

Carl v. Ossietzky
**UNIVERSITÄT
OLDENBURG**

Herrn Prof. Dr. J. O. Metzger danke ich für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. P. Köll danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. O. F. Studiensengang Diplom-Chemie Landesforschungsinstitut für Forst- und Holzwirtschaft in Hamburg danke ich für die Bereitstellung der wertvollen Proben.

DIPLOMARBEIT

Den Herren Dipl.-Ing. K.-H. Plan und Dipl.-Chem. R. Woisch danke ich für die Aufnahme von Sektorfeldmassenspektren.

Den Herren Dr. W.-D. Lehmann und Dr. R. Pipkorn vom Deutschen Krebsfor-
Massenspektrometrische Untersuchungen von Ligninen und
Lignin-Kohlenhydrat-Komplexen

Den Herren Dr. R. Frank und Dr. A. Boxerhoff vom Zentrum für Molekulare
Biologie in Heidelberg danke ich für die Bereitstellung an einem Shimadzu Kr-
ios Kompact MALDI II Laserdesorption-Massenspektrometer.

vorgelegt von:

Der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik der Universität Oldenburg danke ich
für die Nutzungsmöglichkeit des Laserdesorption-Massenspektrometers (LDA
1) und für die aufschlußreichen Diskussionen, insbesondere mit Prof. Dr. E. R. Hilf,
Dr. W. Tiszynski und Dipl.-Phys. R. Angermann.

Knut Kristan Weber

Betreuender Gutachter: Prof. Dr. J. O. Metzger

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. P. Köll

Oldenburg, den 24.05.1994

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. J. O. Metzger danke ich für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. P. Köll danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. O. Faix vom Institut für Holzchemie der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft im Hamburg danke ich für die Bereitstellung der wertvollen Proben.

Den Herren Dipl.-Ing. K.-H. Plate und Dipl.-Chem. R. Woisch danke ich für die Aufnahme von Sektorfeldmassenspektren.

Den Herren Dr. W.-D. Lehmann und Dr. R. Pipkorn vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg danke ich für die Meßmöglichkeit an einem Finnigan VISION 2000 Laserdesorptions-Massenspektrometer.

Den Herren Dr. R. Frank und Dr. A. Bosserhoff vom Zentrum Für Molekulare Biologie in Heidelberg danke ich für die Meßmöglichkeit an einem Shimadzu Kratos Kompact MALDI III Laserdesorptions-Massenspektrometer.

Der Arbeitsgruppe Molekül- und Biophysik der Universität Oldenburg danke ich für die Nutzungsmöglichkeit des Plasmadesorptions-Massenspektrometers OLDA 1 und für die aufschlußreichen Diskussionen, insbesondere mit Prof. Dr. E. R. Hilf, Dr. W. Tuszynski und Dipl.-Phys. R. Angermann.

6.1. Überblick	36
6.2.1. Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS)	36
6.2.2. Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (LD-MS)	36
6.3. Vergleich der Matrixeigenschaften in der PD-MS und MALD-MS auf Grund theoretischer Überlegungen	44
6.4. Eigenschaften einer potentiellen Matrix und Preparation	45
6.5. Zusammenfassung	50

1. Inhaltsverzeichnis

	Seite:
1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Abbildungsverzeichnis	2
3. Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit	4
4. Einleitung und Themenstellung	5
5. Massenspektrometrie	7
5.1. Einleitung und Überblick	7
5.2. Theorie der Desorption / Ionisation , Einführung	7
5.2.1. Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS)	8
a) Desorption	8
b) Ionisation	12
5.2.2. Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (LD-MS)	16
a) Desorption	17
b) Ionisation	23
6. Diskussion der Matrixeffekte	26
6.1. Überblick	26
6.2.1. Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS)	26
6.2.2. Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (LD-MS)	36
6.3. Vergleich der Matrixeigenschaften in der PD-MS und MALD-MS auf Grund theoretischer Überlegungen	44
6.4. Eigenschaften einer potentiellen Matrix und Präparation	45
6.5. Zusammenfassung	50

2. Abbildungsverzeichnis:

	Seite:
7. Einleitung zu den untersuchten Substanzen	51
7.1. Einführung in die Lignine	51
7.2. Zusammenfassung der Eigenschaften	53
7.3. Betrachtung zukünftiger Matrices und Präparationen für die Lignine	54
8. Ergebnisse der Messungen	55
8.1. Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS)	55
8.2. Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (MALD-MS)	56
8.3. Pyrolyse-Massenspektrometrie (EI und DCI)	62
9. Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	76
10. Experimenteller Teil	76
10.1. Materialien	76
10.2. Massenspektrometer	78
10.3. Probenpräparation und Vermessung	78
a) Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS)	78
b) Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (MALD-MS)	80
c) Pyrolyse-Massenspektrometrie (EI und DCI)	81
11. Literaturverzeichnis	83

2. Abbildungsverzeichnis:

			Seite:
1.:	MALD-MS-Spektrum MWL Birke	Überblick	57
2.:	MALD-MS-Spektrum MWL Birke	Ausschnitt 500-2000 Dalton	58
3.:	MALD-MS-Spektrum Fichten-LCC	Überblick	60
4.:	MALD-MS-Spektrum Fichten-LCC	Ausschnitt 500-2000 Dalton	61
5.:	Pyrolyse-EI-Spektren MWL Birke	MWL Buche	63
6.:	DCI-Spektren	G-DHP Fr. 9	LCC Buche (I) 66
7.:	DCI-Spektrum	Ionenströme	LCC Fichte 67
8.:	DCI-Spektrum	Ionenströme	G-DHP Fr. 9 68
9.:	DCI-Spektren	G-DHP Fr. 9	LCC Fichte (II) 69
10:	DCI-Spektren	MWL Buche	MWL Buche Fr.11 72
11.:	DCI-Spektren	MWL Rotholz	MWL Pfahlrohr 73
12:	DCI-Spektrum	Ionenströme	MWL Buche 74
13.:	DCI-Spektrum	Einzelpektren	MWL Buche 75

3. Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit

Die plasma- und laserdesorptions-massenspektrometrische Untersuchung von Ligninen und Lignin-Kohlenhydrat-Komplexen blieb, bis auf eine Ausnahme, erfolglos. Es konnten daher keine neuen Erkenntnisse über diese Verbindungsklassen erhalten werden.

Ein intensives Befassen mit den Eigenschaften einer potentiellen Matrix und der Präparationstechnik läßt zukünftige Erfolge mit der PD-MS, unter akzeptablen Meßzeiten, unwahrscheinlich erscheinen. Bei der MALD-MS sollte es jedoch sehr wohl möglich sein die bestehenden Erfolge auszubauen.

Zu diesem Zweck wird eine aktuelle, umfassende und kritische Darstellung sowie Diskussion über den Stand der Theorie und Praxis dieser Methoden durchgeführt. So wird ein generelles Verfahrensschema vorgestellt, um bei zukünftigen, neuen Substanzklassen schneller und zielgerichteter eine erfolgreiche Präparation zu finden. Weiter besteht die Möglichkeit, die in der Anwendung vorkommenden Parameter dieser Methoden hinsichtlich ihrer Auswirkungen einzuschätzen und bei bestimmten Beobachtungen gezielt zu variieren. Das Differenzieren zwischen den Effekten, die unter Verwendung der jeweiligen Präparationstechnik auftreten, führt zu einer weitgehenden Trennung zwischen Desorption und Ionisation. Im Gegensatz dazu wird die Ähnlichkeit der beiden Verfahren an sich, unter Zuhilfenahme der dazugehörigen physikalischen Theorien, betont. Es wird gezeigt, daß die gemeinsamen Grundlagen der Desorptionsvorgänge deduktiv zu einer potentiellen, neuartigen Methode führen können.

Zur Charakterisierung der Lignine und Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe wurden Pyrolyse-EI- und DCI-Massenspektren angefertigt. Aus diesen geht qualitativ der molekulare Aufbau der zu untersuchenden Substanzen hervor. Es werden Möglichkeiten diskutiert, wie mit diesen Methoden auch quantitative Aussagen über die Zusammensetzung gewonnen werden können.

4. Einleitung und Themenstellung:

Die Massenspektrometrie ist eine leistungsfähige Technik bei der Ermittlung der Masse und Struktur von Molekülen. In jüngster Zeit verdrängt diese zunehmend etablierte Methoden aus ihren Positionen, wie zum Beispiel die Gradientenzentrifugation oder die Gelpermeationschromatographie zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen.¹ Sie wird aber auch sinnvoll in Kombination mit diesen zur Gemischanalytik eingesetzt, etwa bei der Gelelektrophorese.² Die direkte Proteinsequenzierung im Massenspektrometer ist ebenfalls möglich.³ Insbesondere die Plasma-Desorptions- und matrixunterstützte Laser-Desorptions-Massenspektrometrie stoßen dabei in vorher unzugängliche Molekulargewichtsbereiche vor, bei Proteinen bis über 250.000 Dalton,⁴ bei DNA bis über 400.000 Dalton.⁵ Die Bedeutung für die "life sciences" und das "Human-Genome-Project" ist daher kaum zu unterschätzen.⁶ Aber auch in der Technik wächst das Interesse, beispielsweise bei der Bestimmung von Molekulargewichtsverteilungen technischer Polymere.⁷

Während diese beiden Methoden bei einigen Substanzklassen - wie zum Beispiel den Proteinen - nahezu problemlos in Routine angewendet werden können, sind andere Molekülfamilien- wie zum Beispiel die Lignine- mit diesen Methoden gar nicht oder nur äußerst schwer zugänglich. Dies ist dabei keineswegs nur eine Frage des Molekulargewichtes. Die genauen Umstände, die eine günstige Umgebung für diese Methoden darstellen, sind unklar. Der Erfolg hängt wesentlich von der Art der Präparation ab, deren optimale Eigenschaften nicht rational vorhergesagt werden können, weshalb man diese bisher intuitiv nach der trial and error-Methode ausprobiert (z.B. Lit.⁸). Die Eigenschaften gezielt benennen und auswählen zu können würde daher einen enormen Fortschritt in der Anwendung auf vielen weiteren Gebieten ermöglichen und beschleunigen.

Meine Aufgabe war es nun zu versuchen aus dem bekannten theoretischen und empirischen Material solche Vorhersagen abzuleiten, und mit eigenen Messungen am Beispiel der Lignine und Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe zu verifizieren. Des Weiteren sollten Ähnlichkeiten zwischen der Plasma- und Laserdesorption genutzt werden, um nach Möglichkeit die Präparation für beide zu vereinheitlichen. Üblicherweise werden die zu untersuchenden Moleküle entweder auf eine geeignete Oberfläche aufgebracht oder in eine passende Matrix eingebettet. Theoretische Vorstellungen der Desorptions- und Ionisations-Prozesse sollten es unter

Verwendung von empirischem Material ermöglichen, die Vorgehensweise und die eingesetzten Materialien auf ein gegebenes Problem hin maßzuschneidern.

5.1. Einleitung und Überblick:

Die hierfür einzusetzenden Lignine und Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe zeichnen sich durch äußerste Komplexizität aus, die - von lebender Materie abgesehen - wahrscheinlich nur noch durch Erde übertroffen werden kann.⁹ Daher sind diese Substanzklassen als extreme Prüfsteine für die Massenspektrometrie anzusehen. Das Interesse gilt diesen aber, weil sie als technisches Abfallprodukt mit 50 Millionen Jahrestonnen anfallen. Sie stellen ein Abwasserproblem dar und werden außer durch Verbrennung oder als Füllstoff kaum genutzt. Für eine gezielte stoffliche Verwertung ist es nötig die Charakteristika ihrer Struktur möglichst genau zu kennen.

Nur ein Teil der von mir ausgewerteten Literatur kann aus Platzgründen in dieser Arbeit vorgestellt werden. Da ich mich auf die Punkte beschränken muß, die für die Diskussion der Eigenschaften einer potentiellen Matrix später wesentlich sind, kann das Gesamtbild dabei nicht vollständig erscheinen.

5.2. Theorie der Desorption / Ionisation , Einführung:

Alle in dieser Arbeit besprochenen Ionenquellen nutzen das Prinzip des Impulsübertrages von Primärteilchen¹⁰, welche dabei sein können:

- 1.: schnelle Kernfragmente (PD-MS)
- 2.: Ionen (SI-MS und liquid-SI-MS)
- 3.: Atome (FAB-MS)
- 4.: Photonen (LD-MS , MALD-MS)

Die Abkürzungen bedeuten:

5. Massenspektrometrie

5.1. Einleitung und Überblick:

Der kritische Faktor bei der Untersuchung hochmolekularer Substanzen ist das Verbringen in die Gasphase. Es ist nicht problematisch wenn diese dabei nur desorbiert werden, da eine Nachionisation auf schonende Art und Weise möglich ist, so zum Beispiel durch resonante Laser-Photoionisation.^{10,11} Die Lebensdauer der Analytionen muß für die Detektion hinreichend groß sein, weshalb Überschußenergien zu vermeiden sind ("schonende Desorption"). Die hierzu benötigte Zeit liegt bei Flugzeitmassenspektrometern um 100 ns¹², und ist ca. 1000 mal kleiner als die von Quadrupolgeräten.¹³ Um ein verwertbares Signal zu erhalten, muß der Strom an Analytionen vom ebenso detektierten statistischen Untergrund (Artefakte) sowie von anderen vorhandenen Restteilchen unterschieden werden können und daher hinreichend groß sein. Hierfür ist der Dampfdruck zu gering. Ein Erwärmen findet seine natürliche Grenze, da die zu untersuchenden Substanzen dann thermisch zerstört werden. Je mehr Bindungen ein Molekül enthält, umso wahrscheinlicher wird ein Bindungsbruch gegenüber einem gerichteten Wegbewegen von der Oberfläche, da die thermische Energie räumlich isotrop ist. Trotz allem ist sehr schnelles Erhitzen ein gangbarer Weg zur Desorption, da die Kinetik dann die Verdampfung favorisiert.¹⁴ Ein wesentlicher Teil der Aufgaben einer Matrix ist es, Gradienten hoher Energiedichte und kurzer Dauer in diesem Sinne nutzbar zu machen. Wie das geschieht werde ich im weiteren Verlauf dieser Arbeit schildern.

5.2. Theorie der Desorption / Ionisation, Einführung:

Alle in dieser Arbeit besprochenen Ionenquellen nutzen das Prinzip des Impulsübertrages von Primärteilchen¹⁵, welche dabei sein können:

- 1.: schnelle Kernfragmente (PD-MS)
- 2.: Ionen (SI-MS und liquid-SI-MS)
- 3.: Atome (FAB-MS)
- 4.: Photonen (LD-MS, MALD-MS)

Die Abkürzungen bedeuten:

PD-MS = plasma-desorption mass spectrometry ; SI-MS = secondary ion mass spectrometry ; liquid-SI-MS = liquid secondary ion mass spectrometry ; FAB-MS = fast atom bombardment mass spectrometry ; LD-MS = laser-desorption mass spectrometry ; MALD-MS = matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry

Diese unterschiedlichen Methoden bedingen auch ein unterschiedliches Ausmaß der Oberflächen- bzw. Volumensensitivität: In der Reihenfolge SI-MS, PD-MS, FAB-MS, LD-MS nimmt die Informationstiefe immer weiter zu.¹⁶

5.2.1. Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS):

a) Desorption:

Die Methode der Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie wurde in den 70er Jahren von R. D. Macfarlane und D. F. Torgerson entwickelt.¹⁷

In den Modellen zur Desorption/Ionisation wird die Rolle der molekularen Eigenschaften von Matrices und Analyten für diese Prozesse diskutiert. Da diese Kenntnis zu Voraussagen über günstige Matriceigenschaften genutzt werden kann, werde ich nun die wichtigsten dieser Modelle vorstellen:

Im **Schockwellen-Modell** setzt das eintretende Kernfragment seinen Weg nahezu ungehindert fort. Innerhalb dessen bohrschen, adiabatischen Radius entsteht so der sogenannte "infra-track", mit einem Durchmesser von 1 bis 2 nm. In diesem entstehen durch Ionisation ca. 3000 Elektronen/Loch-Paare pro nm, was einer Energie von 10.000 eV/nm entspricht. Diese können in einem Metall innerhalb 10^{-17} Sekunden rekombinieren.¹⁸ Die Energie durch Rekombination dissipiert dann schnell durch die Anregung von Valenzelektronen im Leitungsband über größere Entfernungen. Daher sind die Ionenausbeuten von reinen Metall-Trägern sehr schlecht. In *dielektrischen Medien* ist die freie Valenzelektronenbewegung behindert, und die Elektron/Loch-Paare, zusammengehalten durch Coulombwechselwirkung, bilden Quasiteilchen, sogenannte Excitonen. Diese können sich durch das Medium bewegen, und ihre Eigenschaften sind abhängig von der spezifischen Kopplung zwischen den Molekülen. Intermolekulare Wechselwirkungen verbinden deren elektronische Niveaus zu Exciton-Energiebändern. An *Gitterfehlstellen*, wie zum Beispiel F-Zentren erfolgt Einfang und Konversion, welche sich als Lumineszenzstrahlung bemerkbar machen kann.¹⁹ Es kommt auch zur Anregung von Gitterschwingungen, deren elementare Einheit das Phonon ist. Phononenwellen setzen

sich in kristallinem Material fort. Sind keine *Kristalle* vorhanden, oder ist die Substanz verunreinigt, kommt es zur Streuung, und die gerichtete Ausbreitung ist nicht mehr möglich. So weist Macfarlane auf die Notwendigkeit von Kristallen hin.²⁰ Im infra-track tritt ausnahmslos Fragmentierung ein. Außerhalb dessen Radius werden Sekundärelektronen generiert, hier befindet sich der sogenannte "ultra-track", mit einem Durchmesser von 20 bis 200 nm. Die Energiedichte nimmt mit zunehmender Entfernung vom Zentrum der Trajektorie ab, bis schließlich nur noch moderate elektronische bzw. kinetische Anregung stattfindet. Die schnellen Ausbreitungsprozesse führen zu den "Schockwellen".

Die gleiche Idee führte zum **moleküldynamischen Modell**.²¹ Dessen Grundannahme ist, daß das eintretende Teilchen einen Zylinder mit einem um etwa 10% erhöhten Volumen hinterläßt. Wie dieses geschieht spielt für das Modell keine Rolle. Es wird mit einem modifizierten Lennard-Jones 6-12-Potential gerechnet. Als Parameter gehen die *Dichte*, die *Kohäsionsenergie* der Teilchen und die *Schallgeschwindigkeit* in der Substanz ein. (Es sei angemerkt, daß diese Parameter alle vom Grad der Kristallisation abhängen.) Die Totalausbeute ist umgekehrt proportional der Dichte sowie umgekehrt proportional der Kohäsionsenergie hoch drei. Anschaulich sind lockere, wenig wechselwirkende Kristallverbände instabiler. Das Modell sagt anisotrope Austrittswinkel und Geschwindigkeitsverteilungen in Abhängigkeit des Einschlagswinkels voraus, was experimentell bestätigt wird. Nur Fragmentationen treten in Radialverteilung symmetrisch zur Normalen aus. Auch die Totalausbeute wird experimentell bestätigt. Diese steigt mit dem Einfallswinkel zur Normalen an, da der Impuls radial zur Trajektorie wirkt. Das Verhältnis von Neutralen zu Ionen beträgt bis **10.000 : 1**. Die Ionenausbeute ist proportional dem Kubik der Projektil-Ladung und dem Quadrat des Projektil-Momentes.²² Der Projektildurchschlag nimmt 10^{-12} Sekunden in Anspruch. Der Ausstoß von Wasserstoff-, Metall- und Fragmentationen aus dem Bereich des infra-tracks beginnt unmittelbar und dauert über Mikrosekunden hin an. Die Quasimolekülonen entstehen erst nach 10^{-11} Sekunden. Ihre Bildung erreicht schon nach 10^{-10} Sekunden die Sättigung um dannach schnell abzufallen. Da die kinetische Energie der frühen Teilchen aus dem infra-track-Bereich zudem höher ist (entsprechend Temperaturen von 25.000 Kelvin), sollten diese nicht zur Eichung herangezogen werden. Kraterbildung und Aufschmelzen enden ebenfalls erst nach Mikrosekunden. Moleküldynamische Berechnungen von Hilf et al. ergeben genau dieses.²³ Die häufigsten

Geschwindigkeiten betragen radial und axial 100 Meter pro Sekunde (entsprechend 0,5 eV) und die Verteilung fällt dann relativ zügig ab, nur sehr wenige Teilchen erreichen bis zu 1000 Meter pro Sekunde (entsprechend 30 eV). Weitere Computersimulationen²⁴ dieser Gruppe ergeben einen *Volumenausstoß* an der Oberfläche. Als Parameter fließen die Schallgeschwindigkeit in der Substanz, molekulare Abstände, Kohäsionsenergie und Reibung ein. Es handelt sich hier um Energieübertragung durch Sekundärelektronen aus dem ultra-track.

Von den moleküldynamischen Modellen inspiriert wurde das sogenannte **analytical pressure-pulse-Modell**.²⁵ Auch in diesem gilt die Annahme, daß eine zylindrische Spur entsteht, gleich welchen Ursprungs. Die Betrachtung dieses Modelles bezieht sich auf die dabei auftretenden radialen Impulskomponenten, welche aufsummiert werden. Man behandelt die Einzelimpulse als lokale Energiedichte bzw. deren Gradienten. Es gibt einen starken Hitzegradienten, der das Gefüge impulsartig durchläuft und an der Oberfläche den Analyten herausschleudert ("diffusive spike"), daher der Name "pressure pulse". Bei niedrigen Energiedichten wirken die Impulse als Einzelereignisse. Die Ausbeute an herausgeschleuderten Teilchen skaliert dann linear mit der sogenannten "Stoppkraft", das ist die Einschlagsenergie des Primärteilchens (dE nach dx). Bei höheren Energiedichten tritt die tatsächlich gefundene kubische Abhängigkeit ein. Es werden unterschiedliche Schwellenwerte für Neutrale und Ionen vorausgesagt und experimentell bestätigt, auch die Ausbeuteabhängigkeit vom Einfallswinkel stimmt mit den Meßergebnissen überein. In der Literatur werden die Begriffe Schockwelle und pressure pulse oftmals synonym verwendet.

Von Hilf²⁶ stammt der Begriff "entropic desorption", da der Energie keine Zeit bleibt, um sich gleichgewichtsthermodynamisch auf die verschiedenen Möglichkeiten aufzuteilen. Er beschreibt die nichtlineare Kopplung von makroskopischen, mechanischen Freiheitsgraden (radiale, longitudinale Schallausbreitung) in der Probe mit Oberflächentransversalschwingungen, die oberhalb einer Schwelle aufbrechen können. Hierbei kommt es zu stationären Oberflächensolitonen, die manchmal auch auf Wasseroberflächen zu beobachten sind (**hydrodynamisches Modell**).

Als Erklärung der phänomenologisch allgemein anerkannten ion-track-Expansion (übergeordneter Begriff von infra-track und ultra-track) nimmt man mehrere Mechanismen an:

Das **Coulomb-Explosions-Modell**²⁷ geht davon aus, daß das durchschlagende Ion entlang seiner Spur Atome ionisiert. In Metallen erfolgt schnelle Rekombination der freigesetzten Elektronen. In Dielektrika können die hochenergetischen Elektronen nicht schnell genug zurückkehren, so daß die positive Nettoladung lange genug bestehen bleibt, um die Ionen durch ihre Coulomb-Abstoßung auseinander zu treiben. Der Durchmesser der Ionisationsspur kann hier elektronenmikroskopisch zu 3 bis 5 Nanometer bestimmt werden. In einem ungestörten Kristall sind etwa 20 eV nötig um ein Atom von seiner Gitterposition zu vertreiben. Es wird angenommen, daß eine elektronische Kaskade zu weiterer Ionisation führt und dadurch die Bindungsenergie vermindert wird, was eine Dislokation erleichtert, und es so zur radialen Ausbreitung kommt. Die engere Geschwindigkeitsverteilung von negativen Fragmentionen bezeugt die positive Restladung im ion-track.²⁸

Das **Popkorn-Modell**²⁹ betrachtet an der Oberfläche gebundene Proteine als eine Mischung aus Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Die Annahme besagt nun, daß Moleküle im ultra-track durch niederenergetische Elektronen schwingungsangeregt werden, da die Wirkungsquerschnitte dipolarer Bindungen für diesen Prozeß sehr groß sind, und sich um linear 3-5 % ausdehnen, was einer gleichgewichtsthermodynamischen Temperatur von 1000 Kelvin entspräche. Diese Ausdehnung bewirkt eine Molekülschwerpunktverschiebung um etwa 300 bis 500 pm, was eine Anregung der weiteren Moleküle zur Folge hat. Der auftretende Energiebereich führt vornehmlich zur Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen im ultra-track. Ein Molekül nach dem anderen wird so angeregt, und die letzten an der Oberfläche, die sich ausdehnen, stoßen nur an der zum Inneren gewandten Seite an Nachbarn. Das "aufpoppen" dieser äußeren "molekularen Körner" führt zum abplatzen, was den anschaulichen Namen dieses Modells begründet.

Von Hilf et al.³⁰ wird die Bildung, der Transport und die Kopplung von Excitonen unter besonderer Berücksichtigung einer Matrix betrachtet. Für die Excitonenbewegung spielen die intermolekularen Abstände und die *Übergangsdipolmomente* eine Rolle. Die Breite des Excitonenbandes ist der Dichte proportional und wird

durch Fehlorderungen herabgesetzt, da die einheitliche Kopplung der Moleküldipole (durch ihre Ausrichtung) dann behindert ist. Auch hier wird wieder die notwendige Kristallinität hervorgehoben. Die Exciton-Phonon-Kopplung ist umgekehrt proportional dem Kubik der *Elementarzellgröße*. Die Kopplung wirkt sich auf die Art der Excitonenausbreitung (Dispersion oder Einfang) aus. Die Stärke dieses Effektes ist von der Oszillatorfrequenz der dipolaren Bindung abhängig, und gerade für Wasserstoffbrücken groß (s.o.), hängt aber auch stark von *lokalen Dichtefluktuationen* ab.

In einem Ansatz von Johnson und Sundqvist³¹ folgt der elektronischen Anregung eine Relaxation über strahlungslose Übergänge in abstoßende Anregungszustände, aus denen heraus die Moleküle fragmentieren. Die Fragmente tragen dann kinetische Energien von einigen Elektronenvolt und sind in der Lage an der Oberfläche Analyteileichen zu desorbieren. Für größere Moleküle sind hierzu mehrere Fragmente gleichzeitig nötig, was in der Nähe des ion-tracks gegeben ist. Als weitere Möglichkeit wird die Anregung von *Van-der-Waals-Bindungen* oder Wasserstoffbrücken an der Oberfläche erwägt, die daraufhin antibindenden Charakter erhalten und den Analyten freigeben.

Johnson³² bemerkt, daß die Unterteilung in primäre, hochenergetische Elektronen aus dem infra-track und sekundäre (Delta-) Elektronen aus dem ultra-track künstlich erscheint. Die relative Gewichtung der verschiedenen Anregungsarten ist einer der Hauptunterschiede der verschiedenen Modelle. Er weist im Übrigen darauf hin, daß die **Energiedosis** mit jeweils 60 eV/nm^3 bei der PD-MS und der MALD-MS gleich groß ist.

b) Ionisation:

Bei der Ionisation kommt die Desorption sogenannter "präformierter Ionen" ebenso in Frage wie eine Bildung in der Gasphase. Beides kann als gesichert betrachtet werden.

Für die Desorption vorgebildeter Ionen aus der festen Phase heraus sind an experimentellen Hinweisen anzuführen:

1.: Die Beobachtung, daß alle von nitrocellulosebeschichteten Targets austretenden unfragmentierten Moleküle dieselbe Energie- und Richtungsverteilung in Abhängigkeit des Einschußwinkels besitzen. Dies läßt sich nicht mit bimolekularen Stößen in der Gasphase vereinbaren, da dann die Korrelation verloren gehen müßte. Die Energieverteilung läßt sich mit einer Maxwell-Boltzmann-Funktion fitten, woraus hervorgeht, daß genug Zeit für die Relaxation zur Verfügung steht bevor die Ionen entweichen. Bei reinen Nitrocelluloseschichten ist die kinetische Energie der Wasserstoff-, Metall- und Fragment-Ionen **höher** und die Desorption **verzögert** gegenüber mit 10 nm Gold beschichteten Nitrocellulose-targets. Für letzteres wird eine *statische Oberflächenaufladung* dieser Schichten verantwortlich gemacht.³³ Das rechnerische Lennard-Jones 6-12-Modell gibt die gefundenen Ergebnisse korrekt wieder.³⁴ Metallionen (wie z.B. Cs⁺), Wasserstoffcluster sowie Fragmente werden dagegen *ungerichtet* ausgestoßen, was mit einer hochenergetischen Desorption aus dem Bereich des infra-tracks erklärt wird.³⁵ Gerade bei Massen derselben Größenordnung sollte der Impulsübertrag hoch sein. Bei einer PD-MS-Messung von Leucin-Enkephalin (555 Dalton) unter Cäsium-Zusatz (133 Dalton) beobachtete man die Ionen (M+H)⁺, (M+Cs)⁺ und (M+2Cs-H)⁺ mit denselben radialen Geschwindigkeitsverteilungen.³⁶ Ein Zerfall geladener, höherer Cluster wird hier ausgeschlossen, da dann die Geschwindigkeitsverteilung verschoben sein sollte, und man in diesem Bereich Energieunterschiede von 0,1 eV sehr gut auflösen kann. Die Teilchendichte an sich ist für eine bimolekulare Gasphasenreaktion mit ca. 10 Ionen pro Desorptionseinzelfall wohl auch zu gering. (Diesen stehen - durch das Verhältnis 1 : 10.000 - maximal 100.000 Neutrale zur Seite, s.o.)

2.: Cotter stellte 1982 fest, daß bei einer ganzen Anzahl von Desorptionsmethoden, wie zum Beispiel PD-MS, SI-MS, FAB-MS, LD-MS, Felddesorption (FD) und elektrohydrodynamischer Ionisation (EHD) Ionen offensichtlich aus der kondensierten Phase heraus desorbiert werden. Am leichtesten desorbieren organische Salze, gefolgt von polaren Molekülen und als letzten den neutralen, unpolaren Molekülen.³⁷ Cooks et al. empfehlen daher eine *polare Derivatisierung*.³⁸ Auch beim Thermospray-Verfahren wird eine Lösung polarer Moleküle unter Erhitzen zerstäubt, und es muß ein Elektrolyt darin vorhanden sein, der in Lösung dissoziiert vorliegt.³⁹

3.: Untersuchungen von Zirkoniumphosphaten mittels PD-MS unter Verwendung von Koinzidenzzählung belegen, daß die gefundenen Cluster aus der Originalstruktur stammen müssen, und nicht durch Aufbaureaktionen kleinerer Einheiten oder Umlagerung größerer Bruchstücke in der Gasphase entstanden sind, da die Vorläufer fehlen.⁴⁰

4.: Die teilweise dramatische Quasimolekülonen-Ausbeutesteigerung bei Zugabe von Säuren³⁸ kann ebenfalls durch Präformierung von Ionen in der Probe verstanden werden, zumal wenn man bedenkt, daß der Anteil der H⁺-Ionen am Gesamtionenstrom immer der höchste, und die relative Änderung daher gering ist.

Es gibt jedoch auch Befunde, die für eine Bildung der Ionen in der Gasphase sprechen:

1.: Eine Vermessung von Uranyldiacetat,⁴¹ in analoger Vorgehensweise zur oben angeführten Untersuchung von Zirkoniumphosphaten, zeigt eine Clusterserie mit bis zu 66 Uranyl-Gruppen. Eine Bildung in der Gasphase wird hierbei ebenso ausgeschlossen wie ein solches Vorliegen vor der Desorption. Es erfolgt also *Clusterzerfall* größerer desorbierter Einheiten. Auf Grund des gegebenen Zeitfensters (s.o.) muß dieser in weniger als einer Nanosekunde stattfinden.

2.: Messungen von Hilf et al.⁴² belegen, daß im negativ-Modus die Fragmente von Hexan, Fulleren und beta-Carotin - unabhängig des vermessenen Analyten - sehr ähnlich sind, und höhere Massen als z.B. Hexan selbst aufweisen. Eine Erklärung ist die vollständige Atomisierung im infra-track mit nachfolgender, extrem schneller *Clusterbildung* bei adiabatischer Expansion. In einem anderen Experiment⁴³ werden aus Polyvinylidendifluorid Kohlenstoffcluster (auch Fullerene) ausgestoßen, die sich tief im Inneren des infra-tracks aus Atomen gebildet haben.

3.: Die Ausbeute an Neutralteilchen, positiven und negativen Ionen ist mit unterschiedlichen Proportionalitätskonstanten von der Einschlagenergie des Primärteilchens abhängig.⁴⁴ Durch diese unterschiedlichen Abhängigkeiten werden getrennte Mechanismen (mit unterschiedlichem Energiebedarf) nahegelegt, was gegen eine Desorption präformierter Ionen spricht. Denn in diesem Fall sollten wenigstens die Ausbeuten für negative und positive Ionen dieselbe Abhängigkeit aufweisen.

Es gibt ein theoretisches Modell der Ionisation von Norskov und Lundqvist,⁴⁵ ursprünglich für die Betrachtung der Desorption von Metallionen auf Metallsubstraten. Macfarlane übernahm diesen Ansatz für die üblichen PD-MS-Bedingungen.¹⁸ In diesem werden die elektronischen Zustände der Analyt und/oder Substratteilchen (welches dieselben sein können) durch intermolekulare Wechselwirkungen zu einem Excitonenband gekoppelt. Relative Anordnungen der Moleküle untereinander gehen in die energetische Aufspaltung dieses Bandes mit ein, ähnlich wie bei den Metallen. Die im Inneren der Probe entarteten HOMOs und LUMOs spalten mit der Entfernung von der Oberfläche wieder in die normalen Werte auf. Der Elektronentransfer vollzieht sich 0,2 bis 0,3 nm entfernt von dieser. Ob die Ladungsübertragung stattfindet, und in welcher Richtung, hängt unter anderem von der Geschwindigkeitskomponente des Teilchens ab. Ist der Analyt nicht mit dem Matrixmolekül identisch, so ergibt sich - je nach Struktur - eine Ladungspräferenz. Kationisierte oder anionisierte Teilchen, wie zum Beispiel $(M+K)^+$ und $(M-H)^-$ sollen dadurch entstehen, daß Aggregate des Analyten mit Ionenpaaren in der Probe durch die zugeführte Energie chemische Reaktionen eingehen, und die dabei erzeugten Übergangszustände oder Zwischenstufen beim passieren der Oberfläche ihre endgültige Ladung erhalten, die Ionen sozusagen selektiv extrahiert werden.

In der Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie gilt die Existenz präformierter Ionen als gesichert: Bei der Untersuchung von Tetrapentylammoniumbromid unter Ar^+ -Beschluß ist festzustellen, daß sich die Ionenaubeute unter Berücksichtigung der Verdünnung um den Faktor 10^4 erhöht, wenn man statt aus der flüssigen Reinsubstanz aus einem gefrorenen Wassergemisch desorbiert. Dies wird damit erklärt, daß sich in einer *verdünnten* Lösung das Molekülion und sein Gegenion nicht in demselben gesputterten Bereich aufhalten, was die Extraktion des (präformierten) Ions durch das elektrostatische Feld - im Gegensatz zum Ionenpaar - erleichtert.⁴⁶

Doch ist dies nur eine Möglichkeit der Ionengenerierung in der FAB-MS. Ebenso gibt es die Bildung in der Gasphase. Bei alpha-Tocopherol ist zu beobachten, daß die Ionenausbeute mit zunehmender Gasphasenbasizität der verwendeten Matrix ansteigt. Dieser Parameter soll für die Bildung der Quasimolekülionen generell bedeutender sein als die Zugabe von Säuren (zur Ionenpräformierung).⁴⁷

Bei der Felddesorption (FD) liegen präformierte Ionen vor, deren Bildung durch Oberflächenreaktionen erfolgen kann.⁴⁸ Diese Reaktionen (Kationisierung, Protonierung) können durch das elektrostatische Feld unterstützt werden.

5.2.2. Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (LD-MS):

Die Laserdesorptions-Massenspektrometrie war schon 1975 in Gebrauch,⁴⁹ erlangte aber ihren Durchbruch erst mit der Entdeckung der Matrixunterstützung durch Karas und Hillenkamp 1987, die sich den Biopolymeren widmeten.⁵⁰ Tanaka et al. setzten 1988 ultrafeines Cu-Pulver in Glycerin ein und konnten Lysozymheptamere mit >100.000 Dalton nachweisen, visierten aber auch technische Polymere, wie z.B. Polyethylen- und Polypropylenglycol, an.⁵¹ Karas und Hillenkamp waren die Wegbereiter für die rasche Verbreitung und Kommerzialisierung dieser Technik.

Die Probenpräparation ist hier, wie in der PD-MS auch, von entscheidender Bedeutung: Die Matrix muß die gegebene Laserwellenlänge *absorbieren* und in der Lage sein, die *Wechselwirkungen der Analytmoleküle* untereinander zu reduzieren.⁵² Die Energie- und Zeit-Bereiche sind bei der MALD-MS mit 10^6 bis 10^8 Watt und 10^{-9} Sekunden (teilweise kürzer) von denen der PD-MS sehr verschieden, ebenso wie die beprobten Volumina und Flächen.⁵³ Die *Arbeit* ($W=Pdt$) liegt aber mit 1-100 bzw. 100 Wattsekunden in gleicher Größenordnung, ebenso wie sich die Energiemengen gleichen. Es ist aufschlußreich die Ähnlichkeiten der Prozesse herauszustellen:

Williams⁵⁴ stellte fest, daß Geschwindigkeiten durch mechanische Schocks von einigen hundert Metern pro Sekunde ausreichen sollten, um Proteine zu desorbieren. Er bemerkte, daß diese Beschleunigungen mit Lautsprechern zu erreichen sind, vermutete aber, daß die Energie noch zu gering wäre. Auch Piezokristalle finden in Lautsprechern Anwendung. Einige Ausführungen schaffen Frequenzen über 100 Gigahertz.⁵⁵ Sie sind in weiten Frequenzbereichen frei und eng durchstimmbar, so daß man eine Festkörperresonanzfrequenz finden sollte. Auch Schockwellenanregung ist möglich. Die übertragbaren Leistungen sind enorm, Ultraschall-Nierensteinertrümmerer arbeiten mit diesem Prinzip. In Flüssigkeiten kann man Kavitationen mit Temperaturen von 5800 Kelvin und Drücken von dutzenden von Megapascal bei 100 m/s Ausbreitungsgeschwindigkeit erzeugen.⁵⁶

Neben Radikalbildung kommt es zu Lumineszenz von 0,1 ns Dauer.⁵⁷ Kürzlich wurde durch Piezotechnik ultraschallunterstützte Elektrospray-Ionisation eingeführt.⁵⁸ Theoretische Betrachtungen und Berechnungen sprechen für die Möglichkeit einer Ultraschalldesorption.⁵⁹

a) **Desorption:**

Allgemein sind in der MALD-MS mehr Variable als bei der PD-MS vorhanden. Es werden eine ganze Anzahl von *Laserwellenlängen* im UV, aber auch einige im IR-Bereich und neuerdings im sichtbaren Teil des Spektrums eingesetzt. Die Matrix kann hier außer fest auch flüssig sein. Die theoretischen Modelle der MALD-MS sind denen der PD-MS recht ähnlich:

Johnson und Sundqvist⁶⁰ übertrugen ihr **analytical pressure pulse**-Modell, als sie überlegten, daß bei der größeren Fläche und geringeren Tiefe der Anregung bei der MALD-MS das Nettomoment an jedem Punkt der Probe herausgerichtete Expansion bzw. nach innen gerichtete Kompression sein wird. Wenn die Energieeinwirkung schnell gegenüber der Dissipation ist, werden die Impulse zu einem Analytmolekül übertragen. Die kleinen Matrixmoleküle expandieren schnell, und die daraus resultierenden Impulse werden von den Analytteilchen integriert. Die Anzahl der nötigen Impulse steigt dabei mit der Analytmasse hoch 5/3.

Schockwellen-Modell: Lindner und Seydel^{61,62} haben in frühen Messungen festgestellt, daß die Reproduzierbarkeit mit einem Transmissionsinstrument (LAMMA 500) bei höchsten Leistungsdichten (10^{11} W/cm²) und dicken Schichten besser ist. Sie setzten Stachyose NaJ bzw. KJ im Verhältnis 5:1 zu. Der Laserstrahl fiel dabei von hinten auf die Probe. Die Spektren der dicken Probenschichten zeigten nur kationangelagerte Quasimolekülonen ohne Fragmente. Variiert wurde die *Schichtdicke* der Probe. Sobald Perforation zu sehen war, traten nur noch Fragmente auf, da der Laser dann den Analyten selbst bestrahlte. Sie fanden typische Beschädigungsstellen, die aussahen wie eine beschossene Panzerglasscheibe. Der Rand um den Focus war aufgeschmolzen. Bei Fokussierung des 1 Mikrometer großen Brennflecks auf das rückwärtige Probenträgergitter aus Kupfer fanden sich dieselben, fragmentlosen Spektren. Hierbei fiel der Laser nicht auf die Substanz selbst. Da die Austrittsstelle vom Brennfleck durch die gesamte Substanzdicke separiert war, folgerten sie, daß es sich um einen nichtthermischen schockwellengetriebenen

Prozeß handelt. Die Analyten gehen dann Gasphasenreaktionen mit den kodesorbierten Alkalimetallionen ein.

Ein **hydrodynamisches Modell** von Vertes et al.⁶³ berücksichtigt den Phasenübergang durch Aufheizung. Die herausgetriebenen Teilchen werden mit einem hydrodynamischen Ansatz erfasst, der die kinetische Energie der Neutralteilchen, und deren Ausbeute, in Abhängigkeit der Leistung treffend beschreibt. *Adiabatische Expansionskühlung* stabilisiert die desorbierten Partikel. Das Modell ist für Metalle und *opake* Isolatoren gültig, nicht jedoch für transparente Isolatoren, in denen lawinenartiger Zusammenbruch durch das im Inneren oszillierende elektrische Feld erfolgen kann, da die Strahlung dort den ganzen Körper durchdringt. Bei *Strahlungsdichten* größer 10^6 und kleiner als 10^9 W/cm² sind mehrere Prozesse möglich: Oberflächenaufheizung mit thermischer Desorption, Oberflächenschmelzung mit Verdampfung, Bildung einer optisch dichten Teilchenwolke und Plasmaabsorption in dieser Wolke. Dazu gehören mehrere Schwellenwerte: Verdampfungsschwelle, Plasmazündungsschwelle und optische Zusammenbruchschwelle. Die matrixunterstützte Laserdesorption erfordert üblicherweise um 10^6 W/cm². Zur Verdampfung ist eine Temperatur höher als die *Phasenübergangstemperatur* notwendig. Der zeitliche Anstieg der Oberflächentemperatur ist von der *isothermen Kompressibilität*, *thermischen Leitfähigkeit* und der *spezifischen Wärme* der Matrix abhängig. Eine Berechnung der Oberflächentemperaturerhöhung für Nicotinsäure ergibt eine Steigerung um 202 Kelvin, was (ausgehend von Raumtemperatur) mit der Sublimationstemperatur von 510 Kelvin in Einklang steht. Da die oben erwähnten Parameter im allgemeinen nicht allzu sehr variieren, ist es verständlich, daß die Schwellenwerte der Laserenergie bei vielen Matrices in derselben Größenordnung liegen. Die berechneten Werte für die Geschwindigkeitsverteilung von Neutralteilchen stimmen gut mit Messungen überein, die für Ferulasäure 300-400 m/s betragen. Bemerkenswert ist, daß die Dichte der Teilchenwolke nach einigen Nanosekunden immer noch 1/10 des Festkörperwertes beträgt, was die Möglichkeit von Gasphasenreaktionen begünstigt - im Gegensatz zur PD-MS, bei der jeweils nur 10.000 bis 100.000 Teilchen auf einmal desorbiert werden. Durch adiabatische Expansionskühlung erreicht das Zentrum der Teilchenwolke nach ca. 100 ns eine Temperatur von 110 Kelvin. Es folgt daraus, daß die Ionenbildung nicht durch thermische Prozesse erfolgt, sondern entweder präformierte Ionen desorbiert werden (was immer möglich ist) oder Photoionisation stattfindet,

worauf Gasphasenprozesse, wie zum Beispiel Kationisierung oder Protonierung folgen. Während nur ein Teil der eingestrahlten Energie diesen beschriebenen Vorgang speist, verteilt sich der Rest auf andere Prozesse, wie z.B. elektronische Anregung von Molekülen, Fluoreszenz und Anregung von Gitterschwingungen.

Das kinetische "**homogeneous bottleneck**"-Modell stammt ebenfalls von Vertes et al.⁶⁴ Zwei Effekte konkurrieren miteinander und bestimmen den Erfolg oder Mißerfolg der Messung:

1. Energieübertragung von der Matrix in die Gastmoleküle (Fragmentierung)
2. Desorption der Gastmoleküle.

Zwar gibt es eine direkte Energieübertragung von den Wirtsmolekülen auf die Gäste (die diese erhitzt), aber die Gitterschwingungen kanalisieren sich sehr viel schneller in intramolekulare Anregungen der Matrix, so daß deshalb der Analyt relativ verschont bleibt. Es ist daher erstrebenswert eine Matrix zu wählen, die bei niedrigen Temperaturen sublimiert und die Wellenlänge stark absorbiert, da dies die direkte Einkopplung der Energie zusätzlich verkürzt bzw. vermindert. Zudem kann durch *Kollisionskühlung* die Temperatur der Analytteilchen in der desorbierenden Wolke höchstens die Sublimationstemperatur der Matrix sein, und wird durch adiabatische Expansion noch weiter verringert. Im weiteren Verlauf wird die verbleibende Oberfläche durch das austretende Material gekühlt, entsprechend dem üblichen Phänomen der *Verdampfungskühlung*. Entscheidend ist, daß die *Analytkonzentration gering* gehalten wird, da sonst die Kopplungskonstante des Energieübertragungsprozesses (aus dem Gitter in die Gäste) zunimmt. Dies zu beachten ist wichtig. Es handelt sich hierbei nicht einfach um einen Konzentrationseffekt, der linear mit der Menge skaliert. Die Fragmentierungswahrscheinlichkeit selbst nimmt stetig zu und multipliziert sich mit der Menge des vorhandenen Analyten. Es soll von Vorteil sein höhere Laserleistungen einzusetzen, wenn dabei gleichzeitig die *Pulsdauer* verringert wird. Vertes zufolge trifft das hydrodynamische Modell für höhere Laserleistungen zu, das thermische Modell für niedrige.

Bezüglich der Pulsdauer ergibt sich experimentell jedoch genau das Gegenteil. Messungen von Hakansson und Sundqvist⁶⁵ belegen, daß die Energieschwelle für Femtosekunden- und Nanosekunden-Laser gleich ist (ca. 0,5 mJ), wobei aber der fs-Laser 25 mal mehr Leistung pro Fläche freisetzt. Das charakterisierende Maß in

der MALD-MS ist also die *Gesamtenergie*, und die Bereitstellungszeit spielt für die Desorption nur eine sekundäre Rolle. Probleme ergeben sich bezüglich der Ionisation, da mit dem fs-Laser kaum Quasimolekülonen erhalten werden. Bei einem Stickstofflaser (üblicherweise mit 3-20 ns Pulsbreite) befindet sich die Teilchenwolke nach der ersten Nanosekunde ca. 1 Mikrometer über der Oberfläche. Der fs-Laser ist so schnell, daß zu keinem Zeitpunkt die Teilchenwolke während der Bestrahlung auch nur über die Dimension der Oberflächenrauigkeit der Probe hinauskommt. Für den Fall, daß Photoionisation der Matrixmoleküle in der Wolke zur Ionenbildung durch Gasphasenreaktionen beiträgt, ist dieser Prozeß im Femtosekunden-Bereich ausgeschlossen. Der Anteil der Fragmente ist jedoch bei der kurzen Dauer höher. Es ist anzunehmen, daß aufgrund der höheren *Photonendichte* hier multiphotonische Anregungen wahrscheinlicher werden, die dann zur Fragmentierung führen. Mit einem Picosekunden-Laser gelang es Cotter⁶⁶ jedoch hervorragende Spektren aufzunehmen, und er berichtet über verbesserte Auflösung. In diesem benutzten Zeitbereich erfasst der Strahl noch die bereits desorbierten Moleküle, so daß eine Photoionisation/Gasphasenreaktion ermöglicht ist.

Thermisches Modell: van der Peyl und Kistemaker⁶⁷ fanden für Sucrose, daß zumindest teilweise thermische Verdampfung erfolgt, wenn die Laserleistung im üblichen MALD-MS-Bereich liegt, also bei ca. 1 MW/cm². Sie bestrahlten diese mit einem kontinuierlich arbeitenden CO₂-IR-Laser auf einem Thermoelement (um die Temperatur zu verfolgen). Das Quasimolekülion trat bei derselben Temperatur auf wie die Kaliumionen, ca. 1000 Kelvin. Bei zugeschalteter Elektronenstoß-Ionisation war ein Fragmentensignal mit einem Maximum bei 460 Kelvin anwesend. Also verdampft bei dieser Temperatur die Sucrose und wird dann mittels EI ionisiert, worauf hin sie fragmentiert. Wurde die Sucrose schließlich ohne Laser von einem regelbaren Heizfilament verdampft, und die Kaliumionen aus einer anderen Ionenquelle bereitgestellt, trat das Quasimolekülion ebenfalls bei 460 Kelvin auf. Dies ist die Schmelz-/Zersetzungstemperatur in Normalatmosphäre. Diese Befunde lassen sich am besten durch eine Gasphasenreaktion deuten. Es scheint, daß der Analyt zumindest teilweise thermisch verdampfen kann, die zur Ionisation nötigen Metallionen aus einem zentraleren, heißeren Bereich des Focusses kommen, und sich beide dann zusammenlagern. Bei hohen Laserleistungen und kinetischen Energien der Ionen von bis zu 25 eV ist dieses Modell jedoch unbrauchbar.

Exciton-Generierung und mechanische Schwingungsanregung in Halbleitern durch Laserpulse ist gesichert,⁶⁸ ebenso wie die Exciton/Phonon-Kopplung in Piezokristallen.⁶⁹ Sehr kurze Stresspulse (kohärente, longitudinale Phononen), die in Halbleitern und Nichtleitern durch Laserpulsbestrahlung auftreten, können auch die optischen Eigenschaften verändern.⁷⁰

Die simultane Untersuchung von Ionen und Neutralen⁷¹ (durch Vakuum-UV-Photoionisation) ergibt ein sinkendes Neutrale/Ionen-Verhältnis für den **Analyten** mit steigender Leistung, ausgehend von 10.000 : 1. Das **Matrix-Neutrale/Ionen-Verhältnis** war dagegen von der Leistung wenig abhängig, was auf einen anderen Ionisationsmechanismus der Matrix schließen läßt. Die Effizienz der Analytodesorption ist eine Eigenschaft der Matrix/Analyt-Mischung, **unabhängig** von deren Eignung zur Ionisation. Bolbach et al.⁷² schlagen zwei Schwellenwerte vor, einen für die stabilen Analytionen und einen höheren für die energiereicheren Metastabilen, die jeweils einem bestimmten Energiewert entsprechen. Die stabilen Analyten besitzen also eine *untere und obere Energieschranke*. Das Verhältnis des stabilen zu dem des metastabilen Anteils der desorbierten Teilchen ergibt sich dann aus den relativen Anteilen der (mit der entsprechenden Leistung) bestrahlten Flächen. Mit zunehmender Laserenergie (bei angenommener Gaußcharakteristik des Strahlprofiles) wird daher der Teil der energiearmen desorbierten Teilchen schnell kleiner.

Richtungsempfindliche Messungen mit einer Quarz-Kristall-Mikrowaage⁷³ belegen eine gerichtete, überschallschnelle *Jet-Expansion* und nach deren Abklingen eine weitere thermische, ungerichtete Verdampfung. [Auch hier ist zu bedenken, ob das Prinzip dieser Waage (die Resonanzfrequenz verändert sich beim Kondensieren der Moleküle auf der Oberfläche) sich nicht zur Desorption verwenden ließe.] Weiter werden zwei verschiedene Schwellenwerte gefunden. Der niedrigere wird der reinen Matrix von der Oberfläche her zugeschrieben, während beim höheren der Volumenausstoß (mit Analyten) beginnt. Bolbach beruft sich auf andere Messungen, die für Matrix und Analyt ebenfalls verschiedene Schwellenwerte ergeben.⁷⁴ Ein thermischer Beitrag ist auch deshalb anzunehmen, weil die Ionenproduktion über einige hundert Mikrosekunden hin andauern kann.⁷⁵ *Jet-Expansion* berichten auch Beavis und Chait.⁷⁶ Die Geschwindigkeitsverteilungen besitzen dabei eine Gauß-Charakteristik und sind für die Matrices etwas höher als für die Analyten. Dies spricht für einen explosionsartigen Phasenübergang.

Phasenexplosionsmodell nennt auch Sunner seinen Ansatz, der ursprünglich für die FAB-MS gedacht war.⁷⁷ Bei extrem schneller Nichtgleichgewichtsaufheizung kommt das System in einen Bereich in dem seine Phase "absolut instabil" ist. Der Phasenübergang vollzieht sich dann explosionsartig. Beschreibung mittels statistischer Thermodynamik sagt dabei eine sehr starke Abkühlung der Teilchen voraus. Über das Ausmaß der Expansionskühlung in einem Überschall-Teilchenjet berichten Li et al.⁷⁸ Sie bestrahlten die continuous-flow Einrichtung eines FAB-MS-Spektrometers mit einem IR-CO₂-Laser und verwendeten als Matrix Glycerin, eine gängige IR-MALD-MS-Matrix. Die Ionisation erfolgte resonant biphotonisch, mit einem zweiten, gekreuzten UV-Laserstrahl. Die Temperatur der Teilchen wurde durch Populationsanalyse errechnet. Das Ausmaß der Kühlung ist von der Matrix abhängig, und die Temperaturen fallen im Jet bis auf 46 Kelvin ab. Die kinetische Energieverteilung fittete eine Maxwell-Boltzmann-Charakteristik. Der Kühlungseffekt von Wasser ist stärker als der von Glycerin. Nelson und Williams konnten in Eis als Matrix DNA bis 410.000 Dalton messen.⁵ Wasser besitzt eine *geringere Masse* und *weniger Freiheitsgrade* als Glycerin, was den besseren Kühlungseffekt erklären soll. Da Kollisionskühlung unter den normalen MALD-MS-Bedingungen immer anzunehmen ist, sollten Matrices mit weniger Freiheitsgraden, also *höherer Symmetrie*, effektiver zur Energieerniedrigung der Analytmoleküle/ionen beitragen. Der Austausch zwischen kinetischer und Schwingungsenergie ist durch die Expansion im Jet behindert. Die kinetische Temperatur ist höher als die den Molekülschwingungen entsprechende. Dies ist beachtenswert, da oft kinetische Energieverteilungen gemessen werden, die man dann als direktes Maß für die innere Energie der Teilchen nimmt. Zudem besitzen gerade die energieärmeren Teilchen die höhere kinetische Energie, sie sind im Jet an vorderster Front. *Keinerlei Radikationen zeigen. Dieser Befund spricht für eine Molekularisation, deren Pro-* Ens et al.⁷⁹ berichten über kinetische Energien, die unter dem Wert liegen, den das Beschleunigungsfeld alleine schon verursacht, was ein klarer Beweis der Kollisionskühlung ist. Unter den gegebenen Bedingungen desorbierte der IR-Laser im übrigen fast nur Neutralteilchen. Spengler und Cotter⁸⁰ konnten durch Ionenerzeugung unterhalb des Extraktionsfokus der Ionenoptik und verzögerter Beschleunigung bestimmen, daß die häufigste kinetische Energie ca. 1 eV beträgt und Maxwell-Boltzmann-verteilt ist. Ihre Messtechnik ist unempfindlich gegen Coulomb-Abstoßung, Raumladungseffekte, Oberflächenrauigkeit und andere Parameter, die bei herkömmlichen Messungen (retarding potential) zu Werten von 10

bis 100 eV führen. *IR-Laser* niedriger Energie verwenden auch Grottemeyer und Schlag zusammen mit einer *transparenten Matrix* (Natriumchlorid oder Ammoniumnitrat).⁸¹ Transparente Matrices erzeugen dabei mehr intakte Moleküle als absorbierende Matrices. Auch hier ist Nachionisation notwendig und es wird auf Arbeiten von Allison, Röllgen und Cotter verwiesen, bei denen auch jeweils hauptsächlich Neutralteilchen desorbiert wurden, was bei der IR-MALD-MS noch stärker als bei der UV-MALD-MS üblich ist. Thermische Verdampfung wird ausgeschlossen, da die Analyten keinerlei monomolekulare Zerfälle zeigten. Dies legt sehr niedrige Energien nahe. Es wird vielmehr mechanischer Streß angenommen, der durch lokale Absorption an einigen *bestimmten* Stellen, *Bindungen oder Verunreinigungen* durch schnelle Expansion wegen Erhitzung erfolgt, ohne die Probe in ihrer Gesamtheit zu erwärmen. Bei den durchgeführten Messungen waren hinterher auch Bruchstellen zu erkennen. Dies erinnert an das Schockwellen-Modell in der PD-MS. In diesem Falle dienen die Verunreinigungen jedoch der Energiekonversion durch Absorption und stellen keine Störung dar, wie bei der PD-MS.

Es ist mehr als wahrscheinlich, daß die vorherrschende Art der Desorption - wie z.B. Schockwellen, Verdampfung, Phasenexplosion, usw. - als auch die Art der Ionisation davon abhängt, wie hoch die Photonenenergie und der Fluß ist.

b) Ionisation:

Für Photoionisation mit nachfolgender Gasphasen-Ionen/Molekül-Reaktion gibt es gewichtige Anhaltspunkte in einer umfassenden Arbeit von Karas und Hillenkamp⁸²: Bei Temperaturabsenkung auf 90 Kelvin treten sehr oft Radikationen der Matrices auf. Dies gilt vielfach auch für Matrices, die bei Raumtemperatur keinerlei Radikationen zeigen. Dieser Befund spricht für eine Photoionisation, deren Produkte - die Radikationen - dann aufgrund ihrer hohen Reaktivität bei Raumtemperatur durch schnelles Abreagieren nicht mehr faßbar sind. (s.a. Lit.⁸³) Dieses, und das Auftreten von mehrfach wasserstoffangelagerten Molekül- und Fragmentionen kann nicht durch präformierte Ionen - entstanden durch Säure/Base-Protonentransferreaktionen - erklärt werden. Bei Steigerung des *pH-Wertes* über den *pK-Wert* der Matrix, so daß diese als deprotoniertes Salz vorliegt, ist kein Spektrum mehr zu gewinnen. Die Zugabe von *Übergangsmetall-Salzen*, die Photoelektronenfallen darstellen sollten, stört tatsächlich erheblich die Spektren im negativen Modus. Da typische Ionisationsenergien bei 7,5 bis 9 eV liegen, und

Photonen von 266 nm 4,6 eV besitzen, ist entweder biphotonische Anregung oder Energie-Pooling zweier angeregter Teilchen erforderlich. Die gebildeten Ionen einer Matrix sind auch von der verwendeten Wellenlänge abhängig, was für Indol-2-carbonsäure gezeigt wird. Potentielle Matrices werden bezüglich ihrer Ionisationseigenschaften **in 4 Gruppen eingeteilt**:

- 1.: Selektive Bildung von Molekülradikationen
- 2.: Selektive Bildung von protonierten Quasimolekülonen
- 3.: Bildung von Molekülradikationen und protonierten Quasimolekülonen unter starker Fragmentierung
- 4.: Bildung von $(M-H)^+$, $(M+2H)^+$ und anderen Quasimolekülonen

Die Teilchen der Gruppe 1, die stabile Radikationen bilden können, sind nicht in der Lage weitere Gasphasenreaktionen zu unterstützen. Die der Gruppe 2, die stabile $(M+H)^+$ -Ionen bilden, konkurrieren mit den Analyten um die Protonen und verringern deren Intensität, können aber für Messungen negativer Ionen nützlich sein. Hierzu gehören 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHBS) und 2,4-DHBS. Moleküle der Gruppe 3, die selbst bei der Schwellenintensität schon Fragmentierung zeigen, und deren Radikationen ebenso wie die protonierten Formen relativ *instabil und energiereich* sind, unterstützen die Analytionenbildung sehr gut. Hierher gehören z.B. 2,5-DHBS und Sinapinsäure, zwei sehr universelle Matrices. Über die Gruppe 4, einige besondere Fälle, werden keine allgemeingültigen Aussagen getroffen. Analoge Betrachtungen gelten für den negativ-Modus. Viele Fälle können aber nicht so einfach erklärt werden, wie z.B. die starken Signale von $(M+9)^+$ bei Sulfanilsäure und $(M+21)^+$ sowie $(M+22)^+$ bei Pyrrol-2-carbonsäure. Dies gibt wiederum Anhaltspunkte für komplexe Ionen/Molekül-Reaktionen in der Teilchenwolke. Es ist einsichtig, daß die *Gasphasenbasizität* der Matrix nicht zu hoch sein darf, um zu vermeiden, daß diese - im hohen Überschuß vorliegend - alle Protonen an sich zieht, und die Protonierung des Analyten so behindert wird. Im Gegenteil sollen bei guten Matrices die Analyten regelrechte Protonenfallen in der Desorptionwolke darstellen, so daß die Matrix trotz großen molaren Überschusses fast nicht mehr im Spektrum auftritt. (Dies dürfte jedoch nur bei Analyten zu Verallgemeinern sein, die bevorzugt protoniert werden. Bei Natrium-Angelagerten ist das Bild komplexer.)

Chan berichtet über eine solche Matrixionenunterdrückung, die bei einem bestimmten *molaren Verhältnis* auftritt.⁸⁴ Bemerkenswert ist aber, daß bei gleichbleibendem Verhältnis von Matrix zu Analyt (Nicotinsäure/Insulin, 600 : 1) der Effekt von der *Konzentration* abhängt. Er vermutet, daß bei gleichbleibender Flüssigkeitsmenge die Menge der Substanz ausschlaggebend für die Ausbildung einer günstigen Kristallstruktur ist. Umgekehrt gilt dasselbe für unterschiedliche Flüssigkeitsmengen bei gleichbleibender Substanzmenge. Die Temperatur spielt dabei ebenfalls eine Rolle, denn es geht "einfach" darum, günstige Umstände für eine störungsfreie und homogene Kristallisation zu finden. Nur bei homogener Verteilung ist an jeder beliebigen Stelle das gefundene optimale Verhältnis gegeben.

4.2.3.2. Trennung des Ionisationsprozesses von monomolekularen Zerfällen

Wenn die Analytionen bei Gasphasenreaktionen erzeugt werden, sollte es von Vorteil sein das elektrostatische *Beschleunigungsfeld verzögert einzuschalten*. So läßt man den Reaktionspartnern mehr Zeit. Die Analytionenausbeute kann dadurch mehr als verdoppelt werden.⁸⁵ Zudem sind die Signale schärfer, was darauf zurückzuführen ist, daß nach dieser Zeitspanne bereits ein Teil der Metastabilen zerfallen ist (die dann an anderer Stelle als Fragmente auftreten).

4.2.3.3. Ionisation in geeigneter Phase

Nicht geklärt ist, warum bei negativen Ionen generell keine Addukte, wie z. B. $(M+Cl)^-$ beobachtet werden.⁸⁶ Mit Negativer Chemischer Ionisation (NCI-MS), unter Verwendung von Freon 12 als Reaktandgas, treten solche Addukte durchaus auf, und die Quasimolekülonen $(M+Cl)^-$ von Oligosacchariden sind so energiearm, daß in einem Quadrupolmassenspektrometer kaum Fragmente auftreten.⁸⁷ Dabei muß dort die Lebensdauer der Teilchen etwa 1000-fach länger sein als bei Flugzeitmassenspektrometern. Zudem zeigte diese Studie, daß die wenigen Fragmente alle durch Spaltung glycosidischer Bindungen entstanden und ebenfalls nur als $(M+Cl)^-$ -Ionen auftraten, mit abnehmender Intensität zu kleineren Fragmenten hin. Als Erklärung dieser Bevorzugung größerer Massen wird angeboten, daß diesen mehr Bindungsstellen zur Anlagerung zur Verfügung stehen, also ein *statistischer Effekt* vorliegt. Metzger et al. (s.u.) fanden in ihren Oligosaccharidmessungen bei der MALD-MS gleichfalls eine Diskriminierung geringerer Massen, was im selben Sinne gedeutet wurde.

4.2.3.4. Ionisation von Peptiden/Proteinen: die Rede ist, so liegt dies daran,

daß die PD-MS vorzugsweise hierfür eingesetzt wurde und wird.

4.2.3.5. Es existieren 2 Arten der Matrix-Unterstützung, Adsorption und Inkorporation:

4.2.3.5.1. Adsorption

Cooks wies schon 1983 auf die Möglichkeit von Gasphasenionisationsprozessen in der PD-MS hin.⁸⁸ Weitsichtig verglich er sämtliche Desorptions/Ionisations-Arten: FAB-MS, LD-MS, PD-MS und FD. Deren gemeinsame Merkmale sind:

- 1.: "Isomerisierung", "loss of identity" der abgeladenen Energie, d.h. nur die **Energiemenge** spielt eine Rolle
- 2.: Niederenergetische Desorption, vibronisch oder thermisch
- 3.: Trennbarkeit von Desorption und Ionisation
- 4.: Trennung des Ionisationsprozesses von monomolekularen Zerfällen metastabiler Teilchen

Auch sah er den Effekt der Matrixunterstützung in der MALD-MS voraus, 4 Jahre vor ihrem gezielten Einsatz.

Aufgrund der physikalischen Prozesse der Desorption erscheint eine neuartige Technik unter direkter Erzeugung mechanischer Schwingungen geeigneter Frequenz, Amplitude und Pulsdauer möglich. Bei dieser wäre, wie bei den obigen Methoden auch, die Desorption als von der Ionisation getrennt zu betrachten.

6. Diskussion der Matrixeffekte

6.1. Überblick:

" A Sample of an antibiotic from one laboratory will give excellent mass spectra while a sample of the same molecule from another laboratory will give no detectible molecular ions. " Macfarlane, 1982¹⁸

6.2.1. Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS):

Wenn im Folgenden oft von Peptiden/Proteinen die Rede ist, so liegt dies daran, daß die PD-MS vorzugsweise hierfür eingesetzt wurde und wird.

Es existieren 2 Arten der Matrix-Unterstützung, Adsorption und Inkorporation:

Bei der ersteren wird **Nitrocellulose** (nachfolgend NC) durch das elektro-spray-Verfahren (s.u.) auf das Target aufgebracht. Danach wird der Analyt aus einer Lösung *adsorbiert*. Zuletzt wird die belegte Oberfläche *gewaschen*, um störende Begleit-substanzen aus der vorhergehenden Präparation, Weichmacher oder Rückstände von Säulenbluten zu entfernen. Dieses ist das Standardverfahren der PD-MS.

Bei der zweiten Art wird der Analyt mit einer Matrix vorgemischt und dann auf das Target gebracht. Aber auch getrenntes Auftragen ist möglich. Diese Methode ist das Standardverfahren in der MALD-MS und wurde von dort adaptiert. In jedem Falle muß eine *leitende Schicht* vorhanden sein, da dies für das Anlegen der Beschleunigungsspannung erforderlich ist.

Das **Elektrospray** kann als Präparationstechnik in beiden Fällen angewandt werden. Die ursprüngliche Methode wurde 1979 von McNeal und Macfarlane eingeführt⁸⁹: 3 bis 10 Mikroliter eines 0,1 bis 10 g/L des Analyten enthaltenden organischen Lösungsmittels werden in eine Kapillare mit einem Draht gebracht. Daran wird eine Hochspannung gelegt, bis die Lösung aufgrund der Feldstärke an der Spitze zu versprühen beginnt. Wegen der Leitfähigkeit (Kurzschluß !) dürfen höchstens 30% Wasser enthalten sein. Das übliche Lösungsmittel in der Proteinchemie ist jedoch 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser.

Adsorptionsstrategien:

Die Verwendung von Nitrocellulose geht auf das Jahr 1986 zurück.⁹⁰ Diese wurde in Amylacetat gelöst, auf einen Träger aufgebracht und getrocknet. Im Vergleich zur reinen electro-spray-Präparation waren die Peaks höher, schmaler und mehrfachgeladene Ionen traten verstärkt auf, jeweils protoniert. Man vermutete damals, daß *hydrophobe Wechselwirkungen* sowie *Ladungswechselwirkungen* zur Adsorption führen. Die positiv geladenen Zentren sollten mit den negativen NO₂-Gruppen der Nitrocellulose wechselwirken. Die Analyten würden daraufhin als präformierte Ionen desorbiert. Die Nitrocellulose selbst wird bei der Desorption zerstört, ihre *Struktur kollabiert* und setzt so die aufliegenden Moleküle frei.

Für Proteine, die an Nitrocellulose weniger gut haften, führte Roepstorff die spin-drying-Technik ein.⁹¹ Ein rotierendes Target aus NC auf Mylar wird im Zentrum

mit der Analytlösung beladen. Während der Analyt kontinuierlich (steady state) adsorbiert, werden die leicht löslichen Kontaminanten zum Rand gespült und dort abgeschleudert. Das Trocknen kann visuell vom Zentrum her fortschreitend beobachtet werden. Ein zusätzlicher Waschschrift wird für nötig erachtet, wenn die Summe der Ionensignale von Natrium und Kalium die Hälfte des Wasserstoffsignales erreicht. Dieses Verfahren kann auch zur Beschichtung der Targets mit NC dienen und wird dann spin-coating genannt. Die sogenannte NC-Sandwich-Technik⁹² ist eine weitere Möglichkeit der Präparation für nicht gut adsorbierende Analyten. Nach spin-drying wird eine zusätzliche NC-Schicht aufgesprüht, gefolgt vom Waschschrift. (Dies belegt, daß die Struktur der Nitrocellulose kollabieren muß, da der Analyt ja sonst nicht austreten könnte.) So erhaltene Spektren zeichnen sich durch niedrige Alkalimetallgehalte aus, ohne den Analyten nennenswert abzuspielen.

Ein Vergleich der Verfahren unter Vermessung von Insulin zeigt, daß die optimale Analytmenge der eines *Monolayers* entspricht. Die Quasimolekülonenausbeute $(M+nH)^{n+}$ sinkt beim spin-drying und beim einfachen eintrocknen lassen nach einem Maximum mit zunehmender Menge wieder ab.⁹³ Nur beim adsorbieren mit nachfolgendem Waschen bleibt sie konstant im Maximum, was zeigt, daß der unterste Analytlayer auf der NC-Schicht besser haftet als die restlichen untereinander, welche wieder abgespielt werden. Beim electrospray ist die Ausbeute immer schlechter und nähert sich nur langsam an die der anderen Methoden (bei jeweils gleicher Menge) an, was zeigt, daß keine Monolayer versprüht werden können.

Eine Untersuchung der Ionenausbeute mit Monoschichten unterschiedlicher Fettsäuren übereinander ergab, daß die maximale beprobte Tiefe 15-20 Nanometer beträgt, in der PD-MS ebenso wie bei SI-MS. Das Signal ist bei Monolayern maximal und nimmt bei Überdeckung mit je einem zusätzlichen Fettsäurelayer rapide ab.⁹⁴

Statt Nitrocellulose wurden auch andere Beschichtungen gewählt, die den *Ladungseigenschaften* des Analyten angepaßt waren. Macfarlane nahm Nafion um an die Sulfonsäuregruppen selektiv positive Ionen zu binden. Dieses gelang beispielsweise mit einem Kupfer-Komplex von Bleomycin-B1.⁹⁵ Umgekehrt funktioniert dies auch mit einem Tridodecylmethylammoniumchlorid-dotierten Mylar-Film für negative Ionen, wie zum Beispiel Ribonucleotide.⁹⁶ Dabei wurde der Erfolg nicht

nur auf eine Reduzierung der intermolekularen Analytwechselwirkungen zurückgeführt, sondern auch darauf, daß die sehr sperrigen Kationen zusätzlich eine sterische Vereinzeln bewirken, und daß des weiteren die *Ladungen* im Ionenpaar voneinander *entfernt* sind, was eine leichtere Trennung entgegen der Coulomb-Anziehung bedeutet. Eine andere Untersuchung Macfarlanes ergab, daß die Adsorption von Rhodamin 6G einer Langmuir-Charakteristik folgt, und die Molekülausbeute bei monomolekularen Schichten nahezu gesättigt ist.⁹⁷ Nur bei höheren Bedeckungsgraden sind auch Dimere vorhanden. Dieselbe Betrachtung von Rhodamin B ergab, daß die Häufigkeit der Fragmente (durch Decarboxylierung) bei höherer Beladung zurückgeht, aus der zu schließen sei, daß bei größeren Ionenverbänden die Anregungsenergie verteilt werden kann.

Eine weitere Untersuchung führte auch zu der Beobachtung der Langmuir-Adsorptionscharakteristik bei Insulin,⁹⁸ aber hier stellt sich das Verhältnis von einfach- zu mehrfachgeladenen steigend mit zunehmender Schichtdicke (durch Ellipsometrie ermittelt) ein und führt zur Annahme von Inselbildung durch konkurrierende *Koagulation*. Mehrfachgeladene werden unterhalb monomolekularer Bedeckung gebildet und den direkt adsorbierten zugeschrieben, während die Analytmoleküle mit direkten Partnern einfache Ladung tragen. Die Ausbeute der negativen (M-H⁻)-Ionen steigt im Gegensatz dazu nicht mit derselben Adsorptionscharakteristik an, erfordert viel größere Mengen und ist insgesamt geringer. Die Deprotonierung benötigt also sich assoziierende Analyten. Bei solchen Substanzen, die *Micellen* bilden können (Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe, s.u.), sind Unstetigkeiten der Adsorptionsisothermen festzustellen.⁹⁹

Diskriminierungseffekte:

Diskriminierungseffekte werden in der PD-MS von Peptidmischungen oft beobachtet. Um die möglichen Ursachen zu ermitteln wurden binäre Kombinationen auf NC vermessen.^{100,101} Durch Addition der pK-Werte der einzelnen Aminosäurereste erhielt man die Nettoladung des Peptides. Im positiven Meßmodus unterdrücken die stärker positiven Peptide die weniger positiven, im negativ-Modus werden negativere bevorzugt. Acidere Proteine lagern bevorzugt Natrium an. Bei Verarmung an Natrium sind sie dann protoniert zu sehen, allerdings in geringer Ausbeute. Basischere Proteine treten bevorzugt protoniert auf, nur bei Natrium-Anreicherung bildet sich in höherer Ausbeute das entsprechende Addukt. Im

negativen Meßmodus treten nur (M-H)⁻-Ionen auf. Ein Natriumzusatz drängt hier zusehends die Quasimolekülionen-Signale zurück, ausgeprägter bei höherer Basizität. Neben der Nettoladung spielt also auch die Acidität eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von Diskriminierungseffekten. Über den Einfluß der unterschiedlichen Hydrophobizitäten besteht Uneinigkeit, im Gegensatz zur FAB-MS, wo die hydrophilen Komponenten die Grenzfläche flüssig/Vakuum meiden.¹⁰² Der Ladungseffekt tritt auch bei Mischungen von Substanzen unterschiedlicher Klassen auf, z.B. Kohlenhydraten und Peptiden.

Auch bei Aminosäuren wurden die Diskriminierungseffekte erkundet,¹⁰³ um gleichzeitig Einblick in den Desorptions/Ionisations-Mechanismus zu gewinnen. Hierzu stellte man Mischungen von jeweils 3, 4 oder 5 Aminosäuren her. Durch Permutation ließ sich eine Gesamtreihenfolge in positivem und negativem Modus aufstellen. Wenn die (MH)⁺/(M-H)⁻-Bildung in Lösung erfolgt, sollte Abhängigkeit von der Basizität/Acidität gegeben sein, bei Gasphasenbildung von der Protonenaffinität/Gasphasenbasizität. Die Desorptionsreihenfolgen korrelieren eher mit Letzteren, wobei Ausreißer vorkommen, was einem "chemischen Matrix-Effekt" (=Protonierung, s.u.) zugeschrieben wird. Diese Studie leidet aber unter mehreren Mängeln: Es erfolgte electrospray auf aluminiumbeschichtetes Mylar, dies führt leicht zu inhomogenen Aggregaten und dicken Schichten. Die Spektren selbst sind von starken Fragmenten geprägt, teilweise bis zur erschwerten Erkennung der Quasimolekülionen im Rauschen. Nimmt man nun an, daß sich in der komplexen, ungeordneten "Multilayer"-Probe unterschiedliche Ionenaggregate (aufgrund quantitativ nicht nachvollziehbarer elektronischer und sterischer Parameter) bilden, was sicher ist, und diese zumindest teilweise desorbiert werden, was sehr plausibel ist, so besteht die Möglichkeit schneller, komplexer Zerfälle in die verschiedenen Molekülionen und zahlreiche Fragmente über mehrere Reaktionspfade. Damit aber wäre jegliche Korrelation nur aufgrund der gasphasenthermodynamischen Daten zweifelhaft.

Kationabhängige Effekte:

Bei der Untersuchung von Oligosacchariden stellt sich eine starke Abhängigkeit der Fragmentierung vom Kationengehalt der Probe heraus.¹⁰⁴ Maltoheptaose tritt als (M+Na)⁺-Ion mit wenigen, ebenfalls kationisierten, Fragmentionen auf. Nach Waschen des auf NC adsorbierten Zuckers sind nur Fragmentionen zu sehen, deren

Signale zudem verbreitert sind. Die protonierten Teilchen besitzen also eine höhere Energie als die kationisierten. Während die kationisierten der Ring- wie auch der glycosidischen Spaltung unterliegen, tritt bei den natrium-verarmten nur letztere auf. Dieses Ergebnis gilt auch bei electrospray auf Al-Mylar und nach Acetylierung. Dasselbe Fragmentierungsverhalten wird auch bei anderen massenspektrometrischen Methoden gefunden.¹⁰⁵ Cs⁺-liquid-SI-MS/FT-MS-Messungen ergeben die Zerfallskonstanten der unterschiedlichen Ionen. Die Stabilität der Quasimolekülonen steigt in der Reihenfolge M + H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ an. Zwar liegen die Lebensdauern im Bereich von Millisekunden, aber es wurden auch nur die energieärmsten Teilchen untersucht, bedingt durch die Zeitfenster des Quadrupoles und der FT-MS-Zelle.¹⁰⁶ Vergleiche der Metastabilen-Messungen von Glycin mit *ab initio*-Rechnungen ergeben, daß die Bildung der präformierten Ionen im Festkörper mit der *Gitterenergie* der zugesetzten Alkalimetallhalogenide korreliert.¹⁰⁷ Sie führen Anthracen-9-carboxinsäure als Modell ein. Diese wurde auf Mylar gesprüht. Nicht alle Peptide ergeben kationisierte Quasimolekülonen. Viele werden eher protoniert, und einige Proteine treten nur protoniert auf. Oft ist bei hohen Natriumgehalten vollständige Fragmentierung die Folge, zumindest ist die Ionenausbeute von (M+Na)⁺ kleiner als die von (M+H)⁺ bei salzfreien Proben, die durch Reinigung erhalten wurden.⁹⁰ Das Ammonium-Ion wird auch in höchsten Mengen toleriert,¹⁰⁸ weshalb dessen Salze zur Pufferherstellung bei der Präparation verwendet werden. Sind die Peptide dagegen **apolarer derivatisiert** (N-acetyliert und N,O-permethyliert), wirkt sich auch hier die Natriumzugabe positiv aus.

Zusammenfassend läßt sich aufgrund der experimentellen Befunde vermuten, daß bei acideren Analyten eher Protonierung günstig (also energieärmer) ist, während dies bei basischeren für die Kationisierung gilt. Dies fällt auch bei der MALD-MS auf, in der diese Befunde empirisch noch um das *HSAB*-Prinzip erweitert werden können. Peakverbreiterungen deuten auf Metastabile und es ist denkbar, daß - zumindest teilweise - im Analyten die Quasimolekülonen entsprechend den relativen Häufigkeiten der Kationen und der Stabilität vorgebildet werden, um dann entsprechend ihrer Energie mehr oder weniger schnell zu zerfallen.

Die Adsorption auf NC ist sehr universell für viele Substanzklassen anwendbar, zum Beispiel für Insektizide, Antibiotika, Kronenether, Porphyrine usw. Diese Universalität ist umso bedeutender, als daß bei vielen Vergleichen NC auch besser abschneidet als andere, spezielle Trägermaterialien.¹⁰⁹ Zudem ist die Möglichkeit der

Derivatisierung auf dem Target und die mögliche Rückgewinnung der Substanz von praktischem Interesse. Abschätzungen ergeben, daß die erreichbare Massengrenze mit dieser Methode bei 100.000 Dalton liegt.¹⁰⁹

Inkorporationsstrategien:

Der Zusatz von Glutathion beim electrospray erhöht die Quasimolekülonenausbeute von reduziertem, denaturierten Hühnereiweißlysozym und wird der *Rückfaltung* in die native Form zugeschrieben.¹¹⁰ Des weiteren vermutet man eine die intermolekularen Kräfte vermindernde Spacer-Funktion und Verminderung der Alkalimetallionenverfügbarkeit, also *scavenger*-Eigenschaften. Die Ionen-Ausbeute der NC-Technik wird jedoch nicht erreicht.

Eine Mischform der Techniken verwenden Wolf und Macfarlane. Sie führten Anthracen-9-carbonsäure als Matrix ein^{111,112}: Diese wurde auf Mylar gesprüht, um dann den Analyten aus wässriger Lösung zu adsorbieren, gefolgt von waschen. Die Auswahlkriterien waren daher: *Löslichkeit* in organischen Solventien, unlöslich in Wasser, hohe Substrat/Adsorbat-Affinität (zumindest dieses nach der trial and error-Methode) sowie Sublimierbarkeit. Mit diesem Anthracenderivat ist der Spektrenuntergrund stark reduziert, die Peaks des Insulin schärfer und höher als beim NC-Verfahren. Dies gilt für Spektren positiver und negativer Ionen. In letzteren tritt auch ein $(M-2H)^2$ -Peak auf, was sonst nur von der MALD-MS bekannt ist. Da der Metastabilen-Anteil geringer ist, geht man von einer geringeren Anregungsenergie aus. Außerdem ist ein $(M+Matrix)^+$ -Signal zu sehen. Das weist auf starke *Matrix/Analyt-Wechselwirkungen* hin. Bei der Desorption kann dem Analyt durch Kollisionskühlung Energie entzogen werden. Macfarlane geht von einer Gasphasenionisation unter Protonentransfer aus. 2-Aminoanthracen ergibt im Vergleich dazu keine verwertbaren Spektren. Dies wird auf das Fehlen der Säurefunktion zurückgeführt, die am Ionisationsprozeß beteiligt sei. Die kinetische Energieverteilung ist bei der Anthracen-9-carbonsäure zu niedrigeren Werten hin verschoben. Er weist darauf hin, daß es durch Oberflächenaufladung bei NC zu höheren kinetischen Energien der Analytionen kommt. Die Tatsache, daß Anthracen selbst *photoleitfähig* ist, mündet in seiner Annahme, daß bei dem verwendeten Derivat im ion-track Ladungsträger hoher Mobilität existieren, die die Oberflächenaufladung ableiten (ähnlich einer Goldbedampfung, die zu demselben Ergebnis führt). Erwähnt werden in dieser Arbeit auch Erfolge mit Alizarin, Chinalizarin, Purpurin

und anderen kleinen Molekülen, denen aber, wie dem 2-Aminoanthracen auch, die Säurefunktion fehlt. Es ist daher wohl kaum eine notwendige Brönsted-Acidität unter vollständiger Protonenübertragung anzunehmen.

In besonderem Maße wird an der Universität Oldenburg das Konzept der Matrixisolation bei der PD-MS untersucht. Verschiedene Substanzen wurden als Matrix zu Maltoheptaose bzw. alpha-Cyclodextrin im Verhältnis 2:1 gegeben und pneumatisch auf Al-Mylar gesprüht.¹¹³ Dies hat zur Folge, daß hier gerade die **wasserlöslichen** Moleküle besonders in Betracht kommen. Tauglich waren Kaffeesäure, 1,4-Dihydroxyanthrachinon, 9-Fluorenon, Dithiothreitol, 3-Aminopyridin, 2-Aminobenzothiazol, 1,4-Diaminoanthrachinon, Benzidin und Benzimidazol. Besonders gut waren Alizarin, Chinalizarin, Fluorescein und 2-Aminothiazol. Bemerkenswert ist hier, daß (bis auf Dithiothreitol) alle Systeme *aromatisch* sind und Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können, wenn auch 9-Fluorenon nur als Acceptor. Die Zucker sind dazu natürlich besonders befähigt. Die H-Brücken erfüllen hier vor allem die Funktion der *Isolation* der Analyteileichen voneinander. Die Anwendung der Standardmatrix der MALD-MS, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, war ergebnislos. 2-Aminothiazol ist die bis dahin beste gefundene Matrix für Zucker.

Weiterhin war bemerkenswert, daß bei Verringerung der Analytmenge auf ein Tausendstel bei gleicher Matrixmenge das Signal nur auf 14% des ursprünglichen Wertes absank. Die isomeren Aminopyridine ergaben unterschiedliche Ergebnisse, wobei die Quasimolekülionenausbeute mit der Gasphasenbasizität korrelierte, diese jedoch nur einen Variationsbereich von 31 kJ/Mol überstrich. Bei zu starker Basizität bilden sich vermutlich zu starke Cluster, die dann in der Gasphase nicht mehr zerfallen können. Die optimale Basizität soll etwas über der des Analyten liegen, so daß die Wechselwirkungen zwischen den Analyteileichen noch aufgebrochen, und diese getrennt werden können. Bei Hydroxyanthrachinonderivaten ist Intensivierung und Verschmälerung des Signals zu beobachten, während beim unsubstituierten Anthrachinon keine Intensivierung aber Verschmälerung zu beobachten ist. Dies weist darauf hin, daß die Funktionalität für die Ionenbildung von Ausschlag ist, unabhängig von einer Energieabsenkung durch Verminderung der Analyt/Analyt-Wechselwirkungen durch Isolation, adiabatische Expansionskühlung oder eventuelle Kollisionskühlung bei der Kodesorption. Auch hier traten die

Zuckerderivate - wie immer- natriumangelagert auf, so daß komplexere Prozesse als nur einfache Protonenübertragung anzunehmen sind. Bei Vermessung eines jeweils äquimolaren Malto-penta,-hexa,-hepta,-ose- sowie eines alpha-, beta- und gamma-Cyclodextrin-Gemisches, wurden die höheren Massen zunehmend diskriminiert. Nach Zusatz von 3-Aminopyridin als Matrix war die Diskriminierung beseitigt, und zudem waren **alle** Intensitäten gesteigert. Daher läßt sich vermuten, daß der Zusatz der Matrix eine Konkurrenz der Analyteilchen untereinander um die Kationen verringert, indem insgesamt bessere Kationisationsbedingungen gestellt werden, zum Beispiel durch Ionen/Molekül-Reaktionen in der Gasphase. Eine gleichmäßig zunehmende Diskriminierung bei Dextrin 10 und Dextran 1,5 zu höheren Massen hin läßt entweder die Detektionswahrscheinlichkeit oder die Desorptions/Ionisations-Wahrscheinlichkeit dafür verantwortlich erscheinen. Auch ist zunehmender Metastabilenzerfall denkbar, aber die Peaks sind zu gering um eine Verbreiterung eindeutig erkennen zu können.

In einer weiteren Veröffentlichung dieser Gruppe ¹¹⁴ wurde betont, daß diese Präparation für die PD-MS, wie auch die MALD-MS **gleichermaßen** von Erfolg ist, vorausgesetzt die Matrix absorbiert bei der gegebenen Laserwellenlänge. Das Versagen der 2,5-Dihydroxybenzoesäure bei den Zuckern wurde an dieser Stelle unter anderem der inhomogenen Verteilung auf der Oberfläche zugeschrieben, was auf eine unregelmäßige Kristallisation schließen läßt. Dies ist ein Beispiel für eine unvorhergesehene Matrix/Analyt-Wechselwirkung, da diese Matrix normalerweise hervorragend kristallisiert - und dies auch mit Zuckern tut. Jedoch werden diese dabei nicht *homogen* in den Kristallverband aufgenommen. Generell kann eine solche Inkompatibilität zu Separation, Polymorphismus und zur vollständigen Kristallisationshemmung unter Ausbildung unterkühlter Schmelzen oder amorpher Phasen führen. Dieses ist natürlich auch eine Frage der *Menge*, und das Matrix/Analyt-Verhältnis war bei den oben genannten Messungen mit 2:1 für MALD-MS unüblich niedrig (s.u.). Die festgestellten Inhomogenitäten sind kleiner als die beprobte MALD-MS-, aber größer als die PD-MS-Fläche, weshalb erstere davon betroffen sind. Unterschiedliche Ionisationsprozesse der beiden Methoden unter diesen Bedingungen sind aber ebenfalls möglich. Bei Fluorescein als Matrix war interessant, daß dieses bei 337 nm als (M+H)⁺, bei 532 nm jedoch als (M+H)⁺ und (M+Ma)⁺-Ion auftrat. Bei 532 nm war auch die (M+Na)⁺-Quasimolekülonenausbeute des Cyclodextrins höher, so daß hier Gasphasenprozesse möglicherweise generell

erleichtert sind. Da Fluorescein bei dieser Wellenlänge stärker absorbiert, ist eine höhere Energie wahrscheinlich. Insgesamt ist das Spektrum bei 337 nm dem PD-MS-Spektrum ähnlicher. Weitere Phthaleine ergaben analoge Ergebnisse. Bei MALD-MS-Messungen von Dextrin 10 ist erstaunlicherweise eine Massendiskriminierung der **leichteren** Teilchen unterhalb von 1200 Dalton zu beobachten, die zudem von allen variierten Parametern, wie z.B. einem Natriumchloridzusatz oder der Laserintensität unabhängig ist. Dieses galt auch für Kontrollmessungen an Peptid-Gemischen. Als Erklärung ist anzunehmen, daß die PD-MS aufgrund ihres Einzeldesorptionscharakters keine *kompetitiven Effekte* der unterschiedlichen Analytteilchen zuläßt, bei der MALD-MS jedoch die große Menge der Neutralen und Ionen um die Kationen konkuriert, und die größeren Moleküle mit mehr potentiellen Ionisierungszentren statistisch bevorteilt sind. Zudem kann die Energie der *exothermen Kationanlagerung* bei größeren Molekülen über mehr Bindungen *delokalisiert* werden, so daß die kleineren schneller zerfallen. Bei höheren Bestrahlungsintensitäten traten, abhängig von der Matrix, auch höhere als die in der Probe vorhandenen Massen auf, was unterschiedliche Gasphasenprozesse (Fragmentierung/Aggregation), in Abhängigkeit der Matrix, plausibel erscheinen läßt.

Für die Exothermieabhängigkeit sprechen auch Befunde von Macfarlane,¹¹⁵ in denen bei Peptiden die Fragmentierung gezielt gesteigert werden kann wenn man Lysin-Reste *guadinert*, und so die erhaltenen basischeren Gruppen eine höhere Protonenaffinität aufweisen als vorher.

Hoppilliard et al.¹¹⁶ teilen ihre gefundenen Matrixeffekte in 3 Gruppen ein:

- 1.: **physikalischer Effekt** : variiert $(M+Na)^+$ sowie $(M+H)^+$ gleichermaßen
- 2.: **chemischer Effekt** : variiert nur $(M+H)^+$
- 3.: **(de)kationisierender Effekt** : verändert das $(M+Na)^+/(M+H)^+$ -Verhältnis

Die Funktionsweise des physikalischen Effektes wird Wechselwirkungen zugeschrieben, die die *Sublimationsenthalpie* erniedrigen, also Analyt/Analyt-Wechselwirkungen schwächen. Der chemische Effekt resultiert aus der Acidität der Matrix, die eine Protonierung im Sinne einer Ionenpräformierung bewirkt. Der (de)kationisierende Effekt wird thermodynamisch erfasst (wobei angenommen wird, daß thermodynamisches Gleichgewicht unmittelbar nach dem Einschlag

besteht): Wenn der (acide) Analyt wenigstens teilweise eine *Salzbildungsreaktion* eingehen kann, dann folgt die bevorzugte Bildung von $(M+Na)^+$ gegenüber $(M+H)^+$, auch wenn Metallionen nur in Spuren vorhanden sind. Während dieses Ergebnis hier mittels thermodynamischer (teilweise *ab initio*) Rechnungen durch Vergleich der möglichen Reaktionswege erreicht wird, folgt phänomenologisch dasselbe nach dem von Macfarlane adaptierten Modell von Norskov und Lundqvist, bei dem präformierte Ionen selektiv extrahiert werden.

6.2.2. Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (LD-MS):

In der MALD-MS wird die Matrix üblicherweise in 1000 bis 50.000-fachen molaren Überschuß zugesetzt. Das jeweilige optimale Verhältnis muß, abhängig von der Matrix und dem Analyten, empirisch bestimmt werden. Um Fragmentierung zu vermeiden, die zu einer Intensitätsminderung und Verbreiterung des Quasinolekülionsignals führt, nimmt man die Spektren an der *Auftrittsschwelle* ("threshold") der Ionen auf.¹¹⁷ Dies ist mit Stickstoff-Lasern besser möglich als mit anderen, da sie eine geringere Schuß zu Schuß-Variation der Intensität aufweisen. Von Vorteil ist es nur ultrareine Lösungsmittel einzusetzen und die Matrices zu reinigen um kristallisationshemmende Weichmacher und störende Kationen zu entfernen.

Morphologie: Mikroskopische und videomikroskopische Untersuchungen belegen, daß bei der Präparation durch Auftropfen durchweg heterogene Proben erhalten werden.¹¹⁸ Die Kristallisation der Matrix beginnt vom äußeren Rand her, und der Analyt bildet gegen Ende eine dünne, isotrope Phase im Inneren. Durch Phasenkontrastmikroskopie ist die Separation zu sehen. Bei diesen Proben sind die erhaltenen Signale am Rand stärker, wo das Matrix/Analyt-Verhältnis viel höher ist. Offensichtlich erfolgt nur dort Kokristallisation. Karas und Hillenkamp züchteten durch langsames Abkühlen größere 2,5-DHBS-Einkristalle und untersuchten diese.¹¹⁹ Röntgenstrukturanalyse zeigte ein ungestörtes Kristallgitter bei Cytochrom C Einbau. Von den Kristallflächen konnten an ein und derselben Stelle hunderte von Spektren erhalten werden, ohne daß gravierende Veränderungen im Spektrum oder an der Substanz festgestellt wurden. Wiederauflösung und spektrophotometrische Bestimmung ergaben, daß bei niedrigen Konzentrationen das Verhältnis des Analyten desjenigen in der Lösung entspricht. Nach Erhöhung wird nicht mehr die entsprechende Menge in das Gitter eingebaut. Im optimalem Verhältnis sind keine Matrixsignale mehr zu sehen. Hingegen ist bei üblicher Präparationstechnik die

Targetoberfläche inhomogen, und die Spektren vom Randbereich, in dem sich Kristalle befinden, ergeben höhere, schärfere und reproduzierbarere Signale. Je nach Matrix stören verschiedene Substanzen die Kristallisation erheblich, bei DHBS z.B. Glycerin oder DMSO, bei Sinapinsäure Spuren von Natriumdodecylsulfat aus der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das Spektrum reiner DHBS weist geringe M^+ , $(M+H)^+$ und $(M+2H)^+$ -Signale auf, neben einigen stärkeren Fragmenten, wie z.B. $(M-OH)^+$.

Durch fluoreszenzmarkierte Proteine konnte die Dynamik der Desorptionswolke in Abhängigkeit von der Präparation beobachtet werden.¹²⁰ Die Matrix/Analyt-Gemische wurden durch spin-coating aufgetragen. Die Morphologie war stark von der Präparation abhängig. Mit zunehmender Schichtdicke nimmt die desorbierte Menge zu, die Axialgeschwindigkeit der Wolke jedoch ab. Bei Beschuß von hinten durch Quarzträger wird jeweils die gesamte Menge an der Stelle des Brennflecks abgetragen. Der Effekt der Axialgeschwindigkeit kann jedoch ohne Messung der Energien nicht abgeschätzt werden. Es ist Abkühlung (Kollisionskühlung) oder Aufheizung (Stoßaktivierung) möglich, je nach der herrschenden Temperatur in der Wolke, die ja nicht direkt von der Translationsenergie abhängt.

Beavis stellte kürzlich eine neue Methode der Präparation vor.¹²¹ Erst wird eine gesättigte aber kristallfreie Lösung der Matrix auf das angeraute Target gebracht. Nach Trocknen wird mit einem Deckgläschen diese Schicht verrieben und Überbleibsel abgepinselt. Danach wird die eigentliche Matrix/Analyt-Lösung, ebenfalls kristallfrei, aufgebracht. Der Sinn dieses Vorgehens ist, daß eine Schicht mit vielen *Kristallisationskeimen* erzeugt wird, auf der dann die eigentliche Lösung homogen und fest haftend aufkristallisiert, so daß die derart entstandene Oberfläche gewaschen werden kann. Die gewonnenen Spektren sind an allen Stellen gleich, ohne eine gute suchen zu müssen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man überall etwa gleich große Kriställchen. Normalerweise fängt die Kristallisation an der Grenzfläche flüssig/gasförmig an. Bei Gemischen verdampft das flüchtigere Lösungsmittel zuerst. Kristalle fallen - nicht gut haftend - aus der Lösung aus. Diese wachsen langsam und können inhomogen sein, da sich die Substanzen (unterstützt durch den Lösungsmittelgradienten) separieren. Bei der Kristallkeim-Methode kristallisiert die Substanz schnell an der Grenzfläche fest/flüssig und übernimmt die vorgefundene Morphologie. Der Analyt wird eingebaut, das

Wachstum schreitet mit dem Verdunsten gleichmäßig fort und es kommt nicht zur Separierung von Matrix und Analyt. Es sind kleinere, aber zahlreichere Kristallite vorhanden. Nach Bedarf kann die überstehende Flüssigkeit auch abgespült werden.

Bezüglich der physikalischen Eigenschaften potentieller Matrices stellen Beavis und Chait¹²² fest, daß diese falls sie *schmelzen* statt zu sublimieren untauglich sind. Eine Säurefunktion sei nicht notwendig, ebensowenig wie ein Pi-System.

Chen et al.¹²³ berichten über Oligonucleotiduntersuchungen, bei denen einige Isomere der Dihydroxybenzoesäure eingesetzt wurden. Neben 2,5-DHBS war nur 2,3-DHBS einigermaßen tauglich, und die Morphologien aller Isomere - jeweils nach Augenschein - verschieden.

Ich konnte beobachten, daß bei einem VISION 2000-Gerät mit Beobachtungskamera schon bei moderaten Laserleistungen ein abplatzen und umherfliegen der Substanz von der Oberfläche zu sehen war. Dannach konnte man bis auf den Stahlträger blicken. Allerdings waren unter diesen Bedingungen keine Spektren zu gewinnen. Es hatte den Anschein, als ob die Substanz zu schnell getrocknet sei, und eher amorphen Charakter besaß. Bei einwandfreien Präparationen ist keine visuelle Veränderung zu erkennen. Bei noch "feuchten" Proben, die auch keine Spektren ergeben, reagiert die Substanz wie eine feuchte Wiese auf einen Fußtritt. Bei identischer Lösung und Probenträger ist dies von den Trocknungsbedingungen (Zeit, kratzen) abhängig.

Säure/Base-Eigenschaften:

Es ist zu beachten, daß die Aciditäten von strahlungsangeregten Molekülen teilweise dramatisch von denen im Grundzustand abweichen können, z.B. bei Phenol, wo der pK_a -Wert von 9,94 im Grundzustand auf 5,7 im S_1 -Zustand abfällt.¹²⁴ Dies gibt dann auch Anlaß zu Protonenübertragung in der Gasphase.

Eine andere Arbeitsgruppe verallgemeinert sogar, daß eine Matrix dann gut ist, wenn sie *im angeregten Zustand eine Säure darstellt*, wie z.B. Phenole, Zimtsäuren und aromatische Amine.¹²⁵ Dafür spricht, daß Sinapinsäuremethylester als Matrix ebenso tauglich ist wie Sinapinsäure selbst. Für deren angeregten Zustand wird angenommen, daß die mesomere Grenzstruktur, die als ein protoniertes Chinonmethid zu betrachten ist, ein höheres Gewicht gegenüber dem Grundzustand

erhält. Die Protonenübertragung soll aus dieser Stellung erfolgen und ist daher beim Ester ebenso möglich wie bei der freien Säure.

Für Basizitäten dürfte entsprechendes gelten, so daß bei Abschätzung von vermeintlich passenden Gasphasenwerten enorme Abweichungen durch die Lasereinstrahlung auftreten können, da die Matrix ja per Definition angeregt wird. Aber selbst im Grundzustand ist die Bestimmung der Gasphasenbasizität ein Problem: Vergleiche von Aciditätsmessungen mittels Fouriertransformations-Ion-Cyclotron-Resonanz (FT-ICR) und massenselektierten kinetischen Energiespektren (MIKES), ergeben bei Alkandiolen Abweichungen von mehr als 20 kJ/Mol.¹²⁶ Vergleiche von Basizitätsmessungen und Ammoniumionenaffinitäten bei Kronenethern mittels MIKES und Ion-Trap-Ligandenaustauschtechnik, liefern teilweise unterschiedliche Reihenfolgen und Energiedifferenzen von ebenfalls um 20 kJ/Mol, wobei entropische Effekte hineinspielen.¹²⁷ Große Moleküle lassen sich hingegen zur Zeit noch nicht mit vertretbarem Aufwand berechnen.

Von Karas und Hillenkamp wird ein Effekt des pH-Wertes auch dahingehend interpretiert, daß sich *Matrix/Analyt-Ionenpaare* bilden,¹²⁸ die daraufhin den regelmäßigen Analyteinbau in das Wirtsgitter erleichtern. Verkompliziert wird der Versuch einer Erklärung, wenn man betrachtet, daß für einige Problemstellungen *Matrix-Gemische* eingesetzt werden, so z.B. 2-Aminobenzoessäure/Nicotinsäure, 4:1 für Oligodesoxynucleotide im negativen Meßmodus, 2,5-DHBS/2-Hydroxy-5-methoxyzimtsäure, 9:1 statt DHBS alleine¹²⁹ oder Rhodamin 6G in 3-Nitrobenzylalkohol.¹³⁰ Zum Austausch von Kationen durch unkritische Ammoniumionen geben Karas und Hillenkamp¹³¹ beim Auftragen der Probe ein feines *Ionenaustauscherharz* zu, was die Kristallisation anscheinend nicht behindert. Die Matrix selbst wurde vorher durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt.

Smith et al.¹³² untersuchten die Auswirkungen von Matrices mit verschiedenen pH-Werten in Lösung zwischen 2 bis 11 auf die Spektren von Proteinen und Oligonucleotiden. Diese Werte bleiben allerdings beim Eintrocknen nicht konstant (und der Begriff selbst ist in Festkörpern nicht mehr definiert). Bei den Proteinen wirkte sich Acidifizierung im positiven Modus (wie erwartet) günstig aus. Bei Oligonucleotiden wirkt sich deren Basenzusammensetzung (Sequenz) stark aus, es wurden daher mehrere unterschiedliche vermessen. Ein verallgemeinerungsfähiger Effekt auf die Desorption/Ionisation durch den pH-Wert wurde jedoch bei diesen

nicht festgestellt. Nichtsdestoweniger ist die Verfügbarkeit basischer Matrices aber für die Vermessung säurelabiler (z.B. geschützter) Substanzen von Vorteil und beweist einmal mehr, daß Säurefunktionen nicht notwendig sind.

Die Zugabe von zersetzlichen Ammoniumsalzen¹³³ erhöht die Ausbeute negativer Oligodesoxynucleotid-Ionen beträchtlich und wird der Gasphasenbasizität zugeschrieben. Außerdem bewirken sie Analyt/Analyt-Wechselwirkungsverminderung. In derselben Arbeit werden unterschiedliche Substanzen verglichen und festgestellt, daß diejenigen gute Matrices darstellen, die sich im Vakuum *schnell zersetzen*. Das gilt z.B. für Salze von Acetaten und Carbonaten. Diese Zersetzung bewirkt einen Kühleffekt (aus den oben geschilderten Gründen).

Chait¹³⁴ stellt weiter fest, daß eine pH-Erhöhung der Matrix/Analyt-Lösungen nicht zu einer Erhöhung der Ausbeute negativer Ionen führt, was man bei Deprotonierung in Lösung erwartet hätte. Auch bemerkte er, daß Oligonucleotide die Desorption/Ionisation von Proteinen diskriminieren.

Metallionen-anlagerung:

Es wurde bereits geschildert, daß Natriumanlagerung bei Zuckern notwendig für die Stabilität intakter Quasimolekülonen ist, während bei Proteinen oftmals von einer Störung zu sprechen ist (bei extensiver Kationisierung kommt noch Unsicherheit bezüglich der Massenzuordnung hinzu). Bei negativen Ionen stellten sich Übergangsmetalle als störend heraus. Es gibt aber auch die Möglichkeit der Anlagerung von Übergangsmetallen zur Bildung positiver, stabiler Ionen. Zur Steigerung der Ionenausbeute ist es daher von Interesse zu erfahren, wann diese Ionen einen Vorteil bedeuten. Ebenso stellt sich dann die Frage, ob diese mit den Alkali-metallen konkurrieren.

Karas und Hillenkamp¹³⁵ fanden, daß Polyethylenglycol in DHBS natriumangela-gert auftritt. Polystyrol entmischte sich, so daß hier Nitrophenyloctylether als Ma-trix eingesetzt wurde. Bei Zusatz von Silbertrifluoracetat wurde das Silber angela-gert. An Polybutadien lagern sich im nahen IR Kupfer, Silber und Gold an.¹³⁶ Dies-es geschieht ohne Verwendung einer Matrix. Die Analytlösung wird auf Proben-träger aus dem entsprechenden Material aufgetragen. Eine Zugabe der entspre- chenden *Salze* ermöglicht die Verwendung der üblichen, niedrigen

Laserleistungen, da hier nicht das Metall aus dem Träger geschlagen werden muß. Es wird von einer anderen Arbeit berichtet, in der bei FT-MS Ladungsaustausch stattfindet, da die Ionisationsenergie von Au^+ immerhin 9,22 Elektronenvolt beträgt und in der FT-MS sehr viel mehr Zeit dafür zur Verfügung steht. In einer anderen Arbeit wird ein Goldfilm auf Glas verwendet¹³⁷ und die Schichtdicke so eingestellt, daß die Strahlung eines VIS- bzw. IR-Lasers absorbiert wird. Vermessen wurden Gramacidin S und Cellobiose, die natriumangelagert auftraten, was bei beiden üblich ist. Das Gold soll hier als Konverter für die Energie mittels Induktionsheizung durch das elektromagnetische Feld dienen. Bei einem Peptid, das vorher als $(\text{M}+\text{H})^+$ -Ion auftrat, wurde nach Zusatz von Kupfersulfat beobachtet, daß jede Histidineinheit Cu anlagern kann.¹³⁸ Das Spektrum enthielt eine $(\text{M}+\text{H}+\text{nCu})^+$ -Serie. Da nach waschen der Probe sich das Kupfer aber nicht wieder entfernen ließ, ist davon auszugehen, daß die Reaktion schon vor der eigentlichen Laserdesorption stattfand.

Metzger et al.¹³⁹ führten 3-Aminochinolin als neue Matrix für Polysaccharide und Proteine ein. Im Vergleich zu Messungen mit DHBS fiel auf, daß mit 3-Aminochinolin die Anlagerung von Natrium stärker war als bei der DHBS, wo die Intensitäten von $(\text{M}+\text{Na})^+$ und $(\text{M}+\text{K})^+$ nahezu gleich waren. Zudem sind mit der neuen Matrix die Signale schärfer. Die Menge an Natrium ist immer höher als die Menge an Kalium. Es kann sich also nicht um erhöhte Selektivität energieärmerer Teilchen bei der Aminochinolin-Matrix handeln. Zudem sind die Anteile der Alkalimetalle in den Matrices nicht bekannt.

Cooks¹⁴⁰ berichtet, daß - wie bei der PD-MS - auch in der MALD-MS die Energieinhalte der Quasimolekülonen von Zuckern in der Reihenfolge M plus: $\text{Li} > \text{Na} > \text{K} \gg \text{Cs}$ abnehmen, wobei mit Cs kaum noch Addukte gebildet werden. Bemerkenswert ist, daß einige Disaccharide, wie z.B. Gentobiose, Lactose und Maltose keine Kationen anlagern, während z.B. Melibiose, Palatinose, Sucrose und Trehalose dies tun. Mit Lithium ist die Fragmentierung ähnlich wie bei protonierten Molekülonen. Dies ist eine Folge des sehr harten, stark polarisierenden Li-Ion-Charakters, der von seinen Eigenschaften denen des Protons am nächsten kommt.

Macfarlane et al.¹⁴¹ bemerken, daß angelagerte Übergangsmetallionen die Oxidationsstufe +I (oder Null) tragen, da diese der Gasphasenreduktion unterliegen. Ein Beispiel dafür ist Kupfer (II). In dieser Arbeit fällt auch der Begriff der "Designer-

Matrix", der darstellen soll, daß man eine Matrix auf ein gegebenes analytisches Problem hin *maßschneidern* kann, z.B durch Zugabe von scavenger-Molekülen für störende Begleitstoffe (Kronenether für Alkalimetalle). Auch das Matrixisoliationsprinzip gehört zu den Design-Eigenschaften.

Auf Grund der experimentellen Befunde läßt sich als allgemeines Prinzip annehmen, daß harte Basen (z.B. deprotonierte Säuren) bevorzugt Alkalimetalle anlagern, während weiche Basen (z.B. Disulfidbrücken in Proteinen oder Pi-Systeme) Übergangsmetalle niedriger Oxidationsstufen bevorzugen. Dies ist nichts anderes als das übliche Konzept der harten und weichen Säuren und Basen.^{142,143}

Flüssige Matrices: Diese gehören zu den frühesten überhaupt untersuchten, da deren Verwendung aus der FAB-MS bekannt war. Karas und Hillenkamp setzten daher 3-Nitrobenzylalkohol (NBA) und 2-Nitrophenyloctylether (NPOE) bei 266 nm ein. Hier ist eine homogene Lösung erforderlich. Gramacidin S tritt in den so erhaltenen Spekten natriumangelagert auf, Matrix-Peaks fehlen vollständig.¹⁴⁴ Das auseinanderschwimmen der *hochviskosen* Lösung bei jedem Schuß konnte ich selbst beobachten. Eine permanente *Durchmischung*, die die Probe ständig erneuert, ist daher anzunehmen.

Von starker Clusterbildung bis zum 15-mer von Proteinen in NBA bei 266 nm berichten Chan et al.¹⁴⁵ Deren Ausmaß ist der Menge des Analyten proportional. Von Rinderalbumin tritt das Octamer mit 530.000 Dalton auf. Es ist möglich hunderte von Spektren auf ein und derselben Stelle zu akkumulieren. Sie beobachteten jedoch sehr starke Matrix-Peaks, deren relative Intensität zum Analyten von der Stärke der *Beschleunigungsspannung* abhing. [Als Erklärung hierfür bietet sich an, daß der Ladungsaustausch zwischen Matrix und Analyt zeitlich zufälligerweise genau im Beschleunigungsfeld stattfindet. Eine Variation der Beschleunigungsspannung verschiebt das Aufenthaltszeitfenster in diesem Bereich. Praktisch ist dies eine Beprobung des Reaktionsfortschrittes zu unterschiedlichen Zeitpunkten.]

Als *binäre Matrix* ist NBA auch in anderen spektralen Bereichen (337, 532 nm) einsetzbar, wenn ein absorbierendes Molekül, z.B. Rhodamin 6G, zugegeben wird.¹⁴⁶ Hierbei ist die Auflösung, also Peakschärfe, bei geringerer Absorberkonzentration besser. Dies gilt ebenso für Glycerin mit absorbierenden Farbstoffen. Auch hier werden Cluster beobachtet, mit abnehmender Absorberkonzentration

weniger. Es wird vermutet, daß sich die Proteine an die Chromophore binden, obwohl kaum Addukte im Spektrum auftreten. Keine Spektren wurden mit festen Absorber/Analyt-Mischungen ohne NBA oder Glycerin beobachtet. Die Solventien alleine ergeben ebenfalls keine Signale. Nicht alle bei der verwendeten Wellenlänge absorbierenden, zugesetzten Farbstoffe sind erfolgreich.

Herkömmliche Matrices können mit den Analyten gelöst werden und bleiben, so z.B. Gramacidin S mit 4-Nitroanilin in Methanol/TFA.¹⁴⁷ Dies ist interessant, um continuous-flow-Betrieb, und damit die HPLC/MALD-MS-Kopplung zu ermöglichen. Erste Versuche mit Matrixzugabe nach Art der postcolumn-Derivatisierung sind erfolgreich.¹⁴⁸ Hier ist das optimale Matrix zu Analyt-Verhältnis **1:1**, da keine Kristalle gebildet werden und jedes Analytmolekül "seine" Matrix zur Ionisation benötigt. Bis 10^9 W ist keinerlei Fragmentierung zu beobachten. Die Auflösung ist allerdings sehr schlecht, was vor allem auf die große räumliche Ausdehnung des ionenerzeugenden Volumens zurückzuführen ist. (Deswegen sollte jede Probenoberfläche auch *eben* sein.)

Adsorptionsstrategien:

Cottrell et al.¹⁴⁹ benutzten nitrocellulosebeschichtete Targets, die durch Zusatz von Methanol benetzbar gemacht wurden. Darauf wurde eine Lösung des Proteins in 0,1 %iger Trifluoressigsäure aufgebracht. Nach kurzer Adsorptionszeit konnte diese wieder abgespült werden. Nach dem Trocknen wurde als Matrixlösung Sinapinsäure (10 g/L) in Acetonitril/Wasser, 60 : 40 , mit 0,1 % Trifluoressigsäure aufgebracht und die Probe sofort mit einem Deckgläschen abgedeckt. Dieses war notwendig um durch langsamere Verdampfung die Kristallisation zu erleichtern. Der Vorteil dieser Prozedur besteht in der möglichen nachträglichen Reinigung zur Entfernung von störenden Begleitstoffen. Der Waschschrift ist der gleiche wie in der Nitrocellulose-technik der PD-MS.

Nach Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kann von der verwendeten Polyvinylidendifluorid-electroblotting-Membran nach Matrix-Zusatz direkt gemessen werden.¹⁵⁰ Dies ist deshalb bedeutungsvoll, da es sich dabei um die Standardtrennungsmethode der Proteinchemiker handelt. Zur Ermittlung des Molekulargewichtes ist es aber nötig, eine Eichung mit bekannten Referenzproteinen durchzuführen, indem man diese bei der Trennung mitlaufen

läßt. Dazu muß jedoch die 3-dimensionale Form (z.B. globulär oder fibrillär) vergleichbar sein, da diese die Wanderungsgeschwindigkeit mitbestimmt. Diese Voraussetzung ist aber bei unbekanntem Proteinen nicht gegeben, die Massenzuordnung ist daher nicht sicher und zudem viel ungenauer als bei massenspektrometrischer Bestimmung.

Adsorption an Membranen beschreibt Hutchens.¹⁵¹ Sie mischten Zimtsäureamid (sonst keine taugliche Matrix für Proteine) mit aktivierter Sepharose (zur Gelbildung für die Elektrophorese) und brachten diese Mischung auf einen Träger auf. Darauf konnten Peptide adsorbiert und in guter Qualität vermessen werden. Erstaunlich sind die Ergebnisse mit an die Oberfläche kovalent **gebundener** alpha-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure. Die Spektren weisen ein scharfes Quasimolekülionsignal hoher Intensität auf, Matrix- und Fragment-Signale sowie Addukte fehlen vollständig. Es traten, außer $(M+2H)^{2+}$, keine weiteren für diese Matrix typischen Mehrfachgeladenen auf. Der Mechanismus ist hier unklar. *Molekülselektive Adsorption* erfolgte, indem Einzelstrang-DNA, kovalent an Agarose gebunden, zu einer Urinprobe gegeben wurde. Nur das passende, gesuchte Lactoferrin (80 Kilodalton) wurde adsorbiert. Nach Waschen wurde die Suspension mit Sinapinsäure gemischt und zur Laserdesorption auf einen Glaträger gebracht.

Mit einem Photofilm ist ebenfalls MALD-MS möglich.¹⁵² Der Film wurde belichtet um das Silberbromid zu reduzieren und war damit einsatzbereit. Aminosäuren wurden bei 532 nm desorbiert, mit einem Molekular-Argon-Strahl durch ein Skimmerblech transportiert, und dort durch resonanzverstärkte Multiphotonenionisation (REMPI) ionisiert. Die Temperaturen der Analytionen waren <15 Kelvin. Das Silber dient hier nur zur Energiekonversion.

6.3. Vergleich der Matriceigenschaften in der PD-MS und MALD-MS auf Grund theoretischer Überlegungen:

Kammer streicht deutlich die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen in der PD-MS ebenso wie in der MALD-MS heraus.¹⁵³ Er betont den großen Wirkungsquerschnitt der Dipolmomente dieser Bindungen für Reaktionen mit angeregten Elektronen, was bereits beim PD-MS-Desorptionsmechanismus erwähnt wurde. Wasserstoffbrücken können als unvollständig dissoziierte Protonenübertragungskomplexe betrachtet werden. Eine elektronische Anregung der beteiligten

Moleküle manifestiert sich in der Variation der Bindungsstärke und somit im Ausmaß der Protonenübertragung (Grundlage auch der Solvatochromie). pK-Werte verändern sich ebenfalls bei elektronischer Anregung. Eine Gleichgewichts-Abstandsverlängerung der Bindungen trägt auch wesentlich das Popkorn-Modell. Die praktische Voraussage dieser Betrachtung ist, daß potentielle Matrices ein aromatisches System mit polaren X-H-Bindungen enthalten sollen, z.B. -COOH, -OH und -NH₂. Dies trifft nun auf fast alle funktionierenden Matrices zu und ist somit nicht hinreichend. Das Vorhandensein möglichst vieler Wasserstoff-Brückenbindungen führt zu einer ausgeprägten Phononenbandbildung. So wird die Energie besser weitergeleitet und konvertiert und damit anderen - destruktiven - Relaxationsprozessen entzogen. Kammer und Hilf¹⁵⁴ betonen, daß die Nitrogruppen der Nitrocellulose im UV bei 270 nm absorbieren, und daher ein breites Excitonenband zum Energietransport existiert. Analog gilt dies für Sucroseoctaacetat. Daraus kommen sie zu der Vorhersage, daß als günstige Eigenschaften einer Matrix für die PD-MS als auch für die MALD-MS **gleichermaßen** intensive UV-Absorption, Kristallinität und starke Wasserstoffbrückenbindungen anzusehen sind.

6.4. Eigenschaften einer potentiellen Matrix und Präparation

Die Möglichkeiten der Adsorptionstechniken sind bei der MALD-MS noch sehr jung aber vielversprechend. Ebenso ist die Nutzung der Matrixisolation in der PD-MS eher die Ausnahme. An und für sich sind die MALD-MS und die PD-MS nicht so sehr verschieden, als vielmehr die Möglichkeiten der Adsorption, Inkorporation oder Verwendung einer flüssigen Matrix. Die jeweilige Universalität dieser Präparationstechniken scheint - auch aufgrund der Arbeiten in Oldenburg - immer deutlicher zu werden. Der Hauptunterschied der Desorptionsmethoden liegt in der geringeren Massengrenze der PD-MS, die für die Nitrocellulose-Technik mit 100.000 Dalton geschätzt wurde (s.o.). Dafür ist diese in der Auflösung der MALD-MS etwas überlegen. Die Matrixauswahlkriterien sollen daher nun nicht in 2 mal 3 Methoden (Adsorption, flüssige Matrices, feste Matrices jeweils für die PD-MS und MALD-MS) aufgeschlüsselt werden, da die meisten der geforderten Kriterien für alle gleich sind, und eine positive Eigenschaft bei der "falschen" Methode zumindest nicht stört. Zur rationalen Vorgehensweise ist es sinnvoll nach einem standardisierten Schema vorzugehen, in der Art eines analytischen

Trennungsganges, wobei Erfahrung und Stoffkenntnis nützlich sind. Dabei bietet sich folgende Vorgehensweise an:

- 1.: Charakterisierung des Analyten
- 2.: Auswahl einer Matrix nach Desorptions- und Ionisationseigenschaften
- 3.: Auswahl der Präparationsparameter unter Kontrolle der Matrix/Analyt-Gemischeigenschaften
- 4.: Anpassen der Meßparameter
- 5.: Messung

Bei Teilerfolg: eventuelle Modifizerauswahl, bei anhaltendem Mißerfolg: neue Matrix auswählen oder den Analyten derivatisieren.

Nicht alle Parameter sind bekannt oder auch nur in ihrer Größe abschätzbar. Im folgenden werde ich unabdingbare oder wichtige fett drucken, optionale oder weniger wichtige kursiv, unabhängig von der (derzeit) gezielten Auswählbarkeit.

Analyt: Liegt eine **Einzelsubstanz** oder ein **Substanzgemisch** vor und wie viele Einzelsubstanzen sind es ungefähr? Die einzusetzende Mindestmenge aufgrund der gegebenen Empfindlichkeit und damit das Matrix/Analyt-Verhältnis hängen davon ab.

Wie hoch ist das vermutete relative **Molekulargewicht** und wie sieht eine eventuelle **Molekulargewichtsverteilung** aus? Dies ergibt Hinweise auf die Durchführbarkeit/Schwierigkeit und ob man erwarten kann die gesamte Verteilung zu erfassen. Ist die Substanz **rein**, auch in Bezug auf Ionen? Eventuell können Störungen auftreten, z.B. in Form von Diskriminierung oder mangelhafter Ionisation, dann ist eine Reinigung erforderlich.

Wie steht es um den **Schmelzpunkt**, **Siedepunkt**, die thermische und thermodynamische **Stabilität**? Wie hoch ist die vermutete **Stabilität** eines angeregten oder ionisierten Zustandes, welche **funktionellen Gruppen** liegen vor und **absorbiert** die Substanz Licht bei der einzusetzenden Laserwellenlänge? Beteht **Vakuumkompatibilität**, **Korrosivität**? Daraus folgt eine eventuelle besondere Handhabung, z.B. Kühlung, Licht-, Luft- oder Wasser-Ausschluß. Die Stabilität bedingt

die Aussicht auf Erfolg, eventuell muß man mit Fragmentierung oder zum Beispiel dem Aufbrechen der Quartärstruktur bei Proteinen rechnen. Die Auswahl einer anderen Wellenlänge ist angezeigt, wenn der Analyt die gegebene Wellenlänge absorbiert.

Worin besteht **Löslichkeit**, besteht Neigung zur **Koagulation**, **Micellenbildung**, **Okklusion**, **Oberflächenaktivität**, **Solvolyse**? Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels und Konzentrationsbereiches für homogene Lösungsbildung ohne Reaktivität.

Welche **intermolekularen Wechselwirkungen** liegen vor, wie hoch ist die **Gitterenergie** bei Kristallen? Wie sieht die **Polarität**, **Nettoladung**, **Basizität/Acidität** aus, liegt ein **Salz** vor, wie ist die **Weichheit/Polarisierbarkeit**? Die Auswahl der Matrix erfolgt nach Abschätzung des möglichen Aufbrechens der intermolekularen Wechselwirkungen zur Isolation der Analytteilchen voneinander. Also wird zum Beispiel bei polaren Substanzen eine polare Matrix gewählt, bei unpolaren entsprechend eine unpolare Matrix.

Wie hoch ist die erwartete **Elektronenaffinität/Ionisierungspotential**, **Gasphasenbasizität/acidität**, ist **Kationisierung** oder **Protonierung** wahrscheinlich, und sind diese stark **exotherm**, bestehen **mehrfache Anlagerungs/Ionisationsstellen**? Abschätzen der Ionenart, die wahrscheinlich gebildet wird und der Auswirkung des Alkalimetallgehaltes. Eventuelle Schwierigkeiten können beim Ausrechnen des Molekulargewichtes aus der gefundenen Quasimolekülionmasse auftreten, durch Mehrfachladung und/oder Mehrfachanlagerung von Wasserstoff, Kationen oder Fragmenten. Überlegung, ob Zusätze von bestimmten Ionen wie z.B. Na, Cs oder Ag hilfreich sein kann, oder eher die vorhandenen entfernt werden müssen. Bei z.B. Zuckern kann man so gezielt das Fragmentierungsverhalten beeinflussen (s.o.), und dadurch komplementäre Informationen sammeln.

Desorptionseigenschaften der Matrix: Voraussetzung sind eine gute **Kristallisationsneigung** und **Löslichkeit** im gegebenen Lösungsmittel. Bei flüssigen: hohe **Viskosität**, da das Target bei vielen Geräten senkrecht angebracht ist, und sonst die Lösung heruntertropfen würde. Des Weiteren ist ein niedriger **Dampfdruck** für die Vakuumkompatibilität erforderlich.

Eine starke **Absorption** der Wellenlänge, **Reinheit** und **kein Aufschmelzen** sind weitere Voraussetzungen. **Instabilität** bezüglich Lasereinstrahlung oder Fissionsfragmenten bedingt hohe Desorptionsraten. Bei Adsorption sollte hohe **Affinität zum Analyten** und ein **Kollabieren der Struktur** gegeben sein.

Das **relative Molekulargewicht** sollte niedrig sein, auf jeden Fall unterhalb des interessierenden Massenbereiches liegen. Die **Sublimations-** oder **Zersetzungstemperatur** sollte so gering wie möglich sein, da Energieäquilibrierung durch intermolekulare Stöße in der desorbierten Teilchenwolke bewirkt, daß der Analyt in der Gasphase dann höchstens diese Temperatur besitzen kann. Jedoch ist auch hier auf die Vakuumkompatibilität Rücksicht zu nehmen. Möglichst *hohe Phasenumwandlungsenthalpie* unterstützt die Verdampfungskühlung der verbleibenden festen Probe. Hohe *Molekülsymmetrie*, kleine *Elementarzellgröße*, hohe *Dielektrizitätskonstante*, ein vorhandenes *Pi-System*, hohe *Schallgeschwindigkeit*, *Leitfähigkeit*, *Photoleitfähigkeit*, geringe *isotherme Kompressibilität* sind von Vorteil, eine hohe **thermische Leitfähigkeit** und geringe **Wärmekapazität** sollten angestrebt werden. Diese Faktoren dienen mutmaßlich der besseren Energieleitung und effizienteren Konversion, was aus den theoretischen Ansätzen hervorging. Somit wird die Desorption erleichtert, und dadurch gleichzeitig die energetische Zerstörung des Analyten in den Hintergrund gedrückt. Leitfähigkeit und Wärmekapazität spielen für den Schutz des Analyten vor thermischer Belastung eine Rolle, da nach den Einzelereignissen (Laserpuls oder Teilcheneinschlag) der nicht desorbierte Analyt für die späteren Ereignisse noch zur Verfügung stehen muß, d.h. daß die Probe über die gesamte Meßdauer nicht belastet werden darf. Bei polaren Analyten ist die Ausbildung von **Wasserstoffbrückenbindungen** Voraussetzung.

Ionisationseigenschaften der Matrix:

Der **pH-Wert** in Lösung richtet sich nach der Stabilität der Substanzen, sind diese protonierbar, so kann er versuchsweise zur Ionenpräformation abgesenkt werden. **Reinheit** sollte gegeben sein. **Weichheit/Polarisierbarkeit**, **Ionisationspotential/Elektronenaffinität**, **Gasphasenbasizität/Acidität** sind abzuschätzen und ähnlich denen des Analyten zu wählen, so daß Gasphasenreaktionsgleichgewichte nicht in konkurrierender Weise den Analyten bei der Ionenbildung behindern. Dies ist natürlich nicht gänzlich unabhängig von den polaren Eigenschaften bezüglich der Analytisolierung bei der Desorption (s.o.) zu wählen. *Polare X-H-Bindungen* sind als fast immer vorhanden

zu betrachten. Die wahrscheinliche **Acidität/Basizität des angeregten Zustandes** kann eine große Rolle spielen und sollte aus dem selben Grunde wie oben abgeschätzt werden. Es sollten sich weiter keine stabilen **Ionenpaare** in der Gasphase befinden, da diese durch das Feld nicht beschleunigt werden. Eine **Instabilität der Primärionen** der Matrix läßt hohe Ionisierungsausbeuten erwarten.

Präparationsparameter:

Verwendung einer adäquaten **Menge** und **Konzentration**, um bei der **Trocknung** eine gute und homogene **Kristallisation** zu erhalten, eventuell ist mit einem Phasenkontrast- oder Polarisationsmikroskop Kontrolle zu führen. Bei der PD-MS eine nicht zu hohe **Schichtdicke** auftragen, **Ebenheit** der Oberfläche ist in jedem Fall anzustreben. Auf ausreichende **Adsorptionszeit** achten, um genug Analyten auf der Oberfläche zu haben, eventuell **Waschen**. Ein Erzeugen von **Kristallisationskeimen** kann zu besserer Homogenität und Haftung führen. Gegen statische Aufladung und zum Anlegen der Beschleunigungsspannung sind **leitende Träger** aus Metall, für die PD-MS mit Metall bedampft, zu verwenden.

Matrix/Analyt-Gemischeigenschaften:

Homogenität, keine **Gitterfehlerstellen**, keine **lokalen Dichtefluktuationen**, ein richtiges **molares Verhältnis**, bei flüssigen: homogene **Durchmischung**, keine **Koagulation**, **Phasentrennung** oder **Micellenbildung**, bei Adsorption: **Isolation** des Analyten in einem **Monolayer**, **Ionenpaarbildung** (unter Zerfall in der Gasphase) und **Homogenität** sind anzustrebende Bedingungen.

Meßparameter:

Passende **Wellenlänge** und **Gesamtenergie** wählen. Die **Pulsdauer**, **Strahlungsdichte**, **Strahlprofil**, **Focusgröße**, **Einfallswinkel** sind meist fixe Parameter. Niedrige **Energieschwankungen** sind vorteilhaft. Den **threshold** möglichst genau einhalten, ausreichende **Meßdauer/Schußzahl** akkumulieren, im Notfall eine **günstige Stelle** suchen, die **Höhe der Beschleunigungsspannung**, **Polarität** aussuchen. **Verzögerte Beschleunigung** sollte falls möglich immer getestet werden. Die **Länge des feldfreien Raumes**, ausreichende **Detektorlinearität**, **elektrostatistische Teilchenführung**, Elektronen- und Fragment-**Deflektion** und keine **Auswertartefakte** durch Signalaufarbeitung sind konstruktionsgegeben.

Modifizier: Eventuell ein geeignetes **Alkalimetall** zusetzen, **Verhältnis** der einzelnen Ionen betrachten, bei Kationisierung dasjenige mit der höheren Affinität zugeben, eventuell **Übergangsmetalle** zusetzen (mit möglichst wenig Isotopen, z.B. Au oder Ag) oder **scavenger** (z.B. Kronenether) zugeben, falls diese mit dem Kristallisationsprozeß kompatibel sind. *Ionenaustauscher* zur Entfernung/Maskierung, **Säuren/Basen** zur Ionenpräformierung oder Stabilisierung, **Lichtabsorber/Matrix** für ternäre Systeme, **Stabilisatoren**, **Löslichkeitsvermittler** können ausprobiert werden.

Bei auftretenden Diskriminierungseffekten sind die Parameter zugunsten der unterdrückten Bestandteile zu verändern. Wird gar kein Signal gefunden, ist von vorne zu beginnen und/oder der Analyten zu derivatisieren.

6.5. Zusammenfassung:

Nicht alle gewünschten Parameter sind unabhängig einstellbar oder wählbar, was insbesondere für die physikalischen Festkörpereigenschaften gilt. Sind die Hauptvoraussetzungen erfüllt, ergeben sich mit vielen "dankbaren" Analyten keine Probleme. Refraktäre Substanzen (wie zum Beispiel die Lignine) erfordern jedoch fein abgestimmte Bedingungen, zu deren Kontrolle idealerweise weitere physikalische Meßmethoden eingesetzt werden sollten. Wichtige Parameter, wie zum Beispiel die Trocknungsgeschwindigkeit oder die Konzentration kann man - möglichst automatisiert - in umfangreichen Meßreihen ermitteln. Zwar ist der Aufwand enorm und die Sicherheit, daß es dann auch funktioniert, ist nicht gegeben, aber in der Vergangenheit hat sich oft herausgestellt daß, wenn man den "Dreh" erst einmal heraus hatte, die weitere Durchführbarkeit nicht mehr so diffizil ist, und die Messungen dann in Routine durchgeführt werden können.

Schließen möchte ich hier unter nochmaligem Hinweis auf eine mögliche neuartige Desorptionsmethode durch Verwendung mechanischer Oszillatoren, wie z.B. Piezokristallen. Bei deren Verwendung wäre jede der obigen Desorptionstechniken anwendbar, auftragen einer Matrix, ob fest oder flüssig ebenso wie Adsorption. Für letzteres müßte eventuell eine geeignete Interface-Schicht aufgebracht werden, wenn die Keramikoberfläche nicht die gewünschten Eigenschaften aufweist.

7. Einleitung zu den untersuchten Substanzen

7.1. Einführung in die Lignine

Nach Cellulose ist das Lignin der mengenmäßig häufigste organische Naturstoff. Auch technisch, als Abfallprodukt der Cellulosegewinnung, stellt es mit 50 Millionen Jahrestonnen ein großes stoffliches Reservoir dar. Eine Nutzung in Substanz findet derzeit nur in begrenztem Umfang, zum Beispiel als Füllstoff in der Reifenindustrie oder als Bitumenzusatz im Straßenbau statt. Hauptsächlich dient es der Energiegewinnung durch Verbrennung, wobei es sich im Gegensatz zu Erdöl und Kohle durch seinen fehlenden Schwefelgehalt (wie auch Stickstoffgehalt) auszeichnet. Es ist offensichtlich, daß hier ein weites Feld neuer Anwendungen auf seine Erschließung wartet.

In der Pflanze erfüllt das Lignin eine stützende Gerüstfunktion, und es wird bei der Verholzung, Lignifizierung, gebildet.¹⁵⁵ Es gibt Bereiche innerhalb der Pflanzen, in denen dies bevorzugt der Fall ist, so zum Beispiel im Wasserleitungssystem. Der Stamm von höheren Landpflanzen besteht bei Nadelbäumen zu 26-30%, bei Laubbäumen zu 20-22% des Trockengewichtes aus Lignin. Daher rührt auch der Name, der sich aus dem lateinischen "lignum" für Holz ableitet.

Durch die evolutiv bevorzugte Widerstandsfähigkeit und den statistischen Aufbau, sind nur sehr wenige Organismen, wie beispielsweise der Weißfäulepilz, in der Lage, das Lignin wieder abzubauen.¹⁵⁶

Der Bildungsmechanismus¹⁵⁷ führt nach dem Shikimisäureweg aus Glucose über Shikimisäure, Prephensäure, Phenylalanin zu p-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure. Aus diesen werden über die Aldehyde dann p-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapinalkohol - die Ligninmonomeren - gebildet. Diese Monomere liegen in der Speicherform als Glycoside vor. Ihre relativen Anteile sind nicht nur je nach Pflanzenklasse verschieden, sondern variieren auch innerhalb ein und derselben Pflanze zwischen den verschiedenen Zellarten (und das auch noch jahreszeitlich). Auch p-Cumarsäure, p-Hydroxybenzoesäure und andere Substanzen werden in geringerem Umfang eingebaut. Zur Charakterisierung wird das sogenannte H/G/S-Verhältnis angegeben, also die relativen Anteile von Hydroxyphenylpropan-, Guajacyl-, und Syringyl-Derivaten. Die evolutiv älteren

Gymnospermen (Nacktsamer) enthalten fast nur Guajacyl-Einheiten, die jüngeren Angiospermen (Bedecktsamer) in etwa gleich viel Guajacyl- wie Syringyl-Einheiten und nur in den (evolutiv ältesten) Krautartigen und Gräsern (Einjahrespflanzen) sind auch höhere Anteile von Hydroxyphenyleinheiten bis etwa 30% zu finden.

Die Monomeren werden in der Zelle radikalisch polymerisiert. Das Enzym (eine Peroxidase unter Verwendung von H_2O_2 , Lit.¹⁵⁵) greift dazu selektiv die Hydroxygruppe in para-Stellung zur C_3 -Kette an. Die so entstehenden mesomeriestabilisierten Radikale reagieren statistisch über Chinonmethide weiter. Die ursprünglich vorhandenen Zuckerreste können von einer Glucosidase¹⁵⁵ abgespalten worden sein, aber das Lignin ist immer auch mit einem Zuckeranteil verbunden der ebenso wie dieses statistisch aufgebaut ist. Molekulargewichte bis über eine Million Dalton machen unverändernde Isolationsversuche vergeblich. Schonende Verfahren, zum Beispiel nach Björkman¹⁵⁸ (milled wood Lignin, MWL), sollen weitgehend unverändertes Lignin ergeben.

Es gibt zwischen zwei Monomeren zahlreiche verschiedene Bindungsmöglichkeiten,¹⁵⁹ in ihren Anteilen je nach Gattung unterschiedlich. Zwar führen nicht alle zu unterschiedlichen Massen beim stufenweisen Aufbau, aber da mehrere Monomere beteiligt sind, Wasser addiert sein kann, unterschiedliche Zucker und Zuckerderivate in ebenfalls statistischer Verteilung eingebaut werden, sowie eine Molekulargewichtsverteilung vorliegt, ist im höheren Massenbereich nahezu jede Masse besetzt. Durch die unterschiedlichen Häufigkeiten der Besetzungen ergibt sich jedoch ein Modulationsmuster, das die tatsächlichen Verhältnisse widerspiegelt.

In den nach Björkman gewonnenen Milled-Wood-Ligninen (MWLs) ist die Molekulargewichtsverteilung zu niedrigeren Werten verschoben. Es sind dort noch Kohlenhydratanteile von einigen Prozent zu finden. Zur vereinfachten Strukturuntersuchung hat man Modellverbindungen, die Dehydropolymerisate, geschaffen:

Bei den Dehydropolymerisaten (DHPs)¹⁶⁰ nimmt man zur Synthese oftmals nur einen Monomerbaustein. Zudem wird der Anteil der Kohlenhydrate weggelassen, was die Bildung nicht beeinträchtigt. Entsprechend den natürlichen Verhältnissen wird mittels eines Enzyms radikalisch (hier mit Laccase, Lit.¹⁵⁵) dehydrogeniert. Die Polymerisation verläuft - wie in der Natur - statistisch. Die Molekulargewichte

reichen bis in den hohen Hunderttausender-Bereich, mit Zahlenmitteln um 15000 Dalton, dies sind ähnliche Werte wie bei Milled-Wood-Ligninen.¹⁶¹ Die Ligninbausteine sind mit den Zuckereinheiten, die ebenfalls statistisch aus zahlreichen verschiedenen Monomeren zusammengesetzt sind, über Kovalenzbindungen, Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zu Lignin-Kohlenhydrat-Komplexen (LCCs) verbunden. Konformationsänderungen durch hydrophobe Wechselwirkungen wurden berichtet.¹⁶¹ Gibt man zu einer LCC-Lösung eine Ligninlösung, so fällt die Viskosität sprunghaft ab. Durch Perjodat-oxidation und Smith'schen Abbau ermittelte man, daß dabei das Lignin als Seitenkette an die Kohlenhydratkette kovalent gebunden wurde. Bindeglieder waren Mannose und Glucose, neben Xylose, Arabinose und Galactose. Die Benzylether waren über C-2 und C-3 gebunden, bei Mannose auch über C-6. Weiter kann es zu Micellenbildung und Okklusion anderer hydrophober Substanzen kommen. Die kritische Micellkonzentration eines LCCs wird mit 0,035 % in Wasser angegeben. Dieser Wert hängt aber (wie die Löslichkeit) davon ab wieviel Zuckeranteil der LCC enthält. Bei der Säulenchromatographie adsorbiert Phenylsepharose mehr LCCs als Octylsepharose, was der Grund zur Annahme von Pi-Pi-Wechselwirkungen ist.¹⁶² Die Auftrennung der Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe erfolgt in anscheinend beliebig viele Fraktionen, was zu der Schlußfolgerung geführt hat, daß Strukturveränderungen unter Isolierungs- und Trennungs-Bedingungen auftreten.¹⁶³ Üblicherweise ist das Lignin an Polyosen und auch an Cellulose gebunden. Das Polyosen-Rückgrat enthält als Bindeglieder hauptsächlich Arabinose, Galactose und 4-O-Methylglucuronsäure, mit Benzylester-, Benzylether-, und phenylglycosidischen Bindungen. Die Zahlenmittel der Molekulargewichtsverteilungen liegen bei den LCCs, die man extrahiert, um 8000 Dalton, die Gewichtsmittel bei 12.000 Dalton.

7.2. Zusammenfassung der Eigenschaften

Die Strukturen von Ligninen und insbesondere Lignin-Kohlenhydrat-Komplexen erweisen sich als ebenso vielfältig wie variabel. Monomerhäufigkeiten, Bindungsarten, Zusätze, Molekulargewichtsverteilungen, Löslichkeitsverhalten, all dies sind Faktoren, die von Planze zu Planze, der biologischen Zellzugehörigkeit, der Jahreszeit - und daher auch sicher noch von anderen Faktoren - und nicht zuletzt von der Aufarbeitung abhängen. Die enorme Variabilität der Eigenschaften trägt auch

die Verantwortung dafür, daß eine massenspektrometrische Untersuchung schwer, wenn nicht mit einigen Methoden sogar unmöglich ist. Eine Matrix, die auf den Analyten maßgeschneidert werden soll, muß in so vielen Parametern auf Variable eingestellt sein, daß es bis jetzt nicht möglich war, auf rationale Vorgehensweise die optimalen Eigenschaften zu erhalten, und es ist fraglich ob diese zur Verfügung stehen, selbst wenn sie bekannt sind. Die Spanne der LCCs alleine umfasst schon je nach Gewinnung und Zusammensetzung einen Löslichkeitsbereich, der diese untereinander inkompatibel macht. Er reicht über Wasser/Trifluoressigsäure zu Wasser/KOH, DMSO oder Ethanol. Es kann nicht *eine* optimale Matrix gefunden werden, die die gesamte Spanne der Lignine und Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe zugänglich macht. Ein Ausweg ist dann die präparative Vortrennung.

Die Anzahl der verschiedenen Moleküle in nichtfraktionierten MWLs, DHPs und LCCs dürfte so hoch sein, daß es bei der PD-MS zu einem Empfindlichkeitsproblem kommt, so daß diese Methode eventuell gar nicht (in sinnvollen Meßzeiten) dafür geeignet ist. Bei 100 ng Analyt, unter Annahme von 500 verschiedenen Molekülen mit einer durchschnittlichen Masse von 5000 Dalton, ist die Lage nach überschlägiger Rechnung hoffnungslos.

7.3. Betrachtung zukünftiger Matrices und Präparationen für die Lignine

An Hand der oben dargestellten **Verfahrensweise** (und nicht *Denkweise*) sollte es möglich sein, eine adäquate Matrix auszuwählen. Dieses gilt unabhängig der durch die Methode oder spezifischen Geräteparameter gesetzten Grenzen. Hierzu sind allerdings nähere Kenntnisse der Analyteigenschaften erforderlich, die es zu ermitteln gilt. Es ist aber zu erwarten, daß die Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe mit hohem Zuckeranteil eine polarere Matrix erfordern, als die Lignine oder Dehydropolymerisate. Da die spezifischen Eigenschaften von Wasserstoffbrückenbindungen für die MALD-MS- wie auch die PD-MS-Desorptionsvorgänge von besonderem Vorteil sind, ist daher zu erwarten, daß die LCCs - trotz komplexeren Aufbaus - leichter zugänglich sein sollten. Zudem besteht ein viel größerer Erfahrungsschatz bei polaren Matrices. Es ist jedoch darauf zu achten, daß die LCCs ihrer Neigung zur Micellenbildung nicht nachkommen können, wofür eine ausreichende Verdünnung zu wählen ist. Weiter ist aus bisherigen Messungen bekannt, daß die Lignine protonierte Quasimolekülonen bilden und kein Natrium anlagern.¹⁶⁴ Aufgrund ihrer molekularen Struktur, die vorwiegend aromatisch ist und keine

nennenswerten Anteile stark polarer Bindungen enthält, können die Lignine als weiche Basen im Sinne des HSAB-Prinzips bezeichnet werden. Es sollten daher Versuche mit weichen Pi-Säuren, wie z.B. Silber als Ionisationspartnern angestellt werden. Da die Ausbildung einer homogenen Kristall- oder Lösungsstruktur in der Matrix die Hauptschwierigkeit darstellt, sollte die Präparation interaktiv mit begleitenden physikalischen Methoden durchgeführt werden. Bei solch komplexen Substanzgemischen wäre es jedoch vermessen, an dieser Stelle eine bestimmte Substanz- oder Substanzklasse vorzuschlagen, insbesondere da Gemische zusätzliche Diskriminierungseffekte zeigen, die ohne Kenntniss der gebildeten Ionen, Fragmente und Präparationsbedingungen nicht vorherzusagen sind. Die Erarbeitung dieser Substanzklassen kann auch in Zukunft nicht auf dem Papier bewerkstelligt werden.

8. Ergebnisse der Messungen

8.1. Plasma-Desorptions-Massenspektrometrie (PD-MS):

Die hohe Affinität von Lignin zu Zuckern wird durch eine Messung meinerseits bestätigt, bei der ich als Matrix alpha-Cyclodextrin verwendet habe. Die Mengen betragen 10 Mikrogramm und 200 Nanogramm. Es ergibt sich somit ein Matrix/Analyt-Verhältnis von 50:1. Nach zwei Stunden Messung waren keinerlei Ligninsignale neben normalen Cyclodextrin-Signalen zu erkennen. In einem weiteren Experiment wurde als Matrix 2-Aminothiazol - eine sehr geeignete Polysaccharidmatrix - genommen, 4 Mikrogramm. Neben 200 Nanogramm G-DHP/Fraktion 9, wurden 40 Nanogramm Cyclodextrin zugesetzt. Nach 1 3/4 Stunden waren keinerlei DHP,- sowie ebenfalls keine Cyclodextrin-Signale zu sehen. Dies ist ungewöhnlich, da nach so langer Meßzeit - selbst bei der geringen Analytmenge und dem Matrix/Analytverhältnis von 100:1 - normalerweise schnell ein deutliches Spektrum dieses Zuckers erhalten wird.

Des weiteren wurden keine akzeptablen Spektren in Meßzeiten bis 18 Stunden Dauer erhalten. Bei einem Versuch, unter Zusatz von Silbertrifluoracetat, wurden ebenfalls keine Molekülionensignale erhalten, aber es trat ein beschleunigungs- spannungsabhängiger Isotopeneffekt beim Silber auf, der das Isotop 109 gegen das

Isotop 107 stark unterdrückte (bis zu 80 %). Dem wurde jedoch nicht weiter nachgegangen. Alle bekannten Messungen mit Cyclodextrin konnten zur Präparationskontrolle sehr gut reproduziert werden.

Dabei ist anzumerken, daß die ^{252}Cf -Quelle nur noch ca. 130 Kernfragmentpaare pro Sekunde produziert. Dieser Wert ist sehr gering.

8.2. Laser-Desorptions-Massenspektrometrie (MALD-MS):

Alle Messungen der MWLs, LCCs und DHPs waren erfolglos, bis auf die Messung des Milled-Wood-Lignins der Birke am VISION 2000. Bei dieser Messung betrug die Auftrittsschwelle 52,5 % der maximalen Laserleistung und mußte auf $\pm 0,5$ % genau eingehalten werden. Ein solches Spektrum ist von Metzger et al. bereits veröffentlicht und interpretiert worden.¹⁶⁴ In Abbildung 1 und 2 sind der Überblick und ein Ausschnitt von 500 bis 2000 Dalton zu sehen. Der Bereich bis zu den Decameren wird in der "Feinstruktur" noch hinreichend aufgelöst, d.h. daß z.B. der Bereich der Tetramere aus der Verteilungsfunktion als "Berg" herausragt. Über 2000 Dalton ergibt sich nur noch eine verschmierte Verteilungsfunktion, die durch die Auflösung des Gerätes bedingt ist. Wie im veröffentlichten Spektrum ergibt eine weitere Vergrößerung die "Hyperfeinstruktur", d.h. daß im Bereich der Di- bis Decamere die einzelnen Einheiten in ihrer wirklichen Zusammensetzung zu erkennen sind, die ja statistisch in ihrer Zusammensetzung aus den einzelnen Monomeren (die sich um 30 Dalton unterscheiden) gebildet werden. Die unterschiedlichen Bindungsarten, Wasseraddition, Isotopenmuster und andere Bestandteile besetzen die dazwischenliegenden Massen. Im Rahmen der Eichgenauigkeit sind die Spektren in der Feinstruktur identisch. Der Schwerpunkt der Verteilung erscheint allerdings bei meiner Aufnahme erhöht zu sein (er liegt hier bei ca. 7000 Dalton). Metzger et al.¹⁶⁵ fanden in ihrem MALD-MS-Spektrum der Birke einen Schwerpunkt der Massenverteilung bei 2600 Dalton, der auch durch Gelchromatographie bestätigt wurde. Leider besteht nicht die Möglichkeit, den Sachverhalt durch tatsächliche Integration der Urdaten zu überprüfen.

Abb. 1: MWL Birke, VISION 2000, Gesamtübersicht

Ausschnitt 500 bis
2000 Dalton

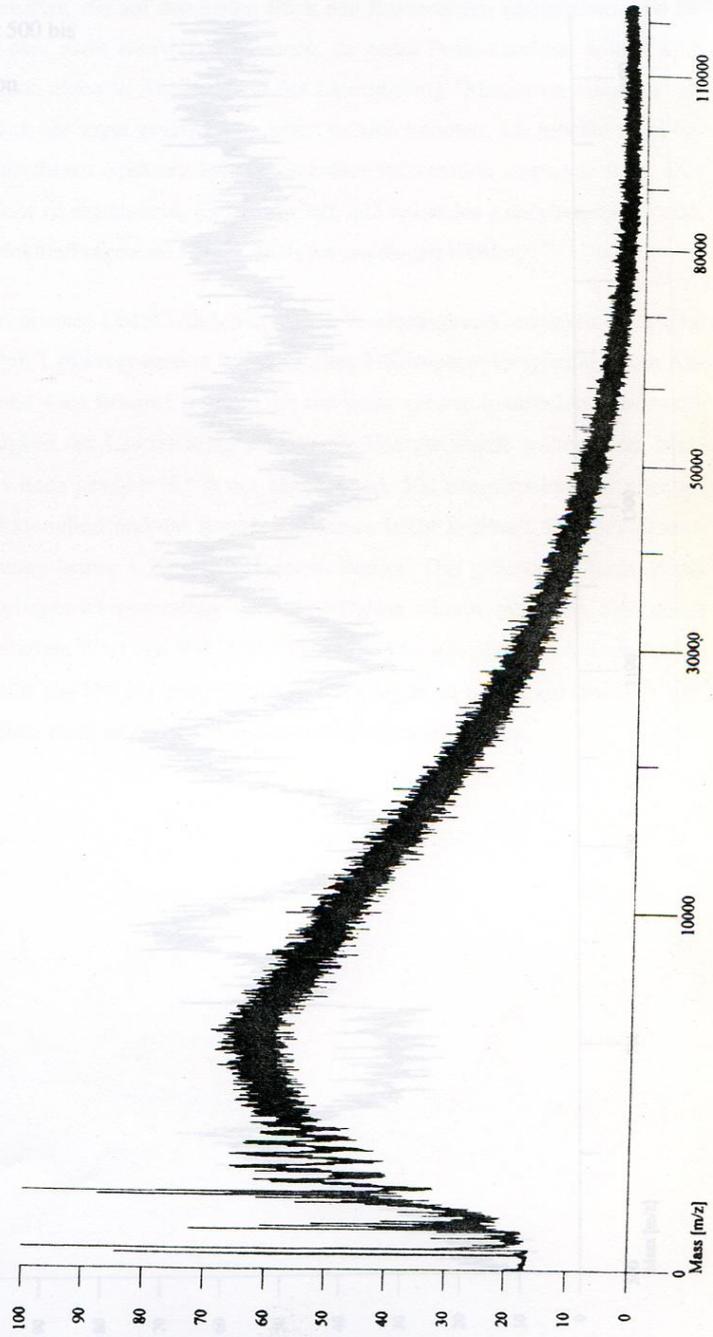
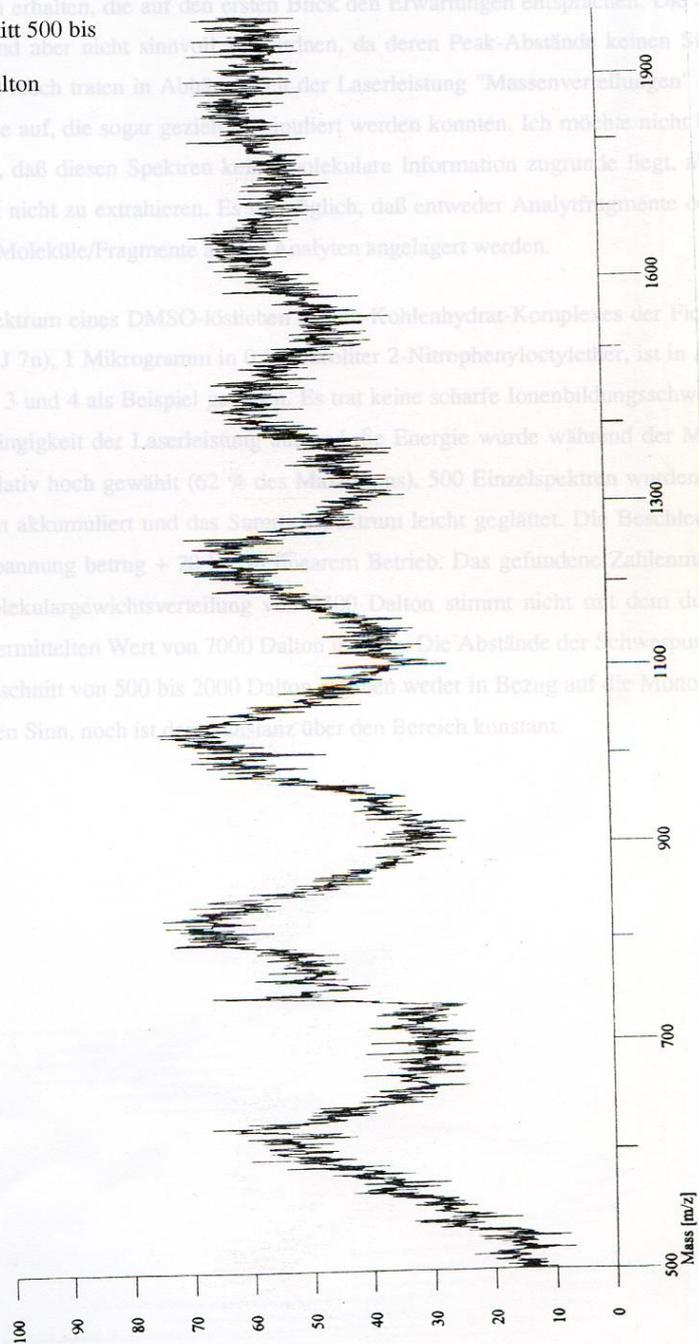


Abb. 2: *in situ* MWL Birke, VISION 2000 III

Ausschnitt 500 bis

2000 Dalton



Am Shimadzu Kratos Kompakt MALDI III wurden teilweise sehr irritierende Spektren erhalten, die auf den ersten Blick den Erwartungen entsprachen. Die Signale sind aber nicht sinnvoll zuzuordnen, da deren Peak-Abstände keinen Sinn ergeben. Auch traten in Abhängigkeit der Laserleistung "Massenverteilungen" als Artefakte auf, die sogar gezielt manipuliert werden konnten. Ich möchte nicht behaupten, daß diesen Spektren keine molekulare Information zugrunde liegt, aber diese ist nicht zu extrahieren. Es ist möglich, daß entweder Analytfragmente oder Matrix-Moleküle/Fragmente an den Analyten angelagert werden.

Das Spektrum eines DMSO-löslichen Lignin-Kohlenhydrat-Komplexes der Fichte (LCC BJ 7n), 1 Mikrogramm in 0,1 Mikroliter 2-Nitrophenyloctylether, ist in Abbildung 3 und 4 als Beispiel gegeben. Es trat keine scharfe Ionenbildungsschwelle in Abhängigkeit der Laserleistung auf und die Energie wurde während der Messung relativ hoch gewählt (62 % des Maximums). 500 Einzelspektren wurden im Zentrum akkumuliert und das Summenspektrum leicht geglättet. Die Beschleunigungsspannung betrug + 20 kV in linearem Betrieb. Das gefundene Zahlenmittel der Molekulargewichtsverteilung von 2300 Dalton stimmt nicht mit dem durch HPLC ermittelten Wert von 7000 Dalton überein. Die Abstände der Schwerpunkte im Ausschnitt von 500 bis 2000 Dalton ergeben weder in Bezug auf die Monomeren einen Sinn, noch ist deren Distanz über den Bereich konstant.

Abb. 3: MWL Birke, Beispiel für Artefakte, Gesamtübersicht

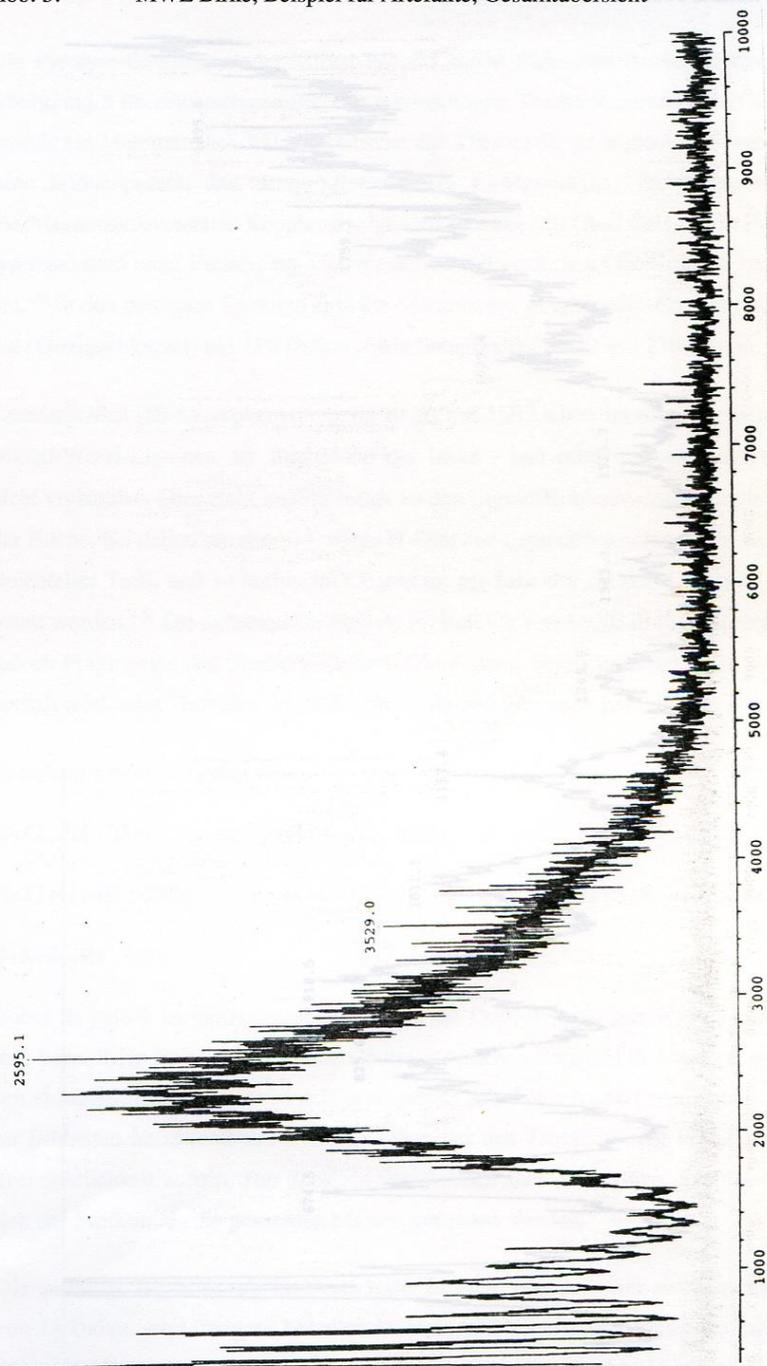
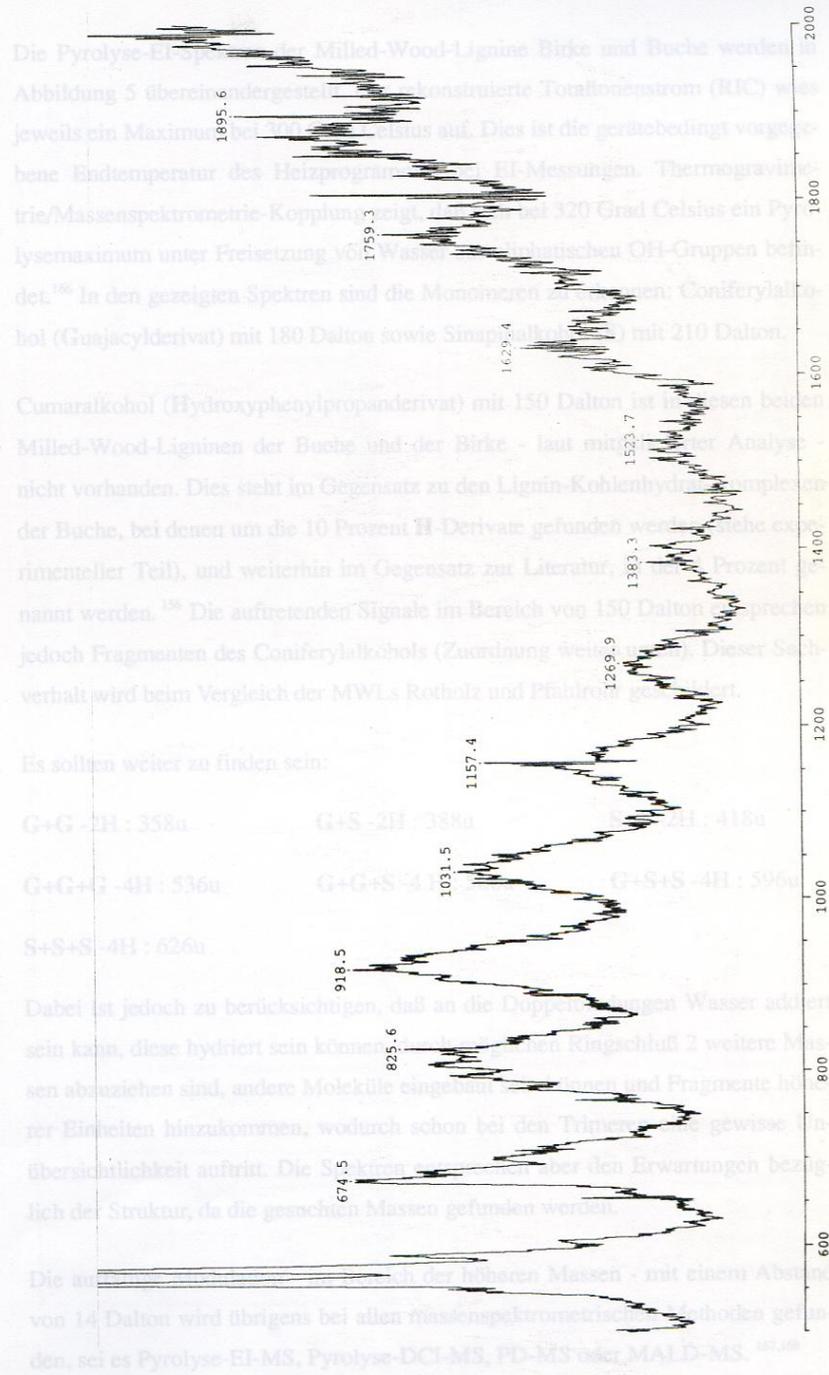


Abb. 4: Pyrolyse MWL Birke, Beispiel für Artefakte, Ausschnitt 500-2000 Dalton



Es sollten weiter zu finden sein:

- G+G-2H : 358u
- G+S-2H : 388u
- G+G+G-4H : 536u
- G+G+S-4H : 596u
- S+S+S-4H : 626u
- G+S+S-4H : 674u
- G+G+G+S-4H : 734u
- G+S+S+S-4H : 794u
- G+G+G+S-4H : 854u
- G+S+S+S-4H : 914u
- G+G+G+S+S-4H : 974u
- G+S+S+S+S-4H : 1034u
- G+G+G+S+S-4H : 1094u
- G+S+S+S+S-4H : 1154u
- G+G+G+S+S+S-4H : 1214u
- G+S+S+S+S-4H : 1274u
- G+G+G+S+S+S-4H : 1334u
- G+S+S+S+S-4H : 1394u
- G+G+G+S+S+S-4H : 1454u
- G+S+S+S+S-4H : 1514u
- G+G+G+S+S+S-4H : 1574u
- G+S+S+S+S-4H : 1634u
- G+G+G+S+S+S-4H : 1694u
- G+S+S+S+S-4H : 1754u
- G+G+G+S+S+S-4H : 1814u
- G+S+S+S+S-4H : 1874u
- G+G+G+S+S+S-4H : 1934u
- G+S+S+S+S-4H : 1994u

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß an die Doppelbindungen Wasser addiert sein kann, diese hydriert sein können, was zu einer Verschiebung des m/z-Wertes um 2 weitere Massen abziehen sind, andere Moleküle eingeklinkert sein können, was zu einer Verschiebung um 14 oder 28 Einheiten hinzukommen, wodurch schon bei den Trimern gewisse Unübersichtlichkeit auftritt. Die Peaks liegen über den Erwartungen bezüglich der Struktur, da die geschätzten Massen gefunden werden.

Die an der Basislinie der höheren Massen - mit einem Abstand von 14 Dalton wird übrigens bei allen massenspektrometrischen Methoden gefunden, sei es Pyrolyse-EI-MS, Pyrolyse-DCI-MS, PD-MS oder MALD-MS.

8.3. Pyrolyse-Massenspektrometrie:

Die Pyrolyse-EI-Spektren der Milled-Wood-Lignine Birke und Buche werden in Abbildung 5 übereinandergestellt. Der rekonstruierte Totalionenstrom (RIC) wies jeweils ein Maximum bei 300 Grad Celsius auf. Dies ist die gerätebedingt vorgegebene Endtemperatur des Heizprogrammes bei EI-Messungen. Thermogravimetrie/Massenspektrometrie-Kopplung zeigt, daß sich bei 320 Grad Celsius ein Pyrolysemaximum unter Freisetzung von Wasser aus aliphatischen OH-Gruppen befindet.¹⁶⁶ In den gezeigten Spektren sind die Monomeren zu erkennen: Coniferylalkohol (G) (Guajacylderivat) mit 180 Dalton sowie Sinapinalkohol (S) mit 210 Dalton.

Cumaralkohol (H) (Hydroxyphenylpropanderivat) mit 150 Dalton ist in diesen beiden Milled-Wood-Ligninen der Buche und der Birke - laut mitgelieferter Analyse - nicht vorhanden. Dies steht im Gegensatz zu den Lignin-Kohlenhydrat-Komplexen der Buche, bei denen um die 10 Prozent H-Derivate gefunden werden (siehe experimenteller Teil), und weiterhin im Gegensatz zur Literatur, in der 4 Prozent genannt werden.¹⁵⁶ Die auftretenden Signale im Bereich von 150 Dalton entsprechen jedoch Fragmenten des Coniferylalkohols (Zuordnung weiter unten). Dieser Sachverhalt wird beim Vergleich der MWLs Rotholz und Pfahlrohr geschildert.

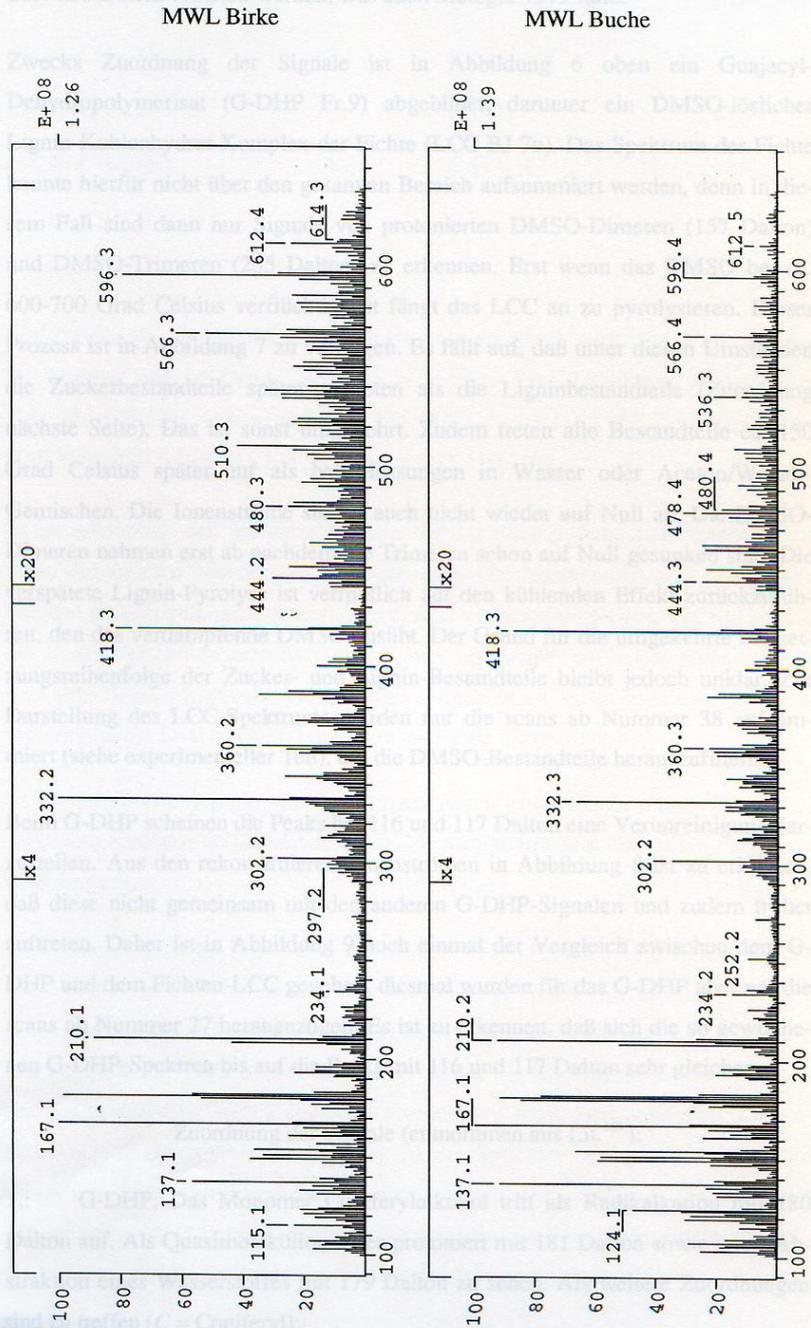
Es sollten weiter zu finden sein:

G+G -2H : 358u	G+S -2H : 388u	S+S -2H : 418u
G+G+G -4H : 536u	G+G+S -4 H : 566u	G+S+S -4H : 596u
S+S+S -4H : 626u		

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß an die Doppelbindungen Wasser addiert sein kann, diese hydriert sein können, durch möglichen Ringschluß 2 weitere Massen abzuziehen sind, andere Moleküle eingebaut sein können und Fragmente höherer Einheiten hinzukommen, wodurch schon bei den Trimeren eine gewisse Unübersichtlichkeit auftritt. Die Spektren entsprechen aber den Erwartungen bezüglich der Struktur, da die gesuchten Massen gefunden werden.

Die auffällige Modulation - im Bereich der höheren Massen - mit einem Abstand von 14 Dalton wird übrigens bei allen massenspektrometrischen Methoden gefunden, sei es Pyrolyse-EI-MS, Pyrolyse-DCI-MS, PD-MS oder MALD-MS.^{167,168}

Abb. 5: Pyrolyse-EI-Spektren der Birke und Buche



Bei allen DCI-Messungen mit Isobutan als Reaktandgas konnten keine Signale über 250 Dalton erhalten werden, was auch Metzger 1979 fand.¹⁶⁹

Zwecks Zuordnung der Signale ist in Abbildung 6 oben ein Guajacyl-Dehydropolymerisat (G-DHP Fr.9) abgebildet, darunter ein DMSO-löslicher Lignin-Kohlenhydrat-Komplex der Fichte (LCC BJ 7n). Das Spektrum der Fichte konnte hierfür nicht über den gesamten Bereich aufsummiert werden, denn in diesem Fall sind dann nur Signale von protonierten DMSO-Dimeren (157 Dalton) und DMSO-Trimeren (235 Dalton) zu erkennen. Erst wenn das DMSO bei ca. 600-700 Grad Celsius verflüchtigt ist fängt das LCC an zu pyrolysieren. Dieser Prozess ist in Abbildung 7 zu verfolgen. Es fällt auf, daß unter diesen Umständen die Zuckerbestandteile später auftreten als die Ligninbestandteile (Zuordnung nächste Seite). Das ist sonst umgekehrt. Zudem treten alle Bestandteile ca. 150 Grad Celsius später auf als bei Messungen in Wasser oder Aceton/Wassergemischen. Die Ionenströme sinken auch nicht wieder auf Null ab. Die DMSO-Dimeren nehmen erst ab nachdem die Trimeren schon auf Null gesunken sind. Die verspätete Lignin-Pyrolyse ist vermutlich auf den kühlenden Effekt zurückzuführen, den das verdampfende DMSO ausübt. Der Grund für die umgekehrte Freisetzungsserienfolge der Zucker- und Lignin-Bestandteile bleibt jedoch unklar. Zur Darstellung des LCC-Spektrums wurden nur die scans ab Nummer 38 aufsummiert (siehe experimenteller Teil), um die DMSO-Bestandteile herauszufiltern.

Beim G-DHP scheinen die Peaks bei 116 und 117 Dalton eine Verunreinigung darzustellen. Aus den rekonstruierten Ionenströmen in Abbildung 8 ist zu erkennen, daß diese nicht gemeinsam mit den anderen G-DHP-Signalen und zudem früher auftreten. Daher ist in Abbildung 9 noch einmal der Vergleich zwischen dem G-DHP und dem Fichten-LCC gegeben, diesmal wurden für das G-DHP aber nur die scans ab Nummer 27 herangezogen. Es ist zu erkennen, daß sich die so gewonnenen G-DHP-Spektren bis auf die Peaks mit 116 und 117 Dalton sehr gleichen.

Zuordnung der Signale (entnommen aus Lit.¹⁶⁹):

1.: G-DHP: Das Monomer Coniferylalkohol tritt als Radikalkation mit 180 Dalton auf. Als Quasimolekülion ist es protoniert mit 181 Dalton sowie unter Abstraktion eines Wasserstoffes mit 179 Dalton zu sehen. Als weitere Zuordnungen sind zu treffen (C = Coniferyl):

$C-CH_2-CH_2-CH_2-OH_2^+$: 183	$C-CH=OH^+$: 153
$C-CH=CH-CH_2-OH_2^+$: 181	$C-CH=CH_2 + H^+$: 151
$C-CH=CH-CH_2-OH^+$: 180	$C-CH_3 + H^+$: 139
$C-CH=CH-CH=OH^+$: 179	$C-CH_2^+$: 137
$C-CH=CH-CHO^+$: 178	$C-H + H^+$: 125
$C-CH=CH-CH_3 + H^+$: 165	C^+	: 123
$C-CH=CH-CH_2^+$: 163		

Die Zuordnung der restlichen Massen ist nicht gesichert. Auffällig ist das Muster im Abstand von 14 Dalton, das sich ja in allen Lignin-Spektren wiederfindet: [181,180,179,178] -14 = [167,166,165,164] -14 = [153,152,151,150] -14 = [139,138,137] -14 = [125,124,123] -14 = [111,110,109]

Es ist erkennbar, daß bei einigen Peaks die Zuordnung nicht mehr eindeutig ist wenn die anderen Monomeren hinzukommen. Die Massen 150 und 151 Dalton könnten ja auch zu einer Cumaryleinheit, falls vorhanden, gehören. Ebenso könnte die Masse 183 Dalton auch Syringylfragment repräsentieren. Je komplexer ein Lignin oder Lignin-Kohlenhydrat-Komplex aufgebaut ist, umso uneindeutiger wird die Zuordnung. Dies erschwert natürlich auch eine Quantifizierung.

2.: LCC: Die Signale, die dem Lignin-Anteil entsprechen, sind - verständlicherweise - ebenso zu sehen wie beim Dehydropolymerisat. Sie fallen insgesamt niedriger aus.

Als zuckerspezifische Peaks sind anzusehen: 103, 113, 114, 115, 127, 133, 144 und 145 Dalton.^{170,171,172,173} Erstere sind den Pentosen zugehörig, letztere den Hexosen. Genaue Strukturvorschläge können nach Pyrolyse-GC/MS getroffen werden. Der Peak mit 163 Dalton kann ein Zucker- sowie ein Ligninfragment sein, entweder $C-CH=CH-CH_2^+$ (s.o.) oder das protonierte Quasimolekülion von 1,6-Anhydro-beta-D-glucopyranose. Auffällig ist die Spur der Masse 119 Dalton, die schon sehr früh auftritt und zudem eine Zehnerpotenz stärker als die restlichen Massenspuren des Lignin-Kohlenhydrat-Komplexes ist. Diese fällt zudem vollständig auf Null zurück. Es handelt sich daher sicher um kein Analytsignal.

Abb. 6: Vergleich der DCI-Spektren eines DHPs und eines LCCs (s.Text)

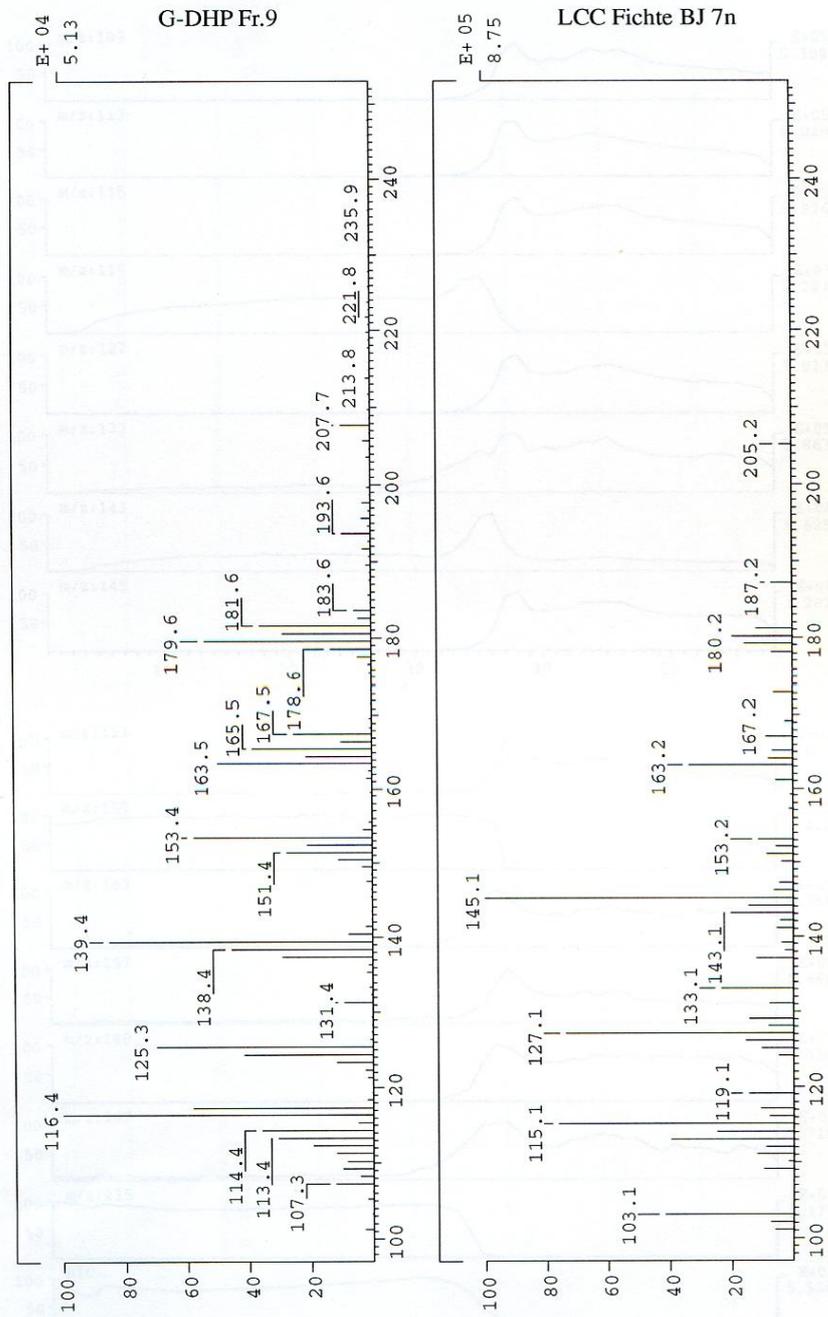


Abb. 7: ausgewählte rekonstruierte Ionenströme des LCC Fichte BJ 7n

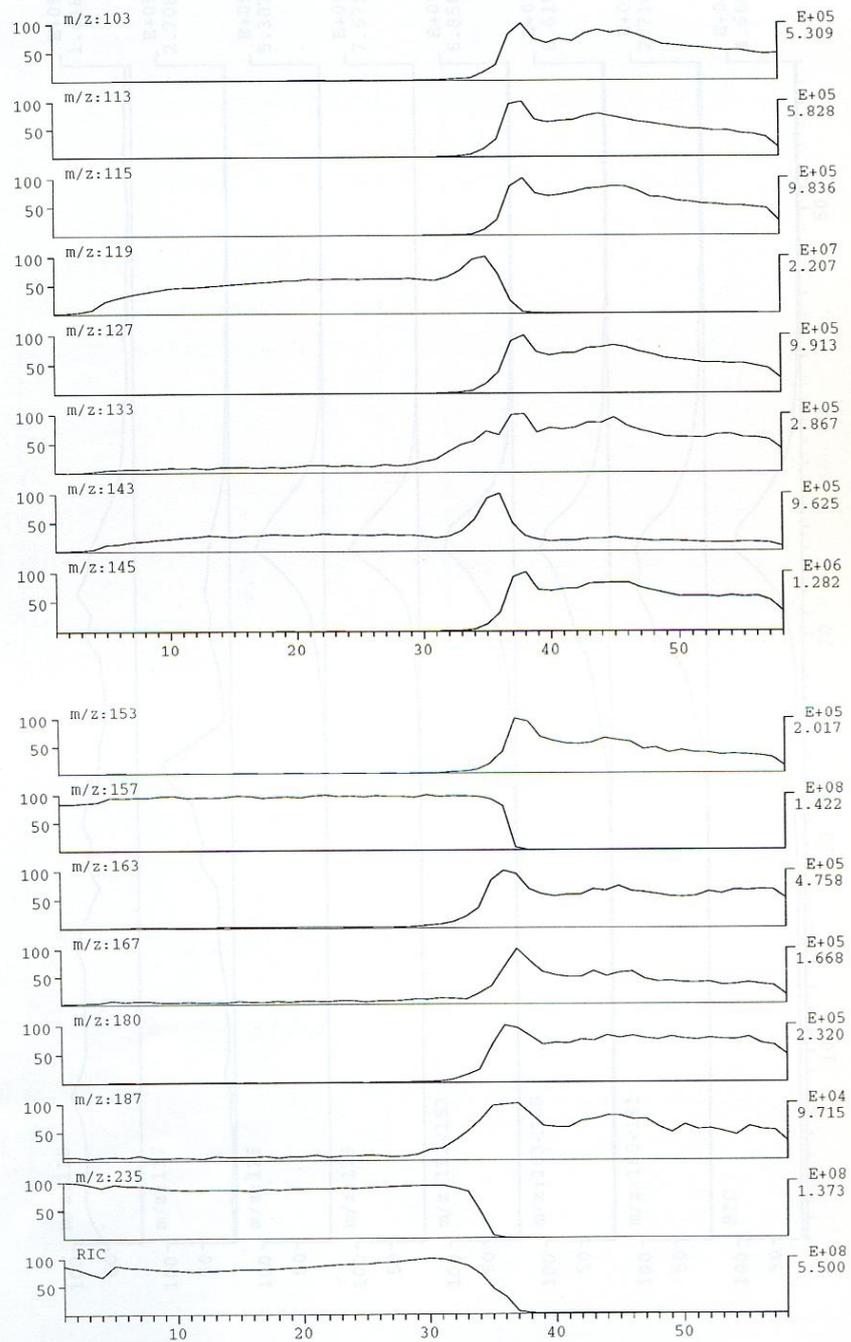


Abb. 8: ausgewählte rekonstruierte Ionenströme des G-DHP Fr.9

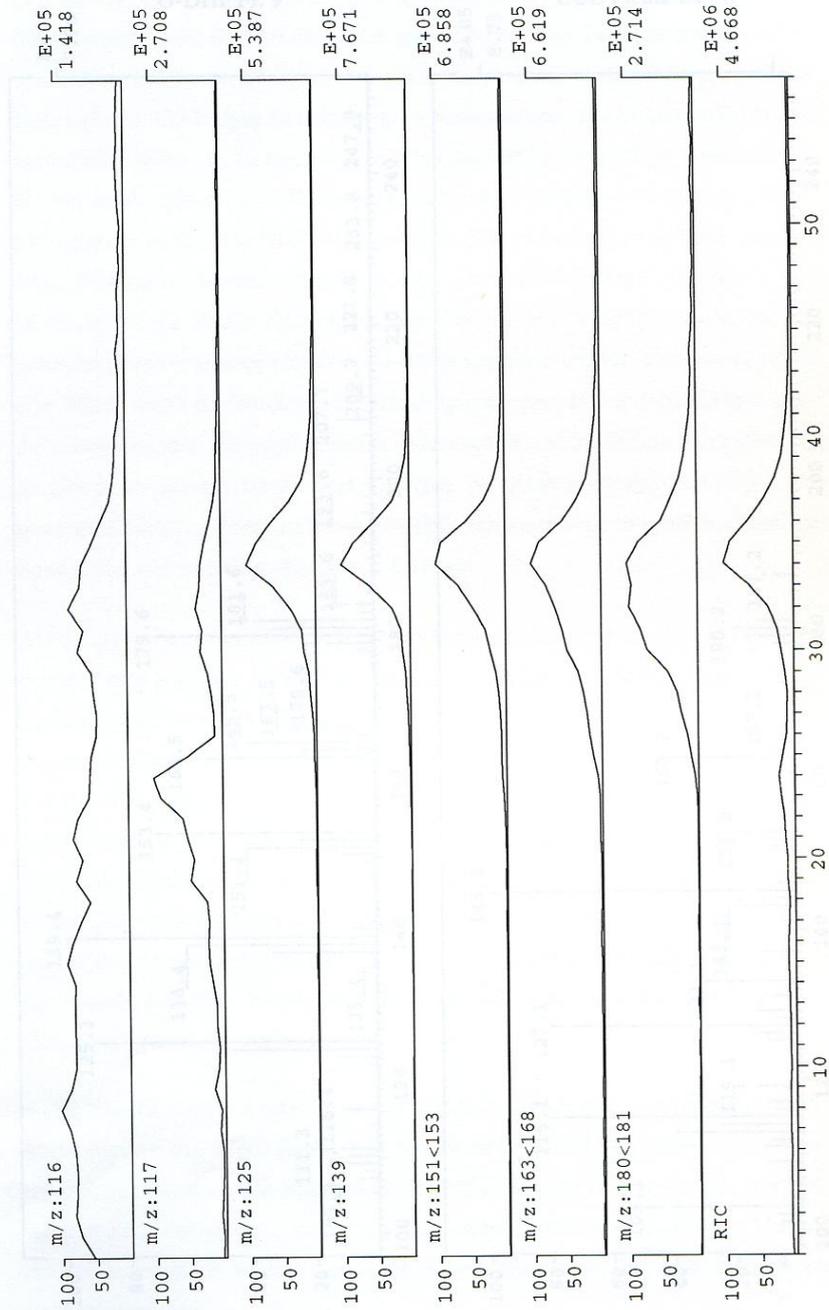
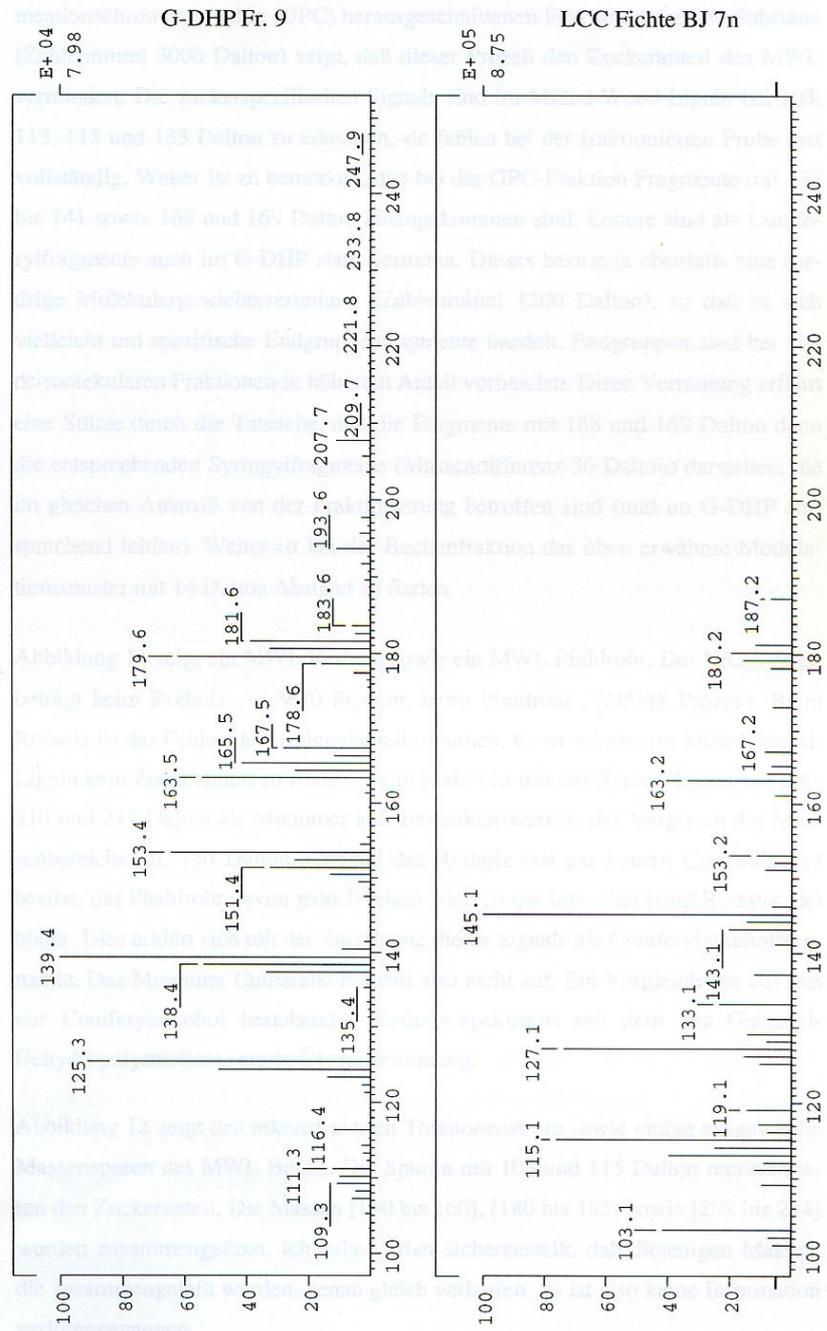


Abb. 9: Vergleich der DCI-Spektren eines DHPs und eines LCCs (s.Text)



Die Gegenüberstellung in Abbildung 10 des MWL Buche mit einer durch Gelpermeationschromatographie (GPC) herausgeschnittenen Fraktion derselben Substanz (Zahlenmittel 3000 Dalton) zeigt, daß dieser Prozeß den Zuckeranteil des MWL vermindert. Die zuckerspezifischen Signale sind im Milled-Wood-Lignin bei 103, 113, 115 und 133 Dalton zu erkennen, sie fehlen bei der fraktionierten Probe fast vollständig. Weiter ist zu bemerken, daß bei der GPC-Fraktion Fragmente mit 138 bis 141 sowie 168 und 169 Dalton hinzugekommen sind. Erstere sind als Coniferylfragmente auch im G-DHP stark vertreten. Dieses besitzt ja ebenfalls eine niedrige Molekulargewichtsverteilung (Zahlenmittel 1200 Dalton), so daß es sich vielleicht um spezifische Endgruppenfragmente handelt. Endgruppen sind bei niedermolekularen Fraktionen in höherem Anteil vorhanden. Diese Vermutung erfährt eine Stütze durch die Tatsache, daß die Fragmente mit 168 und 169 Dalton dann die entsprechenden Syringylfragmente (Massendifferenz 30 Dalton) darstellen, die im gleichen Ausmaß von der Fraktionierung betroffen sind (und im G-DHP entsprechend fehlen). Weiter ist bei der Buchenfraktion das oben erwähnte Modulationsmuster mit 14 Dalton Abstand zu finden.

Abbildung 11 zeigt ein MWL Rotholz sowie ein MWL Pfahlrohr. Der H/G/S-Wert beträgt beim Rotholz <1/99/0 Prozent, beim Pfahlrohr 7/45/48 Prozent. Beim Rotholz ist das Fehlen des Syringylanteils deutlich. Es ist bei diesem Milled-Wood-Lignin kein Zuckeranteil zu finden. Beim Pfahlrohr tritt der Syringylanteil mit 209, 210 und 211 Dalton als Monomer auf. Bemerkenswert ist der Vergleich der Massenbereiche um 150 Dalton. Obwohl das Rotholz fast gar keinen Cumaralkohol besitzt, das Pfahlrohr davon jedoch relativ viel, ist die Intensität beim Rotholz viel höher. Dies erklärt sich mit der Zuordnung dieser Signale als Coniferylalkoholfragmente. Das Monomer Cumaralkohol tritt also nicht auf. Ein Vergleich des aus fast nur Coniferylalkohol bestehenden Rotholz-Spektrums mit dem des Guajacyl-Dehydropolymerisates ergibt Übereinstimmung.

Abbildung 12 zeigt den rekonstruierten Totalionenstrom sowie einige ausgewählte Massenspuren des MWL Buche. Die Spuren mit 103 und 115 Dalton repräsentieren den Zuckeranteil. Die Massen [150 bis 160], [180 bis 185] sowie [208 bis 214] wurden zusammengefasst. Ich habe vorher sichergestellt, daß diejenigen Massen, die zusammengefaßt wurden, genau gleich verlaufen. Es ist also keine Information verlorengegangen.

Es ist hier zu erkennen, daß der Zuckeranteil etwas eher freigesetzt wird als der Ligninanteil. Dies ist auch bei allen weiteren Substanzen - bis auf die in DMSO gelösten Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe - so gefunden worden. Aufgrund der hysteresbedingt limitierten scan-Geschwindigkeit des Magnetsektors ist eine feinere Unterteilung nicht möglich. Die für die Zeichnung interpolierten Kurven stellen tatsächlich diskrete Meß-Punkte dar. Zur Darstellung eines Massenspektrums im üblichen Sinne wählt man den Einzelscan aus, der dem Maximum im rekonstruierten Totalionenstrom entspricht. Wie diese diskrete Skala relativ zum wirklichen, stetigen Freisetzen der Ionen in der Quelle liegt ist insofern "zufällig", als daß die Möglichkeit nicht gegeben ist, sich das Spektrum des tatsächlichen Maximums anzeigen zu lassen. Kennt man die interessierenden Massen, so ist es möglich diese im "multiple-ion-detection"-Modus (MID) einzeln nacheinander anzuspringen. Üblicherweise wird der gesamte Massenbereich von 43 bis 1100 Dalton periodisch durchgescant. Bei Beschränkung auf wenige Ionen trifft man diese häufiger und die Anzahl der (reduzierten) Einzelspektren wird entsprechend größer. Da die Ionenstromkurve dann aus erheblich mehr diskreten Punkten zusammengesetzt ist kann man das tatsächliche Maximum des Ionenstromes viel besser treffen. Dies bedeutet, daß die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Messungen viel höher ist. Dann sollte eine Quantifizierung erleichtert sein. Für diese wäre es jedoch zusätzlich nötig spezifische Peaks für den Cumaralkoholanteil zu kennen. Durch Erfassen auch des niedrigeren Massenbereiches sind solche Fragmente unter Verwendung der linked-scan-Technik wahrscheinlich zu finden. Diese Meßmethode gehört als computergestützte Prozedur zum Inventar der Gerätesteuerung des Finnigan MAT 95, so daß deren Verwendung keinen erheblichen Aufwand darstellt. Auch die anschließende Quantifizierung wird dabei durch eine spezielle, mitgelieferte Software ermöglicht.

Wie sehr die relativen Intensitäten zwischen den einzelnen Scans schwanken, sei in Abbildung 13 gezeigt. Zu der Ionenstromkurve des DCI-Spektrums der Buche in Abbildung 12 sind hier die dazugehörigen Scans 30, 31, 32 und 33 zu sehen. Gut zu erkennen ist die Variation der Massen 103 und 115. Diese nehmen sehr schnell ab, was ja auch aus dem relativ steiflankigen Abfall der rekonstruierten Ionenströme dieser Massen zu entnehmen ist.

Abb. 10: Vergleich MWL Buche und MWL Buche Fr. 11

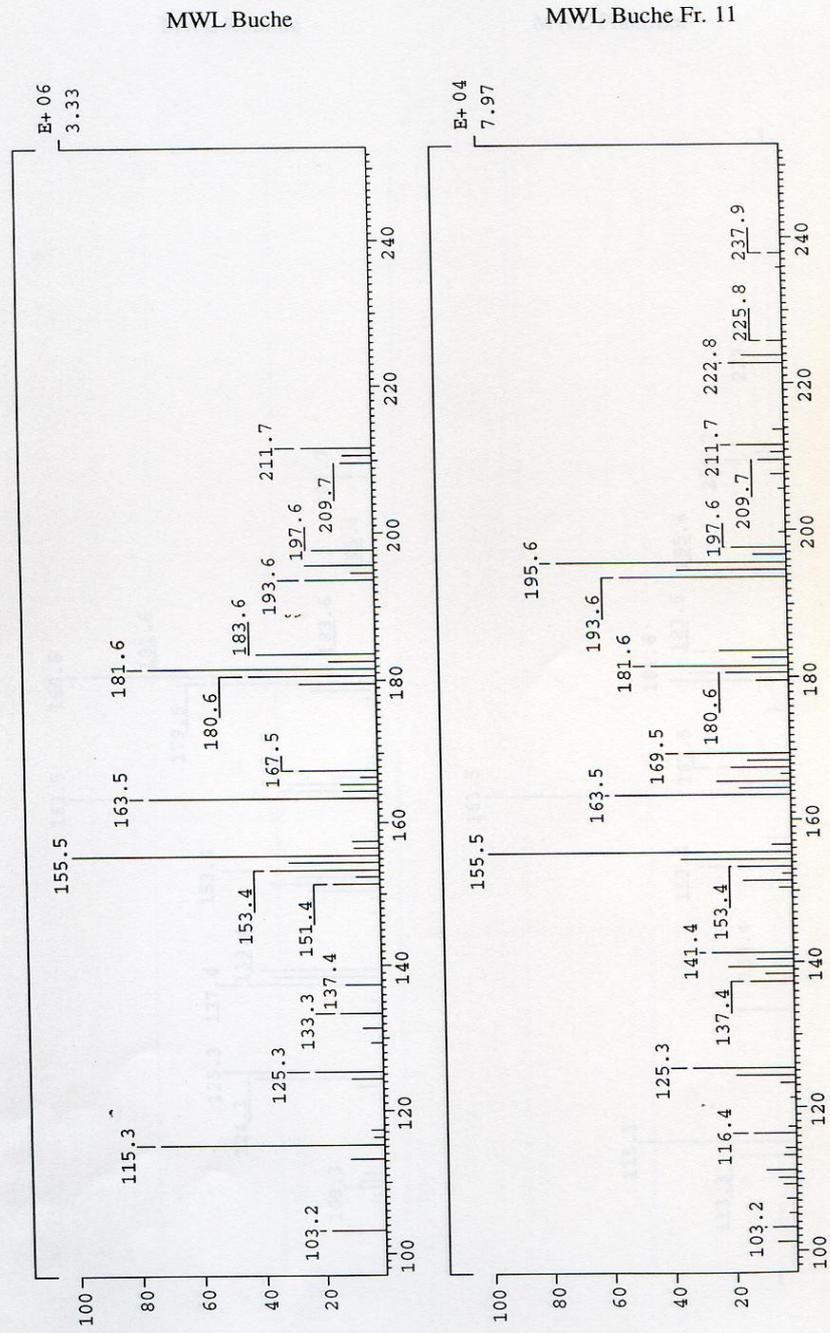


Abb. 11: DCI-Spektren von MWL Rotholz und MWL Pfahlrohr

MWL Rotholz

MWL Pfahlrohr

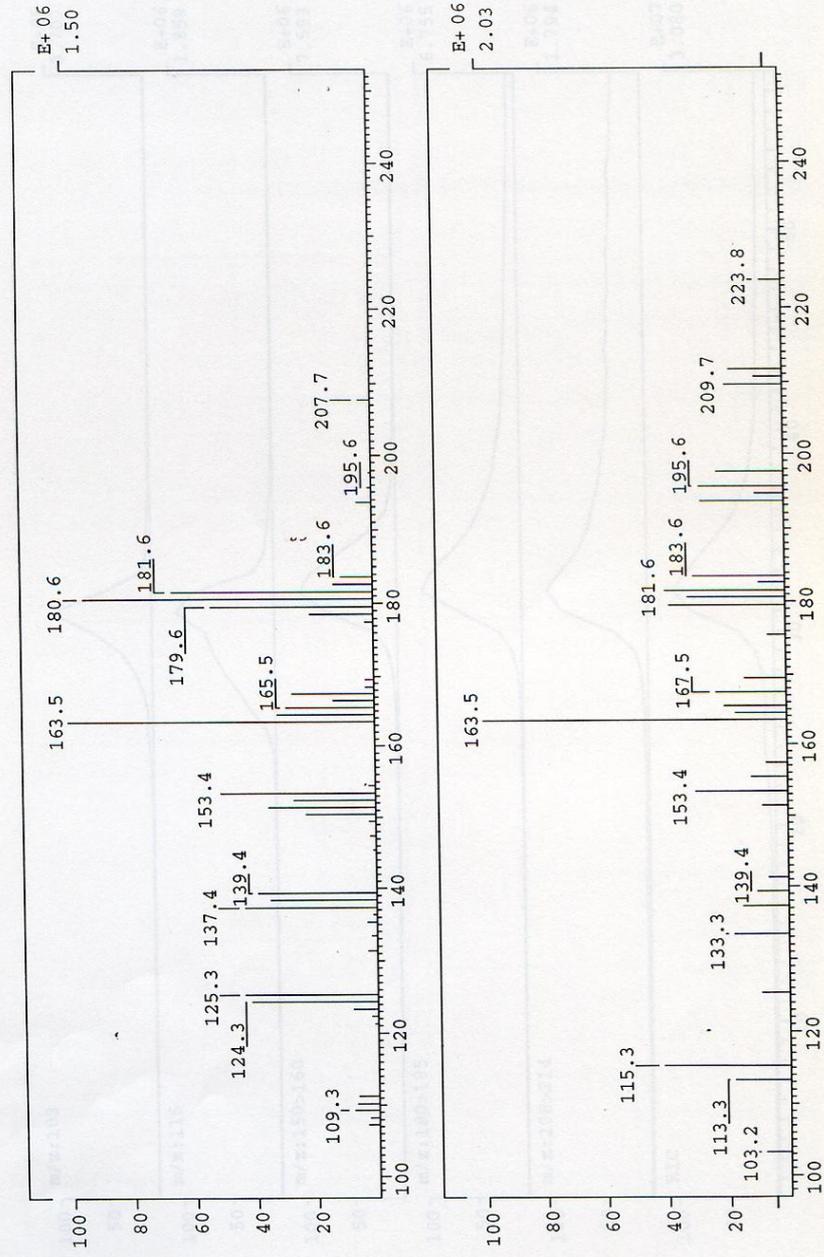


Abb. 12: ausgewählte rekonstruierte Ionenströme des MWL Buche

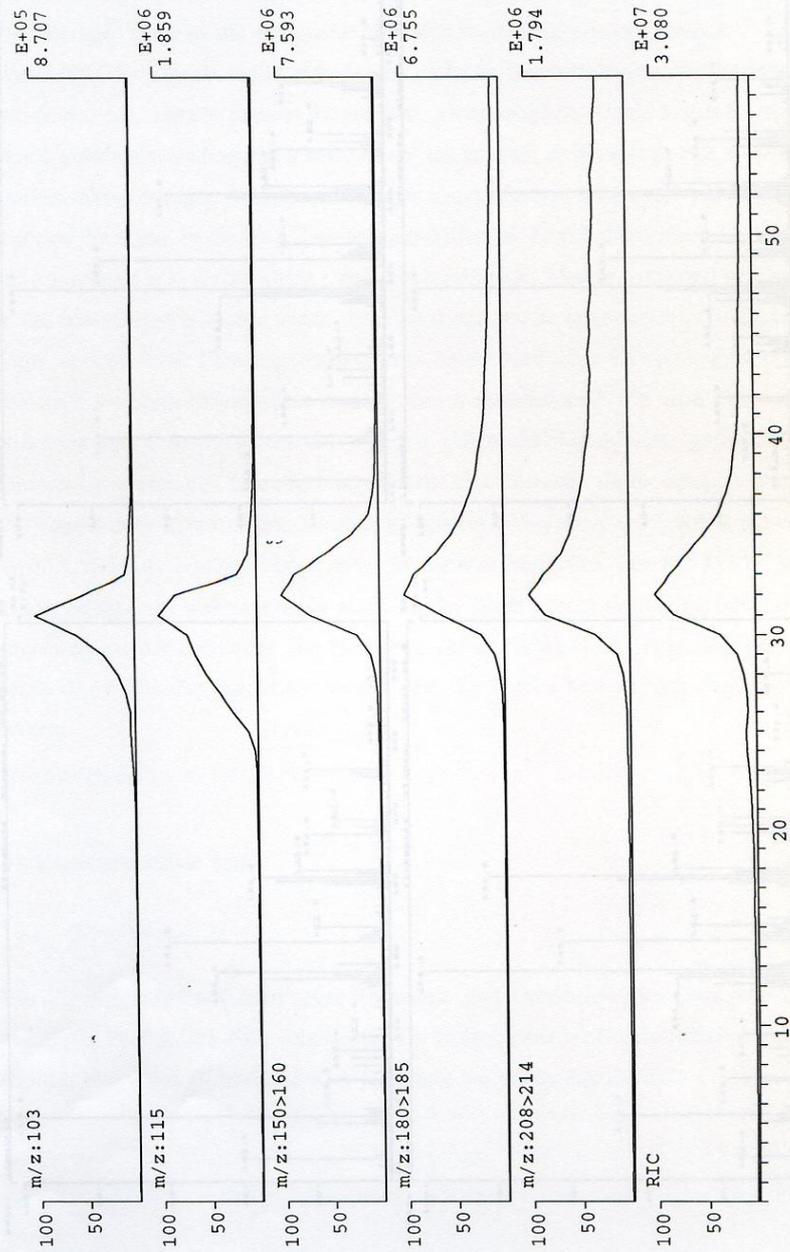
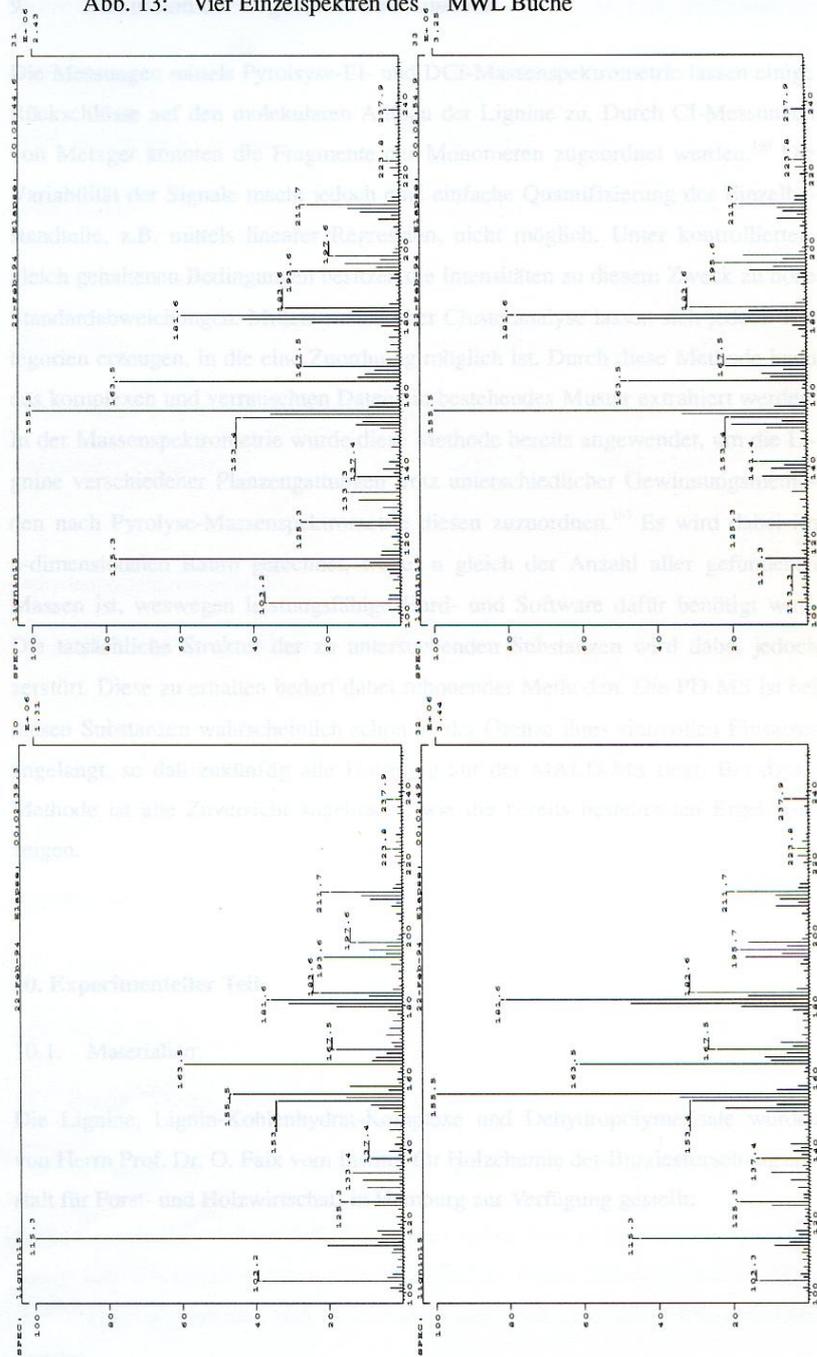


Abb. 13: Vier Einzelspektren des MWL Buche



9. Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Die Messungen mittels Pyrolyse-EI- und DCI-Massenspektrometrie lassen einige Rückschlüsse auf den molekularen Aufbau der Lignine zu. Durch CI-Messungen von Metzger konnten die Fragmente der Monomeren zugeordnet werden.¹⁶⁹ Die Variabilität der Signale macht jedoch eine einfache Quantifizierung der Einzelbestandteile, z.B. mittels linearer Regression, nicht möglich. Unter kontrollierten, gleich gehaltenen Bedingungen besitzen die Intensitäten zu diesem Zweck zu hohe Standardabweichungen. Mittels statistischer Clusteranalyse lassen sich jedoch Kategorien erzeugen, in die eine Zuordnung möglich ist. Durch diese Methode kann aus komplexen und verrauschten Daten ein bestehendes Muster extrahiert werden. In der Massenspektrometrie wurde diese Methode bereits angewendet, um die Lignine verschiedener Pflanzengattungen trotz unterschiedlicher Gewinnungsmethoden nach Pyrolyse-Massenspektrometrie diesen zuzuordnen.¹⁶⁷ Es wird dabei im n-dimensionalen Raum gerechnet, wobei n gleich der Anzahl aller gefundenen Massen ist, weswegen leistungsfähige Hard- und Software dafür benötigt wird. Die tatsächliche Struktur der zu untersuchenden Substanzen wird dabei jedoch zerstört. Diese zu erhalten bedarf dabei schonender Methoden. Die PD-MS ist bei diesen Substanzen wahrscheinlich schon an der Grenze ihres sinnvollen Einsatzes angelangt, so daß zukünftig alle Hoffnung auf der MALD-MS liegt. Bei dieser Methode ist alle Zuversicht angebracht, wie die bereits bestehenden Ergebnisse zeigen.

10. Experimenteller Teil

10.1. Materialien:

Die Lignine, Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe und Dehydropolymerisate wurden von Herrn Prof. Dr. O. Faix vom Institut für Holzchemie der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft in Hamburg zur Verfügung gestellt:

Es ist festzustellen, daß die H/G/S-Werte zwischen dem Milled-Wood-Lignin der Buche und dem Lignin-Kohlenhydrat-Komplex der Buche stark voneinander differieren. Das "n" bedeutet, daß diese Substanzen direkt aus dem Holz extrahiert wurden.

Milled-Wood-Lignine (MWLs):	H/G/S [%]	M _n / M _w in Dalton
MWL Buche:	0/33/67	4830 / 14010
MWL Buche nach Literatur ¹⁵⁶ :	4/56/40	
MWL Birke:	0/32/68	2600 / 9700
MWL Chinesisches Rotholz:	<1/99/0	2400 / 7800
MWL Pfahlrohr:	7/45/48	2100 / 6100
MWL Buche, gelpermeationschromatographisch fraktioniert, Fraktion 11:	0/33/67	2495 / 2817

Dehydropolymerisate (DHPs):

Guajacyl-Dehydropolymerisate, gelpermeationschromatographisch fraktioniert, Fraktionen 8 und 9:

G-DHP 8:	0/100/0	1220 / 1470
G-DHP 9:	0/100/0	900 / 1120

Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe (LCCs):

LCC Fichte, WE-7n:	11 % Lignin	14/77/9	4100 / 17500
LCC Fichte, BJ-7n:	32 % Lignin	11/85/4	7000 / 23300
LCC Buche, WE-8n:	11 % Lignin	20/44/36	3600 / 15100
LCC Buche, BJ-8n:	22 % Lignin	9/39/52	5900 / 20100

Es ist festzustellen, daß die H/G/S-Werte zwischen dem Milled-Wood-Lignin der Buche und dem Lignin-Kohlenhydrat-Komplex der Buche stark voneinander differieren. Das "n" bedeutet, daß diese Substanzen direkt aus dem Holz extrahiert wurden.

Die eingesetzten Matrices stammen von der Firma Aldrich. Diese wurden für die PD-MS-Messungen nicht weiter behandelt, für die MALD-MS-Messungen durch Umkristallisation bzw. Vakuumsublimation gereinigt, bis auf den flüssigen 2-Nitrophenyloctylether, der unbehandelt zum Einsatz kam.

Das N,N'-Bis-(2-Aminoethyl)-ethan-1,2-diamin wurde von Herrn Dipl.-Chem. K. Töllner vom Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, in Mülheim an der Ruhr, erhalten.

Das Wasser wurde bidestilliert. Aceton "zur UV-Spektroskopie" (Baker). Dimethylsulfoxid "zur Spektroskopie" (E. Merck).

Die aluminiumbeschichtete Polyethylenterephthalatfolie wurde von der Firma Goodfellow bezogen.

10.2. Massenspektrometer:

Doppelfokussierendes Sektorfeldmassenspektrometer Finnigan MAT 95, ausgerüstet mit einer DEC-Workstation unter Verwendung der ICIS-Auswertesoftware dieses Herstellers.

Laserdesorptionsmassenspektrometer:

Finnigan VISION 2000, mit einem IBM-kompatiblen 486er PC unter Verwendung der dazugehörigen Ulyssis-Auswertesoftware, Shimadzu Kratos Kompakt MALDI III, mit einer SUN-Workstation unter Verwendung der dazugehörigen OPUS-Auswertesoftware.

Das Plasmadesorptionsflugzeitmassenspektrometer OLDA1 ist von Prof. Dr. K. Wien an der Technischen Hochschule Darmstadt gebaut worden. Die Datenerfassung wird von einem IBM-kompatiblen 286er PC übernommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm "Technische Hochschule Darmstadt Massenanalyse (THD)" und dem Peaksuchalgorithmus "PEAKS" von Prof. Dr. E. Hilf in Oldenburg.

10.3. Probenpräparation und Vermessung:

a) PD-MS: Die Matrices wurden in demselben Lösungsmittel wie die Analyten gelöst, bei dem Cyclodextrin, den MWLs und den DHPs war dies Aceton/Wasser, 9:1. Die wasserlöslichen Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe ("WE"-LCCs) wurden in Wasser gelöst, die nach der Methode von Björkmann gewonnenen ("BJ"-LCCs) in Dimethylsulfoxid. Die Lösungen wurden einzeln unter Ultraschallbehandlung hergestellt und dann ebenso vorgemischt. Das Aufsprühen der Lösungen erfolgte durch eine selbstgebaute pneumatische Sprühapparatur mittels Stickstoff auf die aluminiumbeschichtete Seite der Polyethylenterephthalat-Folie. Nun folgt eine Aufstellung der durchgeführten Messungen:

Analyt	Matrix	M. A.		Verh.	U _b	Dauer
		Menge				
MWL Fr.11	3-AQ	10ug	1ug	10:1	7	10min
MWL Fr.11	3-AQ	5ug	100ng	50:1	14	3h +Ag
MWL Fr.11	CD	10ug	200ng	50:1	12	2h
MWL Fr.11	Alizarin	6 ug	2,4ug	2,5:1	14	19h
MWL Fr.11	Coffein	40ug	400ng	100:1	16	1,5h
MWL Fr.11	Coffein	25ug	500ng	50:1	14	2,25h
MWL Fr.11	Methylrot	10ug	5ug	2:1	14	30min
MWL Fr.11	Sudanrot 7B	20ug	200ng	100:1	14	1h
MWL Fr.11	Fluorescein	10ug	25ng	400:1	18	45min +DS.
MWL Fr.11	Fluorescein	10ug	25ng	400:1	18	45min -DS
MWL Fr.11	Fluorescein	5ug	25ng	200:1	18	45min +DS
MWL Fr.11	Fluorescein	5ug	25ng	200:1	18	45min -DS
MWL Fr.11	Fluorescein	5ug	50ng	100:1	18	45min +DS
MWL Fr.11	Fluorescein	5ug	100ng	50:1	18	45min +DS
MWL Fr.11	Fluorescein	1ug	50ng	20:1	18	45min +DS
MWL Fr.11	Fluorescein	10ug	1ug	10:1	14	90min -DS
MWL Fr.11	Fluorescein	20ug	10ug	2:1	14	1h -DS
MWL Birke	2,5-DHBS	1ug	50ng	20:1	14	1h

MWL Pf.	QL	1ug	250ng	4:1	11	10min	
MWL Pf.	Alizarin	250ng	250ng	1:1	12	15min	
G-DHP 9	2-AT	4ug	200ng	20:1	12	1,75h	+CD
G-DHP 9	CD	10ug	1ug	10:1	13	2h	
G-DHP 9	3-AQ	21ug	8ug	2,6:1	8	90min	
G-DHP 9	QL	5ug	2,5ug	2:1	8	90min	
G-DHP 9	2-AT	4ug	250ng	100:1	14	2h	+Ag'
G-DHP 9	AA	20ug	2ug	10:1	16	1,75h	
G-DHP 9	5-CLS	20ug	500ng	40:1	11	45min	
G-DHP 9	NDA	10ug	100ng	100:1	14	3,5h	

Hierbei bedeuten: NDA = Nitosodimethylanilin, 5-CLS = 5-Chlorsalicylsäure, +Ag = mit 5 ug Silbertrifluoracetat, +Ag' = mit 17 ng Silbertrifluoracetat, MWL Pf. = MWL Pfahrohr, QL = Chinalizarin, 2-AT = 2-Aminothiazol, AA = N,N'-Bis-(2-Aminoethyl)-ethan-1,2-diamin, 3-AQ = 3-Aminochinolin, +/- DS = Deckschicht 100 ng Fluorescein, CD = alpha-Cyclodextrin

c) Pyrolyse-Massenspektrometrie

b) MALD-MS: Die Lösungen der Analyten bzw. Matrices waren dieselben wie bei der PD-MS angegeben. Es kamen zusätzlich noch Lösungen in Acetonitril/Wasser, 2:1 hinzu. Die Präparation erfolgte durch 3 verschiedenen Methoden:

- 1.: Vormischen der Lösungen und Auftropfen, trocknen lassen an der Luft.
- 2.: Methode nach Beavis, wie im theoretischen Teil sowie nachfolgend beschrieben.
- 3.: Getrenntes Auftragen, erst die Matrix, trocknen lassen, dann der Analyt.

Am Shimadzu Kratos Kompakt MALDI III wurden 79 Substanzgemische untersucht, unter Veränderung der Laserleistung, linear/reflektiert-Modus, Polarität, Schußzahl (bis 1000), gleichmäßiges abrastern oder akkumulieren von einer Stelle, wodurch ungefähr zweihundert Spektren erhalten wurden. Auf jedem einzelnen Probenschlitten befand sich Insulin (5732 Dalton) zur Eichung. Es wurde auch

eine 20-stufige Konzentrationsreihe mit dem DHBS-Gemisch und MWL Birke vermessen, sowie einige andere Matrices ausprobiert. Unter den getesteten Matrices befanden sich: 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 2-Hydroxy,5-methoxybenzoesäure, ein Gemisch derselben (9:1), 5-Chlorsalicylsäure, Ferulasäure, Sinapinsäure, 2-Nitrophenyloctylether, Kaffeesäure, Coffein und Chinin.

Am VISION 2000 wurde MWL Birke, unter Verwendung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure/2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (9:1) bei 337 nm vermessen. Die Auftragemethode erfolgte nach Beavis (s.o.) : Von einer 10 g/L Lösung der Matrix-Mischung in Acetonitril/Wasser, 2:1, wurden 10 uL vorgelegt, getrocknet und verrieben. Darauf wurden 10 uL eines 1:1-Gemisches der Matrix-Lösung und der Analyt-Lösung MWL Birke 0,1 g/L in Aceton/Wasser, 9:1, gegeben. Das Gesamt-Matrix/Analyt-Verhältnis betrug 300:1, bei 150 bzw 0,5 ug Beladung. Es wurden noch 10 weitere Messungen an diesem Gerät angefertigt, unter Verwendung der oben genannten Matrices. Das VISION 2000 arbeitet ausschließlich im Reflekttron-Betrieb. Es wurde hier nur mit einer Beschleunigungsspannung von + 20 kV gemessen.

c) Pyrolyse-Massenspektrometrie:

Von den Milled-Wood-Ligninen Birke und Buche wurden EI-Massenspektren aufgenommen. Quelltemperatur: 130 Grad Celsius, 70 eV, Temperaturprogramm des Heizfadens: 5 min; 20-300 Grad Celsius.

Die DCI-Messungen erfolgten bei 50 Grad Celsius Quelltemperatur, die jedoch ständig um einige Grad variierte. Der Probenfaden wurde innerhalb von 5 min von 20 auf 1200 Grad Celsius erhitzt. Als Reaktandgas wurde Isobutan bei 70 eV eingesetzt. Die Rohdaten aller DCI-Spektren wurden überarbeitet, da zu Beginn der Messungen festgestellt wurde, daß die Peakintensitäten schwanken. Daher wurden alle Einzelspektren akkumuliert. Mittels des "AVERAGE"-Programmes der ICIS-Auswertesoftware wurden nur die Peaks aufsummiert, die in mindestens 3 Einzelspektren vorhanden sind. Des weiteren wurden nur diejenigen Peaks aus einem Einzelspektrum herangezogen, deren Intensität mindestens 5 % des Base-Peaks ausmachte. Durch umfangreiche Testreihen habe ich sichergestellt, daß dadurch keine relevante spektrale Information verlorengeht. Der Haupteffekt dieses Mittels besteht in der Integration der Massenspuren, so daß die

Intensitätsschwankungen eines einzelnen wiedergegebenen Spektrums (was für die visuelle Darstellung notwendig ist) vermindert werden. Beim G-DHP Fr.9 und LCC BJ-7n wurde erst ab einer bestimmten scan-Zahl mit der Integration begonnen, um (zeitlich früher auftretende) Kontaminationen bzw. Lösungsmittelpicks herauszufiltern (siehe dort).

- ¹ P. Roepstoß, *Trends Anal. Chem.* 1993, 12, 413-421
- ² K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, *Anal. Chem.* 1994, 66, 464-470
- ³ J. W. Metzger, *Angew. Chem.* 1994, 106, 763-765
- ⁴ M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, *Angew. Chem.* 1989, 101, 805-806
- ⁵ R. W. Nelson, M. J. Rainbow, D. E. Lohr, P. Williams, *Science* 1989, 246, 1585-1587
- ⁶ L. M. Smith, *Science* 1993, 262, 530-531
- ⁷ I. V. Bletsos, D. M. Hercules, D. van Leyen, B. Hagarhoff, B. Niehuis, A. Benninghoven, *Anal. Chem.* 1991, 63, 1953-1960
- ⁸ K. J. Wu, A. Steding, C. H. Becker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993, 7, 142-146
- ⁹ G. Krüger, *Chemie in unserer Zeit* 1976, 10, 21-29
- ¹⁰ R. J. Cotter, *Anal. Chem.* 1984, 56, 485A-493A
- ¹¹ N. Winograd, *Anal. Chem.* 1983, 55, 622A-626A
- ¹² P. R. Krueger, K. Wien, *Z. Naturforsch. A* 1978, 33A, 638-643
- ¹³ R. T. McIver Jr., Y. Li, R. L. Homer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994, 8, 237-241
- ¹⁴ G. D. Davies, *Acc. Chem. Res.* 1979, 12, 359-365
- ¹⁵ C. Bruné, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics* 1982, 45, 51-86
- ¹⁶ B. U. R. Sundqvist, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1992, 118/119, 265-287
- ¹⁷ R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, *Science* 1976, 191, 920-925
- ¹⁸ R. D. Macfarlane, *Acc. Chem. Res.* 1982, 15, 268-275
- ¹⁹ M. Predoi, U. Kynast, C. Ronda, *Chemie in unserer Zeit* 1994, 28, 36-43
- ²⁰ R. D. Macfarlane in: *Soft Ionization Biological Mass Spectrometry*, Edg. H. R. Morris, Proceedings Of The Chemical Society Symposium On Advances In

11. Literaturverzeichnis

- ¹ P. Roepstorff, *Trends Anal. Chem.* **1993**, 12, 413-421
- ² K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 464-470
- ³ J. W. Metzger, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 763-765
- ⁴ M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 805-806
- ⁵ R. W. Nelson, M. J. Rainbow, D. E. Lohr, P. Williams, *Science* **1989**, 246, 1585-1587
- ⁶ L. M. Smith, *Science* **1993**, 262, 530-531
- ⁷ I. V. Bletsos, D. M. Hercules, D. van Leyen, B. Hagenhoff, E. Niehuis, A. Benninghoven, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1953-1960
- ⁸ K. J. Wu, A. Steding, C. H. Becker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 142-146
- ⁹ G. Krüger, *Chemie in unserer Zeit* **1976**, 10, 21-29
- ¹⁰ R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 485A-493A
- ¹¹ N. Winograd, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 622A-629A
- ¹² F. R. Krueger, K. Wien, *Z. Naturforsch. A* **1978**, 33A, 638-643
- ¹³ R. T. McIver Jr., Y. Li, R. L. Hunter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 3, 237-241
- ¹⁴ G. D. Daves, *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 359-365
- ¹⁵ C. Brunée, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics* **1982**, 45, 51-86
- ¹⁶ B. U. R. Sundqvist, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1992**, 118/119, 265-287
- ¹⁷ R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, *Science* **1976**, 191, 920-925
- ¹⁸ R. D. Macfarlane, *Acc. Chem. Res.* **1982**, 15, 268-275
- ¹⁹ M. Bredol, U. Kynast, C. Ronda, *Chemie in unserer Zeit* **1994**, 28, 36-43
- ²⁰ R. D. Macfarlane in: *Soft Ionization Biological Mass Spectrometry*, Hrsg. H. R. Morris, Proceedings Of The Chemical Society Symposium On Advances In

- Mass Spectrometry Soft Ionization Methods, Heyden & Son Ltd, London 1981, 1. Auflage, 110-119
- ²¹ D. Fenyő, B. U. R. Sundqvist, B. R. Karlsson, R. E. Johnson, *Phys. Rev. B* **1990**, 42, 1895-1902
- ²² Y. Le Beyec, S. Della-Negra in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, Hrsg. E. R. Hilf, W. Tuszynski, World Scientific, Singapore 1990, 1. Auflage, Band 3, 73-81
- ²³ S. Harsdorf, E. R. Hilf, B. Nitzschmann, W. Schlez, J. Tomaszewski, K. Vogt, P. Wagner in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, 1. Auflage, Band 3, 164-174
- ²⁴ E. R. Hilf, H. F. Kammer, B. Nitzschmann in: *Ion Formation from Organic Solids*, Mass Spectrometry of Involatile Material, Proceedings of the Fourth International Conference, Münster, Federal Republic of Germany, September 21-23, 1987, Hrsg. A. Benninghoven, John Wiley & Sons Ltd, Chichester 1989, 1. Auflage, Band IV, 97-100
- ²⁵ R. E. Johnson, B. U. R. Sundqvist, A. Hedin, D. Fenyő, *Phys. Rev. B*, **1989**, 40, 49-53
- ²⁶ E. R. Hilf, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, 126, 25-36
- ²⁷ P. K. Haff, *Appl. Phys. Lett.* **1976**, 29, 473-475
- ²⁸ P. D. Mudgett, R. D. Macfarlane in : *Ion Formation from Organic Solids*, Hrsg. A. Hedin, B. U. R. Sundqvist, A. Benninghoven, John Wiley & Sons Ltd, Chichester 1990, 1. Auflage, Band V, 11-15
- ²⁹ P. Williams, B. U. R. Sundqvist, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, 58, 1031-1034
- ³⁰ H. F. Kammer, E. R. Hilf in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band V, 197-203
- ³¹ R. E. Johnson, B. U. R. Sundqvist, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics* **1983**, 53, 337-339
- ³² R. E. Johnson, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, 78, 357-392
- ³³ R. D. Macfarlane, D. L. Jacobs in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 71-80
- ³⁴ D. Fenyő, A. Hedin, P. Hakansson, R. E. Johnson, B. U. R. Sundqvist in: *Ion Formation From Organic Solids*, 1. Auflage, Band V, 33-38
- ³⁵ P. D. Mudgett, R. D. Macfarlane in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band V, 11-15

- ³⁶ P. Demirev, D. Fenyő, P. Hakansson, B. U. R. Sundqvist, *Organic Mass Spectrom.* **1991**, 26, 471-475
- ³⁷ R. J. Cotter, *Trends Anal. Chem.* **1982**, 13, 307-310
- ³⁸ K. L. Busch, S. E. Unger, A. Vincze, R. G. Cooks, T. Keough, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1507-1511
- ³⁹ L. Baczynskyj, G. E. Bronson, *Biomed. Env. Mass Spectrom.* **1988**, 16, 253-254
- ⁴⁰ M. VanStipdonk, M. A. Park, E. A. Schweikert, P. Sylvester, A. Clearfield, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, 128, 133-141
- ⁴¹ L. Schmidt, H. Jungclas in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 91-95
- ⁴² E. R. Hilf, W. Tuszynski, B. Curdes, J. Curdes, M. Wagner, K. Wien, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, 126, 101-114
- ⁴³ B. U. R. Sundqvist, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, 126, 1-9
- ⁴⁴ A. Hedin, P. Hakansson, M. Salehpour, B. U. R. Sundqvist, *Phys. Rev. B* **1987**, 35, 7377-7381
- ⁴⁵ J. K. Nørskov, B. I. Lundqvist, *Phys. Rev. B* **1979**, 19, 5661-5665
- ⁴⁶ P. Williams, G. Gillen in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 15-21
- ⁴⁷ M. Takayama, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 309-312
- ⁴⁸ W.-D. Lehmann, H.-R. Schulten, *Chemie in unserer Zeit* **1976**, 10, 163-174
- ⁴⁹ F. Hillenkamp, E. Unsold, R. Kaufmann, R. Nitsche, *Nature* **1975**, 256 119-120
- ⁵⁰ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, 78, 53-68
- ⁵¹ K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151-153
- ⁵² F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1193A-1203A
- ⁵³ M. Karas, F. Hillenkamp in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, 1. Auflage, Band 3, 103- 113
- ⁵⁴ P. Williams in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band V, 131-135
- ⁵⁵ H. T. Grahn, H. J. Maris, J. Tauc, *IEEE Journal Of Quantum Electronics* **1989**, 25, 2562-2569

- ⁵⁶ K. S. Suslick, *Spektrum der Wissenschaft* **1989**, 4, 60-66
- ⁵⁷ V. Misik, P. Riesz, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 1643-1640
- ⁵⁸ J. F. Banks Jr., S. Shen, C. G. Whitehouse, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 406-414
- ⁵⁹ E. R. Hilf, persönliche Mitteilung
- ⁶⁰ B. U. R. Sundqvist, *Analytica Chimica Acta* **1991**, 247, 265-275
- ⁶¹ B. Lindner, U. Seydel, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 895-899
- ⁶² B. Lindner, U. Seydel in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 109-113
- ⁶³ A. Vertes, G. Irinyi, R. Gijbels, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2389-2393
- ⁶⁴ A. Vertes, R. Gijbels, R. D. Levine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1990**, 4, 228-233
- ⁶⁵ P. Demirev, A. Westman, C. T. Reimann, P. Hakansson, B. U. R. Sundqvist, Y. D. Cheng, W. Seibt, K. Siegbahn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 187-191
- ⁶⁶ M. R. Chevrier, R. J. Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, 5, 611-617
- ⁶⁷ G. J. Q. van der Peyl, K. Isa, J. Haverkamp, P. G. Kistemaker, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics* **1983**, 47, 11-14
- ⁶⁸ S. M. Avanesyan, V. E. Gusev, *Sov. J. Quantum. Electron.* **1986**, 16, 812-817
- ⁶⁹ V. E. Gusev, L. N. Makarova, *Sov. Phys. Acoust.* **1992**, 38, 377-381
- ⁷⁰ C. Thomsen, H. T. Grahn, H. J. Maris, J. Tauc, *Phys. Rev. B* **1986**, 34, 4129-4138
- ⁷¹ C. D. Mowry, M. V. Johnston, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 569-575
- ⁷² K. Riahi, G. Bolbach, A. Brunot, F. Breton, M. Spiro, J.-C. Blais, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 242-247
- ⁷³ A. P. Quist, T. Huth-Fehre, B. U. R. Sundqvist, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 149-154
- ⁷⁴ B. U. R. Sundqvist, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, im Druck
- ⁷⁵ H. Struyf, W. Van Roy, L. Van Vaeck, R. Van Grieken, P. Caravatti, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 32-39
- ⁷⁶ R. C. Beavis, B. T. Chait, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, 181, 479-484
- ⁷⁷ J. Sunner in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band V, 175-180

- ⁷⁸ J.-Y. Zhang, D. S. Nagra, L. Li, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2812-2818
- ⁷⁹ J. Zhou, W. Ens, K. G. Standing, A. Verentchikov, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 671-678
- ⁸⁰ B. Spengler, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 793-796
- ⁸¹ R. C. Beavis, J. Lindner, J. Grotemeyer, E. W. Schlag, *Z. Naturforsch. A* **1988**, 43, 1083-1090
- ⁸² H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, *Organic Mass Spectrom.* **1992**, 27, 472-480
- ⁸³ M. Karas, F. Hillenkamp in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 103-107
- ⁸⁴ T.-W. D. Chan, A. W. Colburn, P. Derrick, *Organic Mass Spectrom.* **1991**, 26, 342-344
- ⁸⁵ B. H. Wang, K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 393-398
- ⁸⁶ P. G. Kistemaker, G. J. Q. van der Peyl, J. Haverkamp in: *Soft Ionization Mass Spectrometry*, 1. Auflage **1980**, 120-136
- ⁸⁷ A. K. Ganguly, N. F. Cappucino, H. Fujiwara, A. K. Bose, *J. C. S. Chem. Comm.* **1979**, 148-149
- ⁸⁸ R. G. Cooks, K. L. Busch, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics* **1983**, 53, 111-124
- ⁸⁹ C. J. McNeal, R. D. Macfarlane, E. L. Thurston, *Anal. Chem.* **1979**, 51, 2036-2039
- ⁹⁰ G. P. Jonsson, A. B. Hedin, P. L. Hakansson, B. U. R. Sundqvist, B. G. Säve, P. F. Nielsen, P. Roepstorff, K.-E. Johansson, I. Kamensky, M. S. L. Lindberg, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1084-1087
- ⁹¹ P. Roepstorff, *Methods In Enzymology* **1990**, 163, 432-441
- ⁹² G. Allmaier, M. R. Caparros, E. Pittenauer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 284-288
- ⁹³ P. F. Nielsen, K. Klarskov, P. Hojrup, P. Roepstorff, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1988**, 17, 355-362
- ⁹⁴ G. Bolbach, A. Viari, R. Galera, A. Brunot, J. C. Blais, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1992**, 112, 93-100
- ⁹⁵ E. A. Jordan, R. D. Macfarlane, C. R. Martin, C. J. McNeal, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Physics* **1983**, 53, 345-348
- ⁹⁶ C. J. McNeal, R. D. Macfarlane, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2132-2139

- ⁹⁷ R. D. Macfarlane in: *Desorption Mass Spectrometry Are SIMS and FAB the Same?*, ACS Symposium Series 291, Ed. P. A. Lyon, American Chemical Society, Washington, D.C., 1985, 56-68
- ⁹⁸ G. Brinkmalm, G. Jonsson, B. U. R. Sundqvist, A. Hedin, P. Hakansson in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 55-60
- ⁹⁹ C. J. McNeal in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, 1. Auflage, Band 3, 51-60
- ¹⁰⁰ K. Schneider, P. F. Nielsen, D. Suckau, M. Przybylski in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, 1. Auflage, Band 3, 176-185
- ¹⁰¹ P. F. Nielsen, P. Roepstorff, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1989**, 18, 131-137
- ¹⁰² S. Naylor, A. F. Findeis, B. W. Gibson, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6359-6363
- ¹⁰³ Y. Hoppilliard, C. Mauriac, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, 28, 977-982
- ¹⁰⁴ S. Aduru, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1621-1625
- ¹⁰⁵ W. B. Martin, L. Silly, C. M. Murphy, T. J. Raley Jr., R. J. Cotter, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1989**, 92, 243-265
- ¹⁰⁶ L. C. Ngoka, J.-F. Gal, C. B. Lebrilla, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 692-698
- ¹⁰⁷ S. Bouchonnet, J. P. Flament, Y. Hoppilliard, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 470-476
- ¹⁰⁸ P. Roepstorff in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, 1. Auflage, Band 3, 23-32
- ¹⁰⁹ B. U. R. Sundqvist, A. Ariyaratne, W. Ens, D. Fanyö, A. Hedin, P. Hakansson, G. Jonsson, S. Widdiyasekera in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 51-56
- ¹¹⁰ R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **1989**, 60, 781A-793A
- ¹¹¹ B. Wolf, R. D. Macfarlane, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, 2, 29-32
- ¹¹² R. D. Macfarlane, B. Wolf, D. Bunk in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, 1. Auflage, Band 3, 10-22
- ¹¹³ J. O. Metzger, R. Woisch, W. Tuszynski, R. Angermann J. Puls, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 1041-1047
- ¹¹⁴ W. Tuszynski, R. Angermann, J. O. Metzger, R. Woisch, *Nucl. Instr. Method. Phys. Res. B* **1994**, 88, 184-190

- ¹¹⁵ D. M. Bunk, R. D. Macfarlane, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, 126, 123-136
- ¹¹⁶ S. Bouchonnet, Y. Hoppilliard, C. Mauriac, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1993**, 126, 163-177
- ¹¹⁷ R. C. Beavis, B. T. Chait in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band IV, 125-130
- ¹¹⁸ S. J. Doktycz, P. J. Savickas, D. A. Krueger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, 5, 145-148
- ¹¹⁹ K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1991**, 111, 89-102
- ¹²⁰ T. W. Heise, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 355-361
- ¹²¹ F. Xiang, R. C. Beavis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 199-204
- ¹²² R. C. Beavis, B. T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, 3, 233-237
- ¹²³ K. Tang, S. L. Allman, R. B. Jones, C. H. Chen, S. Araghi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 435-439
- ¹²⁴ C. Jouvet, C. Lardeux-Dedonder, M. Richard-Viard, D. Solgadi, A. Tramer, *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 5041-5048
- ¹²⁵ M. E. Gimon, L. M. Preston, T. Solouki, M. A. White, D. H. Russel, *Organic Mass Spectrom.* **1992**, 27, 827-830
- ¹²⁶ C. A. Crowder, J. E. Bartmess, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 723-726
- ¹²⁷ H.-F. Wu, J. S. Brodbelt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 718-722
- ¹²⁸ E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. F. Crain, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 771-776
- ¹²⁹ C. Schwager, mündl. Mitteilung
- ¹³⁰ D. S. Cornett, M. A. Duncan, I. J. Amster, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27, 831-832
- ¹³¹ E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. F. Crain, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 771-776
- ¹³² M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3204-3211
- ¹³³ G. J. Currie, J. R. Yates III, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, 4, 955-963
- ¹³⁴ K. Schneider, B. T. Chait, *Organic Mass Spectrom.* **1993**, 28, 1353-1361
- ¹³⁵ U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp, U. Giessmann, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2866-2869
- ¹³⁶ P. A. Dean, R. M. O'Malley, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 53-57

- ¹³⁷ M. C. Wahl, H. S. Kim, T. D. Wood, S. Guan, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3669-3676
- ¹³⁸ R. W. Nelson, T. W. Hutchens, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 4-8
- ¹³⁹ J. O. Metzger, R. Woisch, W. Tuszynski, R. Angermann, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1994**, im Druck
- ¹⁴⁰ L. G. Wright, R. G. Cooks, K. V. Wood, *Biomed. Mass Spectrom.* **1985**, 12, 159-162
- ¹⁴¹ R. D. Macfarlane, Z.-H. Hu, S. Song, E. Pittenauer, E. R. Schmid, G. Allmaier, J. O. Metzger, W. Tuszynski, *Biomed. Mass Spectrom.* **1994**, 23, 117-130
- ¹⁴² R. G. Pearson, J. Songstad, *J. Amer. Chem. Soc.* **1967**, 89, 1827-1836
- ¹⁴³ T.-L. Ho, *Chem. Rev.* **1975**, 75, 1-20
- ¹⁴⁴ M. Karas, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, 78, 53-68
- ¹⁴⁵ T.-W. D. Chan, A. W. Colburn, P. J. Derrick, *Organic Mass Spectrom.* **1992**, 27, 53-56
- ¹⁴⁶ D. S. Cornett, M. A. Duncan, I. J. Amster, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2608-2613
- ¹⁴⁷ K. K. Murray, D. H. Russell, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2534-2537
- ¹⁴⁸ K. K. Murray, D. H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, 5, 1-9
- ¹⁴⁹ K. K. Mock, C. W. Sutton, J. S. Cottrell, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, 233-238
- ¹⁵⁰ M. M. Vestling, C. Fenselau, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 471-477
- ¹⁵¹ T. W. Hutchens, T.-T. Yip, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 576-580
- ¹⁵² R. T. T. Karaiste, I. M. Atkinson, J. A. Shorter, A. E. W. Knight, F. R. Keene, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2776-2783
- ¹⁵³ H. F. Kammer in: *Mass Spectrometry of Large Non-Volatile Molecules for Marine Organic Chemistry*, 1. Auflage, Band 3, 61-72
- ¹⁵⁴ H. F. Kammer, E. R. Hilf in: *Ion Formation from Organic Solids*, 1. Auflage, Band V, 197-203
- ¹⁵⁵ G. G. Gross, *GIT Fachz. Lab.* **1988**, 5, 518-526
- ¹⁵⁶ C. Härtig, D. Meyer, K. Fischer, *Z. Chem.* **1990**, 30, 233-239
- ¹⁵⁷ T. Higuchi in: *Wood Science and Technology*, Springer-Verlag 1990, 23-63
- ¹⁵⁸ A. Björkman, *Svensk Papperstidn.* **1956**, 59, 477-485
- ¹⁵⁹ H. Nimz, *Angew. Chem.* **1974**, 86, 336-344

- ¹⁶⁰ O. Faix, mündl. Mitteilung
- ¹⁶¹ F. Yaku, R. Tanaka, T. Koshijima, *Holzforschung* **1981**, 35, 177-181
- ¹⁶² T. Koshijima, T. Watanabe, F. Yaku in: *Lignin: Properties And Materials*, ACS Symposium Series 397, American Chemical Society, Washington, D.C., 1985, 11-28
- ¹⁶³ D. Fengel, G. Wegener in: *Polysaccharide - Eigenschaften und Nutzung*, Hrsg. W. Burchard, Springer-Verlag, Berlin 1985, 43-53
- ¹⁶⁴ J. O. Metzger, C. Bicke, O. Faix, W. Tuszynski, R. Angermann, M. Karas, K. Strupat, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 777-779
- ¹⁶⁵ C. Bicke, J. O. Metzger, *GIT Fachz. Lab.* **1993**, 2, 77-83
- ¹⁶⁶ B. E. Jakab, O. Faix, F. Till, T. Székely, *Holzforschung* **1991**, 45, 355-360
- ¹⁶⁷ E. R. E. van der Hage, M. M. Mulder, J. J. Boon, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1993**, 25, 149-183
- ¹⁶⁸ C. Schwager, Diplomarbeit, Universität Oldenburg, 1991
- ¹⁶⁹ J. O. Metzger, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1979**, 295, 45-46
- ¹⁷⁰ M. C. Terrón, C. Martín, P. Manzanares, G. C. Galletti, A. E. González, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 659-661
- ¹⁷¹ J. O. Metzger, W. Schwarting, P. Köll, F. J. Winkler, *Organic Mass Spectrom.* **1992**, 27, 508-514
- ¹⁷² J. B. Reeves III, G. C. Galletti, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1993**, 24, 243-255
- ¹⁷³ M. A. Scheijen, J. J. Boon, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1991**, 19, 153-173

Hiermit versichere ich, daß ich diese Arbeit selbstständig
verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen
und Hilfsmittel benutzt habe.

A handwritten signature in black ink, consisting of several large, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.