

Dipl.-Ing. Stefan Johannes Gabriel

**Entmischungsphänomene  
in lösemittelbasierenden  
MALDI-TOF MS Probenpräparationen**

Die vorliegende Arbeit entstand an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Impressum

**Entmischungsphänomene  
in lösemittelbasierenden  
MALDI-TOF MS Probenpräparationen**

2015

Herausgeber:

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Unter den Eichen 87

12205 Berlin

Telefon: +49 30 8104-0

Telefax: +49 30 8112029

E-Mail: [info@bam.de](mailto:info@bam.de)

Internet: [www.bam.de](http://www.bam.de)

Copyright © 2015 by

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Layout: BAM-Referat Z.8

ISSN 1613-4249

ISBN 978-3-9816668-6-1

**Entmischungsphänomene in lösemittelbasierenden  
MALDI-TOF MS Probenpräparationen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl.-Ing. Stefan Johannes Gabriel**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:   1. Prof. Dr. Ulrich Panne  
                          2. Assoc.-Prof. Dr. Clemens Schwarzinger  
                          3. Prof. Dr. Klaus Rademann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2014



*„Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“*

Marie Curie



***Für meine Eltern***





## Danksagung

Diese Arbeit wurde im Fachbereich „Strukturanalytik“ an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM) in Kooperation mit dem Institut für Chemische Technologie Organischer Stoffe (CTO) der Johannes-Kepler-Universität Linz im Rahmen der Promotion an der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Mein Dank gilt meinen Kollegen an der BAM und dem CTO die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Steffen M. Weidner dessen Betreuung, Unterstützung und uneingeschränkte Gesprächsbereitschaft wesentlich am Gelingen dieser Arbeit Teil hat. Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Panne danke ich für die konstruktiven Diskussionen und Anregungen. Für die produktive Zusammenarbeit und Unterstützung danke ich meinem zweiten Doktorvater Assoc.-Prof. Dr. Clemens Schwarzinger. Ohne die genannten Personen hätte meine Arbeit nicht die Vielfalt und den thematischen Tiefgang den sie heute hat.

Ich möchte mich auch bei der „Polymeranalytik“ mit den Kollegen Dr. Jana Falkenhagen, Rosemarie Laging, Karin Böttcher, Bianka Manger, Franziska Rudolph und Dr. Michael Menzel, für die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein besonderer Dank gilt meinem Bürokollegen Anke Kabelitz, Carina Sötebier und Hannes Kulla. Für die immer offene Tür möchte ich mich auch bei meiner Fachbereichsleiterin Dr. Franziska Emmerling bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Dietmar Pfeifer für die NMR-Messungen, Dr. Bettina Schwarzinger für die IR-Messungen und Tobias Fischer für die Fluoreszenzmessungen bedanken. Neben fachlichen Ratschlägen ist auch ein Budget für die Forschung notwendig. Ich bedanke mich daher bei der DFG, JKU und der BAM für die Finanzierung dieser Arbeit. Ein Dank gebührt auch den hilfsbereiten Computer-Administratoren Anka Kohl und Carsten Prinz, sowie Sabine Tietz für die Hilfestellung im Bereich der Bürokratie und anderer organisatorischer Belange.

Für die Unterstützung jeglicher Form während meiner Studien- und Promotionszeit muss ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken. Abschließend möchte ich noch meine Freundin und all meine Freunde außerhalb der Arbeitswelt erwähnen, da gute Freundschaften einen wesentlichen Teil der Promotion darstellen.



## Zusammenfassung

Die matrixunterstützte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-MS) hat sich in den letzten Jahren zu einer etablierten Methode zur Charakterisierung von synthetischen Polymeren entwickelt. Neben der Messung von Molmassen und deren Verteilungen bietet diese Technik die Möglichkeit, simultan Monomerstrukturen und Endgruppen eines Polymers zu bestimmen.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil liegt in der einfachen Probenpräparation, die überwiegend durch Auftropfen der Matrix- und Polymerlösung (engl. Dried Droplet Method) erfolgt. Anstelle eines homogenen Probenspots wird nach dem Verdampfen des Lösemittels häufig jedoch die Bildung von Eintrocknungsringen beobachtet. Dies führt zu lokal unterschiedlichen Matrix/Polymer Verhältnissen, was die Qualität und Reproduzierbarkeit der MALDI Methode erheblich beeinträchtigt. Dies ist insbesondere von Interesse, da synthetische Polymere, im Gegensatz zu biologischen Makromolekülen, eine Kettenlängen-Verteilung aufweisen, die ebenfalls Segregationseffekten unterliegen kann. Eine realistische Bestimmung von Molmassen und deren Verteilung ist demzufolge nahezu unmöglich. Auf Grund der weiten Verbreitung der Dried Droplet Methode ist es daher erforderlich, mögliche Ursachen der Segregation aufzuklären und gegebenenfalls alternative Probenpräparationstechniken, basierend auf dieser simplen Tropfenmethode zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde die Trocknung verschiedener Polymer/Matrix Spots bei Verwendung unterschiedlicher Lösemittel untersucht. Da die MALDI Methode auch die Möglichkeit bietet, als bildgebendes Verfahren (MALDI-Imaging Massenspektrometrie) genutzt zu werden, wurde diese Technik primär für die Untersuchung der Segregationseffekte verwendet. In Analogie zum Einsatz in biologischen Systemen, beispielsweise bei der Lokalisierung von Metaboliten oder Wirkstoffen in Gewebeproben, kann mittels MALDI-Imaging MS die laterale Verteilung von Polymeren mit unterschiedlichen Strukturen und Molmassen sowie der Matrix simultan bestimmt werden.

Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Prozessen, wie Kapillarfluss oder Marangoni Strömung, die u.a. für die Ringbildung verantwortlich gemacht wurden, zeigen die Ergebnisse der hier vorgestellten Experimente deutlich, dass die Löslichkeit von Polymer und Matrix im verwendeten Lösemittel von entscheidender Bedeutung ist. Im Verlauf des Verdampfungsprozesses findet eine Aufkonzentrierung der Moleküle im abgesetzten Tropfen statt. Beim Erreichen der Sättigungskonzentration beginnen die Polymermoleküle mit den hohen Molmassen zuerst auszufallen, während die restlichen,

immer noch gelösten Homologen weiterhin den Transportvorgängen unterliegen, die beim Eintrocknen generiert werden. Bei Lösemitteln die langsam verdunsten kann das zur molmassenabhängigen Segregation von Polymerhomologen führen. Verwendet man Lösemittel die schnell verdunsten erfolgt keine Molmassen-Segregation der Polymere, sondern ausschließlich eine Entmischung von Matrix und Polymer. Auf Grund ihrer geringen Molmasse bleibt die Matrix am längsten gelöst und kann demzufolge bis unmittelbar vor dem Eintrocknen an den Tropfenrand transportiert werden. Dies erklärt die Bildung von hauptsächlich aus Matrix bestehenden Ringen bei der üblicherweise verwendeten Konzentration von  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ . Die Experimente haben jedoch auch gezeigt, dass die beobachtete Entmischung bei einer deutlich höheren Konzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  ohne Einschränkungen in der Qualität der Spektren vermieden werden kann. Bei dieser Konzentration wird die Sättigungskonzentration der Matrix bereits vor dem ersten Ausfallen der Polymere erreicht. Dadurch entsteht eine hoch viskose Lösung, welche die folgenden Transportprozesse der Polymermoleküle behindert. Eine Entmischung kann somit nicht mehr erfolgen und man erhält eine chemisch homogene Spotoberfläche.

Eine andere einfache Möglichkeit die Viskosität der Probenspots soweit zu erhöhen, dass keine Segregation erfolgen kann, bietet die Verwendung von Matrices basierend auf ionischen Flüssigkeiten. Neben der einfachen Synthese zeichnen sich diese Verbindungen durch ihre hohe Stabilität und der Vermeidung einer Sublimation im Vakuum aus. Selbst nach 24h im Hochvakuum der MALDI-Quelle konnten reproduzierbare Spektren gemessen werden. Die Intensität der Spektren ist dabei deutlich höher als bei der Verwendung konventioneller Matrices. Dies ermöglicht die Aufnahme von Spektren bei geringerer Bestrahlungsstärke, was wiederum zu weniger Fragmentierungen führt und insbesondere für labile Polymere interessant sein könnte. Die mit der Dried Droplet Methode und ionischen Matrices erzeugten Spots weisen eine überragende Homogenität auf. Diese Matrixklasse stellt somit eine neue und interessante Alternative zur konventionellen Spotpräparation in der MALDI-TOF Massenspektrometrie dar.

## Abstract

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has become an indispensable tool for polymer characterization. This method enables the determination of molar masses and mass distributions, monomer structures and end groups, simultaneously.

Another advantage represents the simple sample spot preparation, which is typically done by spotting sample and matrix solutions on the target surface. After drying, instead of a homogenous area, often a ring is formed. This segregation leads to different matrix/polymer ratios on the spot, which dramatically affects the quality and reproducibility of the spectra. In contrast to biological macromolecules, synthetic polymers consist of different chain length, which also might be affected by segregation. Thus, a realistic determination of the molecular mass and mass distribution is almost impossible. Since the majority of sample spots are prepared by this simple and fast method, possible reasons for segregation have to be determined. Alternatively, droplet based sample preparation procedures, that avoid segregation should be developed. Therefore, the drying of various polymer/matrix spots using different solvent systems was investigated. Since MALDI can also be used as an imaging tool, this special technique was applied to monitor the segregation effects. Similar to its application in biological systems, e.g. to identify the local distribution of metabolites or drugs in tissues, MALDI Imaging MS is able to simultaneously measure the distribution of polymers with different structures and molar masses, as well as the matrix.

In literature the capillary flow and the marangoni flow are considered as the major causes for ring formation. In contrast to that, the results of this thesis show that the solubility of the polymer and the matrix in the used solvent is of major importance. While evaporating, the concentration of the molecules in the droplet increases. When the saturation concentration of the polymer has been reached, molecules with higher molar masses begin to precipitate first. Lower mass polymers that are still dissolved are subjected to transport processes. When a slowly evaporating solvent is used, mass segregation of polymer homologous can occur. Using a fast evaporating solvent, a segregation of polymer homologous cannot be observed. Here, a segregation of polymer and matrix can be found. Due to its comparatively low molecular mass the matrix stays dissolved much longer than the polymer molecules, and could be transported to the rim of the spots. When a typical matrix concentration of  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  is used, the rings mainly consist of matrix. However, the

experiments also showed that higher matrix concentrations ( $100 \text{ mg ml}^{-1}$ ) always resulted in homogeneous sample spots without any loss of the quality of the spectra. At this concentration the saturation concentration of the matrix is reached before polymers start to precipitate. The much higher matrix concentration dramatically increases the viscosity of the matrix solution. Thus, transport processes caused by the solvent evaporation are increasingly hindered and segregation could not be observed.

Another possibility to increase the viscosity of the sample spots to avoid segregation is the use of ionic liquid matrices. Ionic matrices are easy to produce and stable in high vacuum. Even after 24h in the high vacuum of the MALDI source reproducible spectra could be measured. Thus, the laser irradiance can be reduced, which results in less fragmentation. This could be favorable for the investigation of labile polymers. The dried droplet sample spots show a superior homogeneity and spots can be measured several times without visible differences in the mass spectra. Ionic matrices, therefore, represent a new and promising alternative for the conventional sample spot preparation in MALDI mass spectrometry.

# Inhaltsverzeichnis

1	Motivation .....	1
2	Theoretische Grundlagen der MALDI-TOF Massenspektrometrie .....	3
2.1	Historische Entwicklung .....	3
2.2	Der Desorptions-/Ionisationsprozess .....	7
2.2.1	Rolle der Matrix .....	7
2.2.2	Einfluss des Salzes .....	9
2.2.3	Die Desorption/Ionisation .....	10
2.2.3.1	Der Desorptionsprozess .....	10
2.2.3.2	Die Ionisation .....	12
2.2.3.2.1	Energy-Pooling Modell.....	12
2.2.3.2.2	Lucky Survivor Modell.....	15
2.3	Massenanalysatoren .....	18
2.3.1	Flugzeit (TOF) Massenanalysator .....	18
2.3.2	Quadrupol-Flugzeit-Analysatoren (Q-TOF) .....	21
2.3.3	Ionenfallen (Ion Trap).....	22
2.4	Detektoren .....	25
2.4.1	Mikrokanalplatten-Detektor (MCP) .....	25
2.4.2	Ionen Konvertierungsdynodendetektor (ICD) .....	26
2.4.3	Kryodetektor – Supraleitender Tunnelübergangsdetektor (STJ) .....	27
2.5	Probenpräparation .....	28
2.5.1	Lösemittelbasierende Probenpräparationen .....	29
2.5.1.1	Manuelle Präparation.....	29
2.5.1.2	Automatisches Spotting .....	29
2.5.2	Lösemittelfreie Probenpräparation .....	33
2.5.2.1	Elektrospray .....	33
2.5.2.2	Pulverpräparation.....	34
2.5.3	Ionische Flüssigkeiten .....	35
2.5.4	Andere Präparationstechniken .....	36
2.6	Fragmentierungstechniken.....	37
2.7	MALDI-Imaging MS.....	39
3	Experimentelles .....	41
3.1	Verwendete Chemikalien .....	41
3.2	Verwendete Geräte .....	42

3.2.1	MALDI-TOF-MS .....	42
3.2.2	FTIR Mikroskop .....	42
3.2.3	NMR .....	43
3.2.4	Kontaktwinkelmessgerät .....	43
3.2.5	Fluoreszenzspektrometer .....	43
3.3	Probenvorbereitung .....	44
3.3.1	Dried Droplet Probenpräparation .....	44
3.3.2	Sandwich Probenpräparation .....	45
3.3.3	Elektrospray Probenpräparation .....	45
3.3.4	Probenpräparation mit ionischen Flüssigkeiten .....	46
3.3.4.1	DHB-IM .....	46
3.3.4.2	SA-IM .....	47
3.3.4.3	DCTB-IM .....	48
4	Ergebnisse und Diskussion .....	51
4.1	Einfluss des Lösemittels auf die Segregation .....	51
4.2	Einfluss der Polymere auf die Segregation .....	64
4.2.1	Konstitution der Polymere .....	65
4.2.1.1	Homopolymere .....	65
4.2.1.2	Copolymere .....	67
4.2.2	Polymerblends .....	72
4.2.3	Einfluss der Molmasse der Polymere .....	75
4.3	Einfluss der Matrix auf die Segregation .....	82
4.3.1	Verteilung der Matrix .....	82
4.3.2	Matrixkonzentration .....	84
4.3.3	Ionische Matrices .....	94
4.3.3.1	Allgemeines .....	94
4.3.3.2	Ionische DHB Matrix .....	95
4.3.3.3	Ionische SA Matrix .....	97
4.3.3.4	Ionische DCTB Matrix .....	99
5	Resümee .....	103
6	Verzeichnisse .....	107
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	107
6.2	Publikationsverzeichnis des Autors .....	111
6.3	Literaturverzeichnis .....	114



# 1 Motivation

Neben etablierten Methoden, wie der Gelpermeationschromatographie (GPC), der Viskosimetrie und der Lichtstreuung hat sich die Matrixunterstützte Laser-desorptions-ionizations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) zu einem wichtigen Werkzeug für die Charakterisierung von synthetischen Polymeren entwickelt. Ein Vorteil dieser Methode besteht u. a. darin, dass neben der Absolutbestimmung von Molmassen und deren Verteilung simultan Monomerstrukturen und Endgruppen bestimmt werden können. Darüber hinaus können durch eine einfache Fragmentierungsanalytik zusätzliche Informationen über die Anordnung von Monomereinheiten in Copolymeren gewonnen werden. Wie jede andere Methode weist allerdings auch die MALDI-TOF MS einige Einschränkungen auf. An erster Stelle ist dabei die Beschränkung auf Polymere, mit sehr enger Molekulargewichtsverteilung zu nennen. Diese Limitierung kann durch vorhergehende chromatographische Fraktionierung z. T. überwunden werden.

In den letzten Jahren zeigte sich jedoch auch, dass ein überragender Vorteil der MALDI Methode – die einfache Probenpräparation – gleichzeitig Quelle gravierender Fehler sein kann. Auf Grund ihrer Einfachheit wird die Dried Droplet Probenpräparation am häufigsten verwendet. Dabei werden der Analyt und die Matrix gelöst und, meist vorgemischt als Tropfen, auf das Probenziel aufgebracht. Die nach dem Verdampfen des Lösemittels zu beobachtenden Inhomogenitäten (z. B. Bildung von Eintrocknungsringen) sollten durch eine Mittelung von Messungen, die an verschiedenen Stellen des Spots erhalten wurden, vermeintlich korrigiert werden. In der analytischen Praxis wird jedoch häufig gezielt nach sogenannten „sweet spots“, d. h. Regionen in denen besonders intensive Signale gefunden werden, gesucht. Dabei zeigte sich, dass die an diesen Stellen gemessenen Molmassenmittelwerte und -verteilungen häufig große Abweichungen von den an anderen Stellen des Spots ermittelten Werten aufweisen. Diese Ergebnisse lassen auf Separationseffekte beim Eintrocknen des Probenspots und damit auf lateral unterschiedliche Matrix-Analyt Verhältnisse schließen. Darüber hinaus besteht bei synthetischen Polymeren, auf Grund der Polydispersität, zusätzlich die Möglichkeit einer Massenseparation.

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung und Aufklärung der Ursachen und Mechanismen, die zu einer Entmischung in Probenlösungen nach Auftragung auf den MALDI Probenträger (Target) beitragen. Besonderes Interesse gilt dabei wichtigen physikalisch chemischen Parametern (z. B. Konzentration, Temperatur, Viskosität), die bei der Verdampfung des

## *1 Motivation*

Lösemitteln eine Rolle spielen. Als erstes werden daher Polymer-Matrixsysteme mit unterschiedlichen Lösemitteln und bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Da die MALDI Technik auch die Möglichkeit zur bildgebenden Analytik (Imaging) bietet, wurde ein besonderer Fokus auf die Anwendung dieser Methode zur Detektion lateraler Entmischungseffekte im ProbenSpot gelegt. Darüber hinaus sind der Einfluss der Polymerstruktur und der Matrix von großem Interesse. Um mögliche Wechselwirkungen der beiden Substanzen in Lösung zu verhindern, wird nur die zu untersuchende Komponente auf den Probenträger pipettiert und die jeweils andere Komponente mittels Elektrospray aufgetragen. Bei Verwendung von Homopolymeren kann der Einfluss der Konstitution und Molmasse analysiert werden. Messungen von Copolymeren mit unterschiedlicher Zusammensetzung und von Blends sollen weiteren Aufschluss über mögliche strukturelle Segregationen geben. Die erhaltenen Ergebnisse sollen dazu beitragen, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit einer wichtigen polymeranalytischen Technik zu erhöhen.

## 2 Theoretische Grundlagen der MALDI-TOF Massenspektrometrie

### 2.1 Historische Entwicklung

Auf Grund der hohen und unspezifischen Energieübertragung sind klassische massenspektrometrische Techniken, wie die Elektronenstoß Ionisation (EI) und die Chemische Ionisation (CI) nur für die Analyse niedermolekularer, leicht verdampfbarer Moleküle geeignet. Umgangssprachlich gehören diese Methoden zu den „harten“ Ionisationsmethoden, bei denen Moleküle meist fragmentieren. [1] Die in diesen Fällen beabsichtigten Fragmentierungen erfolgen zumeist nach bestimmten Regeln und gestatten somit eine Strukturaufklärung. Die Fortschritte, die in den 1970er Jahren auf dem Gebiet der Biochemie zu verzeichnen waren, machten es jedoch notwendig, die Molmassen und Strukturen auch sehr großer Biomoleküle (Proteine, Peptide, Glykane etc.) bestimmen zu können. Das erforderte jedoch die Entwicklung neuer massen-spektrometrischer Verfahren.

Eine der ersten Techniken, die dafür verwendet wurde, war die in den 1960er Jahren entwickelte Feld-Desorption (FD)-Massenspektrometrie. [2, 3] Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass ein Emitter (meist ein Draht) mit einer Analytlösung benetzt wird. Die an diesem Emitter anhaftenden Moleküle werden thermisch, durch das Anlegen eines Stroms, desorbiert und meist durch die Anlagerung von Alkalimetallionen ionisiert. Damit war es erstmals möglich ein nahezu fragmentfreies Spektrum von oligomeren Zuckern zu erhalten. Die Feld-Desorption zählt somit bereits zu den ersten „weichen“ Ionisationsmethoden. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die Beschränkung auf Verbindungen mit niedrigem Dampfdruck. Ungeachtet dessen wird sie immer noch in der Analyse von unpolaren Kohlenwasserstoffen verwendet, die nicht oder nur sehr schwer mit anderen MS Methoden ionisiert werden können. [4] Kurze Zeit später wurde die Sekundär Ionen Massenspektrometrie (SIMS) durch Benninghoven vorgestellt. [5] Dabei werden die auf einer leitfähigen Oberfläche positionierten Proben mit Ionen (z. B. Argon) beschossen und die desorbierten Sekundär-Ionen detektiert. Diese Technik kann zu Identifikation und Strukturaufklärung von organischen Molekülen wie z.B. Aminosäuren und Peptiden verwendet werden und ist auch für nicht-flüchtige und thermisch instabile Moleküle geeignet. Ein Nachteil der SIMS ist der relativ hohe Fragmentierungsgrad.

Durch die Zugabe einer „Matrix“ (z. B. Glycerin) und Verwendung neutraler Atome (Xe, Ar) konnte eine deutlich „weichere“ Ionisierung erzielt werden, was die weite Verbreitung der Fast-Atom-Bombardment (FAB) bezeichneten Technik bis in die 1980er Jahre erklärt.

[6, 7] Der Massenbereich, in dem keine oder nur geringe Fragmentierungen erfolgt, blieb jedoch auf unter 1500 Da limitiert. Weitere Nachteile sind die geringe Empfindlichkeit und die schlechte Ionenausbeute.

Mit Hilfe der  $^{252}\text{Cf}$  Plasma Desorption konnten erstmals Biomoleküle (z. B. Tetrodotoxin – Gift des Kugelfisches, Human-Insulin, Cytochrom-C) mit Massen von bis zu 25000 Da gemessen werden. [8-10] Das Prinzip der Ionisation des Analyten beruht dabei auf den Beschuss mit ionischen oder neutralen Zerfallsprodukten von Isotopen (in diesem Fall von  $^{252}\text{Californium}$ ). Eine Messung großer Biomoleküle ist jedoch auch mit dieser Technik nicht möglich.

Erste Untersuchungen zur laser-basierenden Ionisation wurden schon unmittelbar nach der Erfindung des Lasers in den 1960er Jahren veröffentlicht. [11-13] Daraus wurde später die Laser-Desorptions (LD)-Massenspektrometrie entwickelt, welche die energiereiche Strahlung eines Lasers für die Desorption und Ionisation nicht flüchtiger Verbindungen verwendet. [14] Allerdings wird, aufgrund des hohen Energieeintrags, auch bei dieser Methode meist eine starke Fragmentierung beobachtet. Eine Variante dieser Technik stellt der von Hillenkamp *et al.* entwickelte Laser-Microprobe-Mass-Analyzer (LAMMA) dar, der auf Grund des geringen Laserspotdurchmessers ( $<1\ \mu\text{m}$ ) nur eine geringe Probenmenge benötigt. [15] Mit diesem wurden erste Versuche zur Analyse von Aminosäuren durchgeführt. Im Jahr 1985 wurde in der Gruppe um Karas eine Mischung von Tryptophan und Alanin untersucht. [16] Obwohl die in dem Versuch verwendete, relativ geringe Bestrahlungsstärke nur zur Ionisation des Tryptophans hätte ausreichen sollen, konnten Signale beider Moleküle detektiert werden. Damit lag die Vermutung nahe, dass Alanin in einem sekundären Ionisierungsschritt durch Tryptophan ionisiert wurde. [16] Dies war eine der Geburtsstunden der Matrixunterstützten Laserdesorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-MS), weil damit demonstriert werden konnte, dass ein kleines Molekül in der Gasphase Energie auf ein anderes Molekül übertragen kann, ohne dieses zu fragmentieren. Es zeigte sich sehr schnell, dass niedermolekulare, organische Verbindungen mit schwacher Azidität und der Fähigkeit, Licht im Bereich der Laserwellenlänge zu absorbieren, besonders geeignet waren. [17] Eine der ersten in Folge als „Matrix“ bezeichneten Verbindungen stellte die Nikotinsäure dar. Mit dieser gelang es, Spektren von vier unterschiedlichen Proteinen (Lysozyme,  $\beta$ -Lactoglobulin, Porcine Trypsin und Albumin) mit Molmassen zwischen 14000 und 67000  $\text{g mol}^{-1}$  aufzunehmen. [18]

Parallel zu MALDI wurde von Tanaka eine andere Methode entwickelt, mit der ebenfalls die Analyse großer Moleküle möglich war, die Soft-Laser-Desorption (SLD). Im Gegensatz zu den von Karas verwendeten kleinen organischen Matrices wurde eine

Dispersion von Cobalt Nanopulver in Glycerin als Matrix verwendet. [19]. Mit dieser Präparationstechnik konnten erste Massenspektren u. a. von Cytochrome-C ( $12384 \text{ g mol}^{-1}$ ), Bovine Trypsin ( $24000 \text{ g mol}^{-1}$ ) und Carboxypeptidase-A ( $34472 \text{ g mol}^{-1}$ ) aufgenommen werden.

In der darauffolgenden Zeit erwies sich jedoch die Verwendung organischer Matrices gegenüber den Metallnanopulvern als deutlich überlegen. So konnte man bereits nach kurzer Zeit mittels MALDI Proteine mit Massen über 100 kDa (Abbildung 1) detektieren. [20] Die wesentlichen Vorteile dieser Methode – u. a. eine einfache Probenpräparation bei Verwendung geringster Probemengen gepaart mit der Bildung einfach geladener Ionen, trugen zu deren schnellen Verbreitung bei. [21] Die Chemie Nobelpreis Verleihung im Jahre 2002 an Koichi Tanaka (Shimadzu, Japan) *"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"* wurde deshalb kontrovers bewertet, wohingegen die Ehrungen der beiden anderen Preisträger (John B. Fenn – Electrospray-Ionisation und Kurt Wüthrich - BIO-NMR) auf ungeteilte Zustimmung stieß. [22]

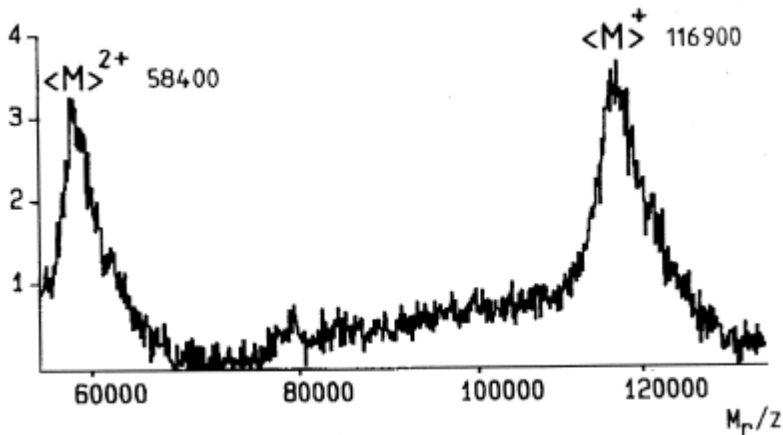


Abbildung 1: MALDI Massenspektrum eines  $\beta$ -D-Galactosidase Derivates unter Verwendung von Nikotinsäure als Matrix. [20]

Erste Applikationen zur Untersuchung von synthetischen Makromolekülen wurden schon kurz nach der Einführung dieser neuen Technik in die Laborpraxis vorgestellt. Eines der ersten Beispiele war die Analyse von Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polystyrol (PS) mit Molmassen bis zu  $70000 \text{ g mol}^{-1}$  zu Beginn der 1990er Jahre. [23] Im Gegensatz zu biologischen Polymeren weisen synthetische Polymere jedoch eine Eigenschaft auf, die

ihre Untersuchung mittels MALDI erschwert – deren Polydispersität. Dabei zeigte sich, dass nur für Polymere mit sehr geringen Polydispersitäten ( $PD < 1,2$ ) sinnvolle Massenspektren erhalten werden können. Breite Molmassenverteilungen führen zur Sättigung des Detektors und damit zur Diskriminierung höherer Molmassen. [24-27] Die aufgenommenen Spektren weisen sehr hohe Intensitäten bei kleinen Molmassen auf, die jedoch sehr schnell exponentiell abfallen. Ungeachtet dieser Nachteile wird die MALDI-Massenspektrometrie routinemäßig zur Charakterisierung von Homo- und Copolymeren angewandt. [28-41] Der überragende Vorteil dieser massenspektrometrischen Methode besteht darin, simultan Informationen über Endgruppen, Monomereinheiten, Kettenstrukturen (z. B. zyklische oder lineare) und, bei einer Polydispersität  $< 1,2$ , auch zur Molmasse zur liefern. Darüber hinaus ist MALDI, im Gegensatz zur Gelpermeationschromatographie (GPC), eine Absolutmethode zur Molmassenbestimmung und benötigt keine strukturspezifischen Standards zur Kalibration. Es zeigte sich jedoch, dass selbst bei Polymeren mit enger Molekulargewichtsverteilung die ermittelten Molmassen von den mit anderen Methoden berechneten abweichen können. [42-44]. Ein wesentlicher Grund dafür beruht auf der detektorspezifischen Diskriminierung höherer Massen (siehe 2.4.1).

Das Haupteinsatzgebiet der MALDI Massenspektrometrie liegt derzeit auf dem Gebiet der Synthesekontrolle. Neue kontrolliert radikalische Polymerisationstechniken (CRP), wie die Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP), die Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) oder Nitroxide-mediated Polymerization (NMP) sind in der Lage, genau definierte Polymerstrukturen (Topologie und Endgruppen) zu erzeugen. [45-49] So ist man mittels MALDI in der Lage, reaktive Zwischenprodukte (bspw. bei der RAFT Polymerisation) zu detektieren und damit wesentliche Aussagen zum Verlauf der Polymerisation zu geben. [41, 50]

MALDI wird ebenfalls zur Untersuchung des Polymerabbaus, hervorgerufen durch UV-Strahlung, Radikale oder thermisch initiiert, eingesetzt. [51-53] Um den Abbau von Polymeren zu verhindern/verzögern werden Additive (z. B. UV-Stabilisator) zugegeben, die neben den eigentlichen Polymeren, ebenfalls mit MALDI detektiert werden können. [54-57] Detaillierte Beispiele zur Anwendung von MALDI auf dem Gebiet der synthetischen Polymere können insbesondere folgenden Reviews entnommen werden. [58-60]

## 2.2 Der Desorptions-/Ionisationsprozess

Die Prozesse der Desorption und der sich anschließenden Ionisation kann man als kooperativ bezeichnen. Beide erfolgen innerhalb weniger Nanosekunden und können daher nicht voneinander getrennt betrachtet werden.

Die Emission von Molekülen aus einer festen Probe wird als Desorption bezeichnet. Im Falle von MALDI erfolgt die thermische Desorption durch Photonen. Streng genommen handelt es sich um eine thermische Ablation, da neben einzelnen Molekülen auch Cluster (Matrix bzw. Matrix/Analyt - Cluster) emittiert werden. Der eigentliche Prozess der Ionisation ist bis jetzt noch nicht komplett verstanden. Derzeit werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Diese werden als das „Energy-Pooling“ bzw. das „Lucky Survivor“ Modell bezeichnet [61, 62]. Diese Theorien wurden erst kürzlich in einem Modell vereinigt. [63]

Beide Prozesse finden in einer sogenannten Quelle meist in einem Vakuum von  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  mBar statt. Darüber hinaus gibt es aber die Möglichkeit bei etwas höheren Drucken ( $10^{-3}$ - $10^{-5}$  mbar) und bei Atmosphärendruck (AP-MALDI) zu arbeiten. Die überwiegende Zahl der MALDI Instrumente, die mit einem Flugzeit (TOF) Analysator (siehe 2.3.1) gekoppelt sind, arbeiten unter Hochvakuum, während MALDI-quadrupol-TOF Instrumente (siehe 2.3.2) bei geringerem Vakuum arbeiten. AP-MALDI wird meist in Kombination mit einer Orbitrap (siehe 2.3.3), aber auch bei der Kopplung mit der Flüssigchromatographie (LC) mit einem TOF Instrument anwendet. [64, 65] Eine zentrale Rolle im MALDI-Prozess kommt der Matrix zu. Diese ermöglichte überhaupt erst die sanfte Ionisation und eröffnete den großen Massenbereich. Daher soll diese im Folgenden detaillierter betrachtet werden. Dem schließt sich eine ausführlichere Diskussion der Desorption/Ionisierung an.

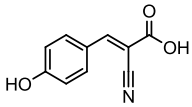
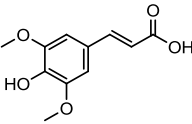
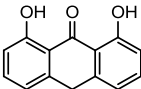
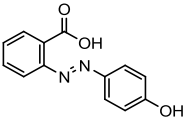
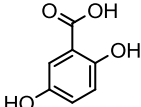
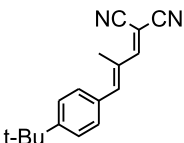
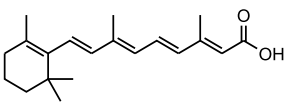
### 2.2.1 Rolle der Matrix

Eine geeignete Matrix sollte neben der Fähigkeit, zur Absorption der Bestrahlungsstärke auch einen niedrigen Dampfdruck aufweisen. Ziel ist es, die Desorption von Matrix und eingebetteten Analyten in möglichst kurzer Zeit zu erzielen (3-5 ns). Weitere Aufgaben der Matrix bestehen darin, die Aggregatbildung der Analytmoleküle zu verhindern und einen „sanften“ Phasenübergang + Ionisierung des Analyten zu gewährleisten. Daher handelt es sich bei den meisten Matrices um niedermolekulare ( $150$ – $300$  g mol<sup>-1</sup>) aromatische

## 2 Theoretische Grundlagen der MALDI-TOF-MS

Moleküle – typischerweise Isomere der Benzoe- und Zimtsäure. [66] Eine Auswahl häufig verwendeter Matrices ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht gängiger Matrices, deren Struktur und Abkürzung

Name	Abkürzung	Struktur
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure	CHCA	
Sinapinsäure	SA	
1,8,9-Trihydroxyanthracen	Dithranol	
2'-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure	HABA	
2,5-Dihydroxybenzoesäure	DHB	
<i>trans</i> -2-[3-(4- <i>tert</i> -Butylphenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril	DCTB	
<i>all-trans</i> -Retinsäure	RA	

Für eine optimale Desorption/Ionisation ist die Eingliederung des Analyten in das Matrixkristallgitter oder die Adsorption des Analyten an der Matrixoberfläche essentiell. [67, 68] Durch den Vergleich zweier Probenpräparationsmethoden konnte gezeigt werden, dass



die Kristallinität und Bestrahlungsstärke korrelieren. [69] Je niedriger die Kristallinität ist, desto geringer ist auch die notwendige Bestrahlungsstärke. In diversen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass eine geringere Bestrahlungsstärke zu einer weicheren Ionisierung führt und damit die Gefahr einer Fragmentierung verringert. [68, 70, 71] Um die Anzahl amorpher Kristallstrukturen zu erhöhen, muss das Oberflächen/Volumen Verhältnis erhöht werden. Fehler in der Kristallstruktur können dabei durch die Einlagerung von mit Analyt gesättigtem Restlösemittel in Form von Mikroeinschlüssen oder durch Änderungen in der Kristalloberfläche auftreten. Beispielsweise sind bei der Einbindung von Cytochrom C in 2,5-DHB neben „perfekten“ Kristalloberflächen auch Stufen in der Oberfläche beobachtbar. [69, 72] Die Einlagerung von Lösemittel konnte mit  $^1\text{H-NMR}$  und Karl-Fischer-Titration, die Änderung der Kristalloberfläche mittels optischer Mikroskopie nachgewiesen werden. [73, 74] Die defekte Kristallstruktur führt zu einer Minimierung der Gitterenergie, wodurch die Freisetzung der Moleküle aus dem Gitterverband in die Gasphase begünstigt wird. Die in der Literatur beschriebene Korrelation der Kristallinität mit der Bestrahlungsstärke widerspricht somit der bis dahin vermuteten These, dass eine Aufnahme des Analyten in den Matrixkristall Voraussetzung für die Ionisierung ist. [67, 69] Ein weiteres Indiz dafür stellt die Matrix 2,6-Dihydroxybenzoesäure dar. Obwohl der Anteil der Einlagerung von Cytochrom C bei diesem Isomer der Dihydroxybenzoesäure sehr gering ist, konnte trotzdem ein Spektrum aufgenommen werden.

### 2.2.2 Einfluss des Salzes

Im Gegensatz zu Biopolymeren, die auf Grund ihrer hohen Protonenaffinität und ihres (meist) sauren Charakters (z. B. Aminosäuren) hauptsächlich protoniert detektiert werden, erfolgt die Adduktbildung bei synthetischen Polymeren überwiegend mit Kationen. Typischerweise sind es Alkalimetalle, da Elemente der ersten Hauptgruppe das geringste Ionisierungspotential aufweisen. Diese stammen meist von den verwendeten (Glas) Vials oder von Verunreinigungen in den Chemikalien, können aber auch gezielt zugegeben werden. So kann die Zugabe eines Salzes das Signal/Rausch-Verhältnis erhöhen, indem die Signale, die durch Anlagerung anderer Kationen gebildet werden, unterdrückt werden. Die Polarität des Analyten stellt dabei ein wichtiges Kriterium für die Auswahl des Kationisierungsreagenzes dar. Laut Llenes und O'Malley ist die Lewis Säure-Base Theorie eine geeignete Auswahlhilfe. [75] Diese besagt, dass stabile Säure-Base Paare durch Kombination von harten Säuren mit harten Basen und vice versa geformt werden. Die meisten neutralen Polymere können als Base, welche ein Elektron mit einem Kation oder einer Säure teilen, angesehen werden. Schwache Basen wie zum Beispiel Polystyrol

werden leicht polarisiert und agieren als Elektronendonoren. Für die Ionisierung wird somit eine schwache Säure, die ebenfalls leicht zu polarisieren ist und freie Valenzelektronen aufnehmen kann, benötigt. Im Gegensatz dazu benötigen starke Basen wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG) für die Ionisierung eine starke Säure, die eine große positive Ladungsdichte und keine nicht-bindenden Elektronen in ihrer Valenzhülle aufweist. Dazu eignen sich Alkalimetalle insbesondere  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ . Dies hat zur Folge, dass Polymere mit elektronegativen Elementen wie Sauerstoff und Stickstoff (z. B. PEG, PMMA, PA) am besten mit  $\text{Li}^+$  oder  $\text{Na}^+$  ionisiert werden, während unpolare Polymere mit  $\pi$ -Elektronen (z. B. PS, PB) hingegen besser polarisierbare Kationen wie  $\text{Ag}^+$  oder  $\text{Cu}^+$  präferieren.

So ist es möglich, dass im Ionisationsprozess ein Polymer mit unterschiedlichen Endgruppen auch unterschiedliche Kationenaddukte generiert, was wiederum zu unterschiedlichen Signalintensitäten führen kann. [28]

### 2.2.3 Die Desorption/Ionisation

#### 2.2.3.1 Der Desorptionsprozess

Der Eintrag thermischer Energie durch die Laserphotonen bewirkt die Ausbildung der sogenannten MALDI-Wolke (Plume), welche mit fortschreitender Zeitdauer expandiert. Diese besteht zum Großteil aus ungeladenen Analyt-, Matrix- und Aggregatmolekülen, sowie aus einer Minderheit ( $10^{-4}$ - $10^{-3}$ ) geladener Teilchen. [76, 77] Neben Protonen und Kationen (z. B.  $\text{Na}^+$ ) konnten darüber hinaus auch Elektronen nachgewiesen werden. Nach Abschluss der Desorption herrscht, in Abhängigkeit von der gewählten Matrix und dem verwendeten Laser (Wellenlänge, Pulsdauer und Energie) eine hohe Teilchendichte und eine Temperatur von ca. 1000 K vor. [78-80] Die Geschwindigkeit der Matrixionen bewegt sich dabei zwischen 200 m/s und 1000 m/s und liegt somit im selben Bereich wie die der ungeladenen Teilchen (600–800 m/s). [80-82] Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Richtungen führen zu zahlreichen Stößen, welche für die sekundäre Ionisation der Analytmoleküle verantwortlich gemacht werden.

Neben UV Lasern kommen auch IR Laser (z. B. Er/YAG  $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$  und  $\text{CO}_2$  Laser  $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$ ) zum Einsatz. Dabei erfolgt eine Anregung von  $-\text{NH}$  und  $-\text{OH}$  Schwingungen der Matrix im Bereich von  $3 \mu\text{m}$  und eine Anregung von  $-\text{OH}$  und  $-\text{CH}$  Schwingungen im Bereich von  $10 \mu\text{m}$ . IR Spektren diverser Matrixmoleküle zeigten eine starke Absorption im Bereich zwischen  $3000$  und  $3500 \text{ cm}^{-1}$ , was den  $-\text{OH}$  und  $-\text{NH}$  Streckschwingung

zugeordnet werden kann. Mögliche Matrices sind neben den klassischen Substanzen wie Sinapinsäure auch Glycerin und Wasser. [83] Da biologisches Gewebe normalerweise Wasser enthält, ist somit eine Messung auch ohne zusätzliche Matrixzugabe möglich. Neben der Ionisierung durch Anregung von Schwingungen und/oder Spallationsprozesse wird ein, dem UV-MALDI ähnlichem Mechanismus vermutet. [84, 85] Spallationsprozesse basieren auf einer schnellen Aufheizung durch den Laser und der dadurch entstehenden Druckwelle, die sich in der Probe ausbreitet. Beim Auftreffen auf die Targetoberfläche entsteht dadurch eine Reflexions-Welle, welche die Probe aufbrechen und Material freigeben kann. Es entstehen große, kalte Cluster, welche nicht genug Energie für eine komplette Verdampfung besitzen. Ein Vorteil der IR-MALDI ist die weichere Ionisierung und somit die Ausbildung von weniger metastabilen Ionenfragmenten. Dies führte dazu, dass bereits Ende der 1990er Jahre intakte Proteine mit Molmassen über 500 kDa gemessen werden konnten. [84, 85] Die Nachteile des IR Lasers liegen, im Vergleich zu einem UV-Laser, in der längeren Pulsdauer (>100 ns) und in der größeren Eindringtiefe in die Probe. [84] Dies hat zur Folge, dass deutlich mehr Material (Matrix, Analyt) pro Puls desorbiert wird. Für die Akkumulation der Spektren ist daher ein häufigerer Positionswechsel nötig, was die Reproduzierbarkeit beeinträchtigt.

Die meisten kommerziell erhältlichen Geräte sind jedoch mit einem UV-Laser ausgestattet. Während anfangs typischerweise  $N_2$  Laser ( $\lambda = 337$  nm) mit Pulsfrequenzen von maximal 20 Hz genutzt wurden, finden zunehmend frequenzverdreifachte Nd:YAG Laser ( $\lambda = 355$  nm) Verwendung. Mit diesen kann eine weit höhere Schussfrequenz (bis zu 2 kHz) erzielt werden, die besonders bei zeitaufwendigen bildgebenden (Imaging) Messungen zur Gewährleistung realistischer Messzeiten erforderlich sind.

Der Einfluss der Laserpulsdauer auf die Signalintensitäten wurde an diversen Proteinen (z. B. Insulin) untersucht. [86] Als Laser wurden ein  $N_2$ -Laser (3 ns, 337 nm) und ein Farbstofflaser (560 fs, wahlweise 496 nm oder 248 nm) verwendet. Eine wesentliche Erkenntnis der durchgeführten Experimente war, dass die Dauer der Probenbestrahlung einen eher sekundären Einfluss hat. Einen weit größeren Effekt hat die sogenannte Bestrahlungsstärke, die im Gegensatz zur Laserpulsintensität (Pulsleistung pro Bestrahlungsfläche) das Verhältnis von Pulsenergie pro Bestrahlungsfläche darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass gerade im Zeitfenster von 3-5 ns die höchsten Signalintensitäten erzielt werden. [87]

### 2.2.3.2 Die Ionisation

Das entscheidende Problem in der ursprünglich angenommenen Theorie der Ionisation im MALDI Prozess stellt die primäre Ionisation dar. Während die Energie des emittierten Photons eines N<sub>2</sub>-Lasers ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) etwa 3,7 eV beträgt, benötigen die klassischen Matrixsubstanzen ca. 8 eV um ionisiert zu werden. Die dafür notwendige Absorption mehrerer Photonen stellt jedoch bei Pulsdauern im ns-Bereich einen unwahrscheinlichen Prozess dar. Ein weiteres Indiz dafür ist, dass auch bei der Verwendung von Femtosekunden-Lasern keine Änderung im Ionisationsverhalten feststellbar war. [86-88] Daher wurden Modelle entwickelt, von denen die zwei bekanntesten Vertreter nachfolgend detaillierter beschrieben werden. Hierbei handelt es sich zum einen um das „Energy-Pooling“ Modell, welches von einem Energieaustausch angeregter Matrixmoleküle ausgeht, sowie dem „Lucky Survivor“ Modell, das auf der Annahme bereits vorliegender Ionen basiert.

#### 2.2.3.2.1 Energy-Pooling Modell

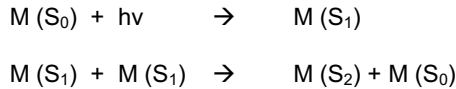
Die Idee der Ionisierung durch Übertragung von angeregten Zuständen stammt ursprünglich von Ehring und wurde von Knochenmuss erweitert. [89-91] Das Grundmodell unterscheidet dabei zwischen primärer und sekundärer Ionisation. Während die erste Ionisation (der Matrix) nur wenige ns nach der Absorption des Laserpulses stattfindet, werden in der MALDI Wolke im Zuge der zweiten Ionisation die Analytmoleküle protoniert.

#### I Primäre Ionisation

Die Differenz zwischen der Energie, die die Matrix durch Aufnahme eines Photons ( $\sim 3,7 \text{ eV}$ ) aufnehmen kann und der für die eigentliche Ionisierung notwendigen Energie von ca. 8 eV, wird durch Übertragung der Anregungsenergie ausgeglichen. Abbildung 2 (A) zeigt die einzelnen Anregungszustände bis zum Ion. Durch Absorption eines Photons wechselt das Matrixmolekül von seinem Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Zustand  $S_1$ . Treffen nun zwei einfach angeregte Matrixmoleküle aufeinander, überträgt ein Molekül seine Anregungsenergie auf das Andere. Dies hat zur Folge, dass ein zweifachangeregtes Matrixmolekül  $S_2$  und ein Matrixmolekül im Grundzustand  $S_0$  entstehen (B). Sind angeregte Moleküle nicht unmittelbar benachbart (im Kristallverbund), kann durch sogenanntes „Hopping“ eine Anregung durch den Kristallverbund „wandern“ (C). Dabei überträgt ein angeregtes Matrixmolekül seine Anregungsenergie auf ein benachbartes Matrixmolekül im

Grundzustand. Für die Ionisierung ist ein Pool von angeregten Matrixmolekülen notwendig. Durch eine weitere Übertragung der Anregungsenergie auf ein zweifach angeregtes Matrixmolekül entsteht daraus ein Matrix-Ion (D).

Energy-Pooling Modell - Anregungsübertragung:



M.....Matrix

S<sub>0</sub>.....Grundzustand

S<sub>1</sub>.....einfach angeregter Zustand

S<sub>2</sub>.....zweifach angeregter Zustand

hv.....Energie Photon

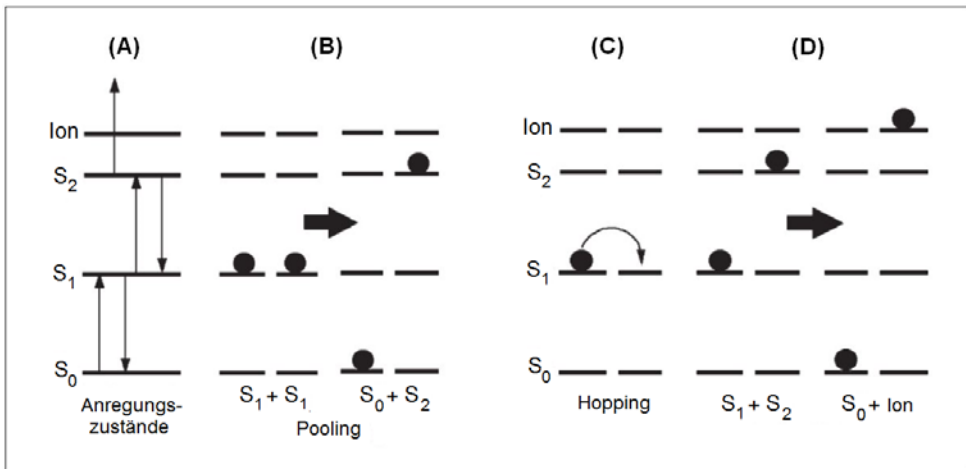


Abbildung 2: Pooling Modell: (A) zeigt die Anregungszustände des Matrixmoleküls – S<sub>0</sub> Grundzustand, S<sub>1</sub> einfach angeregter Zustand, S<sub>2</sub> zweifach angeregter Zustand; (B) die Übertragung der Anregungsenergie – Poolingprozess; (C) das Hopping – Übertragung der Anregungsenergie auf ein benachbartes Molekül; und (D) die Ionisation der Matrix. [61]

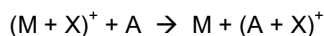
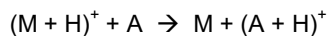
Da sich die MALDI Wolke rasch ausdehnt, ist die primäre Ionisation durch Pooling nur innerhalb der ersten ns nach Absorption des Laserpulses möglich. Durch die Ausdehnung

der Wolke vergrößert sich der Abstand zweier Moleküle soweit, dass eine Übertragung der Anregungsenergie nicht mehr möglich ist. Beweise für das Energy-Polling Modell wurden von Knochenmuss (Beschreibung der Transferreaktionskinetik mit der Arrhenius Gleichung) [90], Setz (Energietransport mit Fluoreszenzmessungen) [92], Lüdemann (Photonenabsorption mit Laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie) [93] sowie Ehring und Sundquist (Messung der Differenz zwischen der absorbierten und emittierten Photonenenergie) [94, 95] geliefert.

### II Sekundäre Ionisation

Die Protonierung bzw. Kationenadduktbildung des Analyten durch die ionisierte Matrix erfolgt in einer sekundären Ionisation. Der dazu notwendige Ladungstransfer findet ausschließlich in der MALDI Wolke statt. [96] Dabei stammen die Protonen ( $H^+$ ) üblicherweise von der Matrix, welche meist eine organische Säure ist. Die Kationen ( $X^+$ ) hingegen sind meist auf Grund von Verunreinigungen bei der Matrixherstellung bzw. durch geringfügige Spuren von Natrium und Kalium aus den verwendeten Glasgefäßen enthalten, können aber, wie in 2.2.2 beschrieben, auch gezielt zugegeben werden. [97] Ein Protonentransfer stellt, in Abhängigkeit der Protonenaffinität des Analyten, eine exotherme Reaktion dar und wird durch Stöße induziert. Üblicherweise besitzen neutrale Aminosäuren und Peptide eine Protonenaffinität  $>900$  kJ/Mol [98-100] und übertreffen damit die Protonenaffinität gängiger Matrices ( $\sim 850$  kJ/Mol). [101-104] Laut Stevenson *et al.* ist die Intensität linear abhängig von der Protonenaffinitätsdifferenz zwischen Matrix und Analyt. [96]

Sekundäre Ionisation:



M.....Matrix

$H^+$ .....Proton

A.....Analyt

$X^+$ ...Kation (z. B.  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ag^+$ )

Bei Verwendung von IR Lasern allerdings versagt das Pooling Modell. Die Energie des Photons beträgt in diesem Wellenlängenbereich etwa 0,4 eV und schließt somit eine Photoionisation aus. Wie von verschiedenen Autoren gezeigt wurde, kann man jedoch unabhängig vom verwendeten Laser ähnliche MALDI Spektren erhalten. [85, 105, 106] Die zur Ionisation notwendige Energie kann durch andere Prozesse, wie bspw. Spallation generiert werden.

### 2.2.3.2.2 Lucky Survivor Modell

Da das „Energy-Pooling“ Modell u. a. Defizite bei der Beschreibung der Ionisationsprozesse durch einen IR-Laser aufwies, bestand die Notwendigkeit zur Entwicklung einer alternativen Theorie. Anfang dieses Jahrtausends wurde von Karas *et al.* ein Modell entwickelt, das als „Lucky Survivor“ bzw. Cluster Modell bezeichnet wurde. [62] Die Kernaussage dieses Modells besteht darin, dass die Moleküle (z. B. Proteine) in Lösung Ladungen besitzen, welche nach dem Mischen mit der Matrix nicht vollständig neutralisiert werden. Diese Vermutung wurde unter Verwendung von pH Indikatormolekülen (z. B. Methylorange, Methylrot, Thymolblau) mit unterschiedlichen Farbumschlagbereichen und Säure/Base-Eigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese Moleküle weder ihre Farbe noch ihren Ladungszustand nach Co-Kristallisation mit sauren, neutralen oder basischen Matrices änderten. [73] Auf Grund der offensichtlich bereits vorhandenen Ladung(en) ist ein „aktiver“ Ionisierungsschritt nicht notwendig. Die vorgeformten Analytationen müssen jedoch von ihren Gegenionen abgespalten bzw. diese neutralisiert werden. Des Weiteren müssen die mehrfachgeladenen Analytationen in einfach geladene Ionen, die normalerweise im MALDI-MS auch detektiert werden, umgewandelt werden. [107] Dafür ist die Ablation von Clustern, bestehend aus geladenen (z. B.  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $M^+$ ) und ungeladenen (z. B. A, M) Molekülen/Teilchen notwendig. Stöße in der MALDI Wolke verursachen den Zerfall dieser teils schwach gebundenen Cluster.

Entsprechend der Theorie können diese in ein positiv und ein negativ geladenes Cluster zerfallen, aus welchem dann wiederum einfachgeladene Analytationen entstehen. [107] In Abbildung 3 ist der entsprechende Mechanismus für die Bildung einfach positiv geladener Analytationen dargestellt. Im Wesentlichen sind dabei drei unterschiedliche Wege vorstellbar [61]:

I Intra-cluster Ladungstransfer:

Die Matrix transferiert das Proton zum Analyten. Ausschlaggebend dafür ist die Differenz der Protonenaffinität zwischen dem Analyten und der Matrix. Während die meisten Matrices sauer sind, besitzen Analyten oft eine protonenaffine Gruppe (z. B.  $-NH_2$ )

II Ladungsausgleich:

Dieser findet zwischen mehrfachgeladenen Clustern statt.

III Desolvatisierung:

Ungeladene Matrixmoleküle werden durch Stöße abgespalten. Dadurch zerfällt das Cluster und es bleibt ein einfach protoniertes Analytmolekül über.

Land *et al.* fanden heraus, dass es für den Desolvatisierungsprozess sowohl einen „weichen“ als auch einen „harten“ Weg gibt. [108] Der „weiche“ Weg ist durch die Abspaltung neutraler Matrixmoleküle ohne Ladungsänderung charakterisiert. Dabei entstehen mehrfach geladene Analytionen. Im Gegensatz dazu werden bei der „harten“ Desolvation auch geladene Matrixmoleküle abgespalten und somit einfach geladene Analytionen erzeugt.

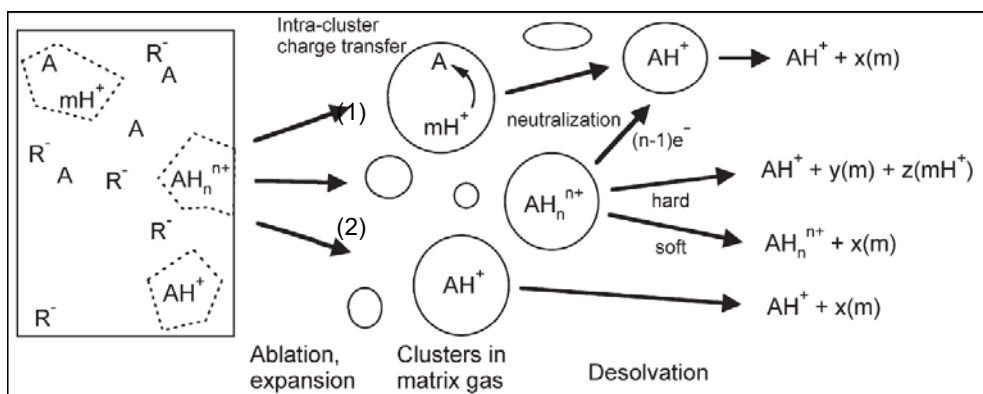


Abbildung 3: Mechanismus der MALDI Ionisation laut Cluster Modell. M = Matrix, A = Analyt, R<sup>-</sup> = Gegenion. 3 Wege der AH<sup>+</sup> Erzeugung: (1) intra-cluster Ladungstransfer, (2) Ladungsausgleich, (3) Desolvatisierung. [61]



Unter der Annahme des Prinzips der Ladungstrennung ist die Rolle der Matrix auf die eines Protonendonors und Photonenabsorbers beschränkt, da eine aktive Beteiligung an der Ionisierung nicht mehr notwendig ist. Da prinzipiell viele Moleküle diese Eigenschaften aufweisen, als Matrixsubstanzen aber nicht verwendbar sind, müssen somit weitere Effekte eine Rolle spielen. Durch die Bildung von Clustern sinkt das Ionisierungspotential, wodurch weniger Energie aufgenommen werden muss. Im Unterschied zum „Energy-Pooling“ Modell findet die Photoionisation der gebildeten Cluster in der MALDI Wolke statt. Dieser Prozess wurde von verschiedenen Gruppen untersucht und konnte dennoch bis jetzt noch nicht abschließend aufgeklärt werden. [109-113] Obwohl das „Lucky Survivor“ Modell die Ionisierung durch IR-Laser erklären kann, existieren andere Unklarheiten im Vergleich zum Pooling Modell.

Im Jahr 2011 wurde von Jaskolla und Karas [63] ein Mechanismus vorgestellt, der beide Modelle berücksichtigt. Der Einfluss experimenteller Parameter, sowie die Eigenschaften des Analyten und der Matrix sind verantwortlich für das Verhältnis der zwei Ionisierungsprozesse. Während eine höhere Laserfluenz und niedrigere Protonenaffinität der Matrix die Ionisierung nach dem „Energy-Pooling“ Modell favorisiert, fördert eine quantitativere Analytprotonierung in Lösung und intramolekulare Ionenstabilisierung das „Lucky Survivor“ Modell. Daher wird dieses Modell auch „Unified MALDI Analyte Protonation Mechanism“ genannt.

## 2.3 Massenanalytoren

In einem Massenanalysator werden die durch die Ionisation entstandenen Ionen entsprechend ihrer Masse (genauer Masse zu Ladungsverhältnis  $m/z$ ) getrennt. Wichtige Merkmale eines Massenanalytators sind die Auflösung, der Massenbereich (dynamischer Bereich) und die Massengenauigkeit. Die Auflösung bezeichnet die notwendige Massendifferenz zwischen zwei Ionen, um diese noch voneinander unterscheiden zu können. Meist wird jedoch das Auflösungsvermögen angegeben. Dieses wird gemäß Formel (1) berechnet.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m}{FWHM} \quad (1)$$

R	Auflösungsvermögen
m	Masse
$\Delta m$	Massendifferenz zwischen zwei Peaks
FWHM	Halbwertsbreite (Full width at half maximum)

So kann man bei einem Auflösungsvermögen von 10 000 die Masse 100,00 Da von 100,01 Da unterscheiden. Ein hohes Auflösungsvermögen ist vor allem für die Isotopenbestimmung notwendig. Der Massenbereich gibt die Spanne der analysierbaren Massen wieder. Dabei ist die Signalintensität nur innerhalb des linear dynamischen Bereiches proportional zu Konzentration. Die Massengenauigkeit gibt an mit welcher Genauigkeit die Masse eines Ions bestimmt werden kann. Typischerweise wird diese in ppm (parts per million) angegeben.

### 2.3.1 Flugzeit (TOF) Massenanalysator

Der Flugzeit (engl. Time of Flight, TOF) Massenmassenanalysator wurde 1946 von Stephens entwickelt und arbeitet in einem gepulsten Modus. [114] Dabei müssen zu diskreten Zeitpunkten Ionen erzeugt werden (z. B. MALDI mit gepulstem Laser), welche dann durch Anlegen einer Hochspannung beschleunigt werden. Da die Spannung konstant gehalten wird, weisen alle Ionen unabhängig von ihrer Masse die gleiche kinetische Energie auf. Diese ist gemäß Formel (2) proportional zu Masse, weshalb sich die Geschwindigkeit mit steigender Masse verringert. Auf Grund der unterschiedlichen

Geschwindigkeiten benötigen die Ionen unterschiedlich lange, um den Flugweg zurückzulegen und werden dadurch entsprechend ihres Masse zu Ladungsverhältnisses getrennt (Abbildung 4). Die Verhältnisse von Masse, Energie, Flugzeit und Geschwindigkeit sind in Formel (2-5) dargestellt.

Der Vorteil eines Flugzeitmassenanalysators besteht in seinem einfachen Aufbau, dem theoretisch unbegrenzten Massenbereich und der schnellen Messzeit. Darüber hinaus wird bei jedem Laserpuls ein komplettes Massenspektrum aufgezeichnet. [115-117]

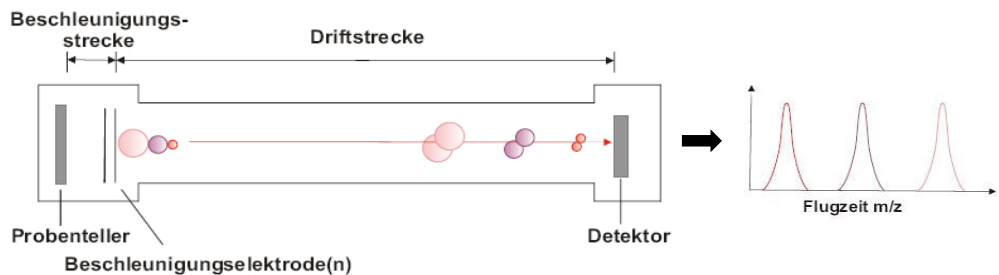


Abbildung 4: Das Prinzip eines MALDI-TOF-Massenspektrometers. [118]

$$E_{kin} = z \cdot e \cdot U = \frac{mv^2}{2} \quad (2)$$

$E_{kin}$	Kinetische Energie des Ions nach Verlassen der Quelle
$z$	Anzahl der Ladungen
$e$	Ladung
$U$	Beschleunigungsspannung ( $\sim 20$ kV)
$m$	Masse
$v$	Geschwindigkeit

$$v = \frac{L}{t} \quad (3)$$

$L$	Länge des Flugrohrs
$t$	Flugzeit

## 2 Theoretische Grundlagen der MALDI-TOF-MS

Durch Kombination von Formel (2) und (3) erhält man eine direkte Beziehung zwischen der Flugzeit und der Masse des Ions (Formel (4) und (5)).

$$t = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2z \cdot e \cdot U}} \quad (4)$$

$$\frac{m}{z} = 2e \cdot U \cdot \left(\frac{t}{L}\right)^2 \quad (5)$$

Nach der Desorption weisen die Ionen jedoch eine Geschwindigkeitsverteilung in der MALDI Wolke auf. Diese führt dazu, dass Ionen mit gleichem  $m/z$  aber unterschiedlichen Anfangsgeschwindigkeiten auch zeitlich versetzt detektiert werden und somit zur Peakverbreiterung und damit zur Verringerung der Auflösung beitragen. Darüber hinaus führen Unterschiede in der Höhe der Probenoberfläche auch zu Unterschieden im elektrischen Potential. Das ist besonders bedeutsam, da mittlerweile sehr große Targets existieren, deren Planheit zwar nur um einige Mikrometer variiert, was jedoch bei der Kürze der Flugzeit der Ionen (wenige  $\mu\text{s}$ ) zu deutlichen Fehlern führen kann. Um diese Verteilungen zu kompensieren wird die sogenannte Delayed Extraktion angewandt. [119-121] Dabei wird das elektrische Feld während und unmittelbar nach dem Laserpuls ausgeschaltet (Delay Time). In dieser potentialfreien Zeit bewegen sich schnellere Ionen weiter zum Detektor als langsamere Ionen und werden nach dem Wiederanlegen des elektrischen Feldes weniger stark beschleunigt, da auf sie ein schwächeres elektrisches Feld wirkt. Dies führt zu einer Fokussierung gleicher Ionen im Flugrohr und somit zu einer Erhöhung der Auflösung.

Eine weitere Möglichkeit zur Kompensierung der Anfangsgeschwindigkeits/-energie Verteilung ist die Verwendung eines Reflektrons (Abbildung 5). [122] Dieses besteht aus einer Serie von Ringelektroden, die durch Anlegen eines Spannungsgradienten die ankommenden Ionen bremst und durch Richtungsumkehr zum zweiten Detektor lenkt. Dabei dringen hochenergetische Ionen weiter ein und legen dadurch einen längeren Weg zurück, als niederenergetische Ionen. Dies führt zu einer Fokussierung von Ionen mit gleichem  $m/z$  Verhältnis, aber unterschiedlichen Energien und erhöht dadurch die

Auflösung drastisch. Moderne TOF/TOF Geräte verwenden die Delayed Extraction für die Verringerung der Geschwindigkeitsverteilung und das Reflekttron zur Energiekompensation. [123]

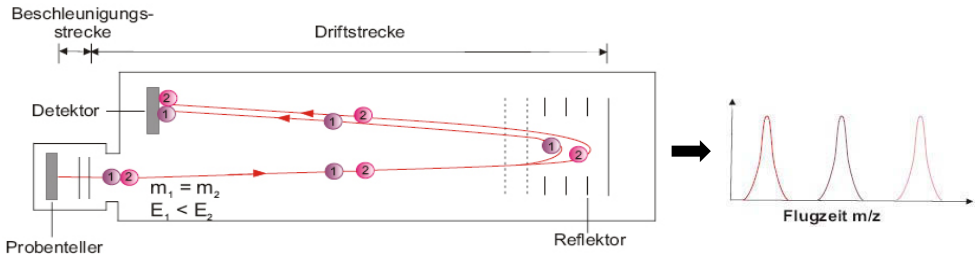


Abbildung 5: Kombination aus einem Linearen- und Reflekttron MALDI-TOF Massenspektrometer. [118]

Um einen Analyten vollständig zu charakterisieren, kann es sinnvoll sein, Fragmentierungsanalytik zu betreiben. Anhand der erhaltenen Fragmentionen ist eine Strukturaufklärung möglich. Dafür kann ein MALDI-TOF/TOF-MS verwendet werden. In einem kommerziell erhältlichen TOF/TOF Instrument wird ein kurzes lineares TOF axial mit einem Reflekttron TOF verbunden. Zwischen den beiden TOFs befindet sich noch der sog. Timed Ion Selector (TIS). Die Aufgabe des ersten TOFs ist es, die entstandenen Ionen zu separieren. Die Isolation des Precursor Ions erfolgt in der TIS durch Einstellen der Delay Time. Nur die Massen, die zu diesem Zeitpunkt (Startzeit: Beschleunigen der Ionen) im TIS sind, können diesen auch passieren. Ein Teil dieser Ionen fragmentiert anschließend in einer Kollisionszelle (z. B. Collision Induced Dissociation) oder auf Grund eines bereits vorhandenen Energieüberschusses (Post Source Decay) (siehe auch 2.6). Diese Ionen werden dann wieder beschleunigt, im zweiten TOF getrennt und detektiert. [124-126] MALDI-TOF/TOF-MS wurde unter anderem für die Charakterisierung von Polyethylenglykol, Polyester und Polystyrol verwendet. [127-129]

### 2.3.2 Quadrupol-Flugzeit-Analysatoren (Q-TOF)

Das Q-TOF gehört zu den sogenannten Hybriden Massenanalysatoren, da es verschiedene Systeme miteinander kombiniert. Der typische Aufbau ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Aufgabe des ersten Quadrupols ( $Q_1$ ) ist die Fokussierung der Ionen damit sie in einer definierten Flugbahn den zweiten Quadrupol erreichen ( $Q_2$ ). Dieser arbeitet als Massenfilter und kann entweder eine Vielzahl von unterschiedlichen Ionen passieren

lassen, oder, für Fragmentierungsuntersuchungen, zur Selektion bestimmter Ionen (Precursor Ion Selection) verwendet werden. Im dritten Quadrupol ( $Q_3$ ) können diese Ionen durch Kollisionen fragmentiert und die Fragmente in einem orthogonalen TOF analysiert oder durch Ion Cooling (siehe 2.6) fokussiert werden. Der Vorteil eines Q-TOFs liegt in der einfachen und flexiblen Anwendung und der hohen Auflösung ( $>10^4$ ) auf Grund der zusätzlichen Fokussierung durch den Quadrupol. Außerdem ist eine schnelle MS/MS Analyse mit einer hohen Sensitivität möglich. [130, 131]

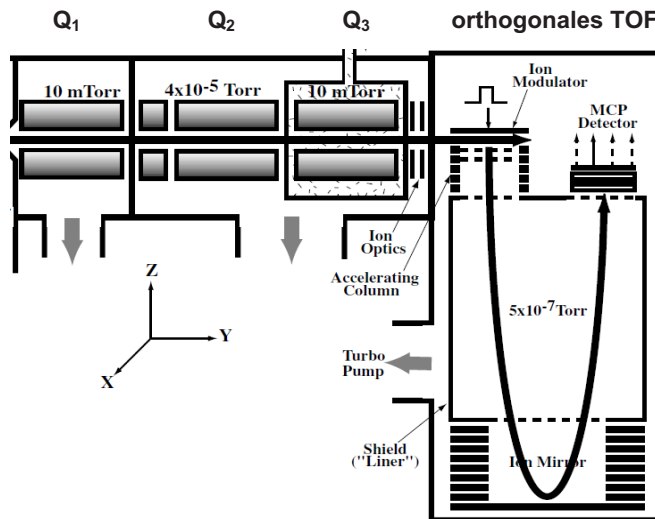


Abbildung 6: Aufbau eines Q-TOF Massenspektrometers. Quelle: MALDI; Q1 Fokussierung; Q2 Massenfilter; Q3 Kollisionszelle; orthogonaler TOF Analysator; Detektor [132]

### 2.3.3 Ionenfallen (Ion Trap)

Eine Möglichkeit die Nachweisgrenze von Analyten zu erhöhen ist die Ionenanreicherung in einer Ionenfalle. Im einfachsten Fall wird dazu ein oszillierendes Quadrupol-Feld verwendet. Eine solche Ionenfalle besteht aus einer zentralen Ringelektrode und Elektrodenkappen an der Ober- und Unterseite (Abbildung 7). Um Ionen injizieren und extrahieren zu können, befinden sich an den Kappen zentrische Öffnungen. Da die Geschwindigkeit der Ionen für das Einfangen jedoch zu hoch ist, wird diese durch Kollision mit Heliumatomen reduziert (siehe Ion Cooling, 2.6). Durch Anlegen von Wechselfeldern, die im zeitlichen Mittel auf den Mittelpunkt der Ion Trap gerichtet sind, lassen sich Ionen

einer Masse oder eines Massenbereichs einfangen und anreichern. Dadurch kann bei Extraktion einzelner  $m/z$  eine massenaufgetrennte Analyse erfolgen. [133]

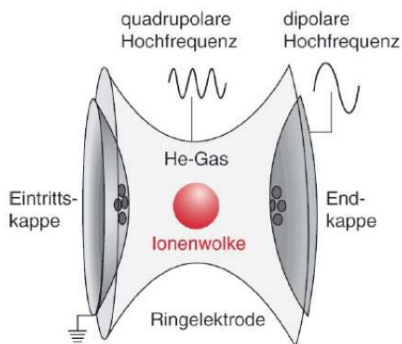


Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau einer Ionenfalle [134]

Ein relativ neuer Massenanalysator, der zur Gruppe der Ionenfallen gehört, ist der von Makarov entwickelte Orbitrap-Analysator. [135, 136] Der Kern der Quelle besteht aus einer zentralen spindelförmigen Elektrode, welche koaxial von einem spezialgeformten Zylinder (Gegenelektrode) umgeben ist. Ein Gleichspannungsfeld wird durch Anlegen einer Spannung (einige kV) errichtet. Die Ionen werden dann tangential zwischen den Elektroden eingeschleust (Abbildung 8 – roter Pfeil). Diese rotieren auf Grund der elektrostatischen Anziehung entlang einer Umlaufbahn (Orbit) um die innere Elektrode. Die dezentrale Einspeisung bewirkt außerdem eine harmonische Schwingung entlang der inneren Elektrode (z-Achse). Die Frequenz dieser Schwingung wird aufgezeichnet, verstärkt und mit Hilfe der Fourier Transformation in  $m/z$  Signale umgewandelt. Die Vorteile der Orbitrap liegen in der sehr hohen Massengenauigkeit und Auflösung sowie dem breiten dynamischen Bereich. Die Auflösung hängt dabei stark von der Messzeit ab. Dafür ist ein sehr gutes Vakuum erforderlich. [135-138]

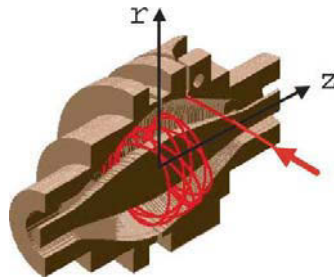


Abbildung 8: Orbitrap Massenanalysator. Der rote Pfeil zeigt die Einschleusung der Ionen sowie deren Bewegung in der Trap. [137]

Auch der Fourier-Transformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz (FT-ICR) Massenanalysator basiert auf dem Einfangen von Ionen auf einer Kreisbahn. Im Unterschied zur Orbitrap wird zum Einfangen jedoch ein starkes homogenes magnetisches Feld, welches mit supraleitenden Magneten erzeugt wird, verwendet. Durch Anlegen von Wechselfeldern (Abbildung 9) werden Ionen, deren Resonanzfrequenz mit der des Wechselfeldes übereinstimmen, angeregt, wodurch sich ihre Kreisbahn vergrößert. Nach Abschalten des Wechselfeldes verbleiben die Ionen auf der erweiterten Kreisbahn und induzieren bei Vorbeiflug an den Detektorplatten ein Potential. Die Summe der induzierten Wechselfrequenzen der Ionen ergeben das Interferogramm, welches durch Fourier Transformation in ein Massenspektrum umgewandelt wird. Da die Massenauflösung direkt von der Frequenzauflösung abhängig ist, führt eine längere Beobachtungszeit zu einer höheren Auflösung. Der FT-ICR zeichnet sich des Weiteren durch eine extrem hohe Massengenauigkeit sowie der Unterscheidbarkeit von Isobaren aus. [139, 140] Nachteile des FT-ICR sind vor allem der begrenzte Massenbereich (im Vergleich mit TOF), das benötigte Hochvakuum ( $<10^{-9}$  mbar) und die Größe des Gerätes. Außerdem ist es, auf Grund der supraleitenden Magnete, sehr schwer und teuer.

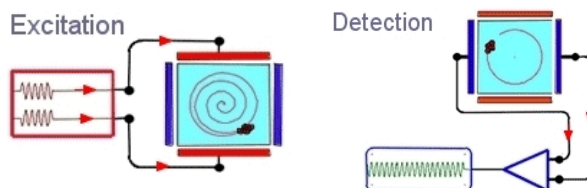


Abbildung 9: Funktionsprinzip des FT-ICR [141]



## 2.4 Detektoren

Die Aufgabe eines Detektors ist es die ankommenden Ionen in ein Signal umzuwandeln. Dabei erfolgt eine Auswertung durch Messen der Stromstärke. Wichtige Parameter für einen Detektor sind die Responsezeit, die Totzeit, der dynamische Bereich, das Sättigungsverhalten und die Empfindlichkeit. Die Responsezeit ist die Zeit, die ein Detektor für die Verstärkung braucht um von dem Anfangswert (z. B. Auftreffen des Ions) zu einem bestimmten Prozentsatz des Endwertes (z. B. 99%) zu kommen. Als Totzeit wird die Zeit, die ein Detektor benötigt um nach einem erfolgten Detektionsvorgang erneut einsatzbereit zu sein, bezeichnet. Der dynamische Bereich ist jener, der vom größtmöglichen und kleinstmöglichen noch zu detektierenden Signal eingeschlossen wird. Die Sättigung bezeichnet einen Zustand des Detektors bei dem dieser keine zusätzlichen Ionen mehr detektieren kann, auch wenn diese weiterhin am Detektor eintreffen. Die Empfindlichkeit ergibt sich aus dem Quotienten aus den tatsächlich detektierten und insgesamt angekommenen Ionen.

### 2.4.1 Mikrokanalplatten-Detektor (MCP)

Der Mikrokanalplatten-Detektor (engl. Micro Channel Plate - MCP) basiert auf dem Prinzip des Sekundärelektronenvervielfachers zum Umwandeln von Ionen in Elektronen. Dabei werden  $10^4$  bis  $10^7$  Kanäle in einem Array mit einem Abstand von etwa  $10\ \mu\text{m}$  angeordnet (Abbildung 10 (a)). Der Durchmesser eines Kanals beträgt etwa  $20\ \mu\text{m}$  bei einer Länge bis zu  $1\ \text{mm}$ .

Das Funktionsprinzip des Detektors ist in Abbildung 10 (b) dargestellt. Das Auftreffen eines Ions löst Elektronen aus der, aus einem Halbleitermaterial bestehenden, Wand des Kanals. Durch das Anlegen einer Spannung entlang des Kanals werden diese Elektronen beschleunigt. Kollisionen mit der Wand setzen immer mehr Elektronen frei, was zur Verstärkung des Signals führt. Zum Auslösen dieser Verstärkungskaskade ist jedoch eine relativ hohe Geschwindigkeit des eintreffenden Ions erforderlich. Da bei Verwendung eines TOF Analysator alle Ionen eine konstante kinetische Energie erhalten, ist deren Geschwindigkeit umgekehrt proportional zu der Masse (Formel (2)). Das hat zur Folge, dass die Sensitivität des Detektors mit steigender Molmasse abnimmt. Ein weiterer Nachteil dieses Detektors ist die Detektorsättigung. Dabei führt das Auftreffen kleiner schneller Ionen zu einer Überlastung eines Kanals während der Signalverstärkung. In der Zeit, die der Kanal benötigt die erzeugte Ladung abfließen zu lassen, ist er quasi blind für weitere Ionen. Dies stellt eine der Hauptursachen dafür dar, dass lediglich von synthetischen

Polymeren mit Polydispersitäten von maximal 1,2 realistische Molmassenverteilungen erhalten werden können. [142, 143]

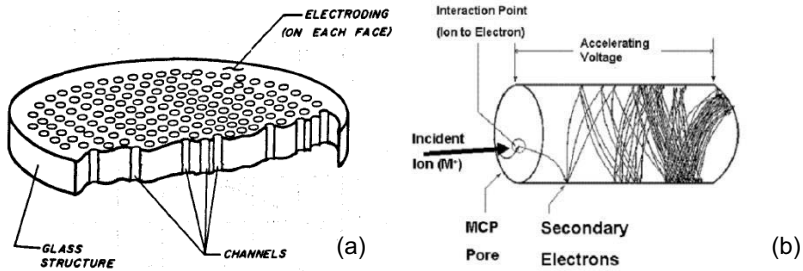


Abbildung 10: (a) Schnitt durch einen Mikrokanalplatten-Detektor. (b) Funktionsprinzip des Mikrokanalplatten-Detektors innerhalb eines Kanals. [142, 144]

## 2.4.2 Ionen Konvertierungsdynodendetektor (ICD)

Bei einem Ionen Konvertierungsdynodendetektor (engl. Ion Conversion Dynode - ICD) treffen die ankommenden Ionen auf eine Konvertierungsdynode auf, an der eine Hochspannung anliegt. Dadurch werden die auftreffenden Ionen (primäre Ionen) in sekundäre Ionen umgewandelt. Diese werden dann nochmals durch ein angelegtes Potential ( $HV1 - HV2$ ) beschleunigt und treffen dann auf eine sekundäre Dynode auf. Dabei werden sie in Elektronen umgewandelt, welche anschließend verstärkt werden. Durch die höhere Geschwindigkeit der sekundären Ionen erhöht sich die Sensitivität des Detektors. Die Funktionsweise ist in Abbildung 11 dargestellt. Der ICD Detektor hat im Vergleich zum MCP ein höheres Sättigungslevel und, speziell im Bereich großer Molmassen, eine höhere Empfindlichkeit. Im kleinen Massenbereich hat er dagegen Nachteile in der Auflösung. [144, 145]

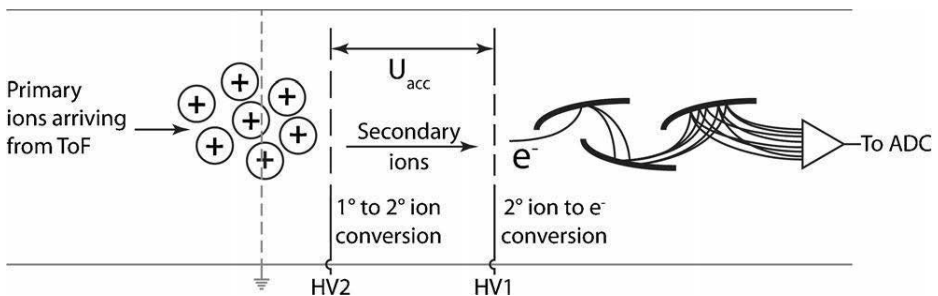


Abbildung 11: Funktionsprinzip des Ionen Konvertierungsdynoden Detektors. [145]

### 2.4.3 Kryodetektor – Supraleitender Tunnelübergangsdetektor (STJ)

Der supraleitende Tunnelübergangsdetektor (engl. Superconducting Tunnel Junction - STJ) misst die kinetische Energie der eingehenden Ionen. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 12 dargestellt. Durch Kühlen des Detektors wird ein supraleitender Zustand erreicht in dem sich Elektronen in der Niobium Schicht zu sogenannten Cooper-Paaren zusammenschließen. Durch Auftreffen von Ionen (auch Partikel) werden Phonon (Quasiteilchen) – Gitterschwingungen generiert, welche die Cooper-Paare in freie Elektronen teilen. Diese können dann durch die dünne Oxidschicht „tunneln“ und werden als Überstrom detektiert. Die Stromstärke ist dabei direkt proportional zur kinetischen Energie, die beim Aufprall übertragen wurde. Nach dem „tunneln“ werden die Cooper-Paare wiederhergestellt und der Überstrom hört auf zu fließen. Da jeder Aufprall einen Energietransfer mit sich bringt gibt es keinerlei Detektorverluste. Darüber hinaus wird der Geschwindigkeitsnachteil großer Ionen wettgemacht und damit eine höhere Sensitivität im hohen Molmassenbereich erreicht. Der höhere Sättigungslevel ist für die Analyse von komplexen Mischungen vorteilhaft. [146] Nachteile des Detektors sind der hohe Anschaffungspreis, die notwendige Kühlung sowie die geringere Responsezeit, die zu einer niedrigen Auflösung für kleine  $m/z$  führt. [143, 146]

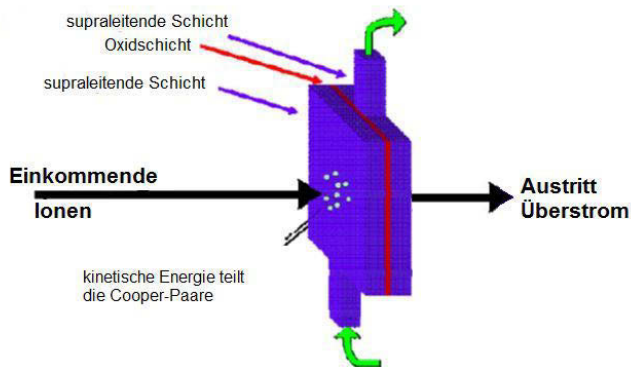


Abbildung 12: Funktionsweise des supraleitenden Tunnelübergangsdetektors. [144]

## 2.5 Probenpräparation

Die Probenpräparation stellt einen wichtigen Schritt in der MALDI Analyse dar. Sie entscheidet wesentlich über die Qualität der Spektren. [147] Verschiedene Parameter, wie z. B. das Matrix-Analyt Verhältnis, die Matrixkristallinität, Analytkonzentration und die Eigenschaften der Kationen (z. B. Ionenradius, Polarisierbarkeit) sowie des Lösemittels (z. B. Polarität, Löslichkeit der Moleküle) haben einen erheblichen Einfluss auf die Ionisierung und somit auf die Intensität und Qualität der Spektren. [91, 148-159] So zeigt zum Beispiel eine Erhöhung der Analytkonzentration (Oligolysinpeptide) eine Verschiebung des Peakmaximums zu höheren Massen. [160] Verwendet man ein Cäsiumsalz anstatt eines Natrium- oder Kaliumsalzes, kann eine derartige Verschiebung auch bei PMMA beobachtet werden. [159] Der Einsatz von Lösemittelgemischen kann auch in einer Massendiskriminierung und Verschiebung des Peakmaximums resultieren. So zeigt z. B. die Zugabe von 1% Wasser in MeOH (v/v) eine Verschiebung des Peakmaximas um 600 Da (PMMA;  $M_w = 4\,100\text{ g mol}^{-1}$ ). [150] Versuche mit diversen Lösemitteln bzw. Lösemittelgemischen sowie PS und PMMA zeigten, dass die Reproduzierbarkeit und Spektrenqualität stark von dem verwendeten Lösemittel abhängen. Dabei zeigte sich, dass je schlechter ein Polymer in einem Lösemittel/Lösemittelgemisch löslich war, desto geringer war auch die Qualität und Reproduzierbarkeit der Spektren. [158]

Prinzipiell kann man zwischen lösemittelfreien und auf Lösemittel basierenden Probenpräparationsmethoden unterscheiden. Die am häufigsten verwendeten lösemittelbasierenden Methoden sind die sogenannte Tropfen Methode (Dried Droplet) und die Schicht-Präparation (Sandwich; modifizierte Dried Droplet). Zu den häufig verwendeten lösemittelfreien Methoden gehören die Elektro-Spray- und die Pulver- Präparation (Mühle, Mörser). [18, 56, 117, 161-164] Diese werden im Detail in den nachfolgenden Unterkapiteln beschrieben. Weitere Präparationstechniken sind die Matrixsublimation, Mikrodispensierung, Spincoating, Impulse driven droplet deposition, sowie die „Seed Layer“ Präparation. [165-169].

## 2.5.1 Lösemittelbasierende Probenpräparationen

### 2.5.1.1 Manuelle Präparation

Bei den lösemittelbasierenden Probenpräparationen wird die Matrix, der Analyt und (sofern benötigt) das Salz in einem geeigneten Lösemittel gelöst und mittels Pipette auf das Target aufgebracht. Dabei ist wichtig, dass die Lösemittel ähnlich (z. B. Siedepunkt) und untereinander mischbar sind. Werden die Lösungen miteinander vermischt und als Mischung (ca. 1  $\mu\text{l}$ ) auf das Target aufgetragen, so spricht man von der pre-mixed Dried Droplet Methode (Abbildung 13 (a)). Nach dem Verdampfen des Lösemittels wird das Target in das MALDI Massenspektrometer eingeführt.

Die Sandwich Methode ist eine modifizierten Form der Dried Droplet Methode. Im Unterschied zu dieser erfolgt jedoch keine Mischung von Matrix und Analyt vor der Auftragung. Diese erfolgt stattdessen schichtweise, wobei vor Aufbringen einer neuen Schicht das Lösemittel des vorangegangenen Tropfens verdunstet sein muss (Abbildung 13 (b)). Die Sandwich Probenpräparation ist speziell für Analyt- und Matrixlösungen geeignet deren Lösemittel sich nicht mischen lassen.

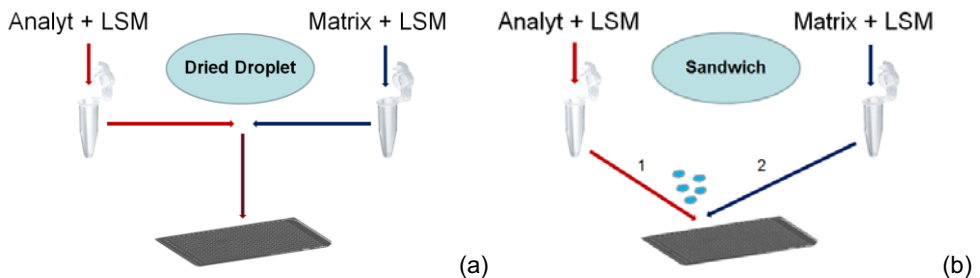


Abbildung 13: Schematische Darstellung der (a) Dried Droplet und (b) Sandwich Probenpräparation

### 2.5.1.2 Automatisches Spotting

Speziell in der Routineanalytik wird eine große Anzahl an Proben gemessen. Um einen Vergleich dieser zu gewährleisten und um die Präparationszeit zu verkürzen, werden seit einiger Zeit automatische Spotter eingesetzt. Für die Auftragung einer Probe auf ein Target gibt es dabei mehrere Möglichkeiten. Beispielsweise kann das Spotting durch parallel angeordnete Mikrokanäle erfolgen. Dabei werden die Tropfen durch Kontakt mit dem Target übertragen. Zur Steuerung der Kontaktaufnahme werden senkrecht bewegliche Mikrokanäle verwendet, die automatisch gesteuert werden. [170] Eine weitere Option kleine

Tropfen (ca. 3 pl) automatisiert aufzutragen, stellt ein gewöhnlicher Inkjet Drucker dar. [171] Dabei wird statt gewöhnlicher Tinte das aufzutragende Gemisch eingefüllt. Wird der Druckkopf über einem dreidimensional beweglichen Tisch aufgebaut, kann damit auch Multi-Layer-Spotting betrieben werden. [172, 173]

Ein großer Nachteil der lösemittelbasierenden Probenpräparation ist die Ausbildung von Eintrocknungsringen und einhergehend damit, eine häufig beobachtete Separation von Matrix und Analyt während des Verdampfens des Tropfens. Darüber hinaus wurde bei synthetischen Polymeren auch eine massenspezifische Separation unterschiedlicher Polymerhomologer beobachtet. Diese Separationseffekte wurden von verschiedenen Autoren untersucht. Eine genaue Erklärung fehlt jedoch bislang. [174-177] Als mögliche Faktoren wurden das verwendete Lösemittel, dessen Polarität, die Löslichkeit sowie, im Falle der synthetischen Polymere, deren Monomerstruktur und Molmasse vermutet. Laut Deegan *et al.* sind die Kapillarkräfte für dessen Entstehung verantwortlich. [175] Diese entstehen auf Grund der ungleichen Verdampfung im Tropfen. Wie in Formel (6) gezeigt ist die Verdampfungsgeschwindigkeit  $J$  von dem Kontaktwinkel  $\theta_c$  und der Position am Tropfen abhängig. [175] Diese ist dabei am Rand des Tropfens deutlich höher und nimmt zur Mitte hin ab. Während des Verdampfens nimmt auch der Kontaktwinkel  $\theta_c$  stetig ab, wodurch sich  $\lambda$  0,5 nähert (Formel (7)). Experimente von Deegan *et al.* konnten diese Theorie bestätigen. [175] Um der Kontraktion des Tropfens entgegenzuwirken, fließt Lösemittel vom Tropfeninneren zum Rand ( $\bar{v}$ ). Abbildung 14 zeigt die auftretenden Kräfte und Flüsse. Das führt ebenfalls zum Transport von gelösten oder dispergierten Molekülen an den Rand des Tropfens. (Abbildung 15 (a))

$$J(r) \propto (R - r)^{-\lambda} \quad (6)$$

J	ortsabhängige Verdampfungsgeschwindigkeit
R	Tropfenradius
r	Abstand von der Tropfenmitte
$\lambda$	siehe Formel (7)

$$\lambda = \frac{\pi - 2\theta_c}{2\pi - 2\theta_c} \quad (7)$$

$\theta_c$       Kontaktwinkel

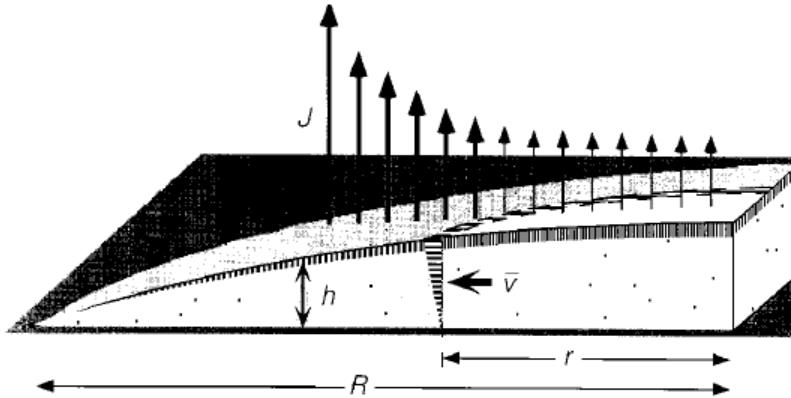


Abbildung 14: Für den Kapillarfluss verantwortliche Größen. Ortsabhängige Verdampfungsgeschwindigkeit  $J$ , Tropfenradius  $R$ , Abstand von der Tropfenmitte  $r$ , Höhe des Tropfens  $h$  und Fluss vom Tropfen inneren zum Rand  $\bar{v}$ . [175]

Als zusätzlich auftretende Kräfte in einem verdampfenden Tropfen müssen die Marangoni Konvektionen (Flow Loops) erwähnt werden. Diese führen zu einer erneuten Vermischung und wirken den durch Kapillarkräfte hervorgerufenen Transportprozessen entgegen. Wenn der Tropfen verdampft, kühlt er sich an der Grenzfläche ab. Dadurch entsteht ein Temperaturgradient zwischen dem Inneren des Tropfens und seiner Oberfläche. Geringe Störeinflüsse auf die Oberflächentemperatur verursachen Gradienten der Oberflächenspannung. Dadurch wird die Flüssigkeit an der Grenzfläche nach innen, zu den höheren Spannungen gezogen, wodurch „warme“ Flüssigkeit an die Grenzfläche gelangt. Dies führt zu einem periodischen Fluss, der thermischen Marangoni Konvektion (Abbildung 15 (b)). [178] Zur Abschätzung der Marangoni Strömung kann die Marangoni Zahl (Formel (8)) berechnet werden. [179] Laut Bhardwaj *et al.* ist die Strömungsrichtung von dem Verhältnis der thermischen Leitfähigkeit des Tropfens ( $k_1$ ) und des Substrats ( $k_2$ ) abhängig.

## 2 Theoretische Grundlagen der MALDI-TOF-MS

[174] Versuche mit Polystyrol, Wasser und einer Glasoberfläche zeigten, bei einem großen Verhältnis  $k_2/k_1$  die in Abbildung 15 (b) (rote Pfeile) dargestellte Strömungsrichtung.

$$M_a = -\frac{\partial\gamma}{\partial T} \cdot \frac{\Delta T \cdot cL}{\alpha \cdot \eta} \quad (8)$$

$M_a$	Marangoni Zahl
$\gamma$	Oberflächenspannung / $\text{N m}^{-1}$
$\Delta T$	Temperaturdifferenz / K
$cL$	Charakteristische Länge / m
$\alpha$	Wärmediffusionskoeffizient / $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$\eta$	dynamische Viskosität / $\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1}$

Trotz der beschriebenen Nachteile ist die lösemittelbasierende Probenpräparation, auf Grund der schnellen Präparationszeit und der insgesamt sehr einfachen Handhabung, die am häufigsten verwendete Methode.

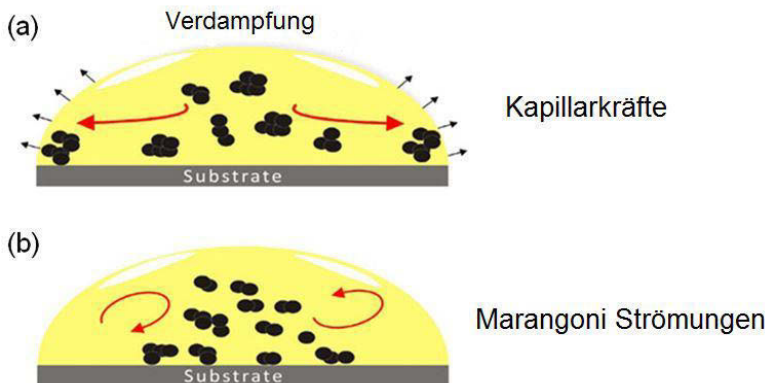


Abbildung 15: Diskutierte Mechanismen die zu einer Separation/Segregation führen. (a) Kapillarkräfte, (b) Marangoni Konvektion. [180]



## 2.5.2 Lösemittelfreie Probenpräparation

### 2.5.2.1 Elektrospray

Das Prinzip der Elektrospray Präparation ist von einer in der Massenspektrometrie weitverbreiteten Ionisationstechnik abgeleitet. Dieses basiert auf dem Transfer von Ionen aus einer Lösung in die Gasphase durch Desolvatisierung unter Verwendung einer Hochspannung. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 16 dargestellt. Zwischen einer leitfähigen Kapillare und der Gegenelektrode – dem MALDI Target – wird eine Hochspannung angelegt. Aus der Kapillare wird kontinuierlich eine Analyt- und/oder Matrixlösung versprüht. Die Oberflächenspannung führt zur Ausbildung eines sogenannten Taylor-Konus, an dessen Spitze ein kontinuierlicher, wenige Mikrometer breiter Flüssigkeitsstrom austritt. Dieser wird auf dem Weg zur Gegenelektrode durch die Verdampfung des Lösemittels immer instabiler, wodurch sich immer kleinere geladene Tropfen bilden. Unterschreitet das Größe-zu-Ladungsverhältnis der Tropfen die Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit; Formel (9)) erfolgt durch die Abstoßung der gleichen Ladungen ein spontaner Zerfall in Mikro-Tröpfchen (Coulomb-Explosion).

$$Q^2 = 64\pi^2 \varepsilon_0 \cdot \gamma \cdot r^3 \quad (9)$$

Q	Ladung / C
$\varepsilon_0$	Dielektrizitätskonstante im Vakuum / C V <sup>-1</sup> m <sup>-1</sup>
$\gamma$	Oberflächenspannung / N m <sup>-1</sup>
r	Radius des Tropfen / m

In einem Vergleich der Elektrospray Probenpräparation mit anderen Spraymethoden konnte an Hand von Rasterelektronenmikroskop (REM) Bildern gezeigt werden, dass neben kleinen Kristallen (einige  $\mu\text{m}$ ) auch eine relativ homogene Oberfläche erzeugt wurde. [181] Neben der Möglichkeit zur Erzeugung von homogenen Matrix- und/oder Analytschichten wird eine bessere Reproduzierbarkeit sowie höhere Empfindlichkeit im Vergleich zur Dried Droplet Methode erzielt. [181, 182]

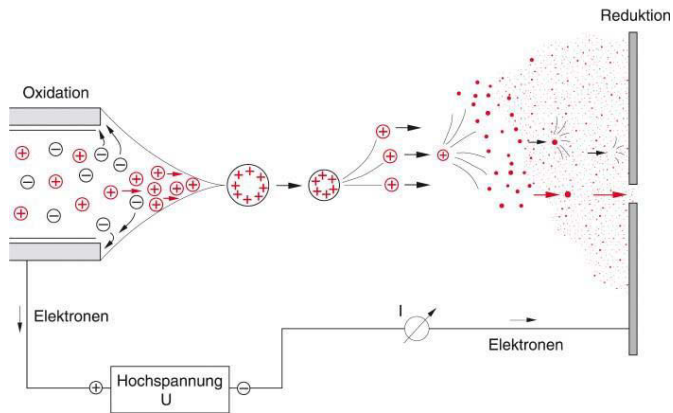


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Elektrospray Prinzips. [183]

Eine der ersten Applikationen der Elektrospray Probenpräparation für die MALDI Massenspektrometrie war die Analyse von zwei Peptiden mit ähnlicher Molmasse und Struktur. Dabei war auf Grund der homogenen Verteilung eine quantitative Messung bei Verwendung eines der Peptide als interner Standard möglich. [164] Mittlerweile gehört die Elektrospray Probenpräparation trotz des höheren apparativen Aufwands zu den etablierten Methoden der MALDI Probenpräparationen. [181, 182, 184-186]

### 2.5.2.2 Pulverpräparation

Da bestimmte Polymere (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, PAK) nicht oder nur sehr schwer löslich sind, ist die lösemittelbasierende Probenpräparation nicht möglich. Das gleiche gilt auch für Systeme, wo sich Matrix und Analyt in untereinander nicht mischbaren Lösemitteln lösen (z. B. Polyvinylpyrrolidon und Dithranol). Diese Probleme führten zur Entwicklung lösemittelfreier Präparationstechniken.

Bei der häufig auch als Pulverpräparation bezeichneten Methode werden der Analyt, die Matrix sowie (falls notwendig) das Salz ohne Zugabe von Lösemittel intensiv im entsprechenden Verhältnis miteinander vermischt. Dazu können z. B. Kugelmøhlen sowie Reibschalen/Mørser [54, 71, 161, 187-190] verwendet werden. Um reproduzierbare Spektren mit gutem Signal/Rausch Verhältnis zu erhalten, ist es notwendig, ein möglichst homogenes Pulver herzustellen. Das erhaltene Pulver kann dann entweder direkt auf das Target gegeben werden (z. B. mit einem Spatel) oder, analog zur IR Spektroskopie, als

Pressling geformt werden. In Versuchen mit PMMA und PS zeigte sich jedoch, dass Presslinge der reinen Pulverauftragung hinsichtlich der Auflösung unterlegen sind. [71] Im Unterschied zu lösemittelbasierenden Probenpräparationen, bei denen Separations- und Segregationseffekte während des Verdampfens des Lösemittels auftreten, ist die homogene Verteilung der Moleküle im Pulver vom Vermischen abhängig und kann somit durch z. B. einen intensiveren oder längeren Mahlvorgang erhöht werden. Des Weiteren können keine Nebenreaktionen mit dem Lösemittel oder dessen Verunreinigungen erfolgen. Dadurch erhält man neben einer höheren Spot-zu-Spot Reproduzierbarkeit eine gleichbleibende bzw. leicht verbesserte Qualität der Massenspektren. [71, 191]

Die Verwendung der Pulverpräparation ermöglichte erstmals die Analyse von PAKs mit Dithranol als Matrix. [191] Auch Polyvinylpyrrolidon, welches in (für Matrices geeigneten) organischen Lösemitteln nur anquillt, konnte so mit Dithranol gemessen werden. [191] Mit der Pulverpräparation konnten auch MALDI Massenspektren vom schwer löslichen Pigment Rot 144 aufgenommen werden. [71] Die hohe Reproduzierbarkeit der Spektren, basierend auf der homogenen Probenoberfläche, ermöglichte es u. a. quantitative Messungen durchzuführen. Dabei wird meist ein interner Standard, welcher dem Analyten in Masse und Ionisierungsverhalten ähneln sollte, zugegeben. Beispielsweise wurden quantitative Analysen von schwer- und unlöslichen PAKs (Standardadditionsverfahren) sowie von Polymeradditiven direkt im Polymer mit dem internen Standard Meso-Tetraphenylporphyrin durchgeführt. [54, 192]

### 2.5.3 Ionische Flüssigkeiten

Ionische Flüssigkeiten sind nichtbrennbare, nichtexplosive Salze die einen vernachlässigbaren Dampfdruck aufweisen. Obwohl ihr Schmelzpunkt unter 100°C liegt, sind sie meist bis zu 250°C stabil. Aufgrund ihrer hervorragenden Eigenschaften wurden sie für Extraktionen, organische Synthesen, enzymkatalysierte Reaktionen und als stationäre Phasen in der Gaschromatographie (GC) eingesetzt. [193-196] Die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten als Matrices für MALDI wurde erstmals von Armstrong *et al.* im Jahr 2001 beschrieben. [197] Die Synthese erfolgt durch einfaches Mischen von äquimolaren Mengen konventioneller Matrix (z. B. 2,5-Dihydroxy-benzoesäure; Sinapinsäure) mit einer organischen Base (z. B. Triethylamin). Als Lösemittel werden üblicherweise Methanol oder Ethanol verwendet, die nach erfolgter Mischung entfernt werden (Rotationsverdampfer). [195, 197, 198]

Ein Vorteil ionischer Matrices besteht, auf Grund des sehr niedrigen Dampfdrucks, in ihrer höheren Vakuumstabilität und der dadurch längeren Verweilzeit in der Quelle [21, 197, 199, 200]. Die hohe Puls-zu-Puls Reproduzierbarkeit der Spektren kombiniert mit der Möglichkeit, denselben Spot mehrfach messen zu können, stellen weitere Vorteile dar. [197] So wurde beispielsweise ein Proben spot (Bradykinin, 1060,2 Da) in mehrere Bereiche unterteilt und separat gemessen. Im Vergleich zu einer klassischen Dried Droplet Methode betrug die Standardabweichung (der mittleren Spektrenintensitäten) nur ca. ein Zehntel der normalerweise sehr hohen Standardabweichung von 150 %, was quantitative Messungen ermöglicht. Erste Versuche mit synthetischen Polymeren wurden mit PEG ( $M_w = 2000 \text{ g mol}^{-1}$ ) unter Verwendung verschiedener ionischer Matrices durchgeführt. Mit aprotischen ionischen Flüssigkeiten konnte kein signifikantes Massenspektrum aufgenommen werden. Bei Verwendung protischer ionischer Flüssigkeit wurden dagegen Spektren aus Na-Addukt Signalen erhalten. [197]

### 2.5.4 Andere Präparationstechniken

Neben den zuvor beschriebenen Präparationstechniken gibt es darüber hinaus weitere, die meist gleichzeitig zum Transfer des Analyten aus einer anderen analytischen Technik in das MALDI Massenspektrometer dienen. So kann zum Beispiel mit der sogenannten „Impulse-Driven-Droplet-Deposition“ die Flüssigchromatographie mit der MALDI-MS gekoppelt werden. [169] Die Auftragung der Probe auf das Target erfolgt mit einer Spule, an welcher eine gepulste Spannung anliegt. Dadurch wird der hängende Tropfen der LC Kapillare mittels Impulsübertragung auf das Target transferiert ohne dass die Kapillare dieses berührt. Für die Online-Kopplung der Kapillarelektrophorese mit MALDI-MS kann ein Vakuumauftrage-Interface verwendet werden. [201] Dabei wird das Analyt/Matrix-Gemisch kontinuierlich auf einem, in Vakuum befindlichen, Band aufgetragen. Von diesem wird dann durch Laserbeschuss die Probe desorbiert und gemessen. Zum Herstellen homogener Oberflächen eignet sich auch das sog. Spincoating. [167] Dabei werden Tropfen in die Mitte eines rotierenden Targets aufgetragen. Durch die schnelle Rotation wird ein gleichmäßiger Film erzeugt und überschüssiges Material weggeschleudert.

## 2.6 Fragmentierungstechniken

Ein wesentlicher Vorteil der MALDI Methode besteht darin, intakte und meist einfach geladene Ionen zu erzeugen. Dagegen führt die unbeabsichtigte Fragmentierung beim Laserbeschuss (In-Source Decay - ISD) oder im TOF Analysator (Post Source Decay - PSD) zu einer substantiellen Verringerung der Spektrqualität, im Wesentlichen durch eine Abnahme der Auflösung und einer Reduktion der Signalintensität. [202] Andererseits bietet die gezielte Fragmentierung (z.B. Collision Induced Dissociation - CID) eine zusätzliche Möglichkeit, Strukturinformationen zu erhalten.

Vor der Einführung von TOF/TOF Instrumenten stellte die Post-Source Fragmentierung eine der wenigen Möglichkeiten dar, überhaupt Fragmentierungsanalytik zu betreiben. [203-205] Als PSD wird die Fragmentierung von metastabilen Molekülen in der Driftstrecke bezeichnet. Die Fragmentierung erfolgt dabei durch eine hohe innere Energie (z. B. durch Laser, Protonentransferreaktion), welche mindestens der Bindungsdissoziationsenergie entsprechen muss. Die verwendete Matrix kann ebenfalls Einfluss auf die Fragmentierung haben. Diese werden, entsprechend ihrer Anfangsgeschwindigkeiten, in „harte“ und „weiche“ Matrizes unterteilt. „Härtere“ Matrizes haben eine geringere Anfangsgeschwindigkeit und führen zu stärkeren Fragmentierungen. [80]

Mitte der 90iger Jahre wurde ein neuer Fragmentierungsmechanismus beschrieben, der in den ersten 100 ns nach der Bildung der Ionen erfolgt. Dieser wurde In-Source Decay - ISD bezeichnet. [206, 207] Der Nachweis von positiven als auch negativen Ionen, lässt darauf schließen, dass Protonentransfer hierbei keine Rolle spielt. [208] Laut Köcher *et al.* sind in diesem Fall hauptsächlich Wasserstoffradikale für die Fragmentierung verantwortlich. [209] Im Vergleich zum PSD führt die ISD zu Bildung von komplexeren Fragmentionen-Serien, die auf Grund der geringen Signalintensität im Allgemeinen nicht zur Strukturaufklärung verwendet werden können. Ein weiteres Problem besteht darin, die erzeugten Fragmentionen einem Precursorion zuzuordnen zu können. Kombiniert man jedoch den ISD Prozess mit weiteren Fragmentierungsschritten (z. B. CID) in einer sogenannten MS<sup>n</sup> Analyse, können wertvolle Informationen erhalten werden. [210] Bei der CID werden die Analytionen durch Zusammenstöße mit neutralen Molekülen (meist Edelgasen) fragmentiert. Dies erfolgt in einer sogenannten CID Zelle, die bei einem höheren Druck ( $10^{-5}$ - $10^{-6}$  mbar) arbeitet. Zur eigentlichen Fragmentierung werden sogenannte Precursor Ionen durch ein elektrisches Feld (z. B. Lift Einheit des verwendeten Bruker Instruments) selektiert. [211] Die daraus durch Stöße erzeugten Fragmentionen werden in einer sich anschließenden zweiten TOF Einheit erneut beschleunigt und im Detektor nachgewiesen.

CID stellt eine der am häufigsten genutzten Methoden zur Strukturaufklärung sowohl von Biopolymeren und zunehmend auch von synthetischen Makromolekülen dar. [212-217]

Weitere Fragmentierungsmethoden, wie die Elektronentransferdissoziation (Electron Transfer Dissoziation – ETD bzw. Electron Capture Dissociation – ECD) werden erst seit ca. 10 Jahren gezielt zur Fragmentierung von Biopolymeren verwendet. Diese bieten den Vorteil, gezielt Modifikationen (z. B. Phosphorylierungs- und Glycosylierungsstellen) in Proteinen nachzuweisen, die mittels CID nicht nachweisbar wären. [218] Für die Untersuchung synthetischer Polymere spielen sie jedoch keine Rolle.

Eine Fragmentierung von Analytionen (z. B. in der Quelle, im Analysator) kann durch sogenanntes „Energy bzw Ion Cooling“ verhindert werden. Dazu wird ein Buffergas (meist Helium) in das Vakuum geleitet und so ein Druck von etwa  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  mbar eingestellt. Treffen ein Analytion und ein neutrales Gasmolekül aufeinander wird durch Energieübertragung die kinetische Energie des Analytions verringert und es „kühlt“ sich ab. Kollisionen erfolgen dabei sowohl in radialer, als auch in axialer Richtung, weshalb ein Quadrupol zum Fokussieren eines Ionenstrahls vorteilhaft ist. Verwendet werden deshalb orthogonal-QTOF Instrumente, da hierbei die Ionen in einem Winkel von  $90^\circ$  in das TOF eintreten. Dadurch werden die Ionen zeitgleich beschleunigt womit sich die Auflösung verbessert. Des Weiteren erhöht der kleinere Strahldurchmesser die Sensitivität des TOFs. [132, 219, 220]

## 2.7 MALDI-Imaging MS

MALDI-MS Imaging (MALDI-MSI) wurde erstmals von Caprioli *et al.* im Jahre 1997 beschrieben. [221] Mit Hilfe dieser Technik kann man die lokale Konzentration von Proteinen, Peptiden, Lipiden und Metaboliten in biologischen Gewebeproben bestimmen. Dazu werden Spektren eines zuvor definierten Bereiches in Form eines Rasters aufgenommen. Die Auswertung dieser Spektren resultiert meist in zweidimensionalen Darstellungen, die positionskorrelierte Ionenkonzentrationen wiedergeben (Abbildung 17). [222] Die erzielbare Auflösung wird durch den Durchmesser des Laserspots limitiert. Ist die Rastergröße kleiner als der Laserspottedurchmesser spricht man von Oversampling. Dadurch erhöht sich die Auflösung, weil, abgesehen vom ersten Spot, bei allen weiteren Spots nur noch eine sehr kleine Probenfläche von Laser ablatiert wird. Allerdings ist dazu die komplette Ablation des Materials an jeder Position notwendig. [223] Da in diesem Fall insgesamt jedoch vergleichsweise wenig Material desorbiert/ablatiert wird, ist die Spektrenqualität beim Oversampling deutlich geringer. Eine weitere Möglichkeit, die Auflösung zu erhöhen, besteht darin, den Laser über geeignete Linsensysteme zu fokussieren. Dies stellt jedoch eine große apparative Herausforderung dar, da die erforderlichen optischen Systeme in unmittelbare Nähe der Ionenquelle positioniert werden müssen. Häufig ergeben sich daraus Probleme mit der Homogenität des elektrischen Feldes, was letztlich wiederum zu einer Peakverbreiterung beiträgt. Durch Verwendung einer bei Atmosphärendruck (AP) arbeitenden MALDI-Quelle in Verbindung mit einem Orbitrap Massenspektrometer konnte eine Auflösung von 3  $\mu\text{m}$  erzielt werden. [64, 224] Eine weitere Möglichkeit bietet die Anordnung des Lasers hinter dem (transparenten) Target. [225] Der kleine einstellbare Laserspottedurchmesser (Ionenoptik direkt vor Probenpot) ermöglicht dadurch eine Ortsauflösung von 1-5  $\mu\text{m}$ . Durch Zusammensetzen mehrerer zweidimensionaler Bilder einzelner Mikrotomschnitte kann man auch dreidimensionale Darstellungen erzeugen. [226-228]

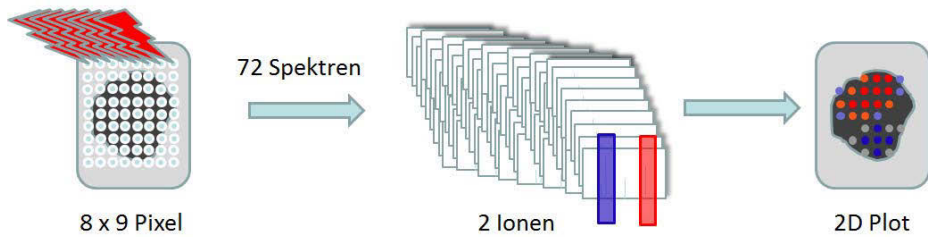


Abbildung 17: Prinzip des MALDI Imaging: Ein Laser scannt die Oberfläche einer Probe und nimmt dabei von jedem Spot ein Massenspektrum auf. Die lokale Intensität ausgewählter Ionen wird dann in eine Farbskala umgewandelt und dargestellt.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, kann die Intensität von ausgewählten Ionen aus den aufgenommenen Massenspektren farblich dargestellt werden. Darüber hinaus ist es möglich, derartige Ionenintensitätsplots von mehreren Ionen zu überlagern und damit Unterschiede in deren individuellen Verteilung festzustellen. Damit kann beispielsweise die laterale Verteilung von Biomarker, Metaboliten und Wirkstoffen in Gewebe simultan dargestellt werden. [229-231] Aber auch für synthetische Polymere stellt MALDI-MSI eine interessante Technik dar, mit der sich z. B. Segregationseffekte in Dried Droplet Probenpräparationen, die Verteilung von Additiven oder der Abbau von Polymeren bestimmen lassen. [180, 232-234]



### 3 Experimentelles

#### 3.1 Verwendete Chemikalien

Name *	Hersteller	Reinheit
ACN	Sigma Aldrich	p. A.
AgTFA	Sigma Aldrich	98,5%
B11-150	Clariant	-
CsCl	Merck	p. A.
DCTB	Sigma Aldrich	≥ 98%
Deionisiertes Wasser	-	-
DHB	Sigma Aldrich	≥ 99%
Dithranol	Sigma Aldrich	≥ 98%
DMF	Merck	p. A.
Ethanol	Sigma Aldrich	p. A.
KCl		
KTFA	Sigma Aldrich	98,5%
Methanol	Sigma Aldrich	p. A.
NaTFA	Sigma Aldrich	98,5%
<i>n</i> -Butylamin	Acros Organics	99%
PE6100	BASF	-
PE6400	BASF	-
PEG	Polymer Standards Service	-
PMMA	Polymer Standards Service	-
Polystyrol	Polymer Standards Service	-
PPG	Polymer Standards Service	-
RbCl	Merck	p. A.
Sinapinsäure	Sigma Aldrich	p. A.
THF	Sigma Aldrich	p. A.
Toluol	Uvasol	≥ 99,9%
Triethylamin	Acros Organics	99%

\* siehe Abkürzungsverzeichnis 6.1

## 3.2 Verwendete Geräte

### 3.2.1 MALDI-TOF-MS

Gerät:	Autoflex III smartbeam
Hersteller:	Bruker Daltonik, Bremen
Laser:	Nd:YAG (355 nm) / Repetitionrate: 200 Hz
Detektor:	Linear und Reflektordetektor (MCP)
Target:	MTP384 Edelstahl
Beschleunigungsspannung:	20 kV
Positiver Modus	
Linear bzw. Reflektron	
Imaging:	
Spektrum eines Pixel:	Je 5 Laserpulse von 100 verschiedenen Positionen im Umkreis von 10 $\mu\text{m}$ werden zu einem Spektrum akkumuliert
Rasterweite:	100-300 $\mu\text{m}$ (Abstand zwischen zwei Pixel)
Scanmodus:	Line-by-line Random Every second spot-every second line
Steuerung:	
FlexControl 1.4 (Bruker Daltonik)	
Datenverarbeitung:	
FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik)	
FlexImaging 4.0 (Bruker Daltonik)	

### 3.2.2 FTIR Mikroskop

Gerät:	Nicolet iN 10 MX
Hersteller:	Thermo Fisher
Messmodus:	Reflexion
Auflösung:	4 $\text{cm}^{-1}$

### 3.2.3 NMR

Gerät: Avance 600  
Hersteller: Bruker Biospin  
Frequenz: 600 MHz

Messeinstellungen:

Spektrale Breite (Sweep width): 6614 Hz  
Akquisitionszeit (Acquisition time): 9,9 s  
Anregungspulsbreite ( $^1\text{H}$  excitation pulse width): 7,6  $\mu\text{s}$  ( $90^\circ$ )  
Wiederholzeit (Relaxation delay): 20 s  
Anzahl der Scans (Number of scans): 16

### 3.2.4 Kontaktwinkelmessgerät

Gerät: OCA 20  
Hersteller: Dataphysics  
Messmethode: Sessile Drop

### 3.2.5 Fluoreszenzspektrometer

Gerät: Genepix 4300  
Hersteller: Molecular Devices  
Laser: 532 nm  
PMT-Spannung: 550 V  
Rel. Laserenergie: 15%  
Rasterweite: 5  $\mu\text{m}$

### 3.3 Probenvorbereitung

#### 3.3.1 Dried Droplet Probenpräparation

Die Matrix, der Analyt und das Salz (falls benötigt) wurden in einem geeigneten Lösemittel gelöst. Die Konzentration lag dabei im Bereich von 1-10 mg ml<sup>-1</sup>. Eine Ausnahme stellten die in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Matrixkonzentration dar, die bis zu 100 mg ml<sup>-1</sup> betragen.

Die einzelnen Lösungen wurden dann in einem Verhältnis von 10:1:1 bzw. 100:10:1 (Matrix:Analyt:Salz, v:v:v) in einem Eppendorf Vial gemischt. Die Auftragung auf das Target erfolgte mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Dabei wird ein Volumen zwischen 0,5 und 2,0 µl auf das Target abgesetzt. Als Kationisierungs-reagenzien wurden, in Abhängigkeit vom zu untersuchenden Polymer, die Salze Kaliumtrifluoracetat (PEG, PMMA, PS, PCL) und -chlorid (PEG), Natriumtrifluoracetat (PEG) sowie Silbertrifluoracetat (PS) verwendet.

Für die Untersuchung zur Lösemittelverdampfung (Kapitel 4.1) wurde die in Abbildung 18 dargestellte, selbstgefertigte „Klimakammer“ verwendet. Mit deren Hilfe war eine Regulierung auf ±1 K möglich.

Bei Verwendung einer ionischen Matrix (Kapitel 4.3.3), wurden 10 µl der synthetisierten ionischen Verbindung mit 10 µl Analytlösung (10 mg ml<sup>-1</sup>) vermischt. Bei diesen Untersuchungen wurde kein zusätzliches Kationisierungssalz verwendet.



Abbildung 18: Temperatur geregeltes Probenaufgabengefäß

### 3.3.2 Sandwich Probenpräparation

Bei der Sandwich Methode wurde die Matrix, der Analyt und das Salz analog zu den bei der Dried Droplet Methode verwendeten Konzentrationen gelöst. Anstelle einer Mischung werden jedoch die Lösungen einzeln aufgetragen, wobei die Auftragung der Matrix erst nach vollständiger Trocknung der vorheriger aufgesetzten Analytlösung erfolgte. Das Tropfenvolumen betrug wiederum jeweils 0,5-2  $\mu\text{l}$ .

### 3.3.3 Elektrospray Probenpräparation

Das Schema des verwendeten Gerätes - BAM ESAirD<sup>®</sup> - wurde in Abbildung 19 dargestellt. Es besteht aus einem in x-y Richtung beweglichen und geerdeten Targethalter aus Teflon. Zwischen diesem und der höhenverstellbaren Kapillare wird ein Feld durch Anlegen einer Hochspannung von bis zu 6 kV erzeugt. Die Matrix wird durch eine Spritzenpumpe ( $5 \mu\text{l min}^{-1}$ ) dosiert. Über das T-Stück kann zusätzlich eine GPC oder HPLC angeschlossen werden. Bei Bedarf kann die Verdampfung des Lösemittels durch ein zusätzliches Gas (z. B.  $\text{N}_2$ ), das bis auf  $180^\circ\text{C}$  erwärmt werden kann, verbessert werden.

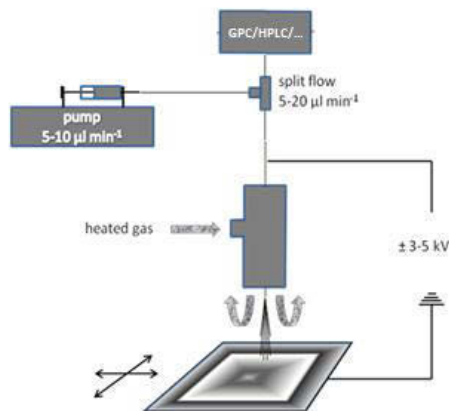


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Elektrospray Probenpräparation mit dem BAM ESAirD<sup>®</sup>.

#### 3.3.4 Probenpräparation mit ionischen Flüssigkeiten

Die ionischen Flüssigkeiten wurden nach dem Verfahren von Armstrong *et al.* [197] synthetisiert. Dazu wurden die Matrizes DHB, SA und DCTB jeweils in einer Konzentration von  $200 \text{ mM l}^{-1}$  in Methanol gelöst. Diese Lösungen wurden anschließend mit der äquimolaren Menge eines Amins (*n*-Butyl- bzw. Triethylamin) gemischt. Nach intensivem Schütteln lässt man das Lösemittel im Abzug bei Raumtemperatur verdampfen. Um die Viskosität der erhaltenen ionischen Flüssigkeit zu reduzieren, wird diese mit 2 ml Ethanol pro 40  $\mu\text{l}$  ionische Flüssigkeit verdünnt.

##### 3.3.4.1 DHB-IM

Für die Synthese der ionischen Matrix DHB-IM wurde *n*-Butylamin verwendet. Zur Synthesekontrolle wurde eine Serie von  $^1\text{H-NMR}$  Spektren aufgenommen. Die beiden Ausgangssubstanzen sind in Abbildung 20 (c) (*n*-Butylamin) und (d) (2,5-Dihydroxybenzoesäure) dargestellt. Um die charakteristische Peakverschiebung, die bei der Bildung eines Ammoniumkations erfolgen sollte nachweisen zu können, wurde in einem ersten Experiment deuterierte Salzsäure mit dem für die Synthese verwendeten Amin gemischt. Dadurch entsteht *n*-Butylammoniumchlorid, dessen  $^1\text{H}$ -Spektrum in Abbildung 20 (a) dargestellt ist. Ein Vergleich von Abbildung 20 (a) und (c) zeigt eine starke Tieffeldverschiebung der N-CH<sub>2</sub> Aminprotonen d und eine geringere Verschiebung der CH<sub>2</sub>-Protonen e und f, was auf die Bildung eines Ammoniumkations deutet. Die Verschiebung ist dabei umso stärker, je näher sich ein Proton am Ammoniumkation befindet. Eine ähnliche Verschiebung der Aminprotonen konnte ebenfalls nach der Zugabe des *n*-Butylamins zur DHB Matrix beobachtet werden (Abbildung 20 (b)). Darüber hinaus konnten keinerlei Signale der Ausgangsstoffe detektiert werden, was, in Kombination mit der Hochfeldverschiebung der aromatischen Protonen a und b (Abbildung 20 (b) und (d)), auf einen nahezu vollständigen Umsatz der Ausgangsstoffe zu einer ionischen Matrix schließen lässt.

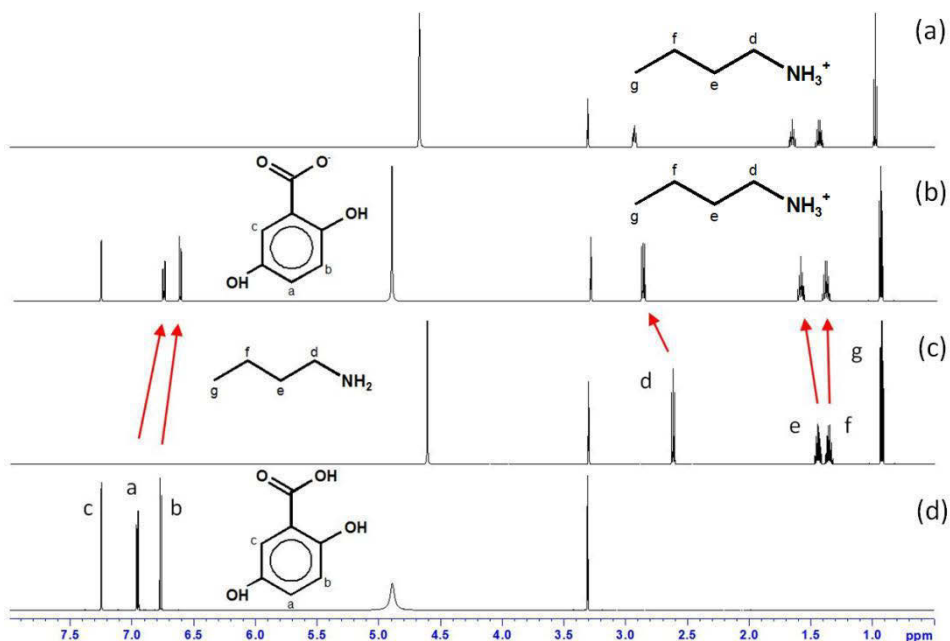


Abbildung 20:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CHD}_2\text{OD}$ ) von DHB-IM, Lösemittelsignale:  $\text{CHD}_2\text{OD}$  (3,3 ppm),  $\text{HOH}$  und  $\text{CD}_3\text{OH}$  (4,9 ppm), (a) 7,9  $\mu\text{l}$   $n\text{-Butylamin}$  + 13,3  $\mu\text{l}$   $\text{DCI}$  (20% in  $\text{D}_2\text{O}$ , ca. 6M), (b) 12,3 mg DHB + 7,9  $\mu\text{l}$   $n\text{-Butylamin}$ , (c) 7,9  $\mu\text{l}$   $n\text{-Butylamin}$ , (d) 12,3 mg DHB

### 3.3.4.2 SA-IM

Für die Synthese einer ionischen Matrix der Sinapinsäure wurde Triethylamin verwendet. Deren erfolgreiche Synthese wurde wiederum mit Hilfe von NMR Messungen, bestätigt. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 21 dargestellt. Analog zum vorherigen Experiment wurde die Bildung des Ammoniumsalzes durch einen Versuch mit deuterierter Salzsäure und Triethylamin vorab geprüft (Abbildung 21 (a)). Ein Vergleich mit dem NMR Spektrum des ursprünglichen Amins (Abbildung 21 (c)) zeigt, dass wiederum eine starke Tieffeld-Verschiebung an den Aminprotonen a und b nachweisbar war. Eine ähnliche Tendenz wie die zuvor für DHB beschriebene Verschiebung der aromatischen Matrix-Protonen wurde auch im NMR Spektrum der gebildeten ionischen Flüssigkeit (Abbildung 21(b)) gefunden.

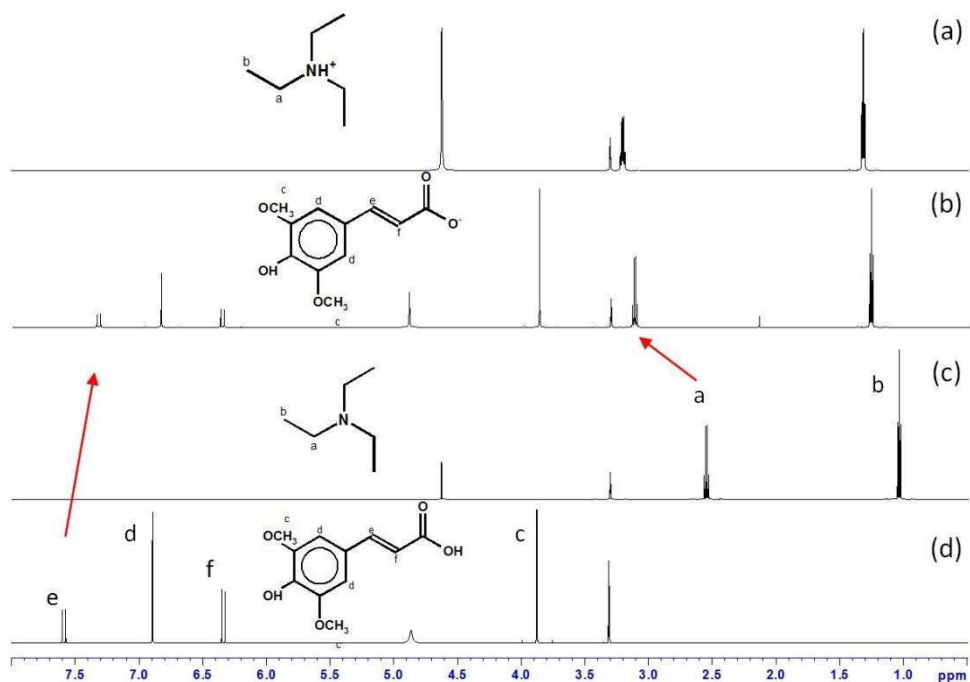


Abbildung 21:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CHD}_2\text{OD}$ ) von SA-IM, Lösemittelsignale:  $\text{CHD}_2\text{OD}$  (3,3 ppm),  $\text{HOH}$  und  $\text{CD}_3\text{OH}$  (4,9 ppm), (a) 7,1  $\mu\text{l}$  Triethylamin + 8,5  $\mu\text{l}$   $\text{DCl}$  (20% in  $\text{D}_2\text{O}$ , ca. 6M), (b) 11,9 mg SA + 6,8  $\mu\text{l}$  Triethylamin, (c) 7,1  $\mu\text{l}$  Triethylamin, (d) 11,9 mg SA.

### 3.3.4.3 DCTB-IM

Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Matrices weist DCTB keine Carboxylgruppe auf. Somit musste die Frage geklärt werden, ob überhaupt ionische Strukturen gebildet werden können. Abbildung 22 zeigt die  $^1\text{H-NMR}$  Spektren von reinem DCTB (d), Triethylamin (c), sowie den beiden Substanzen unmittelbar nach dem Vermischen (b). Da eine deutlich geringere Azidität der DCTB Matrix im Vergleich zu DHB oder SA angenommen wurde, wurde von einer längeren Reaktionszeit zwischen dem Amin und DCTB ausgegangen. Deshalb wurde ein weiteres Spektrum der Mischung nach sieben Tagen aufgenommen (Abbildung 22 (a)). Unmittelbar nach dem Vermischen beider Substanzen konnte lediglich eine geringe Hochfeld-Verschiebung der DCTB Protonen an der Position d und e (0,1 ppm) und f (0,2 ppm) festgestellt werden. Auch die Tieffeld-Verschiebung der Aminprotonen an der Position a war sehr gering. Nach sieben Tagen war die Verschiebung jedoch deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 22 (a) und (b)). Ein möglicher Grund für die schlechte



Qualität der Signale der aromatischen Protonen b und c nach sieben Tagen ist deren weitere Aufspaltung in b' und c'. Dies kann durch eine sterische Hinderung der Rotation des aromatischen Rings durch dessen Interaktion mit dem relativ sperrigen Ammoniumion hervorgerufen werden. Die MALDI-Versuche zeigten jedoch, dass die gebildete ionische DCTB Matrix bis zu einer Woche ohne nachweisbare Veränderung im Ionisierungsverhalten verwendet werden konnte.

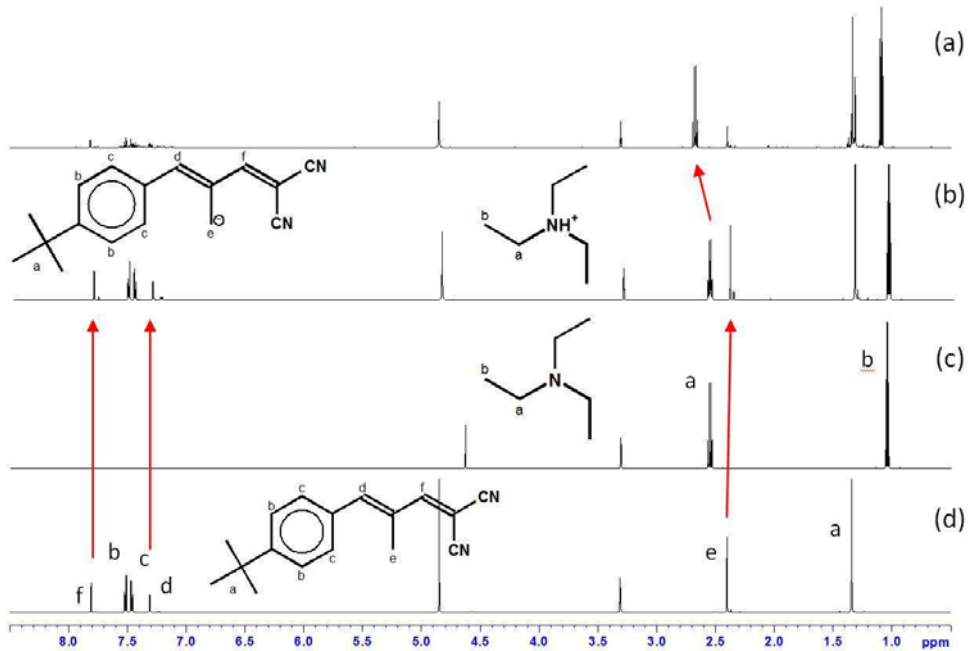


Abbildung 22: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CHD<sub>2</sub>OD) von DCTB-IM, Lösemittelsignale: CHD<sub>2</sub>OD (3,3 ppm), HOH und CD<sub>3</sub>OH (4,9 ppm), (a) 12 mg DCTB + 7,1 µl Triethylamin nach 7 Tagen, (b) 12 mg DCTB + 7,1 µl Triethylamin nach vermischen, (c) 7,1 µl Triethylamin, (d) 12 mg DCTB.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

Da die untersuchte Probenpräparation auf einem äußerst komplexen System aus Lösemittel, Polymer und Matrix beruht, wurden dessen einzelne Bestandteile und deren Beitrag zur Segregation im Folgenden separat untersucht. Zusätzliche Faktoren, die einen Beitrag zur Entmischung von Probenspots liefern könnten (z. B. das Targetmaterial oder dessen Rauigkeit) konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet werden.

### 4.1 Einfluss des Lösemittels auf die Segregation

Die Wahl des Lösemittels hat einen erheblichen Einfluss auf die Beschaffenheit der Probenspots und damit auch auf die Ausbildung von Ringen. Deshalb wurden zu Beginn Experimente mit verschiedenen Lösemitteln und unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt.

Wie von Deegan beschrieben, werden die bei der Verdunstung des Lösemittels generierten Kapillarkräfte als Hauptursache für die Ausbildung von Eintrocknungsringen angesehen. [175] Da mit steigender Temperatur auch die Verdampfungsgeschwindigkeit steigt, stellt der Einfluss der Temperatur einen wesentlichen Faktor dar, der die Homogenität des Probenspots beeinflussen kann. Zur Bestimmung der Verdampfungsgeschwindigkeit wurden Messungen mit einem Kontaktwinkelmessgerät durchgeführt. Dazu wurden mit einem automatischen Spotter jeweils 2  $\mu\text{l}$  unterschiedlicher Lösemittel auf ein temperierbares MALDI Target gegeben. In Abbildung 23 ist stellvertretend die Kontaktwinkelmessung an einem Wassertropfen gezeigt.

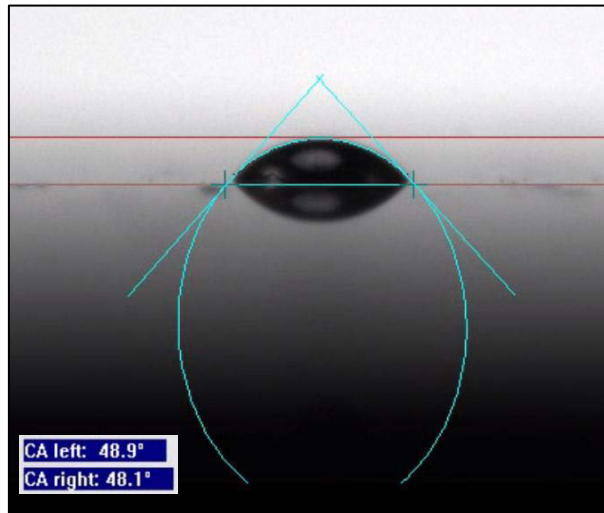


Abbildung 23: Kontaktwinkelmessung an einem 2 µl Wassertropfens. Anpassung: Circle Fit

Die Anpassung an den Tropfen und Auswertung erfolgte dabei mit einem sogenannten Circle Fit, welcher neben den Kontaktwinkeln auch das Tropfenvolumen aus der Kugelkappe gemäß Formel (10) berechnet.

$$V = \pi h^2 \cdot \frac{3r - h}{3} \quad (10)$$

- V      Volumen
- h      Höhe der Kugelkappe
- r      Radius der Kugel

Zur Bestimmung der Verdampfungsgeschwindigkeit (VG) wird die Abnahme des Volumens über die Zeit aufgetragen. Abbildung 24 zeigt die Abnahme bei unterschiedlichen Temperaturen für einen Wassertropfen. Die Berechnung der Verdampfungsgeschwindigkeit erfolgt mittels einer linearen Anpassung (rote Linien) gemäß Formel (11) deren Koeffizienten in Tabelle 2 dargestellt sind. Analoge Messungen wurden ebenfalls für die Lösemittel ACN und DMF durchgeführt.

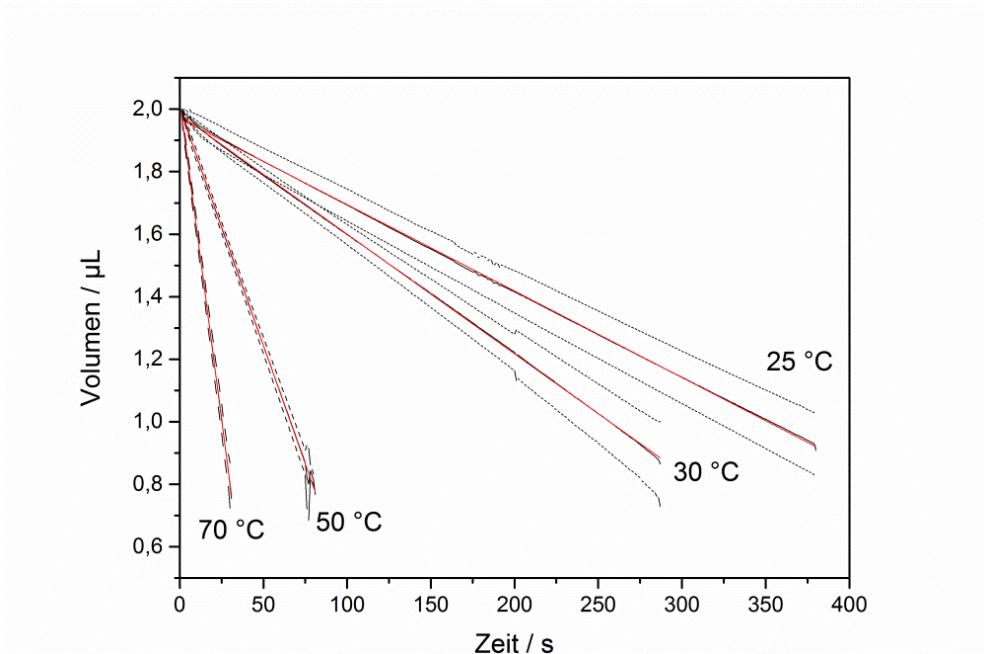


Abbildung 24: Abnahme des Volumens eines 2 µl Wassertropfens über die Zeit. Rote Linien sind angepasste Geraden gemäß Formel (11) deren Koeffizienten in Tabelle 2 dargestellt sind. Die punktierten Linien stellen den Bereich der Standardabweichung dar.

$$V = -VG \cdot t + V_0 \quad (11)$$

V	Volumen
VG	Verdampfungsgeschwindigkeit
t	Zeit
V <sub>0</sub>	Anfangswert

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2: Koeffizienten der linearen Anpassung der Volumenabnahme über die Zeit (Formel (11)).  
Lösemittel: Wasser)

Temperatur °C	VG nl s <sup>-1</sup>	V <sub>0</sub>
25	2,760	1,971
30	3,821	1,982
50	15,160	2,003
70	40,922	2,031

In Abbildung 25 ist die Abhängigkeit der VG von der Temperatur dargestellt. Wie zu erwarten, ist die VG von ACN (schwarze Linie) um ein vielfaches höher als die von Wasser (rote Linie) oder DMF (grüne Linie).

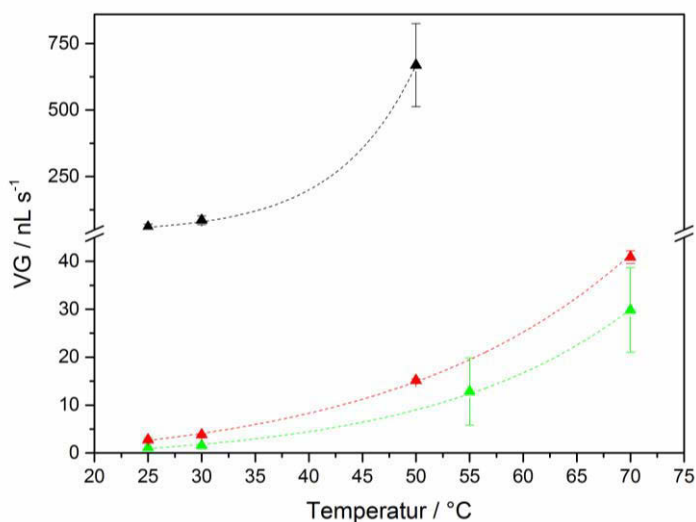


Abbildung 25: Verdampfungsgeschwindigkeiten VG von 2 µl Tropfen bei unterschiedlichen Temperaturen. Lösemittel Wasser (rote Linie), DMF (grüne Linie) und ACN (schwarze Linie).

Die Homogenität eines Dried Droplet Spots wurde bei unterschiedlichen Verdampfungsgeschwindigkeiten getestet. Als Matrix wurde dabei DHB verwendet welches mit dem Polymer PEG und dem Salz (Kaliumchlorid, KCl) im Verhältnis 100:10:1 (v:v:v) in Wasser gemischt wurde. Auf Grund der verhältnismäßig geringen Verdampfungsgeschwindigkeit ermöglicht dies eine lange Beobachtungsdauer. Außerdem führt die hohe Oberflächenspannung (Tabelle 3) zur Ausbildung „stabiler“ Tropfen.

Um eine konstante Temperatur zu gewährleisten wurde der Spotting- und Verdampfungsprozess in einer eigens konstruierten Klimakammer durchgeführt (Abbildung 18). Die Temperaturkonstanz wurde mit einem Temperatursensor (PT100) überwacht und betrug  $\pm 1$  K. In Abbildung 26 sind Intensitätsplots ausgewählter PEG Ionen dargestellt, die mit der Dried Droplet Methode bei unterschiedlichen Temperaturen gespottet wurden. Da aus diesen Bildern eine Abhängigkeit der Ringbreite von der Temperatur angenommen werden kann, wurden aus den Intensitätsplots (Abbildung 26 (b)) Intensitätsquerschnitte der Spots berechnet. Da die absolute Spotgröße unterschiedlich war, wurde, für eine bessere Vergleichbarkeit, die Distanz vom Spotzentrum zum Rand und die Signalintensität normalisiert (Abbildung 27). Die Darstellungen zeigen, dass bei höheren Temperaturen die Ionen  $m/z$  893, 1070 und 1334 sich weiter zum Rand des Tropfens bewegen. Dies führt automatisch zu schmaleren Ringen in denen mehr Material vorhanden sein muss. Gleichzeitig nimmt die Menge der Substanzen in der Spotmitte ab. Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut mit den von Deegan beschriebenen Kapillarkräften erklären. Je schneller die Verdampfung verläuft, desto höher ist der radiale Fluss. Die breiteren Ringe, speziell bei 20°C, basieren auf den Marangoni Strömungen, welche den Kapillarkräften entgegenwirken. Bereits eine Verdopplung der Verdampfungsgeschwindigkeit (Abbildung 25) führt jedoch zu einer beträchtlichen Erhöhung des radialen Flusses, wie ein Vergleich der 20°C und 30°C Bilder zeigt. Auffällig ist auch, dass bei 70°C neben einem deutlichen Ring wiederum Analytsignale in der Spotmitte detektierbar sind. Offensichtlich ist die Verdampfungsgeschwindigkeit bei dieser Temperatur so hoch, dass die Zeit für einen kompletten Transport an den Rand des Tropfens nicht mehr ausreicht.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

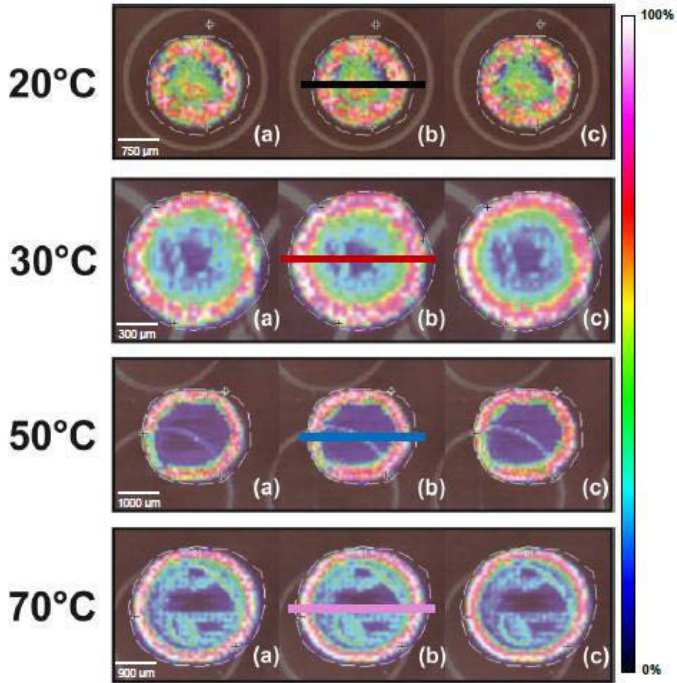


Abbildung 26: Ionenintensitätsplots von PEG mit DHB und KCl in Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen –  $m/z$  (a) 893, (b) 1070 und (c) 1334 .

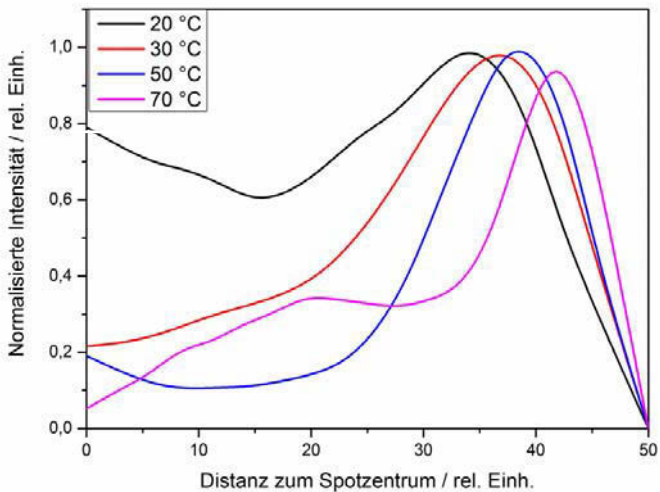


Abbildung 27: Normalisierte Intensitäten von Querschnitten (auf Spotzentrum normalisiert) der PEG Intensitätsplots von Abbildung 26 –  $K^+$   $m/z$  1070.



Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung eines extrem schnell verdampfenden Lösemittels und/oder das Erwärmen des Targets möglicherweise die Ringbildung verhindern kann. Dies ist jedoch bei vielen MALDI Anwendungen nicht möglich. Ein Erwärmen des Targets ist meist nicht praktikabel. Bei der Verwendung von schnell verdampfenden Lösemitteln sind ebenfalls Grenzen gesetzt. So wird Aceton beispielsweise zur Herstellung von HCCA Matrix Dünnschichtfilmen für biologische MALDI Applikationen verwendet. Allerdings ist dieses Lösemittel für die meisten synthetischen Polymere ungeeignet.

Neben den Verdampfungsgeschwindigkeits-Versuchen wurden Experimente mit PMMA und PEG in verschiedenen Lösemitteln durchgeführt. Dabei wurden die Polymerlösungen mit den Matrix- und Salzlösungen vorgemischt und jeweils 0,5  $\mu\text{l}$  (DMSO 2  $\mu\text{l}$  - um einen ähnlichen Spotdurchmesser zu erhalten) bei Raumtemperatur auf das Target aufgetragen. Abbildung 28 zeigt die Intensitätsplots des  $m/z$  4046 PMMA Ions in (a) THF, (b) ACN, (c) Toluol, (d) DMF und (e) DMSO. Wie man deutlich erkennt, ist die Verteilung dieses Ions erheblich vom verwendeten Lösemittel abhängig. Eine unterschiedlich ausgeprägte Ringbildung kann bei (a) THF, (c) Toluol und (d) DMF beobachtet werden. Im Unterschied zum THF, wo ein weitgehend homogener Ring gebildet wurde, sind die Ringe die aus Toluol und DMF Lösungen resultieren, stark segmentiert. Die Verwendung von ACN resultierte in weitgehender Bedeckung des Spots und nur geringer Ringausbildung. Da die Verdampfungsgeschwindigkeit (Tabelle 3) von ACN jene von THF übersteigt, jedoch unterhalb derer von Toluol/DMF liegt, ist eine unmittelbare Korrelation zwischen Ringbreite und Verdampfungsgeschwindigkeit nicht möglich. Interessanterweise ist bei der Verwendung von DMSO (Abbildung 28 (e)) PMMA nur in einem kleinen Bereich des Spots detektierbar. Die Messung des Spots (e) (DMSO) erfolgte nach 60 Minuten im Tropfen. Durch die geringe Verdampfungsgeschwindigkeit des Lösemittels DMSO werden offensichtlich nur geringe oder keine Kapillarkräfte erzeugt, die für den Transport von Material an den Rand verantwortlich sind. Dadurch erfolgt eine Konzentrierung des Polymers in der Mitte des Spots. Interessanterweise ist im optischen Bild eindeutig Material auch an den anderen Stellen des Spots zu sehen. Da dort jedoch keine charakteristischen Polymersignale nachweisbar waren, muss es sich dabei um Matrix bzw. Salz handeln, welches möglicherweise auf Grund schlechterer Löslichkeit schon kurz nach Beginn des Verdampfens ausgefallen ist.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

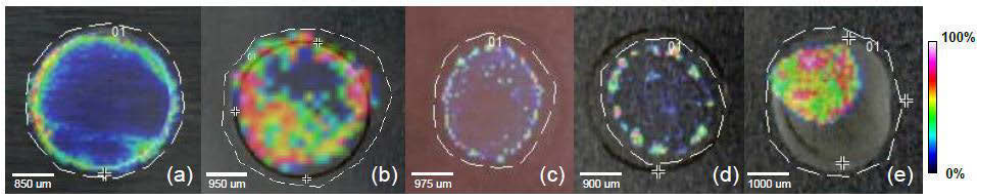


Abbildung 28: Ionenintensitätsplots –  $m/z$  4 046 einer Dried Droplet Probenpräparation von PMMA, KTFA und (a) Dithranol in THF, (b) DCTB in ACN, (c) Dithranol in Toluol, (d) Dithranol in DMF, (e) Dithranol in DMSO.

Da PMMA in einigen Lösemitteln nicht löslich ist (z. B. in Wasser) wurde als zweites Polymer PEG verwendet. Die Präparation der Probenspots erfolgte dabei analog zu den PMMA Versuchen. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt. Wie man erkennen kann, ist eine Ringbildung unabhängig vom verwendeten Lösemittel zu beobachten. Dabei sind jedoch deutlich Unterschiede hinsichtlich der Breite der Ringe festzustellen. Die Ringe von schnell verdampfenden Lösemitteln wie (a) MeOH und (b) THF sind bedeutend breiter und es können zusätzlich Signale in der Mitte des Spots detektiert werden. Während dies bei Verwendung von (d)  $H_2O$  nur noch z. T. möglich ist, erhält man mit (c) ACN einen typischen Ring. Neben der Verdampfungsgeschwindigkeit könnten auch andere physikalische Eigenschaften die Ringbildung beeinflussen. In Tabelle 3 sind der Siedepunkt, die dynamischen Viskosität und die spezifische Oberflächenspannung einiger Lösemittel aufgelistet. Allerdings konnte auch an Hand dieser Daten keine direkte Korrelation bezüglich der in den Abbildung 28 und Abbildung 29 gezeigten Tendenz zur Ringbildung abgeleitet werden.

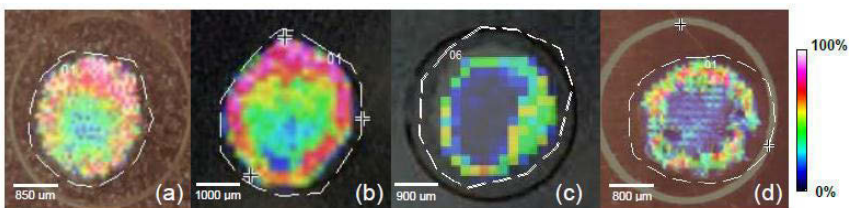


Abbildung 29: Ionenintensitätsplots –  $m/z$  3 052 einer Dried Droplet Probenpräparation von PEG, KTFA und (a) DHB in MeOH, (b) DCTB in THF, (c) DCTB in ACN, (d) DHB in  $H_2O$ .

Tabelle 3: Der Siedepunkt, die dynamische Viskosität  $\eta$  und die spezifische Oberflächenspannung  $\sigma$  ausgewählter Lösemittel bei 25°C. [235, 236]

LSM	Siedepunkt °C	$\eta$ $10^{-3} \text{ Pa s}$	$\sigma$ $\text{N m}^{-1}$
MeOH	64,7	0,54	0,0221
THF	66,0	0,46	0,0267
ACN	81,6	0,37	0,0287
Wasser	100,0	0,89	0,0727
Toluol	110,6	0,56	0,0279
DMF	153,0	0,79	0,0344
DMSO	189,0	1,99	0,0429

Eine weitere Vermutung bestand darin, dass die Ringbildung bzw. Polymersegregation auf die unterschiedliche Diffusion der Polymere im eintrocknenden Tropfen zurück zu führen sei. Eine Berechnung des Diffusionskoeffizienten kann mit der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel (12)) erfolgen. Dazu wird der hydrodynamische Radius des Polymers in dem jeweiligen Lösemittel benötigt. Dieser kann durch Kombination der Mark-Houwink-Gleichung (Formel (13)) und der Einstein-Viskositätsbeziehung (Formel (14)) berechnet werden. Die Konstante K beschreibt dabei die Wechselwirkung der gelösten Polymere mit dem Lösemittel, während a Informationen über die Molekülgeometrie wieder gibt. Beide Konstanten wurden vielfach experimentell bestimmt und für ausgewählte Systeme u. a. dem Polymer Handbook entnommen [237]. Durch Kombination der Formel (15) und Formel (14) kann das hydrodynamische Volumen durch den hydrodynamischen Radius ersetzt werden. Wird nach diesem umgestellt, kann der hydrodynamische Radius (Formel (16)) und somit auch der Diffusionskoeffizient (Formel (12)) berechnet werden. Die Ergebnisse für PMMA sind in Tabelle 4, die für PEG in Tabelle 5 zusammengefasst. Die erhaltenen hydrodynamischen Radien, Staudinger Indizes und Diffusionskoeffizienten stellen jedoch nur Näherungen dar. Beispielsweise wurden die Anwesenheit der Matrix und ein dadurch möglicherweise verändertes Knäuelverhalten nicht berücksichtigt. Zudem stammen die verwendeten Mark-Houwink Parameter K und a aus PMMA-Lösemittel Systemen für deren Messung höhermolekulare PMMA ( $>10\,000 \text{ g mol}^{-1}$ ) verwendet wurden.

Stokes-Einstein-Gleichung:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r_h} \quad (12)$$

D	Diffusionskoeffizient / $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$k_B$	Boltzmann-Konstante $1,3806 \cdot 10^{-23} / \text{J K}^{-1}$
$\eta$	dynamische Viskosität des Lösemittels / $\text{N s m}^{-2}$
$r_h$	hydrodynamischer Radius der diffundierenden Teilchen / nm

Mark-Houwink-Gleichung:

$$[\eta] = K \cdot \left(\frac{M}{M_e}\right)^a \quad (13)$$

$[\eta]$	intrinsische Viskosität (Staudinger Index) / $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K	Konstante für ein Polymer-Lösemittelsystem / $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
M	Molmasse / $\text{g mol}^{-1}$
$M_e$	Einheitsmasse $1 \text{ g mol}^{-1}$
a	Konstante für ein Polymer-Lösemittelsystem

Einstein-Viskositätsbeziehung:

$$[\eta] = 2,5N_A \cdot \frac{V_h}{M} \quad (14)$$

$N_A$	Avogadro Konstante ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
$V_h$	hydrodynamisches Volumen / $\text{m}^3$

$$V_h = \frac{4\pi \cdot \langle r_h^2 \rangle^{\frac{3}{2}}}{3} \quad (15)$$

$$r_h = \sqrt[3]{\frac{[\eta] \cdot 3M}{4\pi \cdot 2,5N_A}} \quad (16)$$

Tabelle 4: Mark-Houwink Parameter  $K$  und  $a$ , sowie errechnete Kenngrößen von PMMA 4 000 bei einer Temperatur von  $^{1}25$ ,  $^{2}30$  oder  $^{3}35^{\circ}\text{C}$ .

LSM	$K / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	$a$	Ref.	$[\eta] / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	$r_h / \text{nm}$	$\eta / 10^{-3} \text{Pa s}$	$D / 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$
THF <sup>1</sup>	0,0104	0,70	[237]	3,46	1,30	0,46	3,66
ACN <sup>2</sup>	0,0393	0,50	[237]	2,49	1,16	0,34	5,07
Toluol <sup>1</sup>	0,0071	0,71	[238]	2,56	1,17	0,56	3,32
DMF <sup>1</sup>	0,0040	0,79	[239]	2,76	1,21	0,79	2,29
DMSO <sup>3</sup>	0,0474	0,05	[240]	2,30	1,24	1,99	0,89

Tabelle 5: Mark-Houwink Parameter  $K$  und  $a$ , sowie errechnete Kenngrößen von PEG 3 000 bei einer Temperatur von  $25^{\circ}\text{C}$ .

LSM	$K / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	$a$	Ref.	$[\eta] / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	$r_h / \text{nm}$	$\eta / 10^{-3} \text{Pa s}$	$D / 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$
MeOH	0,0852	0,57	[237]	8,17	1,57	0,54	2,55
THF	0,0200	0,73	[241]	6,91	1,49	0,46	3,19
Wasser	0,0499	0,67	[237]	10,66	1,72	0,89	1,42

Vernachlässigt man Kapillarkräfte und Marangoni Strömungen, die auf einen verdampfenden Tropfen wirken, kann die durch Diffusion zurückgelegte Wegstrecke nach Formel (17) abgeschätzt werden. [242] Die Größe  $t_e$  (evaporation time) entspricht dabei der Zeit, die ein  $0,5 \mu\text{l}$  Tropfen zum Verdampfen braucht. Sofern diese Zeit nicht mit Formel (11) und den Koeffizienten in Tabelle 2 berechnet werden konnte, wurden sie gravimetrisch bestimmt. Dabei wurden  $0,5 \mu\text{l}$  Lösemittel auf eine Waage pipettiert und die Abnahme der Masse in Abhängigkeit der Zeit aufgezeichnet. Das Ergebnis für PMMA und PEG ist in

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6 dargestellt. Wie man erkennen kann, ist der Einfluss der Diffusion bei schnell verdampfenden Lösemitteln mit einer mittleren Strecke von 50-75  $\mu\text{m}$  gering. Bei Verwendung langsam verdampfender Lösemittel (z. B. DMF, DMSO) ist der Einfluss der Diffusion dagegen erheblich größer. Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen verschiedenen Polymeren (mit ähnlicher Molmasse) im gleichen Lösemittel ebenfalls sehr gering (z. B. PEG und PMMA in THF). Damit erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die Diffusion Ursache für deren unterschiedliche lokale Verteilung im Spot ist. Der Vergleich zweier PMMA mit unterschiedlicher Molmasse ( $4\,000\text{ g mol}^{-1}$  und  $10\,000\text{ g mol}^{-1}$ ) in ACN zeigt ebenfalls, dass der Einfluss der Diffusion auf die beobachtete molmassenabhängige Entmischung (siehe Kapitel 4.2.3) eher zu gering ist. Verwendet man anstatt ACN das Lösemittel DMF, beträgt der Unterschied in der Diffusionsstrecke ca.  $80\ \mu\text{m}$  und somit im Bereich der Ortsauflösung eines konventionellen MALDI-MS. Je langsamer ein Lösemittel verdampft, desto stärker ist der Einfluss der Diffusion auf die Segregation.

$$xD = \sqrt{D \cdot et} \quad (17)$$

$xD$  Durch Diffusion zurückgelegte Wegstrecke /  $\mu\text{m}$

$et$  Verdampfungszeit / s

Tabelle 6: Durch Diffusion zurückgelegte Wegstrecke  $xD$  in der Verdampfungszeit  $et$

Polymer	Molmasse $\text{kg mol}^{-1}$	LSM	$et$ s	$xD$ $\mu\text{m}$
PMMA	4	THF	15	74
	10	ACN	9	54
	4	ACN	9	67
	4	Toluol	70	152
	4	DMF	520	345
	10	DMF	520	263
	4	DMSO	3600	565
PEG	3	MeOH	14	57
	3	THF	15	69
	3	Wasser	180	160

## Fazit

Wie die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführten Versuche mit PEG und der DHB Matrix zeigten, ist die Homogenität der Spots, die unter Verwendung der Dried Droplet Auftragung präpariert wurden, stark von der Verdampfungsgeschwindigkeit abhängig. Im Bereich zwischen 20 und 50°C nahm die Ringbreite mit steigender Temperatur ab. Bei einer weiteren Erhöhung der Verdampfungsgeschwindigkeit kehrte sich dieser Effekt allerdings um und die Breite des Ringes nahm wieder zu. Wurde die Verdampfungsgeschwindigkeit durch die Wahl unterschiedlicher Lösemittel variiert, konnten dagegen keine Trends festgestellt werden. So bildete sich bei Verwendung von ACN und PMMA ein weitgehend homogener Spot, während die Kombination ACN und PEG in einen Ring resultierte. Darüber hinaus konnten keine Korrelationen mit der Viskosität bzw. der Oberflächenspannung der verwendeten Lösemittel festgestellt werden. Der Einfluss der Diffusion ist nur bei langsam verdampfenden Lösemitteln wie z. B. DMF und DMSO ausgeprägt genug, um zur Segregation beitragen zu können. Beispielsweise beträgt bei DMF der Unterschied in der durch Diffusion zurückgelegten Wegstrecke von PMMA mit einer Molmasse von 10 000 g mol<sup>-1</sup> und 4 000 g mol<sup>-1</sup> lediglich etwa 100 µm.

## 4.2 Einfluss der Polymere auf die Segregation

Wie schon mehrfach vermutet, scheinen neben dem Lösemittel auch die Struktur und die Molmasse der Polymere einen erheblichen Einfluss auf die Ausbildung von Ringen zu haben. Aus diesem Grund wurden Experimente mit verschiedenen Homopolymeren unterschiedlicher Molmasse, Blockcopolymeren und Polymerblends durchgeführt. Um ausschließlich die Segregationseffekte untersuchen zu können, die durch die Polymere selbst hervorgerufen wurden, musste ein Einfluss der Matrix komplett ausgeschlossen werden. Deshalb wurden für die folgenden Experimente die Matrix/Salz Lösungen nach der Tropfenpräparation der Polymerlösung mittels Elektrospray aufgetragen (ESD).

Aufgrund des Vakuums ( $<10^{-6}$  mbar) in der MALDI Quelle des Massenspektrometers ist jedoch gerade bei gesprühten Matrixpräparationen mit einer Sublimation der Matrix zu rechnen. So wurde häufig festgestellt, dass bei einem Verbleib des Targets in der Quelle über Nacht die Matrix komplett vom Target entfernt worden war. Da MALDI Imaging Experimente in Abhängigkeit von der Pixelgröße z. T. mehrere Stunden dauern können und die Messung vieler hundert Probenpositionen erfordern, wurde versucht, zur Erhöhung der Messrate, sowie der Reduzierung eines möglichen Verlustes an Signalintensität durch Matrixsublimation, nur jede zweite Position des Probenrasters zu messen. Darüber hinaus wurde auch nur jede zweite Zeile gescannt. Die restlichen Positionen des Spots wurden unmittelbar danach in einem zweiten Durchgang gemessen. Abbildung 30 zeigt den Intensitätsplot eines PMMA  $m/z$  4046 Ions präpariert mittels Dried Droplet Präparation. Wie in dieser Abbildung zu sehen ist, wurden Signale nur an Positionen gemessen, die im ersten Scan erfasst wurden. Der zweite Scan der restlichen Positionen lieferte keine Signale mehr. Als Hauptursache dafür wird die höhere thermische Belastung dieser Positionen durch den Laserpuls im ersten Lauf angesehen. Bei Verwendung des üblichen Scanmodus – spot by spot and line by line – werden nur die jeweils benachbarten Spots vom Laser beeinflusst. Außerdem ist der Einfluss des Lasers auf alle Spots, mit Ausnahme der ersten Reihe(n), gleich. In dem hier verwendeten Scanmodus – every 2<sup>nd</sup> spot and every 2<sup>nd</sup> line – werden alle Spots, welche sich zwischen zwei Messreihen bzw. zwischen zwei gemessenen Spots in einer Reihe befinden, mehrfach indirekt vom Laser beeinflusst. In Kombination mit dem Hochvakuum führt dies offensichtlich zu einer erhöhten Sublimation der Matrix an diesen Punkten.



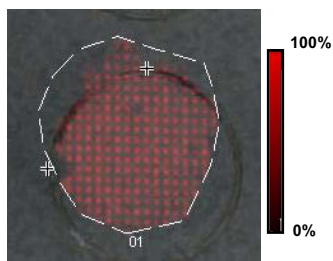


Abbildung 30: Ionenintensitätsplot von PMMA  $m/z$  4 046 in THF. Auftragung der Matrix/Salz Lösung (DCTB/KTFA in EtOH) erfolgte mittels Elektrospray. Scan Modus: „jeder zweite Spot jeder zweiten Zeile, verbleibende Spots im Anschluss“.

Die gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass bei Verwendung gesprühter Matrices ein kontinuierlicher Scanmodus gewählt werden muss. Dabei sollten die Messzeiten nicht länger als 5h Stunden sein, um eine Sublimation der Matrix und eine damit verbundene Verfälschung der Intensitätsplots zu verhindern.

## 4.2.1 Konstitution der Polymere

### 4.2.1.1 Homopolymere

Ein Vergleich der (bei identischen experimentellen Parametern) erhaltenen Ergebnisse, die in Abbildung 28 (b) und Abbildung 29 (c) gezeigt wurden, deutet auf einen strukturellen Einfluss der Polymere hin. Um ausschließlich die Segregationseffekte untersuchen zu können, die durch die Polymere selbst hervorgerufen werden, musste ein Einfluss der Matrix komplett ausgeschlossen werden. Deshalb wurden für die folgenden Experimente die Matrix/Salz Lösungen wiederum mittels Elektrospray aufgetragen (ESD). Zuvor wurden je  $0,5 \mu\text{l}$  der Polymere, gelöst in THF ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ), als Tropfen auf das Target aufgebracht. Für diese Versuche wurden neben Polystyrol und Polymethylmethacrylat auch lineares (l-PCL) und cyclisches Polycaprolacton (c-PCL) verwendet. Die entsprechenden Polymer-Strukturen sind in Abbildung 32 dargestellt. Abbildung 31 zeigt die gemessenen Intensitätsplots der intensivsten Ionen der jeweiligen Polymere (Maximum der Peakverteilung). Im Vergleich zu den in Abbildung 28 gezeigten Darstellungen, die nach Auftragung gemischter Matrix/Polymer Lösungen erhalten wurden, hat sich die Homogenität der Spektren bei reiner Polymerauftragung deutlich verbessert. Während im Fall des Polystyrols (Abbildung 31(a)) zwar immer noch eine Ringbildung sichtbar ist, zeigt

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

das Bild in Abbildung 31(b) deutlich eine zunehmende Konzentrierung von PMMA in der Mitte des Spots.

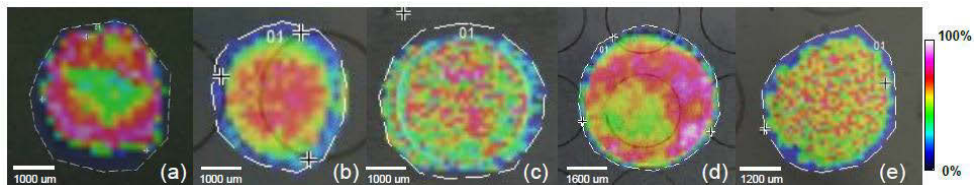


Abbildung 31: Ionenintensitätsplots von (a) PS  $m/z$  3 707, (RA/AgTFA), (b) PMMA  $m/z$  4 046, (DCTB/KTFA), (c) l-PCL  $m/z$  4 280, (DCTB/KTFA), (d) PS  $m/z$  1 624, (DCTB/AgTFA) und (e) c-PCL  $m/z$  1637, (Dithranol/KTFA). ESD der Matrix/Salz-Lösung (10:1, v:v).

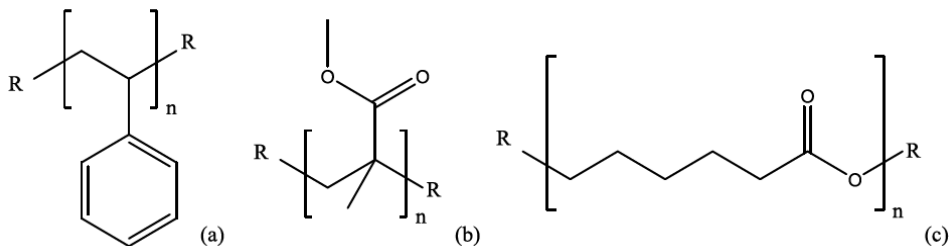


Abbildung 32: Strukturen von (a) Polystyrol, (b) Polymethylmethacrylat und (c) Polycaprolacton.

Da das gleiche Lösemittel verwendet wurde und beide Polymere annähernd dieselbe Molmasse aufweisen, lassen sich diese Unterschiede auf die Struktur zurückführen. Einen wesentlichen Unterschied zwischen beiden Strukturen stellt der aromatische Ring der Monomereinheiten des PS dar. Dagegen weist sowohl PCL als auch PMMA jeweils eine Carboxylgruppe pro Monomereinheit auf. Die geringfügig homogenere Verteilung des l-PCL und speziell des c-PCL stammt möglicherweise von der, im Vergleich zum PMMA, etwas längeren aliphatischen Kette des Polycaprolactons und einem dadurch veränderten Knäuelverhalten. Ein Vergleich der Plots der beiden PCL zeigt nur geringe Unterschiede. Beide Spots sind im Vergleich zum PS und PMMA deutlich homogener, wobei eine geringfügig höhere Intensität des l-PCL in der Spotmitte detektiert werden kann. Diese könnte möglicherweise durch die Differenz der Molmassen der beiden PCL (l-PCL  $m/z$  4280 und c-PCL  $m/z$  1637) hervorgerufen sein. Dieser Einfluss wird im Kapitel 4.2.3 näher diskutiert.

Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Ursache der Ringbildung zeigt sich beim Vergleich der Abbildung 28 und Abbildung 31. Während in nahezu allen Plots der Abbildung 28 ein deutlicher Ringeffect zu beobachten war, ist dies in Abbildung 31 lediglich eingeschränkt der Fall. So sind die Ringe in Abbildung 31(a) und (d) deutlich breiter als die in Abbildung 28 dargestellten und das PMMA Ion  $m/z$  4046 konzentriert sich in der Spotmitte. Der einzige Unterschied zwischen den diesen Bildern zu Grunde liegenden Präparationsmethoden war die An- bzw. Abwesenheit von Matrix im abgesetzten Tropfen. Es kann eindeutig festgestellt werden, dass bei Anwendung der Dried Droplet Methode die Anwesenheit von Matrix die Bildung von Ringen signifikant verstärkt.

#### 4.2.1.2 Copolymere

Da Copolymere aus mindestens zwei unterschiedlichen Monomereinheiten bestehen, die unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften aufweisen, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch beim Eintrocknen von Copolymerlösungen Entmischungsphänomene stattfinden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Anordnung der Monomereinheiten in der Kette statistisch (-A-B-A-A-B-B-), alternierend (-A-B-A-B-A-B-), oder in Blöcken (z. B.  $A_{10}-B_{10}-A_{10}$ ) erfolgen kann. Um wiederum jeglichen Beitrag der Matrix zur Segregation auszuschließen, wurde diese nach der Dried Droplet Spotpräparation der Polymerlösungen aufgesprüht (Elektrospray).

Abbildung 33 zeigt ein typisches Massenspektrum eines statistisch-verteilten Ethylenoxid (EO) - Propylenoxid (PO)-Copolymers. Das Spektrum weist eine gaußförmige Molmassenverteilung mit einem Peakmaximum bei ca.  $m/z$  2400 auf. Wie man dem vergrößerten Bereich zwischen  $m/z$  2280-2320 entnehmen kann, führt die Vielzahl der möglichen  $EO_x-PO_y$  Kombinationen zu einer Überlagerung der einzelnen Isotopenmuster. So besteht jedes der drei Isotopenmuster aus 3-4 einzelnen Copolymeren. Als Beispiel können für das mittlere Muster die Massen  $m/z$  2298,1, 2300,1 und 2302,1 den Copolymeren  $EO_{14}PO_{28}$ ,  $EO_{18}PO_{25}$  und  $EO_{22}PO_{22}$  zugeordnet werden. Somit sollte es möglich sein, Segregationseffekte nur anhand von Änderungen im Isotopenmuster der Überlagerungen festzustellen, da diese jeweils nahezu gleiche Molmassen bei unterschiedlichen EO/PO-Verhältnissen darstellen. So repräsentiert der Peak bei  $m/z$  2298,1 ein Copolymer mit doppelt so hohem PO Anteil (im Vergleich zum EO), während der Peak bei  $m/z$  2302,1 ein 50/50 Copolymer darstellt. Die Ionen-Intensitätsplots dieser drei ausgewählten Zusammensetzungen (respektive Massen) sind in Abbildung 34

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

dargestellt. Unabhängig vom EO zu PO Verhältnis findet man ein weitgehend homogenes inneres Plateau, welches von einem Ring mit niedrigerer Intensität umgeben ist. Abgesehen von leichten Inhomogenitäten ist die Intensitäts-Verteilung der Ionen nahezu gleich. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, da mögliche strukturbedingte Separationen vom statistischen Aufbau des Copolymers überlagert werden. Im Gegensatz dazu sollten Segregationseffekte, wenn vorhanden, bei Blockcopolymeren deutlicher nachzuweisen sein, da in diesen Verbindungen längere Ketten einheitlicher Polymerstrukturen vorhanden sind. Aus diesem Grunde wurden für die folgenden Experimente zwei EO/PO/EO-Tri-Blockcopolymeren mit unterschiedlichem EO Anteil untersucht.

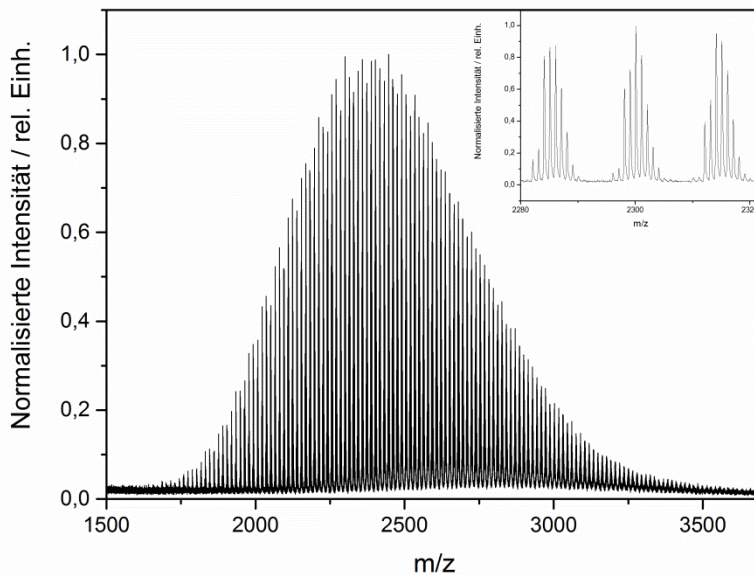


Abbildung 33: MALDI-TOF Massenspektrum eines statistischen EO-PO-Copolymers. (Matrix: DCTB + KTFA, in THF). Insert: Vergrößerter Bereich  $m/z$  2 280-2 320.

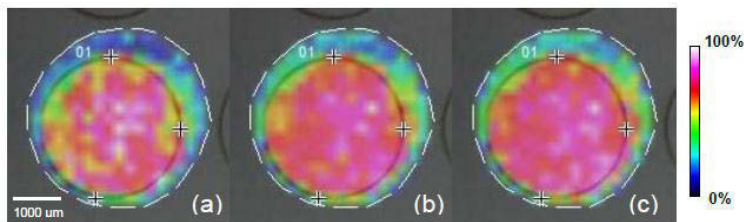


Abbildung 34: Ionenintensitätsplots des EO/PO-Copolymers in THF.  $K^+$   $m/z$  (a) 2298,1 ( $EO_{14}PO_{28}$ ), (b) 2300,1 ( $EO_{18}PO_{25}$ ), (c) 2302,1 ( $EO_{22}PO_{22}$ ). ESD der DCTB/KTFA-Lösung (10:1, v:v).

Das MALDI Massenspektrum des EO/PO/EO-Blockcopolymer mit einem (vom Hersteller angegebenen) EO-Anteil von 10 mol-% ist in Abbildung 35 dargestellt. Die 2D Darstellung der Copolymer-Zusammensetzung wurde mit einem an der BAM entwickelten Programm (MassChrom2D) aus den MALDI Daten errechnet und ist in der rechten oberen Ecke des Massenspektrums dargestellt. Die mit diesem Programm berechnete Copolymer-Zusammensetzung am Maximum des MALDI Spektrums liegt bei 4 EO und 27 PO Einheiten und damit deutlich unter den Herstellerangaben. Wie man jedoch auch sieht, findet sich ein zweites Intensitätsmaximum bei 0 EO/28 PO, das eines PO Homo-polymers, welches offensichtlich als Nebenprodukt bei der Synthese des Copolymers gebildet wurde. Für die Untersuchung möglicher Segregationseffekte wurden wiederum drei (Co)polymere ausgewählt, die sich zwar deutlich in der Zusammensetzung, aber nur geringfügig in ihren Molmassen unterschieden –  $m/z$  1798,3 ( $PO_{30}$ ),  $m/z$  1800,2 ( $EO_4PO_{27}$ ) und  $m/z$  1802,2 ( $EO_8PO_{24}$ ). Die Intensitätsplots dieser Ionen sind in Abbildung 36 dargestellt. Wie schon im Fall des statistischen Copolymers können die ausgewählten Massen auf dem gesamten Spot detektiert werden, unabhängig von der gewählten Zusammensetzung. Vergleicht man das Homopolymer (a) mit dem Block-Copolymer (b), so erkennt man, dass die Intensitätsverteilung weitgehend ähnlich ist. Lediglich in Bild (c) sind kleinere Bereiche zu erkennen, die eine geringfügig andere Intensitätsverteilung aufweisen. Damit sind jedoch keine eindeutigen Unterscheidungen möglich, so dass auch in diesem Fall wiederum davon ausgegangen werden kann, dass es zu keiner strukturabhängigen Segregation gekommen ist.

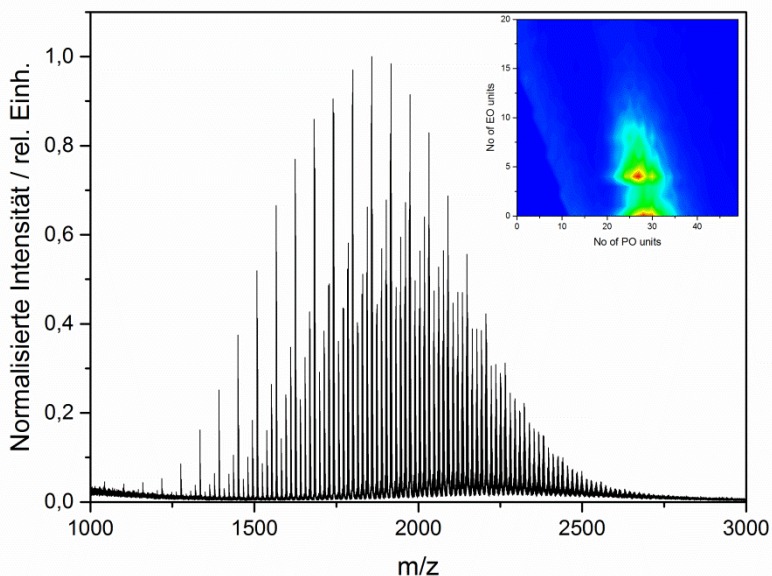


Abbildung 35: MALDI-TOF Massenspektrum des EO/PO/EO-Blockcopolymers mit 10 mol-% EO Anteil (Matrix: DCTB + KTFA, in THF). Insert: 2D Darstellung der Copolymer-Zusammensetzung.

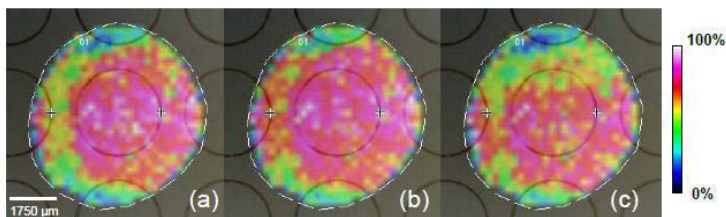


Abbildung 36: Ionenintensitätsplots des EO/PO/EO-Blockcopolymer in THF.  $K^+$   $m/z$  (a) 1 798,3 (PO30), (b) 1 800,2 (EO4PO27), (c) 1 802,2 (EO8PO24). ESD der DCTB/KTFA-Lösung (10:1, v:v).

Da die Auswertung der Intensitätsplots in Abbildung 36 zu keinem eindeutigen Ergebnis führte, wurde ein weiteres EO/PO/EO-Blockcopolymer untersucht, das einen höheren EO-Anteil von 40 mol-% aufweist. Dessen MALDI Massenspektrum, sowie eine 2D Darstellung der Copolymer-Zusammensetzung ist in Abbildung 37 dargestellt. Die gelben Bereiche an der linken oberen und rechten unteren Ecke des 2D Plots stellen dabei Isobare dar. Aufgrund der Massengenauigkeit des MALDI TOF Massenspektrometers können die

Massenzahlen, die theoretisch zwei unterschiedlichen Copolymer-Zusammensetzungen entsprechen, nicht eindeutig unterschieden werden. Ein Beispiel stellt die Masse  $m/z$  2216 dar. Die exakte Molmasse eines Copolymeren mit der Zusammensetzung  $\text{EO}_{31}\text{PO}_{13}$  beträgt  $2216,42 \text{ g mol}^{-1}$ , während ein Copolymer mit der Zusammensetzung  $\text{EO}_2\text{PO}_{35}$  die Masse  $2216,58 \text{ g mol}^{-1}$  aufweist. In der 2D Darstellung werden deshalb beide Möglichkeiten dargestellt. Eine Unterscheidung ist, wie von Weidner *et al.* gezeigt, u.a. mittels Fragmentierungsanalytik möglich. [243] Die Intensitätsplots der Ionen  $m/z$  2518,6 ( $\text{EO}_{19}\text{PO}_{28}$ ), 2520,6 ( $\text{EO}_{23}\text{PO}_{25}$ ) und 2522,6 ( $\text{EO}_{27}\text{PO}_{22}$ ) sind in Abbildung 38 gezeigt. Der Vergleich mit Abbildung 36 zeigt jedoch, dass in diesem System eine ausgeprägte Ringbildung stattgefunden hat. Diese ist in Abbildung 38 (a) deutlich geringer als in Plot (b) und (c) sichtbar, was darauf schließen lässt, dass ein erhöhter EO-Anteil möglicherweise eher zur Ringbildung führt. Eine mögliche Erklärung ist die unterschiedliche Löslichkeit der Copolymeren in Abhängigkeit des EO/PO-Anteils.

Da Blockcopolymeren mit einem noch höheren EO Anteil nicht zur Verfügung standen, wurde weitere Experimente mit Mischungen beider Homopolymere (Polymerblends) durchgeführt.

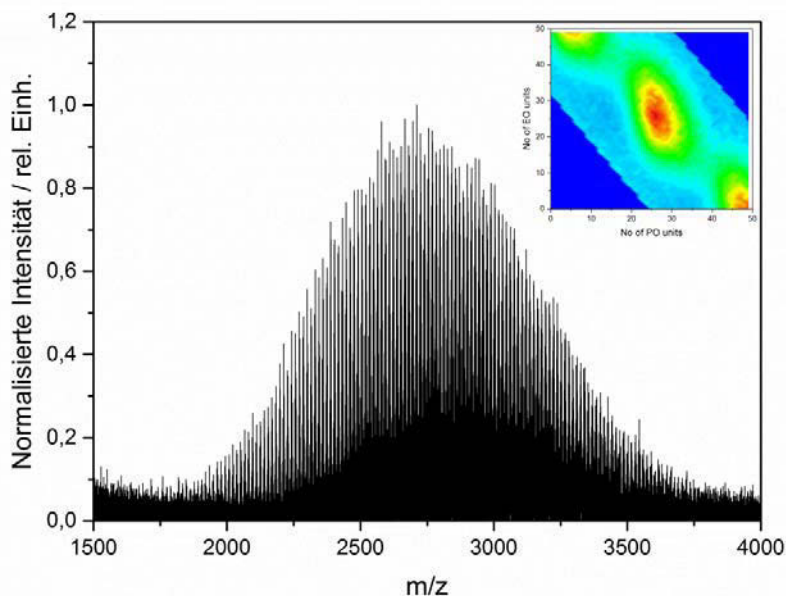


Abbildung 37: MALDI-TOF Massenspektrum des EO/PO/EO-Blockcopolymeren mit 40 mol-% EO Anteil (Matrix: DCTB + KTFA, in THF). Insert: 2D Darstellung der Copolymer-Zusammensetzung.

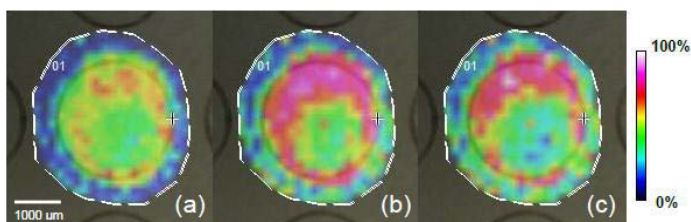


Abbildung 38: Ionenintensitätsplots des EO/PO/EO-Blockcopolymer in THF.  $K^+$   $m/z$  (a) 2 518,6 (EO19PO28), (b) 2 520,6 (EO23PO25), (c) 2 522,6 (EO27PO22). ESD der DCTB/KTFA-Lösung (10:1, v:v).

### 4.2.2 Polymerblends

Da Polymere in Blends, im Gegensatz zu „echten“ Copolymeren keine chemische Bindung aufweisen, sollten in diesen Systemen mögliche strukturbedingte Entmischungseffekte eindeutiger nachweisbar sein. Für die nachfolgenden Versuche wurden verschiedene Blends aus PEO, PPO, PMMA, c-PCL und l-PCL verwendet, die ähnliche Molmassen aufwiesen. Damit sollte wiederum eine molmassenabhängige Segregation ausgeschlossen werden. Gleiches galt für die Matrix, die um eine matrixbedingte Segregation auszuschließen, „trocken“ mittels Elektrospray aufgetragen wurde.

In Anlehnung an die Copolymer Experimente (4.2.1.2) wurden in einem ersten Versuch die Polymere PEO und PPO im Verhältnis 1:1 (v:v) gemischt, auf das Target getropft und nach Eintrocknung mittels MALDI Imaging MS gemessen. Das optische Bild sowie die Intensitätsplots für die Ionen  $m/z$  2074 (PPO) und 3519 (PEO) sind in Abbildung 39 dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass, obwohl im optischen Bild der Präparation keine Entmischungerscheinungen sichtbar waren, sowohl PPO, als auch PEO einen Ring ausbilden. Dabei unterscheiden sich die Intensitätsplots jedoch im Detail. Wie in Abbildung 39 (b) zu sehen ist, sind nur sehr geringe Signale für das PPO Ion  $m/z$  2074 in der Spotmitte nachweisbar. Dies deutet auf einen Transport an den Rand des Spots. Darüber hinaus ist eine Anreicherung in der oberen Hälfte des Ringes zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist die Detektion des PEO Ions  $m/z$  3519 trotz der beobachteten Ringbildung auf fast der gesamten Spotfläche möglich (Abbildung 39 (c)). Auch hier findet man eine Anreicherung in der oberen Hälfte des Spots. Die Ursache dieses lokalen Maximums wird in der Beschaffenheit der Targetoberfläche vermutet. So können Inhomogenitäten auf der Targetoberfläche (z. B. Riefen oder Vertiefungen) einen gerichteten Fluss des Lösemittels induzieren. [180] Eine mögliche Erklärung für die Entmischung der beiden Polymere stellt deren unterschiedliche Löslichkeit dar.



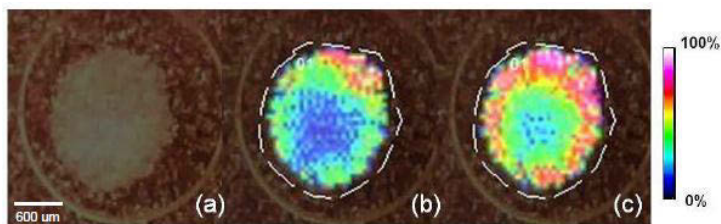


Abbildung 39: Optisches Bild (a) und Ionenintensitätsplots einer 1:1 (v:v) Mischung von PEO und PPO (in MeOH) –  $\text{Na}^+$   $m/z$  (b) 2 074 (PPO), (c) 3 519 (PEO). ESD der DCTB/NaTFA-Lösung (10:1, v:v).

In einem weiteren Experiment wurden PEO mit PMMA in Acetonitril gelöst, gemischt (1:1; v:v) und auf das Target aufgetragen. Das optische Bild sowie die Intensitäten der Ionen  $m/z$  3 010 (PEO) und 4 050 (PMMA) sind in Abbildung 40 abgebildet. Auch in diesem Fall sind im optischen Bild keine Entmischungerscheinungen feststellbar. Die Ionenintensitätsplots zeigen dagegen klar eine Entmischung beider Polymere. So ist die Intensität des PEO Ions an den Stellen am größten, wo das PMMA Ion die geringste Intensität zeigt. Dies drückt sich in einem PEO Ring aus, der PMMA einschließt. Diese Ergebnisse stimmen mit den in Abbildung 28 und 29 erhaltenen Daten überein, die zeigen, dass PEO in ACN einen Ring bildet, während PMMA deutlich homogener eintrocknet. Auch in diesem Fall kann vermutet werden, dass die unterschiedliche Löslichkeit der Polymere, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten auszufallen beginnen, Ursache der beobachteten Entmischungseffekte ist.

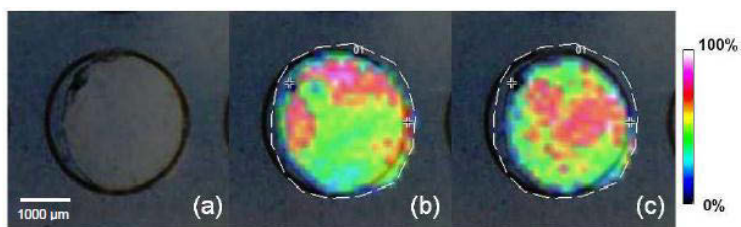


Abbildung 40: Optisches Bild (a) und Ionenintensitätsplots einer 1:1 (v:v) Mischung von PMMA und PEO (in ACN) –  $\text{K}^+$   $m/z$  (b) 3 010 (PEG); (c) 4 050 (PMMA). ESD der DCTB/KTFA-Lösung (10:1, v:v).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

In einem weiteren Experiment wurde ein Polymerblend aus c-PCL und l-PCL untersucht. Beide Ionen ( $m/z$  1637 und 1655) haben eine identische Anzahl an Monomereinheiten ( $n=14$ ), durch die unterschiedliche Konformation jedoch ein unterschiedliches hydrodynamisches Volumen. Die Intensitätsplots der Ionen  $m/z$  1637 (c-PCL) und 1655 (l-PCL) sind in Abbildung 41 dargestellt. Abbildung 41 zeigt deutlich, dass für beide Polymere die intensivsten Signale ausschließlich in den äußeren Bereichen des Spots erhalten wurden. Vergleicht man die beiden Intensitätsplots (b) und (c) erkennt man aber ein unterschiedliches Intensitätsprofil. So weist das cyclische Polycaprolacton einen breiteren Ring und eine höhere Intensität in der Mitte des Spots auf. Zur besseren Darstellung wurden die Intensitätsquerschnitte der Spots dargestellt. Um beides besser vergleichen zu können, wurde jeweils die Distanz vom Spotzentrum zum Rand sowie die Signalintensität normalisiert (Abbildung 42). Die Abbildung unterstreicht die Erkenntnisse aus Abbildung 41.

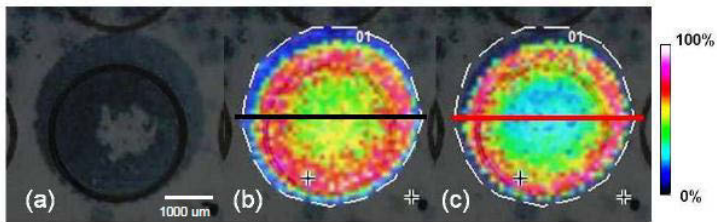


Abbildung 41: Optisches Bild (a) und Ionenintensitätsplots einer 1:1 (v:v) Mischung von c-PCL und l-PCL (in THF) –  $K^+$   $m/z$  (b) 1637 (c-PCL;  $n = 14$ ); (c) 1655 (l-PCL;  $n = 14$ ). ESD der DCTB/KTFA-Lösung (10:1, v:v).

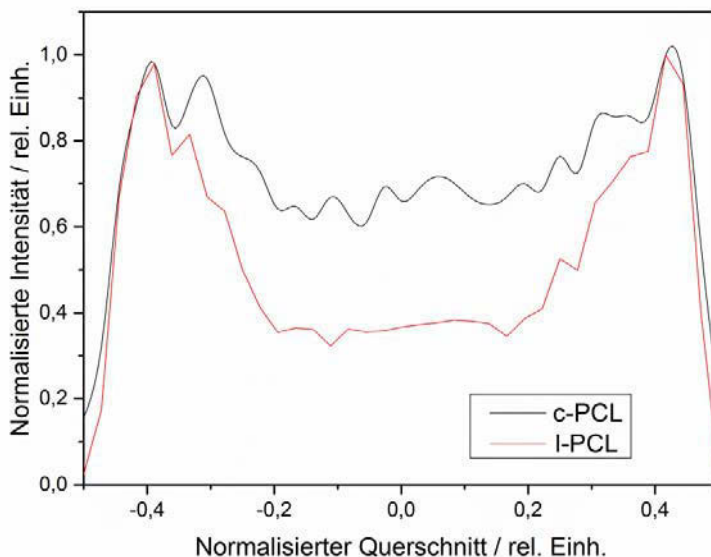


Abbildung 42: Normalisierte Intensitäten von Querschnitten (auf Spotzentrum normalisiert) der PCL Intensitätsplots von Abbildung 41 –  $K^+$   $m/z$  1 655 (rote Linie), 1 637 (schwarze Linie).

### 4.2.3 Einfluss der Molmasse der Polymere

Die derzeit übliche Praxis, um auftretende Entmischungseffekte von Matrix und Analyten zu „mitteln“, schreibt vor, an mehreren Stellen der Spots zu messen und die einzelnen Spektren zu integrieren. [244] Eine darüber hinaus mögliche molmassenabhängige Entmischung innerhalb eines MALDI Spots wird dabei nicht berücksichtigt, hätte aber dramatischen Einfluss auf die Richtigkeit der Molmassenbestimmung mittels MALDI MS. Erste Versuche, die zeigten dass eine derartige Entmischung möglich ist und zu Fehlern von über 15 % führen kann, wurden von Weidner *et al.* veröffentlicht. [232] Aufbauend auf diesen Experimenten wurden verschiedene Probenspots durch Auftropfen einer Polymerlösung und Aufsprühen der Matrix/Salzlösung (Elektrospray) präpariert.

In Abbildung 43 sind die optischen Bilder und die Intensitätsplots der intensivsten Ionen ( $m/z$  3499 und 7350) von zwei Polystyrol-Standards ( $3500 \text{ g mol}^{-1}$  und  $8000 \text{ g mol}^{-1}$ ) dargestellt. Obwohl das optische Bild (a) eine scheinbar homogene Verteilung vermuten lässt, ist im Intensitätsplot des Ions  $m/z$  3499 die Ausbildung eines sehr breiten Ringes (b) beobachtbar. Im optischen Bild des höhermolekularen PS (c) ist dagegen ein dunkler Ring erkennbar. Interessanterweise wurden im Intensitätsplot des Ions  $m/z$  7350 die höchsten

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Signale im Inneren dieses Rings gefunden. Dies deutet wiederum auf einen Löslichkeitseffekt. Bei der Verdampfung des Lösemittels sollten die etwas höhermolekularen Anteile der Molmassenverteilung zuerst ausfallen, während die niedermolekularen Homologen länger gelöst bleiben und damit den Kapillarkräften und den durch diese generierten Transportvorgängen ausgesetzt sind.

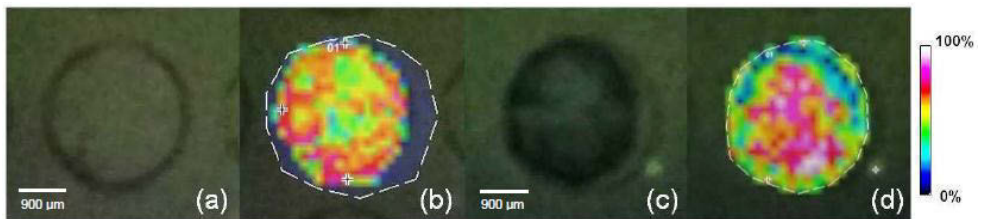


Abbildung 43: Optisches Bild und Ionenintensitätsplot von PS3500 (a, b) und PS8000 (c, d) (in THF) –  $\text{Ag}^+$   $m/z$  (b) 3 499, (d) 7 350. ESD der RA/AgTFA-Lösung (10:1, v:v).

In einem sich anschließenden Experiment wurden diese zwei Polystyrol-Standards als Mischung auf das Target aufgetragen. Nach dem Verdunsten des Lösemittels war im optischen Bild ein schmaler Ring erkennbar (Abbildung 44 (a)), welcher sich jedoch mit keinem der beiden Intensitätsplots der Ionen  $m/z$  3 499 und 8 706 deckt (siehe Abbildungen (b) und (c)). Die Ergebnisse der Einzelmessung (Abbildung 43) stimmen mit den Resultaten der Mischung (Abbildung 44) teilweise überein. Interessanterweise ist das Ion  $m/z$  3 499 in der Mischung weitgehend homogen verteilt und zeigt im Unterschied zur Einzelmessung (Abbildung 43 (b)) keinen Ringeffekt. Ein Vergleich der Ionenintensitäts-plots der größeren Ionen  $m/z$  7 350 (Abbildung 43 (d)) und  $m/z$  8 706 (Abbildung 44 (c)) zeigt jedoch deutlich eine ähnliche Tendenz. Die höchsten Intensitäten dieser Ionen wurden jeweils in der Mitte der Probenspots gefunden.

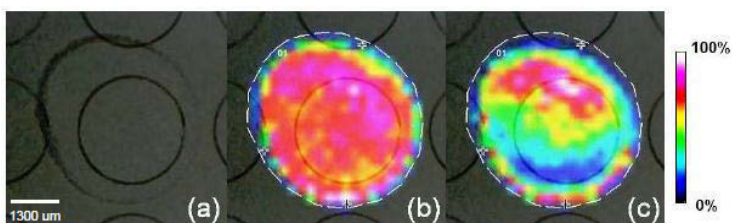


Abbildung 44: Optisches Bild (a) und Ionenintensitätsplots einer 1:1 (v:v) Mischung von PS3500 und PS8000 (in THF) –  $\text{Ag}^+$   $m/z$  (b) 3 499, (c) 8 706. ESD der RA/AgTFA-Lösung (10:1, v:v).

Wie Abbildung 31 zeigte, können Entmischungen auch strukturabhängig sein. Deshalb wurde in einem weiteren Versuch die Mischung zweier PMMA Standards hinsichtlich Molmassensegregation untersucht.

Im optischen Bild (Abbildung 45 (a)) ist ein breiter Ring erkennbar, der nahezu identisch mit der Lage der intensivsten Signale in den Intensitätsplots der Ionen  $m/z$  4046 (b) und  $m/z$  9052 (c) ist. Selbst bei genauerer Betrachtung unterscheiden sich die Ringe in ihrer Breite nur unwesentlich. Ein Vergleich mit den Polystyrol Messungen zeigt, dass die Molmassenunterschiede im Falle des PMMA offensichtlich weniger bedeutsam sind. Jedoch sind auch bei den PMMA Messungen, mit Ausnahme des Ringes, weitgehend homogene Plateaus in der Mitte des Spots erhalten worden. Zur besseren Darstellung wurden auch in diesem Beispiel die Intensitätsquerschnitte der Spots dargestellt. Um beides besser vergleichen zu können, wurde wiederum jeweils die Distanz vom Spotzentrum zum Rand sowie die Signalintensität normalisiert (Abbildung 46). Die Abbildung bestätigt die Erkenntnisse aus Abbildung 45.

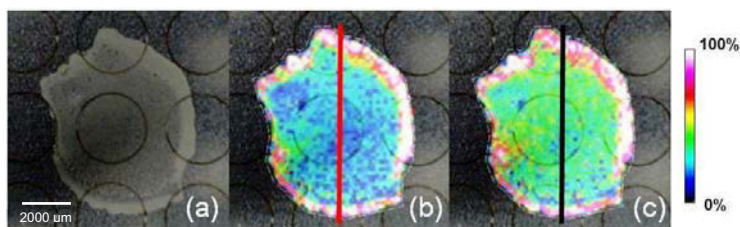


Abbildung 45: Optisches Bild (a) und Ionenintensitätsplots einer 1:1 (v:v) Mischung von PMMA4000 und PMMA10900 (in THF) –  $K^+$   $m/z$  (b) 4 046, (c) 9 052. ESD der Dithranol/KTFA-Lösung (10:1, v:v).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

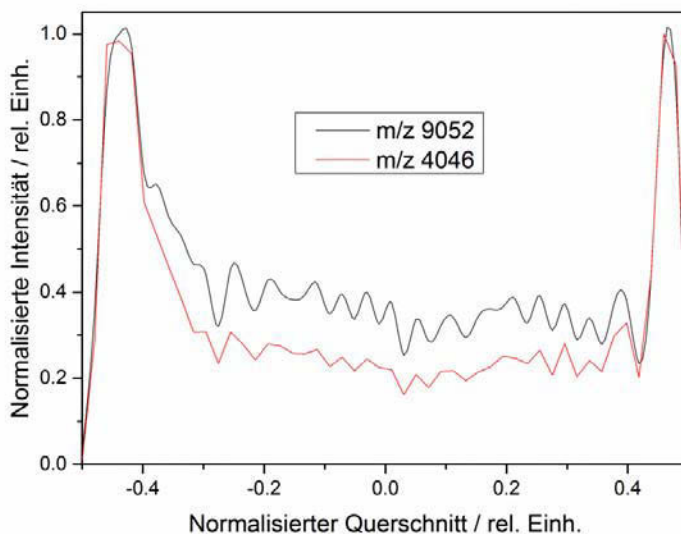


Abbildung 46: Normalisierte Intensitäten von Querschnitten (auf Spotzentrum normalisiert) der PMMA Intensitätsplots von Abbildung 45 –  $K^+$  m/z 4 046 (rote Linie), 9 052 (schwarze Linie).

In einem dritten Experiment wurde die mögliche molmassenabhängige Segregation von I-PCL untersucht. Das optische Bild in Abbildung 47 (a) zeigt einen sehr breiten Ring mit einem hellen Fleck in der Mitte des Spots, der offensichtlich nicht mit Material bedeckt zu sein scheint. Überraschenderweise wurden jedoch auch an dieser Stelle, unabhängig vom detektierten Ion (m/z 1655 und 4281), Signale erhalten. Ein Vergleich der Intensitätsplots (b) und (c) führt wiederum zu der Vermutung, dass sich kleinere Moleküle eher am Rand des Tropfens konzentrieren. So bildet das Ion mit der geringeren Molmasse einen charakteristischen Ring. Dieser schließt das in einem sehr breiten Ring angeordnete höhermolekulare Ion ein.

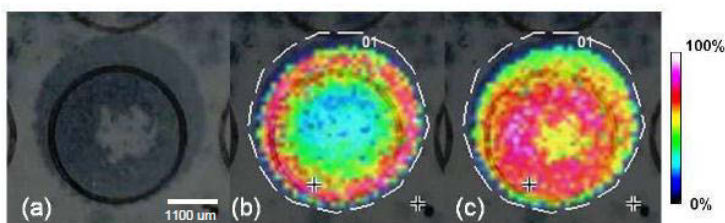


Abbildung 47: Optisches Bild (a) und Ionenintensitätsplots einer 1:1 (v:v) Mischung von I-PCL (in THF) –  $K^+$  m/z (b) 1 655, (c) 4 281. ESD der DCTB/KTFA-Lösung (10:1, v:v).

In einem weiteren Versuch wurde die Fluoreszenz-Spektroskopie als alternative bildgebende Technik angewandt. Dazu wurden zwei Spots mit Fluorescein-markierten Polystyrolstandards ( $M_w = 3\,500$  und  $8\,000\text{ g mol}^{-1}$ ) in THF gelöst und mit der Dried Droplet Methode präpariert. Im Unterschied zu den MALDI-Imaging Messungen wurden die Spots auf einem Glas-Objektträger aufgetragen. Wie in Abbildung 55 zu sehen ist, wurde sowohl für das PS mit der niedrigeren Molmasse, als auch das höhermolekulare PS die Ausbildung eines typischen Rings beobachtet. Bei genauerer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass der Ring der durch das niedermolekulare PS gebildet wird, an einigen Stellen deutlich schmaler ist. Im Unterschied dazu beobachtet man beim Spot des PS 8000 neben dem erwähnten etwas breiteren Ring auch deutliche Signale in der Spotmitte. Zur besseren Darstellung wurden die Intensitätsquerschnitte der Spots dargestellt. Um beides besser vergleichen zu können, wurde jeweils die Distanz vom Spotzentrum zum Rand sowie die Signalintensität normalisiert (Abbildung 49). Die Abbildung bestätigt die Vermutung, dass sich das kleinere Polystyrol weiter zum Rand des Tropfens bewegt. Gleichzeitig nimmt die Konzentration des Polymers in der Spotmitte deutlich ab (rote Linie). Neben dem breiteren Ring weist das höher molekulare Polystyrol in der Spotmitte eine erheblich höhere Intensität auf (blaue Linie). Im Vergleich zu den Ergebnissen der MALDI-Imaging Messungen muss man jedoch berücksichtigen, dass diese Daten möglicherweise von der Targetoberfläche beeinflusst sind.

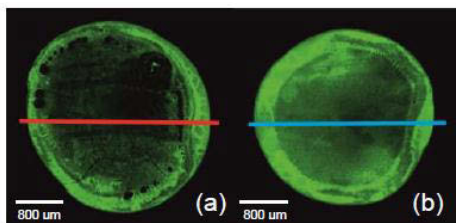


Abbildung 48: Fluoreszenzbilder von Polystyrol (Fluorescein-markiert) in THF ( $10\text{ mg ml}^{-1}$ ) mit einer mittleren Molmasse von (a)  $3\,500\text{ g mol}^{-1}$  und (b)  $8\,000\text{ g mol}^{-1}$ . Wellenlänge des Lasers:  $532\text{ nm}$ .

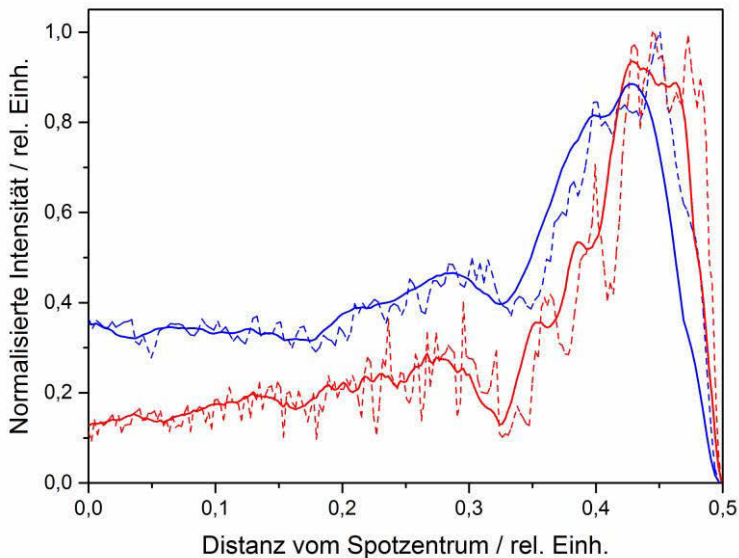


Abbildung 49: Intensitätsprofil von Polystyrol (Fluoresceinmarkiert) in THF mit einer mittleren molaren Masse von  $3\,500\text{ g mol}^{-1}$  (rote Linie) und  $8\,000\text{ g mol}^{-1}$  (blaue Linie). Das Profil wurde aus den Fluoreszenzbildern der Abbildung 48 berechnet und normalisiert. Die Roh-Daten (gestrichelte Linien) wurden mit dem gleitenden Durchschnitt (10. Ordnung) geglättet.

#### Fazit

Die Homogenität der Spots die durch Dried Droplet Auftragung der Polymere und anschließender Überschichtung durch Sprayauftragung der Matrix präpariert wurden, hat sich im Vergleich zur üblicherweise verwendeten Dried Droplet Methode eines Lösungsgemisches (Matrix/Polymer) wesentlich verbessert. Im Gegensatz zu den bei Verwendung der letzteren Methode fast ausschließlich zu beobachteten schmalen Eintrocknungsringen führt das Auftropfen der Polymerlösungen zu deutlich homogeneren Spots. Allerdings werden auch in diesen Beispielen Segregationseffekte beobachtet, die sowohl von der Struktur der Polymere, als auch von deren Molmasse abhängig zu sein scheinen. Beispielsweise war bei einer Mischung von PMMA und PEG eine Konzentrierung von PMMA in der Mitte und von PEG am Rand des Spots beobachtbar (Abbildung 40).

Segregationseffekte konnten ebenfalls bei der Untersuchung von identischen Polymerstrukturen mit unterschiedlichen Molmassen beobachtet werden. Die Ergebnisse der in 4.2.3 beschriebenen Versuche zeigen u. a. eine molmassenabhängige Verteilung der



Polymere. Dabei war zu beobachten, dass die Ringbildung deutlicher ausgeprägt war je kleiner ein Polymer war. Dieser Molmasseneffekt unterstützt die Vermutung, dass die Segregation primär durch Löslichkeitsunterschiede (strukturell und molmassenabhängig) hervorgerufen wird.

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die Matrix, als Molekül mit der geringsten Molmasse, möglicherweise wesentlich für die Bildung von Ringen verantwortlich ist. Daher wurde im nachfolgenden Kapitel gezielt der Einfluss der Matrix auf die Ringbildung untersucht.

### 4.3 Einfluss der Matrix auf die Segregation

#### 4.3.1 Verteilung der Matrix

Um die Homogenität der Matrixauftragung zu untersuchen, wurde ein 0,5 µl Tropfen einer reinen Matrix (DCTB) Lösung mit der konventionellen Dried Droplet Methode auf das Target aufgebracht (optisches Bild in Abbildung 50 (a)). Nach dem Verdampfen des Lösemittels wurde dieser Spot mit einer PMMA Polymerlösung (in THF) mittels Elektrospray übersprüht. Der dünne „transparente“ Polymerfilm ist in Abbildung 50 (b) dargestellt. Dieser Spot wurde anschließend mittels MALDI-MSI untersucht. In Abbildung 50 (c) ist der resultierende Intensitätsplot für das PMMA Ion  $m/z$  4046, welches das intensivste Signal im MALDI Spektrum aufweist, gezeigt. Vergleicht man dies mit dem optischen Bild (a), so erkennt man deutlich, dass die intensivsten Signale ausschließlich in den äußeren Bereichen des Spots erhalten wurden, in denen sich, wie im optischen Bild klar zu erkennen, der Hauptteil der Matrix befindet. In einem weiteren Schritt wurde der gesamte Spot mit zusätzlicher Matrix besprüht. Dazu wurde abermals das Elektrospray-Interface verwendet. Das Bild des Spots nach Auftragung der Matrix (siehe Abbildung 50 (d)) zeigt erwartungsgemäß keine Unterschiede zum vorherigen optischen Bild. Im Gegensatz dazu sind im Intensitätsplot des Ions  $m/z$  4046 (Abbildung 50 (e)) deutliche Unterschiede im Vergleich zu Abbildung 50 (c) erkennbar. Offensichtlich ist die in Abbildung 50 (c) detektierte Ringbildung ausschließlich auf die inhomogene Verteilung der Matrix durch die verwendete Dried Droplet Methode zurückzuführen, während sich das PMMA homogen über die gesamte Spotfläche ausgebreitet hat.

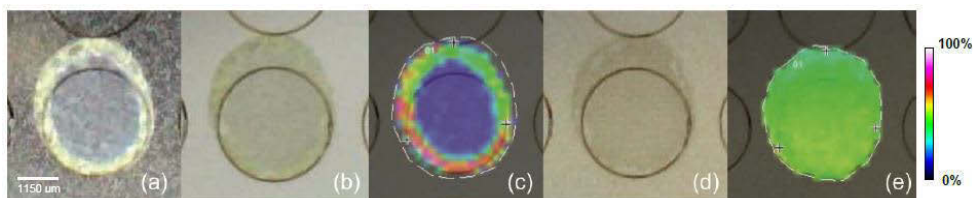


Abbildung 50: Optische Bilder und Intensitätsplots von PMMA  $m/z$  4046 ( $K^+$  Adduktion), (a) DCTB Matrix Dried Droplet, (b)+(c) Sprayauftragung der Polymer/Salz Lösung, (d) und (e) Sprayauftragung von DCTB Matrix auf dem gemessenen Spot.

Dies wurde in den nachfolgenden Experimenten eingehender untersucht. Zu diesem Zweck wurden vorgemischte Matrix/Polymer Lösungen unter Verwendung der Dried Droplet Technik aufgetragen und mittels MALDI-MSI untersucht. In diesem Versuch wurden zwei

PMMA Standards mit einer mittleren Molmasse von 4 000 und 10 000 g mol<sup>-1</sup> verwendet. In Abbildung 51 sind die entsprechenden optischen Bilder (I) und (II) des Probenspots nach Verdampfen des Lösemittels gezeigt. Dabei ist in beiden Fällen eine Ringbildung beobachtbar. Die Intensitätsplots der beiden intensivsten PMMA Ionen (m/z 4046 und 9052) sind in Abbildung 51 (Ia) und (IIa) dargestellt. Beide Bilder bestätigen die Ausbildung eines Ringes. Obwohl die Präparation beider Spots identisch erfolgte, zeigen die Mikroskop-Bilder (I) und (II) unterschiedlich breite Ringe. Im Falle des höher molekularen PMMA ist dabei ein deutlich breiterer Ring erkennbar. Die Ionen-Intensitätsplots (Ia) und (IIa) zeigen ebenfalls einen, wenn auch geringeren Unterschied in der Ringbreite. Des Weiteren zeigt ein Vergleich des optischen Bildes (II) mit dem Intensitätsplot (IIa), dass in Regionen in der Mitte des Spots, die eindeutig mit PMMA bedeckt sind, nur sehr geringe Signale erhalten werden konnten. Um die im vorherigen Experiment nachgewiesene Ringbildung durch die Matrix zu bestätigen, wurde auf die soeben gemessenen Spots wiederum zusätzliche Matrix mit dem Elektrospray Interface homogen aufgetragen. Die resultierenden Intensitätsplots sind in Abbildung 51 (Ib) und (IIb) dargestellt. Obwohl für das PMMA 4000 immer noch ein Ring in (Ib) ersichtlich ist, konnte in beiden Fällen Polymer jetzt auch in der Mitte des Spots detektiert werden. Dieser Effekt ist besonders deutlich in Abbildung (IIb) zu sehen.

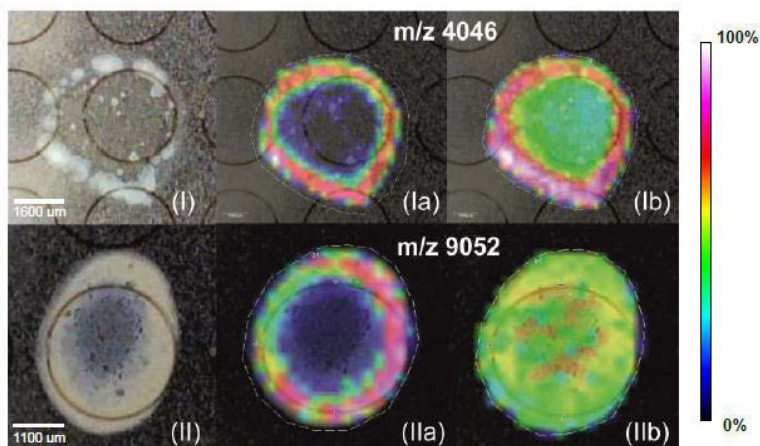


Abbildung 51: Optische Bilder und Intensitätsplots von PMMA/K<sup>+</sup> Ionen m/z 4 046 (I) und 9 052 (II); Probenpräparation (a) DCTB Matrix Dried Droplet; (b) DCTB/KTFA Matrix/Salz Lösung wurde auf den (a) Spot gesprüht.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Der Intensitätsplot zeigt eine weitgehend homogene Verteilung des PMMA Ions  $m/z$  9 052 auf der gesamten Spotfläche, obwohl das optische Bild (II) eine deutliche Ringbildung indiziert. Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, wonach die optisch sichtbaren Eintrocknungsringe überwiegend aus Matrix bestehen, während Polymermoleküle homogen verteilt erscheinen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Breite der Eintrocknungsringe kann in der Molmassendifferenz der gelösten Moleküle vermutet werden. Wie bereits im Kapitel 4.2.3 gezeigt, kann die Molmasse eines Polymers durchaus Einfluss auf die Entmischung haben. Die Verwendung von relativ schnell verdunstenden Lösemitteln (z. B. THF) führte dazu, dass Polymere mit höheren Molmassen sich mehr in der Mitte des Spots konzentrierten. Im Vergleich zum Polymer ist die Molmasse eines Matrixmoleküls signifikant kleiner. Damit bleibt dieses längere Zeit gelöst. Auf Grund der höheren Molmasse der Polymere erreichen diese bei der Verdunstung eher eine „kritische“ Konzentration, bei dessen Unterschreitung sie ausfallen. Durch Adhäsion an der Targetoberfläche können die ausgefallenen Polymermoleküle nicht weiter an den Rand des eintrocknenden Tropfens transportiert werden. [245]

### 4.3.2 Matrixkonzentration

Wie bereits in der Einführung erwähnt, hat das Matrix-zu-Analyt Verhältnis einen erheblichen Einfluss auf die Signal-Intensität. Da die vorherigen Ergebnisse auf einen Transport von hauptsächlich Matrix an den Rand des getrockneten Tropfens hindeuten, wurde der Einfluss der Matrixkonzentration auf die Spektren-Intensität und -qualität untersucht. Dafür wurden Probenspots aus Matrixlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 25, 50, 100  $\text{mg ml}^{-1}$  DCTB in THF) mit der Dried Droplet Methode präpariert. Diese wurden anschließend mit einer konstanten Menge an Polymer (PMMA/KTFA) mittels Elektrospray homogen überschichtet. Aus den aufgenommenen Ionen-Intensitätsdarstellungen der einzelnen Spots wurde dann die durchschnittliche Intensität eines PMMA Ions ( $m/z$  4 046) über den jeweiligen Spot-Querschnitt berechnet und gegen die Matrixkonzentration aufgetragen. Wie in Abbildung 52 dargestellt ist, konnte ein nicht-linearer Anstieg der Signalintensität mit steigender Matrixkonzentration beobachtet werden. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit ähnlichen Resultaten von Knochenmuss *et al.* überein. [155] Die Massenauflösung der MALDI Peaks wird nur gering von der Matrixkonzentration beeinflusst. Eine Verzehnfachung der Konzentration führte lediglich zu einer Abnahme von etwa 10 %. Dieses Ergebnis zeigt, dass deutlich höhere

Matrixkonzentrationen ohne wesentliche Einschränkung in der Spektrqualität verwendet werden können.

Wie in den Intensitätsplots (Abbildung 52) deutlich zu erkennen ist, verbessert sich die Homogenität der gebildeten Probenspots mit steigender Matrixkonzentration. Im verwendeten Matrix/LSM System konnte ab einer Matrixkonzentration von  $50 \text{ mg ml}^{-1}$  eine homogene Matrixverteilung beobachtet werden.

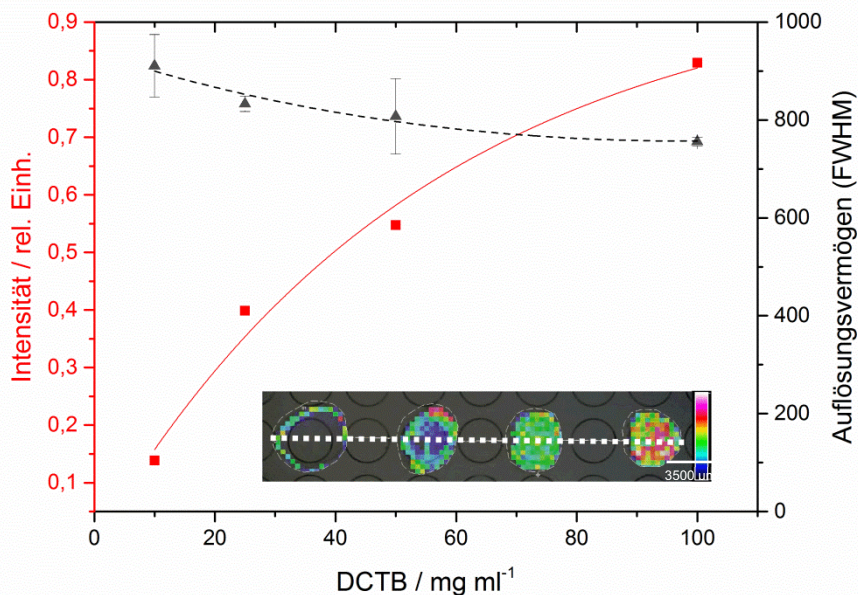


Abbildung 52: Durchschnittliche Signalintensität (rote Linie) und Peakauflösung bei  $m/z$  4 046 (Schwarz gepunktete Linie) in Abhängigkeit der Matrixkonzentration basierend auf einem Scan entlang der gepunkteten Linie im Intensitätsplot von dem PMMA/ $K^+$  Ion ( $m/z$  4 046), Probenpräparation: je  $0,5 \mu\text{l}$  Dried Droplet von DCTB (links nach rechts:  $10, 25, 50, 100 \text{ mg ml}^{-1}$ ) gefolgt von einer Elektrosprayauftragung einer Polymer/Salz-Lösung ( $10:1, v:v$ ). Durchschnittswerte mit FlexImaging Software berechnet.

In einem weiteren Experiment wurde deshalb die Kristallisation von DCTB (in THF,  $0,5 \mu\text{l}$ ) mit einem Mikroskop zeitaufgelöst untersucht. Wie in Abbildung 53 dargestellt, können bei der üblichen Matrixkonzentration von  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  erste Kristallite nach 20 Sekunden beobachtet werden. Die Kristallisation startet dabei gleichzeitig in der Mitte und am Rand des Spots. Nach 30 Sekunden zeigt die Kristallisation am Rand jedoch die Ausbildung eines Ringes. Wie die letzten beiden Bilder (nach 40 s und 50 s) zeigen, bildet sich bei

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

dieser Konzentration ein Spot mit einem flachen, homogenen inneren Plateau, welches von einem höheren Rand umgeben ist.

Dies ändert sich jedoch komplett während der Kristallisation einer deutlich höher konzentrierten Matrix ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Bereits nach 4 Sekunden kann die Ausbildung eines flüssigen Randes sowie die Bildung erster Kristallite beobachtet werden. Einige Sekunden später ist beinahe die komplette Tropfenfläche mit Matrix bedeckt. Da das Tropfenvolumen bei beiden Matrixkonzentrationen identisch ist, muss davon ausgegangen werden, dass auch nach 18 Sekunden immer noch erhebliche Mengen an Lösemittel vorhanden sind. Wie die Bilder zeigen, konnte jedoch kein Transport von Material an den Rand beobachtet werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass bei höheren Konzentrationen durch die deutlich höhere Viskosität Transportprozesse innerhalb des Tropfens behindert werden. Die höhere Viskosität kann ebenfalls als Hauptursache für die Bildung deutlich kleinerer Spots angenommen werden. So ist, wie man in Abbildung 53 erkennt, der Spot bei einer Matrixkonzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  fast doppelt so groß wie der Spot bei  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ .

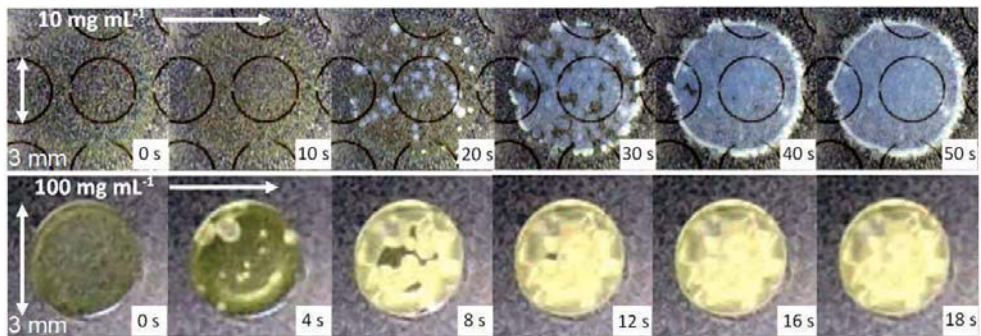


Abbildung 53: Zeitaufgelöste optische Bilder einer Kristallisation von zwei DCTB Matrix Lösungen.

Abbildung 54 zeigt den unter identischen Bedingungen aufgezeichneten Vorgang der Kristallisation von DHB (in THF,  $0,5 \mu\text{l}$ ). Auch mit dieser Matrix kann ein ähnlicher, wenn auch nicht ganz so ausgeprägter, Einfluss der Konzentration beobachtet werden. Bei  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  bilden sich nach etwa 9 Sekunden erste Kristalle aus dem flüssigen Film, welche homogen verteilt zu sein scheinen. Drei Sekunden später erkennt man jedoch die Bildung eines Ringes. Nach 15 Sekunden hat sich, wie auch im Falle der DCTB Matrix, ein Spot mit einem flachen Plateau gebildet, welches von einem deutlichen Rand umgeben ist.

Dagegen startet die Kristallisation der DHB-Lösung mit einer Konzentration von  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  bereits nach 3 Sekunden. Anfangs ist ein leichter Flüssigkeitsring erkennbar,

welcher jedoch nach 5 Sekunden verschwunden ist. Analog zu DCTB erhält man eine homogene Spotfläche. Obwohl die Kristallisation der DHB Matrix im Vergleich zur vorher beschriebenen DCTB Matrix insgesamt wesentlich schneller abläuft, erfolgt diese bei der deutlich höheren Konzentration wiederum ungefähr doppelt so schnell. Einen ähnlichen Effekt kann man auch beim Vergleich der Spotdurchmesser feststellen, der bei der höheren DHB Konzentration wiederum deutlich kleiner ist.

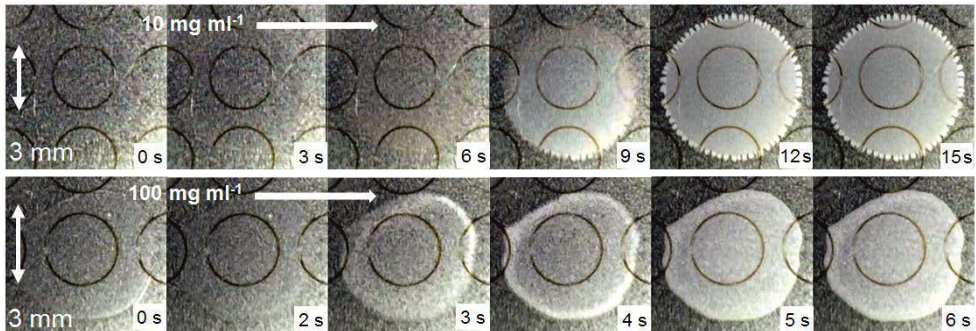


Abbildung 54: Zeitaufgelöste optische Bilder einer Kristallisation von zwei DHB Matrix Lösungen

Zur Bestätigung der Vermutung, dass höhere Matrixkonzentrationen die Ringbildung verhindern können, wurde die IR Spektroskopie als zweite bildgebende Technik angewandt. Dazu wurden zwei Spots mit unterschiedlichen Matrixkonzentrationen (DCTB in THF;  $7,4 \text{ mg ml}^{-1}$  und  $74 \text{ mg ml}^{-1}$ ) mit der Dried Droplet Methode präpariert und anschließend gemessen. Wie in Abbildung 55 zu sehen ist, führt die niedrige Matrixkonzentration wiederum zur Ausbildung des typischen Ringes. Im Unterschied dazu erhält man bei der hohen Konzentration eine homogene Verteilung der Matrix, welche den kompletten Spot bedeckt.

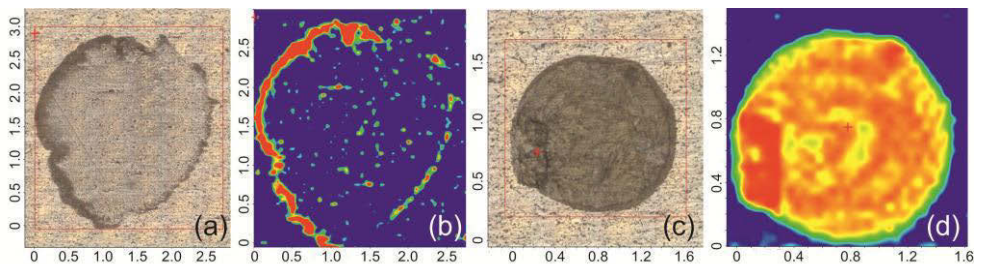


Abbildung 55: Optische Bilder sowie die dazugehörigen IR Bilder (aufgenommen bei  $2950 \text{ cm}^{-1}$ , C-H Streckschwingung) von  $0,5 \mu\text{l}$  DCTB Tropfen ( $7,4 \text{ mg ml}^{-1}$  (a, b) und  $74 \text{ mg ml}^{-1}$  (c, d) in THF). Skalierung in mm.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

In einem weiteren Experiment wurden jeweils zwei Matrixkonzentrationen (10 und 100 mg ml<sup>-1</sup>) für die Untersuchung verschiedener Polymere angewandt. Neben der Variation der Matrixkonzentration wurden dazu verschiedene Matrixsubstanzen, Lösemittel und Polymere mit unterschiedlichen Strukturen und Molmassen verwendet, welche in Tabelle 7 zusammengefasst sind. Neben der bislang gewählten Ionenintensitätsverteilung wurde zur besseren Darstellung der Querschnitt des jeweiligen Probenspots ermittelt. Diese Darstellung ermöglicht neben der Bestimmung des Ring/Plateau-Verhältnisses auch den direkten Vergleich der Verteilung mehrerer Ionen und damit die Bestimmung eventuell auftretender molmassenbasierender Segregationseffekte. Um einzelne Messungen miteinander vergleichbar zumachen wurden sowohl die Ionenintensitäten als auch der Spot-Querschnitt (jeweils von der Mitte des Spots zum Rand) normalisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 56 dargestellt. Die Verwendung der üblichen Matrixkonzentration (10 mg ml<sup>-1</sup>) führte dabei in allen Fällen zur Ausbildung von mehr oder weniger ausgeprägten Ringen. Bei Verwendung der höher konzentrierten Matrixlösungen (100 mg ml<sup>-1</sup>) konnte jedoch bei allen Messungen eine Ringbildung verhindert werden.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Polymer/Matrix/Salz/Lösemittel Systeme und die für die Intensitätsquerschnitte ausgewählten Ionenmassen (Abbildung 56)

Polymer	Matrix/Salz	Lösemittel	Ionenmasse m/z	Abbildung 56
PS 18000	RA/Ag	THF	15372	(A)
			17663	
			20059	
PMMA 9000	DCTB/K	THF	6749	(B)
			9052	
			11855	
PEG 3000	DCTB/K	Acetonitril	3096	(C)
PMMA 4000	DCTB/K	THF	4046	(D)
	DCTB/K	Acetonitril	4046	(E)
	DHB/K	THF	4046	(F)
PS 3500	DCTB/Ag	THF	3499	(G)
	RA/Ag	THF	3499	(H)



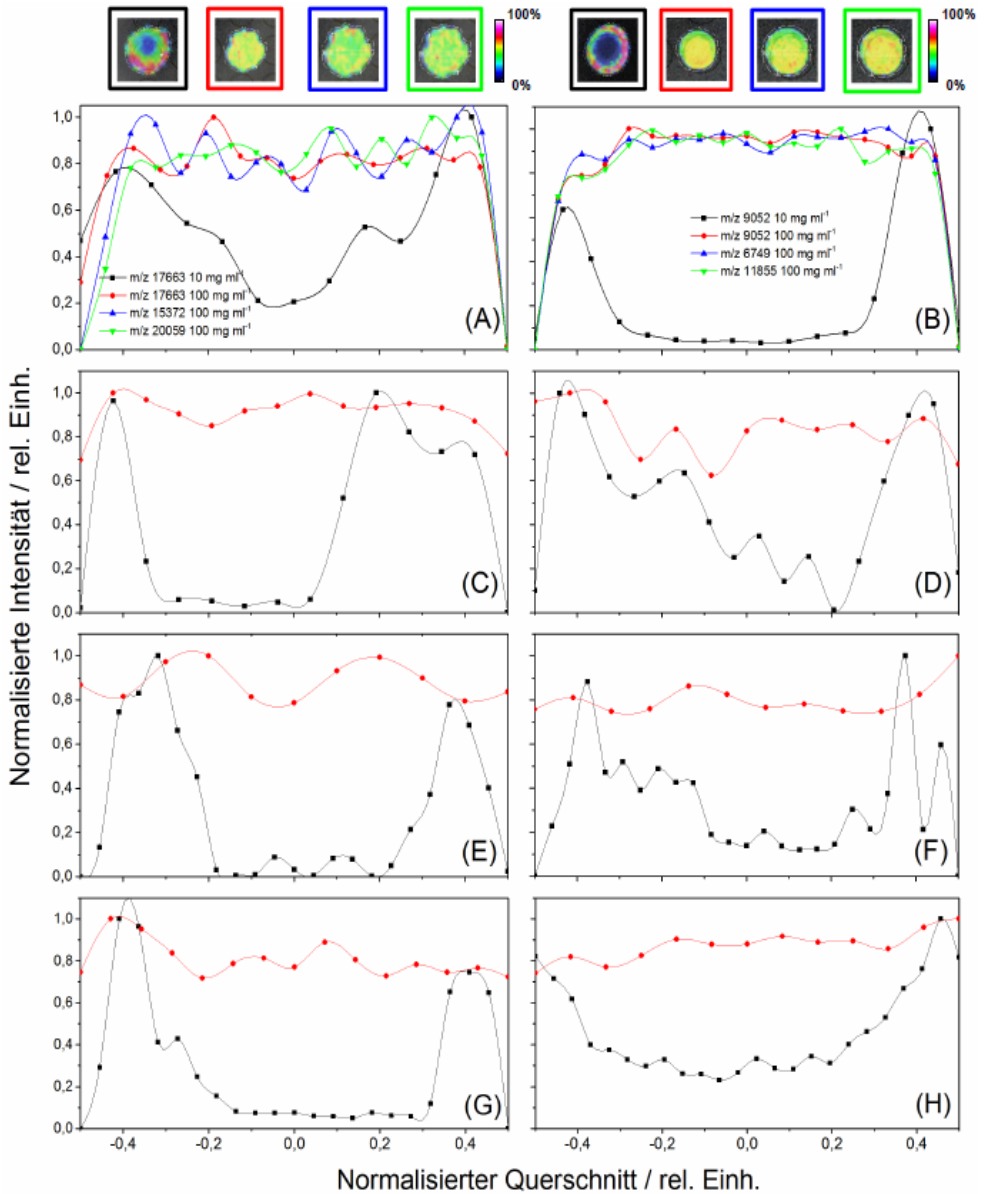


Abbildung 56: Normalisierte Intensitäten von Dried Droplet Spot-Querschnitten (auf Spotzentrum normalisiert) verschiedener Polymer/Salz/Matrix Kombinationen (siehe Tabelle 7). Daten stammen von den MALDI Intensitätsplots der gewählten Ionen (siehe Tabelle 7) mit Matrixkonzentrationen von  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  (schwarze Linie) und  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  (rote Linie). Die Ionenintensitätsbilder und weitere Ionenscans bei  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  (grüne und blaue Linie) sind exemplarisch für Polymere mit höherer Molmasse (a, b) gezeigt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Die Versuche der Polymere PMMA und PS mit einer mittleren Molmasse von über  $9\,000\text{ g mol}^{-1}$  waren dabei von besonderem Interesse, da die Ergebnisse von Weidner *et al.* eine Segregation von Polymerhomologen zeigten. [180] Dazu wurde zusätzlich die Intensitätsverteilung je eines Ions aus dem unteren und oberen Massenbereich der Polymerverteilung gemessen und graphisch dargestellt (Abbildung 57 bzw. Abbildung 56 (A) und (B)). Bei Anwendung der üblichen Matrixkonzentration von  $10\text{ mg ml}^{-1}$  konnte im Falle des Polystyrols neben der Ringbildung wiederum eine lokale Entmischung von Homologen, ähnlich der von Weidner *et al.* beschriebenen, festgestellt werden. [180] Bei einer Erhöhung der Matrixkonzentration auf das Zehnfache konnte keine Segregation von Polymerketten mit unterschiedlichen Massen beobachtet werden. Die in Abbildung 56 und Abbildung 57 gezeigten Ergebnisse bestätigen somit die Vermutung, dass zur homogenen Verteilung von Polymer und Matrix eine deutlich höhere Konzentration notwendig ist.

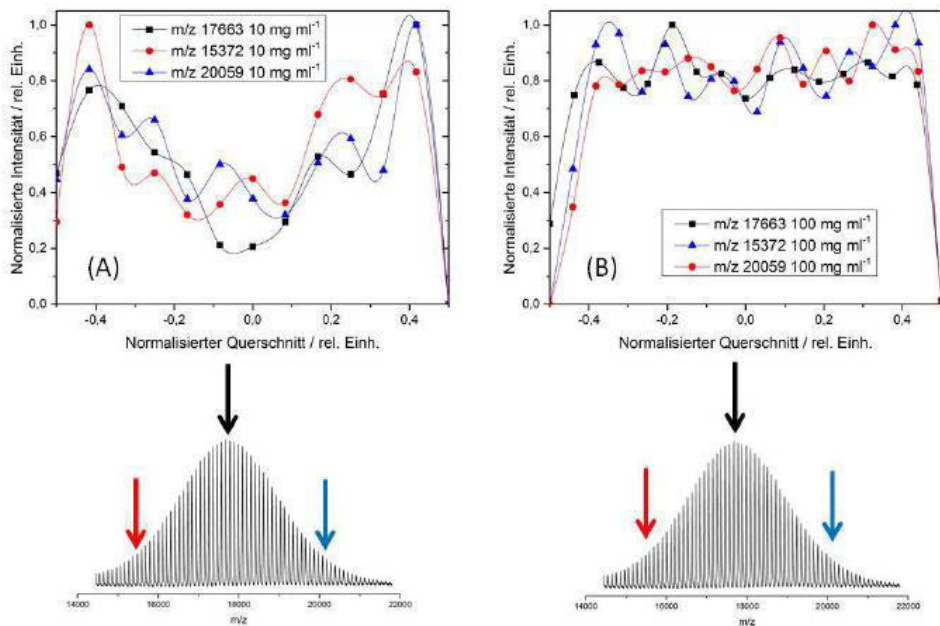


Abbildung 57: Normalisierte Intensitäten von Dried Droplet Spot-Querschnitten (auf Spotzentrum normalisiert) von PS, AgTFA und DCTB. Daten stammen von den MALDI Intensitätsplots der gewählten Ionen -  $m/z$  15 372 (rote Linie), 17 663 (schwarze Linie), 20 059 (blaue Linie) – mit Matrixkonzentrationen von  $10\text{ mg ml}^{-1}$  (A) und  $100\text{ mg ml}^{-1}$  (B).

Eine auf den zuvor dargestellten Ergebnissen basierende Interpretation der Prozesse in einem eintrocknenden Tropfen ist für zwei verschiedenen Matrixkonzentrationen in Abbildung 58 dargestellt. Diese gilt jedoch nur für relativ schnell verdunstende Lösemittel (z. B. THF). Unmittelbar nach Auftragung des Tropfens beginnt die Verdunstung des Lösemittels. Da dieser Prozess an den Kontaktflächen des Tropfens schneller ist als in der Tropfenmitte, fängt dieser an zu schrumpfen. Der Tropfen ist jedoch bestrebt, seine Größe beizubehalten, was zu einer Abflachung durch den Transport von Lösemittel aus der Tropfenmitte zum Rand führt. Diese von Deegan beschriebenen Kapillarkräfte sind für den Transport der gelösten Substanzen an den Rand verantwortlich. [175] Die ebenfalls auftretenden Marangoni Strömungen (Marangoni flow loops) führen zu einer Rückvermischung. Allerdings spielt dieser Prozess wegen der schnellen Verdampfung des Lösemittels eine untergeordnete Rolle. Wie von Majumder *et al.* gezeigt wurde, kann durch Verlangsamung der Verdampfung allerdings auch eine Umkehrung beider Prozesse erzielt werden. [246] Wird der eintrocknende Tropfen unter einer gesättigten Atmosphäre (z. B. Ethanol) gehalten, überwiegen Marangoni Strömungen und die Ringbildung kann komplett vermieden werden. Diese Untersuchung wurde allerdings mit suspendierten Nanopartikeln durchgeführt, die sich in einem wesentlichen Punkt von den Polymeren und der Matrix unterscheiden – der Löslichkeit.

Im Verlauf des Verdampfungsprozess findet eine Aufkonzentrierung der Moleküle im Tropfen statt. Ist für ein Molekül die Löslichkeitsgrenze erreicht, fällt es aus. Dies erfolgt beginnend mit den hohen Molmassen. [247] Durch Van der Waals Kräfte kann eine Adhäsion der ausgefallenen Polymere an der Oberfläche des Targets erfolgen. [245] Auf Grund ihrer geringen Molmasse bleibt die Matrix am längsten gelöst und kann demzufolge bis unmittelbar vor dem Eintrocknen an den Tropfenrand transportiert werden. Dies erklärt die Bildung von hauptsächlich aus Matrix bestehenden Ringen (Abbildung 58 (A)). Bei der deutlich höheren Konzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  wird die kritische Konzentration der Matrix trotz ihrer geringen Molmasse bereits vor (oder zusammen mit) dem Ausfallen der Polymere erreicht. Dadurch entsteht eine hoch viskose Lösung, welche die Transportprozesse der Polymermoleküle behindert (Abbildung 58 (B)). Somit kann keine Entmischung der der gelösten Polymere erfolgen und man erhält eine homogene Probenspotoberfläche.

Bei Verwendung sehr langsam verdampfender Lösemittel sind die hydrodynamischen Kräfte für eine Entmischung nicht ausreichend und es bildet sich eine „homogene“ Fläche. Ist die Verdampfungsgeschwindigkeit jedoch groß genug, treten konvektive Kräfte auf. Diese induzieren Masseneffekte, die zur Segregation der Moleküle führen (z. B. Diffusion).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Im Unterschied zu schnell verdampfenden Lösemittel nimmt die Molmasse der Polymerhomologe zum Rand des Tropfens hin zu. Auf Grund der geringen Verdampfungsgeschwindigkeit ist der zeitliche Abstand in dem die Polymerhomologen die „kritische“ Konzentration erreichen ausgeprägter, weshalb niedermolekulare Homologe signifikant länger gelöst bleiben. Das führt im Fall der synthetische Polymere, die eine Molmassenverteilung aufweisen, zur Trennung der Polymerhomologen. [180]

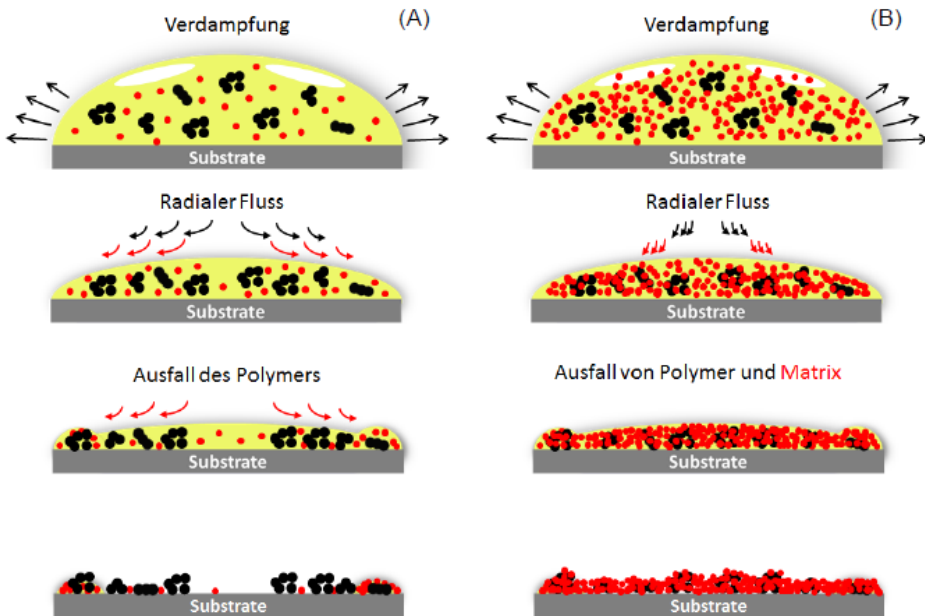


Abbildung 58: Schematische Darstellung der vermuteten Transportprozesse in Dried Droplet Probenpräparationen mit einer Matrixkonzentration von (A) 10 mg ml<sup>-1</sup> und (B) 100 mg ml<sup>-1</sup>.

Ausgehend von dieser Vermutung wurde der Einfluss der Matrixkonzentration auch auf die Segregation von Polymermischungen an Hand von zwei unterschiedlichen Polymerblends untersucht. Abbildung 59 zeigt die Ionen-Intensitätsplots eines PEG/PPG-Blends (PEG m/z 937,5 – blau, PPG m/z 927,6 – rot) bei einer Matrixkonzentration von 10 mg ml<sup>-1</sup> und 100 mg ml<sup>-1</sup>. Wie zu erwarten, führt die Verwendung der niedrigen Matrixkonzentration zur Ausbildung von Ringen. Interessanterweise sind diese bei den beiden Polymeren jedoch unterschiedlich. Wie bereits in den Einzelbildern zu erkennen ist, lagert sich PEG verstärkt im oberen Drittel des Ringes ab. Dies wird besonders in der Überlagerung der Intensitätsplots beider Polymere (Ic) deutlich. Neben der Entmischung der Matrix wird

zusätzlich auch eine Segregation in Abhängigkeit von der Polymerstruktur beobachtet. Wird eine Matrixkonzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  verwendet, ändert sich das Ergebnis komplett. Diese Konzentration führt zu einer homogenen Verteilung von PEG (IIa) und PPG (IIb).

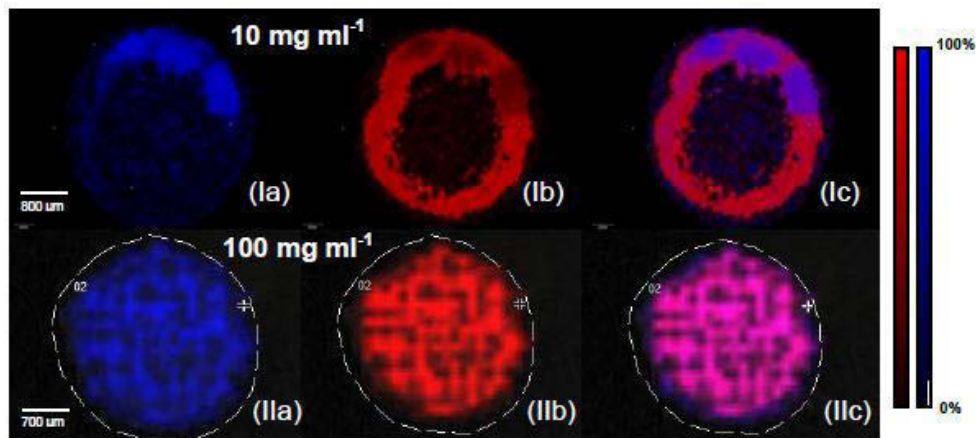


Abbildung 59: Intensitätsplots einer Dried Droplet Probenpräparation von PEG und PPG (1:1, v:v) in THF mit DCTB als Matrix –  $m/z$  937,5 (blau – PEG, (a),(c)) und 927,6 (rot – PPG, (b),(c))

In einem zweiten Versuch wurde eine 1:1 (v:v) Mischung von PEG und PMMA mit DCTB untersucht. Die Konzentration der Matrix betrug dabei  $100 \text{ mg ml}^{-1}$ . Abbildung 60 (a) zeigt den Intensitätsplot eines PEG  $m/z$  2743 Ions (blau). Ähnlich der Einzelmessung von PEG (Abbildung 56 (C)) weist auch eine Mischung mit PMMA keine Inhomogenitäten auf. Das PMMA Ion  $m/z$  4046 (rot) (Abbildung 60 (b)) ist homogen auf dem Spot verteilt. Die Überlagerung beider Intensitätsplots ist in Abbildung 60 (c) dargestellt. Übereinstimmend mit dem in Abbildung 59 (IIc) erhaltenen Ergebnis, wird auch in diesem Fall bei einer Matrixkonzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  die Entmischung der beiden Polymere sowie der Matrix verhindert.

Die Ergebnisse aus Abbildung 59 und Abbildung 60 zeigen, dass die erhöhte Matrixkonzentration ebenfalls für die Untersuchung von Polymermischungen vorteilhaft ist, da auch hier eine homogene Verteilung der unterschiedlichen Polymermoleküle erhalten wird und Entmischungen unterbunden werden.

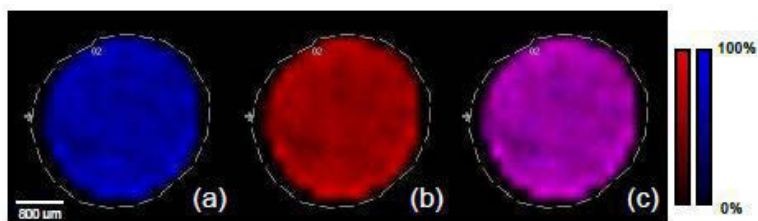


Abbildung 60: Intensitätsplots einer Dried Droplet Probenpräparation von PEG und PMMA (1:1, v:v) in ACN mit DCTB als Matrix –  $m/z$  2 743 (blau – PEG, (a),(c)) und 4 046 (rot – PMMA (b),(c))

### 4.3.3 Ionische Matrizes

#### 4.3.3.1 Allgemeines

Die im vorherigen Kapitel (4.3.2) erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine höhere Viskosität die Entmischung verhindern kann. Eine Möglichkeit, die Viskosität der Probenspots zu erhöhen, ist durch die Verwendung hochviskoser Lösemittel gegeben. Die ist jedoch aus zwei Gründen nicht praktikabel. Zum einen verdunsten hochviskose Lösemittel (z. B. Glycerin, DMF, DMAc u. a.) extrem langsam, was zwar prinzipiell vorteilhaft wäre, da dadurch die Bildung starker Kapillarkräfte vermieden und somit die Ringbildung beim Eintrocknen verhindert werden kann. Damit würde allerdings der große Vorteil der Dried Droplet Methode verloren gehen, der in der Schnelligkeit und Einfachheit der Probenpräparation beruht. Darüber hinaus wurden bei der Untersuchung derartiger Systeme ebenfalls Molmassen-Segregationseffekte beobachtet, die möglicherweise auf diffusionsgesteuerte Prozesse hindeuten. [180] Eine andere Möglichkeit, die Viskosität des Probentropfens zu erhöhen, stellt die Verwendung ionischer Flüssigkeiten dar. Eine von Armstrong *et al.* vorgestellte einfache Präparationsmethode basiert auf dem Vermischen einer typischen MALDI Matrix (z. B. DHB) mit einer äquimolaren Menge an Amin. [197] Deshalb wird eine solche ionische Flüssigkeit im Weiteren als ionische Matrix (IM) bezeichnet. Die erfolgreiche Synthese einer IM kann sehr einfach mit  $^1\text{H-NMR}$  bestätigt werden. Laut Wulf *et al.* zeichnet sich die Bildung von ionischen Flüssigkeiten durch eine starke Wechselwirkung mit den jeweiligen Anionen aus. [248] Dies führt z. B. bei Imidazolium-basierten IM zu einer verstärkten Tieffeldverschiebung der Ringprotonen in den  $^1\text{H-NMR}$  Spektren. Dabei sind die Protonen an dem Kohlenstoffatom, welches sich am nächsten zur ionischen Bindung befindet am stärksten beeinflusst.

Für die folgenden Experimente wurden drei verschiedene ionische Matrizes, basierend auf der Verwendung gebräuchlicher organischer Matrix-Verbindungen (DHB, SA und DCTB), synthetisiert. Zur Synthese wurden *n*-Butylamin und Triethylamin verwendet. Wie im experimentellen Teil der Arbeit dargestellt, wurde der Erfolg der Synthesen mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie nachgewiesen. Dabei kam insbesondere der Synthese der ionischen DCTB Matrix besondere Bedeutung zu, da diese, im Gegensatz zu den beiden anderen Verbindungen, keine Carboxylgruppe aufweist (Struktur: Abbildung 22 (d)). Normalerweise bildet diese nach Protonenabspaltung das Gegenion zum quaternären Ammoniumion. Wie jedoch an Hand der  $^1\text{H-NMR}$  Spektren gezeigt werden konnte, ist das Wasserstoffatom der Methylgruppe (siehe Experimenteller Teil 3.3.4.3, Abbildung 22, Position e) ausreichend azid. Die Homogenität der untersuchten Spots wurde wiederum mittels MALDI-MSI geprüft.

##### 4.3.3.2 Ionische DHB Matrix

Abbildung 61 zeigt mehrere Intensitätsplots eines PEG Ions ( $m/z = 3036$ , Natriumaddukt) bei Verwendung der ionischen DHB Matrix. Zur Präparation wurde eine Sandwich-Methode verwendet, bei der zuerst das Polymer und nach dessen Trocknung die ionische Matrix aufgetropft wird. Diese Spots wurden mit unterschiedlichen Scanmodi gemessen (siehe Legende Abbildung 61). Mit Ausnahme einer leichten Ringbildung (c), konnten keine wesentlichen Inhomogenitäten innerhalb der Spots beobachtet werden. Ein besonders interessantes Ergebnis ist in Abbildung 61 (d) dargestellt. Dabei handelt es sich um den in Bild (c) gezeigten Spot, der nach einem 24 stündigen Verbleib im Hochvakuum der MALDI Quelle, ein weiteres Mal gemessen wurde. Ein Vergleich der beiden Spots ((c) und (d)) zeigt nahezu keine Unterschiede und somit eine bemerkenswerte Vakuumstabilität der Präparation mit der ionischen Matrix. Das Verschwinden des schwach ausgeprägten Rings in (c) lässt zudem auf eine mögliche Rückvermischung bzw. Homogenisierung der Analytmoleküle in der ionischen Matrix schließen.

Der Vergleich zweier MALDI Massenspektren eines PEG ist in Abbildung 62 dargestellt. In diesem Beispiel wurde das Polymer jeweils mit DHB (a) und DHB-IM (b) vorgemischt und auf das Target getropft. Beide Spektren zeigen eine annähernd identische Molmassenverteilung sowie das gleiche Peakmaximum.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

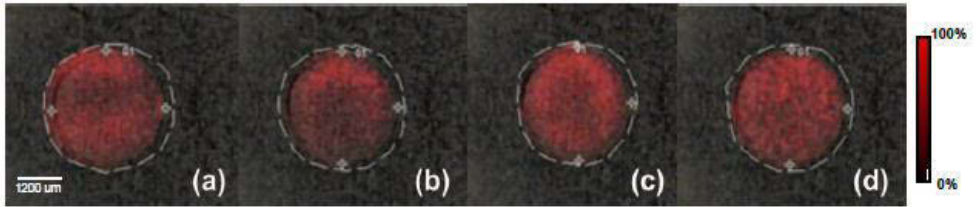


Abbildung 61: Ionenintensitätsplots PEG ( $\text{Na}^+$   $m/z$  3036) mit DHB-IM unter Verwendung verschiedener Scan-Modi – (a) Zeile für Zeile, (b) zufällige Positionen („random“), (c) 1. Messung jeder zweiten Spot jeder zweiten Reihe, verbleibende Spots im 2. Durchgang, (d) Zeile für Zeile an einem vor 24 Stunden präparierten Spot.

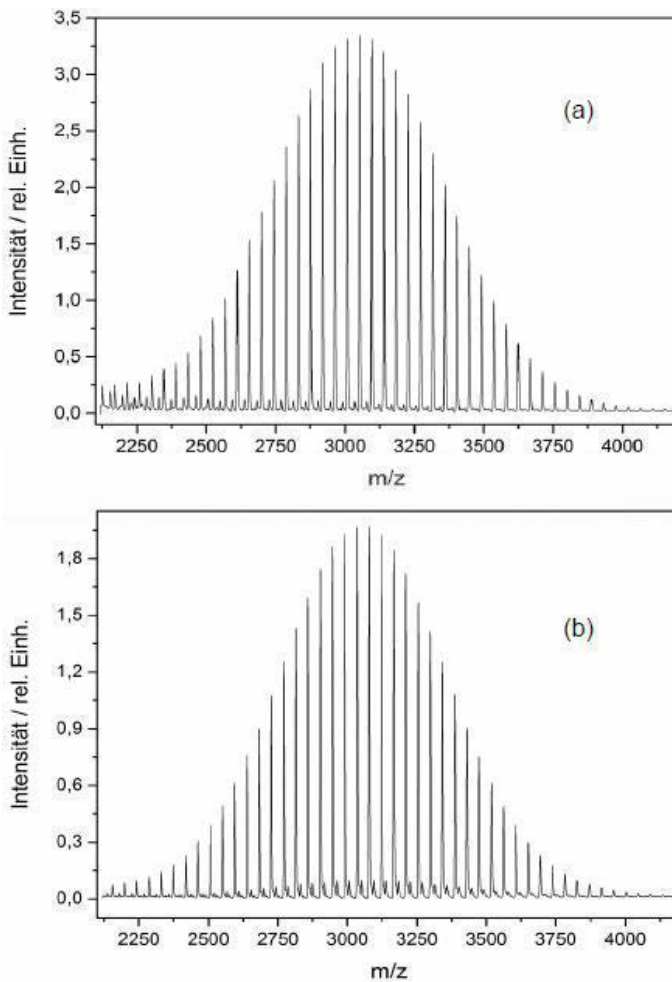


Abbildung 62: MALDI-TOF Massenspektren von PEG mit (a) DHB und (b) DHB-IM



Obwohl kein Kationisierungsreagenz bei der Synthese der ionischen Matrix zugesetzt wurde, stellen die Natriumaddukt Signale die Hauptverteilung dar, während sehr geringe zusätzliche Signale (+16 Dalton) auf die Bildung von Kaliumaddukten deuten. Im Gegensatz dazu wurde KTFA Salz zur DHB Matrix zugegeben, so dass hier Kaliumaddukt Signale die Hauptverteilung darstellen. Bei genauerer Betrachtung von Abbildung 62 kann ein weiterer Vorteil der ionischen Matrix festgestellt werden. Bei Verwendung der klassischen DHB Matrix (a) findet man zusätzliche schwache Signale im niederen Massenbereich des Spektrums (2000–2500). Da die Differenz zwischen diesen Signalen und der Hauptserie -18 Dalton beträgt, kann die Bildung von Natriumaddukten ausgeschlossen werden. Zu vermuten ist die häufig beobachtbare Bildung von Fragmenten (Wasserabspaltung) durch den metastabilen Zerfall von PEG Ionen. In dem mit der ionischen Matrix aufgenommenen Spektrum (b) konnten diese Signale dagegen nicht gefunden werden.

#### 4.3.3.3 Ionische SA Matrix

Ähnliche Ergebnisse wurden bei Verwendung der ionischen Sinapinsäure Matrix erhalten. Abbildung 63 zeigt Ionen-Intensitätsplots von Spots des PEG  $m/z$  3036 Ions, die sowohl mit der klassischen Dried Droplet Methode (a)-(c) als auch der Sandwich Methode (d) präpariert wurden. Der Ringeffekt in (a) resultiert wiederum aus der Verwendung einer Matrix typischen Konzentration von  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ . Wie Abbildung 63 (b) jedoch zeigt, erhält man dagegen mit der ionischen Form der Sinapinsäure einen homogenen Spot. Es ist zu vermuten, dass in dieser Präparation, auf Grund der hohen Viskosität, der Materialtransport durch Kapillarfluss im Spot eingeschränkt ist. Auch in diesem Matrixsystem ist die zuvor vermutete „Regeneration“ des Probenspots durch Diffusionsvorgänge beobachtbar. So konnte der in (b) gezeigte Spot erneut gemessen werden. Der resultierende Ionen-Intensitätsplot dieser zweiten Messung ist in Abbildung 63 (c) dargestellt. In diesem ist jedoch eine geringere Intensität in der Mitte des Spots beobachtbar. Mögliche Erklärungen dafür können zum einen in einer „Verarmung“ von Polymermolekülen auf Grund der vorherigen Messung und einer unvollständigen „Regeneration“ des Spots gesehen werden. Weiterhin muss aber auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die bei der Ionisierung entstandene Aufladung nicht vollständig abgeleitet werden konnte, da die Viskosität der ionischen Flüssigkeit zu hoch bzw. ihre Leitfähigkeit zu gering ist. Die in der Matrix vorhandenen Anionen müssen an die leitfähige Targetoberfläche abgeleitet werden und benötigen, auf Grund der Höhe der Kugelkappe, in der Mitte des Spots länger. Um

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

diesen Einfluss zu minimieren, ist es vorteilhaft einen möglichst flachen Probenspot zu generieren.

Der geringe Einfluss der Art der Probenpräparation wird in Abbildung 63 (d) deutlich. Dieser Probenspot wurde mittels Sandwich Methode (Tropfen Polymerlösung -> Eintrocknen -> Tropfen Matrixlösung -> Eintrocknen) präpariert. Bei Verwendung einer (organischen) Matrixlösung in der sich der Analyt löst, würde sich der beobachtbare Ringeffekt durch das Auftropfen der Matrixlösung verstärken, da der Analyt weiter zum Rand transportiert wird. Im Gegensatz dazu führt die Auftragung von SA-IM auf den trockenen PEG-Spot zu einer Homogenisierung von Matrix und Polymer im resultierenden Spot.

Ein vergleichbares Experiment wurde auch mit PMMA durchgeführt (Abbildung 63 (e) und (f)). Ähnlich den PEG Ergebnissen ist mit SA eine Ringbildung erkennbar, die bei Verwendung ionischen Matrix verhindert werden konnte.

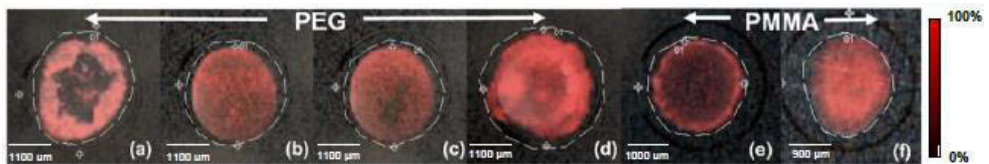


Abbildung 63: Ionenintensitätsplots aufgenommen mit SA und SA-IM unter Verwendung verschiedener Scanmodi und Polymeren (PEG Na<sup>+</sup> m/z 3 036 und PMMA Na<sup>+</sup> m/z 4 030) – (a) und (e) SA Dried Droplet, (b) und (f) SA-IM Dried Droplet, (c) zweite Messung von Spot (b), (d) SA-IM Sandwich Methode.

Die MALDI Massenspektren von PEG unter Verwendung von SA sowie mit SA-IM sind in Abbildung 64 gezeigt. Bei Verwendung der klassischen SA ist neben einer Natriumaddukt-Serie auch eine Kaliumaddukt-Serie beobachtbar (a), die im Spektrum der SA-IM wesentlich geringer ausgeprägt ist (b). Darüber hinaus war mit SA-IM eine signifikant geringere Bestrahlungsstärke zur Ionisation notwendig. Die Molmassenverteilung des Spektrums ist enger und deren Maximum ist leicht zu höheren Massen verschoben. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der geringeren Bestrahlungsstärke. Bei Verwendung der klassischen SA können (analog zu 4.3.3.2) im Massenbereich zwischen m/z 2000 und 2500 Signale, welche zum -18 Dalton verschoben zur Hauptserie sind, detektiert werden. In dem mit der ionischen Matrix aufgenommenen Spektrum (b) konnten diese Signale dagegen nicht gefunden werden.

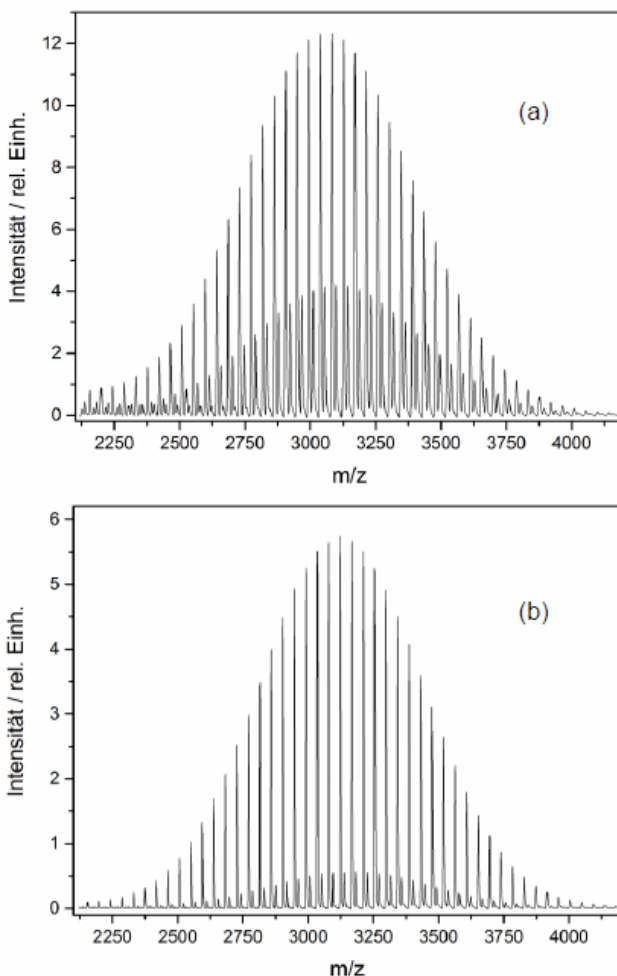


Abbildung 64: MALDI-TOF Massenspektren von PEG mit (a) SA und (b) SA-IM.

#### 4.3.3.4 Ionische DCTB Matrix

Es wurde auch untersucht, inwieweit DCTB als ionische Matrix verwendet werden kann. Dazu wurde ein PMMA ProbenSpot mit der Sandwich Methode präpariert, bei dem zuerst die Probe und nach Verdampfen des Lösemittels, die Matrix (DCTB-IM) aufgetragen wurde. Für die Aufnahme des Ionen-Intensitätsplot Abbildung 65 (a) wurde ein modifizierter Scanmodus verwendet, bei dem zuerst jeder zweite Spot jeder zweiten Zeile gemessen wurde. Die verbliebenden Spots wurden nach Ende dieses Durchgangs im Anschluss

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

gemessen. Der Ionen-Intensitätsplot des PMMA  $\text{Na}^+$  Adduktions  $m/z$  4030 zeigt eine homogene Verteilung über die gesamte Spotfläche. Intensitätsabweichungen zwischen Positionen die im ersten Durchgang gemessen wurden und jenen vom zweiten waren nicht beobachtbar. Derselbe Spot wurde nach 24 Stunden Verweilzeit in der MALDI-Quelle ein zweites Mal gemessen. In diesem Fall wurde ein kontinuierlicher Scanmodus (Zeile für Zeile) angewandt (Abbildung 65 (b)). Ein Vergleich beider Bilder zeigt eine nahezu identische Ionenintensitätsverteilung. In einem weiteren Versuch wurde PEG mit DCTB-IM analog zu PMMA/DCTB-IM präpariert. Wie Abbildung 65 (c) zeigt erhält man auch in diesem Fall einen homogenen Intensitätsplot.

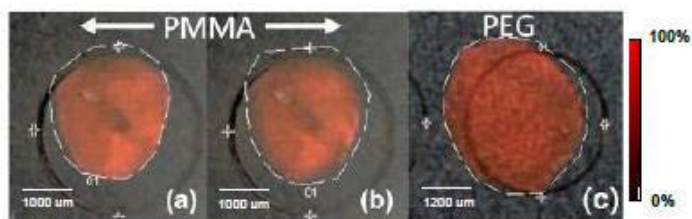


Abbildung 65: MALDI Ionenintensitätsbilder von DCTB-IM und PMMA ( $\text{Na}^+$   $m/z$  4030) bzw. PEG ( $\text{Na}^+$   $m/z$  3036) aufgenommen mit unterschiedlichen Scanmodi – (a) 1. DG zweiter Spot zweite Reihe, Rest im 2. DG, (b) Zeile für Zeile auf dem Spot (a) und (c) Zeile für Zeile.

Charakteristische MALDI Massenspektren von PMMA mit DCTB und DCTB-IM sind in Abbildung 66 dargestellt. Dabei ist das Peakmaximum der Molmassenverteilung des DCTB-IM Spektrums um 5-10% zu höheren Massen verschoben. Ein Vergleich der mit GPC (Herstellerdaten) und MALDI-MS bestimmten  $M_w$ ,  $M_n$  und Polydispersität ist in Tabelle 8 dargestellt. Interessanterweise ist in den massenspektrometrischen Daten eine Verschiebung zu höheren Massen um etwa 200 Da (DCTB) bzw. 400 Da (DCTB-IM) zu beobachten. DCTB ist dafür bekannt die Bildung der Ionen im MALDI Prozess zu begünstigen. [249] Verglichen mit anderen Matrices, wie zum Beispiel DHB, Dithranol oder Trihydroxyacetophenon, erhält man bei einer wesentlich geringeren Bestrahlungsstärke ähnliche Signalintensitäten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass bei einer Verwendung der ionischen Form der DCTB Matrix die notwendige Bestrahlungsstärke sogar noch weiter verringert werden kann, was zu einer noch „sanfteren“ Ionisation beiträgt. Ursache dafür könnte der Umstand sein, dass in ionischen Flüssigkeiten bereits viele Ionen vorliegen und die Bestrahlungsstärke in diesem Fall hauptsächlich zur Verdampfung des Polymer/Matrix Gemisches erforderlich ist.

Tabelle 8: Mit MALDI und GPC bestimmte  $M_w$ ,  $M_n$  und Polydispersität von PMMA

	Hersteller	DCTB	DCTB-IM
$M_w$	4 200	4 394	4 570
$M_n$	3 960	4 248	4 462
PD	1,06	1,03	1,02

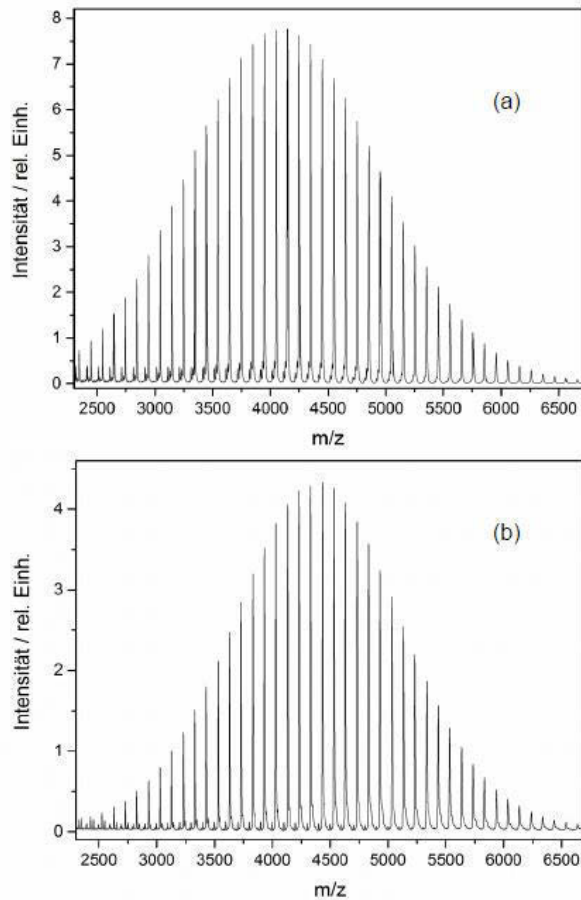


Abbildung 66: MALDI-TOF Massenspektren von PMMA mit (a) DCTB und (b) DCTB-IM.

#### *4 Ergebnisse und Diskussion*

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle feststellen, dass durch die Verwendung ionischer Matrices neben der Bildung homogener Spots eine vom verwendeten Scanmodus unabhängige, hohe Signalintensität bei geringerer Laserleistung erzielt werden kann. Dies verhindert die unbeabsichtigte Fragmentierung der Polymerketten. Darüber hinaus wurde die bei „normalen“ Matrices häufig beobachtete Sublimation in der MALDI Quelle nicht beobachtet.

## 5 Resüme

Im Rahmen dieser Dissertation wurden lösemittelbasierende MALDI-TOF MS Probenpräparationen mit MALDI-TOF Imaging MS analysiert. Ziel war es, die auftretenden Entmischungspänomene, wie z. B. die Bildung von Eintrocknungsringen und deren Ursache zu untersuchen. Dazu wurde jeweils ein Parameter in dem Matrix/Analyt/Lösemittel-System variiert. Somit konnte der Einfluss des Lösemittels bzw. der Verdampfungsgeschwindigkeit, der Einfluss des Polymers und der Einfluss der Matrix weitgehend unabhängig voneinander ermittelt werden.

Erste Untersuchungen zum Einfluss der Verdampfungsgeschwindigkeit wurden mit Polyethylenglykol und Wasser durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Erhöhung der Verdampfungsgeschwindigkeit die Ringbildung fördert, was zu einer Abnahme der Homogenität führt. Dabei nahm im Bereich zwischen 20°C und 50°C die Ringbreite mit steigender Temperatur ab. Bei einer weiteren Erhöhung der Verdampfungsgeschwindigkeit kehrte sich dieser Effekt allerdings um und die Breite des Ringes nahm wieder zu. Wurde die Verdampfungsgeschwindigkeit anstatt durch Zuführen von Wärme durch die Wahl unterschiedlicher Lösemittel variiert, konnten keine Tendenz festgestellt werden. Darüber hinaus konnte keine Korrelation mit der Viskosität bzw. der Oberflächenspannung der verwendeten Lösemittel gefunden werden. Der Einfluss der Diffusion auf die Segregation der Polymere spielt nur bei langsam verdampfenden Lösemitteln wie z. B. DMF und DMSO eine Rolle. Die Ergebnisse zeigen, dass das Lösemittel nur in geringem Umfang zur Entmischung beiträgt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Polymere auf die Homogenität des Probenspots untersucht. Dazu wurden die Polymere mit der Dried Droplet Methode aufgetragen und anschließend durch Sprayauftragung mit der Matrix überschichtet. Dabei hat sich im Vergleich zur üblicherweise verwendeten Dried Droplet Methode eines Lösungsgemisches (Matrix/Polymer) die Homogenität wesentlich verbessert. Allerdings wurden auch dabei Segregationseffekte beobachtet, deren Ursache in den Molmassenunterschieden der Polymere vermutet wurde. Dieser Effekt konnte durch Fluoreszenzmessungen mit Fluorescinmarkierten-Polystyrolstandards bestätigt werden. Weitere Untersuchungen wurden mit Polymermischungen und Copolymeren durchgeführt. Hierbei waren insbesondere Struktur-Lösungseffekte von Interesse, die bei Polymermischungen mit unterschiedlicher Struktur oder, im Falle der Copolymeren von

unterschiedlicher Zusammensetzung, eine deutliche Rolle spielen sollten. Bei der Verwendung von statistischen Copolymeren konnte keine Abhängigkeit der Verteilung von der Zusammensetzung gefunden werden. Im Unterschied dazu weisen Blockcopolymerer verstärkt die Tendenz zur Ringbildung auf. Wesentlich ausgeprägter waren die beobachteten Entmischungen jedoch bei der Analyse von Blends. Hierbei konnte eine eindeutige Entmischung von verschiedenen Polymeren beobachtet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass die Matrix wesentlich für die Bildung von Ringen verantwortlich ist. Deren Einfluss wurde im dritten Teil dieser Arbeit untersucht. Dazu wurde die Matrix mit der Dried Droplet Methode aufgetragen und anschließend durch Sprayauftragung mit Polymer überschichtet. Dabei konnte ein Ring beobachtet werden, welcher annähernd identisch mit dem Ring des optischen Bildes vor Polymerauftragung war. Da die Matrixkonzentration lokal sehr unterschiedlich war, wurde der Einfluss der Konzentration auf die Qualität der Spektren untersucht. Dazu wurde Matrix mit unterschiedlicher Konzentration mittels Dried Droplet Methode aufgetragen, mit Polymer überschichtet (Elektrospray) und mit MALDI-TOF Imaging MS gemessen. Dabei konnte eine Abhängigkeit der Homogenität von der Konzentration der Matrix beobachtet werden. Die Verwendung einer üblichen Konzentration ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) führte zur Ausbildung von Ringen, welche mit steigender Konzentration deutlich breiter wurden. Eine weitgehend homogene Oberfläche konnte bei einer Matrixkonzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$ , unabhängig vom verwendeten Lösemittel und Matrix, erhalten werden. Dies konnte ebenfalls mit einem Infrarotmikroskop verifiziert werden.

Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Prozessen, wie Kapillarfluss oder Marangoni Strömung, die u.a. für die Ringbildung verantwortlich gemacht wurden, zeigen die Ergebnisse, dass die Löslichkeit von Polymer und Matrix im verwendeten Lösemittel von entscheidender Bedeutung ist. Im Verlauf des Verdampfungsprozesses findet eine Aufkonzentrierung der Moleküle im abgesetzten Tropfen statt. Beim Erreichen der Sättigungskonzentration beginnen die Polymermoleküle mit den hohen Molmassen zuerst auszufallen, während die restlichen, immer noch gelösten Homologen weiterhin den Transportvorgängen unterliegen, die beim Eintrocknen generiert werden. Auf Grund ihrer geringen Molmasse bleibt die Matrix am längsten gelöst und kann demzufolge bis unmittelbar vor dem Eintrocknen an den Tropfenrand transportiert werden. Bei einer Konzentration von  $100 \text{ mg ml}^{-1}$  wird die Sättigungskonzentration der Matrix bereits vor dem ersten Ausfallen der Polymere erreicht. Dadurch entsteht eine hoch viskose Lösung, welche die folgenden Transportprozesse der Polymermoleküle behindert.



Da die Löslichkeit und Viskosität für Entmischungsphänomene hauptverantwortlich sind, wurden Versuche mit ionischen Flüssigkeiten basierend auf der Verwendung klassischer Matrices durchgeführt. Dazu wurde neben Literaturbekannten ionischen Flüssigkeiten basierend auf DHB bzw. SA, auch eine auf DCTB basierende synthetisiert und erfolgreich mittels NMR nachgewiesen. Erste Untersuchungen mit den ionischen Flüssigkeiten zeigten erhebliche Vorteile hinsichtlich Homogenität sowie Reproduzierbarkeit. Ein weiterer Vorteil dieser Verbindungen ist ihre hohe Vakuum-Stabilität. Selbst nach 24h im Hochvakuum der MALDI-Quelle konnten reproduzierbare Spektren gemessen werden. Die Intensität der Spektren war dabei deutlich höher als bei der Verwendung konventioneller Matrices. Dies ermöglichte die Aufnahme von Spektren bei geringerer Bestrahlungsstärke, was wiederum zu weniger Fragmentierungen führte und insbesondere für labile Polymere interessant sein könnte.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse geben Aufschluss über die Ursache der Entmischungsphänomene und erleichtern die Entwicklung alternativer Präparationsmethoden. Die vorgestellten Alternativen zur konventionellen Dried Droplet Methode ermöglichen die Aufnahme reproduzierbarer MALDI-Massenspektren ohne den Vorteil der einfachen und schnellen Handhabung zu verlieren.



## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

[ $\eta$ ]	Intrinsische Viskosität (Staudinger Index)
A	Analyt
a	Konstante für ein Polymer-Lösemittelsystem
ACN	Acetonitril
AgTFA	Silbertrifluoracetat
AP	Atmosphärendruck
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
CI	Chemische Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
cl	Charakteristische Länge
CRP	kontrolliert radikalische Polymerisationstechniken
CsCl	Cäsiumchlorid
cyc-PCI	Cyclisches Polycaprolacton
D	Diffusionskoeffizient
DCTB	<i>trans</i> -2-[3-(4- <i>tert</i> -Butylphenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril
DG	Durchgang
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
Dithranol	1,8,9-Trihydroxyanthracen
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
e	Elementarladung
ECD	Electron Capture Dissociation
EI	Elektronenstoß Ionisation
$E_{kin}$	Kinetische Energie
EO	Ethylenoxid
ESD	Electrospray Deposition – Elektrospray Auftragung
et	Evaporation time - Verdampfungszeit
ETD	Electron Transfer Dissoziation
FAB	Fast Atom Bombardment

## 6 Verzeichnisse

FD	Feld Desorption
FT-ICR	Fouriertransformations-Ionen-Zyklotron-Resonanz
FWHM	Halbwertsbreite
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Höhe der Kugelkappe
HABA	2'-(4-Hydroxyphenylazo) benzoessäure
ICD	Ionen Konvertierungsdynodendetektor
IM	Ionische Matrix
ISD	In-Source Decay
J	Ortsabhängige Verdampfungsgeschwindigkeit
K	Konstante für ein Polymer-Lösemittelsystem
$k_B$	Boltzmann Konstante
KCl	Kaliumchlorid
KTFA	Kaliumtrifluoracetat
L	Länge des Flugrohrs
LAMMA	Laser Microprobe Mass Analyzer
LC	Flüssigchromatographie
LD	Laser Desorption
lin-PCI	Lineares Polycaprolacton
LSM	Lösemittel
m	Masse
M	Molmasse
$M_a$	Marangoni Zahl
$M_n$	Zahlenmittlere Molmasse
$M_w$	Gewichtsmittlere Molmasse
MALDI-MS	Matrixunterstützten Laserdesorptions/Ionisations Massenspektrometrie
MALDI-MSI	MALDI-MS Imaging
MALDI-TOF-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie
MCP	Mikrokanalplatten-Detektor
MeOH	Methanol
n	Anzahl der Monomer-Wiederholeinheiten
$N_A$	Avogadro Konstante
NMP	Nitroxide-mediated Polymerization

PA	Polyamid
PAK	Polycyclisch-aromatische Kohlenwasserstoffe
PB	Polybutadien
PD	Polydispersität
PEG	Polyethylenglykol
PMMA	Polymethylmethacrylat
PO	Propylenoxid
PPG	Polypropylenglycol
PS	Polystyrol
PSD	Post-Source Decay
PVP	Polyvinylpyrolidon
Q	Ladung
R	Auflösungsvermögen
r	Radius
RA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer
RbCl	Rubidiumchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
$r_h$	Hydrodynamischer Radius
SA	Sinapinsäure
SIMS	Sekundär Ionen Massenspektrometrie
SLD	Soft-Laser-Desorption
STJ	supraleitende Tunnelübergangsdetektor
t	Zeit
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Timed Ion Selector
TOF	Flugzeit-Massenanalysator
U	Beschleunigungsspannung
v	Geschwindigkeit
V	Volumen
VG	Verdampfungsgeschwindigkeit
$V_h$	Hydrodynamisches Volumen
$X^+$	Kation
xD	Durch Diffusion zurückgelegte Wegstrecke in der Zeit t
z	Anzahl der Ladungen

## 6 Verzeichnisse

$\alpha$	Wärmediffusionskoeffizient
$\gamma$	Oberflächenspannung
$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante
$\eta$	Dynamische Viskosität
$\theta_c$	Kontaktwinkel

## 6.2 Publikationsverzeichnis des Autors

### Veröffentlichungen

Gabriel S. J., Steinhoff R. F., Pabst M., Schwarzingler C., Zenobi R., Panne U., Weidner S. M.: Improved analysis of ultra-high molecular mass polystyrenes in MALDI-TOF mass spectrometry using DCTB matrix and caesium salt. *in Vorbereitung*

Gabriel S. J., Schwarzingler C., Schwarzingler B., Panne U., Weidner S. M.: Matrix segregations as the major cause for sample inhomogeneity in MALDI dried droplet spots. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **25**, 1356-1363 (2014)

Gabriel S. J., Pfeifer D., Schwarzingler C., Panne U., Weidner S. M.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric imaging of synthetic polymer sample spots prepared using ionic liquid matrices. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**, 489-498 (2014)

### Vorträge

Weidner S. M., Gabriel S. J., Schwarzingler C., Panne U., *Segregation in dried droplet polymer sample spots examined by MALDI imaging MS*. IMSC (2014), Genf/CH.

Weidner S. M., Gabriel S. J., Schwarzingler C., Panne U., *Matrix segregation as a major cause for sample inhomogeneity using the dried droplet sample preparation method*. ASMS (2014), Baltimore/USA.

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingler C., *MALDI-ToF-MS Imaging: Classical Dried Droplet vs. Ionic Matrix*. APST3 (2013), Linz/AT.

## 6 Verzeichnisse

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingen C., *Ionic liquids improve the homogeneity of the sample preparation used for MALDI MS*. 17<sup>th</sup> MALDI Kolloquium MALDI (2013), Berlin/D.

Gabriel S. J., Mishra K. B., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingen C., *Molar mass distribution of a dried droplet sample spot depending on solvents and polymers*. 16<sup>th</sup> MALDI Kolloquium (2012), Berlin/D.

### Poster

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingen C., *Homogeneous MALDI sample spots of synthetic polymers using ionic liquid matrices*. ASMS (2014), Baltimore/USA

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingen C., *MALDI MS of polymers using ionic matrices for dried droplet sample preparation methods*. DGMS (2014), Frankfurt(Main)/D.

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingen C., *MALDI MS of polymers using ionic matrices for dried droplet sample preparation methods*. Bruker Anwendertreffen (2014), Berlin/D.

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingen C., *Separation effects caused by the dried droplet sample preparation for MALDI-MS of synthetic polymers*. Adlershofer Forschungsforum (2013), Berlin/D.

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingen C., *Separation effects caused by the dried droplet sample preparation for MALDI-MS of synthetic polymers*. ASMS (2013), Minneapolis/USA.



Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingler C., *Separation effects in dried-droplet sample preparations for MALDI mass spectrometry of polymers*. DGMS (2013), Berlin/D.

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingler C., *Separation effects in dried-droplet sample preparations for MALDI mass spectrometry of polymers*. Anakon (2013), Essen/D.

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingler C., *Separation effects in dried droplet sample preparations for MALDI MS of synthetic polymers*. Bruker Anwendertreffen (2013), Berlin/D.

Gabriel S. J., Weidner S. M., Panne U., Schwarzingler C., *Separation effects caused by dried-droplet sample preparation in MALDI mass spectrometry of polymers*. Macro BeGe (2012), Houffalize/BE.

### 6.3 Literaturverzeichnis

- [1] H. M. Fales, G. W. A. Milne, H. U. Winkler, H. D. Beckey, J. N. Damico, R. Barron, *Analytical Chemistry* **1975**, 47, 207.
- [2] H. D. Beckey, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1969**, 2, 500.
- [3] H. D. Beckey, *Angewandte Chemie* **1969**, 81, 662.
- [4] J. H. Gross, S. M. Weidner, *European Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 6, 11.
- [5] A. Benninghoven, W. K. Sichter mann, *Analytical Chemistry* **1978**, 50, 1180.
- [6] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *Nature* **1981**, 293, 270.
- [7] M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, E. T. Whalley, *Biomedical Mass Spectrometry* **1981**, 8, 337.
- [8] B. Sundqvist, P. Roepstorff, J. Fohlman, A. Hedin, P. Hakansson, I. Kamensky, M. Lindberg, M. Salehpour, G. Sawe, *Science* **1984**, 226, 696.
- [9] R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, *Science* **1976**, 191, 920.
- [10] B. Sundqvist, I. Kamensky, P. Hakansson, J. Kjellberg, M. Salehpour, S. Widdiyasekera, J. Fohlman, P. A. Peterson, P. Roepstorff, *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, 11, 242.
- [11] R. E. Honig, J. R. Woolston, *Applied Physics Letters* **1963**, 2, 138.
- [12] N. C. Fenner, N. R. Daly, *Review of Scientific Instruments* **1966**, 37, 1068.
- [13] F. J. Vastola, R. O. Mumma, A. J. Pirone, *Organic Mass Spectrometry* **1970**, 3, 101.
- [14] M. A. Posthumus, P. G. Kistemaker, H. L. C. Meuzelaar, M. C. Tennoeverdebrauw, *Analytical Chemistry* **1978**, 50, 985.
- [15] F. Hillenkamp, E. Unsold, R. Kaufmann, R. Nitsche, *Nature* **1975**, 256, 119.
- [16] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 2935.
- [17] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1987**, 78, 53.

- [18] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299.
- [19] T. Yoshida, K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, *Shitsuryo Bunseki* **1988**, *36*, 59.
- [20] M. Karas, U. Bahr, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1989**, *92*, 231.
- [21] A. Tholey, E. Heinze, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386*, 24.
- [22] A. NobelMedia, 2014, Nobelprize.org, **2002**.
- [23] U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp, U. Giessmann, *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 2866.
- [24] H. C. M. Byrd, C. N. McEwen, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 4568.
- [25] D. C. Schriemer, L. Li, *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4176.
- [26] H. Rashidzadeh, B. C. Guo, *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 131.
- [27] C. N. McEwen, C. Jackson, B. S. Larsen, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, *160*, 387.
- [28] B. Thomson, K. Suddaby, A. Rudin, G. Lajoie, *European Polymer Journal* **1996**, *32*, 239.
- [29] E. Scamporrino, D. Vitalini, P. Mineo, *Macromolecules* **1996**, *29*, 5520.
- [30] G. Montaudo, F. Samperi, M. Montaudo, *Prog. Polym. Sci* **2006**, *31*, 277.
- [31] G. Montaudo, D. Garozzo, M. S. Montaudo, C. Puglisi, F. Samperi, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7983.
- [32] G. WilczekVera, P. O. Danis, A. Eisenberg, *Macromolecules* **1996**, *29*, 4036.
- [33] D. Vitalini, P. Mineo, S. DiBella, I. Fragala, P. Maravigna, E. Scamporrino, *Macromolecules* **1996**, *29*, 4478.
- [34] Y. F. Wang, M. Paventi, K. P. Chan, A. S. Hay, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1996**, *34*, 2135.
- [35] H. J. Rader, J. Spickermann, K. Mullen, *Macromolecular Chemistry and Physics* **1995**, *196*, 3967.
- [36] H. J. Rader, J. Spickermann, M. Kreyenschmidt, K. Mullen, *Macromolecular Chemistry and Physics* **1996**, *197*, 3285.

- [37] R. M. Whittal, D. C. Schriemer, L. Li, *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 2734.
- [38] K. Yoshimura, L. Przybilla, S. J. Ito, J. D. Brand, M. Wehmeir, H. J. Rader, K. Mullen, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2001**, 202, 215.
- [39] S. Weidner, G. Kuhn, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, 10, 942.
- [40] S. M. Weidner, D. Wolff, M. Glanz, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2000**, 219, U421.
- [41] N. Fandrich, J. Falkenhagen, S. M. Weidner, D. Pfeifer, B. Staal, A. F. Thunemann, A. Laschewsky, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, 211, 869.
- [42] C. Jackson, B. Larsen, C. McEwen, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 1303.
- [43] P. M. Lloyd, K. G. Suddaby, J. E. Varney, E. Scrivener, P. J. Derrick, D. M. Haddleton, *European Mass Spectrometry* **1995**, 1, 293.
- [44] G. Kuehn, S. Weidner, U. Just, G. Hohner, *Journal of Chromatography A* **1996**, 732, 111.
- [45] C. Barner-Kowollik, *Handbook of RAFT Polymerization*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2008**.
- [46] D. H. Solomon, E. Rizzardo, P. Cacioli, *Vol. US4581429 A* (Ed.: C. S. a. I. R. Organization), **1986**.
- [47] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, 31, 5559.
- [48] J. S. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1995**, 28, 7901.
- [49] T. P. Le, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Vol. WO1998001478 A1*, **1998**.
- [50] N. Fandrich, J. Falkenhagen, S. M. Weidner, B. Staal, A. F. Thunemann, A. Laschewsky, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, 211, 1678.
- [51] S. Weidner, G. Kuehn, B. Werthmann, H. Schroeder, U. Just, R. Borowski, R. Decker, B. Schwarz, I. Schmuecking, I. Seifert, *Journal of Polymer Science Part a - Polymer Chemistry* **1997**, 35, 2183.

- [52] O. Wachsen, K. H. Reichert, R. P. Kruger, H. Much, G. Schulz, *Polymer Degradation and Stability* **1997**, 55, 225.
- [53] S. Soulis, D. Triantou, S. Weidner, J. Falkenhagen, J. Simitzis, *Polymer Degradation and Stability* **2012**, 97, 2091.
- [54] C. Schwarzingler, S. Gabriel, S. Beissmann, W. Buchberger, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**, 23, 1120.
- [55] E. Sachon, L. Matheron, G. Clodic, T. Blasco, G. Bolbach, *J. Mass Spectrom.* **2010**, 45, 43.
- [56] S. Trimpin, K. Wijerathne, C. N. McEwen, *Analytica Chimica Acta* **2009**, 654, 20.
- [57] F. G. Hoogland, J. J. Boon, *International Journal of Mass Spectrometry* **2009**, 284, 66.
- [58] G. Montaudo, S. Carroccio, M. S. Montaudo, C. Puglisi, F. Samperi, *Macromolecular Symposia* **2004**, 218, 101.
- [59] S. M. Weidner, S. Trimpin, *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 4349.
- [60] S. M. Weidner, S. Trimpin, *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 4811.
- [61] R. Knochenmuss, *Analyst* **2006**, 131, 966.
- [62] M. Karas, M. Gluckmann, J. Schafer, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, 1.
- [63] T. W. Jaskolla, M. Karas, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, 22, 976.
- [64] S. Guenther, A. Römpf, W. Kummer, B. Spengler, *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, 305, 228.
- [65] J. M. Daniel, V. V. Laiko, V. M. Doroshenko, R. Zenobi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, 383, 895.
- [66] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, 17, 337.
- [67] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H. C. Ludemann, F. Hillenkamp, M. Lage, K. Strupat, *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 185, 859.
- [68] V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck, *Analytical Chemistry* **2001**, 73, 1016.
- [69] S. Trimpin, H. J. Räder, K. Müllen, *J. of Mass Spec.* **2006**, 253, 13.

- [70] L. R. Macgillivray, M. J. Zaworotko, *Journal of Chemical Crystallography* **1994**, *24*, 703.
- [71] S. Trimpin, A. Rouhanipour, R. Az, H. J. Räder, K. Müllen, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15*, 1364.
- [72] V. Horneffer, R. Reichelt, K. Strupat, *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *226*, 117.
- [73] R. Kruger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Gluckmann, M. Karas, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5812.
- [74] K. Dreisewerd, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 395.
- [75] C. F. Llenes, R. M. Omalley, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, *6*, 564.
- [76] K. Dreisewerd, M. Schurenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, *International Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *141*, 127.
- [77] C. D. Mowry, M. V. Johnston, *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 1904.
- [78] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan, G. B. Hurst, M. V. Buchanan, B. S. Luk'yanchuk, *Physical Review Letters* **1999**, *83*, 444.
- [79] P. Juhasz, M. L. Vestal, S. A. Martin, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 209.
- [80] M. Gluckmann, M. Karas, *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 467.
- [81] B. Spengler, V. Bokelmann, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* **1993**, *82*, 379.
- [82] A. I. Gusev, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 366, 691.
- [83] S. Berkenkamp, M. Karas, F. Hillenkamp, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 7003.
- [84] S. Berkenkamp, C. Menzel, M. Karas, F. Hillenkamp, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1399.
- [85] S. F. Niu, W. Z. Zhang, B. T. Chait, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 1.

- [86] P. Demirev, A. Westman, C. T. Reimann, P. Hakansson, D. Barofsky, B. U. R. Sundqvist, Y. D. Cheng, W. Seibt, K. Siegbahn, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1992**, 6, 187.
- [87] M. R. Papantonakis, J. Kim, W. P. Hess, R. F. Haglund, *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 37, 639.
- [88] R. Knochenmuss, A. Vertes, *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, 5406.
- [89] R. Knochenmuss, *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 37, 867.
- [90] R. Knochenmuss, *Analytical Chemistry* **2003**, 75, 2199.
- [91] H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, *Organic Mass Spectrometry* **1992**, 27, 472.
- [92] P. D. Setz, R. Knochenmuss, *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, 109, 4030.
- [93] H. C. Ludemann, R. W. Redmond, F. Hillenkamp, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, 16, 1287.
- [94] H. Ehring, B. U. R. Sundqvist, *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, 30, 1303.
- [95] H. Ehring, B. U. R. Sundqvist, *Applied Surface Science* **1996**, 96-8, 577.
- [96] E. Stevenson, K. Breuker, R. Zenobi, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, 1035.
- [97] F. L. Brancia, M. Stener, A. Magistrato, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, 1327.
- [98] S. R. Carr, C. J. Cassidy, *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 959.
- [99] S. R. Carr, C. J. Cassidy, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, 7, 1203.
- [100] X. Zhang, C. J. Cassidy, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, 7, 1211.
- [101] K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, 10, 1111.
- [102] K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 184, 25.
- [103] M. Mormann, S. Bashir, P. J. Derrick, D. Kuck, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, 11, 544.

- [104] R. D. Burton, C. H. Watson, J. R. Eyler, G. L. Lang, D. H. Powell, M. Y. Avery, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, 443.
- [105] E. Nordhoff, F. Kirpekar, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, K. Kristiansen, P. Roepstorff, A. Lezius, *Nucleic Acids Research* **1994**, 22, 2460.
- [106] S. Weidner, G. Kuhn, J. Friedrich, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12, 1373.
- [107] M. Karas, R. Kruger, *Chemical Reviews* **2003**, 103, 427.
- [108] C. M. Land, G. R. Kinsel, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, 12, 726.
- [109] R. Knochenmuss, E. Lehmann, R. Zenobi, *European Mass Spectrometry* **1998**, 4, 421.
- [110] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, 1237.
- [111] V. Karbach, R. Knochenmuss, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12, 968.
- [112] D. A. Allwood, P. E. Dyer, R. W. Dreyfus, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, 499.
- [113] Q. Lin, R. Knochenmuss, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, 15, 1422.
- [114] W. E. Stephens, *Physical Review* **1946**, 69, 691.
- [115] F. Hillenkamp, M. Karas, *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 200, 71.
- [116] R. C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **1989**, 3, 436.
- [117] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 3281.
- [118] F. Lottspeich, H. Zorbas, in *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Heidelberg; Berlin, **1998**, p. 328.
- [119] S. M. Colby, J. P. Reilly, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 1419.
- [120] W. C. Wiley, I. H. McLaren, *Review of Scientific Instruments* **1955**, 26, 1150.



- [121] P. Juhasz, M. T. Roskey, I. P. Smirnov, L. A. Haff, M. L. Vestal, S. A. Martin, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 941.
- [122] B. A. Mamyryn, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin, *Zhurnal Eksperimentalnoi I Teoreticheskoi Fiziki* **1973**, 64, 82.
- [123] P. B. O'Connor, F. Hillenkamp, in *MALDI MS*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2007**, pp. 29.
- [124] K. F. Medzihradzsky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal, A. L. Burlingame, *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 552.
- [125] A. L. Yergey, J. R. Coorsen, P. S. Backlund, P. S. Blank, G. A. Humphrey, J. Zimmerberg, J. M. Campbell, M. L. Vestal, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13, 784.
- [126] M. L. Vestal, J. M. Campbell, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 402* (Ed.: A. L. Burlingame), Academic Press, **2005**, pp. 79.
- [127] A. P. Gies, M. J. Vergne, R. L. Orndorff, D. M. Hercules, *Macromolecules* **2007**, 40, 7493.
- [128] A. E. Giannakopoulos, B. Thomas, A. W. Colburn, D. J. Reynolds, E. N. Raptakis, A. A. Makarov, P. J. Derrick, *Review of Scientific Instruments* **2002**, 73, 2115.
- [129] P. Rizzarelli, C. Puglisi, G. Montaudo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, 20, 1683.
- [130] A. Shevchenko, A. Loboda, A. Shevchenko, W. Ens, K. G. Standing, *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 2132.
- [131] H. Steen, B. Kuster, M. Mann, *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 36, 782.
- [132] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 36, 849.
- [133] G. C. Stafford Jr, P. E. Kelley, J. E. P. Syka, W. E. Reynolds, J. F. J. Todd, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1984**, 60, 85.
- [134] F. Lottspeich, H. Zorbas, in *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Heidelberg; Berlin, **1998**, p. 357.
- [135] A. Makarov, *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 1156.

- [136] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Baischun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 2113.
- [137] Q. Z. Hu, R. J. Noll, H. Y. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 40, 430.
- [138] R. H. Perry, R. G. Cooks, R. J. Noll, *Mass Spectrometry Reviews* **2008**, 27, 661.
- [139] Comisaró, M. B., A. G. Marshall, *Chemical Physics Letters* **1974**, 25, 282.
- [140] A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, S. D. H. Shi, *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 253a.
- [141] AlyXan, 2014, [www.alyxan.com](http://www.alyxan.com), **2011**.
- [142] J. Ladislav Wiza, *Nuclear Instruments and Methods* **1979**, 162, 587.
- [143] R. J. Wenzel, U. Matter, L. Schultheis, R. Zenobi, *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 4329.
- [144] R. J. Wenzel, S. Kern, R. Zenobi, in ASMS, Seattle, **2006**.
- [145] S. Weidmann, R. Zenobi, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, 25, 950.
- [146] A. A. Aksenov, M. E. Bier, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, 19, 219.
- [147] S. L. Cohen, B. T. Chait, *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 31.
- [148] H. Brandt, T. Ehmann, *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 8169.
- [149] S. Bashir, R. Mutter, P. J. Derrick, *European Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 10, 487.
- [150] H. R. Chen, B. C. Guo, *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 4399.
- [151] M. J. Deery, K. R. Jennings, C. B. Jasieczek, D. M. Haddleton, A. T. Jackson, H. T. Yates, J. H. Scrivens, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, 57.
- [152] J. Gidden, T. Wyttenbach, J. J. Batka, P. Weis, A. T. Jackson, J. H. Scrivens, M. T. Bowers, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, 10, 883.
- [153] S. D. Hanton, P. A. C. Clark, K. G. Owens, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, 10, 104.

- [154] A. J. Hoteling, W. J. Erb, R. J. Tyson, K. G. Owens, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 5157.
- [155] R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, R. Zenobi, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 871.
- [156] K. Strupat, J. Kampmeier, V. Horneffer, *International Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *169*, 43.
- [157] S. Trimpin, H. J. Rader, K. Mullen, *International Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *253*, 13.
- [158] T. Yalcin, Y. Q. Dai, L. Li, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 1303.
- [159] D. Dogruel, R. W. Nelson, P. Williams, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 801.
- [160] G. Schlosser, A. Jakab, G. Pocsfalvi, K. Vekey, F. Hudecz, G. Mezo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 1249.
- [161] S. D. Hanton, D. M. Parees, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 90.
- [162] L. Hughes, M. F. Wyatt, B. K. Stein, A. G. Brenton, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 543.
- [163] Y. Dai, R. M. Whittal, L. Li, *Anal Chem* **1999**, *71*, 1087.
- [164] R. R. Hensel, R. C. King, K. G. Owens, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1785.
- [165] J. A. Hankin, R. M. Barkley, R. C. Murphy, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 1646.
- [166] P. Onnerfjord, S. Ekstrom, J. Bergquist, J. Nilsson, T. Laurell, G. Marko-Varga, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *13*, 315.
- [167] I. K. Perera, J. Perkins, S. Kantartzoglou, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 180.
- [168] S. Ekstrom, P. Onnerfjord, M. Bengtsson, T. Miliotis, D. Ericsson, J. Nilsson, G. Marko-Varga, T. Laurell, *Micro Total Analysis Systems 2000, Proceedings* **2000**, 455.

- [169] J. B. Young, L. Li, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 325.
- [170] C. W. Tsao, S. Tao, C. F. Chen, J. K. Liu, D. L. DeVoe, *Microfluidics and Nanofluidics* **2010**, *8*, 777.
- [171] D. L. Baluya, T. J. Garrett, R. A. Yost, *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 6862.
- [172] M. A. R. Meier, U. S. Schubert, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2003**, 225, U666.
- [173] M. A. R. Meier, B. J. de Gans, A. M. J. van den Berg, U. S. Schubert, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 2349.
- [174] R. Bhardwaj, X. H. Fang, D. Attinger, *New Journal of Physics* **2009**, *11*, 1.
- [175] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Nature* **1997**, *389*, 827.
- [176] R. W. Garden, J. V. Sweedler, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 30.
- [177] J. B. Hu, Y. C. Chen, P. L. Urban, *Anal Chim Acta* **2013**, *766*, 77.
- [178] V. N. Truskett, K. J. Stebe, *Langmuir* **2003**, *19*, 8271.
- [179] J. Straub, A. Weinzierl, M. Zell, *Wärme - und Stoffübertragung* **1990**, *25*, 281.
- [180] S. Weidner, P. Knappe, U. Panne, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *401*, 127.
- [181] H. Wei, K. Nolkranz, D. H. Powell, J. H. Woods, M. C. Ko, R. T. Kennedy, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 1193.
- [182] S. M. Weidner, J. Falkenhagen, I. Bressler, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2012**, *213*, 2404.
- [183] F. Lottspeich, H. Zorbas, in *Bioanalytik*, Spektrum Verlag, Heidelberg; Berlin, **1998**, p. 349.
- [184] S. Weidner, R. D. Schultze, B. Enthaler, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2013**, *27*, 896.
- [185] X. W. Lou, J. L. J. van Dongen, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 1308.

- [186] S. D. Hanton, I. Z. Hyder, J. R. Stets, K. G. Owens, W. R. Blair, C. M. Guttman, A. A. Giuseppetti, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15*, 168.
- [187] R. Skelton, F. Dubois, R. Zenobi, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1707.
- [188] S. Trimpin, M. L. Deinzer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 542.
- [189] S. Trimpin, A. C. Grimsdale, H. J. Rader, K. Mullen, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 3777.
- [190] L. Przybilla, J. D. Brand, K. Yoshimura, H. J. Rader, K. Mullen, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 4591.
- [191] S. Trimpin, S. Keune, H. J. Räder, K. Müllen, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 661.
- [192] S. U. Kulkarni, M. C. Thies, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26*, 392.
- [193] S. Park, R. J. Kazlauskas, *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 8395.
- [194] X. X. Han, D. W. Armstrong, *Organic Letters* **2005**, *7*, 4205.
- [195] S. Carda-Broch, A. Berthod, D. W. Armstrong, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 553.
- [196] K. Huang, X. Han, X. Zhang, D. W. Armstrong, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 2265.
- [197] D. W. Armstrong, L. K. Zhang, L. F. He, M. L. Gross, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 3679.
- [198] J. L. Anderson, J. Ding, T. Welton, D. W. Armstrong, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14247.
- [199] P. Wasserscheid, W. Keim, *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 3772.
- [200] M. Zabet-Moghaddam, E. Heinzle, A. Tholey, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 141.
- [201] J. Preisler, P. Hu, T. Rejtar, B. L. Karger, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 4785.

- [202] M. Karas, U. Bahr, K. Strupat, F. Hillenkamp, A. Tsarbopoulos, B. N. Pramanik, *Analytical Chemistry* **1995**, 67, 675.
- [203] B. Spengler, *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 32, 1019.
- [204] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, 5, 198.
- [205] P. Chaurand, F. Luetzenkirchen, B. Spengler, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, 10, 91.
- [206] R. S. Brown, B. L. Carr, J. J. Lennon, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1996**, 7, 225.
- [207] R. S. Brown, J. J. Lennon, *Analytical Chemistry* **1995**, 67, 3990.
- [208] R. S. Brown, J. H. Feng, D. C. Reiber, *International Journal of Mass Spectrometry* **1997**, 169, 1.
- [209] T. Kocher, A. Engstrom, R. A. Zubarev, *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 172.
- [210] A. S. Abdelhameed, M. W. Attwa, H. A. Abdel-Aziz, A. A. Kadi, *Chemistry Central Journal* **2013**, 7.
- [211] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, 376, 952.
- [212] S. M. Weidner, J. Falkenhagen, K. Knop, A. Thuenemann, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23, 2768.
- [213] K. Knop, B. O. Jahn, M. D. Hager, A. Crecelius, M. Gottschaldt, U. S. Schubert, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, 211, 677.
- [214] A. C. Crecelius, C. R. Becer, K. Knop, U. S. Schubert, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2010**, 48, 4375.
- [215] A. T. Jackson, A. Bunn, L. R. Hutchings, F. T. Kiff, R. W. Richards, J. Williams, M. R. Green, R. H. Bateman, *Polymer* **2000**, 41, 7437.
- [216] A. T. Jackson, M. R. Green, R. H. Bateman, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, 20, 3542.
- [217] A. M. Yol, D. Dabney, S. F. Wang, B. A. Laurent, M. D. Foster, R. P. Quirk, S. M. Grayson, C. Wesdemiotis, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, 24, 74.

- [218] M. Wuhrer, M. I. Catalina, A. M. Deelder, C. H. Hokke, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, 849, 115.
- [219] D. J. Douglas, J. B. French, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1992**, 3, 398.
- [220] A. N. Krutchinsky, I. V. Chernushevich, V. L. Spicer, W. Ens, K. G. Standing, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, 9, 569.
- [221] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Analytical Chemistry* **1997**, 69, 4751.
- [222] R. M. A. Heeren, in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (Ed.: L. John), Academic Press, Oxford, **2010**, pp. 1443.
- [223] J. C. Jurchen, S. S. Rubakhin, J. V. Sweedler, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16, 1654.
- [224] A. Rompp, B. Spengler, *Histochemistry and Cell Biology* **2013**, 139, 759.
- [225] A. Zavalin, E. M. Todd, P. D. Rawhouser, J. H. Yang, J. L. Norris, R. M. Caprioli, *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, 47, 1473.
- [226] H. Thiele, S. Heldmann, D. Trede, J. Strehlow, S. Wirtz, W. Dreher, J. Berger, J. Oetjen, J. H. Kobarg, B. Fischer, P. Maass, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2014**, 1844, 117.
- [227] A. C. Crecelius, D. S. Cornett, R. M. Caprioli, B. Williams, B. M. Dawant, B. Bodenheimer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, 16, 1093.
- [228] T. K. Sinha, S. Khatib-Shahidi, T. E. Yankeelov, K. Mapara, M. Ehtesham, D. S. Cornett, B. M. Dawant, R. M. Caprioli, J. C. Gore, *Nature Methods* **2008**, 5, 57.
- [229] H. Qiao, G. Piyadasa, V. Spicer, W. Ens, *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 281, 41.
- [230] R. C. Murphy, J. A. Hankin, R. M. Barkley, *Journal of Lipid Research* **2009**, 50, S317.
- [231] H. Meistermann, J. L. Norris, H. R. Aerni, D. S. Cornett, A. Friedlein, A. R. Erskine, A. Augustin, M. C. D. Mudry, S. Ruepp, L. Suter, H. Langen, R. M. Caprioli, A. Ducret, *Molecular & Cellular Proteomics* **2006**, 5, 1876.
- [232] S. M. Weidner, J. Falkenhagen, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, 23, 653.

- [233] A. C. Crecelius, J. Vitz, U. S. Schubert, *Analytica Chimica Acta* **2014**, 808, 10.
- [234] A. C. Crecelius, T. Alexandrov, U. S. Schubert, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, 25, 2809.
- [235] C. L. Yaws, *Thermophysical Properties of Chemicals and Hydrocarbons*, William Andrew Inc., Norwich, NY, **2008**.
- [236] D. R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, 85 ed., CRC Press, Boca Raton, FL, **2004**.
- [237] J. Brandrup, A. Abe, D. R. Bloch, E. H. Immergut, E. A. Grulke, *Polymer Handbook, Vol. 2*, 4 ed., John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, **2003**.
- [238] D. W. Van Krevelen, K. Te Nijenhuis, 4 ed., Elsevier, Amsterdam, NL, **2009**, p. 260.
- [239] I. Kossler, M. Netopilik, G. Schulz, R. Gnauck, *Polymer Bulletin* **1982**, 7, 597.
- [240] S. Moyses, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2008**, 13, 413.
- [241] B. Riedl, M. J. Vohl, L. Calvé, *Journal of Applied Polymer Science* **1990**, 39, 341.
- [242] K. A. Jackson, *Kinetic Processes*, Wiley-VCH, Weinheim, DE, **2004**, p. 13.
- [243] S. M. Weidner, J. Falkenhagen, S. Maltsev, V. Sauerland, M. Rinken, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, 2750.
- [244] ISO, in *ISO 10927:2011*, **2011**.
- [245] C. L. Moraila-Martinez, M. A. Cabrerizo-Vilchez, M. A. Rodriguez-Valverde, *Soft Matter* **2013**, 9, 1664.
- [246] M. Majumder, C. S. Rendall, J. A. Eukel, J. Y. L. Wang, N. Behabtu, C. L. Pint, T.-Y. Liu, A. W. Orbaek, F. Mirri, J. Nam, A. R. Barron, R. H. Hauge, H. K. Schmidt, M. Pasquali, *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, 116, 6536.
- [247] H. Craubner, *Colloid and Polymer Science* **1975**, 253, 28.
- [248] A. Wulf, K. Fumino, D. Michalik, R. Ludwig, *Chemphyschem* **2007**, 8, 2265.
- [249] M. F. Wyatt, B. K. Stein, A. G. Brenton, *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 199.