



... zurück

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-MS (MALDI)

Ionisationsprinzip

Die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie wurde auf Basis der Laser Desorption entwickelt. Hierbei wird die Probe auf einer Metalloberfläche mit einem gepulsten Laser bestrahlt. Die so erzeugten LD-MS Spektren zeigen jedoch nur geringe Intensitäten und starke Fragmentierungen der Analytmoleküle.

Der Einsatz von Lasern bei der massenspektrometrischen Analyse von Biomolekülen hoher Molmasse wurde erst durch *Hillenkamp* und *Karas* 1987 ermöglicht. Ihre Untersuchungen zur Wechselwirkung von ultravioletter Laserstrahlung mit organischen Molekülen zeigten, daß geeignete Matrixsubstanzen, die bei der eingestrahlten Laserwellenlänge ein Absorptionsmaximum haben, die schonende Desorption und Ionisation der Analytmoleküle entscheidend befördern.

Die Einbettung der Analytmoleküle in einem 10^3 bis 10^5 fachen molaren Überschuß an Matrix gewährleistet bei MALDI eine sanfte Ionisation selbst makromolekularer Substrate.

In MALDI-MS Spektren werden hohe Intensitäten an meist einfach geladenen Analytmolekülonen generiert, wobei fast keine Fragmentierungen beobachtet werden.

Zur massenspektrometrischen Analyse werden überwiegend Time-of-Flight (TOF)-Geräte eingesetzt.

Probenvorbereitung

Für die Probenpräparation bei MALDI wurden verschiedene Techniken entwickelt, die alle den Einbau der Analytmoleküle in das Kristallgitter der Matrix gewährleisten sollen.

Im Hochvakuum der Ionenquelle wird die kristalline Oberfläche der präparierten Probe dann mit einem intensiven Laserpuls von wenigen Nanosekunden Dauer bestrahlt. Zur Anregung wird bei MALDI-MS entweder im ultravioletten Wellenlängenbereich mit N_2 - oder Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat (**Nd:YAG**)-Lasern oder im infraroten Wellenlängenbereich mit CO_2 oder **Er:YAG**-Lasern gearbeitet.

Bei der Wechselwirkung eines UV-Laserpulses mit dem Matrix/Probe-Kokristall erfolgt eine resonante Anregung der Elektronen des aromatischen π -Systems der Matrices. Werden IR-Laser verwendet, erfolgt eine elektronische Anregung der **O-H**-Bindungen der flüssigen oder gefrorenen Matrices.

Laser für die MALDI-MS			
Laser	Wellenlänge	Photonenenergie [eV]	Pulsdauer [ns]
N_2	337 nm	3,68	<1+x
Nd:YAGx3	355 nm	3,49	5
Nd:YAGx4	266 nm	4,66	5

Er:YAG	2,94 μm	0,42	85
CO₂	10,6 μm	0,12	100

Ionenbildung bei MALDI-MS

Die nach der resonanten Wechselwirkung des Laserpulses mit den Matrixmolekülen erfolgte elektronische Anregung relaxiert in das Festkörperrgitter. Hierbei kommt es allerdings nicht zu einer thermischen Equilibrierung sondern zu einer starken kurzzeitigen Störung, die letztlich zu einer translatorischen Ausdehnung angeregter Moleküle in das Vakuum führt. Es werden so explosionsartig Matrixmoleküle und Analytmoleküle aus dem Festkörperverband gelöst. Man findet ähnlich wie bei anderen Desorptionstechniken einen kontinuierlichen Phasenübergang zwischen festem Matrix /Analytkristall und dem Vakuum, der sogenannten *MALDI-plume*. Diese MALDI-plume ist gekennzeichnet durch eine hohe Teilchendichte von neutralen Matrixmolekülen und verschiedenen ionischen, radikalischen und elektronisch angeregten Spezies.

Als direkte Folge der Wechselwirkung des Laserpulses mit dem Festkörperrgitter werden bei MALDI-MS unterschiedliche ionische, radikalische und elektronisch angeregte Spezies der Matrix gebildet.

Nach Relaxation in die Gasphase erfolgen in der MALDI plume weitere, CI-ähnliche Gasphasen-Ionen-Molekülreaktionen.

Zur Beschreibung der bei MALDI-MS ablaufenden Ionisationsprozesse werden verschiedene Modelle herangezogen, die hier nur in Stichworten erwähnt werden können. Eine ausführliche Diskussion der Thematik ist in der angegebenen Literatur zu finden.

Primäre Ionenbildung: direkte Wechselwirkung Matrix/Laserpuls

- Multiphoton Ionisation
- Energy Pooling und Multicenter Modelle
- Protonentransfer im angeregten Zustand
- Disproportionierungen
- Desorption vorgebildeter Ionen
- Thermale Ionisation

Ionisation in der MALDI plume

- Gasphasen-Protonen Transfer (Matrix-Matrix bzw. Matrix-Analyt; PA !)
- Gasphasen-Kationisierung
- Elektronentransfer (IP !)

Wichtige Funktionen der Matrix bei MALDI-MS

- Die Matrixsubstanz absorbiert die eingestrahlte Laserenergie und schützt aufgrund des Überschusses (ca. 10^3 :1) die Analytmoleküle vor Zersetzung.
- Die Matrixsubstanzen werden durch die Absorption der Laserenergie selbst elektronisch angeregt und stellen die zur Desorption der Analytmoleküle notwendige Energie zur Verfügung.
- Die Matrix wirkt als Brönstedt Säure oder Base d.h. sie liefert Protonen oder abstrahiert diese zur Ionisation des Analyten.
Eine Ionisation des Analyten kann zudem durch Elektronenabstraktion in einer Elektronen-Transferreaktion mit einem Matrix-Molekül-Radikalkation erfolgen.
- Die Matrixsubstanz unterbindet Wechselwirkungen der Analytmoleküle untereinander und zwischen Analyt und Probenträger.

Typische Matrixsubstanzen für die MALDI-MS in der biochemischen Analytik

Matrix	Wellenlänge	geeignet für
Nicotinsäure	266 nm	Proteine, Peptide
2,5-Dihydroxybenzoesäure DHB	266/337/355 nm	Proteine, Peptide
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimsäure (Sinapinsäure)	266/337/355 nm	Proteine
α -Cyano-4-hydroxyzimsäure	337/355 nm	Peptide
4-Hydroxypicolinsäure	337/355 nm	Oligonucleotide
Bernsteinsäure	2,94/10,6 μm	Proteine, Peptide
Glycerin	2,94/10,6 μm	Proteine, Peptide

Literatur

R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry*, Mass Spectrom. Rev. 17 (1998) 337-366

F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis, B.T. Chait, *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers*, Anal. Chem. 63 (1991) 1193A-1202A

M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer, *Ionisation in Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors*, Journal Of Mass Spectrometry 35 (2000) 1-12

verschiedene Autoren im Schwerpunktheft: *Focus on Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry*, J. Am. Mass Spectrom. 9 (1998)