein stabiler Elektronenstrahl erzeugt bzw. aufrechterhalten werden kann und somit die Vakuumsysteme für alle Elektronenmikroskope kritisch sind.

Die Spannungsdifferenz zwischen Kathode und Anode ist die sogenannte Beschleunigungsspannung (bei Rasterelektronenmikroskopen ca. 5000 bis 30000 V). Sie determiniert die Energie und damit Wellenlänge der Elektronen. Zur weiteren Fokussierung und Ablenkung des Elektronenstrahls werden elektromagnetische Linsen eingesetzt. Zunächst wird der Elektronenstrahl durch die Kondensorlinse gebündelt und anschließend durch die Objektivlinse auf die Probenoberfläche fokussiert. Innerhalb der Objektivlinse befinden sich noch zusätzlich sogenannte Ablenkspulen, welche aufgrund einer angelegten veränderlichen Spannung ein Magnetfeld erzeugen, wodurch es möglich wird, den Elektronenstrahl über die Probe zu rastern. Weiters wird noch eine sogenannte Aperturblende (Metallstück mit einem kleinen runden Loch mit Durchmessern von 30-1000 μm) eingesetzt, welche den Elektronenstrahl formt und Streuelektronen zurückhält.

Wenn der Elektronenstrahl auf die Probe trifft, finden einer Reihe von Wechselwirkungen mit dem Kern und den Elektronen der Probenatome statt. Da in dieser Arbeit mit der Detektion von Sekundärelektronen und rückgestreuten Elektronen gearbeitet wurde, wird nachfolgend kurz auf diese eingegangen.

Das klassische REM-Bild entsteht durch die Detektion von Sekundärelektronen, welche ein topographisches Bild der Probe liefern. Diese werden durch die Wechselwirkung von Primärelektronen und schwach gebundenen Elektronen in den Probenatomen erzeugt. Sie weisen eine geringe Energie von 3 bis 5 eV auf, weshalb auch nur jene, welche nahe der Probenoberfläche erzeugt werden, die Probe verlassen können (der Rest wird von der Probe

2 Theoretische Grundlagen

absorbiert). Diese werden mithilfe eines Sekundärelektronendetektors (positiv geladener Kollektorschirm mit Szintillator und Photomultiplier) detektiert.

Die Erzeugung von rückgestreuten Elektronen beruht, im Gegensatz zu den Sekundärelektronen, auf elastischer und inelastischer Streuung. Das heißt, dass die einfallenden Elektronen einen Energieverlust erfahren, je nach Höhe der Ordnungszahl der Probenatome stärker oder schwächer rückgestreut werden und somit Unterschiede in der mittleren Ordnungszahl (Z) der Probe sichtbar gemacht werden können (Material- oder Z-Kontrast). Schwere Elemente streuen mehr Elektronen zurück, wodurch diese Bereiche am Bild hell erscheinen, wohingegen leichte Elemente, welche weniger Elektronen rückstreuen, dunkel erscheinen. Die Detektion erfolgt mithilfe eines speziellen Halbleiterdetektors. Aufgrund der relativ hohen Energien der rückgestreuten Elektronen (ca. 60 bis 80 % der ursprünglichen Energie des Elektronenstrahls) können sie die Probe aus größeren Tiefen als die Sekundärelektronen verlassen. Durch das größere Austrittsvolumen ist die Auflösung im Vergleich zur Detektion von Sekundärelektronen schlechter.

Die Probenvorbereitung ist für die Rasterelektronenmikroskopie relativ simpel, nur eine Vakuumstabilität muss gegeben sein. Elektrisch leitende Proben bedürfen keiner weiteren speziellen Vorbereitung, lediglich nicht leitende Proben müssen mit einer leitenden Schicht, zumeist aus Gold, überzogen werden, da es ansonsten schnell zu Aufladungen der Probe und somit zu Verschlechterungen der Bildqualität kommt.¹⁰

Im Zuge dieser Arbeit wurden alle Proben direkt untersucht. Auf ein Besputtern mit Gold wurde verzichtet, da nach den REM-Untersuchungen MALDI-TOF-MS – Experimente durchgeführt wurden.

¹⁰ Flegler, Stanley L. / Heckmann, John W. / Klomparens, Karen L.: *Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen*, Spektrum Akademischer Verlag Berlin und Heidelberg, 1995.

3 Probenpräparation für MALDI-TOF-MS

Wichtige Aspekte der Probenpräparation sind z.B. die Auswahl einer für den Analyten geeigneten Matrix, das Konzentrationsverhältnis der beiden zueinander und die Auftragungstechnik. In diesem Kapitel wird ein kurzer Überblick über bewährte und neue Techniken in der Probenpräparation gegeben.

3.1 Matrizes

Um als Matrix fungieren zu können, muss eine Substanz zunächst einige Anforderungen erfüllen. Sie sollte eine hohe Absorption im Wellenlängenbereich des Lasers aufweisen (Stickstofflaser: 337 nm), vakuumstabil, im selben Lösungsmittel wie der Analyt löslich sein (für Ausnahmen siehe 3.2 Auftragungstechniken), nicht mit dem Analyt reagieren und den Analyt protonieren bzw. eine Kationisierung zulassen können.¹¹

Im Regelfall sind dies organische Moleküle mit konjugierten bzw. aromatischen Gruppen. Einige typische Vertreter sind Dithranol (1,8,9-Anthracenriol), DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) und CHCA (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure) (Abb. 6). Ausführliche Listen mit geeigneten Matrizes bzw. Matrix/Analyt-Paaren finden sich in der Literatur.³

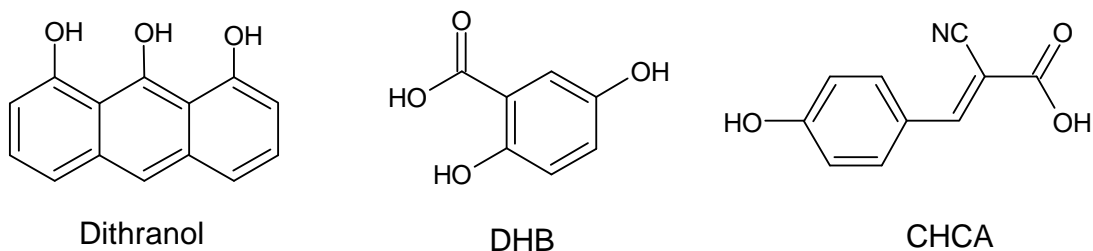


Abb. 6: Strukturen von Dithranol, DHB und CHCA

Seit den Versuchen von Tanaka et al.¹² - in denen gezeigt werden konnte, dass auch anorganische Nanopartikel als Matrizes fungieren können (in diesem Fall war es ein Gemisch

¹¹ Williams, J. B.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. *Macromolecules* **1996**, *29*, 8144-8150.

¹² Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spec.* **1988**, *2*, 151-153.

3 Probenpräparation bei MALDI-TOF-MS

aus Cobaltnanopartikeln und Glycerin) - gewinnt auch die Verwendung von Nanomaterialien zunehmend an Bedeutung. Diese bieten den Vorteil, dass bei der Analyse von Molekülen mit niedrigen Molekulargewichten (< 1000 Da) keine störenden Matrix- und weniger Untergrundsignale auftreten.¹³ So konnte schon die Eignung als Matrix für eine Vielzahl von Nanomaterialien, wie zum Beispiel SiO₂-¹³ und ZnO-¹⁴Nanopartikel, sowie ZnO-Nanowires¹⁵, gezeigt werden.

Des Weiteren wurde versucht ein bestehendes Matrix/Analyt-Paar durch Zusatz von Nanopartikeln zu optimieren. In einem Fall geschah dies durch die Zugabe von CdSe/ZnS - Quantumdots, fluoreszierende Halbleiter – Nanokristalle, zu α -Cyano-4-hydroxymethylsäure im Rahmen der Untersuchung von tryptisch abgebautem Bovin Serumalbumin (BSA).¹⁶ Es konnte ein Abnahme der Kristallgröße, eine homogenere Verteilung und in weiterer Folge ein verbessertes Signal-zu-Rausch – Verhältnis und eine höhere Anzahl an detektierten Peptiden beobachtet werden. In einem anderen Fall wurde erfolgreich versucht Gold-Nanopartikel mit CHCA zu modifizieren.¹⁷ Dadurch konnte, im Vergleich zur Verwendung von unmodifizierten Gold-Nanopartikeln als Matrix, eine Verbesserung der Desorptions-/Ionisations-Effizienz bei Peptiden und eine Abnahme von Gold-Cluster-Signalen festgestellt werden.

Diese Methoden sind teilweise schon einer leicht abgewandelten Form von MALDI, und zwar der sogenannten Oberflächenunterstützten Laser Desorption/Ionisation (SALDI), zuzuschreiben. Hierbei dient eine modifizierte Targetoberfläche zur Desorption/Ionisation. Die am weitesten verbreitetste ist sicherlich DIOS (Desorption/Ionisation auf porösem Silizium).¹⁸ Das Funktionsprinzip beruht auf einem Anätzen der Siliziumoberfläche, wodurch diese nanokristalline Eigenschaften aufweist, somit das Laserlicht absorbiert und Energie auf den Analyten übertragen kann, was schließlich eine Desorption/Ionisation zur Folge hat. Dadurch können auch die Limitierungen der Mischbarkeit bei „normalen“ Probenpräparationen überwunden werden, da der Analyt direkt auf das Target aufgetragen werden kann.

¹³ Wen, X.; Dagan, S.; Wysocki, V. H. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 434-444.

¹⁴ Watanabe, T.; Kawasaki, H.; Yonezawa, T.; Arakawa, R. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1063-1071.

¹⁵ Go, E. P.; Apon, J. V.; Luo, G.; Saghatelian, A.; Daniels, R. H.; Sahi, V.; Dubrow, R.; Cravatt, B. F.; Vertes, A.; Siuzdak, G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1641-1647.

¹⁶ Bailes, J.; Vidal, L.; Ivanov, D. A.; Soloviev, M. *Journal of Nanobiotechnology* **2009**, *7*:10.

¹⁷ Duan, J.; Linman, M. J.; Chen, C.-Y.; Cheng, Q. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 1530-1539.

¹⁸ Wie, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G. *Nature* **1999**, *399*, 243-246.

3 Probenpräparation bei MALDI-TOF-MS

Viele weitere sogenannte Matrixfreie Methoden wurden erfolgreich angewandt und finden sich in der Literatur.¹⁹

3.2 Auftragungstechniken

Die einfachste und dadurch auch am weitesten verbreitete Auftragungstechnik ist die sogenannte Dried-Droplet-Methode.²⁰ Hierbei werden Analyt-, Matrix- und optionale Additiv-Lösungen gemischt, ca. 0,6 – 1 µl auf das Target gespottet und an Luft getrocknet. Die großen Probleme dieser Methode sind die relativ große Inhomogenität am Spot, aufgrund von möglichen Phasenseparierungen während der Kristallisation. Dadurch wird man erstens gezwungen „sweet-spots“ zu suchen und zweitens resultiert dies in einer schlechten Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit.

Bei einer alternativen Auftragungstechnik wird das Target nach dem Aufspotten des Gemisches in einen Vakuumtrockenschrank gegeben. Dadurch verdampft das Lösungsmittel schneller und dies führt zu kleineren Kristallen, und einer höheren Homogenität des Spots.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Lösungen nicht zu mischen, sondern schichtweise, mit der sogenannten Dünnschicht- bzw. Fast Evaporation-Technik, aufzutragen.²¹ Hierbei wird die Matrix in einem schnell verdampfenden Lösungsmittel, wie z.B. Aceton, gelöst und ca. 0,5 µl auf das Target gespottet. Nach der Trocknung wird der Analyt in einem anderen Lösungsmittel aufgetragen, das die gebildeten Matrixkristalle auflöst, aber nicht wieder vollständig auflöst. Dadurch dienen die Matrixkristalle als Kristallisationskeime, was zu kleineren Matrix-Analyt-Co-Kristallen und einer homogenen Verteilung am Spot führt. Durch diese Auftragungstechnik können Verbesserungen der Empfindlichkeit und der Auflösung erzielt werden.

Eine komplexere Auftragungstechnik stellt die Auftragung mithilfe eines sogenannten Elektrosprays dar.^{22,23} Diese ist eine der Elektrospray Ionisation (ESI)⁴ verwandte Technik, bei der aus der Matrix/Analyt-Lösung ein geladenes Aerosol erzeugt wird, welches auf dem Target

¹⁹ Peterson, D. S. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 19-34.

²⁰ Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **1987**, *78*, 53-68.

²¹ Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3281-3287.

²² Axelsson, J.; Hoberg, A.-M.; Waterson, C.; Myatt, P.; Shield, G. L.; Varney, J.; Haddleton, d. M.; Derrick, P. J. *Rapid Commun. Mass Spec.* **1997**, *11*, 209-213.

²³ Hanton, S. D.; Cornelio Clark, P. A.; Owens, K. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 104-111.

3 Probenpräparation bei MALDI-TOF-MS

abgeschieden wird. Dadurch können Phasenseparationen weitestgehend verhindert werden, kleinere Kristallgrößen und höhere Homogenität am Spot erreicht werden. Dies wirkt sich positiv auf die Desorptions/Ionisationseigenschaften des Analyten und die Reproduzierbarkeit aus. Problematisch ist, dass man zusätzliches Equipment benötigt und die Technik zeitaufwändiger als andere ist.

3.3 Umgebungseinflüsse

Zu den Einflüssen der Luftfeuchtigkeit bei der Probenpräparation konnten keine Informationen in der Literatur gefunden werden. Es wurden lediglich Versuche gefunden, die den Einfluss der Zugabe von Wasser zum Lösungsmittelgemisch untersuchen.²⁴ Hierbei konnte eine Verschlechterung der Reproduzierbarkeit und eine Massendiskriminierung bei der Untersuchung von Poly(methylmethacrylat) (PMMA) festgestellt werden.

Der Einfluss der Temperatur wird, wie bereits in Abschnitt 3.2 erwähnt, z.B. durch die Benützung eines Trockenschrankes ausgenutzt. Durch das schnellere Verdampfen des Lösungsmittels kann dies zu kleineren Kristallen und einer höheren Homogenität des Spots führen.

²⁴ Chen, H.; Guo, B. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4399-4404.

4 Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Probenpräparation untersucht werden. Hierfür sollte die Probenpräparation in einer Glovebox bei Bedingungen mit definierten Luftfeuchtigkeitswerten durchgeführt werden und der Einfluss auf die Kristallisations- und nachfolgend Desorptions-/Ionisationseigenschaften eines Peptides (Angiotensin I) und eines synthetischen Polymers (Polyethylenglykol 1000) bestimmt werden.

In weiteren Experimenten sollte der Einfluss der Targettemperatur auf das Kristallisations- und Desorptions-/Ionisationsverhalten von verschiedenen Biomolekülen mit CHCA als Matrix untersucht werden.

Des Weiteren sollte versucht werden, durch Zusatz von Nanopartikeln zu ausgewählten Matrix-Analyt-Gemischen, das Kristallisationsverhalten gezielt zu beeinflussen. Die dahinterstehende Überlegung ist, dass die Nanopartikel als Kristallisationskeime dienen sollten, um somit zu gleichmäßigerer Kristallisation am Spot zu kommen. Dadurch sollte das Aufsuchen von sogenannten „sweet spots“, also Stellen mit hoher Analytsignalintensität, überflüssig werden und damit auch die Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit aufgrund der höheren Homogenität verbessert werden.

Zusätzlich galt das Interesse ungewöhnlicher Kombination von Matrix und Lösungsmittel. Hierbei sollte α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA), eine der wichtigsten Matrices im Bereich der Charakterisierung von Peptiden und Biomolekülen^{25,26}, in THF als Lösungsmittel für verschiedene synthetische Polymere eingesetzt werden.

²⁵ Beavis, R.C.; Chaudhary, T.; Chait, B.T. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 156-158.

²⁶ Mank, M.; Stahl, B.; Boehm, G. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2938-2950.

5 Experimentelles

5.1 Geräte

- Rasterelektronenmikroskop: JEOL JSM-5410 Scanning Microscope
Einstellungen: working distance (wd) = 13
 Beschleunigungsspannung: 5,0 kV
 Bilderfassung: Semafore
- Massenspektrometer: Micromass ToF Spec 2E
Einstellungen: Operating voltage: 20 kV
 Polarity: Positive
 Source (V): 20000
 Extraction (V): 20000
 Focus (V): 16000
 Reflectron (V): 24500
 Pulse time: 39
 Sampling rate: 500 MHz
 Sensitivity: 50 mV
 Shots pro scan: 5
 Detector (V): 1700 für Reflectron Mode
 3800 für Linear Mode
- Analysenwaage: Sartorius MC1, Research RC 210 P
- Kolbenhubpipetten: Hamilton – 2 µl, 25 µl, 100 µl, 1 ml
- Heizplatte: IKAMAG RCT
- Controlled Atmosphere Chamber (Nitrogen dry box 850-NB) by Plas Labs, Inc. (Lensing, Michigan, USA)
- Heizeinheit (Heater Unit: 800-HEATER) by Plas Labs, Inc. (Lensing, Michigan, USA)
- Thermo-/Hygrometer Voltcraft HT 200:
 Genauigkeit Feuchte: % rH ± 2 % (bei 25 °C und 20 – 80 % rH), alle anderen Bereiche ± 2,5 %
 Genauigkeit Temperatur: ± 0,5 °C (bei 25 °C), alle anderen Bereiche ± 0,8 °C

5.2 Chemikalien

Chemikalie	Bezogen von	CAS	Katalognummer
Tetrahydrofuran, anhydrous, ≥ 99.9%, inhibitor free	Sigma-Aldrich	109-99-9	401757-1L
Methanol, 99.9%, A.C.S., spectrophotometric grade	Sigma-Aldrich	67-56-1	154903-1L
Acetonitrile, ACS reagent, ≥ 99.5%	Sigma-Aldrich	75-05-8	360457-1L
1,8,9-Anthracentriol, puriss. p.a., matrix substance for MALDI-MS	Fluka Analytical	1143-38-0	
Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid 97%	Aldrich	28166-41-8	14550-5

5 Experimentelles

Sodium trifluoroacetate, 98%	Aldrich Chemistry	2923-18-4	13210-1
Silver fluoroacetate, purum 48,3%/g	Fluka Chemika	2966-50-9	85322
Polyethylenglykol 1000	Aldrich	25322-68-3	20242-8
Polyethylenglykol 2000	Aldrich	25322-68-3	29590-6
Polyethylenglykol 4600	Aldrich	25322-68-3	37300-1
Polyethylenglykol 8000	Aldrich	25322-68-3	20245-2
Poly-(ethylenglykol)methylether, Durchschnitts-MG 2000	Aldrich	9004-74-4	20250-9
Poly(methylmethacrylat), Mp = 1210, Mw = 1070, Mn = 890, Mw/Mn = 1,20	Polymer Standards Service	9011-14-7	
Polystyrene, Mp = 1820, Mw = 1920, Mn = 1770, D = 1,08	Polymer Standards Service	9003-53-6	
Angiotensin I, Acetate Salt, Human; Synthetic, purity: 99%, peptide content: 85%	Sigma	70937-97-2	A-9650
Insulin chain B oxidized, from Bovine Insulin, purity: 85%, peptide content: 87%	Sigma	30003-72-6	I6383-5MG
ACTH Fragment 18-39, Mass Spec Standard	Sigma	53917-42-3	A-8346
Zinc oxide, dispersion, nanoparticles, 50 wt.% in water, < 100 nm (DLS) particle size, < 35 nm avg. particle size (APS)	Aldrich Chemistry	1314-13-2	721077-100G
Indium tin oxide, nanopowder	Aldrich	50926-11-9	544876-5G
CuInS ₂ -Nanopartikel, Partikelgröße ca. 3 nm	-	-	-

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

6.1 Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit

Durchführung

Alle Versuche wurden in einer Glovebox durchgeführt. Die Glovebox wurde mit einem digitalem Hygro- und Thermometer und einer Heizeinheit zur Einstellung der Temperatur und Gewährleistung ausreichender Luftumwälzung ausgestattet. Die relative Luftfeuchtigkeit (rH) wurde zunächst mittels Spülen mit Stickstoff auf 3 % eingestellt und anschließend durch Verdampfen von Wasser auf die gewählten Werte erhöht.

Für jeden Wert der Luftfeuchtigkeits wurden 8 Spots untersucht. Auf jedem Spot wurden sechs Positionen zufällig ausgewählt, auf denen jeweils 25 Laser-Shots aufgenommen wurden. Anschließend wurden alle erhaltenen Spektren summiert. Zur Ermittlung des Mittelwerts der Signalintensität des Analyts auf den 8 Spots, wurde die Intensität des jeweils höchsten Analytpeaks im Spektrum herangezogen ($[M+H]^+$ für Angiotensin I und $[H(O-CH_2-CH_2)_{22}-OH + Na]^+$ für Polyethylenglykol 1000), der als Anhaltspunkt für die Gesamtintensität der Analytsignale dienen soll.

Des Weiteren wurde die Standardabweichung zur Veranschaulichung der Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit bestimmt. In den nachfolgenden Abb.en wird jeweils jenes Spektrum gezeigt, welches von der Intensität her dem Mittelwert am nächsten kommt.

6.1.1 Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf Untersuchungen von PEG1000

Alle Versuche wurden mit Polyethylenglykol 1000 (PEG1000) aus Dithranol und Natriumtrifluoracetat (NaTFA) in THF durchgeführt.

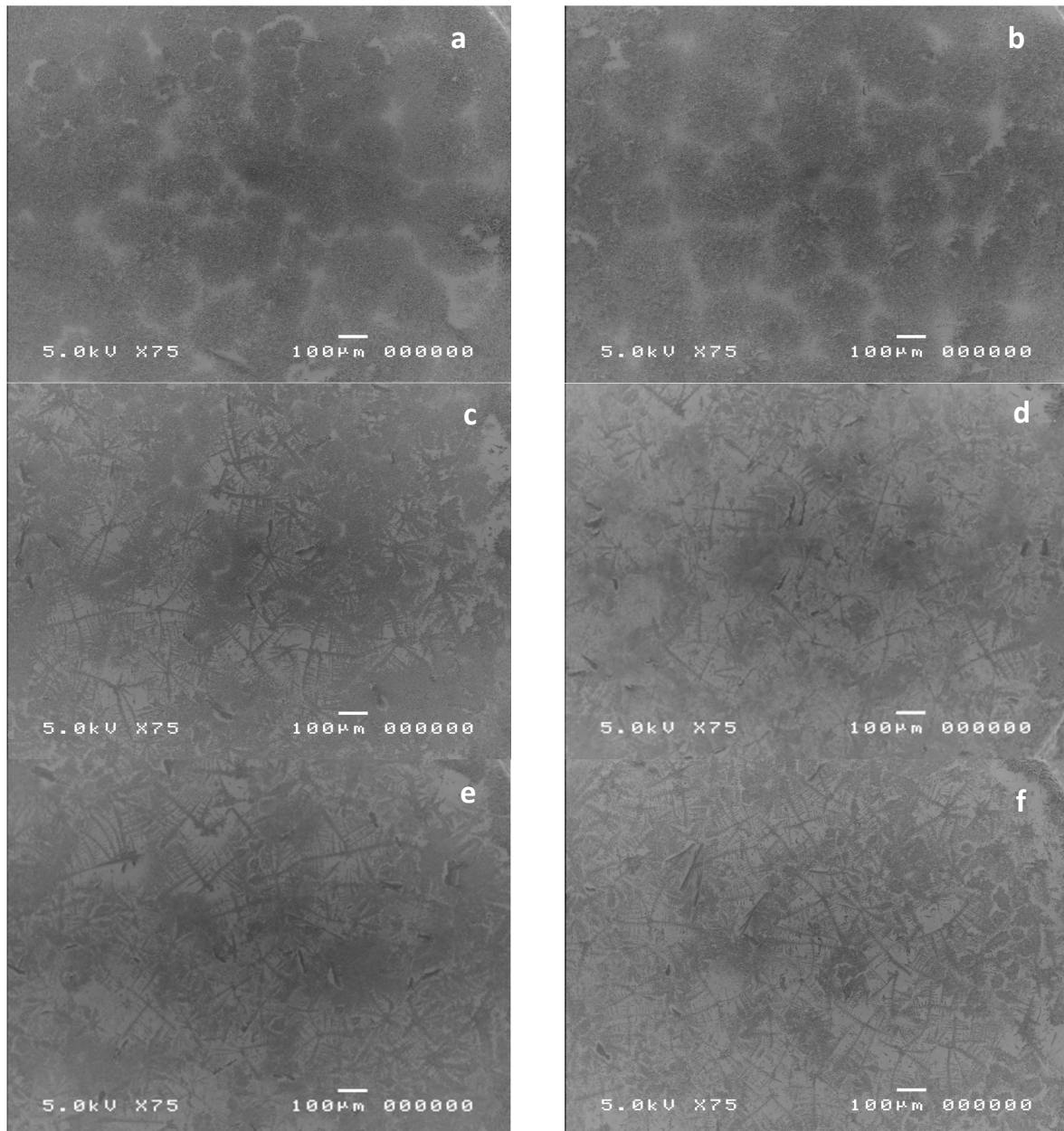
Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 µl Dithranol (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 µl NaTFA (1,00 mg/ml) und 20 µl PEG1000 (5 mg/ml) zugegeben, gemixt und 0,6 µl auf die Spots aufgetragen.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Die Matrix-Lösung wurde für jeden Versuch unmittelbar vorher, die NaTFA- und PEG-Lösungen jeden Tag frisch hergestellt.

REM-Aufnahmen



6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

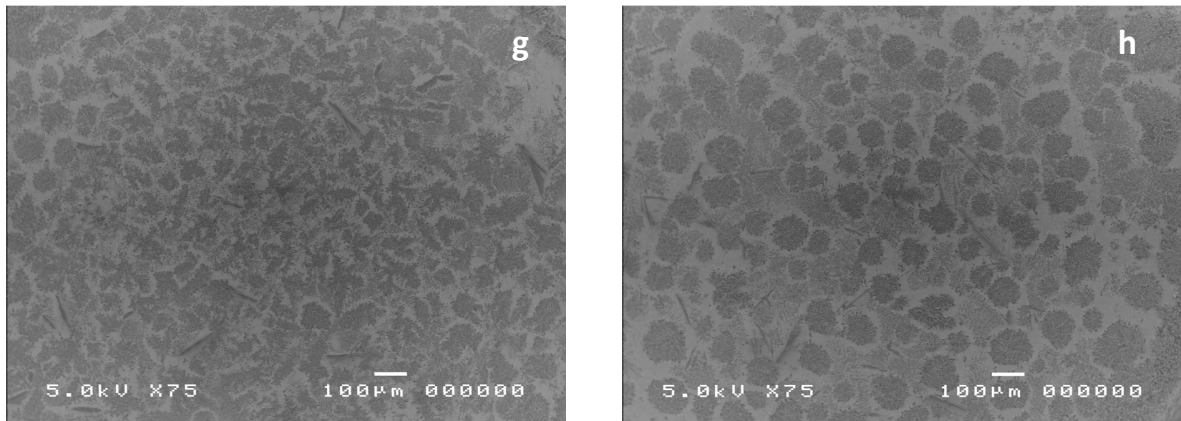
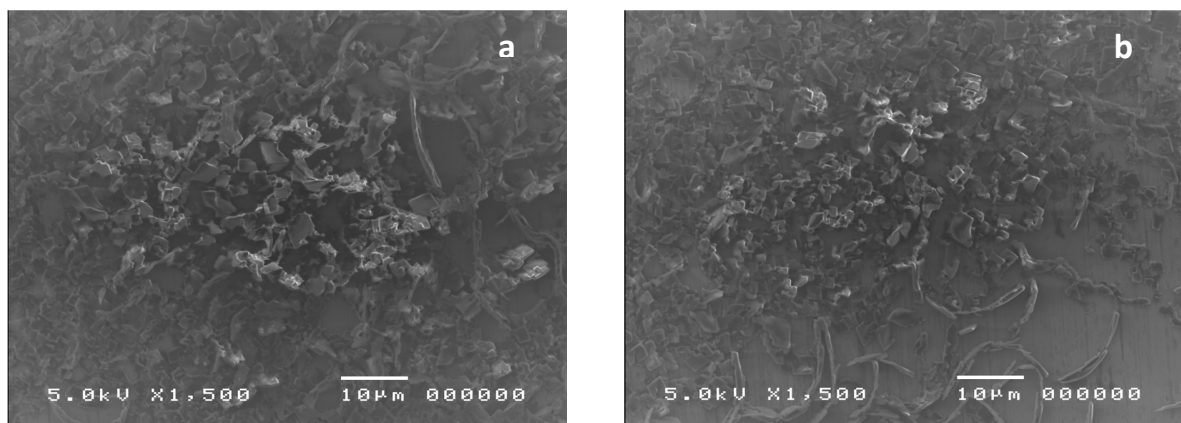


Abb. 7: Übersichts-REM-Aufnahmen von PEG1000/Dithranol/NaTFA – Kristallisaten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten; (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 %, (d) 32 %, (e) 44 %, (f) 54 %, (g) 75 % und (h) 90 % rH

Wie bereits aus den Übersichtsaufnahmen (Abb. 7) ersichtlich wird, besitzt die Luftfeuchtigkeit einen großen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten. So zeigt sich bei geringer Luftfeuchtigkeit (3 und 10 % rH), dass die Kristalle relativ dicht gepackt und dazwischen nur kleine Freiräume zu beobachten sind. Diese hohe Homogenität nimmt mit zunehmender Luftfeuchtigkeit ab und es kommt zu einer „Auflockerung“ des Kristallisats. Weiters kann eine Bildung von stäbchenförmigen Kristallen beobachtet werden. Ab einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75 % beginnt das Matrix/Analyt-Gemisch wieder dichter gepackt zu kristallisieren.



6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

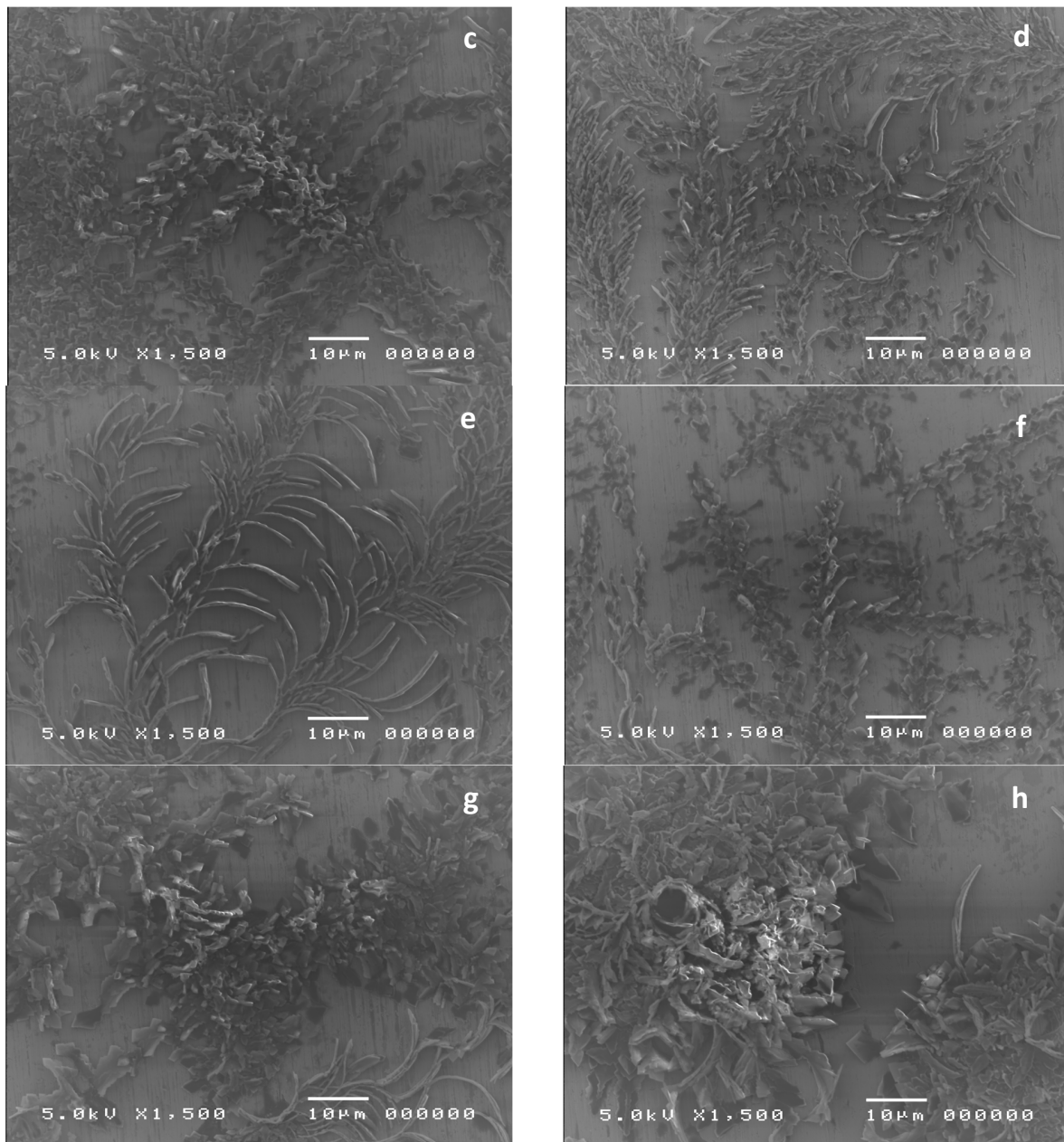


Abb. 8: REM-Aufnahmen mit höherer Vergrößerung von PEG1000/Dithranol/NaTFA – Kristallisaten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten ; (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 %, (d) 32 %, (e) 44 %, (f) 54 %, (g) 75 % und (h) 90 % rH

Die REM-Aufnahmen bei hoher Vergrößerung (Abb. 8) bestätigen, dass das Kristallisat bei niedrigen Luftfeuchtigkeitswerten (3 und 10 % rH) dicht gepackt vorliegt. Weiters ist eine Ähnlichkeit zum Kristallisat bei 90 % rH zu erkennen. Ab einer relativen Luftfeuchtigkeit von 32 % kann ein vermehrtes Auftreten von länglichen Kristallen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Kristallwachstumsgeschwindigkeit höher ist, als die Keimbildungsgeschwindigkeit. Ab 54 % rH ist wieder eine Abnahme der Kristallgröße zu

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

beobachten bis sich schließlich bei 90 % ein ähnliches Kristallisationsverhalten wie bei 3 % rH zeigt.

MALDI

Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 35, Suppression: 200, Pulse Voltage: 2300 V

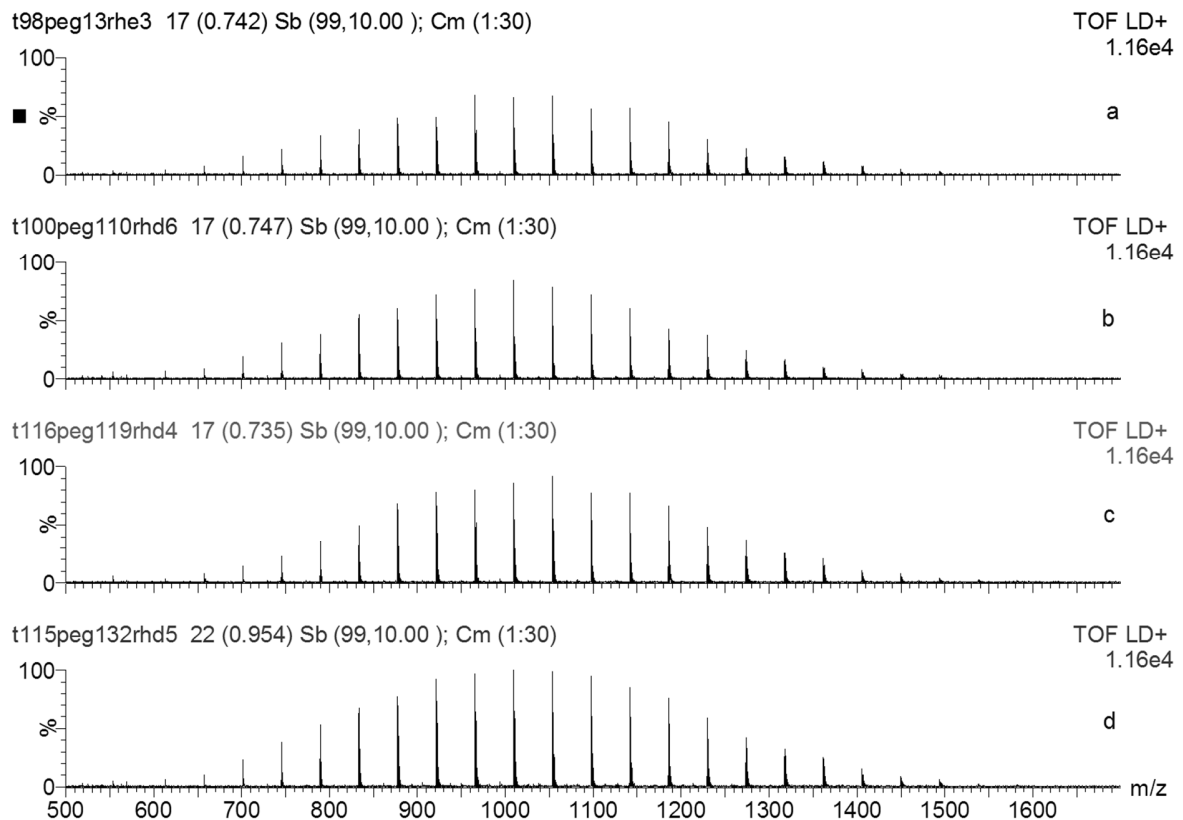


Abb. 9: MALDI-Spektren von PEG1000 aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 % und (d) 32 % relativer Luftfeuchtigkeit

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

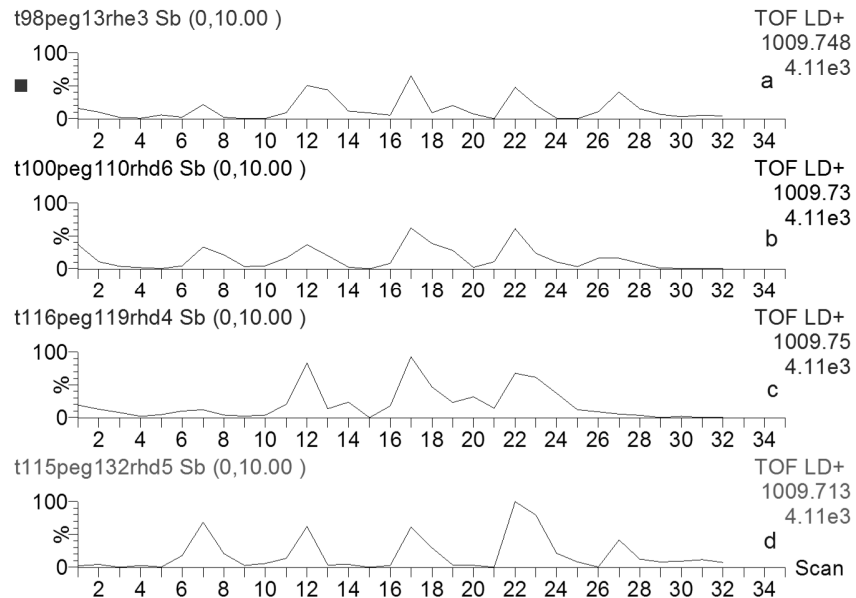


Abb. 10: Ionenchromatogramme von $[\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{22}-\text{OH} + \text{Na}]^+$ aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 % und (d) 32 % relativer Luftfeuchtigkeit

Wie man den MALDI-Spektren (Abb. 9) entnehmen kann, nimmt die Signalintensität mit steigender Luftfeuchtigkeit zu. Auch die Homogenität am Spot scheint, wie aus den Ionenchromatogrammen (Abb. 10) ersichtlich, etwas besser zu werden. Bei 32 % rH ist nach jedem Wechsel der Laserposition in etwa gleich viel Signal ($[\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{22}-\text{OH} + \text{Na}]^+$) beobachtbar, wohingegen bei den anderen Luftfeuchtigkeitswerten an manchen Positionen deutlich weniger Signal zu sehen ist.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

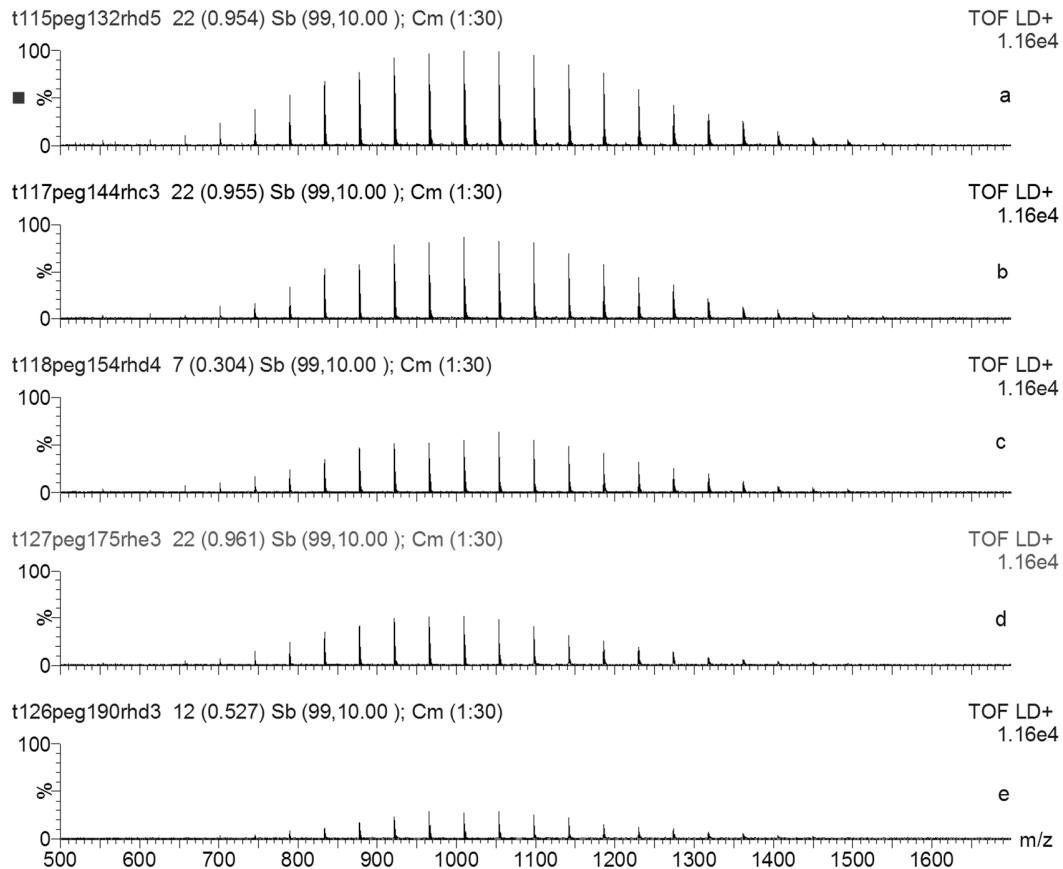


Abb. 11: MALDI-Spektren von PEG1000 aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 32 %, (b) 44 %, (c) 54 %, (d) 75 % und (e) 90 % relativer Luftfeuchtigkeit

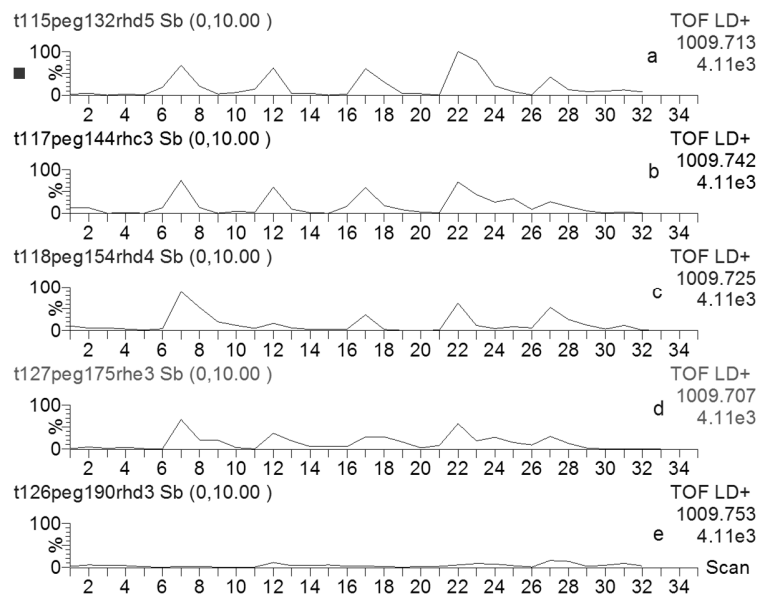


Abb. 12: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{22}-OH + Na]^+$ aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 32 %, (b) 44 %, (c) 54 %, (d) 75 % und (e) 90 % relativer Luftfeuchtigkeit

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Wie aus den MALDI-Spektren (Abb. 11) ersichtlich, nimmt die Intensität der PEG1000-Signale ab 32 % relativer Luftfeuchtigkeit kontinuierlich wieder ab. Auch hier zeigen die Ionenchromatogramme (Abb. 12) sinkende Homogenität.

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der intensivsten PEG-Signale ($[\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{22}-\text{OH} + \text{Na}]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit

Luftfeuchtigkeit / %rH	Intensität	RSD	RSD / %
3	7694	1598	21
10	9718	1167	12
19	11121	2237	20
32	12209	2256	18
44	9814	2420	25
54	7441	1303	18
75	6028	1012	17
90	3768	1305	35

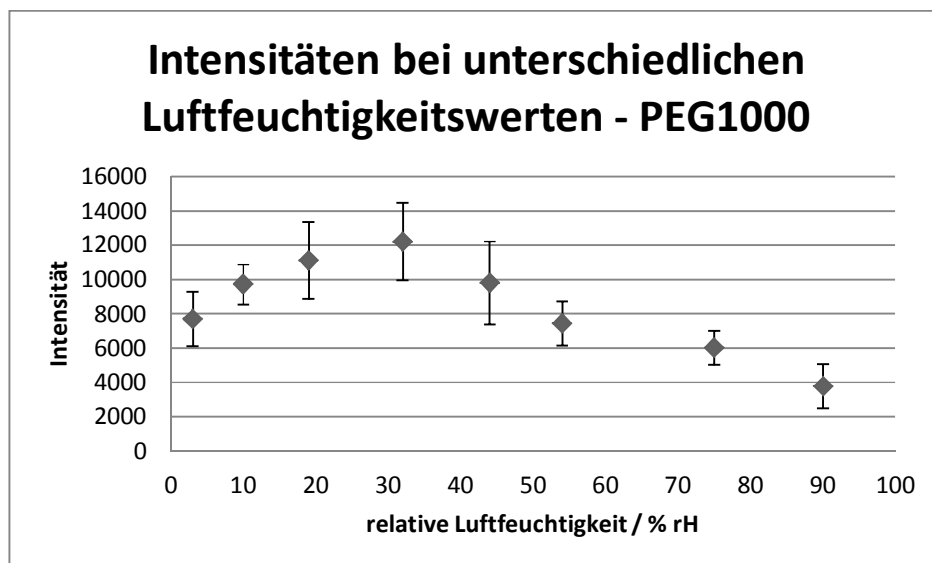


Abb. 13: Graphische Darstellung der PEG – Signalintensitäten ($[\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{22}-\text{OH} + \text{Na}]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit

Diskussion

Wie aus der graphischen Darstellung (Abb. 13) ersichtlich wird, durchläuft die Signalintensität ein Maximum bei 32 % relativer Luftfeuchtigkeit. Wie die REM-Bilder (Abb. 7 und Abb. 8) zeigen, lockert sich aufgrund steigender Luftfeuchtigkeit die Kristallstruktur auf, was sich bis zu einer relativen Luftfeuchtigkeit von 32 % positiv auf das Desorptions-/Ionisationsverhalten des

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Analyten auszuwirken scheint (Abb. 9). Diese Auflockerung ist einerseits - aufgrund der Hygroskopie von THF - auf eine Aufnahme von Wasserdampf aus der Luft während des Trocknungsprozesses zurückzuführen. Weiters ist zu bedenken, dass es während der Verdampfung von THF zu einer Abkühlung am Spot kommt, wodurch die Kondensation von Luftfeuchtigkeit gefördert wird. Dies konnte auch durch eine Verlangsamung des Trocknungsprozesses bei hohen Luftfeuchtigkeitswerten beobachtet werden. Demnach ist in der Endphase des Trocknungsprozesses viel Wasser am Spot vorhanden, hat somit einen großen Einfluss auf das Kristallisationsverhalten und führt bei hohen Luftfeuchtigkeitswerten zu einer Konzentrierung des Co-Kristallisats an manchen Stellen (Abb. 7, g und h), welche sich negativ auf die Signalintensität auswirkt.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Luftfeuchtigkeit eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung von Matrix und Analyt spielt und auch bei einem relativ unempfindlichen Analyt wie Polyethylenglykol, also einer idealisierten Probe unter idealisierten Bedingungen, einen erheblichen Einfluss auf die Signalintensität besitzt. Bei realen Proben, unter realen Bedingungen, kann der Einfluss noch größer ausfallen, was den weithin bekannten Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Probenpräparation für MALDI-TOF-MS einen weiteren wichtigen Gesichtspunkt hinzufügt, der bislang nicht untersucht wurde. Bezüglich Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die über mehrere Tage bei unterschiedlichen Bedingungen bzw. auch mithilfe automatisierter Systeme gewonnen werden, stellen die Ergebnisse einen Ansatzpunkt zur Verbesserung dar.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

6.1.2 Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf Untersuchungen von Angiotensin I

Alle Versuche wurden mit Angiotensin I aus α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) in Methanol durchgeführt.

Probenpräparation:

Zunächst wurden 60 μ l CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 10 μ l Angiotensin I (2 pmol/ μ l) zugegeben und je 0,6 μ l auf die Spots aufgetragen.

Die Matrix-Lösung wurde für jeden Versuch unmittelbar vorher frisch hergestellt.

REM-Aufnahmen

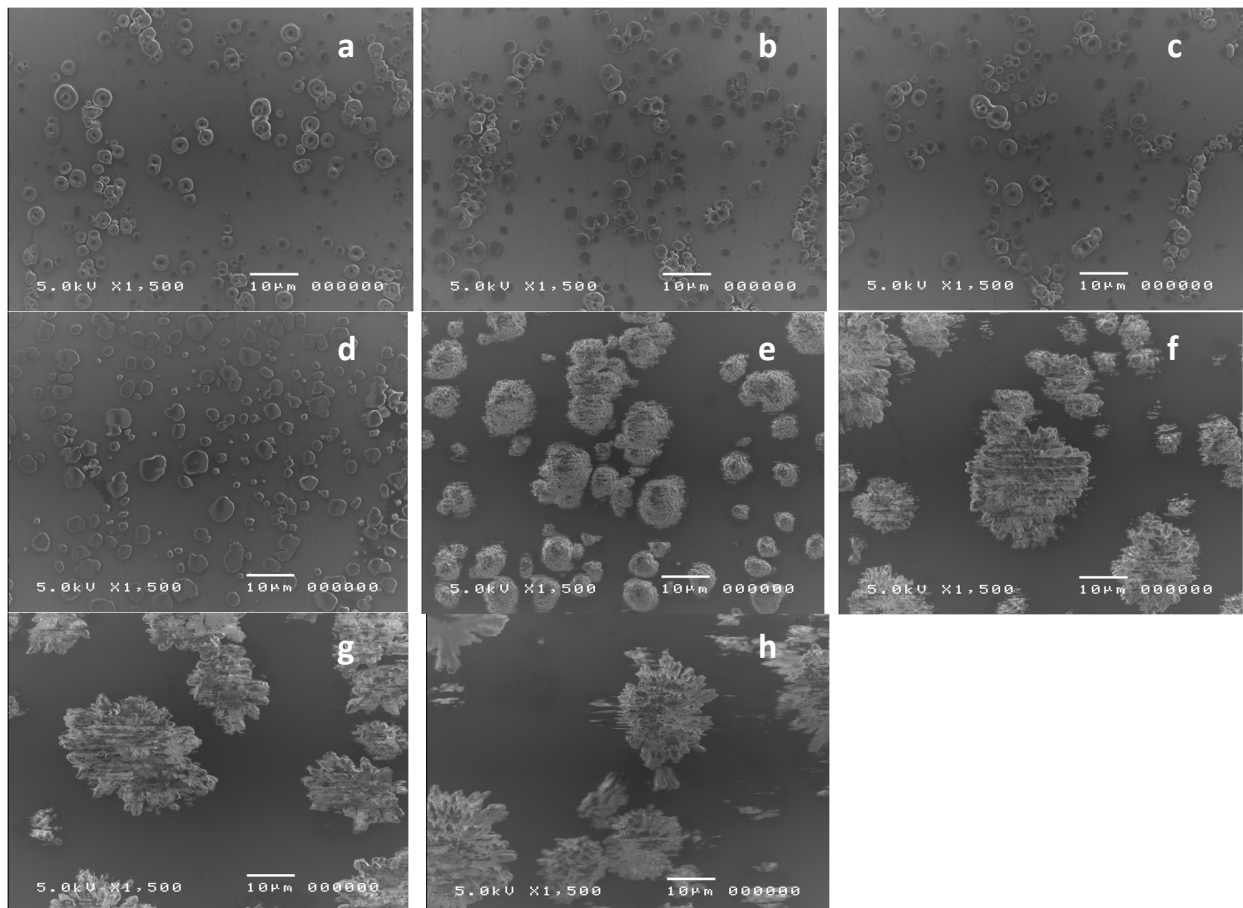


Abb. 14: REM-Aufnahmen von Angiotensin I/CHCA – Kristalliten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten ; (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 %, (d) 31 %, (e) 42 %, (f) 52 %, (g) 71 % und (h) 89 % rH

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

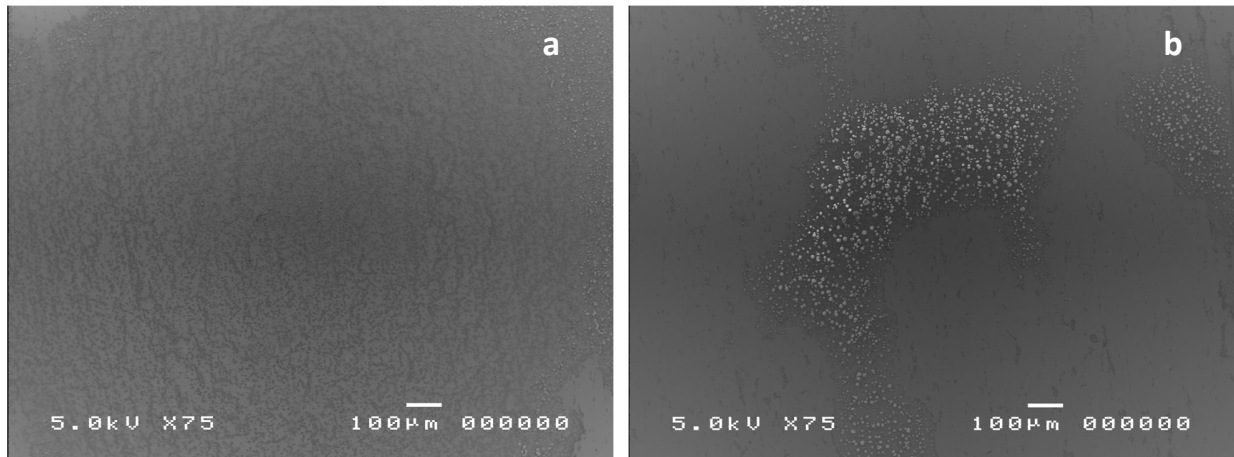


Abb. 15: Übersichts-REM-Aufnahmen von Angiotensin I/CHCA – Kristallisaten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten ; (a) 31 % und (b) 42 % rH

Aus den REM-Bildern (Abb. 14) ist ersichtlich, dass die Kristallisation bis 20 % rH in etwa gleich erfolgt, sich bei 32 % rH leicht und ab 42 % rH gravierend ändert. Diese gravierende Änderung ist auf ein „Zusammenziehen“ des Gemisches beim Trocknen zurückzuführen, welches zu einer Aufkonzentrierung in der Mitte des Spots und in weiterer Folge zu einer Vergrößerung der Kristalle führt (Abb. 15). Gründe hierfür sind die bereits angesprochene Aufnahme von Wasserdampf durch das Lösungsmittel und die, durch die Abnahme der Temperatur am Spot während des Trocknungsprozesses, geförderte Kondensation der Luftfeuchtigkeit (siehe 6.1.1, *Diskussion*). Dies führt ab einer relativen Luftfeuchtigkeit von 42 % in weiterer Folge zu einer Konzentrierung des Analyten in der Mitte des Spots. Deshalb konnte bei der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS in diesem Bereich eine erhöhte, im überwiegenden Teil des Spots jedoch keine Analytsignalintensität beobachtet werden. Aus diesem Grund, ist eine Korrelation mit den Ergebnissen der vorherigen Proben, bei welchen die Kristallisation über den ganzen Bereich des Spots erfolgt, nicht möglich.

MALDI

Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 30, Suppression: 300, Pulse Voltage: 2600 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

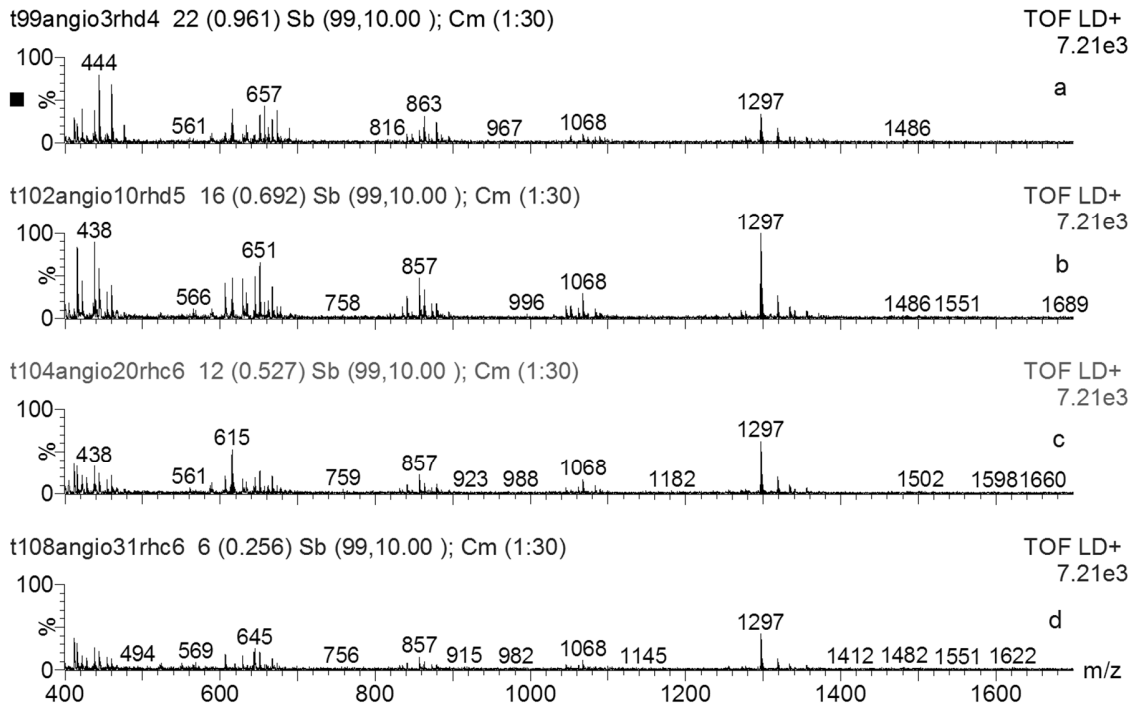


Abb. 16: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 % und (d) 31 % rH

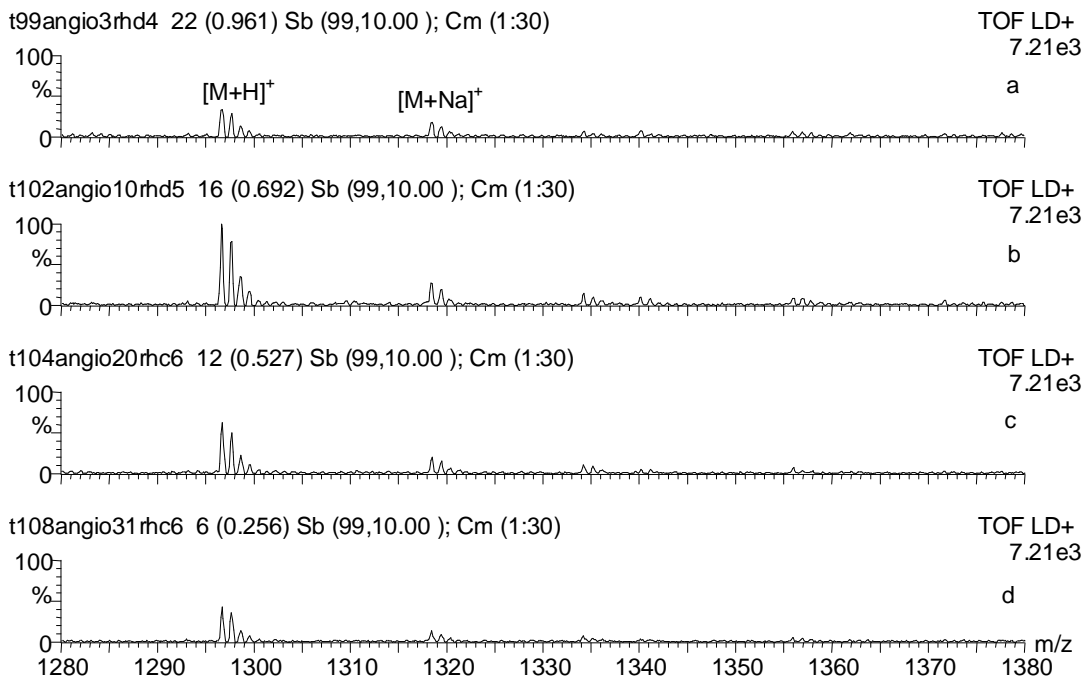


Abb. 17: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 % und (d) 31 % rH - Ausschnitt

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

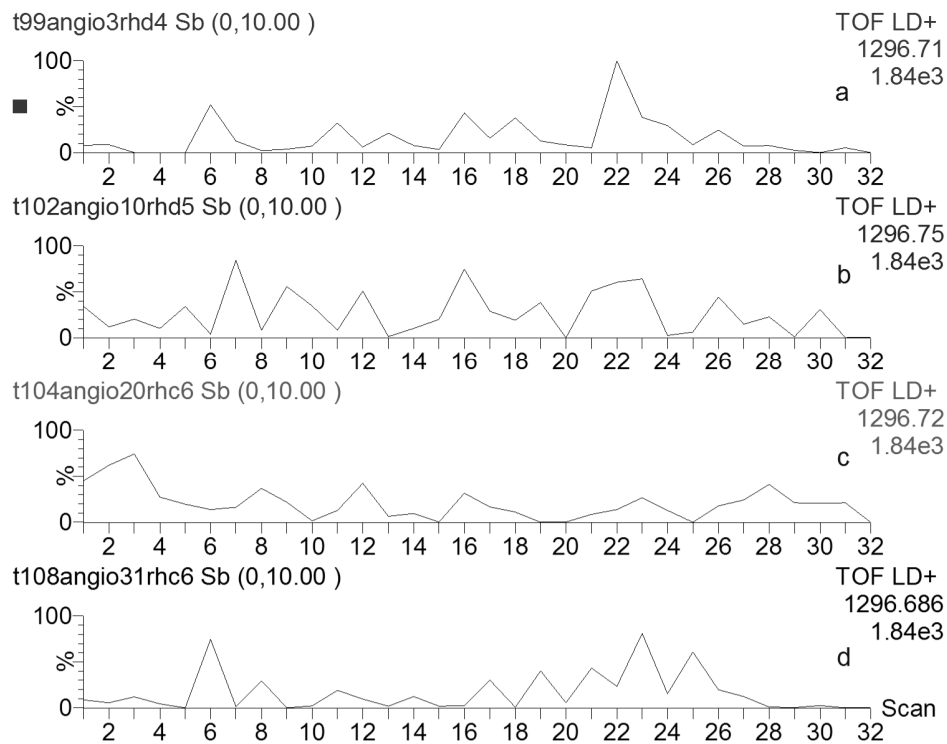


Abb. 18: Ionenchromatogramme von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 % und (d) 31 % rH

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Angiotensin I – Signalintensität ($[M+H]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit

Luftfeuchtigkeit / %rH	Intensität	RSD	RSD / %
3	2531	781	31
10	7305	1449	20
20	4723	1812	38
31	2939	726	25

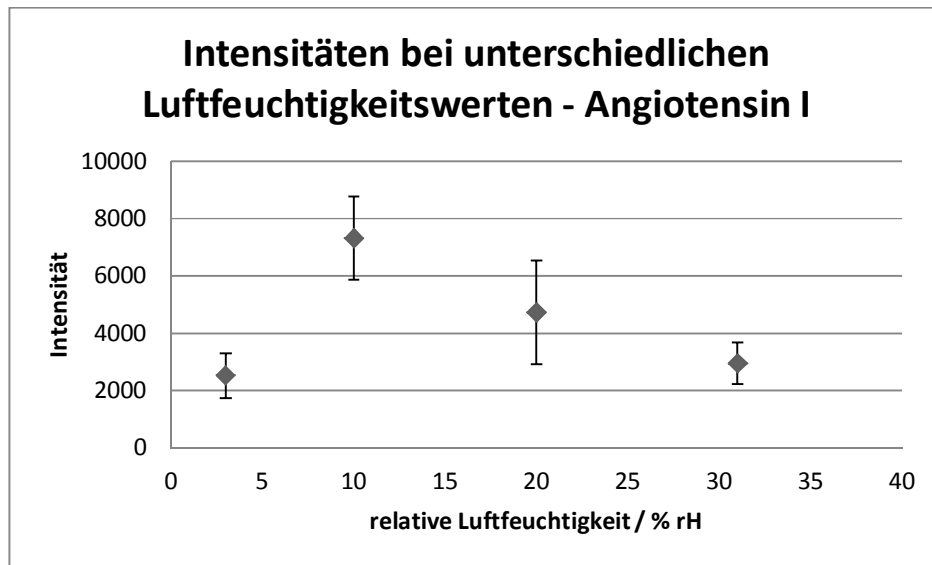


Abb. 19: Graphische Darstellung der Angiotensin I – Signalintensitäten ($[M+H]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit

Diskussion

Den MALDI-Spektren (Abb. 17) und der graphischen Darstellung der Mittelwerte (Abb. 19) kann man entnehmen, dass die Angiotensin I - Signalintensität ($[M+H]^+$) - im untersuchten Bereich von 3 bis 31 % rH - ein Maximum bei 10 % relativer Luftfeuchtigkeit erreicht. Wie die REM-Bilder (Abb. 14) belegen, ist die Kristallgröße im Bereich von 3 – 20 % rH konstant. Die erheblichen Unterschiede in den Signalintensitäten können demnach nicht auf das Kristallisationsverhalten zurückgeführt werden. Erst ab einer relativen Luftfeuchtigkeit von 31 % ist eine Vergrößerung der Kristalle beobachtbar. Diese ist - wie bereits in der Diskussion zu PEG1000 nachzulesen (siehe 6.1.1, *Diskussion*) - durch eine Aufnahme von Wasserdampf durch das Lösungsmittel und die Kondensation der Luftfeuchtigkeit zurückzuführen.

Im Vergleich zu Polyethylenglykol aus Dithranol scheint der Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit bei Angiotensin I aus CHCA/MeOH deutlich größer auszufallen. Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, konnte bei einer Erhöhung der relativen Luftfeuchtigkeit von 3 auf 10 % eine annähernde Verdreifachung der Signalintensität ($[M+H]^+$) beobachtet werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Signalintensitäten von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA, zumindest in Methanol als Lösungsmittel, eine, im Vergleich zu Polyethylenglykol aus Dithranol, größere Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit aufweisen und deshalb auch wesentlich empfindlicher auf Änderungen reagieren. Diese Erkenntnis müsste natürlich erst in

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

weiteren Experimenten mit weiteren Biomolekülen und anderen Lösungsmitteln abgesichert werden.

6.2 Einfluss der Targettemperatur

Zur Untersuchung des Einflusses der Targettemperatur wurden die Analyt/Matrix-Gemische bei einer Temperatur von $47 (\pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ (hot target) und bei Raumtemperatur (cold target) aufgespottet und ein Vergleich angestellt.

6.2.1 Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von Angiotensin I aus CHCA/Methanol

Alle Versuche wurden mit Angiotensin I aus α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) in Methanol durchgeführt.

Die restliche Durchführung erfolgte analog der Untersuchung zum Einfluss der Luftfeuchtigkeit (siehe 6.1, *Durchführung*). In diesem Fall wurden jedoch pro Spot 8 Positionen ausgewählt. Zusätzlich wurden Spektren aufgenommen, bei welchen die Position am Spot für 150 Laser-Shots nicht geändert wurde.

REM-Aufnahmen

Zum Vergleich wurden auch REM-Aufnahmen von Angiotensin und CHCA in Acetonitril/ H_2O (v/v = 7:3 - Standardlösungsmittelgemisch bei der Untersuchung von Biomolekülen) gemacht.

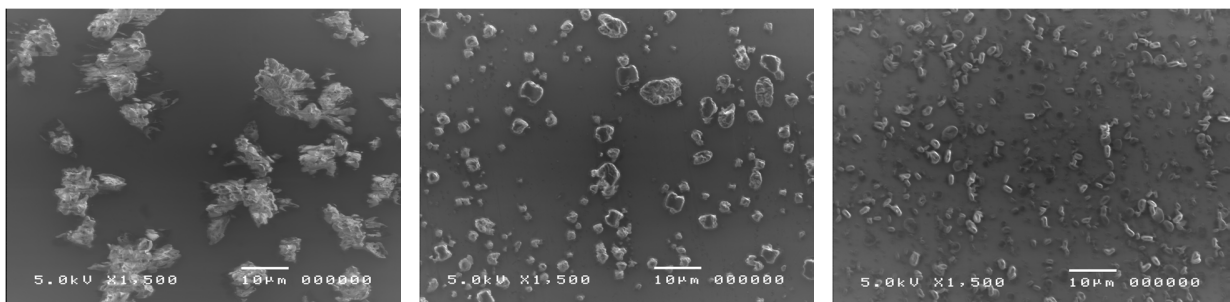


Abb. 20: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus CHCA / (a) Acetonitril/ H_2O , (b) MeOH (cold Target), (c) MeOH (hot target)

Die REM-Bilder (Abb. 20) zeigen, dass durch Verwendung von Methanol anstatt eines Acetonitril/Wasser-Gemisches als Lösungsmittel die Kristallgröße deutlich abnimmt. Durch Aufspotten auf ein heißes Target konnte sowohl die Kristallgröße weiter gesenkt werden, als

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

auch eine gleichmäßigere Verteilung über den Spot beobachtet werden. Dies ist nachvollziehbar, da aufgrund der erhöhten Temperatur das Lösungsmittel schneller verdampft, wodurch die Keimbildungsgeschwindigkeit zunimmt und somit weniger Zeit für das Kristallwachstum zur Verfügung steht.

MALDI-Spektren

Einstellungen: Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 28, Suppression: 300, Pulse Voltage: 2300 V

Probenpräparation 1:

Zunächst wurden 60 µl CHCA vorgelegt und anschließend 10 µl Angiotensin I ($c = 0,2 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) zugegeben.

Konzentration Angiotensin I am Spot = 18,1 fmol

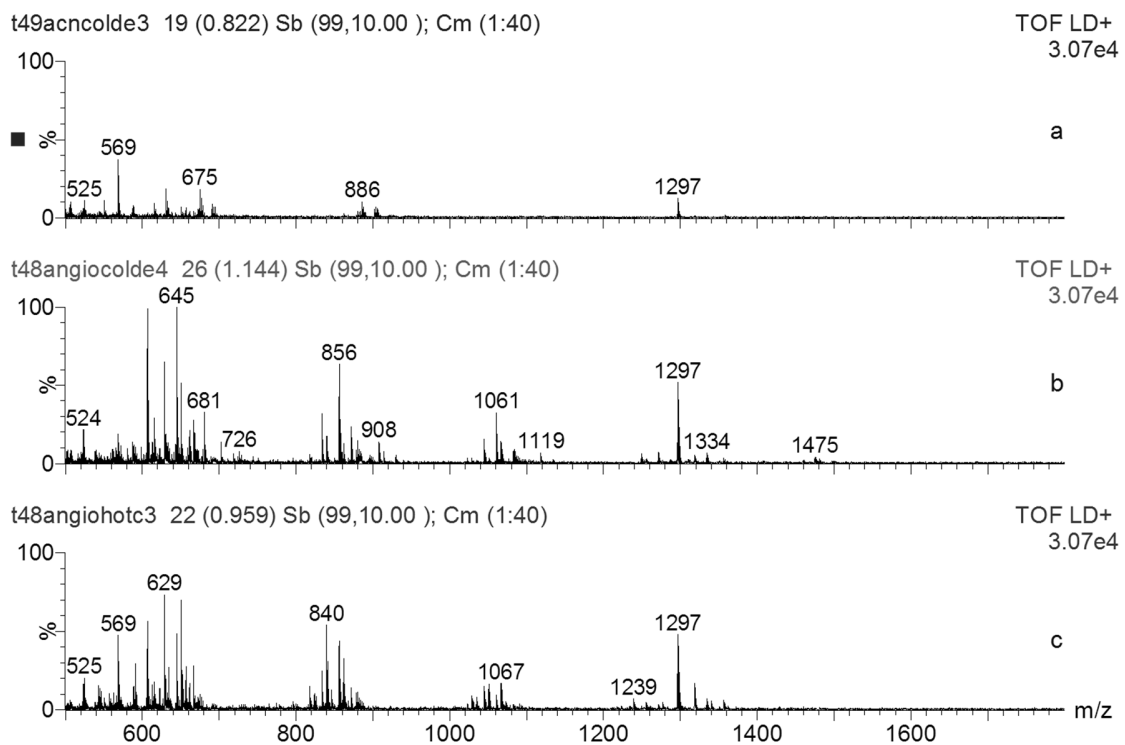


Abb. 21: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA / (a) Acetonitril/Wasser, (b) MeOH (cold target) und (c) MeOH (hot target)

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Bei der Betrachtung der MALDI-Spektren (Abb. 21) fällt zunächst auf, dass bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel im Vergleich zu Acetonitril/Wasser eine deutliche Steigerung der Signalintensität auftritt.

Mittelwert (cold): $15338 \pm 3043 (\triangleq 20 \%)$

Mittelwert (hot): $14338 \pm 2100 (\triangleq 15 \%)$

(für alle Werte siehe 8 Anhang, Tabelle 3)

Die Mittelwerte zeigen, dass Angiotensin I aufgespottet auf das heiße Target eine leicht geringere Intensität aufweist, die Standardabweichung jedoch auch etwas geringer ausfällt, was auf eine höhere Homogenität hindeutet. Der große Vorteil des Aufspottens auf ein heißes Target zeigt sich allerdings erst bei längerem Laserbeschuss (150 Laser shots) an einer Position, wie nachfolgende Abb.en zeigen.

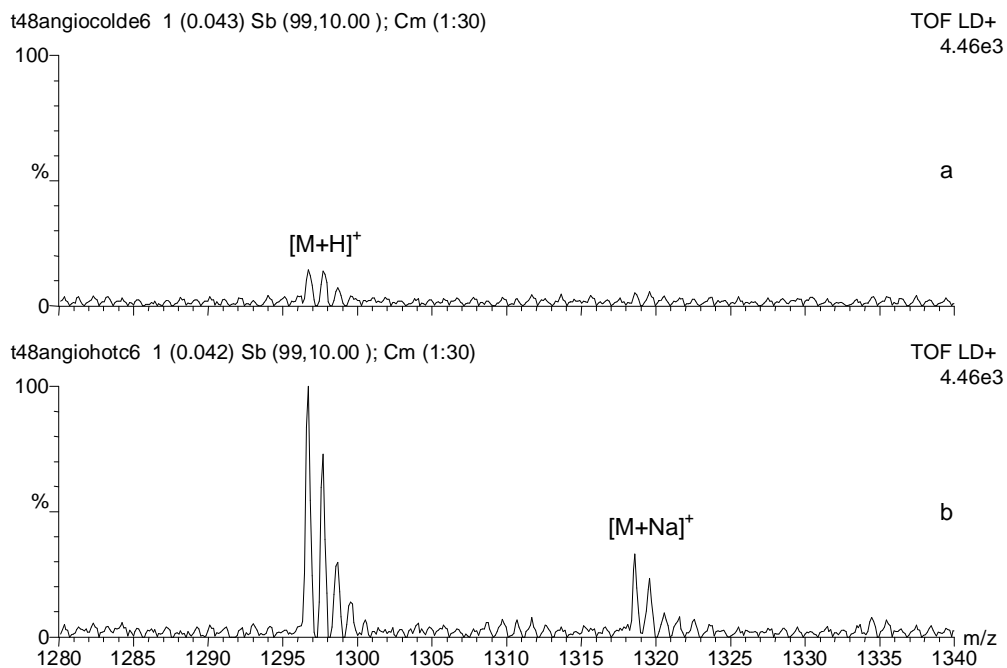


Abb. 22: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - 150 Laser Shots an einer Position

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

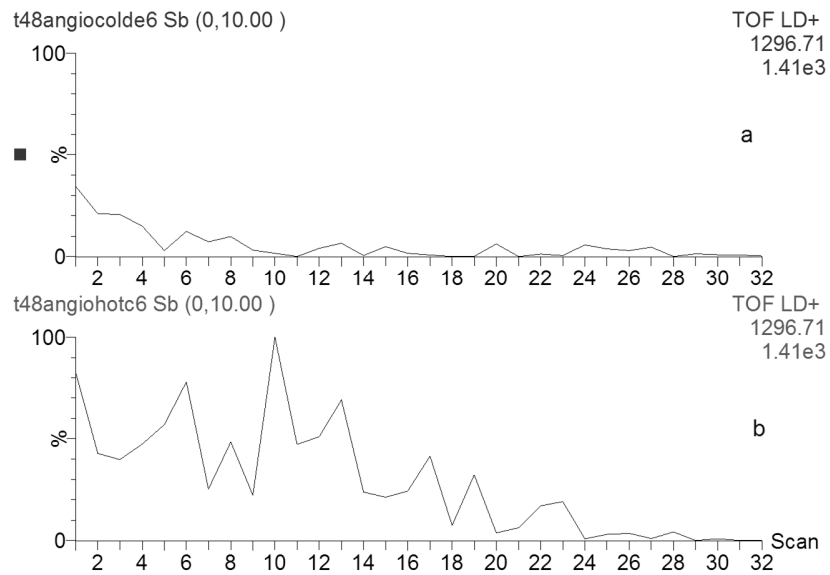


Abb. 23: Ionenchromatogramme von Angiotensin I $[M+H]^+$ aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - 150 Laser Shots an einer Position

Wie aus Abb. 22 und Abb. 23 ersichtlich, liefert dies deutlich länger und somit auch ein höheres Signal ($[M+H]^+$).

Probenpräparation 2:

Zunächst wurden 60 μl CHCA vorgelegt und anschließend 10 μl Angiotensin I ($c = 0,02 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) zugegeben.

Konzentration Angiotensin I am Spot = 1,81 fmol

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

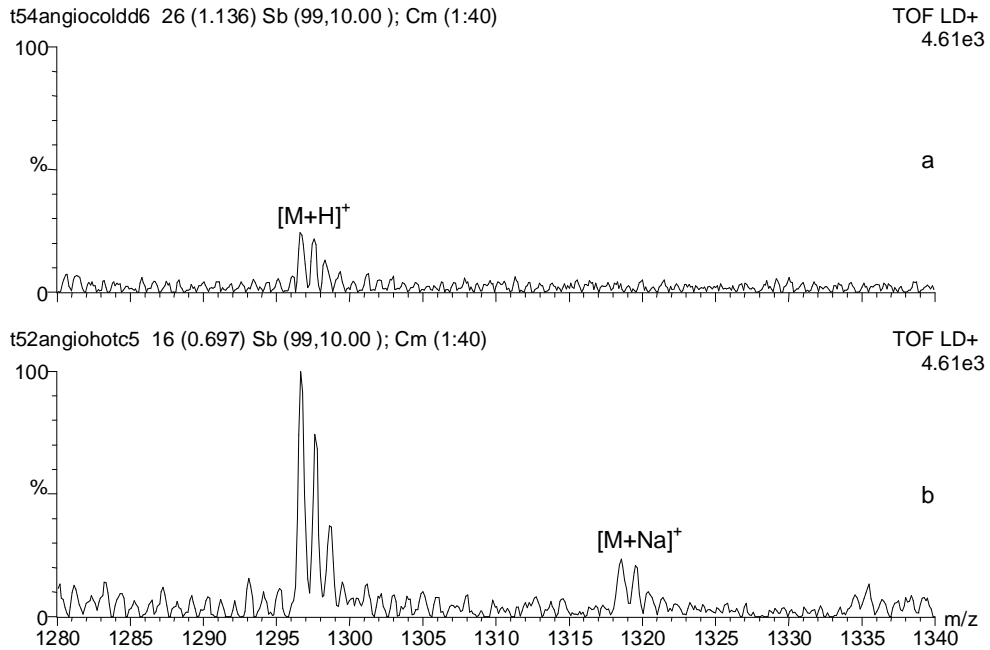


Abb. 24: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - Ausschnitt

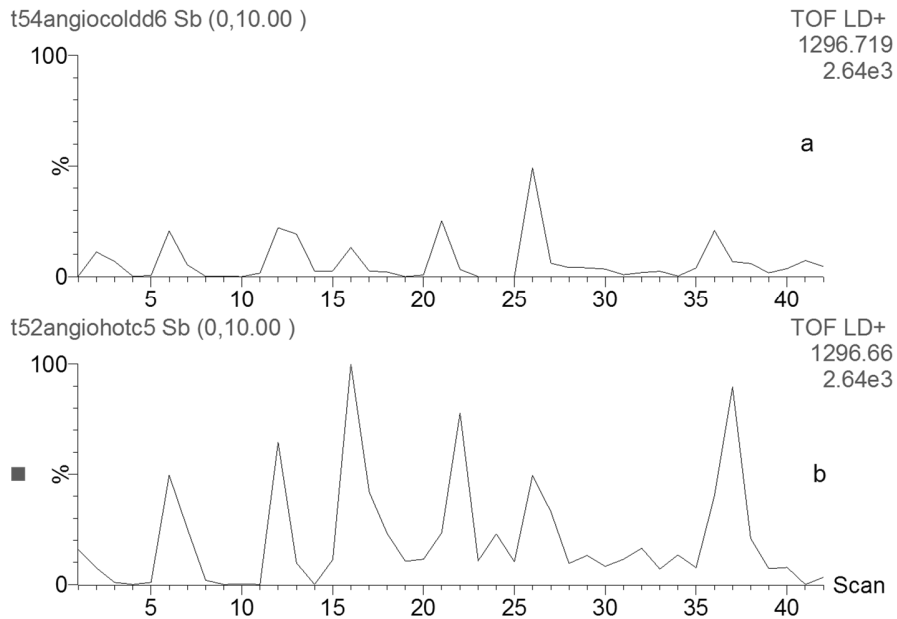


Abb. 25: Ionenchromatogramme von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet

Mittelwert (cold): 1090 ± 430 ($\triangleq 39\%$)

Mittelwert (hot): 4498 ± 434 ($\triangleq 10\%$)

(für alle Werte siehe 8 Anhang, Tabelle 4)

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Bei sinkender Angiotensin I – Konzentration am Spot zeigt sich ein weiterer noch größerer Vorteil. Wie man an den Spektren und Mittelwerten erkennen kann, ist die Intensität bei der Verwendung des heißen Targets deutlich höher und die Standardabweichung niedriger. Das heißt, dass man durch das Aufspotten auf ein heißes Target höhere Empfindlichkeit erreichen kann und die Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit aufgrund der höheren Homogenität des Spots deutlich besser ist.

6.2.2 Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von Angiotensin I aus CHCA/Acetonitril/H₂O (v/v=7:3)

Die Durchführung erfolgte analog zu 6.2.1.

Da in diesem Fall die Auftragung auf das heiße Target keine Verbesserung zeigte, wurde darauf verzichtet 8 Spots zu messen.

REM-Aufnahmen

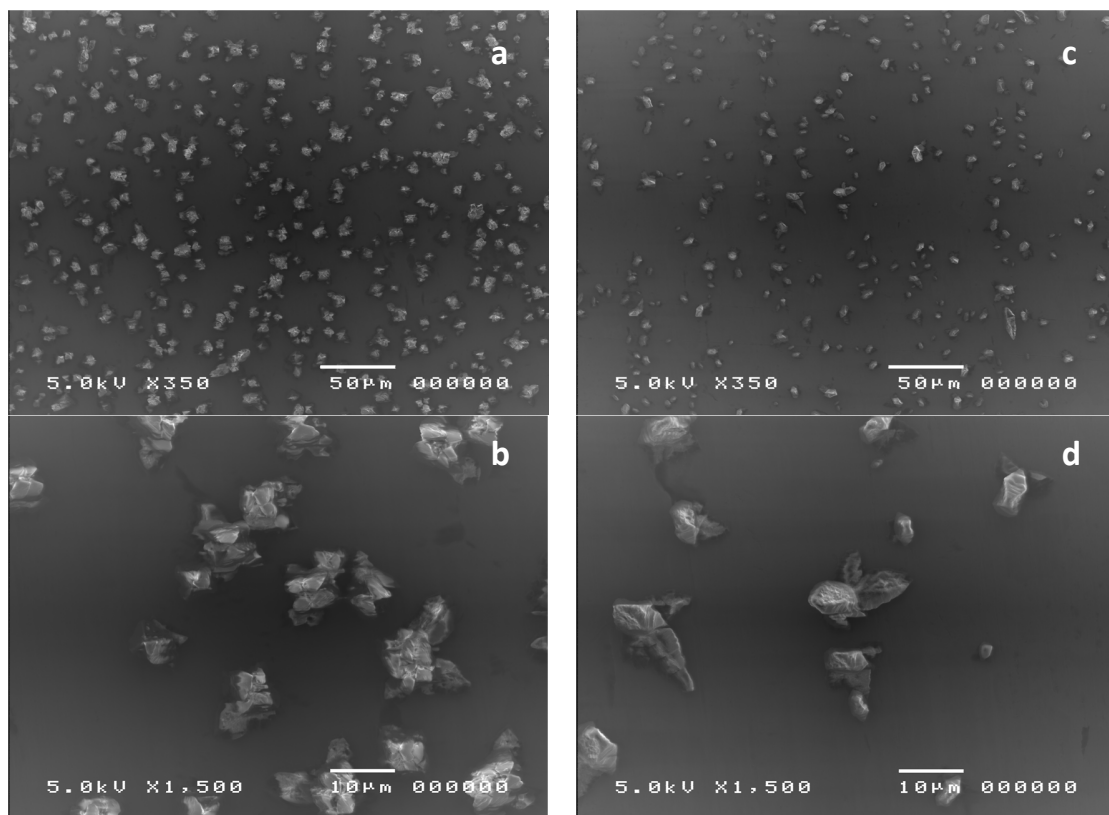


Abb. 26: REM Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus CHCA/Acetonitril/H₂O aufgespottet auf (a+b) cold target und (c+d) hot target

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Die REM-Bilder (Abb. 26) zeigen, dass die Kristallgröße nur unwesentlich beeinflusst wird, jedoch die Zwischenräume durch das Aufspotten auf das heiße Target deutlich größer werden.

MALDI-Spektren

Einstellungen: Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 28, Suppression: 300, Pulse Voltage: 2300 V

Probenpräparation:

Zunächst wurden 60 μl CHCA vorgegeben und anschließend 10 μl Angiotensin I ($c = 0,2 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) zugegeben.

Konzentration Angiotensin I am Spot = 18,1 fmol

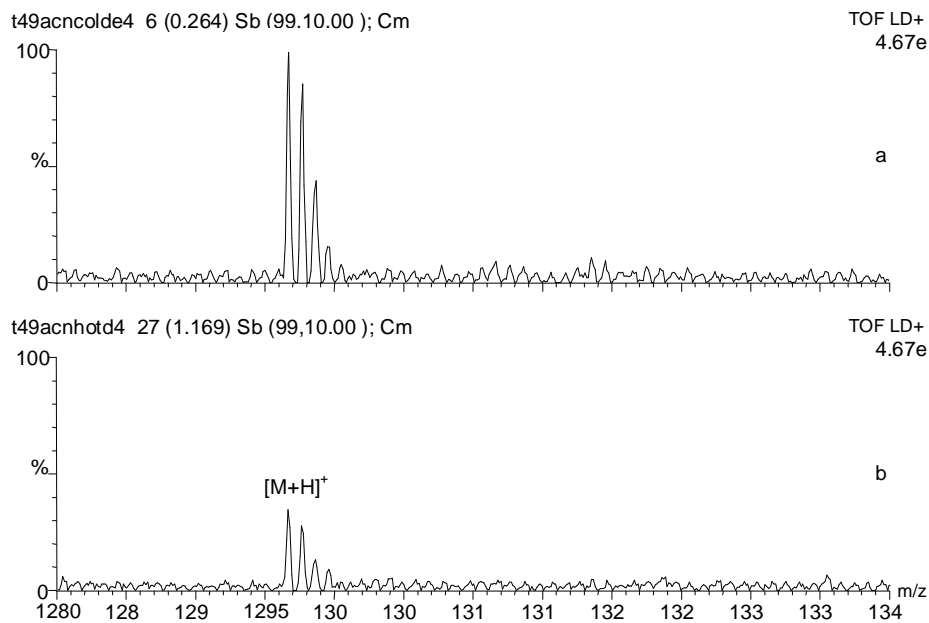


Abb. 27: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/ACN/H₂O auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

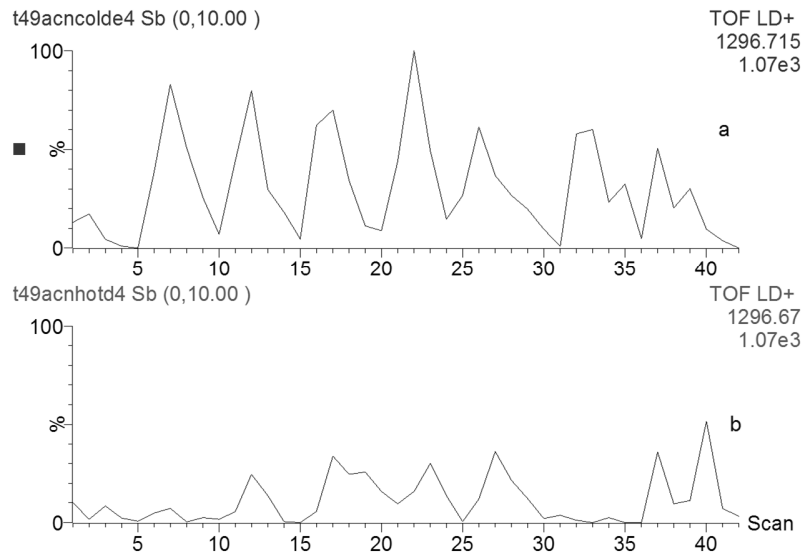


Abb. 28: Ionenchromatogramme von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA/ACN/H₂O auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - 100 Laser Shots an einer Position

Die MALDI-Spektren (Abb. 27) belegen, dass ein Aufspotten auf ein heißes Target bei der Verwendung von einem Acetonitril/Wasser-Gemisch als Lösungsmittel keine Verbesserung der Signalintensität bringt. Eine mögliche Erklärung für diese Verschlechterung ist, dass, im Vergleich zum vorherigen Versuch, Wasser im Lösungsmittelgemisch enthalten war. Für mögliche Gründe siehe 6.2.5.

6.2.3 Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von Insulin chain B oxidized (in H₂O) aus CHCA/Methanol

Alle Versuche wurden mit Insulin chain B oxidized (in H₂O) aus α -Cyano-4-hydroxymethansäure (CHCA) (in Methanol) durchgeführt.

Die Durchführung erfolgte analog zu 6.2.1. Der einzige Unterschied besteht darin, dass nur 4 Positionen am Spot ausgewählt wurden und an jeder Position 50 Laser-Shots aufgenommen wurden.

Da auch in diesem Fall die Auftragung auf das heiße Target keine Verbesserung zeigte, wurde darauf verzichtet 8 Spots zu messen.

REM-Aufnahmen

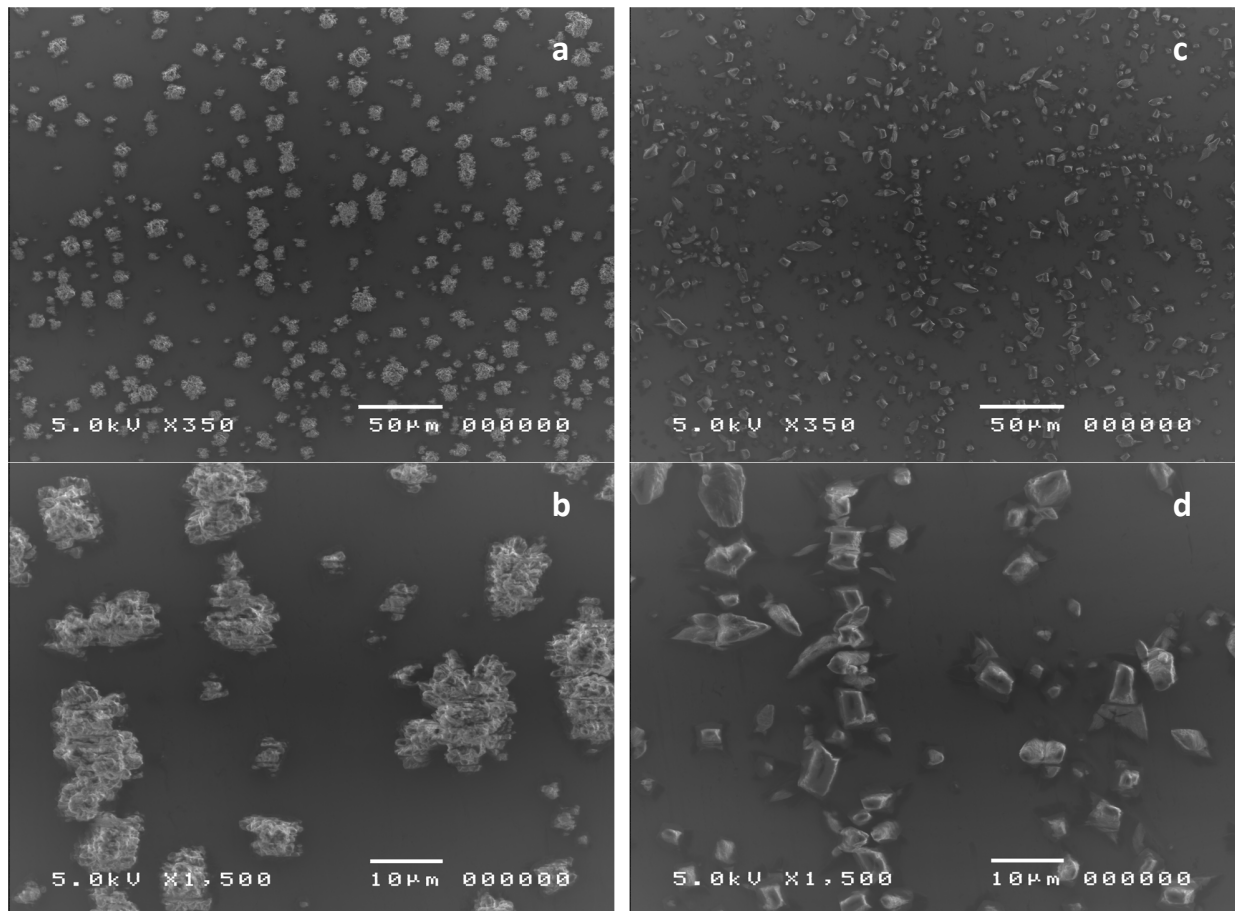


Abb. 29: REM Aufnahmen von Kristallisaten von Insulin aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a+b) cold target und (c+d) hot target

Aus den REM-Bildern (Abb. 29) ist ersichtlich, dass die Kristallgröße durch Aufspotten auf ein heißes Target etwas kleiner wird. Des Weiteren fällt auf, dass sich die Kristallisatform grundlegend zu ändern scheint. Und zwar sind die Kristalle deutlich glatter und eckiger und weisen somit deutlich weniger Oberflächenstruktur auf als dies beim kalten Target der Fall ist.

MALDI-Spektren

Probenpräparation:

Zunächst wurden 60 µl CHCA vorgelegt und anschließend 10 µl Insulin ($c = 28,6 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) zugegeben.

Konzentration Insulin am Spot = 2,45 pmol

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Einstellungen: Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 28, Suppression: 2000, Pulse Voltage: 2800 V

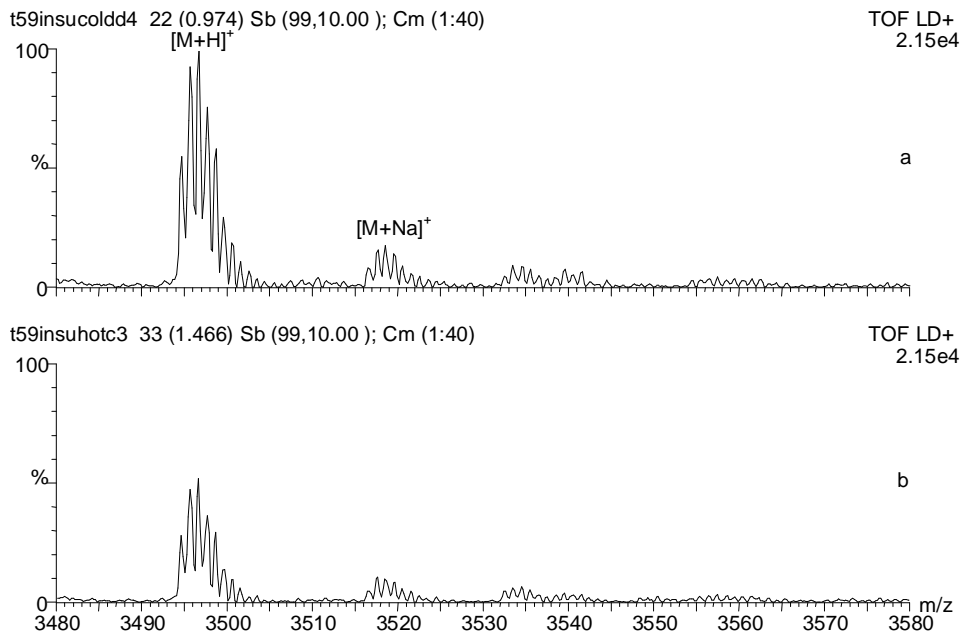


Abb. 30: MALDI-Spektren von Insulin chain B oxidized (in H₂O) aus CHCA/MeOH; aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target

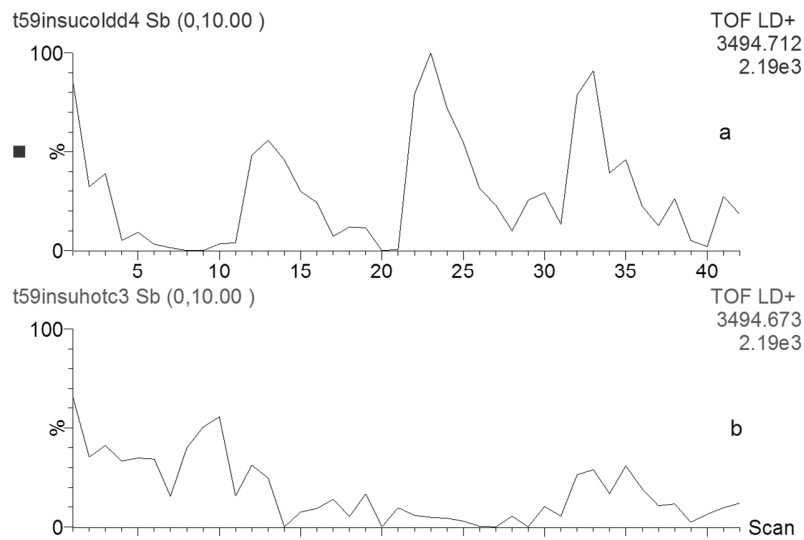


Abb. 31: Ionenchromatogramme von Insulin chain B oxidized (in H₂O) ([M+H]⁺) aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target

Im Gegensatz zu Angiotensin I konnte bei Insulin keine Verbesserung der Signalintensität festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf die gravierende Änderung der

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Kristallisation zurückzuführen. Die Kristalle, welche beim Aufspotten auf das heiße Target erhalten wurden, ähneln denen von Angiotensin I und CHCA in Acetonitril/Wasser (Abb. 26). Eventuell ist der Grund hierfür darin zu finden, dass Insulin in Wasser gelöst wurde und dass deshalb mit dem heißen Target keine Verbesserung erzielt werden konnte (vgl. 6.2.2).

6.2.4 Einfluss der Targettemperatur bei der Untersuchung von ACTH (in Acetonitril/H₂O) aus CHCA/Methanol

Alle Versuche wurden mit Adrenocorticotropem Hormon (in Acetonitril/H₂O) aus α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) (in Methanol) durchgeführt.

Die Durchführung erfolgte analog zu 6.2.1.

Da auch in diesem Fall die Auftragung auf das heiße Target keine Verbesserung zeigte, wurde darauf verzichtet 8 Spots zu messen.

REM-Aufnahmen

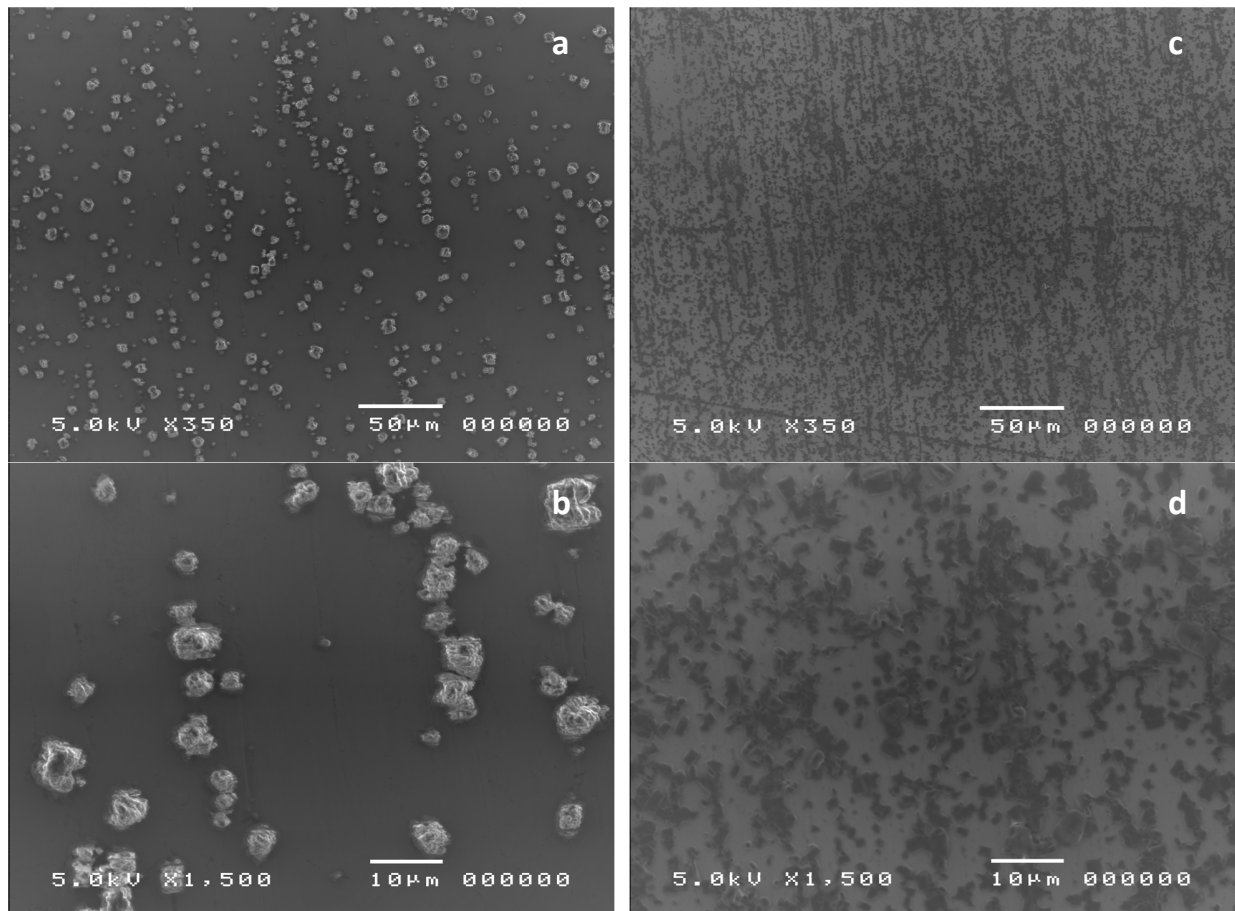


Abb. 32: REM Aufnahmen von Kristallisaten von ACTH aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a+b) cold target und (c+d) hot target

Auch hier geht aus den REM-Bildern (Abb. 32) eine deutliche Abnahme der Kristallgröße durch das Auftragen auf das heiße Target hervor. Im Vergleich zu den anderen beiden Peptiden scheint der Unterschied größer zu sein.

MALDI-Spektren

Probenpräparation:

Zunächst wurden 60 μl CHCA vorgelegt und anschließend 10 μl ACTH (c = 1 pmol/μl) zugegeben.

Konzentration ACTH am Spot = 85,7 fmol

Einstellungen: Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 30, Suppression: 2000, Pulse Voltage: 2800 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

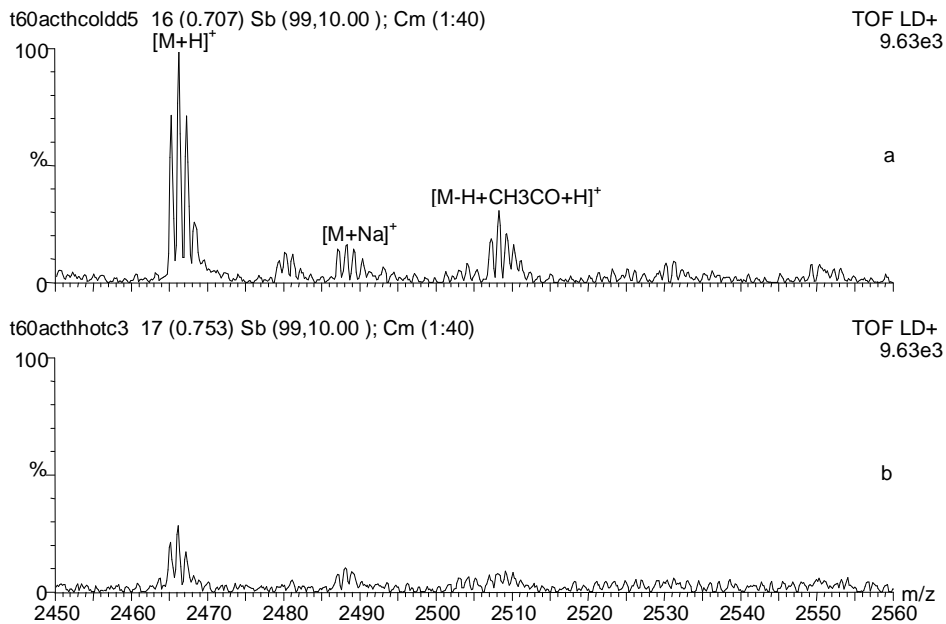


Abb. 33: MALDI-Spektren von ACTH (in Acetonitril/ H_2O) ($[M+H]^+$) aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target

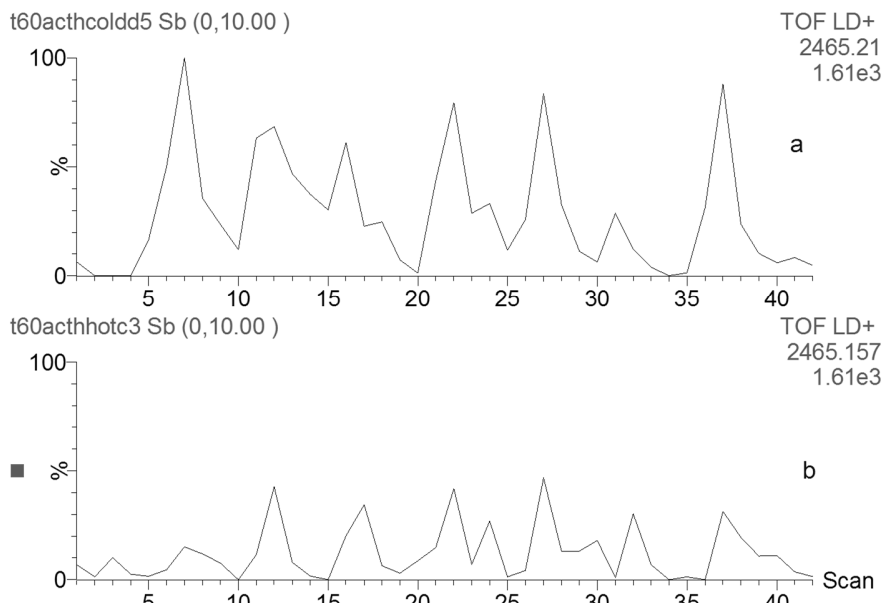


Abb. 34: Ionenchromatogramme von ACTH (in Acetonitril/ H_2O) ($[M+H]^+$) aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target

Wie aus den MALDI-Spektren (Abb. 33) ersichtlich, führt auch hier das Auftragen der Probe auf das heiße Target, ähnlich wie bei Insulin, zu einer deutlich niedrigeren Signalintensität. Ein möglicher Grund könnte in diesem Fall sein, dass durch die geringe Größe des Co-Kristallisats

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

der Analyt von deutlich weniger Matrixmolekülen umgeben ist und somit schlechter desorbiert. Ein weiterer Grund könnte auch hier die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel sein (vgl. 6.2.2).

6.2.5 Diskussion

Wie die Versuche zeigen, konnte nur bei einem von 3 Biomolekülen, nämlich bei Angiotensin I, eine Verbesserung der Empfindlichkeit (vor allem bei niedrigeren Konzentrationen), der Homogenität und somit auch der Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit, bei der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS, festgestellt werden. Demnach lassen sich bei diesem Analyten durch Aufspotten auf ein heißes Target höhere Signalintensitäten ($[M+H]^+$) und folglich möglicherweise niedrigere Nachweisgrenzen erreichen. Durch die am heißen Target schnellere Verdampfung des Lösungsmittels, nimmt die Keimbildungsgeschwindigkeit zu und es bleibt weniger Zeit für das Kristallwachstum und somit den Einbau der Biomoleküle in die Matrix. Im Fall der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel scheint dies von Vorteil zu sein.

Sobald Wasser (im Fall von Inulin und ACTH auch nur in geringen Mengen) in einem der Lösungsmittelgemische enthalten war (siehe 6.2.2 - 6.2.4), konnte eine Abnahme der Analytsignalintensitäten beobachtet werden. Da Wasser deutlich langsamer verdampft als Methanol, sind möglicherweise höhere Targettemperaturen vonnöten, um eine Verbesserung der Desorptions-/Ionisationseigenschaften der Analyte aus Lösungsmittelgemischen mit Wasser zu erzielen.

6.3 Zusatz von Nanopartikeln

6.3.1 Zusatz von CuInS_2 -Nanopartikeln bei der Untersuchung von PEG1000

Alle Versuche wurden mit Polyethylenglykol 1000 (PEG1000) aus Dithranol, Natriumtrifluoracetat (NaTFA) und als Zusatz THF bzw. CuInS_2 (CIS) -Nanopartikel (Partikelgröße ca. 3 nm) in THF durchgeführt.

Probenpräparation:

Zunächst wurden 60 μl Dithranol (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 μl NaTFA (1,05 mg/ml), 20 μl PEG1000 (5 mg/ml) und 10 μl THF bzw. CIS (0,01-1 mg/ml) zugegeben.

Es wurden jeweils 0,6 μl auf die Spots aufgetragen.

Die angegebenen Verhältnisse beziehen sich auf das Gewicht.

REM-Aufnahmen

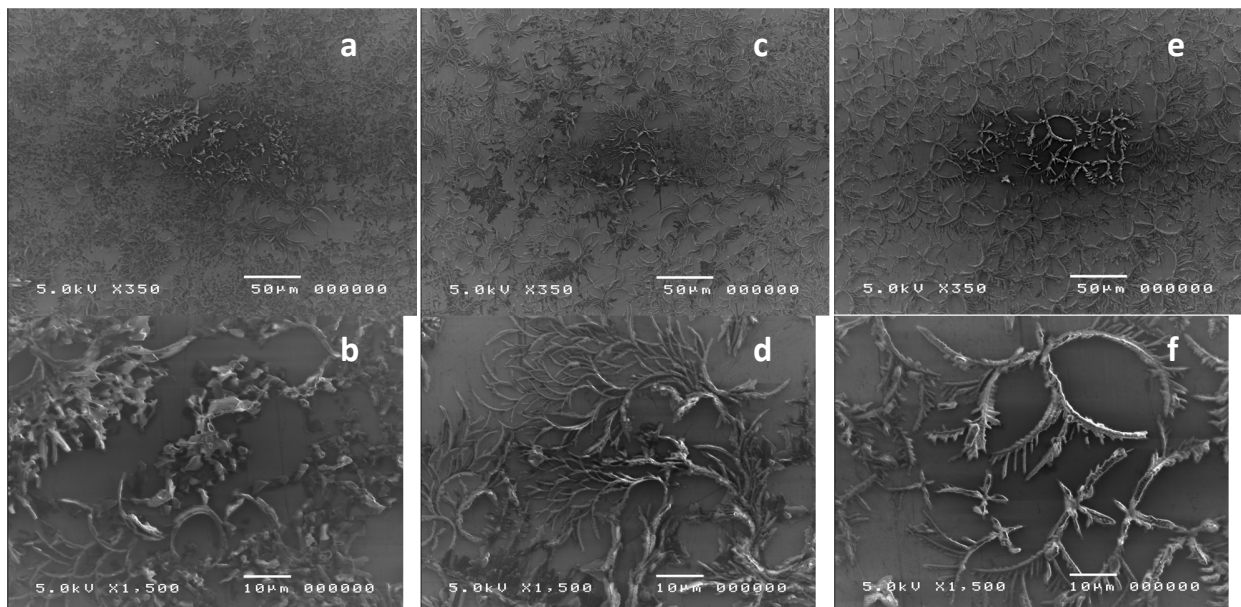


Abb. 35: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG1000 aus (a+b) Dithranol, (c+d) Dithranol/CIS = 600/1 und (e+f) Dithranol/CIS = 60:1

Die REM-Aufnahmen (Abb. 35) belegen eindeutig, dass sich mit zunehmender CIS-Konzentration größere Kristalle bilden. Die Nanopartikel scheinen also das Kristallwachstum zu beschleunigen.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Weitere REM-Aufnahmen wurden vom Kristallisat des PEG1000 - Dithranol/CIS = 60:1 – Gemisches (siehe Probenpräparation) nach ca. 20 Minuten gemacht (Abb. 36), da eine Verfärbung nach dieser Zeit beobachtet werden konnte. Dieser Effekt tritt auch bei einem Gemisch ohne Nanopartikel auf, allerdings erst nach ca. 1-2 Stunden, und ist auf die Photoinstabilität von Dithranol zurückzuführen, welche durch Zugabe der photoaktiven CuInS_2 -Nanopartikel offensichtlich verstärkt wird.

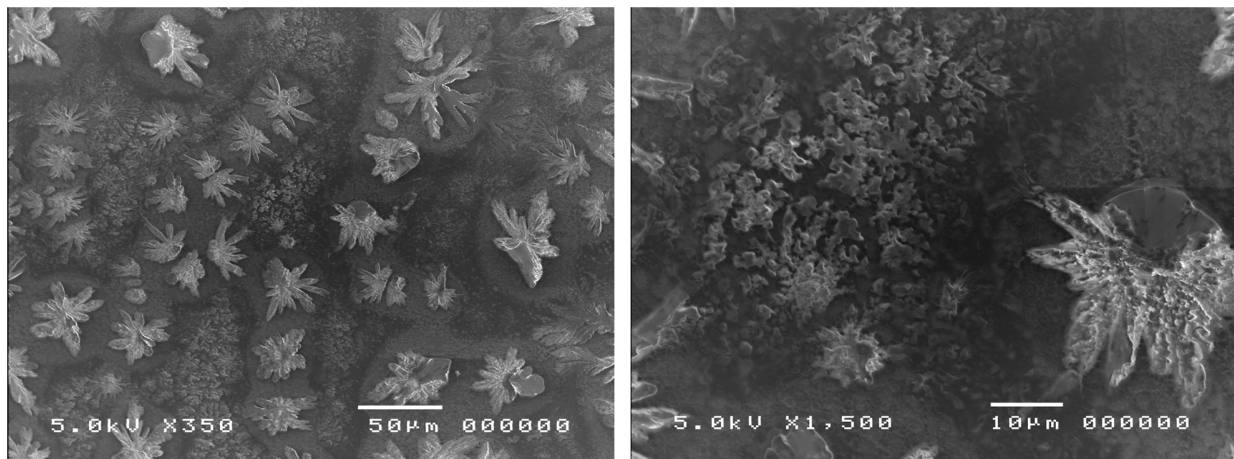


Abb. 36: REM-Aufnahmen von PEG1000 aus Dithranol/CIS = 60:1 nach 20 Minuten

Wie aus den REM-Aufnahmen (Abb. 36) ersichtlich, führt dies zu einer komplett veränderten Kristallisation und scheint auch der Grund dafür zu sein, dass die Kristallitgröße, entgegen der Erwartung, mit steigender Konzentration der CIS-Nanopartikel zunimmt.

MALDI

Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 33, Suppression: 400, Pulse Voltage: 2300 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

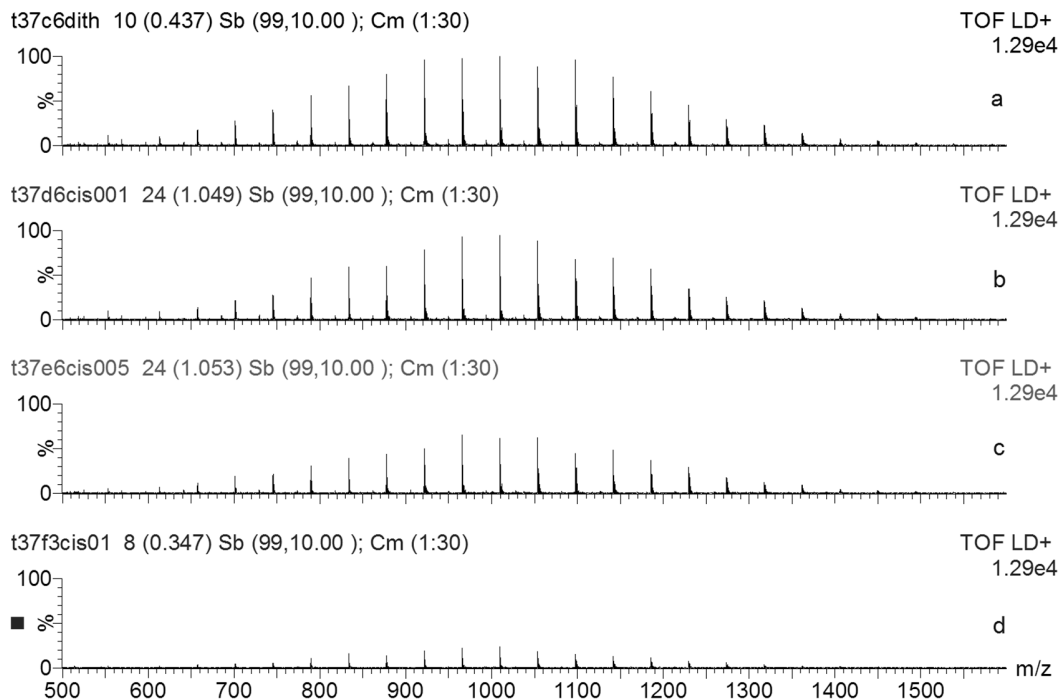


Abb. 37: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/CIS = 6000:1, (c) Dithranol/CIS = 1200:1 und (d) Dithranol/CIS = 600:1

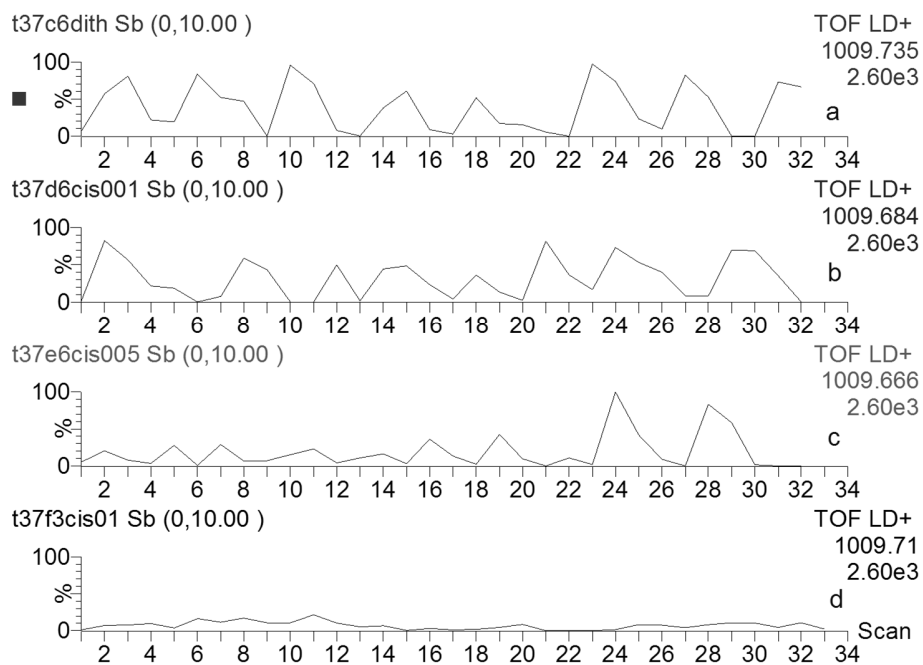


Abb. 38: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{22}-OH + Na]^+$ aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/CIS = 6000:1, (c) Dithranol/CIS = 1200:1 und (d) Dithranol/CIS = 600:1

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Aus den Spektren (Abb. 37) ist ersichtlich, dass mit steigender CIS-Konzentration die Intensität der Analytsignale abnimmt und dies obwohl nur sehr geringe Mengen eingesetzt wurden. Diese Abnahme wird darauf zurückgeführt, dass einerseits die Kristallitgröße zunimmt und andererseits die CIS-Nanopartikel die Photoinstabilität von Dithranol verstärken und somit zu einer beschleunigten Inaktivierung von Dithranol führen.

6.3.2 Zusatz von ZnO-Nanopartikeln bei der Untersuchung von Angiotensin I

Alle Versuche wurden mit Angiotensin I aus α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA) und als Zusatz Methanol bzw. ZnO-Nanopartikeln in Methanol durchgeführt.

Probenpräparation:

Zunächst wurden 60 μl CHCA (10 mg/ml) verlegt, anschließend 10 μl Angiotensin I ($c = 15 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) und als Zusatz 10 μl MeOH bzw. ZnO (0,28 – 8,5 mg/ml) zugegeben.

Es wurden jeweils 0,8 μl auf die Spots aufgetragen.

Die angegebenen Verhältnisse beziehen sich auf das Gewicht.

REM-Aufnahmen

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

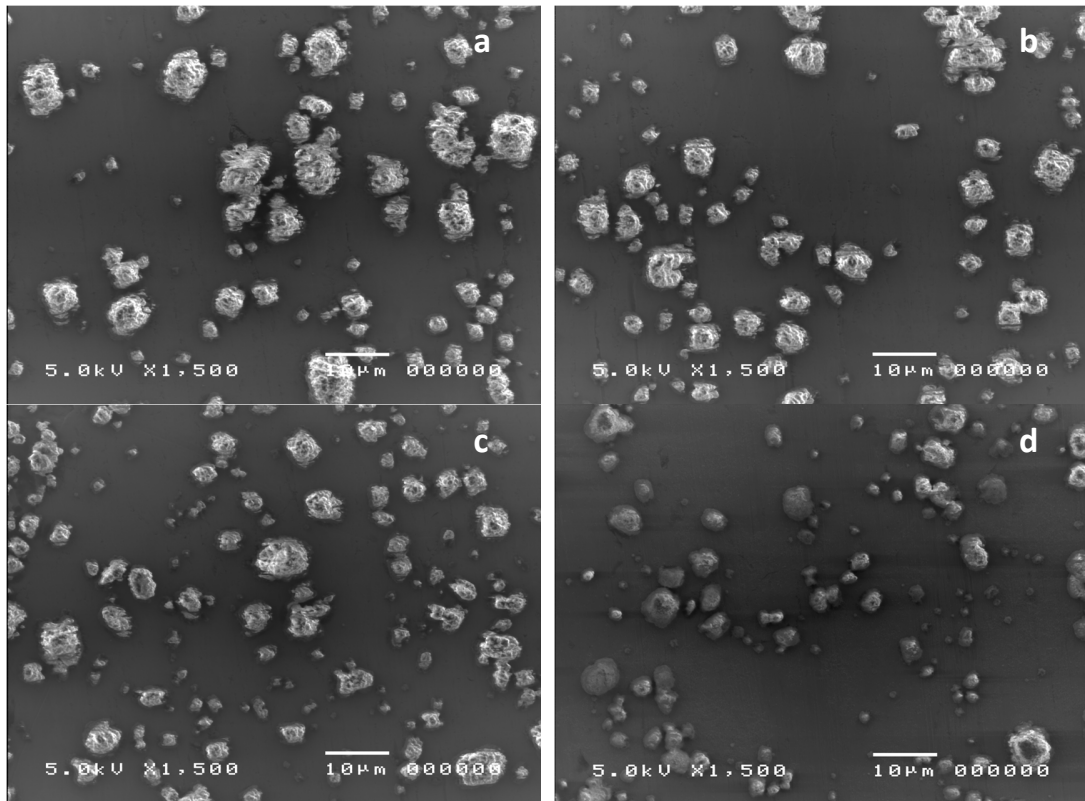


Abb. 39: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus (a) CHCA, (b) CHCA/ZnO = 214:1, (c) CHCA/ZnO = 71:1 und (d) CHCA/ZnO = 7:1

Wie man an den REM-Aufnahmen (Abb. 39) erkennen kann, nimmt die Kristallgröße mit zunehmender ZnO-Konzentration leicht ab. Dies entspricht den Erwartungen, da mehr Kristallisationskeime zur Verfügung stehen und somit die Wahrscheinlichkeit der Bildung größerer Kristalle abnimmt. Jedoch fällt dieser Effekt relativ gering aus.

MALDI

Einstellungen: Linear Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 25, Suppression: 400, Pulse Voltage: 950 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

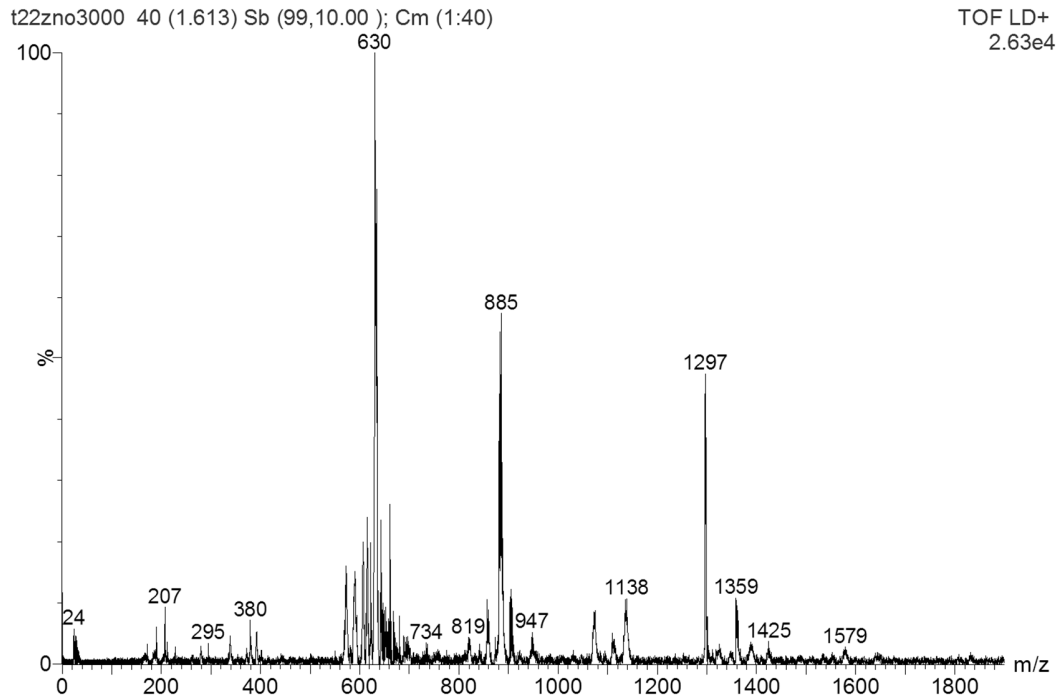


Abb. 40: MALDI-Spektrum von Angiotensin I aus CHCA/ZnO = 214:1

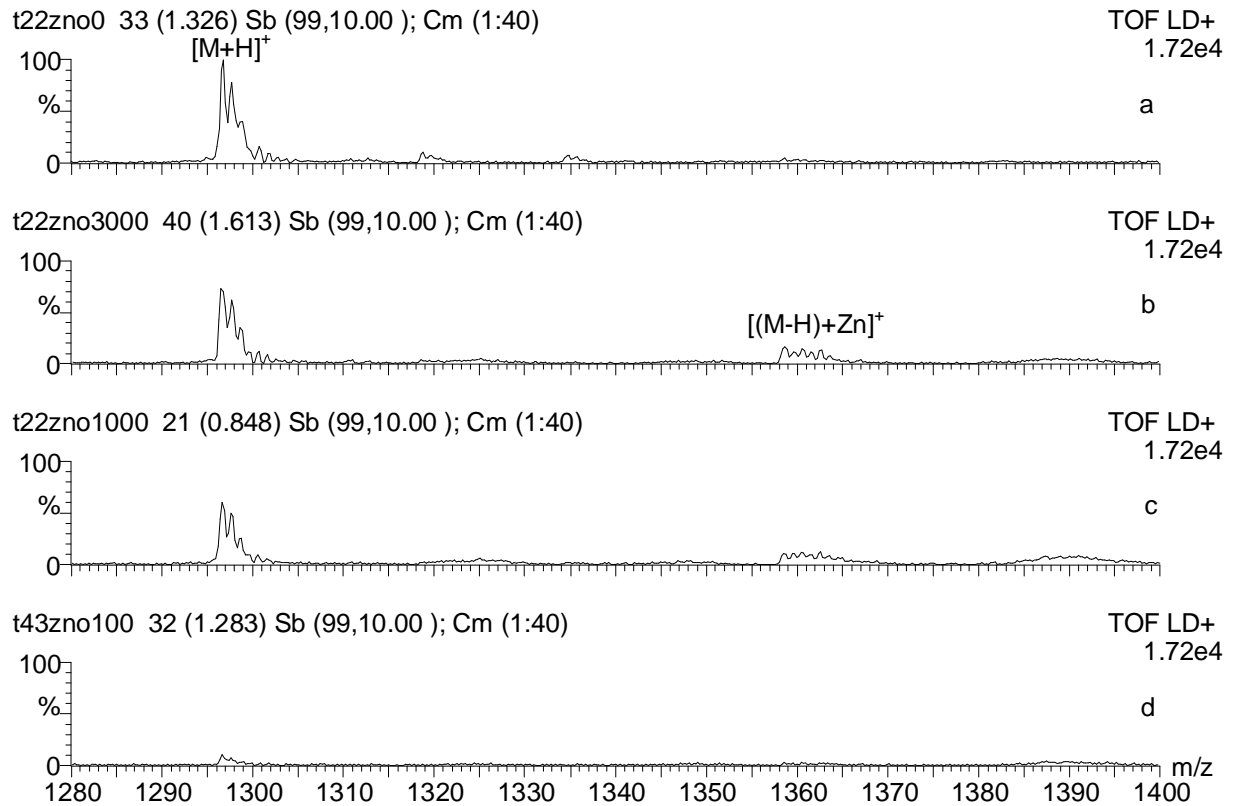


Abb. 41: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/ZnO (a) 0, (b) 214:1, (c) 71:1 und (d) 7:1

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

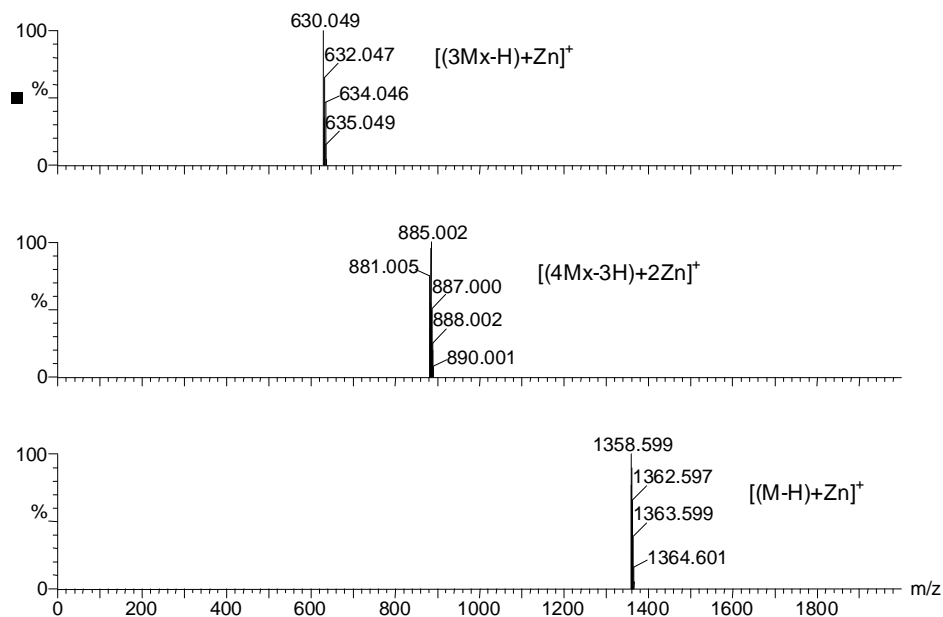


Abb. 42: Berechnete Isotopenmuster für die Matrix- und Analytsignale, die auf Ionisation mit Zn zurückzuführen sind

Diskussion

Aus dem MALDI-Spektrum von Angiotensin I aus CHCA/ZnO = 214:1 (Abb. 40) ist ersichtlich, dass es auch schon bei relativ geringen Mengen von ZnO zur Ionisation durch Zink kommt. So konnten Matrix-Zink-Cluster beobachtet werden, aber auch mit Zink ionisiertes Angiotensin ($[(M-H)+Zn]^+$). Diese konnten durch den Vergleich mit den berechneten Isotopenmustern (Abb. 42) interpretiert werden. Der Peak bei 630 ist demnach ein Cluster von 3 Matrix-Molekülen mit Zink ($[(3Mx-H)+Zn]^+$) und jener bei 881 einer von 4 Matrixmolekülen mit 2 Zinkatomen ($[(4Mx-3H)+2Zn]^+$).

Aus den MALDI-Spektren (Abb. 41) geht hervor, dass mit zunehmender ZnO-Konzentration ein Abnehmen des Angiotensin I – Signals ($[M+H]^+$, $m/z = 1296,685$) einhergeht. Dies geschieht einerseits deshalb, weil der Analyt auch zu einem geringen Teil mit Zn ionisiert wird. Diese offensichtlich starke Wechselwirkung lässt auch die Bindung von Angiotensin I an der Oberfläche der ZnO-Nanopartikel vermuten, wodurch selbige der Analyse entzogen werden.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

6.3.3 Zusatz von ITO-Nanopartikeln bei der Untersuchung von PEG1000 und Angiotensin I

6.3.3.1 Zusatz von ITO-Nanopartikeln bei der Untersuchung von PEG1000

Alle Versuche wurden mit Polyethylenglykol 1000 (PEG1000) aus Dithranol und Natriumtrifluoracetat (NaTFA) in THF und als Zusatz H₂O bzw. Indium Zinn Oxid-Nanopartikel in Wasser durchgeführt.

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 µl Dithranol (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 µl NaTFA (1,00 mg/ml), 20 µl PEG1000 (5 mg/ml) und 10 µl H₂O bzw. ITO (0,2-2 mg/ml) zugegeben.

Es wurden jeweils 0,6 µl auf die Spots aufgetragen.

Die angegebenen Verhältnisse beziehen sich auf das Gewicht.

REM-Aufnahmen

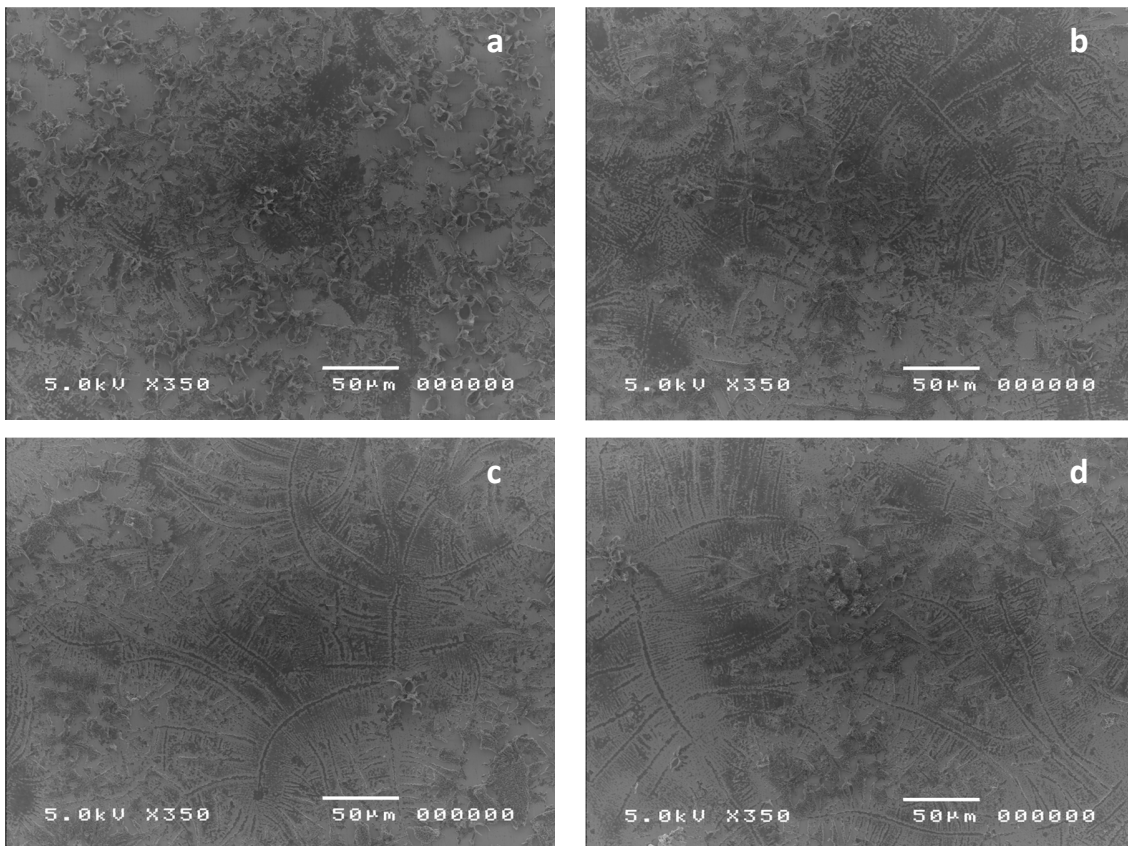


Abb. 43: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG1000 aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/ITO = 350:1, (c) Dithranol/ITO = 70:1 und (d) Dithranol/ITO = 35:1

Wie man an den REM-Bildern (Abb. 43) erkennen kann, ändert sich die Kristallisation nach dem Zusatz von ITO - Nanopartikeln deutlich. Es kann eine Abnahme der Kristallgröße und eine gleichzeitige Bildung von langen stäbchenförmigen Kristallen beobachtet werden.

MALDI

Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 65, Suppression: 200, Pulse Voltage: 2300 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

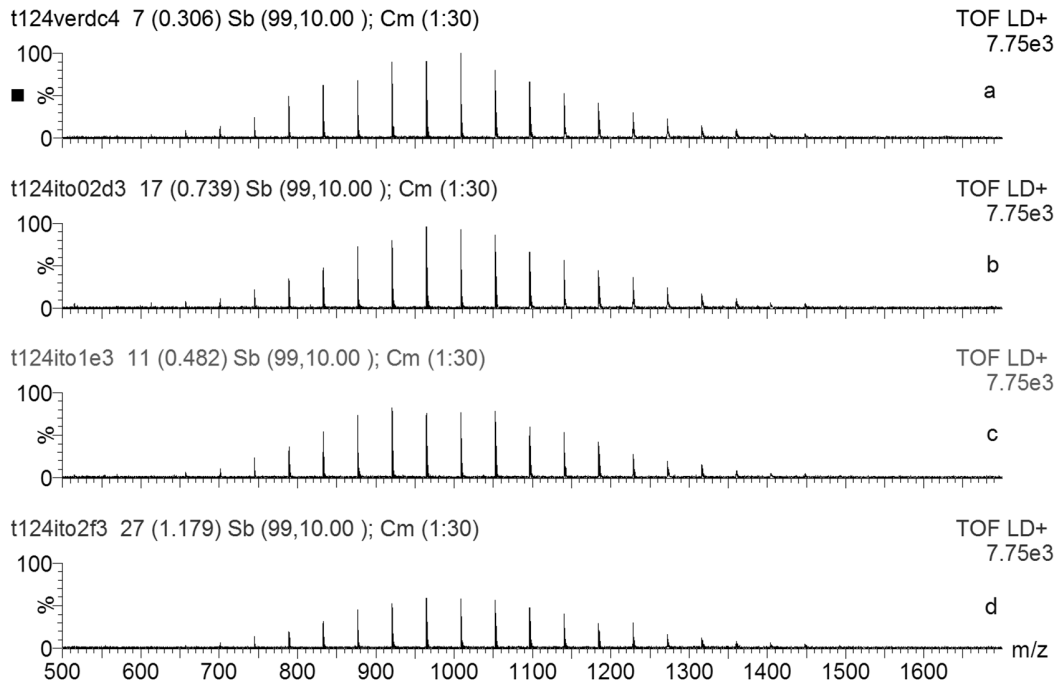


Abb. 44: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/ITO = 350:1, (c) Dithranol/ITO = 70:1 und (d) Dithranol/ITO = 35:1

Die Auswirkungen der veränderten Kristallisation auf die bei MALDI-TOF-MS beobachteten Signalintensitäten (Abb. 44) halten sich jedoch in Grenzen. Es ist lediglich eine leichte Abnahme feststellbar. Erst ab einem Gewichtsverhältnis Dithranol/ITO von 35:1 tritt eine merkbare Verschlechterung der Signalintensitäten auf.

6.3.3.2 Zusatz von ITO-Nanopartikeln bei der Untersuchung von Angiotensin I

Alle Versuche wurden mit Angiotensin I aus α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) in Methanol und als Zusatz H₂O bzw. Indium Zinn Oxid-Nanopartikel in Wasser durchgeführt.

Probenpräparation:

Zunächst wurden 60 μ l CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 10 μ l Angiotensin I ($c = 2$ pmol/ml) und 10 μ l H₂O bzw. ITO (0,2-2 mg/ml) zugegeben.

Es wurden jeweils 0,6 μ l auf die Spots aufgetragen.

Die angegebenen Verhältnisse beziehen sich auf das Gewicht.

REM-Aufnahmen

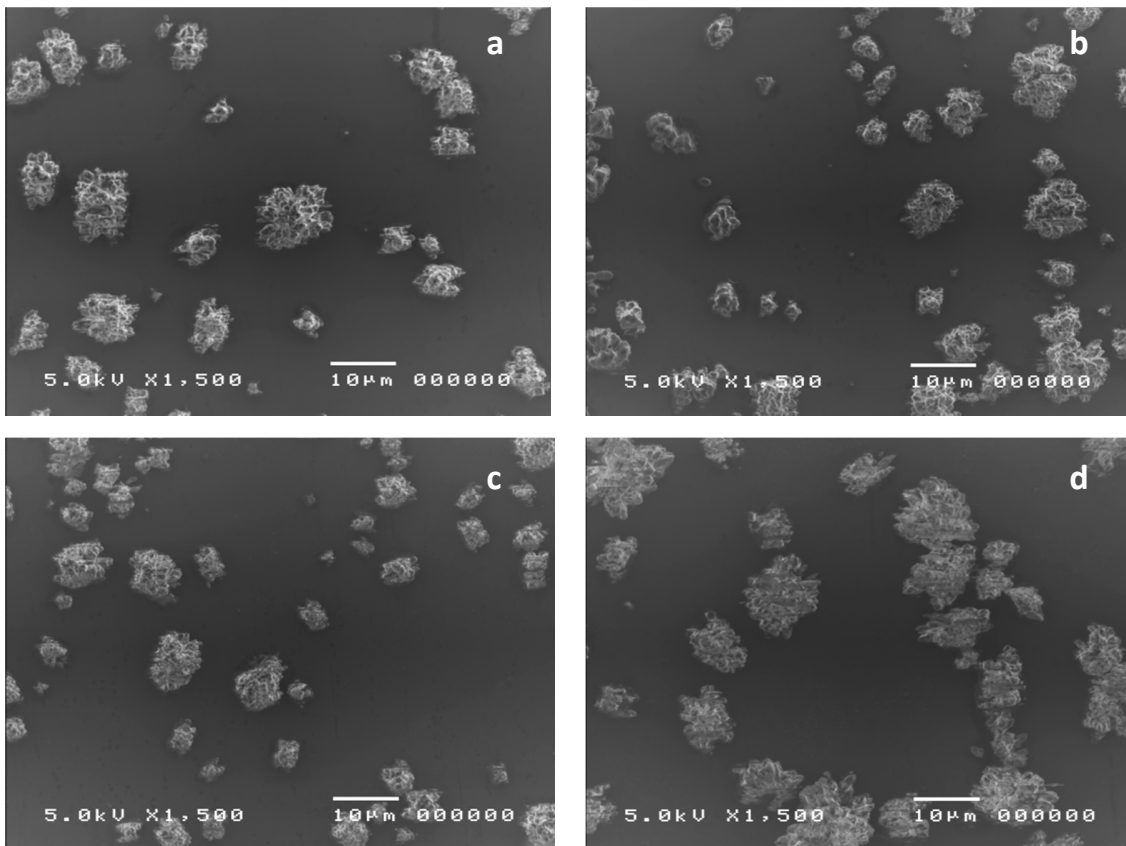


Abb. 45: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus (a) CHCA, (b) CHCA/ITO = 300/1, (c) CHCA/ITO = 60:1 und (d) CHCA/ITO = 30:1

Aus den REM-Bildern (Abb. 45) ist ersichtlich, dass sich das Kristallisationsverhalten mit steigender ITO-Konzentration nicht gravierend ändert.

Zusätzlich zu den hier gezeigten Bildern, die auf der Detektion von Sekundärelektronen beruhen, wurden weitere Aufnahmen unter Verwendung eines BSE (Backscattered Electron) - Detektors gemacht.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

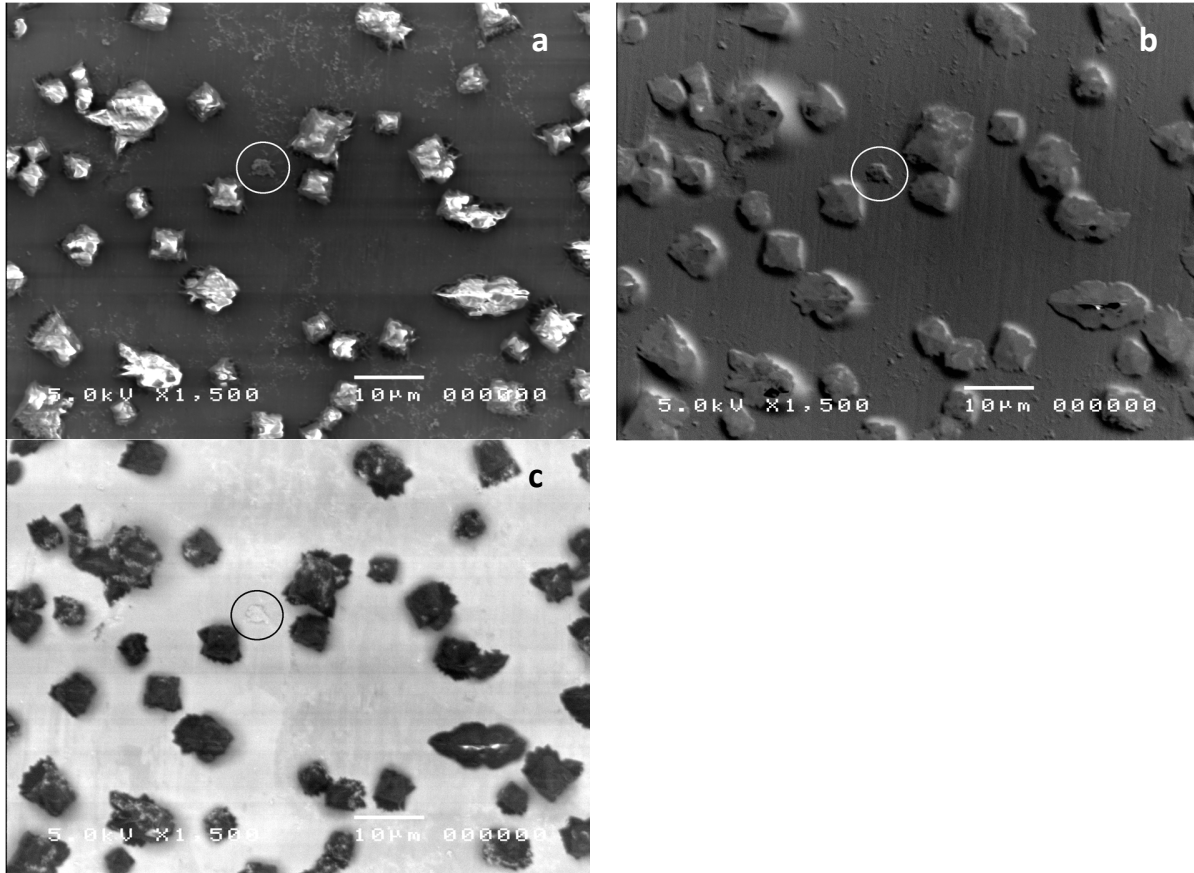


Abb. 46: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus CHCA/ITO = 24:1; (a) SE-Image, (b) BSE-Topographie und (c) BSE-Chemie bzw. Materialkontrast

Mit dieser Untersuchung sollte die Verteilung der ITO-Nanopartikel im Kristallisat untersucht werden. Es wurde z.B. vermutet, dass es sich bei der, in Abb. 46 durch den Kreis gekennzeichneten, Ansammlung um ITO handelt. Die BSE-Topographie-Aufnahme (Abb. 46 b) bestätigt zunächst, dass es sich tatsächlich um eine Ansammlung und nicht um ein Artefakt handelt. Im BSE-Chemie bzw. Materialkontrast-Modus erscheinen Elemente mit niedrigen Ordnungszahlen (also die Matrix-Moleküle) dunkel und jene mit höheren Ordnungszahlen (also die Indium Zinn Oxid – Nanopartikel) hell (Abb. 46 c). Somit konnte bestätigt werden, dass es sich bei dieser Ansammlung tatsächlich um die ITO-Nanopartikel handeln muss.

MALDI

Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 40, Suppression: 500, Pulse Voltage: 2600 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

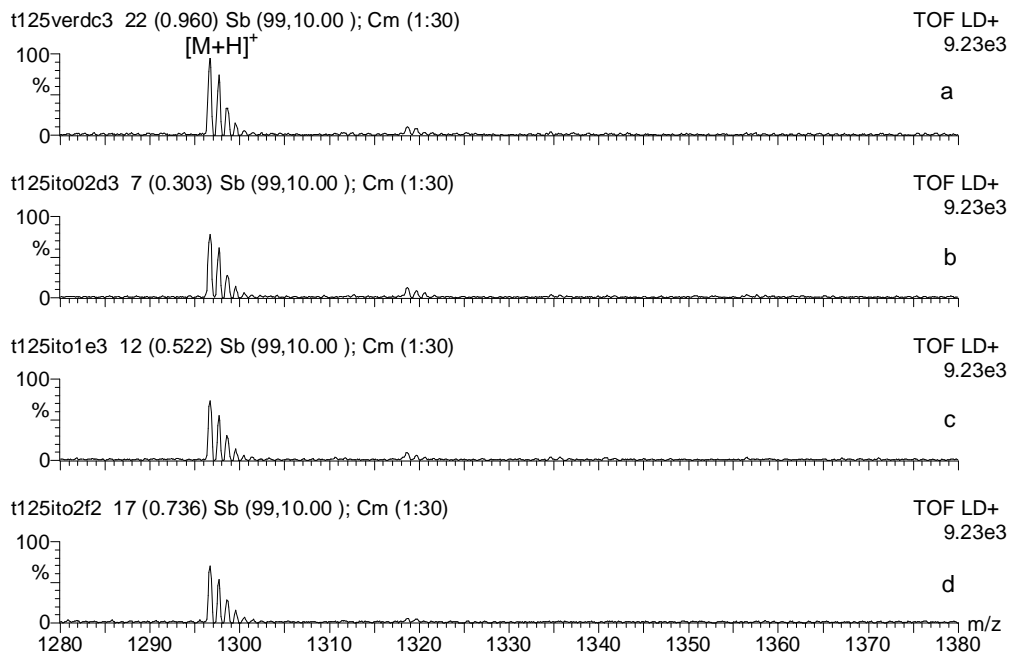


Abb. 47: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus (a) CHCA, (b) CHCA/ITO = 300:1, (c) CHCA/ITO = 60:1 und (d) CHCA/CIS = 30:1

Wie die MALDI-Spektren (Abb. 47) zeigen, ist auch im Falle des Peptids nur eine leichte Abnahme der Signalintensität mit steigender ITO-Konzentration feststellbar.

6.3.3.3 Diskussion

Wie man an den MALDI-Spektren erkennen kann, hat der Zusatz von Indium Zinn Oxid-Nanopartikeln keinen wesentlichen Einfluss auf die Signalintensitäten. Bei höheren ITO-Konzentrationen scheinen die Nanopartikel - bei Angiotensin I aus CHCA - eher als Agglomerate zwischen den Matrixmolekülen vorzuliegen, wie die REM-Bilder im BSE-Modus (Abb. 46) zeigen. Als möglicher Grund hierfür wird eine zu geringe Wechselwirkung mit den Matrixmolekülen angenommen. Bei Polyethylenglykol aus Dithranol wird die Kristallisation durch die Zugabe der ITO-Nanopartikel zwar beeinflusst, jedoch scheint dies nur geringe Auswirkungen auf die Signalintensitäten zu besitzen. Erst bei hohen Konzentrationen der Nanopartikel tritt eine Verschlechterung der Analytsignalintensitäten auf.

6.3.4 Zusammenfassung

Somit konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von Nanopartikeln keine Verbesserungen der Desorptions-/Ionisationseigenschaften der gewählten Analyte erzielt werden konnten. Sie zeigen entweder zu viel (CIS- und ZnO-Nanopartikel) oder zu wenig (ITO-Nanopartikel) Wechselwirkung mit den Matrices. CIS und ZnO scheinen zu reaktiv zu sein, wohingegen ITO eher agglomeriert und somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Probenpräparation bzw. auf die Ergebnisse hat.

In Zukunft könnte versucht werden inerte bzw. unreaktivere Nanopartikel wie z.B. Gold oder Silber zu verwenden und deren Einfluss auf die Kristallisations- und Desorptions-/Ionisationseigenschaften zu untersuchen.

6.4 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von synthetischen Polymeren

In den nachfolgenden Experimenten wurde versucht, α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) in THF für verschiedene synthetische Polymere einzusetzen und ein Vergleich zu Dithranol, einer der Standardmatrixen im polymeren Bereich, angestellt.

Die Durchführung erfolgte analog zu 6.1, *Durchführung*. Zusätzlich wurden Spektren aufgenommen, bei welchen die Position am Spot für 100 Laser-Shots nicht geändert wurde. Weiters wurden nur 7 Spots pro Polymer untersucht.

REM-Aufnahmen

REM-Bilder wurden nur von den Proben mit PEG1000 (5 mg/ml) (Abb. 48) und PEG8000 (20 mg/ml) (Abb. 49) gemacht.

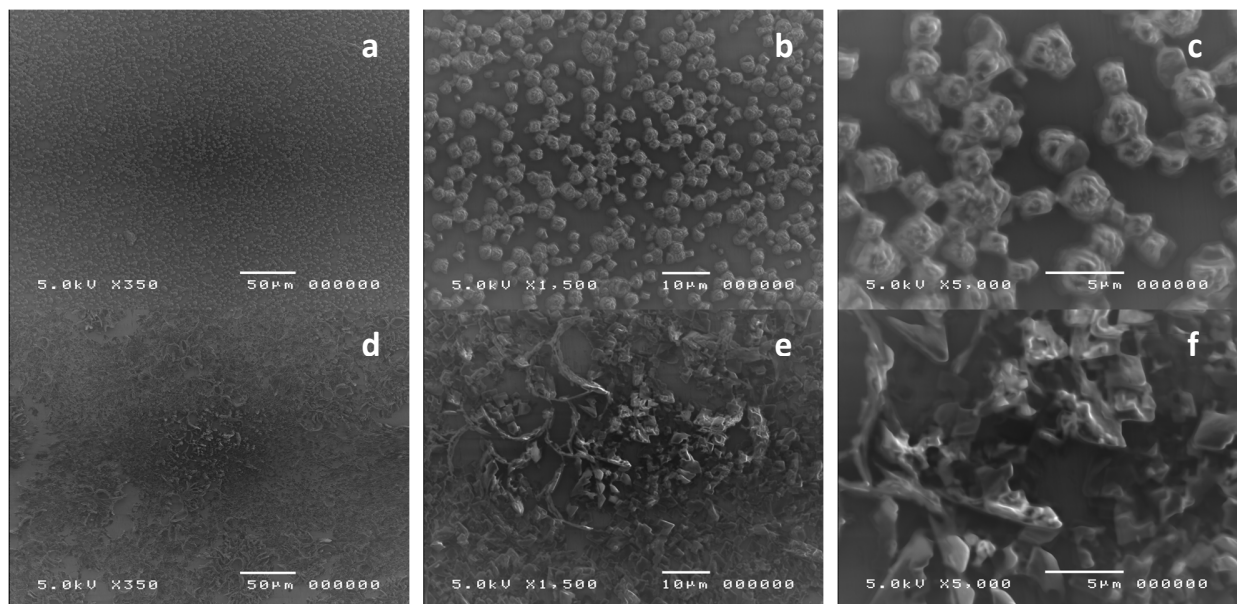


Abb. 48: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG1000/NaTFA aus (a-c) CHCA/THF und (d-f) Dithranol/THF

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

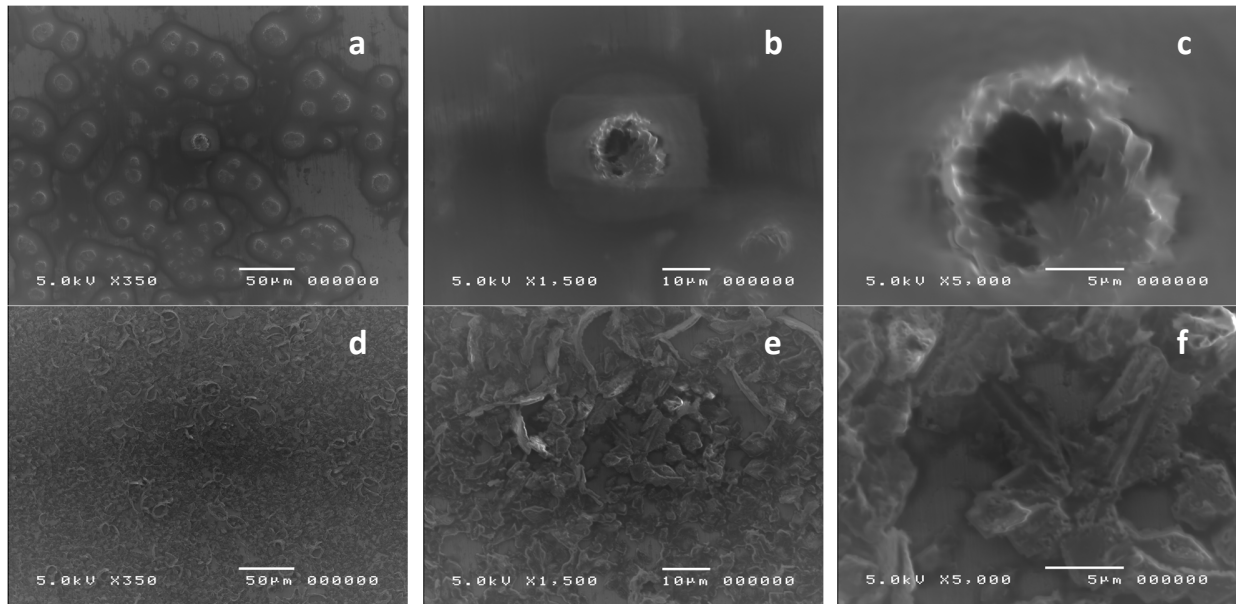


Abb. 49: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG8000/NaTFA aus (a-c) CHCA/THF und (d-f) Dithranol/THF

Bei der Betrachtung der REM-Bilder (Abb. 48 und Abb. 49) fällt zunächst einmal auf, dass CHCA ein deutlich anderes Kristallisationsverhalten als Dithranol aufweist. Bei CHCA sind viele kleine einzelne Kristalle sichtbar, wohingegen Dithranol eher als „Geflecht“ kristallisiert. Des Weiteren ist aus den Abbildungen ersichtlich, dass die höhere Probenkonzentration von PEG8000 aus CHCA zu einer stärkeren Veränderung der Kristallisation führt. Und zwar ist eine deutlichere Vergrößerung der Kristalle erkennbar und auch die Dichte der Kristalle am Spot fällt deutlich geringer aus, wohingegen diese bei Dithranol gleich bleibt bzw. sogar leicht zunimmt.

6.4.1 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG1000

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 µl Dithranol (10 mg/ml) bzw. CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 µl NaTFA (1,05 mg/ml) und 20 µl PEG1000 (5 mg/ml) zugegeben und je 0,6 µl auf die Spots aufgetragen.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

MALDI-Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 33 bzw. 40, Suppression: 300, Pulse Voltage: 2300 V

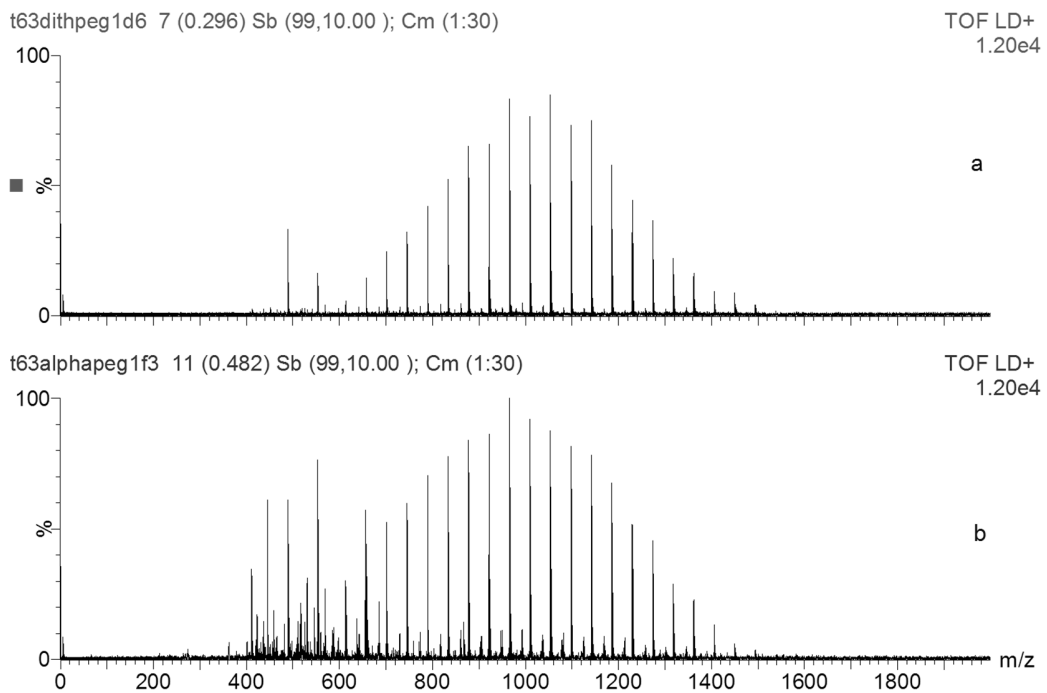


Abb. 50: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33)

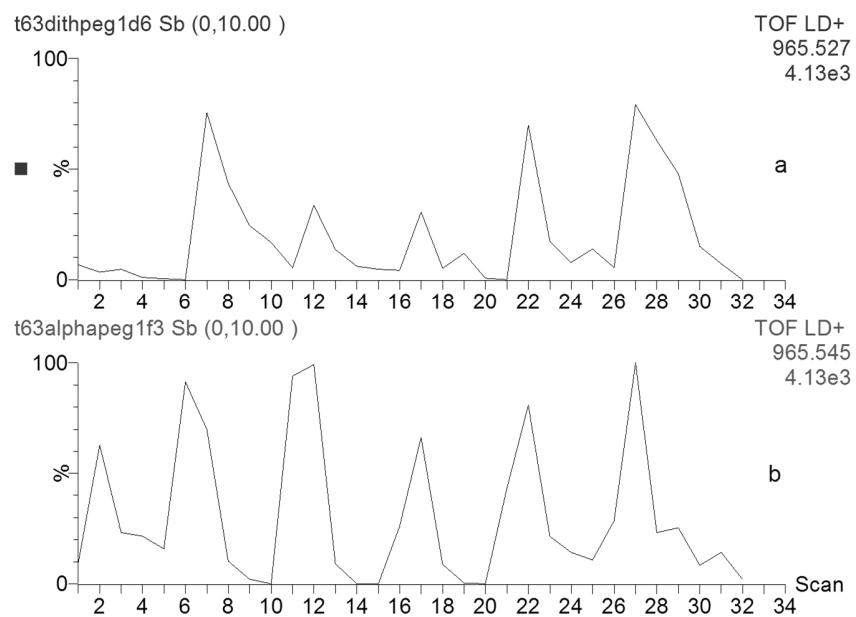


Abb. 51: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{21}-OH + Na]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33)

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Wie man an den MALDI-Spektren (Abb. 50) erkennen kann, ist die Intensität der PEG1000-Signale in beiden Matrizes in etwa gleich groß, wobei zu beachten ist, dass das Spektrum mit CHCA als Matrix bei einer deutlich niedrigeren Laserenergie aufgenommen wurde (CHCA: LF = 33, Dithranol: LF = 40). Dies belegt erstens, dass CHCA auch für Polyethylenglykol als Matrix herangezogen werden kann, und zweitens - rein auf die Signalintensität bzw. benötigte Laserenergie bezogen - sogar besser funktioniert. Die Ionenchromatogramme (Abb. 51) zeigen, dass die Homogenität am Spot geringfügig besser ist, wie man an der gleichmäßigeren Intensität der Peaks erkennen kann.

Ein großer Nachteil in diesem Massenbereich, sind die zahlreicheren und wesentlich ausgeprägteren Matrix-Signale, die sich optisch störend auf das Spektrum auswirken. Eine Möglichkeit, die diese zu minimieren besteht darin, länger als 25 Laserschüsse an einer Position zu verweilen, wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen.

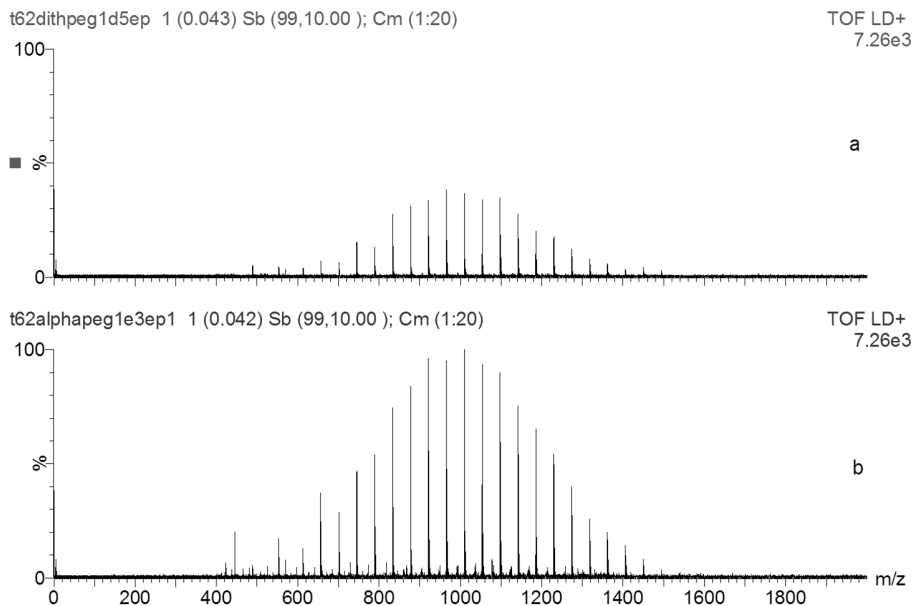


Abb. 52: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 35) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35) – 100 Laser Shots an einer Position

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

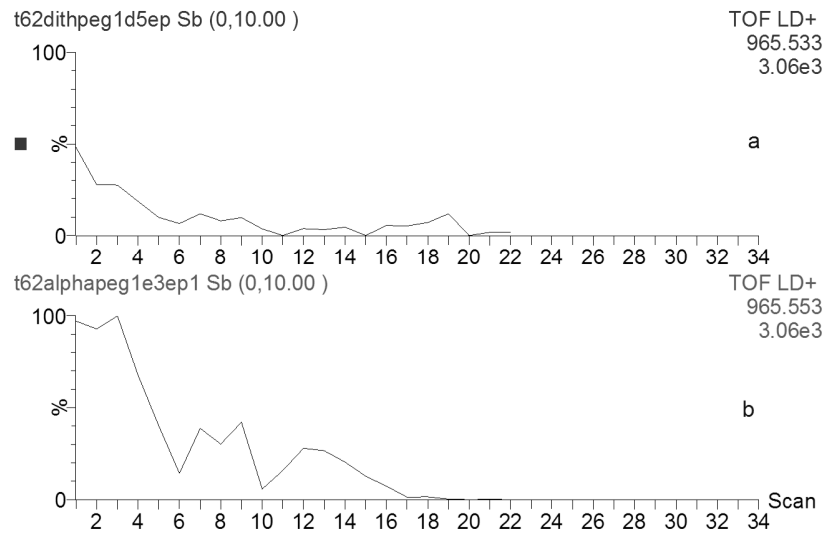


Abb. 53: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{21}-OH + Na]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 35) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35) – 100 Laser Shots an einer Position

Aus Abb. 52 und Abb. 53 ist ersichtlich, dass CHCA bei gleicher Laserenergie (LF = 35) und einem längeren Laserbeschuss (100 Laser-Shots) an einer Position deutlich länger Analytsignal ($[H(O-CH_2-CH_2)_{21}-OH + Na]^+$) liefert und so auch die störenden Matrix-Signale minimiert werden können.

6.4.2 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG2000

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 μ l Dithranol (10 mg/ml) bzw. CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 μ l NaTFA (1,05 mg/ml), 20 μ l PEG2000 (5 mg/ml) zugegeben und jeweils 0,6 μ l auf die Spots aufgetragen.

MALDI-Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 33 bzw. 40, Suppression: 600, Pulse Voltage: 2700 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

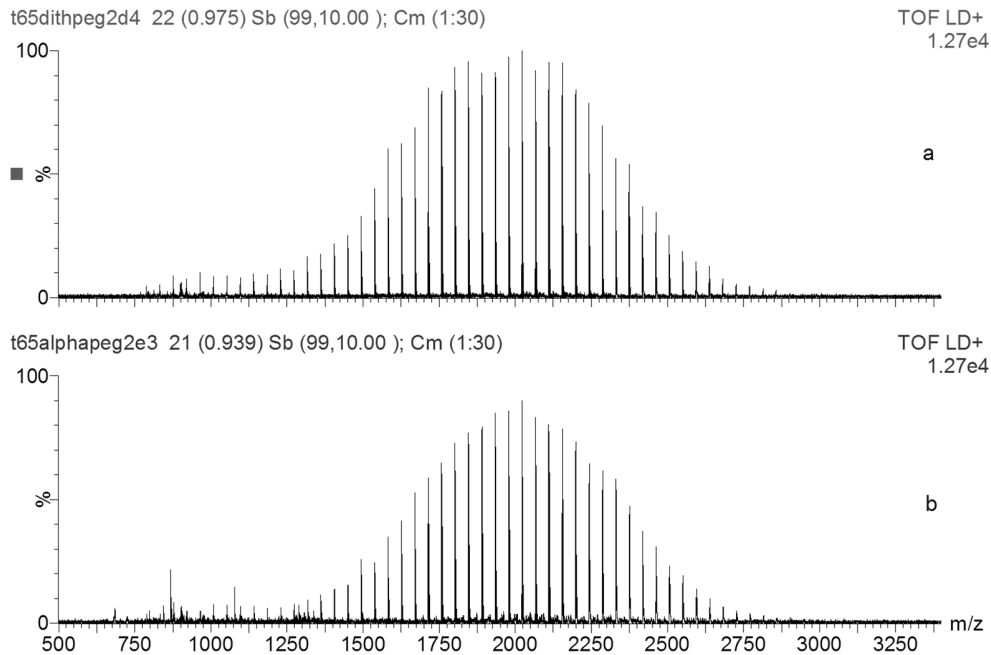


Abb. 54: MALDI-Spektren von PEG2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33)

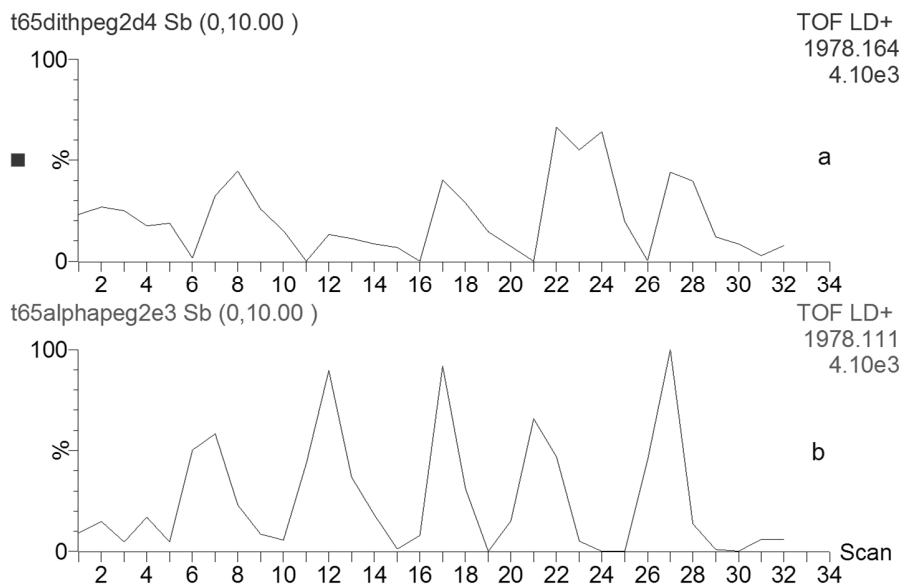


Abb. 55: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{44}-OH + Na]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33)

Auch hier liefern beide Matrices vergleichbare Signalintensitäten (Abb. 54, CHCA: LF = 33, Dithranol: LF = 40). Auffällig ist, dass in diesem Massenbereich, aufgrund der gewählten suppression von 600, deutlich weniger ausgeprägte Matrix-Signale auftreten und somit keine

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Störung der Analytsignale erfolgt. Die Ionenchromatogramme (Abb. 55) zeigen bei CHCA als Matrix deutlich höhere Peaks, jedoch nimmt die Intensität im Vergleich zu Dithranol auch schneller wieder ab. Diese Effekte gleichen sich in etwa aus.

6.4.3 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG4600

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 µl Dithranol (10 mg/ml) bzw. CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 µl NaTFA (1,05 mg/ml), 20 µl PEG4600 (10 mg/ml) zugegeben und jeweils 0,6 µl auf die Spots aufgetragen.

MALDI-Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 40 bzw. 50, Suppression: 1500, Pulse Voltage: 3000 V

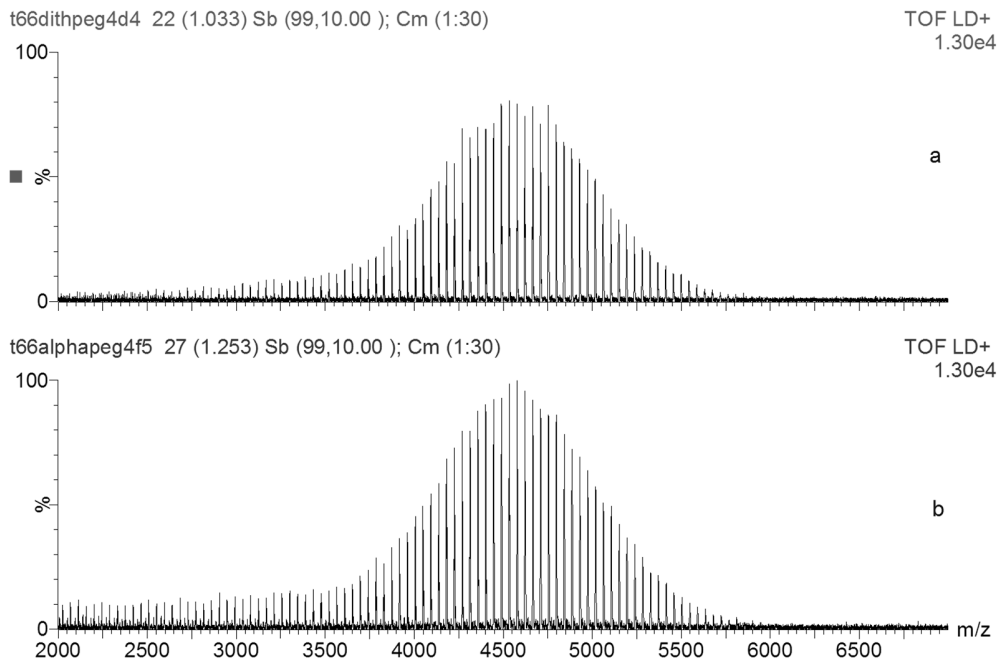


Abb. 56: MALDI-Spektren von PEG4600 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

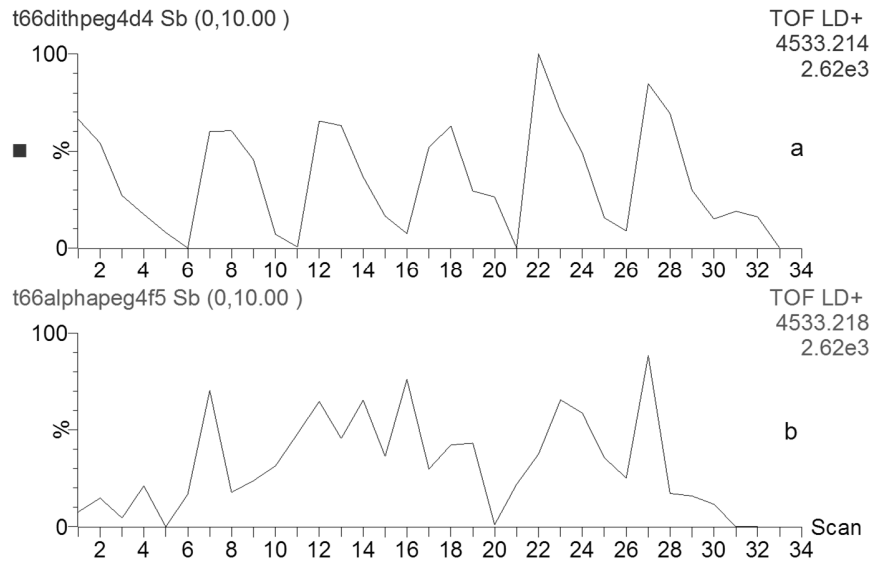


Abb. 57: Ionenchromatogramme von $[\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{102}\text{-OH} + \text{Na}]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)

Wieder liefern beide Matrices ähnlich hohe Signalintensitäten (Abb. 56). Allerdings können bei der Verwendung von CHCA als Matrix im unteren Massenbereich intensivere Signale beobachtet werden. Dies ist auf eine Fragmentierung des Polyethylenglykols zurückzuführen, welche aus CHCA offensichtlich begünstigt wird.

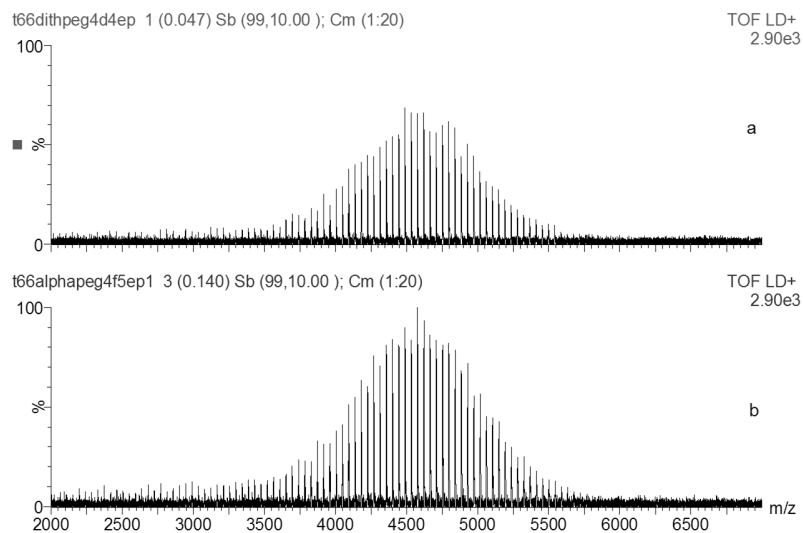


Abb. 58: MALDI-Spektren von PEG4600 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser shots an einer Position

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

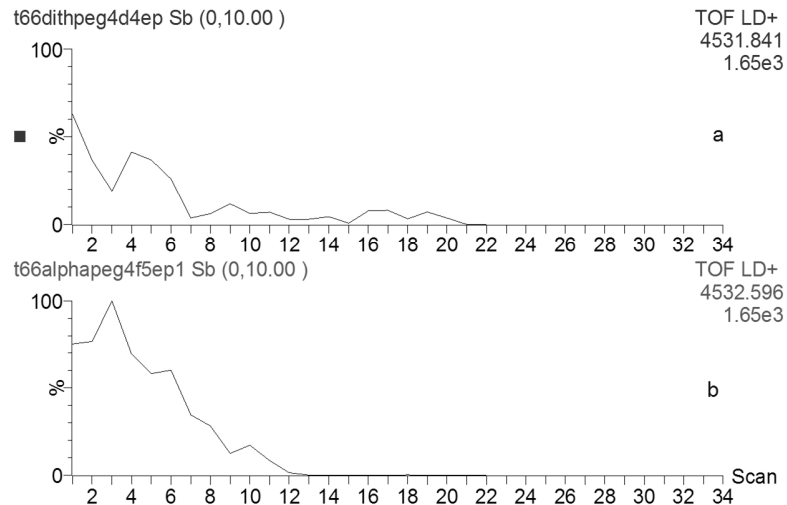


Abb. 59: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{102}-OH + Na]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser shots an einer Position

Bei längerem Laserbeschuss an einer Position (Abb. 58) ist eine leichte Abnahme der Intensität der Fragmentsignale zu beobachten, sie sind jedoch im Vergleich mit Dithranol immer noch höher.

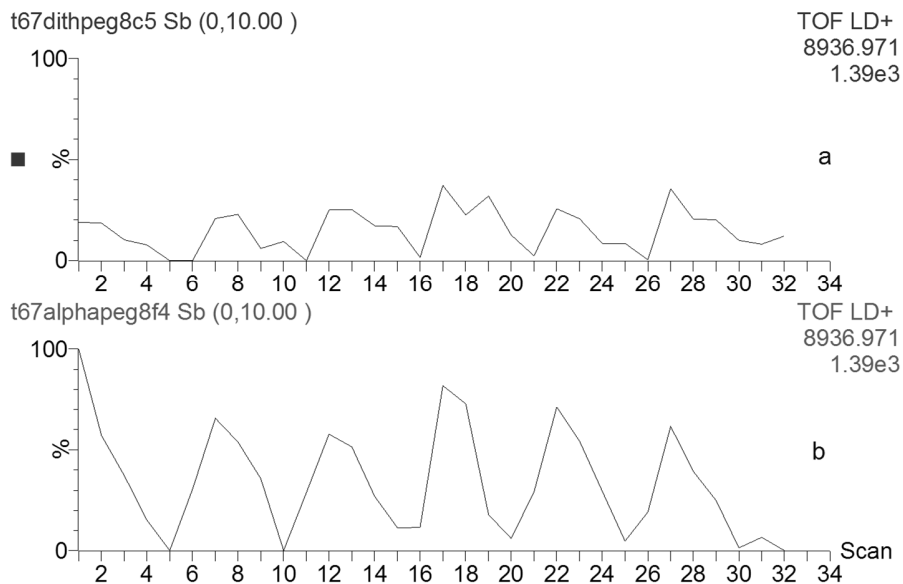
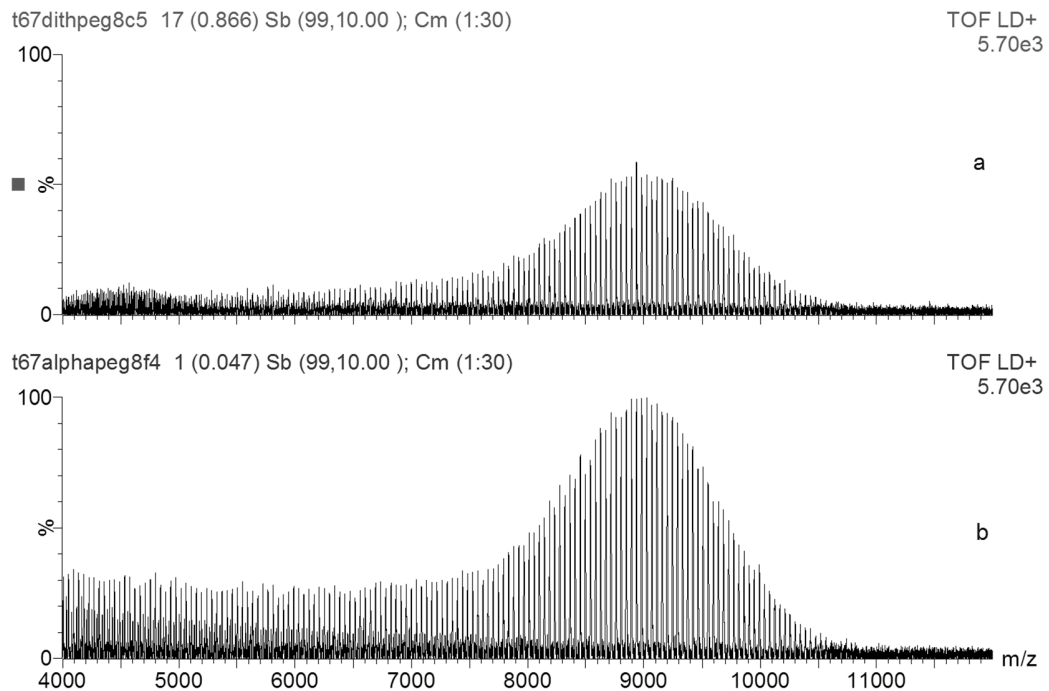
6.4.4 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG8000

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 μ l Dithranol (10 mg/ml) bzw. CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 μ l NaTFA (1,05 mg/ml), 20 μ l PEG8000 (20 mg/ml) zugegeben und jeweils 0,6 μ l auf die Spots aufgetragen.

MALDI-Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 40 bzw. 50, Suppression: 4000, Pulse Voltage: 3300 V

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion



6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Im Fall von Polyethylenglykol 8000 ist die Fragmentierung noch deutlich ausgeprägter (Abb. 60). Diese wird durch die größere Kettenlänge begünstigt, da mit wachsender Länge auch eine Fragmentierung wahrscheinlicher wird.

6.4.5 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PEG-ME2000

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 µl Dithranol (10 mg/ml) bzw. CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 µl NaTFA (1,05 mg/ml), 20 µl PEG-ME2000 (5 mg/ml) zugegeben und jeweils 0,6 µl auf die Spots aufgetragen.

MALDI-Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 40 bzw. 45, Suppression: 400, Pulse Voltage: 2800 V

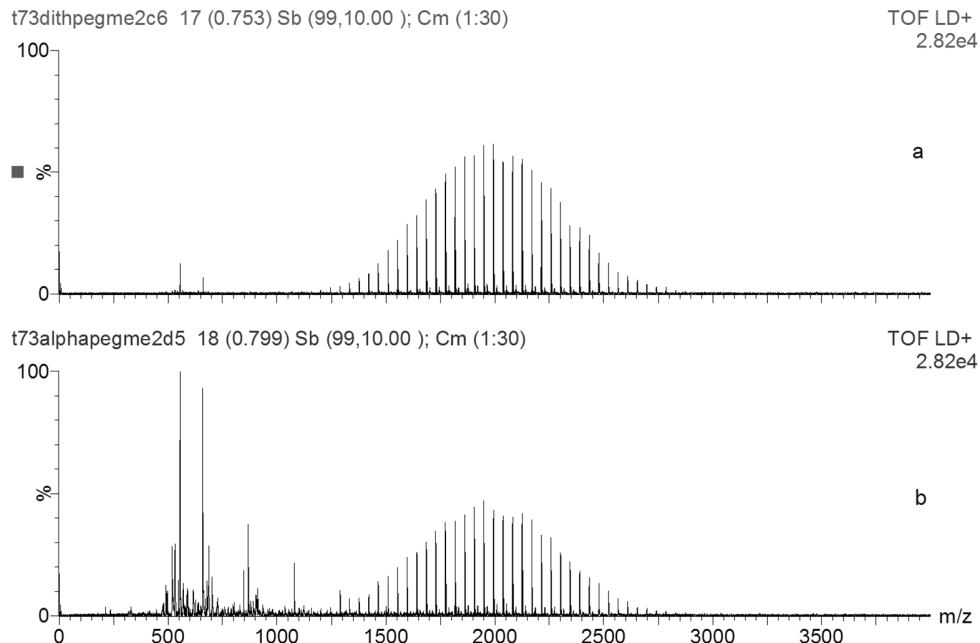


Abb. 62: MALDI-Spektren von PEG-ME2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

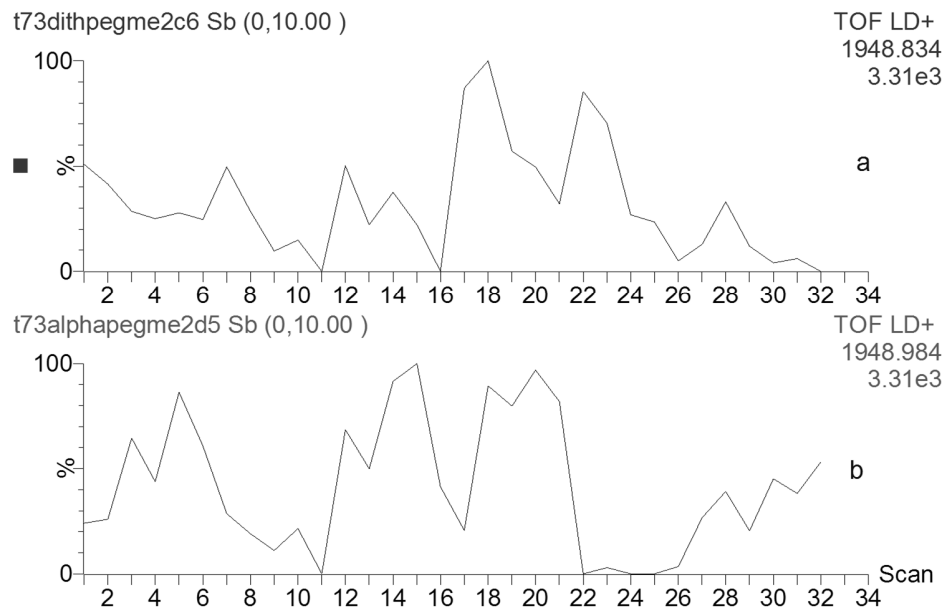


Abb. 63: Ionenchromatogramme von $[H_3C(O-CH_2-CH_2)_{43}-OH + Na]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)

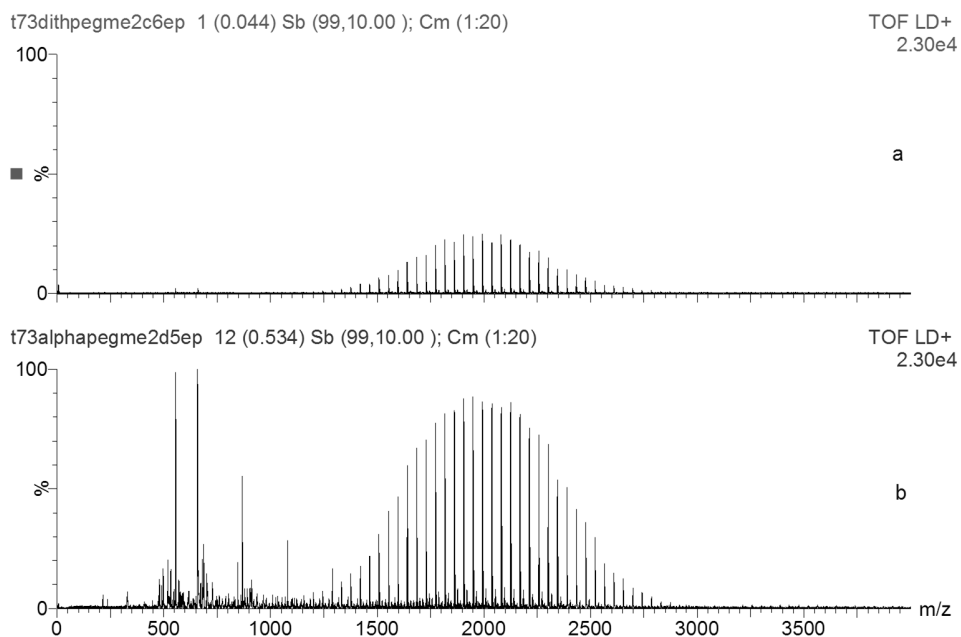


Abb. 64: MALDI-Spektren von PEG-ME2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 45) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser Shots an einer Position

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

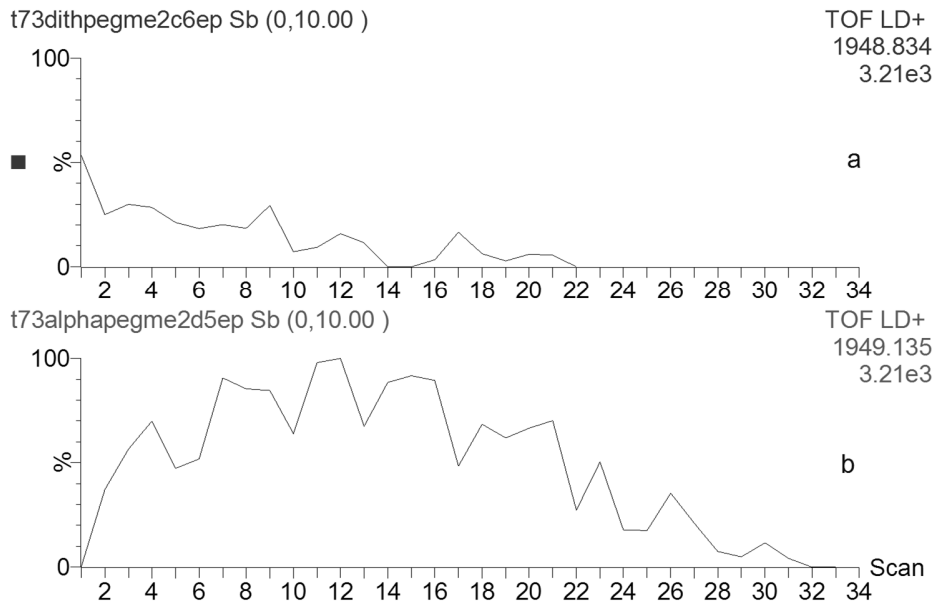


Abb. 65: Ionenchromatogramme von $[\text{H}_3\text{C}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{43}-\text{OH} + \text{Na}]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 45) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser Shots an einer Position

Polyethylglykoldimethylether scheint auf den ersten Blick mit CHCA, bei einem Wechsel der Position nach 25 Laserschüssen (Abb. 62), weniger intensive Signale zu liefern. Doch der längere Laserbeschuss an einer Position zeigt, dass der Analyt erst nach einigen Laserschüssen anfängt zu desorbieren und dann relativ konstant „läuft“ (Abb. 64 und Abb. 65). Dies deutet darauf hin, dass in diesem Fall die Kristalle durch die ersten Laserschüsse zunächst aufgewärmt werden, und erst danach eine effektive Desorption/Ionisation gewährleistet werden kann.

6.4.6 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von PMMA1000

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 μl Dithranol (10 mg/ml) bzw. CHCA (10 mg/ml) vorgelegt, anschließend 20 μl NaTFA (1,05 mg/ml), 20 μl PMMA1000 (5 mg/ml) zugegeben und jeweils 0,6 μl auf die Spots aufgetragen.

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

MALDI-Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 30 bzw. 38, Suppression: 100, Pulse Voltage: 2300 V

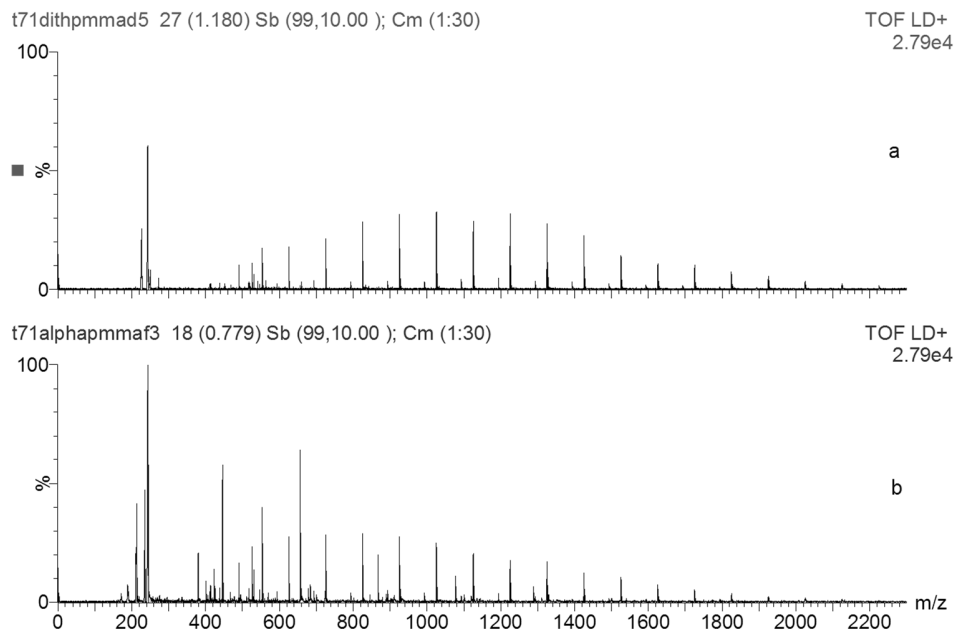


Abb. 66: MALDI-Spektren von PMMA1000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 38) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35)

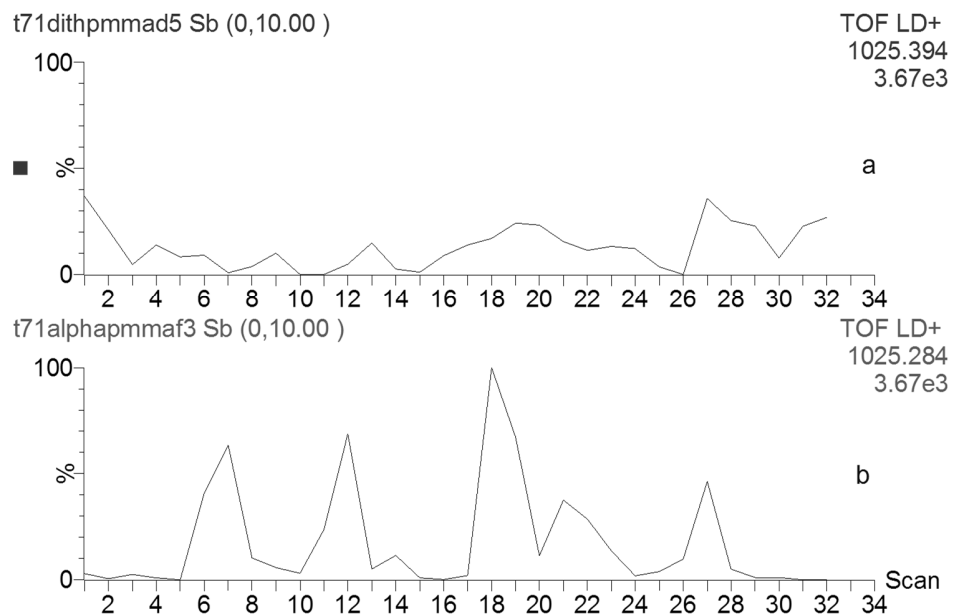


Abb. 67: Ionenchromatogramme von $\{H_3C[CH_2-C(CH_3)(COOCH_3)]_{10}-CH_3 + Na\}^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 38) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35)

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Für PMMA scheint CHCA, zumindest in diesem Massenbereich, schlechter geeignet zu sein, und zwar deshalb, weil die Signalintensität bei ähnlicher Laser-Energie (CHCA: LF = 35, Dithranol: LF = 38) kleiner ist (Abb. 66) und, wie man den Ionenchromatogrammen (Abb. 67) entnehmen kann, zwar sehr kurz sehr intensiv ist, aber sofort wieder abfällt. Mit Dithranol als Matrix ist die Signalintensität über die Zeit zwar niedriger, aber relativ konstant. Aus den MALDI-Spektren (Abb. 66) ist auch ersichtlich, dass mit CHCA in den höheren Massenbereichen geringere Intensitäten beobachtet werden. Zusätzlich wirken sich auch die Matrix-Signale wieder sehr störend aus.

6.4.7 Ungewöhnliche Kombination von Matrix/Lösungsmittel für die Untersuchung von Polystyrol 2000

Probenpräparation:

Zunächst wurden 70 µl Dithranol (10 mg/ml) bzw. CHCA (10 mg/ml), anschließend 20 µl AgTFA (1,34 mg/ml), 20 µl PS2000 (10 mg/ml) zugegeben und jeweils 0,6 µl auf die Spots aufgetragen.

MALDI-Einstellungen: Reflectron Mode, Laser Coarse: 50%, Laser Fine: 40 bzw. 43, Suppression: 400, Pulse Voltage: 2800 V

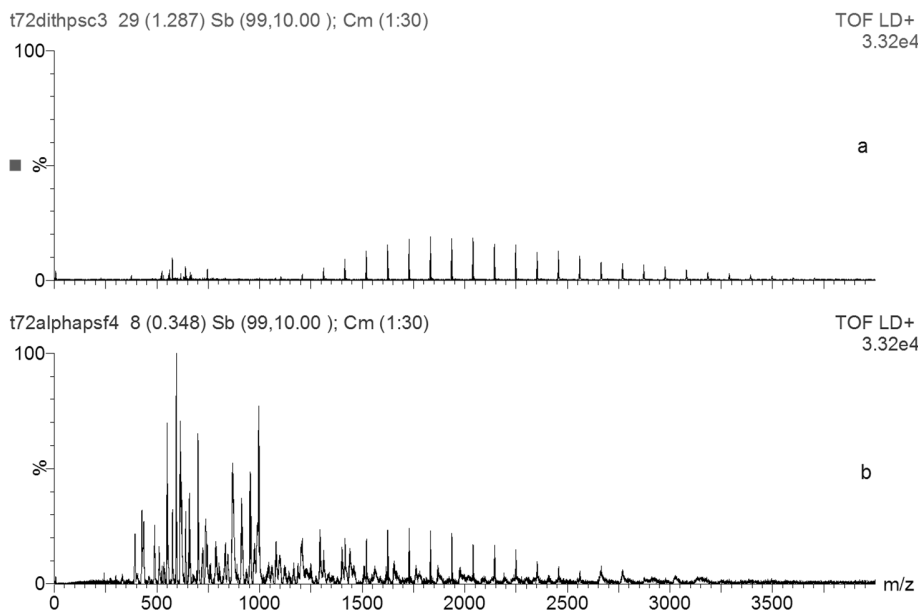


Abb. 68: MALDI-Spektren von PS2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

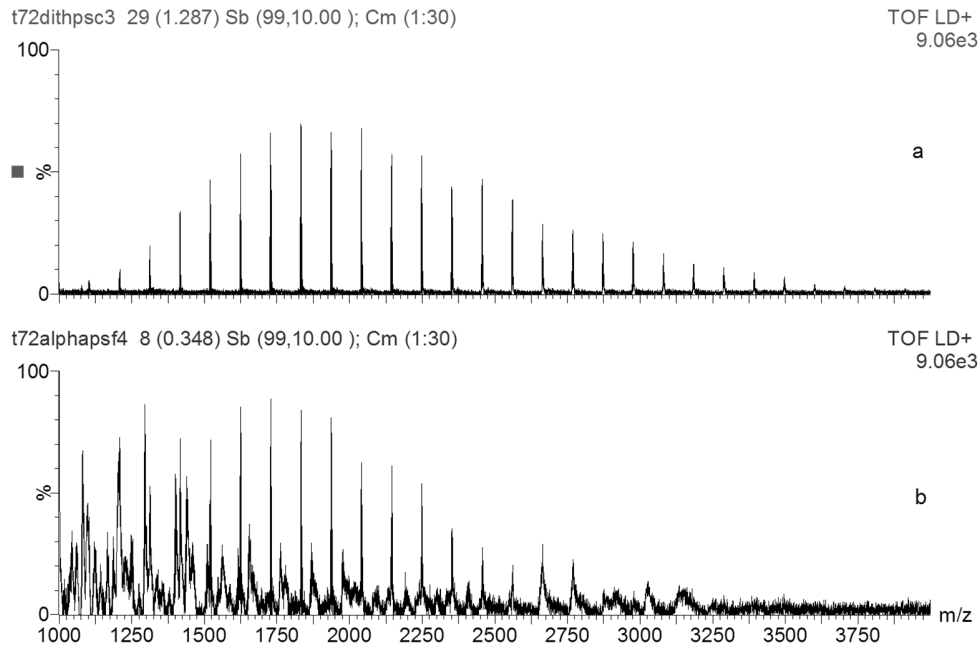


Abb. 69: MALDI-Spektren von PS2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) - Ausschnitt

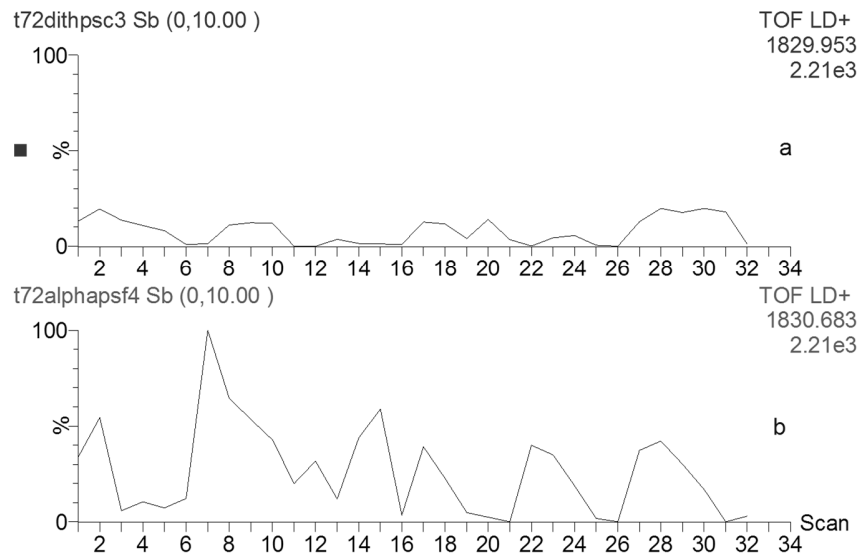


Abb. 70: Ionenchromatogramme von $\{H_3C[CH(Ph)-CH_2]_{16}-CH_3 + Ag\}^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)

Polystyrol kann zwar auch mithilfe von CHCA desorbieren/ionisieren, jedoch ist die Signal/Noise-Ratio deutlich schlechter, das heißt, dass der Untergrund mit CHCA als Matrix deutlich intensiver ist (Abb. 69). Bei einer vergleichsweise hohen Laser-Energie (CHCA: 40, Dithranol: 43) fallen auch hier wieder die deutlich intensiveren und zahlreicheren Matrix-

6 Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Signale auf (Abb. 68). Ähnlich wie bei PMMA scheint mit steigender Masse im Vergleich zu Dithranol die Empfindlichkeit abzunehmen.

6.4.8 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CHCA grundsätzlich auch in THF für polymere Proben eingesetzt werden kann. Vor allem für Polyethylenglykol scheint es teilweise sogar besser als Dithranol zu funktionieren. Jedoch ist es nur eingeschränkt nutzbar, da in niedrigen Massenbereichen mehr störende Matrix-Signale auftreten können und es bei zu hohen Molekulargewichten eine Fragmentierung der Polymere begünstigt und somit für Bestimmungen von Molekulargewichtsverteilungen eher ungeeignet ist.

Bei PMMA und Polystyrol scheint Dithranol als Matrix doch die geeignetere Wahl zu sein. Hier konnte mit CHCA, relativ betrachtet, eine Verschlechterung der Signalintensität bzw. der Auflösung beobachtet werden.

7 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass viele Parameter Einfluss auf die Probenpräparation für MALDI-TOF-MS haben.

Es konnte festgestellt werden, dass die relative Luftfeuchtigkeit einen großen Einfluss auf die Probenpräparation hat. Die Hygroskopie der verwendeten Lösungsmittel (THF und Methanol) führt zu einer Aufnahme von Wasserdampf aus der Luft während des Trocknungsprozesses. Weiters kommt es während der Verdampfung des Lösungsmittels zu einer Abkühlung am Spot, wodurch die Kondensation von Luftfeuchtigkeit gefördert wird. Demnach ist in der Endphase des Trocknungsprozesses viel Wasser am Spot vorhanden und dies scheint nicht nur das Kristallisationsverhalten zu beeinflussen, sondern auch eine wichtige Rolle in der Wechselwirkung von Analyt und Matrix zu spielen. Es konnte - unter den Bedingungen dieses Modellsystems - für einen relativ unempfindlichen Analyten wie Polyethylenglykol aus Dithranol eine Abhängigkeit der Analytsignalintensitäten von der relativen Luftfeuchtigkeit, bei der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS, festgestellt und ein Maximum bei 30 % rH beobachtet werden. Weiters konnte diese Abhängigkeit auch bei Angiotensin I aus CHCA festgestellt und ein Maximum der Signalintensität ($[M+H]^+$) – innerhalb des untersuchten Bereichs von 3 bis 31 % rH - bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 10 % beobachtet werden. Sowohl zu hohe, als auch zu niedrige Luftfeuchtigkeit wirkt sich bei den untersuchten Modellsystemen negativ aus.

Durch Erhöhung der Targettemperatur konnte für Angiotensin I aus CHCA/Methanol, vor allem im Bereich niedriger Konzentrationen, eine Verbesserung der Empfindlichkeit bei der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS beobachtet werden. Somit könnten, durch das Aufspotten auf ein heißes Target, möglicherweise niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden. Weiters konnte, aufgrund der schnelleren Verdampfung des Lösungsmittels, eine Verbesserung der Homogenität am Spot und somit auch der Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit festgestellt werden. Sobald Wasser - auch nur in geringen Mengen - im Lösungsmittelgemisch enthalten war, konnte eine Abnahme der Signalintensitäten ($[M+H]^+$) der untersuchten Analyte beobachtet werden.

7 Zusammenfassung

Durch den Zusatz von Nanopartikeln zu ausgewählten Matrix/Analyt-Paaren konnten keine Verbesserungen der Desorptions-/Ionisationseigenschaften der gewählten Analyte beobachtet werden. Die Nanopartikel zeigten entweder zu viel (CuInS_2 und ZnO) oder zu wenig (Indium Zinn Oxid) Wechselwirkung mit den Matrizes. CuInS_2 und ZnO scheinen zu reaktiv zu sein, was in einer Abnahme der Analytsignalintensitäten, bei der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS, resultierte. Demnach scheinen die photoaktiven CuInS_2 -Nanopartikel die Photoinstabilität von Dithranol zu verstärken, wohingegen die ZnO -Nanopartikel eine zu hohe Affinität zum Analyt (Angiotensin I) aufweisen. Indium Zinn Oxid – Nanopartikel hingegen zeigen keine bzw. kaum Wechselwirkung mit den Matrizes. Sie neigen eher zur Agglomeration und haben somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Probenpräparation bzw. auf die Ergebnisse.

Weiters konnte gezeigt werden, dass CHCA grundsätzlich auch in THF für synthetische Polymere eingesetzt werden kann. Für Polyethylenglykol konnten bei niedrigeren Laserenergien höhere Signalintensitäten beobachtet werden. Jedoch ist es nur eingeschränkt nutzbar, da in niedrigen Massenbereichen mehr störende Matrix-Signale auftreten können und es bei zu hohen Molekulargewichten eine Fragmentierung der Polymere begünstigt und somit für Bestimmungen von Molekulargewichtsverteilungen ungeeignet ist. Bei Poly(methylmethacrylat) und bei Polystyrol konnte aus CHCA/THF, relativ betrachtet, eine Verschlechterung der Analytsignalintensitäten bzw. der Auflösung beobachtet werden.

8 Anhang

Tabelle 3: Signalintensitäten Angiotensin I ($[M+H]^+$) – hot und cold Target (c = 18,1 fmol am Spot)

Angiotensin I	cold Target		hot Target	
	Intensität		Intensität	
c = 18,1 fmol				
	19100		14800	
	15900		13300	
	12300		15400	
	12800		11200	
	10900		12100	
	18900		15600	
	16500		17800	
	16300		14500	
		RSD		RSD
Durchschnitt	15338	3043	14338	2100
RSD / %		20		15

Tabelle 4: Signalintensitäten Angiotensin I ($[M+H]^+$) – hot und cold Target (c = 1,8 fmol am Spot)

Angiotensin I	cold Target		hot Target	
	Intensität		Intensität	
c = 1,8 fmol				
	2040		4130	
	1140		4610	
	700		4750	
	702		5260	
	839		4280	
	982		4800	
	1130		3950	
	1190		4200	
		RSD		RSD
Durchschnitt	1090	430	4498	434
RSD / %		39		10

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der intensivsten PEG-Signale ($[H(O-CH_2-CH_2)_{22}-OH + Na]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit	24
Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Angiotensin I – Signalintensität ($[M+H]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit	29
Tabelle 3: Signalintensitäten Angiotensin I ($[M+H]^+$) – hot und cold Target (c = 18,1 fmol am Spot)	79
Tabelle 4: Signalintensitäten Angiotensin I ($[M+H]^+$) – hot und cold Target (c = 1,8 fmol am Spot)	79

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Desorption/Ionisation bei MALDI.....	3
---	---

Abb. 2: Schematische Darstellung der Ionenbeschleunigung bei MALDI	4
Abb. 3: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS im Linear Modus	5
Abb. 4: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS im Reflectron Modus.....	6
Abb. 5: Aufbau und Funktionsprinzip eines Rasterelektronenmikroskops	7
Abb. 6: Strukturen von Dithranol, DHB und CHCA.....	10
Abb. 7: Übersichts-REM-Aufnahmen von PEG1000/Dithranol/NaTFA – Kristallisaten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfechtigkeiten; (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 %, (d) 32 %, (e) 44 %, (f) 54 %, (g) 75 % und (h) 90 % rH.....	19
Abb. 8: REM-Aufnahmen mit höherer Vergrößerung von PEG1000/Dithranol/NaTFA – Kristallisaten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfechtigkeiten ; (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 %, (d) 32 %, (e) 44 %, (f) 54 %, (g) 75 % und (h) 90 % rH	20
Abb. 9: MALDI-Spektren von PEG1000 aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 % und (d) 32 % relativer Luftfeuchtigkeit.....	21
Abb. 10: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{22}-OH + Na]^+$ aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 19 % und (d) 32 % relativer Luftfeuchtigkeit	22
Abb. 11: MALDI-Spektren von PEG1000 aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 32 %, (b) 44 %, (c) 54 %, (d) 75 % und (e) 90 % relativer Luftfeuchtigkeit	23
Abb. 12: Ionenchromatogramme von $[H(O-CH_2-CH_2)_{22}-OH + Na]^+$ aus Dithranol/NaTFA; aufgespottet bei (a) 32 %, (b) 44 %, (c) 54 %, (d) 75 % und (e) 90 % relativer Luftfeuchtigkeit	23
Abb. 13: Graphische Darstellung der PEG – Signalintensitäten ($[H(O-CH_2-CH_2)_{22}-OH + Na]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit	24
Abb. 14: REM-Aufnahmen von Angiotensin I/CHCA – Kristallisaten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfechtigkeiten ; (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 %, (d) 31 %, (e) 42 %, (f) 52 %, (g) 71 % und (h) 89 % rH	26
Abb. 15: Übersichts-REM-Aufnahmen von Angiotensin I/CHCA – Kristallisaten hergestellt bei unterschiedlichen Luftfechtigkeiten ; (a) 31 % und (b) 42 % rH.....	27
Abb. 16: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 % und (d) 31 % rH.....	28
Abb. 17: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 % und (d) 31 % rH - Ausschnitt	28
Abb. 18: Ionenchromatogramme von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA; aufgespottet bei (a) 3 %, (b) 10 %, (c) 20 % und (d) 31 % rH.....	29
Abb. 19: Graphische Darstellung der Angiotensin I – Signalintensitäten ($[M+H]^+$) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit	30
Abb. 20: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus CHCA / (a) Acetonitril/H ₂ O, (b) MeOH (cold Target), (c) MeOH (hot target)	32
Abb. 21: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA / (a) Acetonitril/Wasser, (b) MeOH (cold target) und (c) MeOH (hot target)	33
Abb. 22: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - 150 Laser Shots an einer Position	34
Abb. 23: Ionenchromatogramme von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - 150 Laser Shots an einer Position.....	35
Abb. 24: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - Ausschnitt.....	36
Abb. 25: Ionenchromatogramme von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA/MeOH auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet.....	36
Abb. 26: REM Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus CHCA/Acetonitril/H ₂ O aufgespottet auf (a+b) cold target und (c+d) hot target.....	37
Abb. 27: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/ACN/H ₂ O auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet	38
Abb. 28: Ionenchromatogramme von Angiotensin I ($[M+H]^+$) aus CHCA/ACN/H ₂ O auf (a) cold target und (b) hot target aufgespottet - 100 Laser Shots an einer Position.....	39
Abb. 29: REM Aufnahmen von Kristallisaten von Insulin aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a+b) cold target und (c+d) hot target.....	40
Abb. 30: MALDI-Spektren von Insulin chain B oxidized (in H ₂ O) aus CHCA/MeOH; aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target.....	41
Abb. 31: Ionenchromatogramme von Insulin chain B oxidized (in H ₂ O) ($[M+H]^+$) aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target	41

Abb. 32: REM Aufnahmen von Kristallisaten von ACTH aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a+b) cold target und (c+d) hot target.....	43
Abb. 33: MALDI-Spektren von ACTH (in Acetonitril/H ₂ O) ([M+H] ⁺) aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target.....	44
Abb. 34: Ionenchromatogramme von ACTH (in Acetonitril/H ₂ O) ([M+H] ⁺) aus CHCA/MeOH aufgespottet auf (a) cold target und (b) hot target	44
Abb. 35: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG1000 aus (a+b) Dithranol, (c+d) Dithranol/CIS = 600/1 und (e+f) Dithranol/CIS = 60:1	46
Abb. 36: REM-Aufnahmen von PEG1000 aus Dithranol/CIS = 60:1 nach 20 Minuten.....	47
Abb. 37: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/CIS = 6000:1, (c) Dithranol/CIS = 1200:1 und (d) Dithranol/CIS = 600:1.....	48
Abb. 38: Ionenchromatogramme von [H(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₂ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/CIS = 6000:1, (c) Dithranol/CIS = 1200:1 und (d) Dithranol/CIS = 600:1	48
Abb. 39: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus (a) CHCA, (b) CHCA/ZnO = 214:1, (c) CHCA/ZnO = 71:1 und (d) CHCA/ZnO = 7:1.....	50
Abb. 40: MALDI-Spektrum von Angiotensin I aus CHCA/ZnO = 214:1.....	51
Abb. 41: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus CHCA/ZnO (a) 0, (b) 214:1, (c) 71:1 und (d) 7:1	51
Abb. 42: Berechnete Isotopenmuster für die Matrix- und Analytsignale, die auf Ionisation mit Zn zurückzuführen sind	52
Abb. 43: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG1000 aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/ITO = 350:1, (c) Dithranol/ITO = 70:1 und (d) Dithranol/ITO = 35:1	54
Abb. 44: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol, (b) Dithranol/ITO = 350:1, (c) Dithranol/ITO = 70:1 und (d) Dithranol/ITO = 35:1.....	55
Abb. 45: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus (a) CHCA, (b) CHCA/ITO = 300/1, (c) CHCA/ITO = 60:1 und (d) CHCA/ITO = 30:1.....	56
Abb. 46: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von Angiotensin I aus CHCA/ITO = 24:1; (a) SE-Image, (b) BSE-Topographie und (c) BSE-Chemie bzw. Materialkontrast	57
Abb. 47: MALDI-Spektren von Angiotensin I aus (a) CHCA, (b) CHCA/ITO = 300:1, (c) CHCA/ITO = 60:1 und (d) CHCA/CIS = 30:1.....	58
Abb. 48: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG1000/NaTFA aus (a-c) CHCA/THF und (d-f) Dithranol/THF.....	60
Abb. 49: REM-Aufnahmen von Kristallisaten von PEG8000/NaTFA aus (a-c) CHCA/THF und (d-f) Dithranol/THF.....	61
Abb. 50: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33)	62
Abb. 51: Ionenchromatogramme von [H(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₁ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33).....	62
Abb. 52: MALDI-Spektren von PEG1000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 35) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35) – 100 Laser Shots an einer Position	63
Abb. 53: Ionenchromatogramme von [H(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₁ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 35) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35) – 100 Laser Shots an einer Position	64
Abb. 54: MALDI-Spektren von PEG2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33)	65
Abb. 55: Ionenchromatogramme von [H(O-CH ₂ -CH ₂) ₄₄ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 40) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 33).....	65
Abb. 56: MALDI-Spektren von PEG4600 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)	66
Abb. 57: Ionenchromatogramme von [H(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀₂ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40).....	67
Abb. 58: MALDI-Spektren von PEG4600 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser shots an einer Position.....	67
Abb. 59: Ionenchromatogramme von [H(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀₂ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 50) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser shots an einer Position	68
Abb. 60: MALDI-Spektren von PEG8000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 60) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 55)	69
Abb. 61: Ionenchromatogramme von [H(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₀₂ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 60) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 55).....	69
Abb. 62: MALDI-Spektren von PEG-ME2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40)	70
Abb. 63: Ionenchromatogramme von [H ₃ C(O-CH ₂ -CH ₂) ₄₃ -OH + Na] ⁺ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40).....	71

Abb. 64: MALDI-Spektren von PEG-ME2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 45) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser Shots an einer Position.....	71
Abb. 65: Ionenchromatogramme von $[H_3C(O-CH_2-CH_2)_{43}-OH + Na]^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 45) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) – 100 Laser Shots an einer Position	72
Abb. 66: MALDI-Spektren von PMMA1000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 38) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35).....	73
Abb. 67: Ionenchromatogramme von $\{H_3C[CH_2-C(CH_3)(COOCH_3)]_{10}-CH_3 + Na\}^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 38) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 35).....	73
Abb. 68: MALDI-Spektren von PS2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40).....	74
Abb. 69: MALDI-Spektren von PS2000 aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40) - Ausschnitt.....	75
Abb. 70: Ionenchromatogramme von $\{H_3C[CH(Ph)-CH_2]_{16}-CH_3 + Ag\}^+$ aus (a) Dithranol/NaTFA (LF = 43) und (b) CHCA/NaTFA (LF = 40).....	75