

**Methodische Entwicklung der MALDI-TOF
Massenspektrometrie für Grenzbereiche der
Makromolekülanalytik**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Sarah Trimpin
geb. in Basel, Schweiz

Mainz 2002

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	Entwicklung der MALDI-TOF-MS – vom Zufall der Matrix-Entdeckung bis hin zu neuen Möglichkeiten der Polymercharakterisierung	1
1.1.1	Die Geschichte der Massenspektrometrie bis zur Entwicklung der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI)	1
1.1.2	Mechanistische Aspekte der MALDI-TOF-MS.....	4
1.1.3	Die Entwicklung der MALDI-TOF-MS zur Analytik von Polymeren und Makromolekülen	6
1.1.3.1	Biopolymeranalytik	6
1.1.3.2	Analytik synthetischer Polymere	7
1.1.3.3	Makromolekülanalytik.....	9
1.1.4	Eine Bilanz zur qualitativen und quantitativen MALDI-TOF-MS-Analyse.....	9
1.1.5	Analytische Möglichkeiten und gegenwärtige Limitierungen der MALDI-TOF-MS.....	10
1.2	Zielsetzungen	13
2	ANALYTIK.....	15
2.1	MALDI-TOF-MS.....	15
2.1.1	Bedeutung der Probenpräparation.....	15
2.1.2	Aufbau und Messprinzip eines MALDI-TOF-Massenspektrometers.....	18
2.1.3	Interpretation von MALDI-TOF-Massenspektren.....	20
2.1.4	Detektionsmodi und deren praktische Bedeutung für die Fragmentationenanalyse	22
2.2	MALDI-TOF-Fragmentationenanalytik	24
2.2.1	Grundlagen.....	24
2.2.2	Messprinzip.....	26
3	ERGEBNISSE.....	29
3.1	Praktische und theoretische Gesichtspunkte der MALDI-TOF-MS-Probenpräparation	29
3.1.1	Grundlagen und Motivation.....	29
3.1.2	Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS	30
3.1.2.1	Universelle Anwendbarkeit	30
3.1.2.2	Vorteile gegenüber der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS	44
3.1.2.3	Charakterisierung von unlöslichen Substanzen	52
3.1.3	Grundlagenuntersuchungen zur Matrixunterstützung in MALDI-TOF-MS mittels lösungsmittelfreier Probenpräparation an Cytochrom C.....	63

3.1.3.1	Theorie und analytisches Konzept.....	63
3.1.3.2	Charakterisierung von Kristallen.....	64
3.1.3.3	Untersuchungen in Abhängigkeit der MALDI-Probenpräparation	70
3.1.3.4	Diskussion zum theoretischen Aspekt.....	78
3.1.4	Resümee.....	79
3.2	Fragmentionenanalytik.....	81
3.2.1	Systematische Untersuchungen zur Abhängigkeit der Fragmentierung	81
3.2.1.1	Fragmentionenanalyse anhand des Modellhomopolymers PMMA.....	81
3.2.1.2	Einführung einer chemisch induzierten Fragmentierung.....	94
3.2.2	Charakterisierung der Copolymerzusammensetzungen.....	97
3.2.2.1	Grundlagen	97
3.2.2.2	Triblockcopolymer.....	97
3.2.2.3	Statistische Copolymer aus den Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure	104
3.2.3	Resümee.....	121
3.3	Methodenentwicklung zur qualitativen MALDI-TOF-MS-Analyse.....	123
3.3.1	Charakterisierung supramolekularer Komplexe	123
3.3.1.1	Grundlagen	123
3.3.1.2	Metallo-supramolekulare Strukturen	123
3.3.1.3	Supramolekulare Wirt-Gast-Systeme basierend auf Cyclodextrinen (CD)	132
3.3.2	Resümee.....	144
3.4	Anwendung der MALDI-TOF-MS-Analyse zur Synthesekontrolle, Reinheitsbestimmung und Identifizierung von Neben- und Abbauprodukten.....	147
3.4.1	Motivation.....	147
3.4.2	Methodischer Vergleich am Beispiel der Nahe Infrarot-Farbstoffe.....	147
3.4.3	Analytik von Dendrimeren	150
3.4.3.1	Analytische Herausforderungen	150
3.4.3.2	Boc-geschützte Gly-Perylendendrimere	154
3.4.3.3	Fullerodendron.....	161
3.4.3.4	Azodendrimere	163
3.4.3.5	Polyphenylendendrimere mit tetraedrischem Kern	172
3.4.3.6	Biotinylierte Polyphenylendendrimere mit tetraedrischem Kern	182
3.4.3.7	Polymere Farbstoffe.....	192
3.4.4	Analytik von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs).....	197
3.4.4.1	Analytische Herausforderungen	197
3.4.4.2	Charakterisierung substituierter PAHs	201
3.4.4.3	Analytik von PAHs.....	204
3.4.4.4	Ermittlung von „Response“-Faktoren.....	219
3.4.5	Analytik von Poly(vinylpyrrolidon).....	222
3.4.5.1	Grundlagen und analytisches Konzept	222

3.4.5.2	Evaluierung der qualitativen und quantitativen MALDI-TOF-MS-Analytik für Studien des biologischen Abbauverhaltens.....	225
3.4.5.3	Untersuchungen zum Abbauverhalten und zum Verbleib von PVP.....	233
3.4.5.4	Evaluierung des analytischen Ansatzes	237
3.4.6	Wege der Quantifizierung mittels MALDI-TOF-MS	238
3.4.7	Resümee.....	245
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	249
5	AUSBLICK	255
6	EXPERIMENTELLER TEIL	257
6.1	Materialien	257
6.1.1	Reagenzien, Lösungsmittel, Matrices, Kalibriersubstanzen	257
6.1.2	Analyte und Synthesen	258
6.1.2.1	Dendrimer 8	258
6.1.2.2	Polyzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoff C ₁₃₂ H ₃₄ 9	259
6.1.2.3	Bis(p-methyl benzylidene)sorbitol 10.....	259
6.1.2.4	Poly(9,9-diphenylfluorene) 11	260
6.1.2.5	Züchtung von Einkristallen aus 2,5-DHB mit und ohne Inkorporation von Cytochrom C	261
6.1.2.6	Triblockcopolymer 14	261
6.1.2.7	Synthetische Peptide	262
6.1.2.8	Poly[9,9-di-(2-ethylhexyl)fluoren]-Tris(8-Hydroxychinolin)-Aluminium (Alq ₃ -PF) 18	263
6.1.2.9	Supramolekularer N ^ε -Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplex 19.....	264
6.1.2.10	Acetylierung von α-, β- und γ- Cyclodextrinen 20.....	265
6.1.2.11	Supramolekulare γ-Cyclodextrin-Gast-Komplexe 21.....	266
6.1.2.12	Naher Infrarot (NIR)-Farbstoff 22.....	266
6.1.2.13	Geschützte Boc-Gly-Perylendendrimere 23	267
6.1.2.14	Fullerodendron 24.....	268
6.1.2.15	Azodendrimer 25	269
6.1.2.16	TdG ₂ ABCp-Polyphenylendendrimer 26.....	269
6.1.2.17	TdG ₂ A ₄ BCp-Polyphenylendendrimer 27.....	270
6.1.2.18	Biotinpolyphenylendendrimer 28	271
6.1.2.19	Sternpolymere mit photolabilem Kern 29-31	271
6.1.2.20	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) 32-47	272
6.1.2.21	Proteolytische Abbauprobieren	273
6.2	Reinigung und analytische Trennmethode.....	274
6.2.1	Umkristallisation der Matrices.....	274
6.2.2	GPC-Fraktionierung.....	274

6.2.2.1	Alq ₃ -Polyfluoren	275
6.2.2.2	Poly(vinylpyrrolidon) (PVP)	275
6.2.2.3	Poly(methylmethacrylat) (PMMA).....	275
6.3	Massenspektrometrische Methoden	276
6.3.1	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	276
6.3.1.1	Massenspektrometer	276
6.3.1.2	Kalibrierung	276
6.3.1.3	Allgemeine Probenpräparation	279
6.3.1.4	Probenpräparation im Speziellen	280
6.3.2	Weitere massenspektrometrische Methoden.....	285
6.4	Spektroskopische Methoden	285
7	ANHANG: STOCHASTIK ZUR STATISTISCHEN COPOLYMERANALYSE.....	287
8	BIBLIOGRAPHIE	290

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitrill
AIBN	Azoisobuytronitril
AS	Aminosäure
BOC	<i>t</i> -Butoxycarbonyl
CAD	(engl.) Collisionally Activated Dissociation
CI	(engl.) Chemical Ionisation
CID	(engl.) Collision-Induced Dissociation
CD	Cyclodextrine
D	Polydispersität
Da	Dalton
DE	(engl.) Delayed Extraction
DNA	Desoxynucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	(engl.) Electrospray
FAB	(engl.) Fast Atom Bombardment
FAST™	(engl.) Fragment Analysis and Structural TOF
FBBR	(engl.) Laboratory-Scale Fixed-Bed Bioreactor
FD	(engl.) Field Desorption
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Glu	Glutaminsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
Ins	Rinderinsulin
IP	Ionisierungspotential
IR	Infrarot
ISD	(engl.) In-Source Decay
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
LC	(engl.) Liquid Chromatography
LD	(engl.) Laser Desorption
LED	(engl.) Light Emitting Diode
Lys	Lysin
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MALDI	(engl.) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol
Mn	zahlgewichtete mittlere Molmasse (Zahlenmittel)
MPI	(engl.) Multiphoton Ionisation
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	tandem Massenspektrometrie
M _w	massengewichtete mittlere Molmasse (Massenmittel)
MW	Molekulargewicht
NIR	(engl.) Near Infra Red
NMR	(engl.) Nuclear Magnetic Resonance
NPEO	Nonylphenol Polyethoxylate
PAH	(engl.) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon
PD	Cf-Plasmadesorption
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)

PDT	Poly(dithiathianthren)
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEO	Poly(ethylenoxid)
PEI	Poly(etherimide)
PF	Poly-(9,9-diphenyl-2,7-fluoren)
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PS	Polystyrol
PSD	(engl.) Post-Source Decay
R2PI	(engl.) Resonance 2-Photon Ionisation
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Riboxynucleinsäure
STM	(engl.) Scanning Tunneling Microscopy
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	(engl.) Time-of-Flight
UV	Ultraviolett
UV/Vis	Ultraviolett/Visible

Abkürzungen der MALDI-Matrices:

CSA	5-Chlorsalicylsäure
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
Dithranol	1,8,9-Trihydroxyanthracen
HABA	2-(4'-Hydroxybenzolazo)-benzoesäure
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
HMB	2-Hydroxy-5-methoxy-benzoesäure
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
IAA	3 β -Indolylacrylsäure
NA	9-Nitroanthracen
NBA	3-Nitrobenzylalkohol
SA	trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-zimtsäure (Sinapinsäure)
TCNQ	7,7,8,8-Tetracyanoquinodimethane
Vit.A	all-trans-Retinoesäure (Vit.A)

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 Entwicklung der MALDI-TOF-MS – vom Zufall der Matrix-Entdeckung bis hin zu neuen Möglichkeiten der Polymercharakterisierung

1.1.1 Die Geschichte der Massenspektrometrie bis zur Entwicklung der Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI)

Die Anfänge der Massenspektrometrie (MS) gehen auf den Beginn des 20sten Jahrhunderts zurück^{1,2,3,4}, jedoch erfolgte die Entwicklung erst in den 1950er Jahren für die Analyse niedermolekularer organischer Substanzen. Der Einsatz der klassischen MS-Methoden ist auf Untersuchungen von thermisch stabilen und verdampfbaren niedermolekularen Molekülen beschränkt, die durch **Elektronenstoßionisation (EI)-MS** (Abb. 1-1) oder durch **Chemische Ionisation (CI)-MS** analysierbar sind. Dabei werden den Molekülen erhebliche Überschussenergien zugeführt, die bei EI-MS in den meisten Fällen zu Fragmentierungen der so erzeugten radikalkationischen Molekülionen führen. Fragmentionen liefern strukturspezifische Informationen und können zur Strukturidentifizierung durch Vergleich mit Spektrenbibliotheken herangezogen werden^{5,6,7,8}. Bei der Strukturaufklärung wichtiger Naturstoffe, wie z.B. von Prostaglandinen, Steroid- und Peptidhormonen^{9,10,11} und der Identifizierung toxischer Verbindungen in Nahrungsmitteln¹², leistete die Tandem-MS-Methode bereits wichtige Beiträge.

Durch geeignete chemische Modifizierungsreaktionen (z.B. Trimethylsilylierung, Peralkylierung, Peracetylierung) können auch schwerflüchtige und polare organische Verbindungen in flüchtige und thermostabile Derivate überführt und so ebenfalls der EI- oder CI-MS zugänglich gemacht werden^{13,14}. Diese erhebliche Erweiterung analytischer Anwendungen grenzte die hochpolaren, thermisch oder chemisch instabilen und höhermolekularen Verbindungen weiterhin aus. Zur indirekten massenspektrometrischen Analyse größerer organischer Moleküle und synthetischer Polymere wurde nach thermischem Abbau eine anschließende massenspektrometrische Analyse der Pyrolysebruchstücke durchgeführt¹⁵. Eine wesentliche Weiterentwicklung zur Charakterisierung organischer Verbindungen aus komplexen Gemischen, wie z.B. Serum und Urin, wurde durch die Direktkopplung von **Gaschromatographie (GC)** und MS verwirklicht^{16,17}.

Die massenspektrometrische Analyse polarer, nichtflüchtiger und höhermolekularer Verbindungen wurde erstmals Ende der 1960er Jahre direkt, d.h. ohne Derivatisierung, mit der Entwicklung von **Ionisierungs- und Desorptionsmethoden aus kondensierter Phase** zugänglich¹⁸. Diese Methoden können bezüglich der Art des Energieeintrages unterschieden werden wie z.B. durch elektrische Felder oder energiereiche Primärteilchen. Ein entscheidendes Merkmal ist die Erzeugung und/oder Desorption intakter Molekülionen aus einer definierten chemischen Matrix, wie z.B. Glycerin. Die Ionisierung findet durch Kationenanlagerung (z.B. Protonierung) oder Anionenbildung (z.B. Deprotonierung) zum Teil bereits in kondensierter Phase statt. Der erzielbare Massenbereich wird instrumentell durch den verwendeten Analysator sowie durch die Ladung der Molekülionen bestimmt. Der Massenbereich ist bei „**Time-of-Flight**“ (TOF) **Analysatoren** prinzipiell unbegrenzt. Bei **magnetischen** bzw. **elektrostatischen Sektorfeldgeräten** mit hoher Massenauflösung wurde durch Hochfeldmagnete und größere Bahnradien ein instrumentell zugänglicher Massenbereich bis

ca. 15.000 Da bei voller Beschleunigungsspannung erreicht¹⁹, während **Quadrupolanalysatoren** aufgrund der notwendigen hohen Wechselfelder auf etwa 2.000 Da begrenzt sind. Bei manchen Ionisierungsmethoden (z.B. ESI) werden jedoch mehrfach- bis hochgeladene Molekülonen gebildet und damit der analytisch zugängliche Molekulargewichtsbereich proportional zu m/z vergrößert.

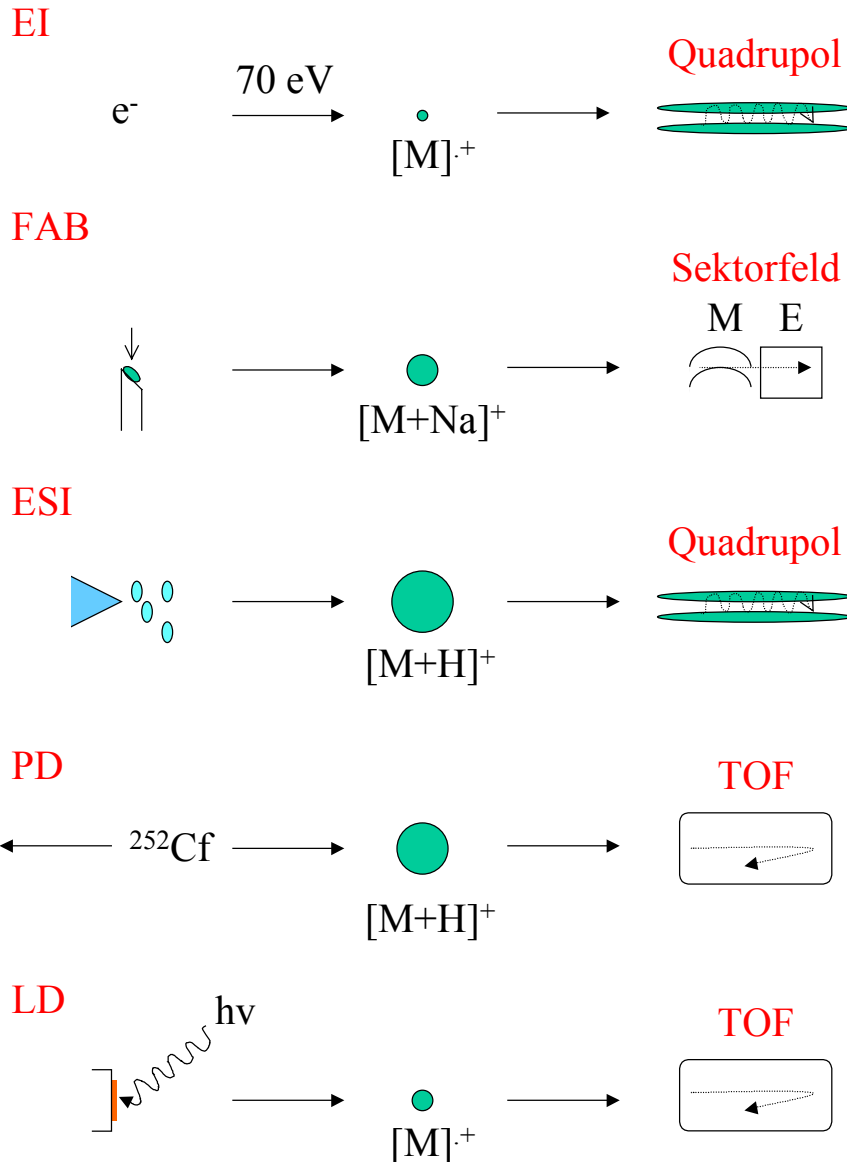


Abb. 1-1: Verschiedene Ionisierungsmethoden in Verbindung mit geeigneten Analysatoren: EI-; FAB-; ESI-; PD-; LD-TOF-MS.

Ein Durchbruch für die direkte Analyse von thermolabilen Makromolekülen gelang durch die Einführung weiterer „sanft ionisierender“ MS-Methoden seit Anfang der 1980er Jahre. Die **Fast Atom Bombardment (FAB)-MS**²⁰ (Abb. 1-1) bringt durch Beschuss der Probenlösung in einer schwerflüchtigen Lösungsmittelmatrix mit keV-Primärpartikeln intakte Pseudo-Molekülonen verschiedenster polarer Makromoleküle^{21,22,23,24} zur Desorption, die anschließend massenspektrometrisch in einem Bereich von < 20.000 Da (Sektorfeldanalysator) nachgewiesen werden können^{19,20}.

Bei der **Felddesorptions (FD)-MS**, als erster Ionisationsmethode aus kondensierter Phase^{25,26,27}, dient ein mit Mikronadeln versehener Emitter zur Ionenemission und erlaubt die Analyse in einem Massenbereich < 6.000 Da (Sektorfeldanalysator). Hiermit wurden z.B. Peptidmoleküle mit einem Molekulargewicht bis zu mehreren tausend Da erfolgreich untersucht²⁸.

Bei den Spray-Ionisationsmethoden **Thermospray (TSP)**²⁹, **Aerospray (AS)**³⁰, und **Elektrospray (ESI)**³¹ (**Abb. 1-1**) werden Moleküle durch Desolvatisierung aus kleinen, hochgeladenen Lösungsmitteltröpfchen desorbiert. Die Probenlösung wird durch eine dünne Kapillare kontinuierlich zugeführt und das Lösungsmittel durch Aufheizen der Kapillare (TSP), hohen Druck in der Kapillare (AS) oder hohe elektrische Felder im Aerosolraum (ESI)^{32,33} verdampft. Die ersten Untersuchungen zur Ionisierung von Makromolekülen durch ESI erfolgte schon Ende der 1960er Jahre^{34,35}, der Durchbruch setzte erst 1988 mit der Entwicklung geeigneter Ionenquellen für Quadrupol-Massenspektrometer^{31,36} ein. Diese „sanfte“ Methode liefert hochgeladene Makromoleküle und erlaubt ihre Charakterisierung in einem Massenbereich bis zu 100.000 Da. Sie hat sich dadurch auf dem Gebiet der Biopolymeranalytik als eine der wichtigsten analytischen Methoden etabliert³⁷. Aufgrund der Komplexität der Massenspektren können nur in einem sehr geringen Maße Substanzgemische und synthetische Polymere analysiert werden.

Als eine Methode, bei der hochenergetische Tochternuklide einer ²⁵²Cf-Quelle die Desorption der Probenmoleküle von einer Trägeroberfläche induzieren, hat sich die **²⁵²Cf-Plasmadesorptions (PD)-MS**^{38,39} (**Abb. 1-1**) zur Charakterisierung organischer Makromoleküle entwickelt. Die Entwicklung geeigneter Träger- und Matrixsysteme⁴⁰ erlaubt Massenspektren mit hoher Empfindlichkeit und mit präziser Molekulargewichtsbestimmung bis ca. 45.000 Da (TOF-Analysator) zu erzielen. Das Hauptanwendungsgebiet der PD-MS liegt im Biopolymer- und Peptidbereich^{41,42,43,44}, zeigt jedoch auch Anwendungen für Oligonucleotide^{45,46}, Glycolipide⁴⁷ und synthetische Polymere⁴⁸.

Neben dem Energieeintrag durch hochenergetische Primäratome und -ionen kann die Desorption von hochmolekularen Sekundärionen auch durch energiereiche Strahlung erzielt werden. Seit den späten 1970er Jahren wurden Laser angewendet, um nichtflüchtige Verbindungen von metallischen Oberflächen zu desorbieren^{49,50}. Dieser Ansatz, gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion, wird als **Laserdesorptions (LD)-MS** (**Abb. 1-1**) bezeichnet. Sie ermöglicht die Charakterisierung von organischen und anorganischen Molekülen in Einzelfällen bis ca. 9.000 Da, wobei jedoch aufgrund einer zum Teil sehr hohen Fragmentierung Interpretationsprobleme der Massenspektren in Kauf genommen werden müssen⁵¹.

In den 1980er Jahren wurde der Anwendungsbereich des **Laser Microprobe Mass Analyzer (LAMMA)** auf niedermolekulare organische Verbindungen erweitert. Systematische Untersuchungen an allen Aminosäuren folgten. Bei einer eher zufälligen Untersuchung eines Gemisches aus Tryptophan und Alanin wurden Signale *beider* Aminosäuren gefunden, und zwar bei einer Laserleistung, bei der nur Tryptophan hätte desorbiert und ionisiert werden dürfen. Aufgrund der vorangegangenen systematischen Untersuchungen bei einer Laserwellenlänge von 266 nm, aus denen hervorging, dass Alanin eine zehnfach erhöhte Desorptionsschwelle im Vergleich zu Tryptophan hat, konnten Karas und Hillenkamp⁵² dieses Ergebnis eindeutig interpretieren: „Alanin ist Huckepack mit dem Tryptophan geflogen“⁵³. Die Idee der matrixunterstützten Desorption war damit geboren, so dass die Entwicklung der sehr schonenden Desorptionsmethode, der **Matrix-unterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI)-MS**, ihren Lauf nehmen konnte⁵⁴. Die „Matrix“, eine im ultravioletten Spektralbereich absorbierende Substanz, wird in hohem molaren Überschuss mit dem

Analyten vermengt und eingetrocknet. Idealerweise absorbiert in diesem auskristallisierten Probengemisch ausschließlich die Matrix die Energie des Laserlichtpulses beim Laserdesorptionsbeschuss und geht durch die freiwerdende thermische Energie in die Gasphase über. Der Mechanismus der Desorption des Analyten ist noch Gegenstand aktueller Forschung (Kapitel 1.1.2, S. 4).

Das Konzept einer „Matrix“ war in den 1980er Jahren in verschiedenen massenspektrometrischen Anwendungen in unterschiedlicher Weise beleuchtet worden wie z.B. Glycerin bei FAB-MS^{55,56,57}, Nitrocellulose bei PD-MS⁴⁰ sowie auch unterschiedliche Matrixeigenschaften bei LD-TOF-MS^{58,59}, um eine kontrollierte Zuführung von Energie zur Probe zu ermöglichen. Der Durchbruch stellte sich jedoch nur für die MALDI-MS ein: Im Rahmen der International Mass Spectrometry Conference in Bordeaux (1988) wurde das erste MALDI-Massenspektrum eines Proteins > 100 kDa (**Abb. 1-2**⁵³) vorgestellt^{60,61}, bei der ein β -D-Galactosidase-Analyt mit einer Nikotinsäure-Matrix analysiert wurde. Ein weiterer Meilenstein war die Kopplung zur MALDI-TOF-MS durch Beavis and Chait⁵³, die sich unmittelbar aus diesen bahnbrechenden Untersuchungen (**Abb. 1-2**) entwickelten.

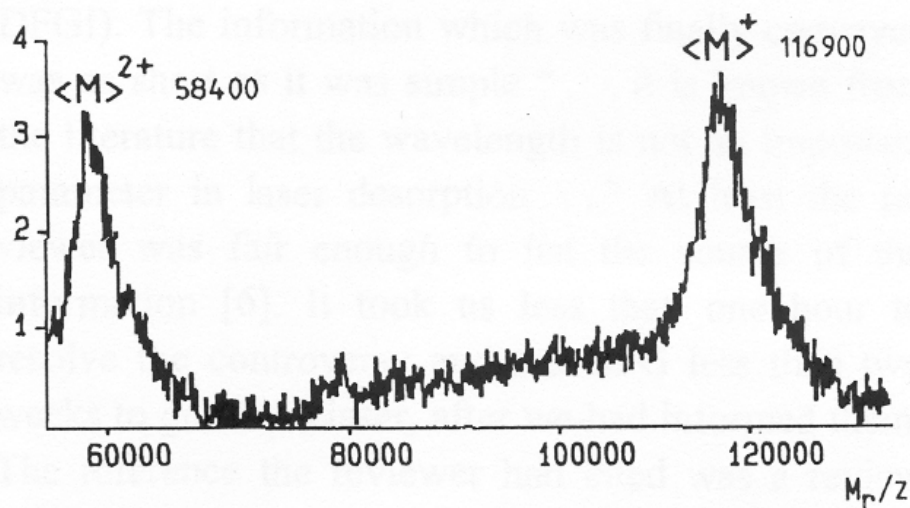


Abb. 1-2: Erstes MALDI-Massenspektrum eines Proteins > 100 kDa vorgestellt bei der International Mass Spectrometry Conference (1988)⁶⁰: β -D-Galactosidase unter Verwendung der Nikotinsäure-Matrix und 100 Laserschüssen. [Hillenkamp, F.; Karas, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 71-77.]

1.1.2 Mechanistische Aspekte der MALDI-TOF-MS

Seit der Entwicklung der MALDI-TOF-MS wurden parallel zu den anwendungsorientierten Forschungsbestrebungen fortwährend Untersuchungen zu den grundlegenden Prozessen durchgeführt. Daraus resultierten Modellvorschläge, die teilweise bis dato ihre Gültigkeit haben. So wird allgemein angenommen, dass der „sanft desorbierende“ Prozess von einer Vororganisation der Kristalle herrührt, bei welchem der Analyt während der Lösungsmittelverdampfung in einen Matrixkristall eingebaut wird. Diese Vororganisation erlaubt dann eine besondere Matrixunterstützung während des Desorptionsprozesses^{62,63}. Damit zeigt sich die MALDI-Probenpräparation als

Schlüsselparameter (Kapitel 2.1.1, S. 15), der ausschlaggebenden Einfluss auf den Erfolg bzw. auf die Qualität der massenspektrometrischen Analyse hat.

Beim Beschuss mit einem kurzwelligen Laser (z.B. 337 nm) wird Strahlung von der Matrix absorbiert (**Abb. 1-3**). Dabei wird angenommen, dass die Matrixmoleküle angeregt, das Gitter im Festkörper zerstört und die Matrixmoleküle desorbiert werden. Bei diesem Phasenübergang werden die darin eingebetteten Analytmoleküle mitgerissen und ionisiert⁶⁴. Auf diese Weise wird eine effiziente und kontrollierte Energiezuführung ermöglicht, während die Analytmoleküle von einer übermäßigen Energie, die zu ihrer Fragmentierung führen könnte, geschützt werden. Der Vorgang verläuft pyrolysefrei⁶⁵.

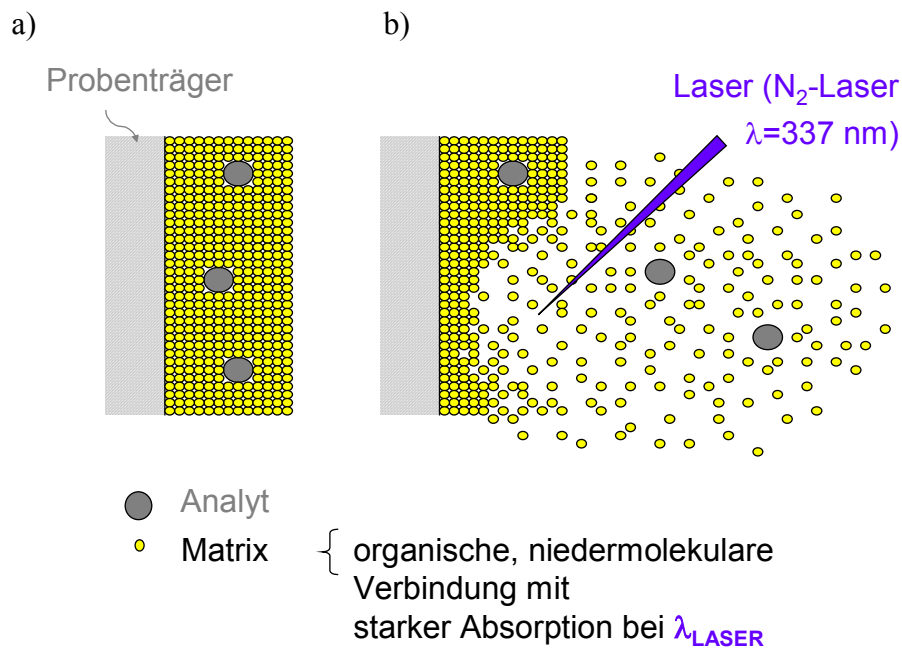


Abb. 1-3: Modellvorstellung der Desorption und Ionisation des höhermolekularen Analyten im MALDI-Prozess: a) Probenträger mit Analyt-Matrix-Probenmischung; b) MALDI-Laserschuss von a).

Das tatsächliche Verständnis der Prozesse ist jedoch nach wie vor unvollständig. Diese Insuffizienz beruht auf der Komplexität und in der messtechnischen Schwierigkeit, Prozesse zu erfassen, die auf einer Nanosekundenzeitskala bzw. im Nanoliter räumlichen Maßstab verlaufen. Computer liegen noch weit hinter den dafür erforderlichen Kapazitäten zurück⁶⁶. Unmittelbar zugänglich sind der Messung zudem nur die Ionen, die lediglich einen verschwindend geringen Anteil der erzeugten Spezies bilden. Untersuchungen zu den Anfangsenergien und -geschwindigkeitsverteilungen stellen damit große Herausforderungen dar. Da der Analyt nur in verschwindend geringen Konzentrationen vorliegt, gestalten sich Untersuchungen zur Wechselwirkung von Matrix und Analyt schwierig. Der Einfluss dieser Wechselwirkung auf das Desorptionsverhalten neben unterschiedlichen Modellen zur Ionisation (z.B. photochemische Prozesse bzw. Spallationsmodelle) werden bis heute mit großem Interesse verfolgt und diskutiert^{67,68}.

1.1.3 Die Entwicklung der MALDI-TOF-MS zur Analytik von Polymeren und Makromolekülen

1.1.3.1 Biopolymeranalytik

Die MALDI-TOF-MS gewann für die direkte Analyse von Proteinen rasch an Bedeutung⁶⁹. Da wenig mehrfach geladene Moleküle erhalten werden und Fragmentierungen selten sind, ist die MALDI-TOF-MS auch eine geeignete Methode zur Untersuchung von Peptidgemischen aus proteinchemischen Experimenten⁷⁰. Dabei kommt ihr ihre hohe Empfindlichkeit zugute⁷⁰. Die Biopolymeranalytik ist aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen auf empfindliche Methoden angewiesen. Die Etablierung und Weiterentwicklung der MALDI-TOF-MS verlief daher rasant im Vergleich zu anderen Methoden.

Viele primärstrukturspezifische Fragestellungen konnten effizient bearbeitet werden, da mit der MALDI-TOF-MS eine exakte Massenbestimmung der Peptide und Proteine auch in komplexen Gemischen möglich ist. Durch Vergleich mit dem aus einer „Leitsequenz“, die aus DNA-Sequenzinformationen gewonnen sind, berechneten Molekulargewicht kann eine schnelle und eindeutige Identifizierung erzielt werden. So wurde MALDI-TOF-MS erfolgreich eingesetzt zur Überprüfung von aus DNA-Sequenzierungsdaten abgeleiteten Aminosäuresequenzen⁷¹ und zur Strukturidentifizierung rekombinant hergestellter Proteine^{72,73}. Peptidgemische, die durch einen gezielten enzymatischen oder chemischen Abbau eines Proteins erhalten wurden, waren direkt massenspektrometrisch zugänglich („Peptide-Mapping“)⁷². Besonders leistungsfähig zeigte sich die „Peptide-Mapping“-MALDI-TOF-MS-Methode bei der Identifizierung kovalenter, posttranslatiöner Strukturmodifikationen^{74,75}, wodurch beispielsweise Glycosylierung, Phosphorylierung, Sulfatierung oder Acylierung rasch und effizient aufgeklärt werden konnten^{70,76}. Die Kombination der MALDI-TOF-MS mit selektiven proteinchemischen Umsetzungen erlaubt die Charakterisierung von Proteintertiärstrukturen^{77,78,79}. MALDI-TOF-MS eignet sich ebenfalls für bakterielle „Screening“-Untersuchungen^{80,86}, und in beschränktem Maße können auch nicht-kovalente Komplexe charakterisiert werden^{81,82,85}.

Da die Anregung der Moleküle beim MALDI-Desorptionsprozess nur in geringem Maße eine sequenzspezifische Fragmentierung induziert, können zusätzlich zur Molekulargewichtsinformation wichtige Strukturinformationen zur direkten Bestimmung von Peptidpartialsequenzen durch die MALDI-TOF-Fragmentierungsanalytik gewonnen werden, die es erlaubt, „Post-Source Decay“ (PSD) Fragmente zu trennen und zu analysieren^{83,84}.

Die herausragenden Vorteile der MALDI-TOF-MS bezüglich der Proteinanalytik, wie sie durch mannigfache wissenschaftliche Beiträge belegt werden, sind:

- hohe Auflösung, Massengenauigkeit⁸⁵,
- Stabilität gegenüber Puffersalzen, Verunreinigungen und Enzymspuren⁸⁶,
- hohe Effizienz bei vergleichsweise geringem Zeitbedarf und
- hohe Sensitivität (Substanzmengen im Femtomolbereich^{70,87}).

Die wissenschaftliche Entwicklung der MALDI-TOF-MS in der Biopolymeranalytik ist mittlerweile durch die intensive anwendungsorientierte Forschung sehr weit fortgeschritten. Aufgrund

dieser hält seit den späten 1990er Jahren das MALDI-TOF-Massenspektrometer als „Werkzeug“ in einem erheblichen Ausmaß Einzug in die pharmazeutischen Betriebe: Proteomics kommt viel Aufmerksamkeit bei der Entwicklung von pharmazeutischen Wirkstoffen zu. Die Proteom-Analyse basiert ganz wesentlich auf der voll automatisierten Charakterisierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS: Die zweidimensionale Gelelektrophorese trennt zunächst das Proteingemisch auf. Die Protein-„Spots“ werden ausgeschnitten und mit biochemischen Methoden protolytisch abgebaut. Die erhaltenen Peptide sind „Fingerprints“ der Elternproteine. Die Peptidmassen eines Abbaugemisches können durch MALDI-TOF-MS bestimmt werden. Die erhaltenen Massen-„Fingerprints“ werden durch Suchen in Proteinsequenzdatenbanken zur eindeutigen Charakterisierung der Proteine verwendet. Bei zweideutigen Ergebnissen, die insbesondere durch posttranslationale Modifikationen verursacht werden können, kommt der Einsatz von chromatographischen Trennmethode der Peptidfragmente und deren Sequenzanalyse mittels MALDI-Fragmentationanalytik und Edmanabbau zum Tragen^{87,88}. Quantitative Aussagen zur Polymerkonzentration werden durch sensitive Anfärbemethoden der Gele und nicht durch die MS erhalten.

MALDI-TOF-MS zeigte sich als eine schnelle und zuverlässige Methode für Synthese und Qualitätskontrolle von Oligonucleotiden und hat inzwischen Einfluss auf dem Gebiet der Genomics. Die Molekulargewichtsobergrenzen liegen bei DNA um 90 kDa (ca. 300-mer)⁸⁹ und für RNA um 150 kDa (ca. 500-mer)⁹⁰ mit einer Sensitivität im Femtomolbereich⁸⁵. Bei Substanzklassen wie die der Kohlenhydrate ist die MALDI-Methode besonders wertvoll, da Moleküle sowohl direkt als auch derivatisiert untersucht werden können⁹¹. Mit Einführung der Fragmentationanalytik gewann die MALDI-TOF-Methode auch in diesem Bereich weiter an Attraktivität, da Aussagen über Strukturisomere möglich wurden⁹². Zunehmendes Interesse findet MALDI-TOF-MS in den Teilgebieten der Glycolipide^{93,94}, Nucleotide^{95,96} und Peptid Nucleinsäuren (PNA)^{97,98,99}.

Die MALDI-TOF-Methode zeigt ein hohes Potential bei biomolekularen und mikrobiologischen Fragestellungen¹⁰⁰. Es ist für die Zukunft zu erwarten, dass MALDI-TOF-MS noch in weitere Bereiche Einzug halten wird: Diese beinhalten u.a. das direkte Verfolgen der Proteinexpression oder chemischer Modifikationen von Proteinen als Antwort auf umweltbedingte oder metabolische Stimuli. Der Fortschritt und die Nützlichkeit der MALDI-TOF-MS im Bereich des Biopolymersektors dieser nun mehr als zehn Jahre alten Forschung ist erheblich.

1.1.3.2 Analytik synthetischer Polymere

Die Etablierung der MALDI-TOF-MS-Analyse auf anderen Gebieten als der Biopolymeranalytik setzte erst später ein und lehnte sich konsequent an die MALDI-Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Biopolymere an. Der zeitlich versetzte Einsatz ist u.a. darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz zum Biopolymerbereich ausreichende Mengen an Analyt und damit auch konventionelle analytische Methoden zur Charakterisierung vorhanden waren. So stehen der klassischen Analytik synthetischer Polymere Methoden, wie z.B. die der Gelpermeationschromatographie (GPC), Osmometrie, Lichtstreuung und Viskosimetrie zur Verfügung, die wichtige Fragestellungen hinsichtlich der Molekulargewichtsmittelwerte M_w (massengewichtete mittlere Molmasse) und M_n (zahlengewichtete mittlere Molmasse) prinzipiell klären können. Informationen zu einzelnen Polymerkettenlängen oder Endgruppen sind nur beschränkt unter Anwendung von Methodenkombinationen möglich. Der polydisperse Charakter und der Molekulargewichtsbereich synthetischer Polymere verhinderten lange

Zeit den Einsatz massenspektrometrischer Methoden. Mit Einführung der MALDI-TOF-Methode stand damit erstmals eine MS-Methode zur Verfügung, die bereits zuverlässig komplexe Biopolymergemische und hohe Molekulargewichte zu analysieren vermochte. Im Gegensatz zu klassischen Methoden der Polymeranalytik ist die Möglichkeit eröffnet, direkt ergänzende Strukturinformationen polydisperser Proben zu gewinnen.

MALDI-TOF-MS wurde ab 1992¹⁰¹ auf synthetische Polymere übertragen und charakterisiert diese bis in einen Molmassenbereich von bis zu 1.500 kDa¹⁰² in Ausnahmefällen. Eine besondere Bedeutung kommt der MALDI-TOF-MS bei Fragestellungen zu, bei denen konventionelle Methoden der Polymercharakterisierung versagen, nur unzuverlässig eingesetzt werden können oder nur durch einen großen methodischen Aufwand gelöst werden können.

Eine herausragende Eigenschaft der MALDI-TOF-MS-Analyse ist, dass einzelne Polymerketten innerhalb der Verteilung bis rund 30.000 Da aufgelöst wiedergegeben werden. Damit ist die direkte Charakterisierung der Wiederholungseinheit und der Endgruppen möglich, die bei konventionellen polymeranalytischen Methoden nur durch zeitaufwendige Methodenkombinationen und in einem wesentlich niedrigeren Massenbereich zugänglich sind. Gegenüber konventionellen Methoden der Polymercharakterisierung weist MALDI-TOF-MS sechs wesentliche Vorteile auf:

- kurze Analysendauer (nach vollendeter Probenvorbereitung),
- minimaler Substanzbedarf,
- hohe Massengenauigkeit,
- hohe Massenauflösung,
- hohe Reproduzierbarkeit und
- hoher Informationsgehalt.

Im Bereich < 10.000 Da ist die MALDI-TOF-MS-Methode geeignet, isotopenaufgelöste Signale zu ermitteln und erlaubt damit eine zusätzliche Verifizierung der theoretischen Isotopenverteilung. Die Zuverlässigkeit der Analyse wird weiter erhöht.

Durch die Einführung der MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik für synthetische Polymerfragestellungen konnte die Leistungsfähigkeit der MALDI-TOF-Methode weiter erhöht werden. So kann z.B. erst durch die Fragmentionenanalyse ein komplexes Polycarbonatgemisch vollständig charakterisiert werden¹⁰³. Die Charakterisierung einer derart komplizierten Zusammensetzung einer polydispersen Probe kann mit keiner konventionellen, polymeranalytischen Methode mit gleich geringem Aufwand erzielt werden. Gängigerweise erfolgt die Copolymercharakterisierung direkt durch die mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen. Jedoch können z.B. die Blocklängen eines Poly(ethylenoxid)-*b*-poly(*para*-phenylen ethynylen) nur mit der Fragmentionenanalyse eindeutig bestimmt werden¹⁰⁴. Die Bestimmung der Copolymerzusammensetzung ist mit keiner anderen analytischen Methode direkt zugänglich, jedoch auch bei der MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse noch auf labile Sollbruchstellen zwischen den einzelnen Copolymerblöcken beschränkt.

Die MALDI-TOF-MS ermöglicht ebenfalls die Bestimmung der Molekulargewichtsmittelwerte M_n und M_w , welche im Falle von engen Verteilungen eine sehr gute Übereinstimmung mit den durch konventionelle Methoden erhaltenen Werte erbrachte¹⁰⁵. Mit steigenden Polydispersitäten (ca. $\geq 1,2$)

unterscheiden sich die mit MALDI und GPC ermittelten Molmassenmittelwerte zunehmend. Die berechneten M_n - und M_w -Werte der MALDI-TOF-Methode liegen unterhalb der durch konventionelle Methoden erhaltenen Werte ($< 20\%$)^{106,107}. Diese Abweichungen in der Molekulargewichtsbestimmung einer breiten Polymerverteilung können durch die Methodenkombination von MALDI-TOF-MS und GPC-Fraktionierung behoben werden^{108,109,110,111,112}. Trotz dieser Einschränkung der MALDI-TOF-MS bei der Ermittlung von Molekulargewichtsmittelwerten gelang es der MALDI-TOF-Methode aufgrund der Fülle der gelieferten Informationen, sich als eine wertvolle und notwendige Ergänzung zu konventionellen Methoden der Analytik synthetischer Polymere zu etablieren. Die wachsende Bedeutung, die der MALDI-TOF-MS auf dem Gebiet der synthetischen Polymere zukommt, manifestiert sich nicht zuletzt in der Zahl der Polymer-„Abstracts“ der „American Society for Mass Spectrometry“ (ASMS)-Konferenz, die im Zeitraum von 1989 bis 1997 um mehr als 600 % anstiegen¹¹³.

1.1.3.3 Makromolekülanalytik

Die Erweiterung der MALDI-TOF-MS-Methode auf das Gebiet der Makromolekularen Chemie erfolgte zeitversetzt und in Anlehnung an die MALDI-Biopolymeranalytik. Organische Substanzen sind aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes in der Regel zuverlässig durch konventionelle MS (z.B. EI-MS) und spektroskopische Methoden (z.B. NMR-Spektroskopie) charakterisierbar. Zusätzlich erwies sich der niedrige Massenbereich organischer Substanzen für die MALDI-TOF-MS als nachteilig, da sich eine zu leichte Verdampfbarkeit im Vakuum und zu große Interferenz mit Matrixsignalen zeigten, die eine zuverlässige Charakterisierung dieser niedermolekularen Moleküle und Substanzgemische erschwerten. Mit steigendem Molekulargewicht der organischen Moleküle setzten zum Teil Löslichkeitsprobleme ein, welche die Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS in einem erheblichen Maße erschwerten. Seit es gelang, den interferierenden Matrixuntergrund zu verringern¹¹⁴ bzw. Löslichkeitsprobleme zu bewältigen (z.B. Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe, PAH)¹¹⁵ ist die MALDI-TOF-MS als eine unverzichtbare neue Methode etabliert. Darüber hinaus deckt diese in der organischen Chemie inzwischen Bereiche ab, bei denen etablierte Methoden an ihre Grenzen stoßen^{115,116}, so dass die Charakterisierung der Syntheseprodukte aufgrund fehlender Methoden verhindert war. Damit tritt die generelle Bedeutung des Zusammenspiels zwischen Synthese und Analytik in der Entwicklung von Substanzklassen hervor.

In vielen weiteren Gebieten wie denen der Kombinatorik¹¹⁷ oder Supramolekularen Chemie¹¹⁸ hielt die MALDI-TOF-MS-Methode ebenfalls Einzug. Die Entwicklung der MALDI-TOF-MS-Analyse verhielt sich jedoch in keinem dieser Bereiche ähnlich rasant wie auf dem Biopolymersektor.

1.1.4 Eine Bilanz zur qualitativen und quantitativen MALDI-TOF-MS-Analyse

Die MALDI-TOF-MS-Methode zeigt sich gegenüber anderen MS-Methoden sehr flexibel für die Charakterisierung unterschiedlichster Substanzklassen bei geeigneter Probenpräparation. Sie erlaubt dabei, hohe Molekulargewichte und komplexe Substanzgemische zu analysieren. Durch Fragmentationsanalytik können bei geeigneter Probenpräparation wichtige Strukturinformationen gewonnen werden. Wichtig ist, die großen Spielräume in der Probenpräparation zwischen den und innerhalb der unterschiedlichen Substanzklassen so zu gestalten, dass optimale Signal-zu-Rausch-Verhältnisse erzielt werden. Diese Optimierungsspielräume sind gleichermaßen ein Vorteil wie ein

Nachteil, um das Potential der Methode auszuschöpfen. Jedoch kann in der Regel bei ausreichender Erfahrung ein ausgearbeitetes Messprotokoll MALDI-TOF-MS zu einer sehr leistungsfähigen Methode machen. Da sich der Desorptions- und Ionisierungsprozess noch weitgehend ungeklärt zeigt, ist dieser für jedes neue Polymersystem neu zu erarbeiten. Experimentelle Bedingungen lassen sich nur schwer extrapolieren oder vorhersagen, so dass Messbedingungen durch systematische Veränderungen der Probenpräparation ermittelt werden müssen, um durch geeignete Wahl der experimentellen Parameter ein wirklichkeitstreues Abbild einer Probe zu schaffen:

- Probenvorbereitung: Lösungsmittel, Metallsalz, Matrix, molare Analyt/Matrix-Verhältnisse,
- Probenauftragungstechniken (Kapitel 3.1.1, S. 29),
- Einstellungen des Geräts: Beschleunigungs- und Detektorspannung, Matrixsignalunterdrückung.

Auf allen Gebieten, bei denen die MALDI-TOF-MS ihre Anwendung gefunden hat, zeigt sie sich als eine sehr effektive Methode, die nach beendeter Probenvorbereitung schnell und reproduzierbar bei geringem Substanzbedarf eine hohe Massengenauigkeit und -auflösung erzielt. Die hohe Reproduzierbarkeit beschränkt sich dabei auf qualitative Aussagen und nicht auf quantitative, da die Desorptions- und Ionisationswahrscheinlichkeiten der Gemischbestandteile unterschiedlich sind und zu ausgeprägten Suppressionseffekten führen können. Die Quantifizierbarkeit ist daher auf allen Substanzgebieten gleichermaßen auf Sonderfälle beschränkt^{91,119,120,121}.

1.1.5 Analytische Möglichkeiten und gegenwärtige Limitierungen der MALDI-TOF-MS

Die kürzlich entwickelten Probenpräparationsmethoden^{115,122} verzichten vollständig auf Lösungsmittel, um unlösliche Substanzen einer MALDI-TOF-MS-Charakterisierung zuzuführen. Dieser analytische Ansatz erlaubte erstmals und bislang einzigartig die MALDI-Charakterisierung eines unlöslichen Analyten¹¹⁵. Das generelle Potential zur MALDI-TOF-MS-Charakterisierung von unlöslichen Substanzen ist noch weitgehend unerforscht. Geeignete Untersuchungen könnten diese auf den Bereich der Polymeranalytik übertragen, um die Zugänglichkeit unlöslicher synthetischer Polymere zu beurteilen.

Aufgrund der Komplexität der Probenpräparation zeigt sich der steigende Bedarf einer generelleren MALDI-Präparationsmethode, die aufgrund weniger kritischer Parameter einfacher anzuwenden ist. Da das Lösungsmittel einen großen Einfluss ausübt, könnten diese neuen Entwicklungen in der MALDI-Probenpräparation^{115,122} bislang unbeachtete Entwicklungsmöglichkeiten zur Vereinfachung der generellen MALDI-TOF-MS-Analyse eröffnen.

Da das tatsächliche Verständnis der zugrundeliegenden MALDI-Prozesse nach wie vor gering ist, könnten geeignete Modellexperimente unter Berücksichtigung der lösungsmittelfreien Probenpräparation ein tieferes theoretisches Verständnis der Analyt-Matrix-Vororganisation ermöglichen.

Die Fragmentionenanalytik ist im Bereich der Biopolymere als ergänzende Methode zur Strukturverifizierung etabliert. Abhängigkeiten insbesondere hinsichtlich der verwendeten Matrices konnten aufgezeigt werden¹²³. Biopolymere weisen durch die zahlreichen Heteroatombindungen im

Gegensatz zu synthetischen Polymeren eine Vielfalt an Sollbruchstellen auf. Aus diesem Grund ist die Polymerfragmentationenanalytik deutlich benachteiligt, um zusätzliche Informationen durch spezifische Fragmentierung zu erhalten. Dennoch gelingt eine genauere Endgruppenbestimmung in komplexeren Systemen¹⁰³. Unter der Voraussetzung einer labilen Sollbruchstelle zwischen den Copolymerblöcken konnte auch die Copolymerzusammensetzung eines Diblockcopolymers ermittelt werden¹⁰⁴. Bei der angewendeten PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungsmethode wird die Aktivierungsenergie lediglich durch eine Änderung der Laserleistung geregelt und lässt damit nur einen geringfügigen Einfluss auf den Fragmentierungsmechanismus zu. Bei der „Collision-Induced Dissociation“ (CID)-Fragmentierungsmethode beruht die Fragmentierung dagegen auf Stößen mit einem nach der Beschleunigungszone eingelassenen, regelbaren Stoßgas. Dadurch könnten prinzipiell die Fragmentationenausbeuten erhöht oder aufgrund veränderter Zerfallsprozesse zusätzliche Strukturinformationen gewonnen werden. In der Polymerfragmentationenanalytik besteht damit noch breiter Entwicklungsbedarf. Systematische Untersuchungen zu

- probenspezifischen (z.B. Molekulargewicht),
- probenpräparationsspezifischen (z.B. Matrix, Kationisierungsmetallsalz),
- methodenspezifischen (z.B. PSD-, CID-Fragmentationenanalyse) und
- parameterspezifischen (z.B. Druck, elektronisches „Gate“, Stoßgas, Beschleunigungsspannung)

Grundlagen könnten ein tieferes Verständnis und damit optimierte Bedingungen ermöglichen. Damit könnten erstmals zusätzliche Strukturinformationen von komplexeren Polymerstrukturen wie z.B. statistischer Copolymere oder sternartiger Copolymere ermittelt werden.

Die Bedeutung der MALDI-TOF-MS ist im Bereich der synthetischen Chemie in unterschiedlichem Maße erkannt, jedoch sind deren Möglichkeiten und Grenzen insbesondere zur Strukturbestimmung schwer charakterisierbarer Substanzen, die mit konventionellen Methoden der spektroskopischen und massenspektrometrischen Analytik nahezu uncharakterisierbar sind, nur wenig definiert. Detailliertere Untersuchungen möglichst verschiedenartiger, schwer charakterisierbarer Analyten könnte das Potential der MALDI-TOF-MS-Analyse hervorheben und komplexe, analytische Schwierigkeiten verbessern.

Supramolekulare Strukturen können aufgrund der schwachen Bindungskräfte dieser Substanzen nicht oder nur unzuverlässig mittels konventionellen Analysenmethoden nachgewiesen werden. Die Charakterisierung dieser Analyten mittels MALDI-TOF-MS-Analyse ist unabhängig von ihrer Herkunft bislang nur auf Sonderfälle beschränkt wie z.B. die der nicht-kovalenten Biopolymerkomplexe¹²⁴ und den anorganischen metallo-supramolekularen Strukturen¹²⁵. Damit könnten sich der MALDI-TOF-MS-Methode neue supramolekulare Substanzklassen eröffnen.

Fragmentierungslabile Substanzen, wie sie z.B. UV-Laserwellenlängen absorbierende Substanzen darstellen, sind aufgrund der erhöhten Fragmentierungstendenz einer MALDI-TOF-MS-Charakterisierung erschwert zugänglich. Eine besondere Bedeutung kommt dabei nicht nur der Probenpräparation, sondern auch der Durchführung der Messung zu. Die Bedeutung des Zusammenspiels der MALDI-TOF-MS und der MALDI-TOF-Fragmentationenanalytik ist in vielen Gebieten der Polymer- und Makromolekülanalytik nicht erkannt bzw. der Informationsgehalt

unterschätzt. Das Potential der massenspektrometrischen Analysemethoden könnte an ausgewählten Beispielen die Leistungsfähigkeit zeigen, um die Bedeutung der MALDI-TOF-MS-Analyse für die synthetische Chemie zur Reaktions- und Produktkontrolle hervorzuheben. Eine weitere schwierig zu charakterisierende Substanzklasse stellen Substanzen wie die der PAHs dar, die aufgrund ihrer unzureichenden Löslichkeit zum Teil erst durch die eigens für diese Substanzklasse entwickelte MALDI-Probenpräparationsmethode zugänglich gemacht werden konnten¹¹⁵. Eine anschließende semiquantitative Analyse ließ auf einen wesentlich höheren Reinheitsgrad der Probe, als im lösungsmittelfreien MALDI-TOF-Massenspektrum angedeutet, schließen. Mangels ergänzender Charakterisierungsmethoden ist die Produktaufklärung der PAHs erschwert. Mittels detaillierterer MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-Fragmentuntersuchungen würde sich die Möglichkeit bieten unter Berücksichtigung der Synthesedurchführung wertvolle Reaktionsanalytik betreiben zu können.

Erfolgreiche Quantifizierungen mittels MALDI-TOF-MS sind unabhängig von der Herkunft des Analyten bislang nur auf Sonderfälle beschränkt^{120,121}. Die Probenvorbereitung (Lösungsmittel, Matrix, Metallsalz, Auftragungsmethode) stellt dabei einen komplexen Prozess dar, der entsprechend jeder Substanz eingehend untersucht werden muss, um „Response“-Faktoren ermitteln zu können. Die Polymerverteilung erhöht die Komplexität der Untersuchung. Desorptions- und Ionisationswahrscheinlichkeiten bei optimierten Präparationsbedingungen sind Parameter, die sich dann außerhalb des einflussnehmenden Bereiches befinden. Jedoch könnten durch ein tieferes Verständnis mittels Modelluntersuchungen analytische Möglichkeiten erarbeitet werden.

1.2 Zielsetzungen

Zielsetzung dieser Arbeit sind methodische Entwicklungen der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations- (MALDI) Time-of-Flight-(TOF) Massenspektrometrie (MS) zur Charakterisierung von Polymeren und Makromolekülen. Durch die Wahl geeigneter Analyten und unter Berücksichtigung ergänzender analytischer Methoden sollen neue Möglichkeiten der MALDI-TOF-MS-Methode erarbeitet und deren Grenzen definiert werden.

Im Einzelnen lassen sich folgende Ziele formulieren:

- Die MALDI-Probenpräparationsmethode soll auf die Entwicklungsmöglichkeiten zur Verbesserung und Vereinfachung der generellen MALDI-Methode überprüft werden. Durch systematischen Vergleich der lösungsmittelfreien mit der konventionellen lösungsmittelbasierenden Probenvorbereitung sollen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowie deren Vorteile und Limitierungen zur Charakterisierung von löslichen und unlöslichen Analyten erarbeitet werden.
- Modellexperimente sollen entwickelt werden, um weiterführende Erkenntnisse hinsichtlich der gültigen Modellvorstellungen der MALDI-TOF-MS-Methode zu erhalten.
- Für die MALDI-Fragmentionenanalytik soll der Einfluss von experimentellen Parametern auf das Fragmentierungsverhalten der Polymere und die Anwendbarkeit zur direkten Bestimmung von Copolymerzusammensetzungen untersucht werden. Durch einen systematischen Vergleich von unterschiedlichen Anregungsverfahren an geeigneten Makromolekülen sollen deren Potential, Gemeinsamkeiten und Unterschiede definiert werden.
- Durch geeignete Probenpräparations- und Messbedingungen soll die MALDI-TOF-MS für die direkte Analyse schwer charakterisierbarer labiler bzw. unlöslicher Analyten und Substanzgemische genutzt werden. Dabei sollen außerdem die analytischen Möglichkeiten und Limitierungen zur Charakterisierung von supramolekularen Komplexen anhand geeigneter Modellsysteme ermittelt werden.
- Die analytischen Möglichkeiten und Limitierungen zur quantitativen Charakterisierung von Gemischbestandteilen mittels MALDI-TOF-MS sollen durch geeignete Modelluntersuchungen aufgezeigt und an ausgewählten Beispielen durchgeführt werden.

2 ANALYTIK

2.1 MALDI-TOF-MS

2.1.1 Bedeutung der Probenpräparation

Bislang wurde vermutet, dass die Löslichkeits- und die Mischbarkeitseigenschaften von Analyt und Matrix in Lösung und im Kristall und damit einhergehend die Probenauftragung ein ausschlaggebendes Kriterium sind, um den Analyten in den Kristall (s. **Abb. 1-3**, S. 5) einbauen zu können⁸⁵. Nur so ist eine gute Isolierung der Analytmoleküle voneinander gewährleistet und damit eine Reduzierung der intermolekularen Kräfte möglich¹²⁶. Auf die Verschiedenartigkeit der Matrices und die Vielschichtigkeit der Probenpräparation soll hier näher eingegangen werden.

Nach dem Auftragen der Analyt-Matrix-Mischung auf den MALDI-Probenträger erfolgt die Auskristallisation durch Verdampfen des Lösungsmittels. Danach wird der Probenträger in die unter Vakuum stehende Probenkammer des Massenspektrometers überführt. Als Matrices dienen niedermolekulare organische Verbindungen (**Tabelle 2-1**), die im Bereich der verwendeten Laserwellenlänge (337 nm) ausreichend absorbieren. Jedoch ist unverständlich, welche Eigenschaften der Matrix für ihre spezifischen und außergewöhnlichen Eigenschaften verantwortlich sind, die folglich die optimalen Analyt-Matrix-Kombinationen ausmachen. Dies kann trotz ähnlicher Absorptionseigenschaften der verwendeten Matrices starke Qualitätsunterschiede in den Massenspektren des Analyten verursachen. Um erfolgreich UV-MALDI-Charakterisierungen durchzuführen, wurden bei den unterschiedlichen Substanzklassen (**Tabelle 2-1**) trotz gleicher Löslichkeitseigenschaften verschiedene Matrices eingesetzt.

Bei systematischen Untersuchungen von Biopolymeren konnte gezeigt werden, dass verschiedene Matrices in unterschiedlichem Ausmaß Fragmentierung der Analyte induzieren¹²³. „Heiße“ Matrices induzieren höhere Fragmentanteile als „kalte“. Für die MALDI-Fragmentionenanalytik kann es aus diesem Grund vorteilhaft sein, „heiße“ Matrices (z.B. HCCA) zu verwenden und „kalte“ (z.B. DHB) für fragmentierungsarme MALDI-TOF-MS-Analysen. Damit übt neben der Wahl der Probenvorbereitung insbesondere die der Matrix einen entscheidenden Einfluss auf die MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse aus.

Tabelle 2-1: Gängige MALDI-Matrices, deren Lösungseigenschaften und Anwendungsgebiete.

Matrix (Abk.; Molmasse in Da)	Strukturformel	Lösungsmittel	Anwendungsgebiete
all-trans-Retinoesäure (Vit.A; 300,44)		THF, CH ₂ Cl ₂	Synthetische Polymere
5-Chlorsalicylsäure (CSA; 172,57)		wässrig	Synthetische Polymere
α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (HCCA; 189,2)		wässrig	Biopolymere
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB; 154,12)		wässrig	Biopolymere Synthetische Polymere Oligonucleotide
2-(4'-Hydroxybenzolazo)- benzoesäure (HABA; 242,23)		THF, CH ₂ Cl ₂	Synthetische Polymere
2-Hydroxy-5-methoxy- benzoesäure (HMB; 168,15)		wässrig	Synthetische Polymere
3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA; 139,11)		wässrig	Oligonucleotide
9-Nitroanthracen (NA; 223,23)		THF, CH ₂ Cl ₂	Synthetische Polymere
3-Nitrobenzylalkohol (NBA; 153,14)		Aceton	Synthetische Polymere
trans-3-(3-Indolyl)-acrylsäure (IAA; 187,20)		Methanol	Synthetische Polymere
7,7,8,8-Tetracyanochino- dimethan (TCNQ; 204,19)		Partiel in THF	Organische Makromoleküle
trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxy- zimtsäure (SA; 224,21)		wässrig	Biopolymere
1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol; 226,23)		THF, CH ₂ Cl ₂	Synthetische Polymere

Die verzögerte Entwicklung der Charakterisierung verschiedener Substanzklassen ist neben ausreichenden Substanzmengen und hinreichend etablierten Methoden auf ihre grundlegenden Unterschiedlichkeiten in der Probenpräparation zurückzuführen. Die Komplexität der MALDI-TOF-Probenpräparation und der -Messanalytik ist in groben Zügen in **Tabelle 2-2** zusammengestellt.

Tabelle 2-2: Probenpräparation und Ionisation nach Art des Analyten.

Art des Analyten	Ionisation	Bemerkungen/Probleme
Proteine und Peptide	Protonierung (Einsatz von 0,1 % TFA ¹²⁷)	Eingeschränkte Lösungsmittelwahl Aufreinigung ¹²⁸
Oligonucleotide	negative Ionen im negativen Messmodus ¹²⁹ (Einsatz von Matrices und Co-Matrices ¹³¹)	Sehr geringe Substanzmengen ^{70,87} Instabil aufgrund der Protonierung der Oligonucleobase ¹³⁰ Sehr hohe Sensitivität gegenüber Protonen und Salzen ¹³¹
Synthetische Polymere		Polydispersität ¹⁰⁶⁻¹¹²
Organische Makromoleküle	Pseudo-Molekülionbildung (Einsatz von Metallsalzen ^{113,132})	Mangel an geeigneten protonierbaren Heteroatomen Löslichkeit ¹¹⁵ Fragmentierung

Folgende gängige Probenpräparationsbedingungen lassen sich neben den Probenpräparations- und Messbedingungen, die sich aus der präferentiellen Ionisation ergeben (**Tabelle 2-2**), weiter zusammenfassen:

- Molare Analyt/Matrix-Verhältnisse:
Biopolymere und Oligonucleotide $1/10^4$ bis $1/10^6$ ¹³³
Synthetische Polymere und Makromoleküle 1/500 (bei Dithranol-Matrix)
- Probenauftragungsmethode:
Probenunabhängig; im allgemeinen sehr variabel (Erläuterung s. Kapitel 3.1, S. 29)
- Probenpräparationsmethode:
Unlösliche PAHs durch lösungsmittelfreie Probenpräparation¹¹⁵; Durchmischung erfolgt durch Mahlvorgang

2.1.2 Aufbau und Messprinzip eines MALDI-TOF-Massenspektrometers

Die Abkürzung MALDI-TOF steht für die Kombination aus einer Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-(MALDI)-Ionenquelle und einem „Time-of-Flight“ (TOF) Flugzeitanalysator⁷⁰. MALDI-TOF-MS ist eine diskontinuierliche Methode bei der die Desorption der Ionen jeweils als Folge von einzelnen Laserblitzen erfolgt, d.h. die Abfolge der Ionenerzeugung, Beschleunigung und Trennung wird in kurzen Zeitabständen wiederholt. Aufgrund des gepulsten MALDI-Ionisationsverfahrens lässt sich dieses besonders vorteilhaft mit dem ebenfalls diskontinuierlichen Betriebsmodus des TOF-Analysators koppeln. Die weiteren Vorteile der MALDI-TOF-MS-Methode liegen in einem prinzipiell unbegrenzten Massenbereich (z.B. Polystyrol (PS), 1.500 kDa¹⁰²) und in der sehr hohen Transmission des Flugzeitmassenspektrometers (bis 100 %), wodurch sehr hohe Nachweisempfindlichkeiten für Makromoleküle erreicht werden (z.B. 200 kDa Proteine im Femtomolbereich).

Der Aufbau der verwendeten MALDI-TOF-Massenspektrometer ist in **Abb. 2-1** wiedergegeben. Die Ionenquelle besteht aus einer geladenen Metallelektrode (dem mobilen MALDI-Proben-träger) und einer geerdeten Beschleunigungselektrode. Als Lasersystem wird ein N₂-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Pulsbreite von 3 ns angewendet. Die Laserleistung ist ein relatives Maß und lässt sich als prozentuale Laserabschwächung definieren (=100 % - Laserabschwächung). Die prozentuale Abschwächung des Lasers wird über die Software geregelt, jedoch besteht kein linearer Zusammenhang zwischen Laserleistung und -abschwächung.

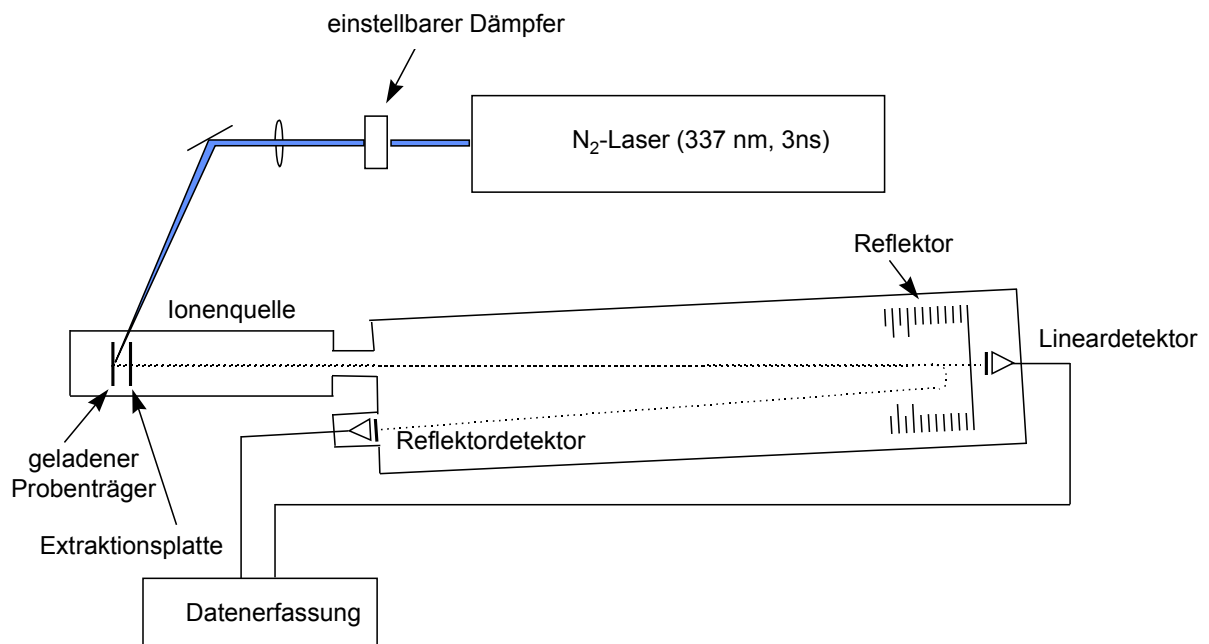


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau des verwendeten MALDI-TOF-Massenspektrometers.

Außerhalb des Massenspektrometers wird bei der MALDI-Probenpräparation (Kapitel 2.1.1, S. 15) die Analyt-Matrix-Mischung auf den mobilen MALDI-Proben-träger aufgebracht und durch Vakuumschleusen in die Ionenquelle eingebracht. Durch den Laserpuls (Kapitel 2.1.2, S. 18) erfolgt sowohl der Start der Flugzeitmessung als auch der Beschuss des Analyt-Matrix-Kristalls in der

Ionenquelle. In diesem Desorptions/Ionisationsprozess werden durch die bei der Laserwellenlänge absorbierende Matrix gasförmige Analytionen erzeugt. Diese werden in einem anliegenden starken elektrischen Feld (10 bis 30 kV) beschleunigt und im TOF-Analysator nach der Flugzeit getrennt. Nach **Gleichung 2-1** haben die Molekülionen nach Durchlaufen des Spannungsgefälles die gleiche, definierte kinetische Energie.

$$E_{kin} = U \cdot z = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

Gleichung 2-1

E_{kin}	kinetische Energie
U	Beschleunigungsspannung
z	Elementarladung
m	Ionenmasse
v	Ionengeschwindigkeit

Die gleiche kinetische Energie der Molekülionen führt in der Flugstrecke des TOF-MS zu unterschiedlichen Flugzeiten t in Abhängigkeit vom m/z . Nach definierter Flugstrecke L treffen die Ionen auf den Detektor. Die Aufnahme des Detektorsignals nach der Flugzeit ergibt zunächst das TOF-Massenspektrum in Abhängigkeit von der Zeit, welches sich dann in eine m/z -Abszisse umrechnen lässt. Mit **Gleichung 2-1** ergibt sich durch Substitution von $v = \frac{L}{t}$ und Umformung für m/z die **Gleichung 2-2**.

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot U}{L^2} \cdot t^2$$

Gleichung 2-2

L	definierte Länge der Flugstrecke
t	Flugzeit des Molekülions

Die Registrierung der Analytionen kann im Linear- oder im Reflektordetektor erfolgen (Kapitel 2.1.4, S. 22)¹³⁴. Das Datensystem liefert die Massenspektren.

Die Kalibrierung des MALDI-TOF-Massenspektrometers erfolgt mit einem Standard (z.B. Polystyrol, Poly(ethylenglykol), Fulleren, Rinderinsulin) mit bekanntem Molekulargewicht, indem die gemessenen Flugzeiten den bekannten m/z -Verhältnissen zugeordnet werden. Die Wahl des geeigneten Standards wird durch den Massenbereich des Analyten definiert. Die Genauigkeit der Massenbestimmung des Analyten beträgt etwa 0,01 bis 0,1 %.

2.1.3 Interpretation von MALDI-TOF-Massenspektren

Synthetische Polymere und organische Substanzen können im Fall mangelnder protonierbarer Heteroatome bevorzugt unter Ausbildung eines **Metall-Pseudo-Moleküliions** erfolgreich analysiert werden. Aus diesem Grund wird der Analyt-Matrix-Mischung oft ein zum Analyten zehnmolarer Überschuss eines gelösten Metalltrifluoracetatsalzes gezielt zugesetzt, um die Ionisierung des Analyten zu begünstigen. Die Reproduzierbarkeit der Pseudo-Molekülionenbildung wird dadurch erhöht, so dass die in der Analyt-Matrix-Mischung vorkommenden zufälligen Verunreinigungen durch Metallspuren unterdrückt werden, welche ebenfalls zur Ionenbildung beitragen können, aber andere Molekulargewichte liefern.

Ein typisches MALDI-TOF-Massenspektrum ist in **Abb. 2-2** dargestellt, bei dem die Pseudo-Molekülionenbildung von Bedeutung ist. Bei der Probe handelt es sich um ein Reaktionsgemisch eines peracetylierten Kohlenhydrates. Dabei ist die konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-Probenpräparation unter Verwendung von Dithranol und THF und einem gezielten Zusatz von Silbertrifluoracetat (**Abb. 2-2**) angewendet worden.

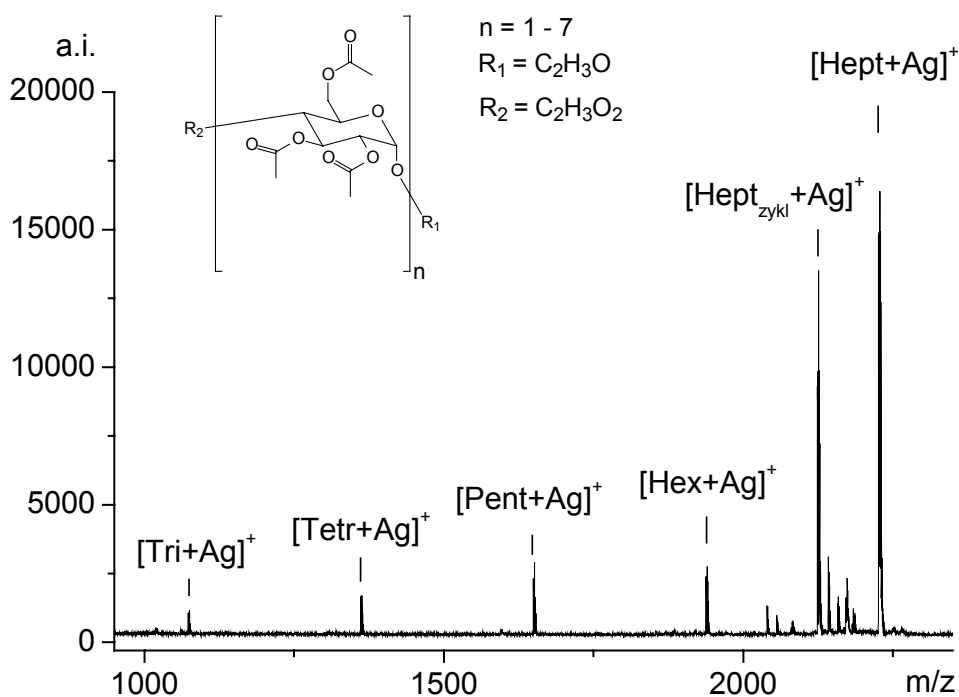


Abb. 2-2: MALDI-TOF-Massenspektrum: Ag-Pseudo-Molekülions eines Kohlenhydrates (Kapitel 3.3.1.3.1, S. 132).

Der Abstand der Signale der einzelnen Kettenlängen untereinander beträgt 289 Da und gibt das Molekulargewicht der Kohlenhydratwiederholungseinheit (C₁₂H₁₇O₈) wieder. Die absolute Masse einer jeden detektierten Kettenlänge setzt sich aus der Masse aller Wiederholungseinheiten, der beiden Acetylendgruppen und der für die Ionisation verwendeten Masse des Silberkations zusammen. Die theoretische absolute Masse einer Polymerkette lässt sich damit mittels **Gleichung 2-3** berechnen:

$$M[\text{g/mol}] = n \cdot 289,09 + 43,02 + 59,01 + 106,91$$

Gleichung 2-3

n	Anzahl der Kohlenhydratwiederholungseinheiten
289,09	Monoisotopisches Molekulargewicht der Wiederholungseinheit des Oligosaccharides
43,02	Monoisotopisches Molekulargewicht der Endgruppe mit $R_1 = \text{C}_2\text{H}_3\text{O}$
59,01	Monoisotopisches Molekulargewicht der Endgruppe mit $R_2 = \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$
106,91	Monoisotopisches Atomgewicht des Silberkations

Die gefundenen Massen mit den intensivsten Signalen können damit eindeutig den unterschiedlichen Oligomerisationsgraden der linearen, acetylierten Tri- bis Heptamere und dem zyklischen, acetylierten Heptamer jeweils als Ag-Pseudo-Molekülonen zugeordnet werden. Im Bereich des Heptamers ist diese Zuordnung nicht mehr möglich. Eine effektive Möglichkeit, um eine Differenzierung zwischen chemischer und massenspektrometrischer Herkunft der Signale im höheren Molekulargewichtsbereich machen zu können, besteht darin, Messungen durch Variation der Metallsalzzugabe zu ergänzen (**Abb. 2-2**).

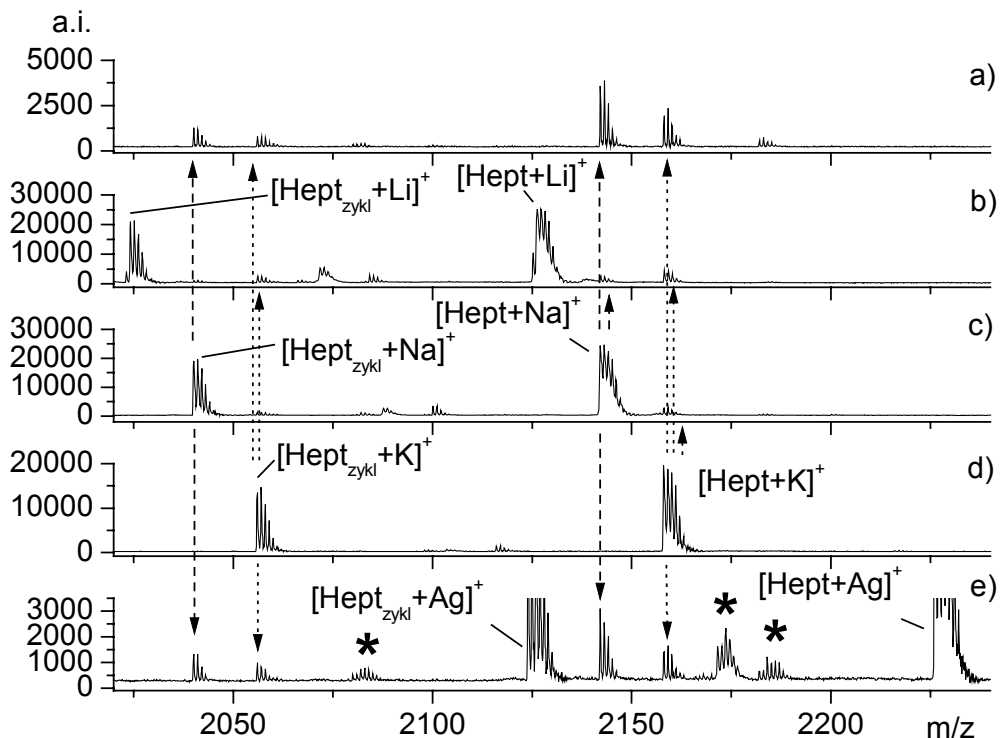


Abb. 2-3: Variable Metall-Pseudo-Molekülonenbildungen zur eindeutigen Charakterisierung, veranschaulicht am Beispiel eines Kohlenhydrates (Kapitel 3.3.1.3.1, S. 132); weitere Ag-Pseudo-Molekülonen sind mit * gekennzeichnet: a) ohne Metallsalzzugabe; b) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$; c) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$; d) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{K}$; e) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$.

In **Abb. 2-3** wird gezeigt, dass trotz gezielter Zugabe von Silbertrifluoracetat zur Probenmischung das erhaltene Massenspektrum Signale zeigt, welche durch konkurrierende Pseudo-Molekulationen der linearen und zyklischen, vollständig acetylierten Strukturen mit Natrium- und Kaliumkationen gebildet werden. Dabei kann festgehalten werden, dass die letztere die bevorzugte Pseudo-Molekulationbildung mit den Analyten ist, da bei dem erhaltenen Massenspektrum (**Abb. 2-3d**) keine konkurrierenden Ionisationen gefunden werden. Dabei wird deutlich, wie nachdrücklich eine Spektreninterpretation durch zusätzliche, konkurrierende Pseudo-Molekulationbildungen erschwert ist.

Zusätzlich zur Verschiebung der Signallagen um die Massen des eingesetzten Metallkations kann die Isotopenauflösung durch Vergleich mit einer entsprechenden Isotopensimulation zur eindeutigen Charakterisierung herangezogen werden. So können in **Abb. 2-3e** neben den überlagerten Signalen konkurrierender Na- und K- eindeutig zusätzliche Ag-Pseudo-Molekulationbildungen erkannt werden. Diese durch * hervorgehobenen Ag-Pseudo-Molekulationen können im Folgenden dann als lineare und zyklische Struktur des Heptamers mit einer unvollständigen Acetylierung berechnet werden.

Aus diesem Beispiel geht hervor, wie wichtig die Metallsalzzugabe ist, um ein Molekül mangels protonierbarer Stellen einer massenspektrometrischen Untersuchung zugänglich machen zu können (**Abb. 2-3a**). Des Weiteren wird die variable, konkurrierende und nur bedingt vorhersagbare Pseudo-Molekulationbildung auch bei gezielter Metallsalzzugabe (**Abb. 2-3b,c,e**) deutlich. Daher muss bei jeder massenspektrometrischen Untersuchung die Art der Ionisation des Analyten sichergestellt werden, um eine eindeutige Interpretation des Massenspektrums zu ermöglichen.

2.1.4 Detektionsmodi und deren praktische Bedeutung für die Fragmentionenanalyse

Die einfachste Konfiguration des TOF-MS ist der lineare Detektionsmodus, bei dem Ionen nach ihrer Beschleunigung und Durchlaufen der Flugstrecke auf einen Detektor am Ende des Flugrohrs treffen. Dieser Detektionsmodus ist von untergeordneter Bedeutung, da die erhaltenen Molekülsignale nur mit relativ geringer Auflösung erhalten werden, wofür eine Kombination experimenteller Faktoren wie z.B. der Zeitpunkt der Ionenerzeugung, die anfängliche Energieverteilung und die Coulombabstoßung verantwortlich sind. Die durch die Energieverteilung der Ionen bedingte geringe Auflösung im linearen Detektionsmodus kann durch die Anwendung des Ionenreflektrons deutlich verbessert werden.

Das Ionenreflektron ist vor dem Lineardetektor angeordnet und besteht aus einem entgegengerichteten, leicht gewinkelten elektrischen Feld, das geringfügig höher als das Beschleunigungspotential eingestellt ist. Die eintreffenden Ionen dringen in das Ionenreflektron ein, bis sie ihre kinetische Energie vollständig verloren haben, werden umgelenkt und auf den Reflektordetektor weiterbeschleunigt. Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis, aber größerer kinetischer Energie dringen tiefer in das Reflektionsfeld ein als Ionen, die eine kleinere kinetische Energie besitzen. Die Ionen mit der größeren kinetischen Energie treffen daher verzögert auf dem Reflektordetektor ein. Die Auflösung sowie die Massengenauigkeit der Messung werden gesteigert, jedoch wird die hohe Empfindlichkeit des TOF-MS leicht eingebüßt, da die vor dem Ionenreflektron zerfallenen Molekulationen nicht detektiert werden können.

Die praktische Bedeutung des linearen Detektionsmodus besteht darin, dass ein Zerfall von Ionen nach der Beschleunigung keinen Einfluss auf das erhaltene Massenspektrum hat, da sich die Geschwindigkeit der Bruchstücke nach dem Zerfall nur unwesentlich ändert. Aus diesem Grund werden „Post-Source Decay“ (PSD)-Fragmentationen, also Fragmentationen, die in der Flugstrecke durch metastabilen Zerfall gebildet werden, zum gleichen Zeitpunkt am Lineardetektor registriert, bei dem die intakten Elternionen registriert worden wären. Damit können am Lineardetektor ausschließlich Fragmentationen, die vor der Beschleunigungsphase und damit innerhalb der Quelle entstehen, die sogenannten „In-Source Decay“ (ISD)-Fragmentationen, registriert werden, nicht jedoch PSD-Fragmentationen. Im Reflektordetektionsmodus werden beide Arten an Fragmentationen detektiert (**Abb. 2-4**), da die PSD-Fragmente durch das Reflektron (Kapitel 2.2, S. 24) nach ihrer Masse getrennt werden. Vergleichsmessungen in den beiden Detektionsmodi bieten die Möglichkeit, die Herkunft eines Fragmentes indirekt zu bestimmen.

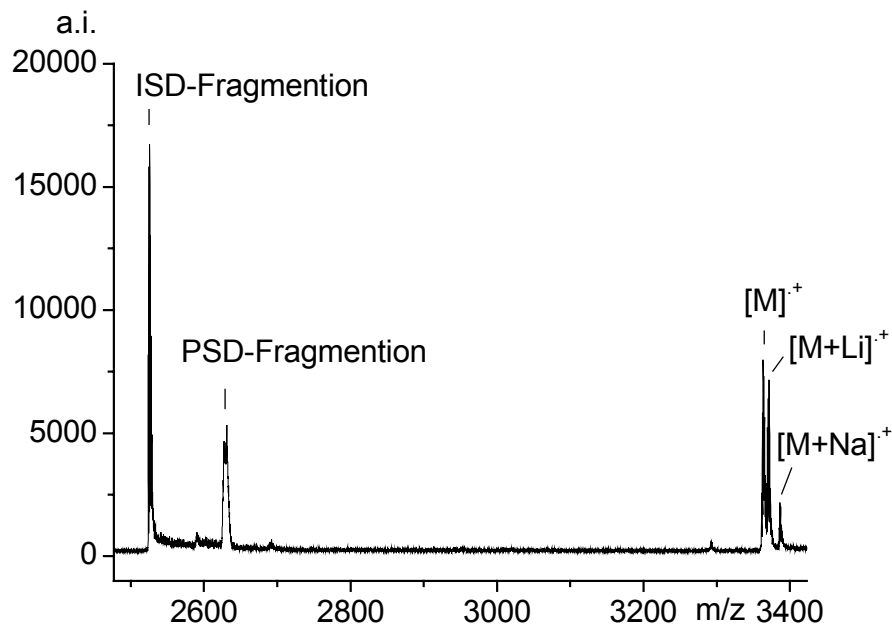


Abb. 2-4: Ein Reflektor-MALDI-TOF-Massenspektrum eines Dendrimers (Kapitel 3.4.3.5, S. 172) zeigt neben intaktem Elternion dominante ISD- und PSD-Fragmentierung.

Der Nachteil dieses analytischen Ansatzes besteht darin, dass nur die ISD-Fragmente mit der korrekten Kalibrierung detektiert werden, da diese schon in der Quelle und damit vor der Beschleunigungsphase entstehen. PSD-Fragmente dagegen besitzen einen Bruchteil der kinetischen Energie des Elternions und erreichen den Reflektordetektor zu einem späteren Zeitpunkt als das identische ISD-Fragment und werden intrinsisch mit einer falschen Kalibrierung detektiert. Über die Struktur lässt sich daher nur für das ISD-Fragment, jedoch nicht für das PSD-Fragment eine Aussage treffen. Zur Veranschaulichung der Komplexität dieses Sachverhaltes ist in **Abb. 2-4** ein Reflektor-MALDI-TOF-Massenspektrum eines Dendrimers (Kapitel 3.4.3.5, S. 172) dargestellt, welches ISD- und PSD-Fragmente zeigt.

2.2 MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik

2.2.1 Grundlagen

Der MALDI-Prozess verläuft derart schonend (Kapitel 1.1.2, S. 4), dass Analytionen bis einige hunderttausend Dalton intakt produziert werden können. Eine „**In-Source Decay**“ (**ISD-Fragmentierung**) resultiert aus einem spontanen Zerfall in der Quelle und kann in der Regel durch geeignete experimentelle Bedingungen vermieden werden. ISD-Fragmentionen können jedoch durch Vergleichsmessungen im Linear- und Reflektordetektionsmodus (Kapitel 2.1.3, S. 20) indirekt nachgewiesen werden. Intakt desorbierte Analytionen können nach dem Verlassen der Quelle und der Beschleunigungszone einer „**Post-Source Decay**“ (**PSD-Fragmentierung**) in der Driftstrecke des Flugzeitmassenspektrometers unterliegen. Die Fragmentionen, die aus einem solchen metastabilen Zerfall resultieren, konnten erstmals in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer von Kaufmann *et al.* 1991 von Peptiden detektiert werden^{83,84}.

Die benötigte Aktivierungsenergie des PSD-Fragmentprozesses („In-Source“-Aktivierung) erfährt der Analyt in der Ionenquelle des Massenspektrometers während der Beschleunigungsphase durch Stöße in der Ausbreitungswolke, in der ein hoher lokaler Druck auftritt. Trotz des hohen Vakuums in der Driftstrecke des Massenspektrometers erfolgt zusätzlich eine Aktivierung des Analyten durch Stöße mit Restgasmolekülen („In-flight“-Aktivierung)¹³⁵, welche jedoch bei einem typischen Gasdruck von 8×10^{-7} mbar selten sind¹³⁶.

Die Stoßaktivierung kann stark erhöht werden, indem ein entsprechendes Stoßgas nach der Beschleunigungszone eingelassen wird. Dieser stoßinduzierte Zerfall eines Analyten in der Driftstrecke des Flugzeitmassenspektrometers wird dann als „**Collision-Induced Decay**“ (**CID-Fragmentierung**) bezeichnet. Bei dieser stoßinduzierten Aktivierungsmethode liegt der Restgasdruck typischerweise bei 3×10^{-6} mbar.

Der **PSD-** und **CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik** liegen damit gleichermaßen eine Fragmentierung innerhalb der Driftstrecke zugrunde. Das zunächst intakte, aktivierte Elternion zerfällt in der Driftstrecke vor dem Reflektor (**Abb. 2-5**) in ein geladenes Fragmention und in ein neutrales Fragmentmolekül. Da die Fragmentierung nach der Beschleunigungszone stattfindet, bewegen sich beide Fragmente mit der gleichen Geschwindigkeit fort wie das Elternion. Fragmente und Elternion treffen folglich zum gleichen Zeitpunkt auf den Lineardetektor und sind daher nicht differenzierbar.

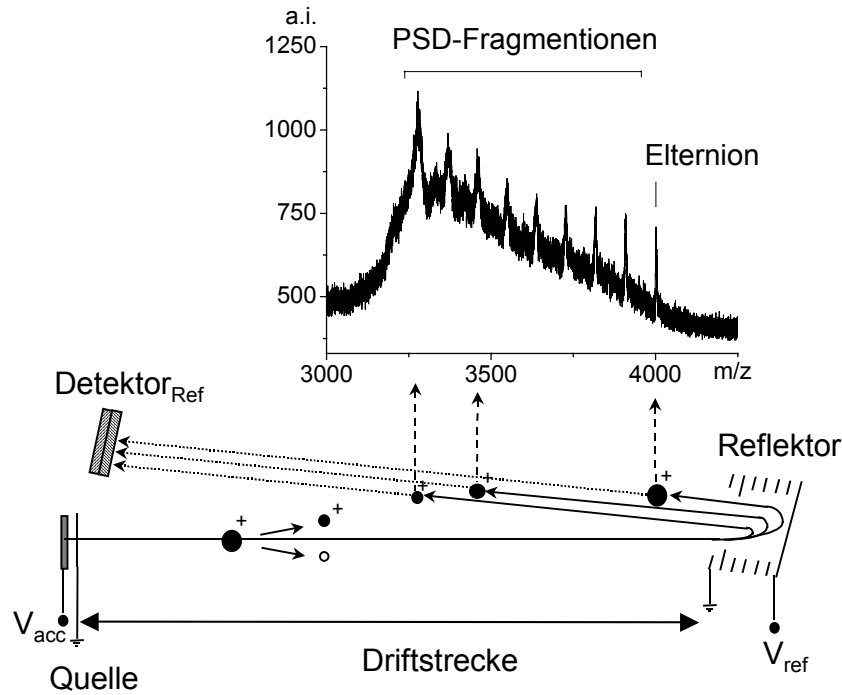


Abb. 2-5: Schematische Darstellung des PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungsprozesses, veranschaulicht an einem Reflektrom-MALDI-TOF-Massenspektrum eines Dendrimers unter Anwendung erhöhter Beschleunigungsspannungen (Kapitel 3.4.3.2, S. 154).

Der Reflektormodus (**Abb. 2-5**) erlaubt dagegen eine entsprechende Differenzierung und damit Charakterisierung von Fragmentationen. Da Fragmentationen die gleiche Geschwindigkeit wie die des Elternions haben, treffen diese zum gleichen Zeitpunkt, jedoch mit einer niedrigeren kinetischen Energie E_f auf den Reflektor. Der Zusammenhang ist durch **Gleichung 2-4** gegeben. Die geladenen Fragmentationen dringen infolgedessen nicht so tief in den Reflektor ein wie das Elternion. Folglich verlassen die Fragmentationen den Reflektor früher und treffen eher auf den Reflektordetektor als das Elternion. Demzufolge treffen auch kleinere Fragmentationen früher am Reflektordetektor ein als größere Fragmentationen.

$$E_f = E_M \times \frac{m_f}{M}$$

Gleichung 2-4

- E_f kinetische Energie des PSD-Fragmentions in der Driftstrecke
 E_M kinetische Energie des Elternions in der Driftstrecke
 $=E_{acc}$; Beschleunigungsenergie
 m_f Masse des PSD-Fragmentions
 M Masse des Elternions

Die MALDI-TOF-Fragmentationenanalytik bietet also die Möglichkeit, Strukturinformationen über Analytmoleküle zu gewinnen. Jedoch sollte hervorgehoben werden, dass Peptide schon bei Schwellenlaserleistung PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungsprozesse zeigen⁸³, während für einen entsprechenden Zerfall synthetischer Polymere eine starke Erhöhung der Laserleistung notwendig ist, welche eine Zunahme der Stöße in der Quelle verursacht.

2.2.2 Messprinzip

Der MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik liegt die „**Fragment Analysis and Structural TOF**“-(FAST™) Methode zugrunde, deren Prinzip im Folgenden erläutert wird. Für eine erfolgreiche PSD- bzw. **CID-Fragmentionenanalytik** muss zunächst gewährleistet sein, dass ausschließlich Fragmentationen detektiert werden, die vom gleichen Elternion herrühren. Diese Bedingung wird umso erforderlicher, je komplexer das Elternionenspektrum ist (z.B. komplexe Gemische, synthetische Polymere mit Massenverteilungen).

Dafür steht ein elektronisches „Gate“ zur Verfügung, welches Molekülonen mit einer definierten Masse selektiert und dadurch von Molekülen mit anderer Masse separiert. Dieses „Gate“ besteht aus einem elektrischen Feld, das in der Driftstrecke des Massenspektrometers orthogonal zur Flugrichtung angelegt wird (**Abb. 2-6**). Durch ein getriggertes Aus- und Einschalten des „Gates“ durchwandert das selektierte Molekülion unbeeinflusst seine Flugstrecke durch das „Gate“, während die Ionen mit niedrigeren sowie höheren Massen abgelenkt werden. Da die Fragmentationen mit gleicher Geschwindigkeit (**Abb. 2-5**) und damit zum gleichen Zeitpunkt wie das Elternion das „Gate“ durchwandern, werden im Reflektordetektor sowohl das intakte Elternion der selektierten Masse als auch dessen Fragmentationen detektiert.

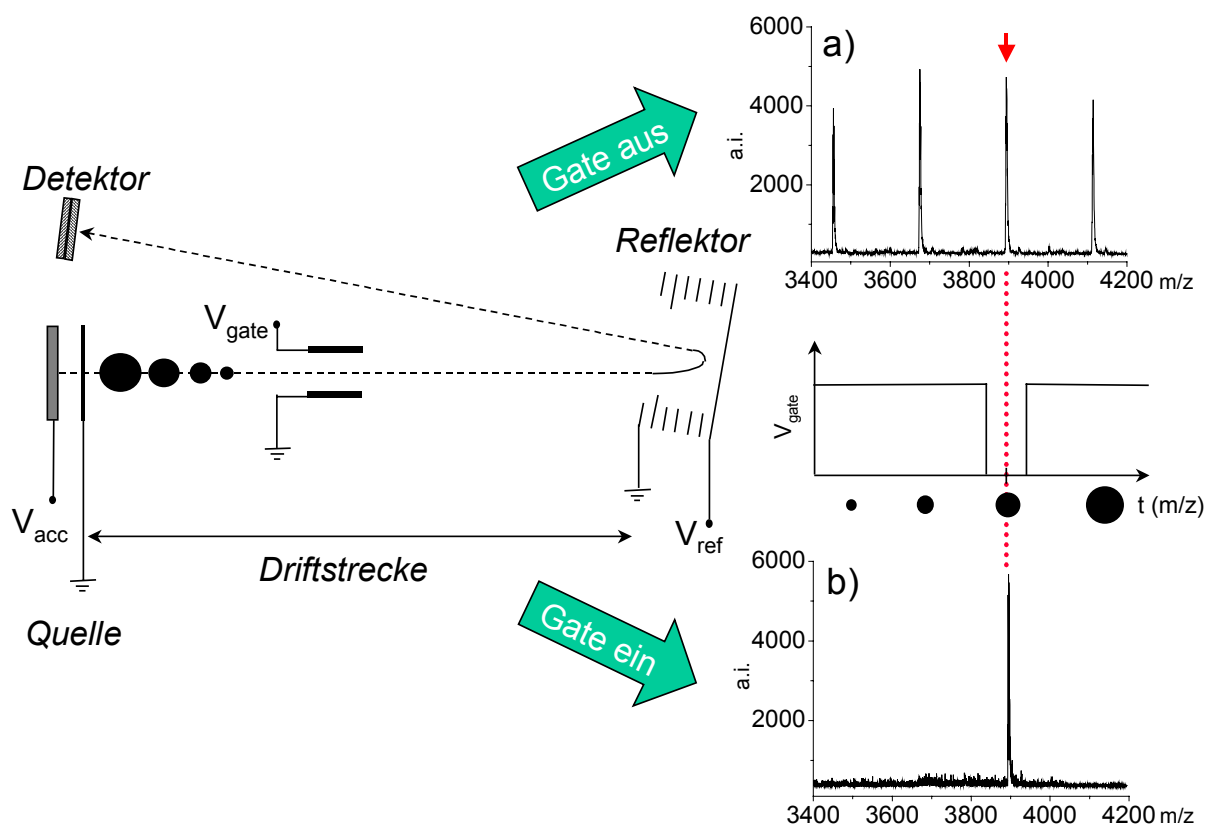


Abb. 2-6: Das Prinzip des elektronischen „Gates“ zur Selektion eines definierten Elternionensignals, veranschaulicht an einem Sternpolymer (Kapitel 3.4.3.7, S. 192): a) MALDI-TOF-Massenspektrum; b) MALDI-TOF-Massenspektrum nach Selektion mit dem elektronischen „Gate“.

Da die kinetische Energie der Fragmentionen nur einem Teil der Beschleunigungsenergie entspricht (**Gleichung 2-4**), werden die Fragmentionen auf dem Reflektordetektor mit einer falschen Masse detektiert. Bei einem Vergleich mit Ionen entsprechender Masse, die jedoch schon in der Quelle vorhanden sind (z.B. ISD-Fragmentionen, intakte Molekülionen) und daher die volle Beschleunigungsenergie erfahren, erreichen die Fragmentionen, die in der Driftstrecke gebildet werden, den Reflektordetektor zu einem späteren Zeitpunkt. Aus diesem Grund muss eine Kalibrierung dieser Fragmentionen durchgeführt werden. Diese FAST-Kalibrierung ordnet den auftretenden Fragmentmassen die tatsächlichen Molekulargewichte dieser Fragmente zu, indem diese mit einem Kalibrier-,„File“ eines Peptides, dessen Fragmente bekannt sind, abgeglichen und eindeutig zugeordnet werden. Die **PSD-** bzw. **CID-Fragmentkalibrierung** wird jeweils mit dem entsprechenden Kalibrier-,„File“ durchgeführt.

Ein Nachteil der MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik ist, dass bevorzugt große Fragmentionen ($m_r > 0.75 \times M$) detektiert werden, da einerseits die kleineren Fragmentionen nicht ausreichend tief in den Reflektor eindringen und somit in einem Bereich mit geringerem Flugzeitdispersionsvermögen verbleiben. Dadurch werden diese zusammen reflektiert und erzeugen ein breites Signal im niedrigeren Massenbereich des Fragmentspektrums. Andererseits werden Fragmentionen mit erheblich kleineren Massen als das Elternion aufgrund ihrer kleineren kinetischen Energie auf eine falsche Flugbahn reflektiert, so dass diese den Reflektordetektor gar nicht erreichen. Aus diesem Grund werden bei der FAST-Methode zur Datenaufnahme eines **PSD-Fragmentspektrums** 15 einzelne Segmentspektren (**Abb. 2-7**) mit immer kleiner werdenden Reflektorspannungen aufgenommen. In jedem dieser Segmente entspricht damit die Reflektorspannung einem anderen Fragmentmassenbereich, so dass die Fragmentionen auf dem Reflektordetektor differenziert werden können. Die 15 Segmente werden nach der entsprechenden FAST-Kalibrierung zu einem **MALDI-TOF-Fragmentspektrum** zusammengefügt. Das **CID-Fragmentspektrum** wird durch den selben Segmentaufbau erhalten, jedoch werden 16 Einzelsegmente aufgenommen.

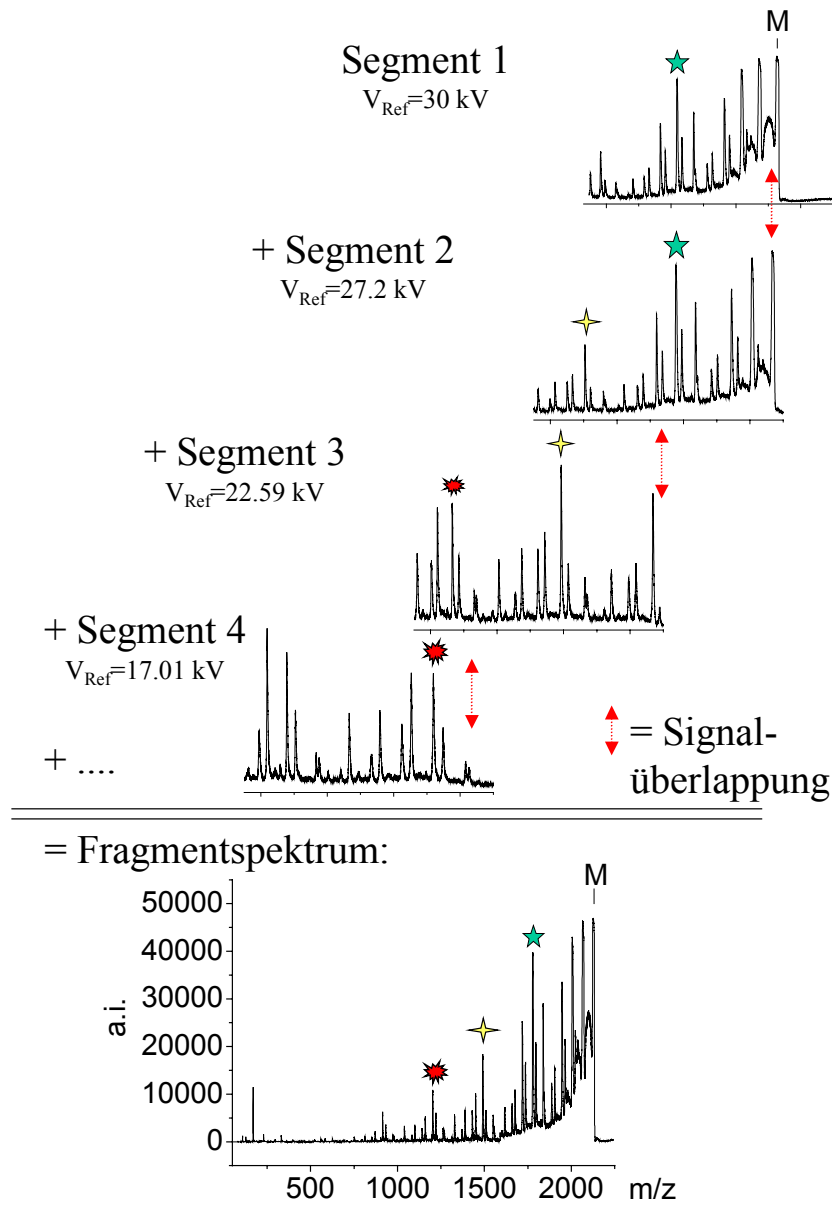


Abb. 2-7: Aufbau eines Fragmentmassenspektrums mittels der FAST™-Methode, welches durch Zusammenfügen der einzelnen Segmentspektren erhalten wird. Veranschaulicht wird dies am Beispiel des γ -Cyclodextrins (Kapitel 3.3.1.3, S. 132).

3 ERGEBNISSE

3.1 Praktische und theoretische Gesichtspunkte der MALDI-TOF-MS-Probenpräparation

3.1.1 Grundlagen und Motivation

Der Desorptions- und Ionisationsprozess ist noch weitgehend ungeklärt (Kapitel 1.1.2, S. 4), weshalb nur eingeschränkt gültige Vorhersagen zu den geeigneten experimentellen MALDI-Bedingungen einer Substanz (Kapitel 2.1.1, S. 15) getroffen werden können. Voraussetzungen für die herkömmliche Probenpräparation sind die Löslichkeit der Analyten und Matrices und deren Kompatibilität sowohl hinsichtlich der eingesetzten Lösungsmittel als auch des Analyt- und Matrixsystems. Des Weiteren muss nach der Lösungsmittelentfernung die im gelösten Zustand erzielte Homogenität im auskristallisierten Analyt-Matrix-Gemisch auf der Oberfläche des MALDI-Probenträgers erhalten bleiben. Die Bestrebungen nach einer entsprechenden Vororganisation des Analyten und der Matrix führten zu unterschiedlichsten Probenpräparationsmethoden, um das Kristallwachstum positiv zu beeinflussen. Homogenität einer erhaltenen Analyt-Matrix-Mischung kann durch die richtige Wahl der Lösungsmittel¹³⁷, der Matrices^{138,139,140,141,142}, der gemischten Matrices¹⁴³, der Co-Matrices^{130,144} und Detergentien^{145,146}, der pH-Werte^{147,148}, der Gegenwart von Metallsalzen¹⁴⁹ und Gegenionen¹⁵⁰, der Konzentrationen in Lösung und der Analyt/Matrix-Verhältnisse¹⁵¹, der Probenauftragungsdichte und der Auftragungsmethode wie z.B. der „dried droplet“¹⁵², „thin-“¹⁵³ und „thick-layer“¹⁵⁴, „seed-layered“¹⁵⁴, „spin-coated“¹⁵⁵ und „elektrospray“-Auftragung¹¹⁹ erzielt werden. Diese Faktoren können die Ionenausbeute erheblich beeinflussen, aber auch ausgeprägte Massendiskriminierungen verursachen. Damit üben bei der herkömmlichen lösungsmittelbasierenden MALDI-Probenpräparation zu viele Schlüsselparameter einen zum Teil erheblichen Einfluss aus. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit einer universelleren Methode, die einfacher anzuwenden ist und weniger kritische Parameter aufweist.

Um unlösliche Substanzen einer Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS zugänglich zu machen, wurden kürzlich Untersuchungen zur lösungsmittelfreien MALDI-Probenpräparation durchgeführt^{115,122}. Diese lösungsmittelfreie Probenpräparation zeigt große Entwicklungsmöglichkeiten zum Verständnis und zur Vereinfachung der MALDI-Methode.

Basierend auf diesen neueren Entwicklungen werden zunächst weiterführende praktische Gesichtspunkte der lösungsmittelfreien Probenpräparation erarbeitet, um Erkenntnisse und Aussagen hinsichtlich ihrer allgemeineren Anwendbarkeit treffen zu können. Ein systematischer Vergleich zwischen der lösungsmittelbasierenden und der lösungsmittelfreien Probenpräparation soll dabei die Gemeinsamkeiten und Unterschiede hervorheben. Die Zugänglichkeit unlöslicher synthetischer Polymere wird ebenfalls untersucht. Des Weiteren werden theoretische Implikationen dieser lösungsmittelfreien Probenpräparation hinsichtlich der Modellvorstellung der MALDI-TOF-MS-Methode berücksichtigt und durch geeignete Experimente vertieft.

3.1.2 Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS

3.1.2.1 Universelle Anwendbarkeit

Die Analyten, die in diesem Kapitel systematisch unter verschiedenen Aspekten hinsichtlich der universellen Anwendbarkeit der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS untersucht werden, sind bis auf Rinderinsulin **3** und Rinderserumalbumin (BSA) **4** in **Abb. 3-1** zusammengestellt.

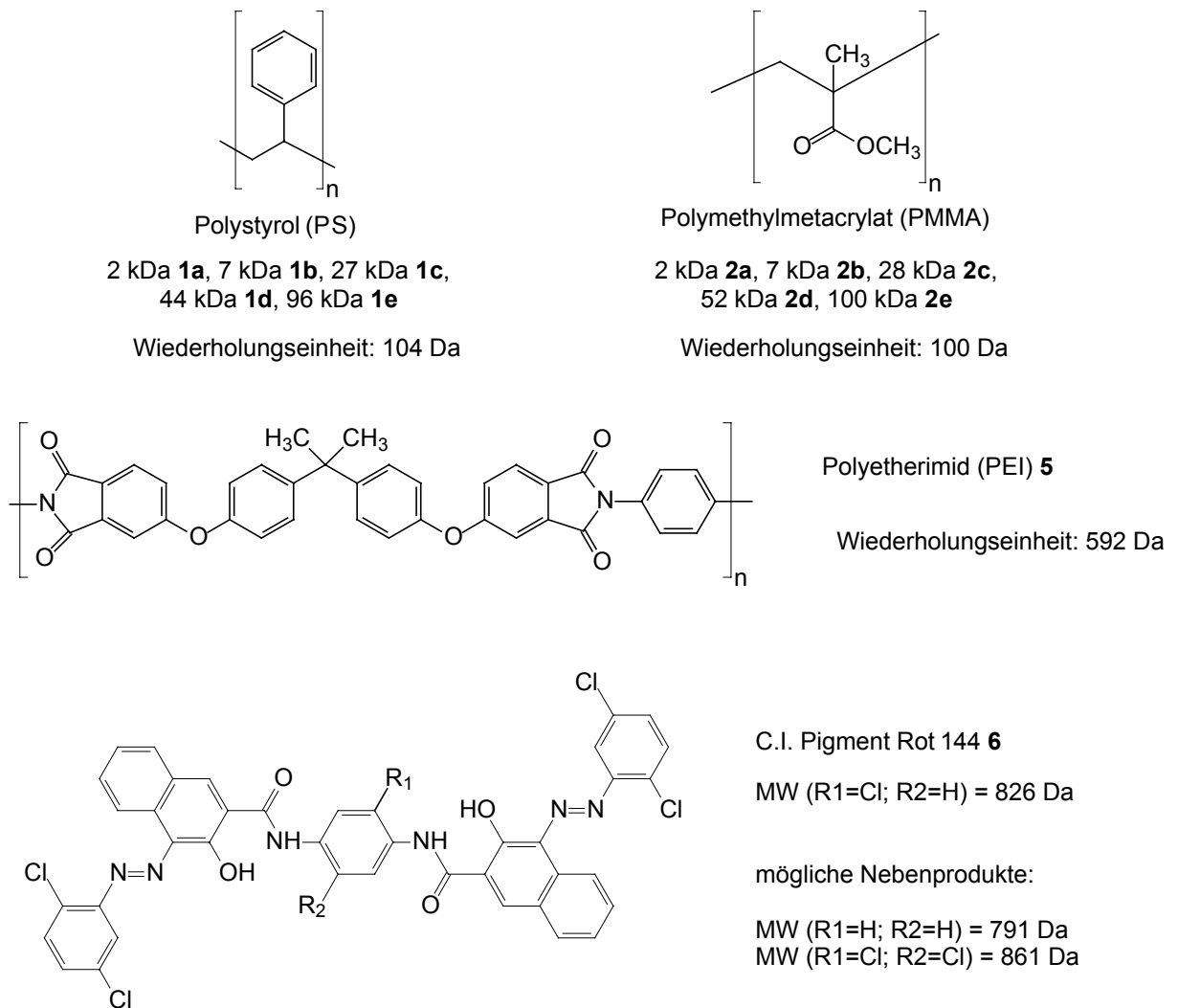


Abb. 3-1: Strukturen der verwendeten Analyten mit Ausnahme von Rinderinsulin **3** und Rinderserumalbumin **4**.

3.1.2.1.1 Untersuchungen zu Nieder- und Hochmolekulargewichtsbestimmungen

3.1.2.1.1.1 Optimale molare Analyt/Matrix-Verhältnisse.

Für einen einfachen Vergleich der Ergebnisse, die mit konventioneller lösungsmittelbasierender und lösungsmittelfreier MALDI-Probenpräparation hinsichtlich der Sensitivität und Auflösung erhalten werden, stützen sich diese Untersuchungen auf gut charakterisierte, definierte Polymerstandards wie die der Polystyrole (PS) **1a** und Poly(methylmethacrylate) (PMMA) **2a**. Diese sind in hoher Reinheit hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung (z.B. definierte Endgruppen) und engen Polydispersitäten käuflich erhältlich.

Die Massenspektren von PMMA (2.000 Da **2a**, **Abb. 3-2**) zeigen nahezu gleiche Ergebnisse für beide Präparationsmethoden hinsichtlich der wichtigsten Informationen wie die der absoluten Massen der aufgelösten Signale und der Molekulargewichtsverteilung. Zusätzlich zeigt sich kein nennenswerter Unterschied in der Form der Molekulargewichtsverteilung mit unterschiedlich molaren Analyt/Matrix-Mischungsverhältnissen von 1/50 bis 1/5.000. Damit verändert sich die komplette Erscheinung der Massenspektren nicht, sie sind bei Anwendung der lösungsmittelfreien und lösungsmittelbasierenden Probenpräparation praktisch identisch.

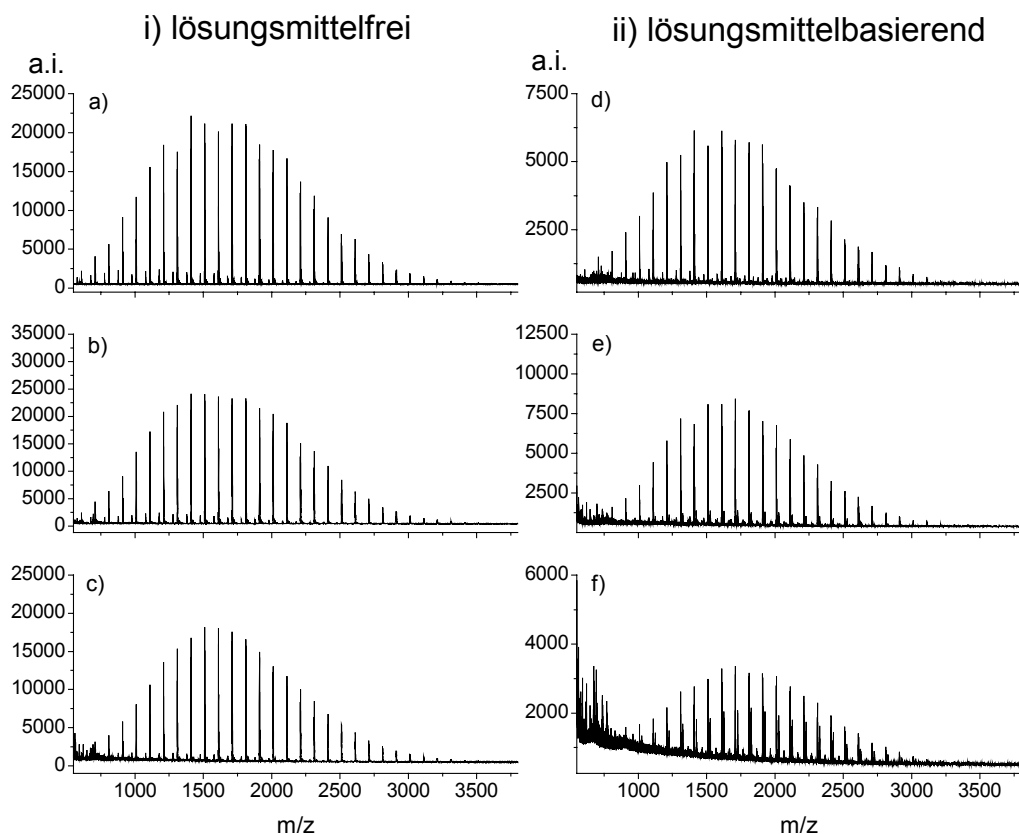


Abb. 3-2: Massenspektren von PMMA (2.000 Da, **2a**) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von PMMA/Dithranol/CF₃CO₂Li: i) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS: a) 1/50/10, b) 1/500/10, c) 1/5.000/10; ii) lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS: a) 1/50/10, b) 1/500/10, c) 1/5.000/10.

Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (**Abb. 3-2a-c**) aufweisen im Vergleich zur lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS (**Abb. 3-2d-f**) bemerkenswerte Vorteile hinsichtlich besserer Signalintensitäten, welche dreimal größer sind, und damit ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den Massenspektren für alle angewendeten molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse zeigen. Die Basislinienveränderung und die Beeinträchtigung durch den Matrixuntergrund ist bei den Matrixverdünnungsexperimenten der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS weniger stark ausgeprägt. Unter Anwendung der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS sind die erhaltenen Massenspektren von komplexerer Natur aufgrund unerwünschter Konkurrenzionisationen mit unterschiedlichen Metallkationen. Die größte Konkurrenz tritt zwischen Lithium- und Natriumkationen auf, und ist umso ausgeprägter, je größer die Matrixverdünnung wird (**Abb. 3-2e,f**). Diese nachteilige Konkurrenzionisation ist vernachlässigbar gering bei Anwendung der lösungsmittelfreien Probenpräparation. Der Unterschied beider Probenpräparationen ist am stärksten für die Verdünnung 1/5.000. Hier ist die Qualität des erhaltenen Massenspektrums zugunsten der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS wesentlich höher.

Das optimale Mischungsverhältnis von Analyt und Matrix in **Abb. 3-2** wird für beide Präparationsmethoden bei 1/500 gefunden. Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS zeigt eine wesentlich höhere Toleranz gegenüber anderen Mischungsverhältnissen, da die Erscheinung der Massenspektren in **Abb. 3-2a-c** praktisch unverändert bleibt im Gegensatz zu den Massenspektren der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS (**Abb. 3-2d-f**).

Von Bedeutung ist der Nachweis, dass Kationisierungsmetallsalze (z.B. Lithiumtrifluoracetat) bei der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS analog der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation einsetzbar sind. Die Metallkationanlagerung, bei der Pseudo-Moleküle gebildet werden, ist bedeutend, da Polymere für einen erfolgreichen Ionisationsschritt herkömmlicherweise auf Kationisierungsmetallsalze (Kapitel 2.1.1, S. 15) angewiesen sind.

Die gleichen Untersuchungen wurden für PS (2.000 Da, **1a**) durchgeführt und verifizieren die Ergebnisse der PMMA-Untersuchungen. Es zeigt sich eine starke Übereinstimmung beider MALDI-Präparationsmethoden, welche auf die enge Polydispersität dieser Polymerstandards zurückgeführt werden kann. Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS zeigt bei der Analyse von PMMA und PS keine Nachteile im Vergleich zur lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS. Dabei lässt sich vermuten, dass dies ein generelles Verhalten ist, das gleichermaßen für die Charakterisierung anderer Analyt-Matrix-Systeme angewendet werden kann. Um die deutlichen Unterschiede zwischen direkter Laseranregung von PMMA 2.000 Da **2a** in Laserdesorption/Ionisation und Matrix-unterstützten-LD hervorzuheben, wurden diese Untersuchungen durch LD-TOF-MS-Messungen ergänzt. Diese LD-TOF-MS-Ergebnisse verdeutlichen, dass die LD-Massenspektren dieser Analyten nur unter Anwendung höherer Laserleistungen erhältlich sind und dabei nur geringe Signalintensitäten und signifikante Unterschiede im Kurvenverlauf der Polymerverteilung aufweisen. Bei den analogen Untersuchungen an PMMA 7.000 Da **2b** kann gezeigt werden, dass beide MALDI-TOF-MS-Probenpräparationsmethoden die Charakterisierung der intakten Molekularionen erlauben, wohingegen die LD-TOF-MS versagt. Damit ist die Desorption/Ionisation von PMMA in diesem Molekulargewichtsbereich ohne Matrixunterstützung nicht zugänglich.

3.1.2.1.1.2 Kalibrierung, Sensitivität und Auflösung.

Die Auflösung und die Kalibrierengenauigkeit werden repräsentativ für PS (2.000 Da, **1a**) gezeigt, welche durch die beiden unterschiedlichen Probenpräparationsmethoden unter Anwendung des optimalen Mischungsverhältnisses von 1/500 (Analyt/Matrix-Verhältnis) erzielt werden. Bei der Evaluierung der monoisotopischen Massen des PS 20-mers (2.246 Da, **Abb. 3-3**) bei externer Kalibrierung ergeben sich Molekulargewichtsabweichungen von durchschnittlich < 30 ppm für beide MALDI-Präparationsmethoden. Die experimentell erhaltenen Auflösungen werden mit denen der computersimulierten Auflösung von $M/\Delta M=5.000$ (**Abb. 3-3a**) der isotopenaufgelösten Verteilung des 20-mers verglichen. Die experimentell ermittelten Auflösungen sind 4.000 für die lösungsmittelbasierende (**Abb. 3-3b**), 5000 für die lösungsmittelfreie Probenpräparation (**Abb. 3-3c**) und 3.000, wenn das lösungsmittelfreie MALDI-Gemisch als Pellet gepresst auf den MALDI-Probenträger aufgetragen wird (**Abb. 3-3d**). Damit zeigen sich eine höhere Auflösung und Sensitivität, wenn das MALDI-Pudergemisch direkt auf den Probenträger aufgetragen wird, statt zunächst ein Pellet zu pressen analog eines KBr-Pellets und zu vermessen. Die höhere Dichte dieses gepressten Pellets des Analyt-Matrix-Metallsalz-Gemisches scheint möglicherweise aufgrund der erhöhten Oberflächenenergie den Desorptionsschritt zu erschweren.

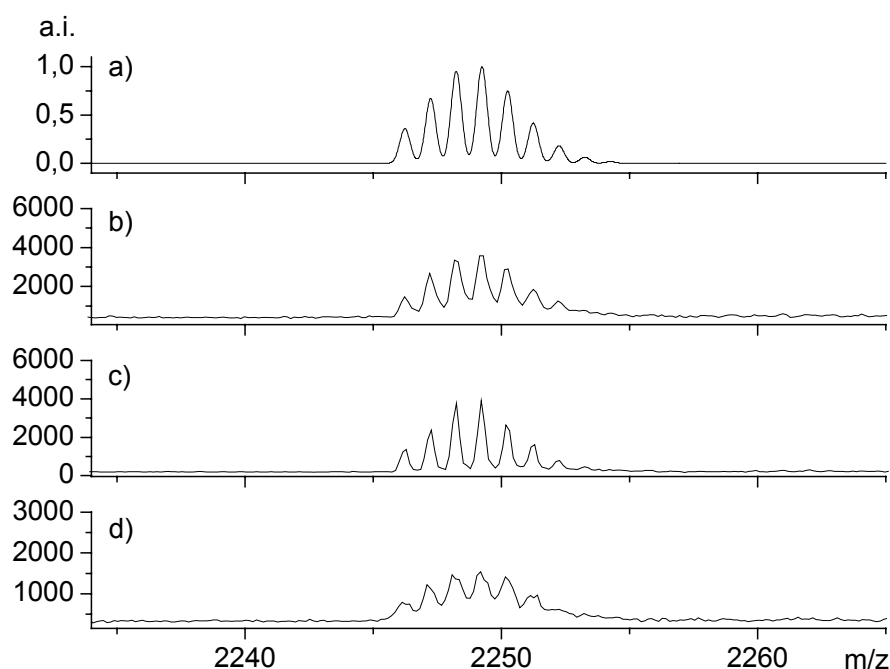


Abb. 3-3: Isotopenverteilung des PS 20-mers **1a** bei einem molaren Mischungsverhältnis von 1/500/10 (PS/Dithranol/ $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$): a) Computersimulation (Auflösung 5.000); b) lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS (Auflösung 4.000); c) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (Auflösung 5.000); d) lösungsmittelfreie gepresste Pellet MALDI-TOF-MS-Probenauftragung (Auflösung 3.000).

Weiterführende Untersuchungen zu den beiden unterschiedlichen lösungsmittelfreien MALDI-Auftragungsmethoden auf den Probenträger zeigen bemerkenswerte Qualitätsunterschiede in den Massenspektren von PS (2.000 Da, **1a**) hinsichtlich variierender molarer Analyt/Matrix/Metallsalz-Verhältnisse von 1/500/10 und 1/300/10 (**Abb. 3-4**). Bei der Evaluierung der 1/300/10-Verhältnisse zeigen die Massenspektren der lösungsmittelfreien Probenpräparationsmethode (**Abb. 3-4b**) dreifach höhere Signalintensität und eine verbesserte Auflösung verglichen mit der gepressten Pelletauftragungsmethode (**Abb. 3-4a**). Eine Matrixverdünnung von 1/500/10 führt zu einer starken Qualitätsverbesserung bei der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS (**Abb. 3-4d**) und, im Gegensatz dazu, zu einer starken Qualitätseinbuße bei der gepressten Pelletanwendung (**Abb. 3-4c**), erkennbar durch geringe Signalintensitäten und Signal-zu-Rausch-Verhältnisse.

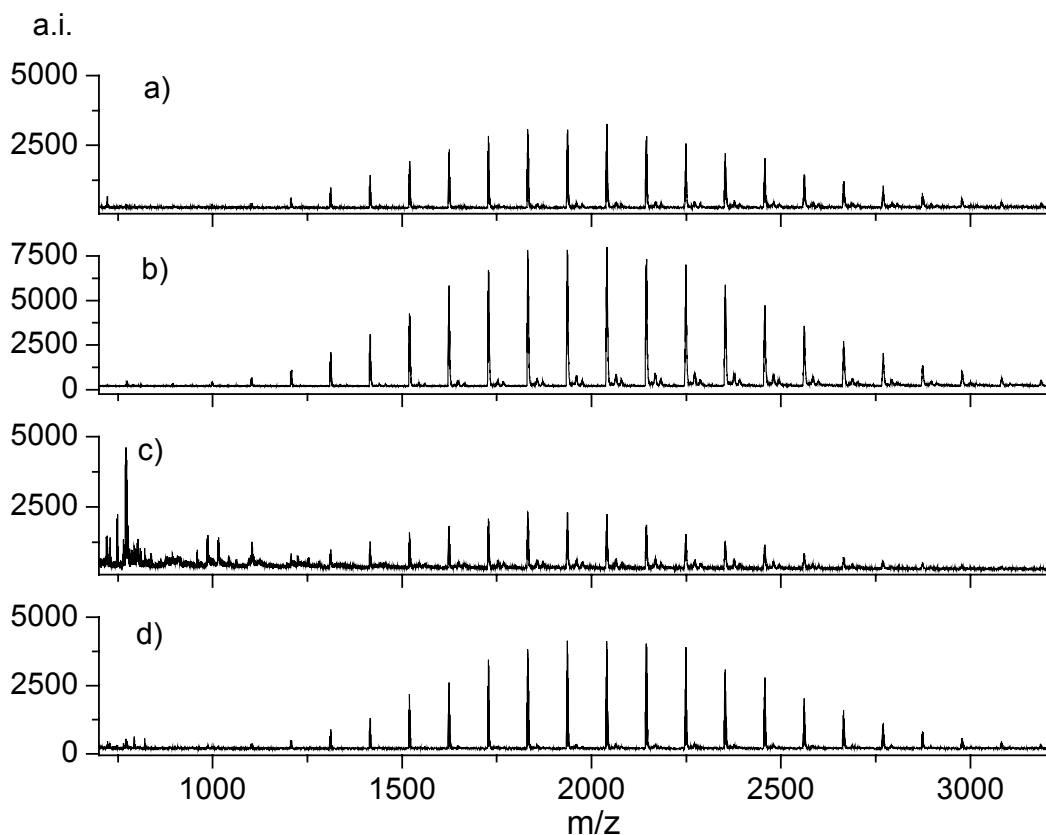


Abb. 3-4: Vergleich von PS (2.000 Da, **1a**) MALDI-TOF-Massenspektren unterschiedlicher lösungsmittelfreier Probenauftragungsmethoden bei unterschiedlichen PS/Dithranol/CF₃CO₂Ag-Mischungsverhältnissen (in Klammern): a) gepresste Pelletauftragung für MALDI-TOF-MS (1/300/10); b) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (1/300/10); c) gepresste Pelletauftragung für MALDI-TOF-MS (1/500/10); d) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (1/500/10).

Die gepresste Pelletauftragung ermöglicht es, gute MALDI-TOF-MS-Ergebnisse zu erzielen, zeigt jedoch Nachteile gegenüber der direkten Puderauftragung auf den Probenträger bei lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS:

- zeitaufwendige Pelletpräparation und
- kleinere Toleranz für weniger optimale molare Analyt/Matrix-Verhältnisse

führen bei steigender Matrixverdünnung zu einem schnellen Qualitätsverlust der MALDI-TOF-Massenspektren. Ähnliche Ergebnisse wurden für die gepresste Pelletauftragung für MALDI-TOF-MS von Polyamid < 5.000 Da berichtet¹²². Die unüblichen Analyt/Matrix-Verhältnisse bei der gepressten Pelletauftragungsmethode weisen auf eine weniger effektive Matrixunterstützung hin und stehen im starken Widerspruch zur lösungsmittelfreien und lösungsmittelbasierenden Probenpräparation. Aus praktischen (z.B. Zeitaufwand) ebenso wie aus ergebnisorientierten Gesichtspunkten (z.B. bessere Auflösung) ist es daher besser, auf die Anfertigung eines gepressten Pellets zu verzichten, sofern für eine ausreichende Haftung des Analyt-Matrix-Metallsalz-Pudergemisches auf den Probenträger gesorgt wird.

3.1.2.1.1.3 Hochmolekulargewichtsbestimmungen.

Die Gemeinsamkeiten der Ergebnisse der lösungsmittelfreien und lösungsmittelbasierenden MALDI-Probenpräparationsmethoden für die Charakterisierung niedermolekularer Analyten heben unmittelbar das Potential der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS hinsichtlich deren Genauigkeit und Auflösung hervor. Ein weiterer Aspekt der Universalität ist, das Potential der Methode zur Charakterisierung hochmolekularer Analyten nachzuweisen. Aus diesem Grund werden die mittels der neuen und traditionellen Methode erhaltenen Ergebnisse in einem Massenbereich bis 100 kDa miteinander verglichen. **Abb. 3-5** zeigt die Massenspektren von PS 96 kDa **1e** als repräsentatives Beispiel der Ergebnisse, die bei den Untersuchungen der zwei unterschiedlichen Methoden für PMMA- (28 **2c**, 52 **2d** und 100 kDa **2e**) und PS-Analyten (7 **1b**, 27 **1c**, 44 **1d**, 96 kDa **1e**) erhalten wurden. Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS erzielt Massenspektren mit nahezu gleicher Qualität (**Abb. 3-5a**), jedoch etwas geringerer Signalintensität wie bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation (**Abb. 3-5b**).

Die mit steigendem Molekulargewicht erhöhte wachsartige Beschaffenheit von PS erschwert die Homogenisierung von Matrix und Analyt beim Mahlvorgang. Unter Einsatz einer externen Kühlapparatur des Mahlbechers mittels flüssigem Stickstoff während des Mahlvorgangs wurde die Sprödigkeit der PS-Probe 96 kDa **1e** so weit erhöht, dass eine ausreichend homogene Durchmischung des Analyt-Matrix-Metallsalz-Gemisches erhalten wurde. Bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation lässt sich im Folgenden eine steigende Spektrqualität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Durchmischungsmethoden ermitteln:

Mörser-Behandlung < Kugelmühle < gekühlte Kugelmühle.

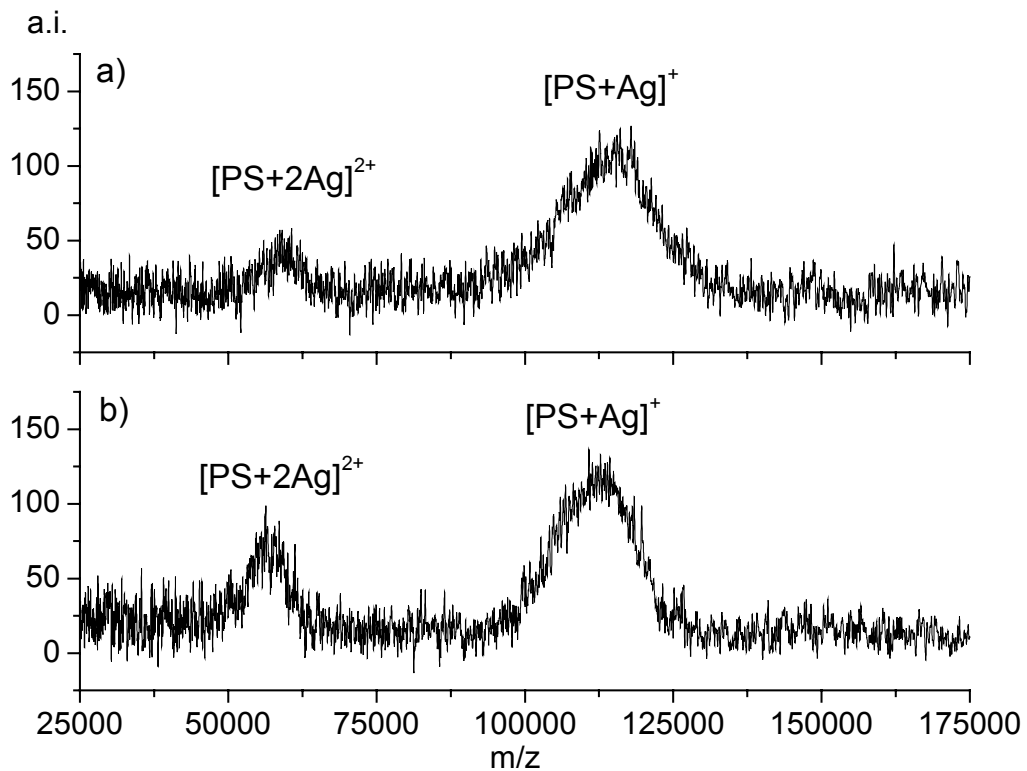


Abb. 3-5: Massenspektren von PS (96 kDa, **1e**) identisch geglättet und basislinienkorrigiert: a) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS; b) konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS.

Die Qualität der Massenspektren ist nur indirekt abhängig vom Molekulargewicht, jedoch insbesondere von der Sprödigkeit des Analyten und der Matrix bzw. dessen Fähigkeit, eine homogene Durchmischung mit der angewendeten Matrix einzugehen. Daher ist die Gewährleistung der Homogenität des Analyt-Matrix-Gemisches ausschlaggebender Faktor, der den Erfolg der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS diktiert.

Die mit dieser Kugelmühle erhaltliche Partikelgröße wird im Bereich eines Mikrometers¹⁵⁶ angegeben, hängt jedoch stark von der Natur des Analyten ab. Die Mahleffizienz kann durch längere Mahlzeiten und/oder durch eine externe Kühlapparatur des Mahlbeckers verbessert werden. Diese Verbesserung der Durchmischbarkeit stellt einen wesentlichen Vorteil der Kugelmühle gegenüber der Mörser- und Pistillbehandlung dar: Präparationsbedingungen können einfacher an die Anforderungen der einzelnen Analyt-Matrix-Mischungen angepasst werden, wobei der Präparationszeitaufwand für beide Methoden ungefähr gleich ist. Eine hohe Mahleffizienz im Mikrometerbereich wird bei der Kugelmühledurchmischung erreicht und stellt damit eine hohe Homogenität und „spot-to-spot“-Reproduzierbarkeit auch bei Polymeren mit hohen Molekulargewichten sicher. Die Mörser- und Pistillbehandlung erweist sich als ausreichend, jedoch insuffizient in Sonderfällen trotz intensiver Durchmischungsversuche.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation mit steigendem Molekulargewicht des Analyten die Ergebnisse generell verbessert werden können, je dünner das MALDI-Gemisch aufgetragen wird und umso schneller das Lösungsmittel verdampft. Erzielt werden feinste, mikrokristalline Proben sehr hoher Homogenität. Diese operatorspezifische Auftragung kann durch „spin coating“ bzw. „electrospray“-Auftragung vereinheitlicht werden¹. Bei der Spektrenaufnahme wird eine sehr schnelle Abtragung dieser sehr dünnen MALDI-Probenschicht beobachtet. Die „shot-to-shot“-Reproduzierbarkeit ist erheblich erhöht.

3.1.2.1.2 Untersuchungen zur Analytik von Biopolymeren

Um eine Methode als universell auszuweisen, sollten generelle Untersuchungen ebenfalls eine Vielzahl von unterschiedlichen Analyten beinhalten. MALDI-TOF-MS hat seine breiteste Anwendung im Gebiet der Biopolymeranalyse (Kapitel 1.1.3.1, S. 6). Die Zugänglichkeit der lösungsmittelfreien Probenpräparation wird aus diesem Grund ebenfalls für Rinderinsulin **3** überprüft, welches als Kalibriersubstanz bei der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS auf dem Gebiet der Biopolymere Anwendung findet. Dieser Analyt sollte ebenfalls eine Bewertung der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS zur Detektion von negativen Ionen ermöglichen¹⁵⁷.

Die erhaltenen lösungsmittelfreien MALDI-TOF-Massenspektren von Rinderinsulin **3** im positiven und negativen Detektionsmodus sind von ähnlicher (**Abb. 3-6a,c**) und im Vergleich zur lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS sogar von besserer Qualität (**Abb. 3-6b,d**).

Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS zeigt keine Einschränkungen für Proben biologischer Herkunft und scheint keinen generellen Unterschied im MALDI-Mechanismus zu haben. Des weiteren wurden keine Nachteile in der Ionisation und Detektion bei der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS beobachtet.

Biopolymere bilden zwar Tertiärstrukturen aus, die zu einer deutlichen Stabilisierung führen, dennoch stellen sie labilere Strukturen dar als z.B. synthetische Polymere. Aus diesem Grund müsste der Grenzbereich zwischen erfolgreicher und nicht erfolgreicher MALDI-TOF-MS-Analyse bei diesen Polymerstrukturen deutlich enger sein als bei den zuvor untersuchten synthetischen Polymeren. Aus diesen Überlegungen ergeben sich weitere interessante Fragestellungen hinsichtlich der Stabilität eines Analyten und des MALDI-Prozesses, die im Folgenden untersucht werden sollen.

Die Anwendbarkeit der Hochmolekulargewichtsbestimmung von Biopolymeren soll anhand von Rinderserumalbumin (BSA, 66 kDa) **4** durchgeführt werden. Im Falle von PS (2.000 Da, **1a**) lieferte die Pelletauftragung trotz sehr geringen Molekulargewichtes deutlich schlechtere Massenspektren als für die direkte Pulverauftragung (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31). Dabei muss angenommen werden, dass die schlechte Qualität des Massenspektrums (**Abb. 3-4**, S. 34) durch die erhöhte Laserleistung zu erklären ist, die jedoch aufgewendet werden musste, um ein Massenspektrum zu erhalten.

¹ Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn *Dr. F.-J. Mayer-Posner*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen.

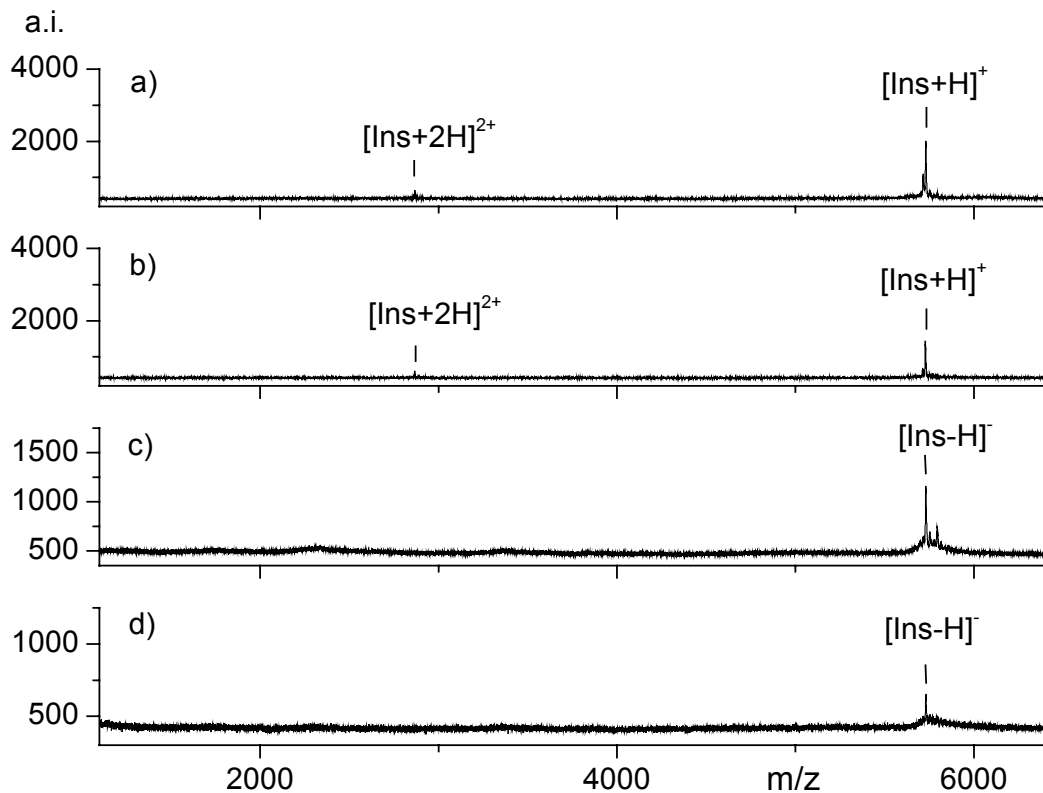


Abb. 3-6: Massenspektren von Rinderinsulin **3**: a) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (positive Ionen); b) konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS (positive Ionen); c) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (negative Ionen); d) konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS (negative Ionen).

In **Abb. 3-7** sind die Massenspektren von BSA **4** dargestellt, die mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS in Abhängigkeit von der Laserleistung erhalten werden. Die optimalen molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse liegen bei 1/1.000 und damit zwischen den konventionellen Verhältnissen von synthetischen Polymeren (1/500) und Biopolymeren (1/10⁴ bis 1/10⁶). Bei der Pelletauftragung des identischen MALDI-Gemisches kann kein lösungsmittelfreies MALDI-TOF-Massenspektrum mehr erhalten werden.

Um diese starke Diskrepanz zwischen beiden lösungsmittelfreien Probenpräparationen zu erklären, werden für die direkte Pulverauftragung Massenspektren von BSA **4** in Abhängigkeit von der relativen Laserleistung aufgenommen. In **Abb. 3-7** ist ein Massenspektrum von BSA **4** mit erhöhter relativer Laserleistung von 55 dem von 50 gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, wie stark der Qualitätsverlust mit leichter Erhöhung der Laserleistung einhergeht, welcher auf stärkere Fragmentierung zurückgeführt werden kann. Am auffälligsten zeigen sich dabei (**Abb. 3-7b**) die starke Verbreiterung des Molekularionensignals bei verminderter Intensität sowie ein starker Anstieg der Basislinie im niedermolekularen Bereich. Damit wird deutlich, dass diese Untersuchungen unmittelbar an der Stabilitätsschwelle des Biopolymers erfolgen.

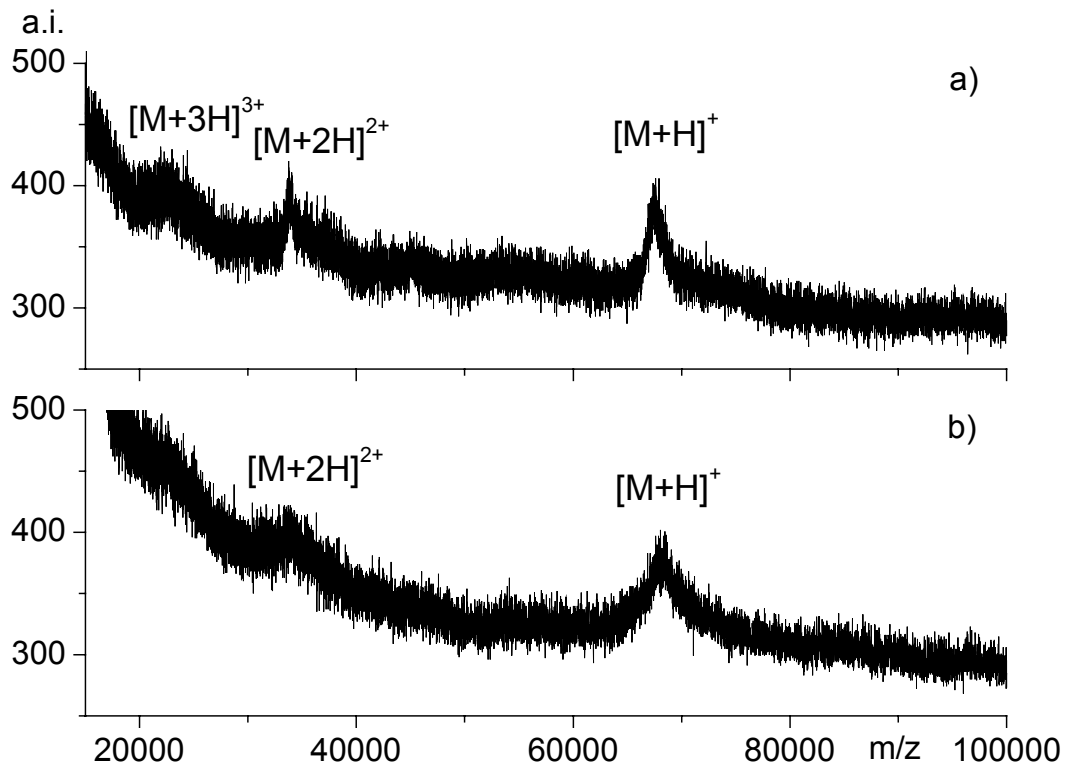


Abb. 3-7: Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-Massenspektren von BSA 4 mit steigender relativer Laserleistung: a) 50; b) 55.

Der Misserfolg der MALDI-TOF-MS-Analyse bei einer Pelletpräparation weist auf einen Zusammenhang zwischen Oberflächenbeschaffenheit und Dichte der MALDI-Probe hin und scheint einen effektiven MALDI-Prozess zu erschweren. Je kompakter die Oberfläche des Analyt-Matrix-Gemisches ist, desto weniger effektiv verläuft der MALDI-Prozess. Die Desorption/Ionisation ist gehemmt und kann nur durch erhöhte Laserleistung überwunden werden. Umgekehrt ist der MALDI-Prozess umso effektiver, je loser das MALDI-Probengemisch ist.

Damit ist nicht nur eine effektive Durchmischung des Probenoberflächengemisches ausschlaggebender Faktor bei der MALDI-TOF-MS-Analyse, sondern insbesondere die Probenbeschaffenheit, die sich unter anderem gerade durch die beiden unterschiedlichen lösungsmittelfreien Probenauftragungsmethoden widerspiegelt. Ähnliche Zusammenhänge sind vermutlich ebenfalls in der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS ableitbar und werden im theoretisch motivierten Teil dieses Kapitels eingehender untersucht (Kapitel 3.1.3, S. 63). Dennoch kann eindeutig gezeigt werden, dass bei geeigneten lösungsmittelfreien Probenpräparationsbedingungen und -auftragungsmethoden auch Hochmolekulargewichtsbestimmung von Biopolymeren durchgeführt werden kann. Entsprechend den synthetischen Polymeren (z.B. Kühlung beim Mahlvorgang, Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31) können in Zukunft ebenfalls in diesem biologischen Bereich Optimierungsuntersuchungen durchgeführt werden. Trotz höherer

Labilität der Biopolymere im Vergleich zu synthetischen Polymeren unterscheiden sich deren lösungsmittelfreie Pulver MALDI-TOF-MS-Analysen prinzipiell nicht von herkömmlichen MALDI-Methoden. Auffällig zeigte sich bei diesen BSA-Untersuchungen, dass die anwendbaren molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse wesentlich begrenzter sind als bei den synthetischen Polymeren.

Obwohl die lösungsmittelfreie Probenpräparation sich direkt und unkompliziert erweist, zeigt die Handhabung der Analyt-Matrix-Mischung eine Limitierung hinsichtlich der minimalen Probenmenge für den Kugelmühlenbecher (1,5 mL im Volumen): die einfach handzuhabende Gesamtmenge der Analyt-Matrix-Mischung liegt im Bereich von 3 mg. Dies entspricht bei einem Protein von 50 kDa und der HCCA-Matrix bei einem gängigen molaren Verhältnis von $1/10^4$ einer Substanzmenge von 80 μg . Diese Limitierung beschränkt bioanalytische Anwendungen, welche generell substanzlimitiert sind. Jedoch ist diese Einschränkung bedingt durch die Größe der bisher verwendeten Ausrüstung und kann durch die Entwicklung entsprechend kleinerer Kugelmühlenbehälter behoben werden.

3.1.2.1.3 Anwendungsbeispiele

Bei diesen Untersuchungen steht die generelle Anwendbarkeit der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS zur Charakterisierung unterschiedlicher Analyten bei möglichst geringer Variation der Probenpräparation im Vordergrund. An unterschiedlichen Substanzklassen wird aus diesem Grunde im Folgenden ein direkter Vergleich der mittels der lösungsmittelfreien und der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS-Methode erzielbaren Ergebnisse unter Verzicht von Optimierungsversuchen angestrebt.

3.1.2.1.3.1 Polyetherimid (PEI) Granulat.

PEI (30 kDa, **5**), dessen Struktur in **Abb. 3-1** dargestellt ist, ist erstmals Gegenstand von MALDI-TOF-MS-Untersuchungen. Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS erlaubte eine direkte Datenaufnahme eines MALDI-TOF-Massenspektrums mit hoher Qualität, insbesondere mit einem guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis und hoher Sensitivität (**Abb. 3-8a**). Ein konventionelles lösungsmittelbasierendes MALDI-TOF-Massenspektrum konnte nicht mit annähernd gleicher Qualität und Signalintensität unter Verwendung von CH_2Cl_2 als Lösungsmittel, welches das geeignetste für PEI **5** ist¹⁵⁸, erhalten werden (**Abb. 3-8b**).

Ein optimales Matrix-Lösungsmittelsystem könnte möglicherweise durch intensive Optimierungsversuchen für diese Probe gefunden werden. Dies wurde hier jedoch bewusst nicht durchgeführt, da unser Interesse darin bestand, gute Massenspektren möglichst zeiteffektiv zu erhalten. Dieses Beispiel zeigt damit zusätzlich zu den Gemeinsamkeiten beider Probenpräparationen Vorteile der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS wie z.B. intensivere Signalintensitäten sowie schnellere Optimierungsprozesse. Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-Probenpräparation ist daher als eine Vereinfachung in der Durchführung zu bewerten. Die bekannten Suppressionseffekte^{106,107} höhermolekularer Bestandteile in der MALDI-TOF-MS sind unberührt von der Art der Probenvorbereitung und kommen bei beiden Probenpräparationsmethoden gleichermaßen zum Tragen (**Abb. 3-8**).

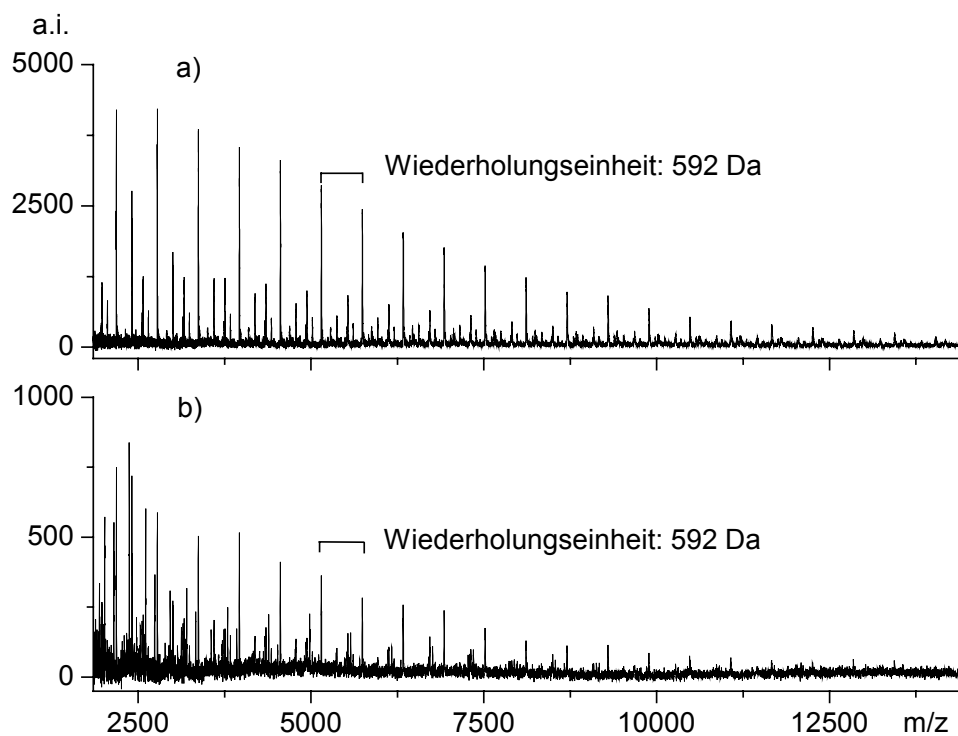


Abb. 3-8: Massenspektren von PEI 5: a) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS, b) konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS.

3.1.2.1.3.2 Pigment Rot 144.

Der weitaus größte Beleg für eine Matrixunterstützung bei der lösungsmittelfreien MALDI-Probenpräparation kann für Substanzen erwartet werden, die eine wahre Matrixunterstützung erfordern, um eine intakte Detektion des Molekülions zu ermöglichen und daher nicht mittels LD-TOF-MS zugänglich sind. Vielversprechend im niedermolekularen Massenbereich sind Substanzen, die bei der Laserwellenlänge absorbieren (337 nm beim N_2 -Laser). Die Fragmentierungstendenz ist erhöht, wenn der Analyt eine signifikante Absorption bei der Absorptionswellenlänge des Desorptionslasers zeigt. Dabei wird die bei der Desorption und Ionisation absorbierte Energie durch molekularen Zerfall abgegeben, wobei die matrixunterstützte Desorption/Ionisation die Fragmentierungstendenz stark vermindern kann^{159,160}. Diese vergleichenden LD-TOF- und MALDI-TOF-MS-Untersuchungen konzentrierten sich auf zwanzig unterschiedliche Pigmente industrieller Relevanz^{II}, wobei die Ergebnisse exemplarisch für Pigment Rot 144 **6** in **Abb. 3-9** dargestellt werden.

Pigment Rot 144 **6** (**Abb. 3-1** mit $R=Cl$) konnte bislang nur mit konventionellen Methoden wie Dünnschichtchromatographie und IR-Spektroskopie charakterisiert werden und ist nur in

^{II} Pigmente wurden von *Dr. R. Az*, Clariant GmbH, PTRF Pigmentanalytik, Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

Lösungsmitteln mit hohen Polaritäten (teilweise in heißem Dichlorobenzol) oder Aciditäten (konzentrierter Schwefelsäure, Trifluoressigsäure) löslich. Jedoch sind all diese Lösungsmittel gleichermaßen ungünstig für herkömmliche MALDI-Matrices, wobei die acidischen Lösungsmittel aufgrund der Oxidationstendenz von Pigment Rot 144 **6** einen zusätzlichen Nachteil aufweisen. Aufgrund des relativ geringen Molekulargewichtes könnte Pigment Rot 144 **6** durch LD-TOF-MS zugänglich sein, sofern ein gewisses Maß an Fragmentierung toleriert wird. Pigment Rot 144 stammt aus industrieller Produktion und ist ein Produktgemisch. Dies kann zu beträchtlichen Suppressionseffekten führen und daher eine eindeutige Interpretation verhindern.

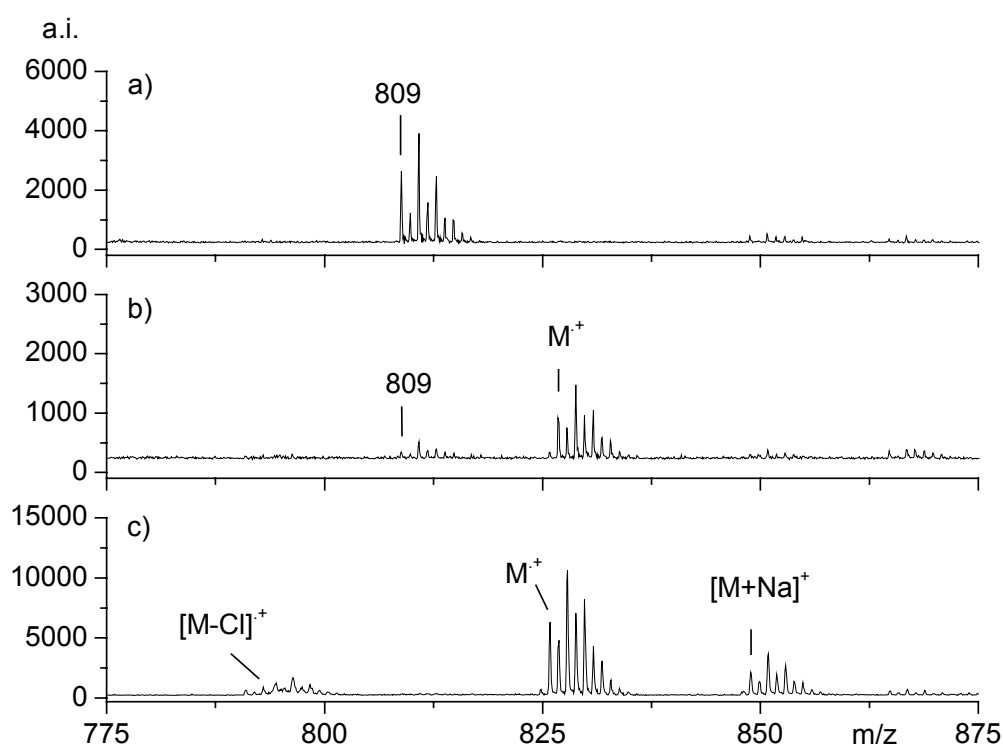


Abb. 3-9: Massenspektren von Pigment Rot 144 **6**: a) lösungsmittelbasierende LD-TOF-MS; b) konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS; c) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS.

Im LD-Massenspektrum von Pigment Rot 144 **6** (Abb. 3-9a) ist kein intaktes Molekularion detektierbar. Des Weiteren kann keine eindeutige Charakterisierung des Signals bei m/z 809 (Δ 17 Da) erhalten werden. Die Annahme des Verlustes einer Hydroxylgruppe liegt nahe. PSD-LD-TOF-Experimente schließen Fragmentierungen innerhalb der Flugstrecke des TOF-Massenspektrometers aus, da die Bildung des Fragmentes von m/z 809 ausbleibt (Kapitel 2.2.1, S. 24). Ein sehr dominanter Kohlenstoff-Stickstofffragmentbruch innerhalb der Amidfunktion wird gefunden, wobei das radikalkationische stickstoffhaltige Fragmentation detektiert wird (Daten nicht gezeigt). Das Signal im LD-Massenspektrum bei m/z 809 kann daher durch einen direkten Zerfall innerhalb der Quelle (ISD) oder durch ein unbekanntes Nebenprodukt, einhergehend mit einem hohen Suppressionseffekt des

Molekülions erklärt, jedoch nicht experimentell nachgewiesen werden. Diese unbefriedigenden Ergebnisse zeigen die Limitierungen der LD-TOF-MS auf. Im Gegensatz dazu führt die lösungsmittelfreie Probenpräparation zu MALDI-TOF-Massenspektren, die eindeutig das intakte Molekülion als Radikalkation (**Abb. 3-9c**) und als Na-Pseudo-Molekülion neben Spuren an dechloriertem Nebenprodukt als Radikalkation (**Abb. 3-1** mit R=H) nachweisen. Das erhaltene Massenspektrum ist hinsichtlich der Signalintensität, der Auflösung und des Informationsgehaltes von hoher Qualität.

Aufgrund der geringen Löslichkeit von Pigment Rot 144 **6** konnte dieses für die lösungsmittelbasierende MALDI-Probenpräparation in THF nur suspendiert werden. Die lösungsmittelbasierende MALDI-Probenpräparation erlaubt jedoch auch die Ermittlung des intakten Molekularions durch einfache Suspension des Analyten und zeigt damit einen gewissen Grad an Matrixunterstützung. Die geringe Leistung der konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-Probenpräparation kann in diesem Fall durch Inhomogenitäten im Analyt-Matrix-System durch die schlechte Durchmischung sowie durch die Segregation während des Verdampfungsprozesses des Lösungsmittels bei der Kristallisation erklärt werden.

Der Vergleich der LD-TOF-MS und der lösungsmittelbasierenden und lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS-Methode solcher UV-absorbierenden Substanzen zeigt für die letztere Methode eine klare Matrixunterstützung, hohe Sensitivität und eine hohe Probenhomogenität, welche sich durch eine hohe „shot-to-shot“-Reproduzierbarkeit auszeichnet. Damit liefert die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS von den Methoden, die in diesen Untersuchungen zum Vergleich standen, deutlich die besten Ergebnisse. Die lösungsmittelfreie MALDI-Probenpräparationsmethode überwindet nicht nur die Inkompatibilitäten von Analyt-Matrix-Lösungsmittel, die durch die sehr geringe Löslichkeit des Analyten hervorgerufen wird, sondern behebt ebenfalls die Probleme der Oxidationstendenz des Analyten bei aciden Lösungsmitteln im Lösungsschritt, welcher für die herkömmliche lösungsmittelbasierende Probenpräparation erforderlich ist. Zusätzlich wurde damit in dieser Untersuchung erstmals Pigment Rot 144 **6** mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert.

Um mögliche Nebeneffekte, die durch mechanisch induzierte Reaktionen in der Kugelmühle (z.B. durch mechanische Energiezufuhr) verursacht werden könnten, während des Mahlvorgangs auszuschließen, wurden UV-Spektren von Pigment Rot 144 **6** vor und nach dem Mahlvorgang aufgenommen. Sie zeigten keine Veränderungen.

Die Motivation dieser Untersuchung war es, die traditionelle Methode der lösungsmittelbasierenden mit der neuen lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS-Methode zu vergleichen. Der Nachweis der Matrixunterstützung bei der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS wird für jeden der untersuchten Analyte gefunden, und es zeigen sich generell höhere Signalintensitäten und ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Dies zeigt, dass die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS als eine zusätzliche und komplementäre Probenpräparationsmethode einsetzbar ist. Die Vorteile, die sich in diesen Untersuchungen ergeben haben, sollen daher durch weiterführende Untersuchungen vertieft werden. Hinsichtlich des theoretischen Verständnisses ergeben sich neue Perspektiven, welche in Kapitel 3.1.3 diskutiert und durch geeignete Experimente vertieft werden.

3.1.2.2 Vorteile gegenüber der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS

Im Vordergrund dieser Untersuchung steht, die Vorteile der lösungsmittelfreien gegenüber der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS zu erarbeiten. Die Analyten, die in diesem Kapitel eingehender diskutiert werden, sind in **Abb. 3-10** dargestellt. Die detaillierte Motivation dieser Untersuchung wird in den Unterkapiteln gegeben.

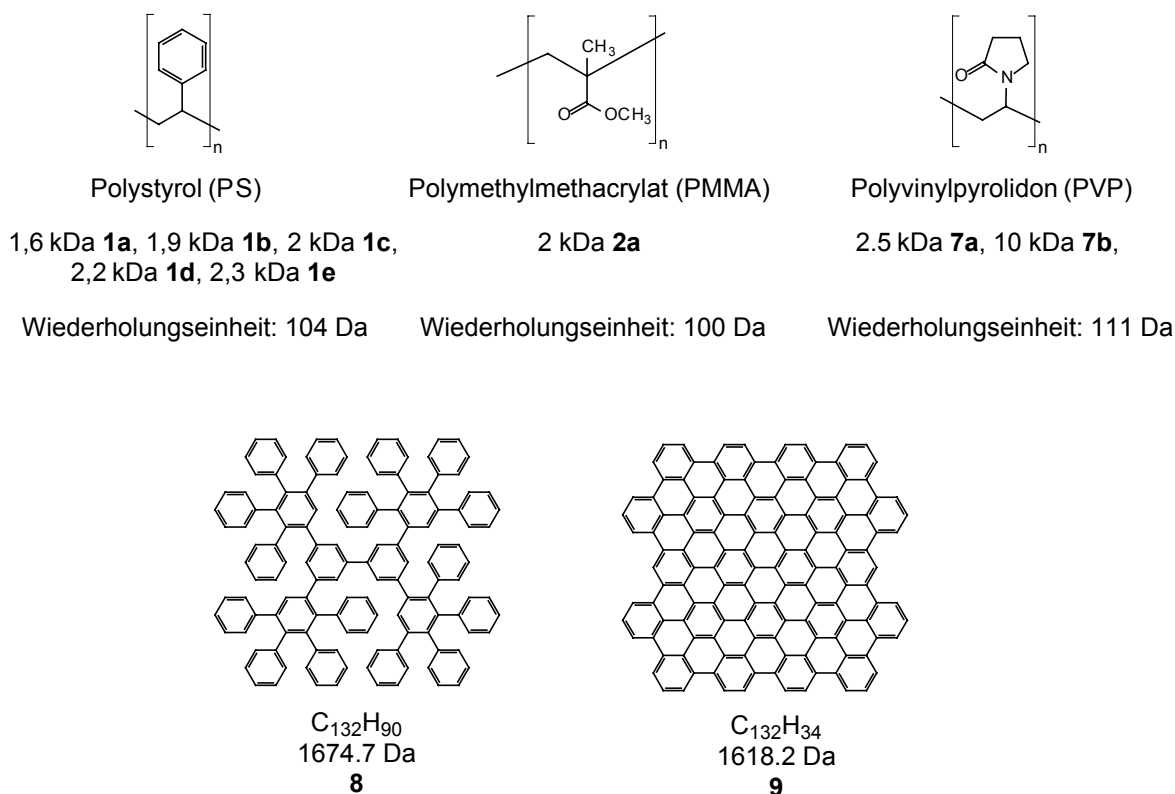


Abb. 3-10: Strukturen der Analyten.

3.1.2.2.1 Freie Wahl der Matrices

Die größte Abhängigkeit der Qualität eines Massenspektrums, welches durch lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS erhalten wurde (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31), besteht darin, inwieweit es die Sprödigkeit des Analyten und der Matrix erlauben, ein homogenes Gemisch aus beiden zu erhalten. Dies kann gängigerweise durch mechanische Behandlung im festen Zustand mit der Kugelmühle erreicht werden. Dadurch könnten prinzipiell ebenfalls Analyt-Matrix-Metallsalz-Kombinationen zugänglich sein, die bislang wegen Inkompatibilität der unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften nicht zugänglich waren.

Für diese Modelluntersuchung werden Analyt-Matrix-Kombinationen wie PS/IAA/CF₃CO₂Ag, PMMA/IAA/CF₃CO₂Li und PVP/Dithranol/CF₃CO₂Na gewählt, welche in der konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS wegen der Unverträglichkeit des wässrigen und organischen Lösungsmittels nicht zugänglich sind. Die Analyten PMMA und PS benötigen organische Lösungsmittel. PVP quillt in organischen Lösungsmitteln und ist nur in wässrigen Lösungsmitteln gut

löslich¹⁶¹. Die IAA-Matrix ist in wässrigem Medium sowie Methanol und die Dithranol-Matrix in verschiedenen organischen Lösungsmitteln löslich (z.B. THF, Dichlormethan).

Unter Verwendung der gängigen molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse von 1/500 werden die Analyten durch Massenspektren mit hoher Qualität, starken Signalintensitäten und guten Signal-zu-Rausch-Verhältnissen im Falle von PMMA(**2a**)/IAA (**Abb. 3-11a**), PVP(**7a**)/Dithranol (**Abb. 3-11b**) charakterisiert. PS(**1c**)/IAA (**Abb. 3-11c**) zeigt im gleichen molaren Verhältnis von 1/500 geringere Qualität im Vergleich zur PMMA- und PVP-Probe, aber auch im Vergleich mit der konventionellen Kombination PS/Dithranol (**Abb. 3-14b**).

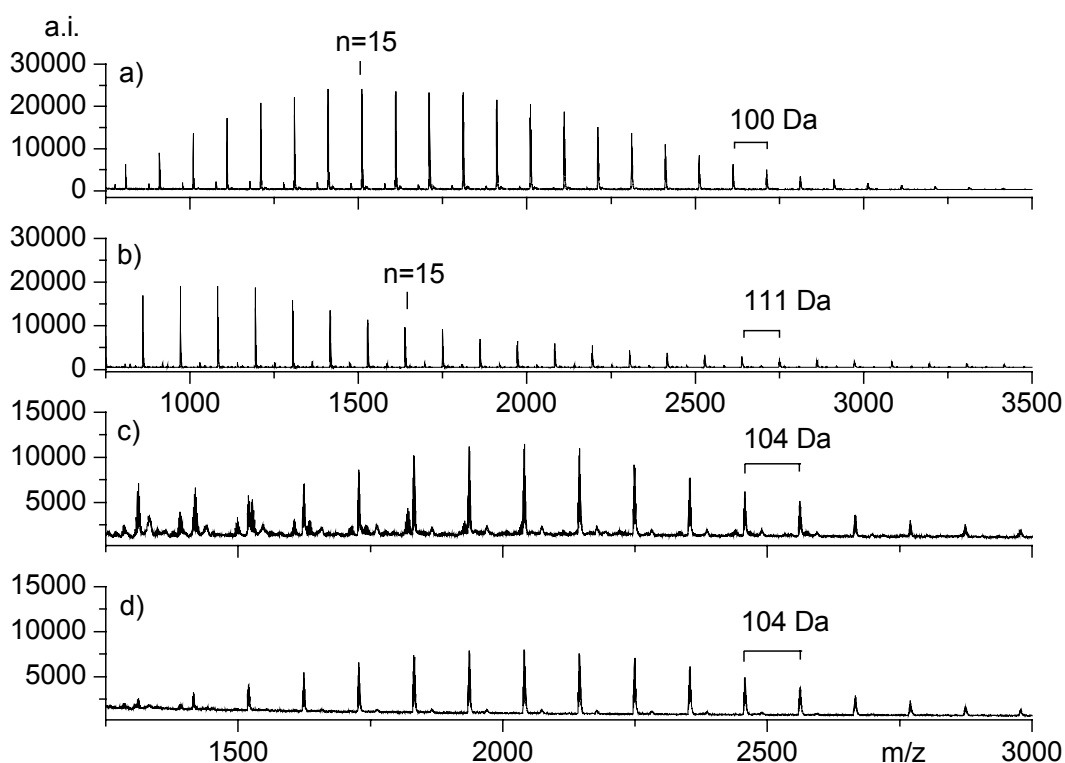


Abb. 3-11: MALDI-TOF-Massenspektrum von neuen Analyt-Matrix-Kombinationen in lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS in Abhängigkeit von den molaren Analyt/Matrix/Metallsalz-Mischungsverhältnissen: a) PMMA (2.000 Da, **2a**), IAA und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$ von 1/500/10; b) PVP (2.500 Da, **7a**), Dithranol und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ von 1/500/10; c) PS (2.000 Da, **1c**), IAA und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$ von 1/500/10; d) PS (2.000 Da, **1c**), IAA und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$ von 1/5.000/10.

Durch weiterführende Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die geringe Qualität bei 1/500 in **Abb. 3-11c** durch eine weitere Matrixverdünnung auf 1/5.000 wesentlich verbessert werden kann (**Abb. 3-11d**). Bislang galt 1/500 als das gängige Analyt/Matrix-Verhältnis, welches auch für die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS konventioneller Analyt-Matrix-Kombinationen gefunden wurde (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31). Das verbesserte molare Verhältnis von PS/IAA bei 1/5.000 (**Abb. 3-11d**) anstatt bei 1/500 (**Abb. 3-11c**) zeigt, dass neue Analyt-Matrix-Kombinationen die optimalen

molaren Verhältnisse signifikant verschieben können. Damit könnten neue Analyt-Matrix-Kombinationen wertvolle Vorteile haben. Dies kann aufgrund der Löslichkeits- und der Kompatibilitätsbeschränkung nicht mit konventioneller lösungsmittelbasierender MALDI-TOF-MS verwirklicht werden.

Weitere Untersuchungen zu neuen Analyt-Matrix-Kombinationen mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS wurden anhand von PVP (10.000 Da, **7b**) durchgeführt. Die erhaltenen MALDI-TOF-Massenspektren (Daten nicht gezeigt) zeigen in der Tat Matrixunterstützung für jede eingesetzte Matrix (IAA, DHB, HABA; Dithranol, HCCA, Na, SA, VitA, TCNQ). Die Qualität der erhaltenen Massenspektren ist unterschiedlich. Jedoch bestätigten diese Ergebnisse, dass dieser Ansatz neue, bislang unbekannte Analyt-Matrix-Kombinationen erlaubt.

Durch die Beseitigung des Lösungsmittelparameters wird die Zahl der Variablen verringert, die bei der Probenpräparation berücksichtigt werden muss. Somit verbleiben nur noch die bedeutenden Parameter Analyt und Matrix, die entscheidenden Einfluss auf den MALDI-Prozess ausüben. Die Eigenschaften des Lösungsmittels müssen nicht mehr berücksichtigt werden. Dies ist ein sehr wertvoller Vorteil der lösungsmittelfreien gegenüber der konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS-Methode. Zahlreiche vollständig neue Analyt-Matrix-Kombinationen sind nun zugänglich und vereinfachen die Suche nach einem optimierten System erheblich.

3.1.2.2.2 Verhinderung von löslichkeitsbedingten Suppressionseffekten

Die Charakterisierung komplexer Substanzgemische, welche insbesondere Kompatibilitäts- oder Löslichkeitsbeschränkung zeigen, ist aus Gründen der Segregation während des Verdampfens des Lösungsmittels schwierig durchzuführen. Unterschiedliche Desorptions/Ionisationswahrscheinlichkeiten bzw. unzureichende MALDI-Probenpräparation können angeführt werden. In einem Reaktionsgemisch sind die Edukte häufig viel besser löslich als die Produkte. Folglich werden im Lösungsschritt der konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS die Edukte zu einem wesentlich höheren Grad gelöst als die Produkte. Die molaren Verhältnisse der löslichen und unlöslichen Teile im gelösten Überstand wird vorzugsweise zum löslichen Teil verschoben. Daher ist die Charakterisierung des weniger löslichen Produkts gehemmt oder gar verhindert. Diese Beschränkung in MALDI-TOF-MS wird vermutlich durch die lösungsmittelfreie Probenpräparationsmethode überwunden.

Eine solche Situation wird durch die folgende Modelluntersuchung dokumentiert. Eine definierte komplexe Mischung einer monodispersen, organischen Verbindung eines löslichen, dendritischen Eduktes $C_{132}H_{34}$ **8** (in CH_2Cl_2 ; Synthese s. Kapitel 6.1.2, **Abb. 6-1**, S. 258) und eines unlöslichen Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoff (PAH)-Produktes $C_{132}H_{90}$ **9**^{III} (Synthese s. Kapitel 6.1.2, S. 259, **Abb. 6-2**) wird in einem molaren Verhältnis von 1/10 gemischt. Damit wird eine Ausbeute von 90 % simuliert. An dieser definierten Mischung zweier zuvor wohl charakterisierten Verbindungen werden die beiden MALDI-Präparationsmethoden auf deren Potential evaluiert.

^{III} Die Synthese wurde von Frau *Dr. A. Veyland* im Rahmen ihrer Postdoktorandenzeit im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS charakterisiert beide Komponenten dieser Modellmischung. Das Massenspektrum ist von hoher Qualität (**Abb. 3-12a**). Beide Moleküle werden als Radikalkationen detektiert. Das dendritische Edukt **8** wird aufgrund von Desorptions/Ionisationspräferenzen zu einem wesentlich höheren Grad ermittelt als das Produkt **9** (180-fache Überrepräsentation). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer früheren Untersuchung des C₂₂₂H₄₂-PAHs (150-fach¹²⁵). Der Suppressionseffekt einer weniger gut löslichen Verbindung durch eine lösliche Verbindung in einem Substanzgemisch aufgrund insuffizienter MALDI-Probenpräparation kann mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS erfolgreich behoben werden. Der Suppressionseffekt aufgrund präferentieller Desorption/Ionisation ist unabhängig von der Probenpräparation und bleibt durch die Anwendung der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS unbeeinflusst. Ein wirklichkeitstreuere Abbild dieser Substanzmischung kann damit auch mit dieser neuen Probenpräparationsmethode nicht erhalten werden.

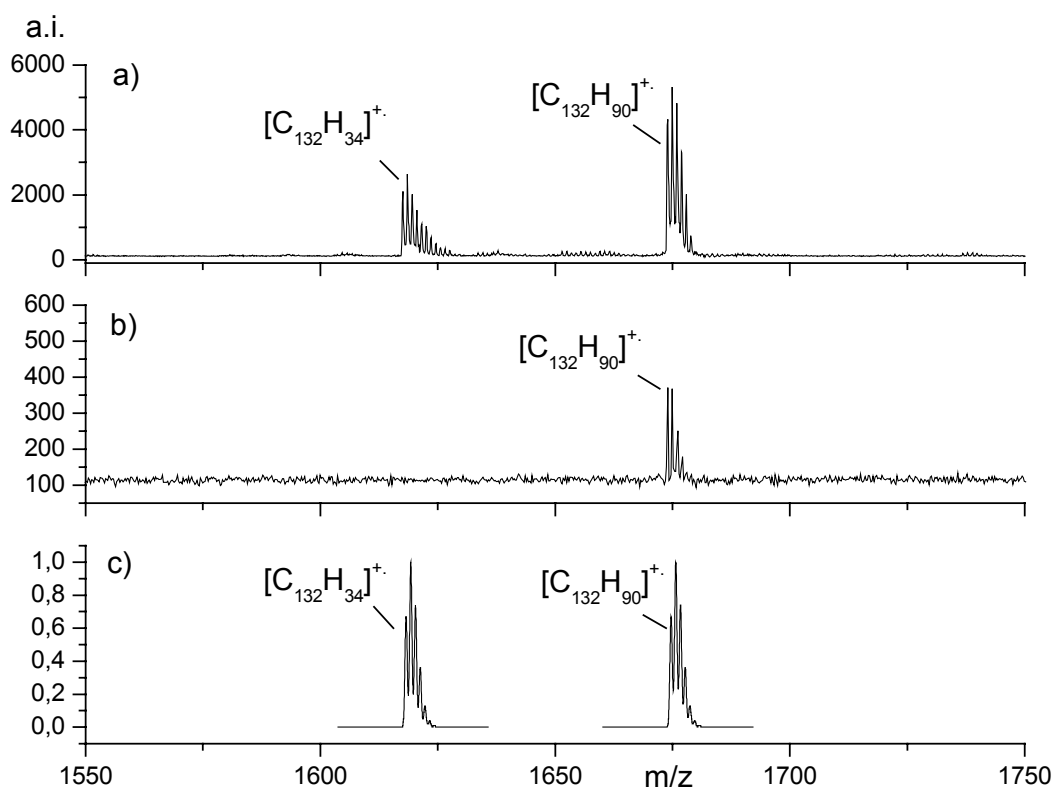


Abb. 3-12: MALDI-TOF-Massenspektren eines Modellgemisches einer 90 % Reaktionsausbeute der Cyclodehydrierungsreaktion des Dendrimervorläufers C₁₃₂H₉₀ **8** zum PAH-Produkt C₁₃₂H₃₄ **9**: a) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS; b) konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS, c) qualitative Computersimulation von Edukt und Produkt.

Für einen möglichst direkten Vergleich der beiden MALDI-Probenpräparationsmethoden wird die Analyt-Matrix-Pudermischung der lösungsmittelfreien Probenpräparation in Dichloromethan gelöst. Das auf dem Probenträger auskristallisierte MALDI-Gemisch erscheint sehr inhomogen. Ein

Massenspektrum (**Abb. 3-12b**) konnte nur durch erhöhte Laserleistung zugänglich gemacht werden. Dabei wurde ausschließlich das dendritische, lösliche Edukt nachgewiesen. Das erhaltene lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-Massenspektrum in **Abb. 3-12b** zeigt folgende Nachteile gegenüber **Abb. 3-12a**:

- vollständige Unterdrückung des PAH-Signals,
- geringe Signalintensität des Eduktes $C_{132}H_{34}$ **9**: rund ein Zehntel im Vergleich zum lösungsmittelfreien Massenspektrum,
- geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis,
- vermehrt Signale unter 1.000 Da, die allgemein bei lösungsmittelbasierender MALDI-TOF-MS beobachtet werden und
- geringe Übereinstimmung mit der Isotopenverteilung (**Abb. 3-12c**).

Diese Unterschiede in der Aussagekraft im Vergleich zum lösungsmittelfreien Massenspektrum können auf die starken Inhomogenitäten und die erhöhten Laserleistungen zurückgeführt werden, die angewendet werden mussten. Die hohe Massengenauigkeit, Sensitivität und das Auflösungsvermögen der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS stimmt mit PS-Untersuchungen **1a** in einem ähnlichen Massenbereich überein (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31).

Der größte Unterschied bei dieser Untersuchung zeigt sich darin, dass das PAH-Produkt **9** selbst bei sehr hohen Laserleistungen mittels lösungsmittelbasierender MALDI-TOF-MS nicht nachweisbar ist. Dies beruht auf den starken Löslichkeitsunterschieden zwischen Produkt und dem Vorläufer, aber genau dies simuliert eine praktische Laborsituation. Folglich würde die lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS das falsche Ergebnis liefern, nämlich dass die Reaktion zum Cyclodehydrierungsprodukt nicht gelungen ist, obwohl eine 90 %-ige Ausbeute zugrunde liegt. Die Charakterisierung dieser komplexen Mischung konnte mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS (**Abb. 3-12a**) durchgeführt werden, ohne

- Kenntnisse über die Löslichkeit der Analyten oder
- zeitintensive Optimierungsprozeduren.

Das Erstere ist insbesondere von Bedeutung für Analytensysteme (z.B. temperatur- oder oxidationslabile Verbindungen), bei denen eine Wärmebehandlung zur Dekomposition oder zu anderen irreführenden MALDI-Ergebnissen (z.B. präferentielles Lösen einer Komponente) führt. Eine diesen Ergebnissen ganz ähnliche Verbesserung kann für kompatibilitätsbeschränkte Edukt/Produkt-Gemische (z.B. Löslichkeit in wässrigem bzw. organischem Lösungsmittel) angenommen werden, welche in der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS in Abhängigkeit des gewählten Lösungsmittelsystems bevorzugt das Produkt bzw. Edukt charakterisieren würde.

3.1.2.2.3 Verhinderung der Überrepräsentation eines Nebenproduktes

Bei der Charakterisierung von schwer löslichen Analyten bzw. wenig kompatiblen Mischungen kann der MALDI-Anwender entsprechende Vorsichtsmaßnahmen während der Probenvorbereitung treffen. Inhomogenitäten sind häufig schon über die Videokamera des MALDI-Massenspektrometers zu erkennen. Eine vollständig andere und schwierigere Situation stellen die Suppressionseffekte dar, die in hohem Grade in kompatiblen Standardsystemen auftreten, da keine Inhomogenitäten sichtbar sind. Folglich hat der Anwender keinen Grund, das erzielte MALDI-TOF-MS-Ergebnis zu hinterfragen.

In der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-Routineanalyse von PS (2.000 Da, **1a**) wird ohne genaues Abwiegen von Analyt und Matrix ein Massenspektrum erhalten, welches die zu erwartenden *n*-Bu- und H-Endgruppen charakterisiert (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wird jedoch eine weitere Polymerverteilung mit einer Wiederholungseinheit von 104 Da gefunden. Die Simulation der Isotopenverteilung (Daten nicht gezeigt) weist eine Silberkationisierung nach (Hintergrundinformation s. Kapitel 2.1.3, S. 20) und schließt andere herkömmliche Kationisierungsmetallsalze aus. Der beobachtete Massenunterschied von +60 Da (beziehungsweise -44 Da) zur ursprünglichen Polymerverteilung kann durch keine herkömmliche Endgruppe oder eine Analyt-Matrixadduktbildung erklärt werden.

Bei Wiederholungsmessungen schwankt das Ergebnis hinsichtlich des einen oder anderen PS-Oligomers. ¹H-NMR-Experimente dieser niedermolekularen Polymeren zeigen keine zusätzliche Endgruppe und schließen einen höheren Grad einer Verunreinigung in der PS-Probe aus (< 5 %). Die plausibelste Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass starke Suppressionseffekte der MALDI-TOF-MS-Analyse zugrunde liegen. Der analytische Ansatz zur Aufklärung des vermuteten Suppressionseffektes ist ein direkter Vergleich beider MALDI-TOF-MS-Methoden in Abhängigkeit verschiedener molarer Analyt/Matrix-Verhältnisse. Um einen direkten Vergleich beider Methoden zu erhalten, wird die lösungsmittelfreie Pudermischung im geeigneten Lösungsmittel gelöst, um lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS durchzuführen. Damit unterscheiden sich beide MALDI-Probenpräparationsmethoden ausschließlich durch das Lösungsmittel.

In lösungsmittelbasierender MALDI-TOF-MS mit einem molaren Verhältnis von Analyt/Matrix/Metallsalz von 1/50/10 werden ausschließlich die zu erwartenden *n*-Bu- und H-Endgruppen ermittelt (**Abb. 3-13a**). In einem molaren Verhältnis von 1/500/10 tritt zusätzlich (**Abb. 3-13b**) zur ursprünglichen Polymerverteilung der *n*-Bu- und H-Endgruppen eine weitere Polymerverteilung auf. Diese wird für 1/5.000/10 ausschließlich gefunden (**Abb. 3-13c**). Folglich wird eine zusätzliche Polymerverteilung bei Zunahme der Matrixverdünnung in der konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS erhalten, wenn die MALDI-Pudermischung PS/Dithranol/CF₃CO₂Ag in THF gelöst wird.

In der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS wird in keinem der angewendeten molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse zwischen 1/50 und 1/5.000 (**Abb. 3-14**) eine zum PS-Oligomer mit *n*-Bu- und H-Endgruppen zusätzliche Polymerverteilung ermittelt.

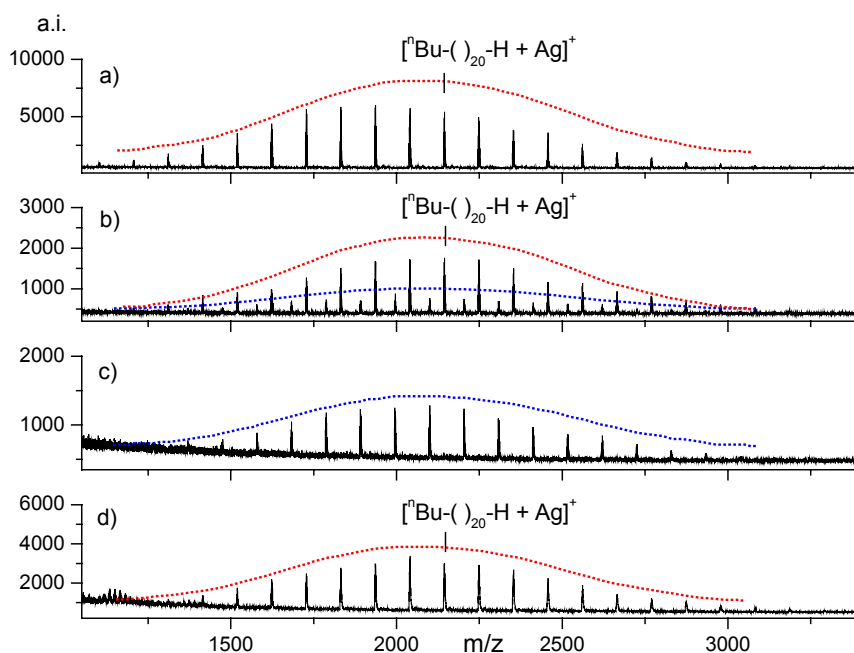


Abb. 3-13: MALDI-TOF-Massenspektrum von PS (2.000 Da, **1c**) in Abhängigkeit der molaren Mischungsverhältnisse von PS/Dithranol/CF₃CO₂Ag und dem angewendeten Lösungsmittel bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation: a) 1/50/10 in THF, b) 1/500/10 in THF, c) 1/5.000/10 in THF, d) 1/5.000/10 in Dichlormethan.

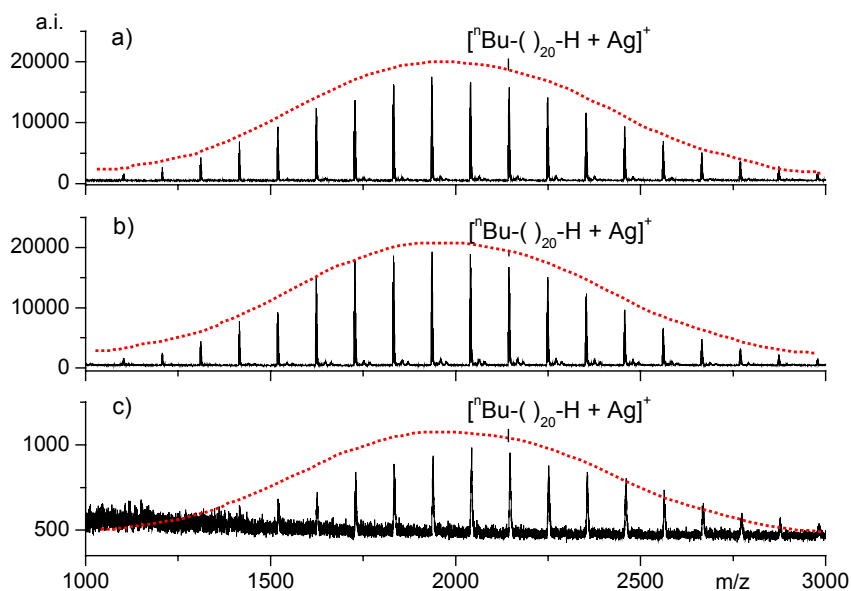


Abb. 3-14: MALDI-TOF-Massenspektrum von PS (2.000 Da, **1c**) in Abhängigkeit der molaren Mischungsverhältnisse von PS/Dithranol/CF₃CO₂Ag bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation: a) 1/50/10, b) 1/500/10, c) 1/5.000/10.

Die Wiederholung dieses Vergleiches zeigt identische Ergebnisse und schließt Fehler in der Reproduzierbarkeit aus. Wird die lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS dieses Matrixverdünnungsexperimentes mit Dichlormethan durchgeführt, wird keine zusätzliche Polymerverteilung in einem der verwendeten molaren Verhältnisse zwischen 1/50 und 1/5.000 ermittelt. In **Abb. 3-13d** ist dies exemplarisch für ein molares Verhältnis von 1/5.000/10 gezeigt.

Das irreführende Ergebnis einer zusätzlichen Endgruppe in der Polymerverteilung, die ausschließlich in den konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-Massenspektren mit THF als Lösungsmittel auftritt, wird möglicherweise durch Spuren einer Verunreinigung verursacht, die unterhalb der ¹H-NMR-Detektionsgrenze liegt. Dies wurde auch durch Testmessungen mittels ESI- und FD-MS gestützt. Die lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS-Ergebnisse sind wahrscheinlich auf eine präferentielle Desorption/Ionisation von endgruppenfunktionalisiertem PS, im Gegensatz zur Wasserstoff- und Butylgruppenterminierten Probe, zurückzuführen.

Dieser Annahme folgend wurden PS-Oligomere mit ähnlichem Molekulargewicht (1,6 **1a** und 2.300 Da **1e**) untersucht, die mit aus der gleichen Charge stammendem Initiator hergestellt wurden. Diese PS-Oligomere zeigen mit zunehmender Matrixverdünnung die gleiche zusätzliche Polymerverteilung von +60 Da (Daten nicht gezeigt). PS-Oligomere (1.900 Da **1b** und 2.200 Da **1d**), welche von verschiedenen Initiatorchargen stammen, zeigen nur die Polymerverteilung mit den erwarteten *n*-Bu- und H-Endgruppen (Daten nicht gezeigt). Eine Strukturzuweisung zu dieser zusätzlichen Polymerverteilung kann nicht gegeben werden. Dies steht auch nicht im Vordergrund der Untersuchung. In diesem Beitrag konnten in einer Standardsituation eines im hohen Grad kompatiblen Analyt-Matrix-Systems eindrucksvolle Unterschiede beider MALDI-TOF-MS-Methoden aufgrund des Einflusses des Lösungsmittels erarbeitet werden. Der Suppressionseffekt des PS-Oligomers mit *n*-Bu- und H-Endgruppen wird erfolgreich mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS behoben.

Die Kombination von PS (2.000 Da, **1c**) und IAA-Matrix, die unter einem anderen Aspekt zuvor untersucht wurde, zeigt ebenfalls in keinem der verwendeten molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse (**Abb. 3-11c,d**) die zusätzliche Endgruppe mit +60 Da, die in der konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS mit THF als Lösungsmittel gefunden wurde (**Abb. 3-13**). Dies zeigt die Zuverlässigkeit der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS hinsichtlich einer geringeren Anfälligkeit für Suppressionseffekte unabhängig von der verwendeten Matrix. Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS ist damit weniger empfindlich und liefert repräsentativere Ergebnisse. Folglich muss die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS als zuverlässigere MALDI-Probenpräparationsmethode bewertet werden. Dieser verminderte Suppressionseffekt ist besonders wertvoll hinsichtlich Fehlinterpretationen und Quantifizierungsuntersuchungen.

Weitere problematische Analyten konnten detailliert mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS (z.B. Verminderung von Segregationseffekten bei Poly(dimethylsiloxan) (PDMS)^{IV}) untersucht werden¹⁶². Auf diese wird im Folgenden nicht detaillierter eingegangen.

^{IV} Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Frau *Dr. S. Keune*, Goldschmidt AG, Essen.

lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS-Analyse zur Charakterisierung unlöslicher Substanzen bislang nicht beschrieben.

Motivation dieser Untersuchung ist es, die universelle Anwendbarkeit der lösungsmittelfreien Probenpräparationsmethode zur Charakterisierung unlöslicher Substanzen zu evaluieren und mit literaturbeschriebenen Ansätzen zu vergleichen. Die Analyten, die in diesem Kapitel eingehender diskutiert werden, sind in **Abb. 3-15** dargestellt. Weitere unlösliche Substanzen konnten detailliert mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS charakterisiert werden¹⁷⁵. Da die Untersuchungen zu **Poly(dithiathianthren)** (**Abb. 3-16**)^V keine wesentlichen zusätzlichen Aspekte zu denen von **Polyfluoren 11** ergeben, beschränkt sich die Ausführung und Diskussion der Charakterisierung unlöslicher Substanzen mittels MALDI-TOF-MS auf das letztere Beispiel.

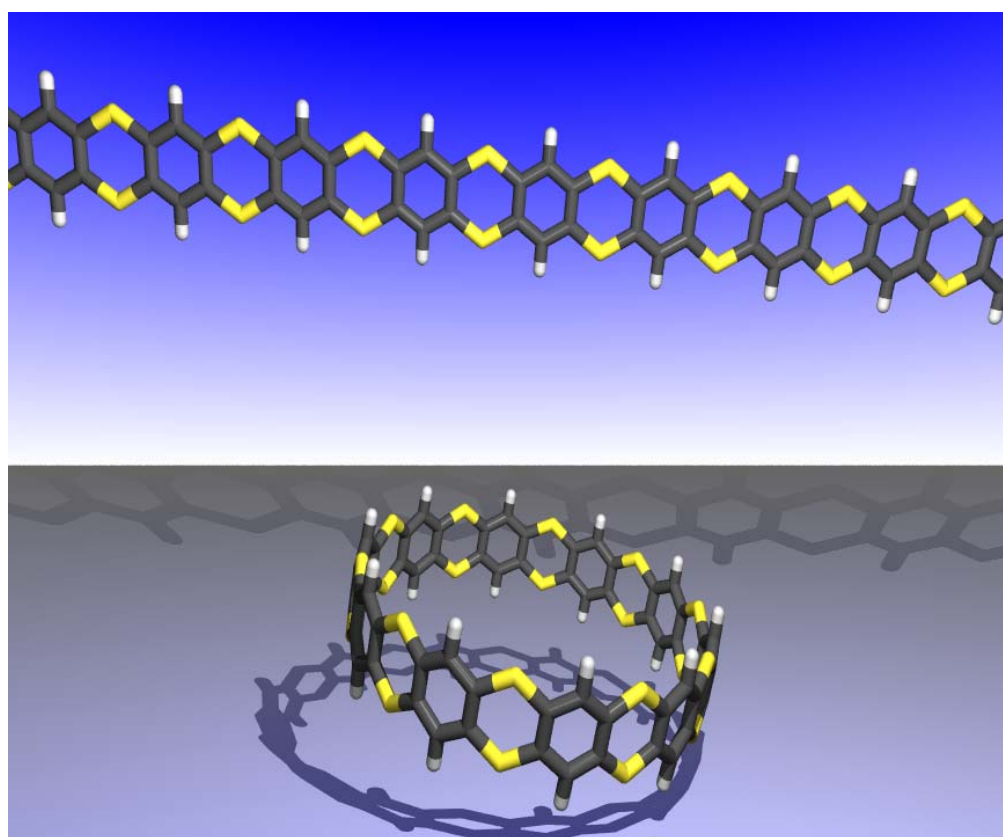


Abb. 3-16: Charakterisierung von Poly(dithiathianthren)¹⁷⁵ mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS.

^V Die Synthese wurde von Herrn *Dr. J. Leuninger* im Rahmen seiner Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

3.1.2.3.2 Vergleich mit literaturbekannten massenspektrometrischen Methoden

Die Charakterisierung von unlöslichen Substanzen ist generell eine analytische Herausforderung. Ein Nachteil ist, dass bei der Entwicklung einer entsprechenden analytischen Methode ergänzende Methoden fehlen, die einen Vergleich der erhaltenen Daten ermöglichen würden. Daher kann mit keinem unterstützenden Beweis durch eine andere analytische Methode oder durch einschlägige Literatur gerechnet werden.

Die lösungsmittelfreie MALDI-Probenpräparation¹¹⁵ soll durch Vergleich mit literaturbeschriebenen Methoden zunächst hinsichtlich deren Potential zur Charakterisierung von unlöslichen Substanzen evaluiert werden. Die Literatur beschreibt bislang nur eine MALDI-Probenpräparationsmethode, die eine unlösliche Substanz, ein geschütztes Sorbitolderivat (SOR) **10** (Synthese s. Kapitel 6.1.2, **Abb. 6-3**, S. 259), zu charakterisieren vermochte¹⁷⁴. Diese MALDI-Probenpräparation sieht eine Abscheidung des Analyt-Matrix-Gemisches (SOR/Ferulische Säure 1/100) durch eine thermische Vakuumsublimation vor.

In **Abb. 3-17** werden Massenspektren von SOR **10**, die mittels unterschiedlicher LD- und MALDI-Probenpräparationsmethoden erhalten wurden, gegenübergestellt. Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (**Abb. 3-17d**) liefert qualitativ gute Massenspektren von SOR **10**, welches auch mit konventioneller lösungsmittelbasierender MALDI-Probenvorbereitung (**Abb. 3-17c**) charakterisiert werden kann. Eine Suspension eines Analyten kann zu partieller Durchmischung mit der Matrix im kristallinen Zustand und damit zu einem ausreichenden MALDI-Matrixeffekt bei der MS-Untersuchung führen. Dadurch können in Ausnahmefällen auch schwerlösliche Substanzen unter optimierten Bedingungen vermessen werden.

SOR **10** kann auch eindeutig mittels lösungsmittelbasierender und lösungsmittelfreier LD-TOF-MS bei höheren Laserleistungen fragmentierungsfrei charakterisiert werden. Dies kann auf das niedrige Molekulargewicht zurückgeführt werden, das eine direkte Anregung des Analyten erlaubt. Die qualitativen Unterschiede in **Abb. 3-17a,b** ergeben sich ausschließlich durch verstärkte Bildung von Pseudo-Molekülonen, die bei der lösungsmittelbasierenden LD-Probenpräparation wesentlich stärker ausgeprägt sind.

Damit wird ein zusätzlicher Aspekt zwischen lösungsmittelbasierender (**Abb. 3-17a,c**) und lösungsmittelfreier Probenpräparation (**Abb. 3-17b,d**) in der Art deutlich, dass bei Verzicht auf Lösungsmittel der Matrixuntergrund sowie konkurrierende Ionisationen vernachlässigbar sind.

Durch die LD-Messungen an SOR **10** ist der matrixunterstützende Effekt bei den MALDI-Probenpräparationsmethoden nicht mehr eindeutig. Ein Vergleich mit literaturbekannten MALDI-Probenpräparationsmethoden zur Charakterisierung unlöslicher Substanzen konnte deshalb nicht erfolgreich durchgeführt werden, weil kein anderer Analyt mit einer MALDI-Probenpräparationsmethode, literaturbeschrieben charakterisiert ist bei der nachweislich ein matrixunterstützender Effekt festzustellen ist.

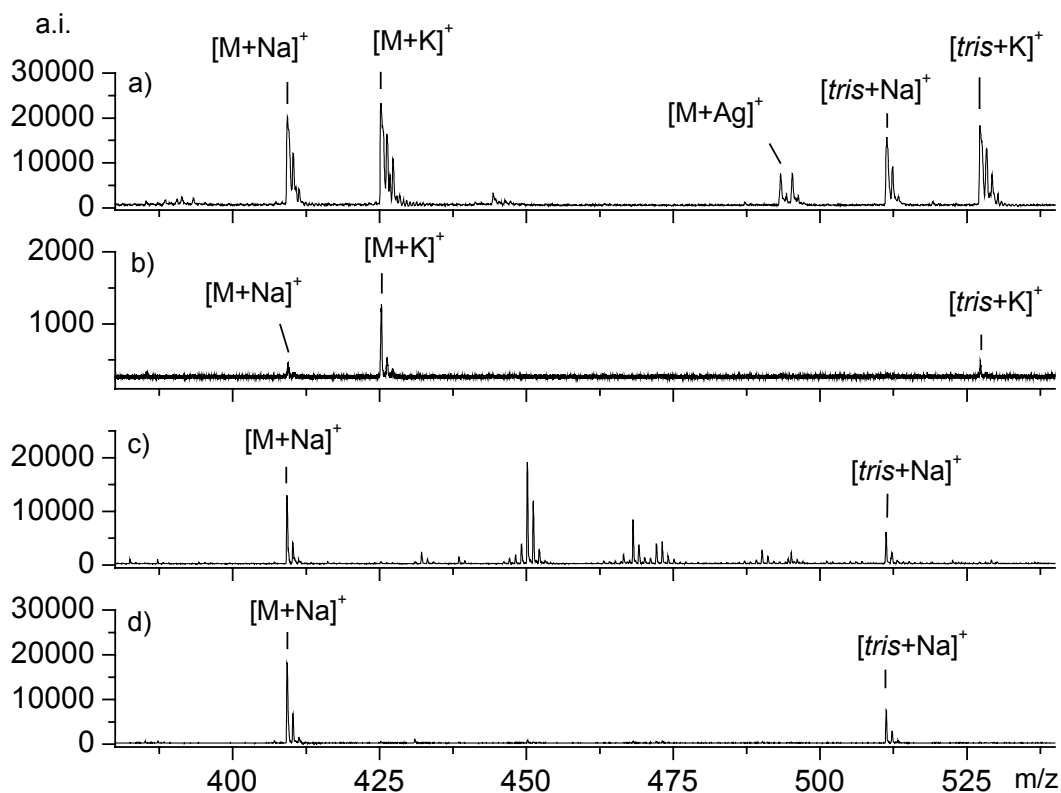


Abb. 3-17: MALDI-TOF-Massenspektren von SOR 10 und des *tris*-geschützten Sorbitolderivates: a) LD-TOF-MS: suspendiert in THF; b) LD-TOF-MS: lösungsmittelfreie Auftragung; c) MALDI-TOF-MS: konventionelle lösungsmittelbasierende Probenpräparation unter Anwendung von CF_3CO_2Na ; d) MALDI-TOF-MS: lösungsmittelfreie Probenpräparation unter Anwendung von CF_3CO_2Na .

3.1.2.3.3 Charakterisierung von unlöslichem Poly-(9,9-diphenyl-2,7-fluoren)

Polyfluorene können einen hohen Anteil von unlöslichem, höhermolekularem Material aufweisen, welches bislang nicht ausreichend charakterisiert werden konnte. **Poly-(9,9-diphenyl-2,7-fluoren) 11**^{VI} (Abb. 3-15) wurde vor kurzem durch Yamamoto-Kupplung (Synthese s. Kapitel 6.1.2, Abb. 6-4, S. 260) als erster Vertreter einer neuen Klasse lichtemittierender Poly-(9,9-diarylfluorene) synthetisiert¹⁷⁶. Der Hauptteil des Polymers ist in den konventionellen organischen Lösungsmitteln unlöslich. Eine kleine lösliche Fraktion konnte durch eine fünftägige Soxhletextraktion des Rohproduktes **11** mit Toluol erhalten werden. Die Menge der löslichen Fraktion war kleiner als 10 % der gesamten Polymerausbeute. Die getrennten löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden mit

^{VI} Die Synthese wurde von Herrn *Ph.D. A. Grimsdale* im Rahmen seiner Postdoktorandenzeit im AK Prof. K. Müllen am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

MALDI-TOF-MS charakterisiert. Hierbei wurden prinzipiell zwei unterschiedliche Probenpräparationsmethoden, jedoch jeweils mit Dithranol als Matrix angewendet. So wird konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS angewendet, um die lösliche Fraktion zu charakterisieren, während lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS die Charakterisierung der unlöslichen Fraktion erlaubt. Das Massenspektrum der unlöslichen Fraktion **11** (**Abb. 3-19**) konnte nur mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS erhalten werden, während eine MALDI-TOF-Testmessung der konventionellen Probenpräparation vollständig versagte. Das Massenspektrum der löslichen Fraktion **11** (**Abb. 3-18**) zeigt eine Molekulargewichtsverteilung, die von 800 Da ($n=3$) bis < 5.000 Da ($n=15$) reicht. Das intensivste Signal entspricht einem Oligomerisationsgrad $n=6$. Die unlösliche Fraktion **11** (**Abb. 3-19**) gibt eine Molekulargewichtsverteilung wieder, die von 1.500 Da ($n=5$) bis ungefähr 8.000 Da ($n=25$) reicht, während die Hauptsignalintensität einen Oligomerisationsgrad $n=8$ anzeigt. Damit wird anschaulich, dass die Polymerverteilung zu höheren Molekulargewichten verschoben wird und dass ebenfalls Polymere mit Kettenlängen enthalten sind, die auch in der löslichen Fraktion anwesend sind.

Es scheint, dass einfache Soxhletextraktion die lösliche von der unlöslichen Fraktion nicht strikt trennen kann. So werden die zwei Fraktionen mit den jeweiligen Bestandteilen zwar angereichert, aber sie sind noch immer durch das Polymer der anderen Fraktion "verunreinigt". Da die intensivsten Signale der unlöslichen Fraktion **11** der gleichen homologen Polymerserie wie die der Signale der löslichen Fraktion **11** angehören, kann festgestellt werden, dass die Polymerkette während der Synthese weitergewachsen ist, obwohl das Material die maximale Länge für dessen Löslichkeit im Reaktionsgemisch überschritten hatte. Das beweist, dass die Reaktion an der Oberfläche des ausgefallenen Polymers auch weiter fortschreiten kann. Der maximale Polymerisationsgrad von **11**, der durch MALDI-TOF-MS ermittelt wurde, liegt bei $n \approx 25$. Damit wird nahegelegt, dass rund zehn Polymerisationszyklen an der Oberfläche des ausgefallenen Polymers stattfinden ($n(\max)_{\text{unlösliche Fraktion}}=25$, $n(\max)_{\text{lösliche Fraktion}}=15$, unter Verwendung von Dithranol als Matrix). Dieses Ergebnis ist jedoch nur qualitativ, da die einzelnen Signalintensitäten und folglich die Kurvenformen der Polymerverteilungen empfindlich von den angewendeten experimentellen Bedingungen abhängen. Aus diesem Grund wurden die gleichen experimentellen Bedingungen (z.B. Laserleistung, instrumentelle Einstellungen, Matrix usw.) für beide Fraktionen verwendet, um einen zuverlässigen Vergleich sicherzustellen.

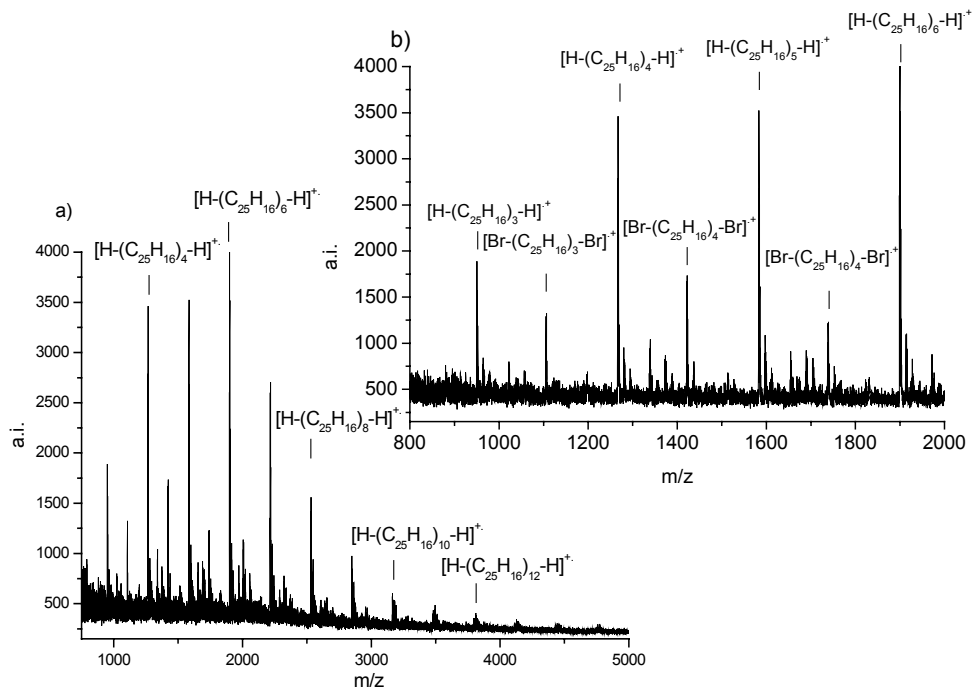


Abb. 3-18: MALDI-TOF-Massenspektren der löslichen Fraktion **11** unter Anwendung der konventionellen lösungsmittelbasierenden Probenpräparation (Dithranol als Matrix, Toluol als Lösungsmittel): a) ganzer Massenbereich; b) Ausschnittsbereich der vier intensivsten Signale.

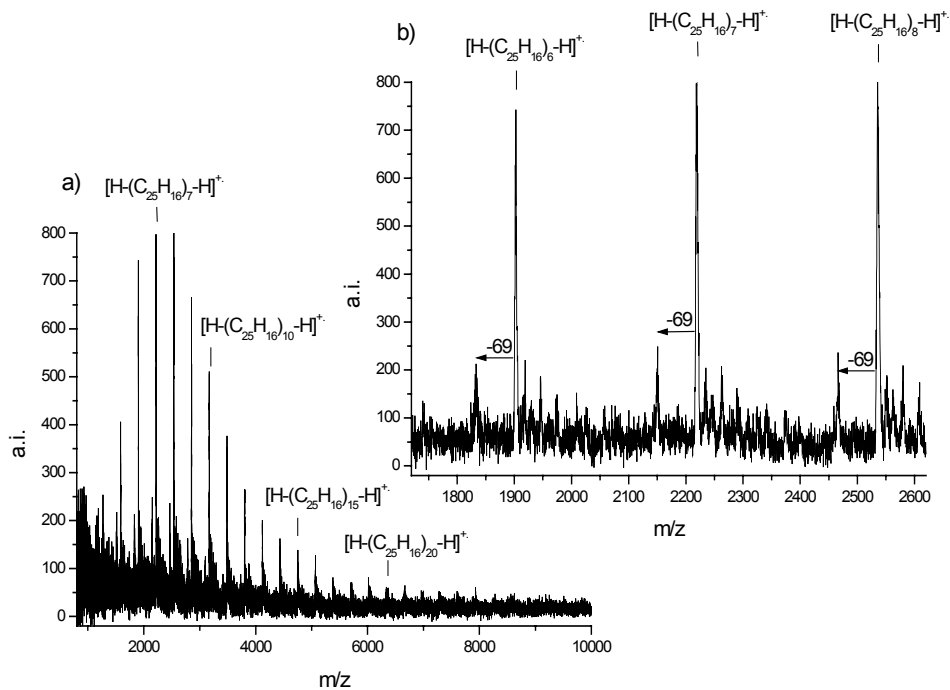


Abb. 3-19: MALDI-TOF-Massenspektren der unlöslichen Fraktion **11** unter Anwendung der lösungsmittelfreien Probenpräparation (Dithranol als Matrix): a) ganzer Massenbereich; b) Ausschnittsbereich der drei intensivsten Signale.

3.1.2.3.3.1 Endgruppenanalyse des Reaktionsgemisches

Für eine eindeutige strukturelle Zuweisung ist es unentbehrlich, die Ionisation von **11** zu ermitteln (Kapitel 2.1.3, S. 20). Eine Kationisierung findet nur über Ag^+ , jedoch nicht durch Li^+ , Na^+ oder K^+ statt. Die resultierenden Massenspektren sind von geringer Qualität. Wie schon für steife stäbchenförmige Polymere mit einer Polyparaphenylstruktur beschrieben wurde^{159,160}, ist die bevorzugte Ionisation von Struktur **11** die Bildung eines Radikalkations.

Beide, die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS der unlöslichen Fraktion und die lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS der löslichen Fraktion, zeigen, dass die Polymerketten mit den Wasserstoffendgruppen (Struktur **11c**) in den Hauptserien (**Abb. 3-18b** und **Abb. 3-19b**) als Radikalkationen auftreten. Diese strukturelle Zuweisung stimmt auch mit einer Simulation der Isotopenverteilung von **11c** überein. Das Wachstum dieses Polymers wurde durch eine Nebenreaktion, die zu einer Substitution der reaktiven Bromatome (**Abb. 3-15**) durch Wasserstoffatome während der Synthese führte, abgebrochen.

Durch eine ausführlichere Spektreninterpretation der löslichen Fraktion **11** können die zusätzlichen intensiven Signale einem Radikalkation mit der Struktur **11a**, die zwei terminale Bromatome trägt, zugeschrieben werden. Spuren der reaktiven Struktur **11a** treten im erhaltenen Polymer aufgrund der Bildung des Polymerniederschlags auf, da sich dabei eine unlösliche Schicht um **11a** bildet. Dadurch sind die eingeschlossenen Moleküle nicht mehr für eine weitere Polymerisations- oder Debromierungsreaktion zugänglich. Obwohl eine zyklische Struktur **11d** theoretisch erhalten werden könnte, unterstützen die MALDI-TOF-Massenspektren beider Fraktionen nicht ihre Bildung.

Das Massenspektrum der unlöslichen Fraktion (**Abb. 3-19b**) zeigt eine Nebenserie mit einer Wiederholungseinheit von **11** (316 Da), die keiner Verbindung zugewiesen werden konnte. Eine ähnliche Serie erscheint auch dann im Massenspektrum der löslichen Polymerfraktion, wenn die Laserleistung bei der Messung erhöht wird. Die Signalintensität dieser Nebenserie erhöht sich bei Zunahme der Laserleistung in einem höheren Umfang als bei anderen Nebenserien. Diese nicht identifizierte Signalserie lässt sich somit durch Fragmentierung der Struktur **11c** erklären. Das Auftreten der Fragmente kann vollständig vermieden werden, sobald die Laserleistung auf den Desorptions/Ionisationsschwellenwert für das Signal von **11c** reduziert wird. Sofern die unlösliche Fraktion vermessen wird, ist es nicht möglich, die Fragmentierung durch Schwellenanregung zu vermeiden (**Abb. 3-20a**). Folglich wurde die neue Matrix TCNQ getestet, die erfolgreich in einer früheren Untersuchung von Przybilla *et al.* zur Charakterisierung eines unlöslichen PAHs¹¹⁵ angewendet wurde. In der Tat verbessert die TCNQ-Matrix die Messung der unlöslichen Fraktion, indem eine komplette Unterdrückung der Fragmentierung durch Schwellenanregung ermöglicht wird (**Abb. 3-20b**). Diese wird dem sehr niedrigen Desorptionsschwellenwert von TCNQ und seinem stabilisierenden Effekt für Radikalkationen zugeschrieben. Obwohl TCNQ eine niedrige Löslichkeit in den meisten herkömmlichen Lösungsmitteln zeigt (z.B. Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Toluol), kann TCNQ als Matrix verwendet werden, da MALDI-TOF-MS nicht von der Löslichkeit des Analyten einerseits und der Matrix andererseits abhängig ist, sofern lösungsmittelfreie Probenpräparation angewendet wird.

Zusätzlich zur Unterdrückung der Fragmentierung zeigen die Messungen mit TCNQ ein verbessertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis für beide Fraktionen und insbesondere einen höheren Oligomerisationsgrad für die unlösliche Fraktion (n=30) im Vergleich zur Anwendung von Dithranol als Matrix (n=25).

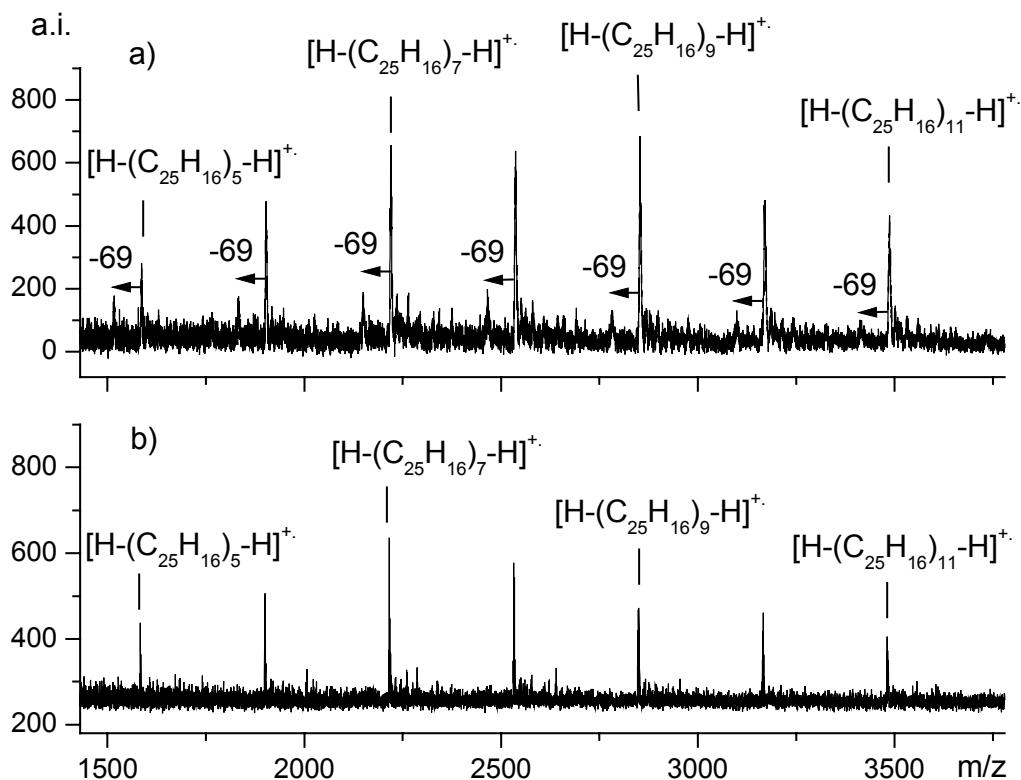


Abb. 3-20: Ausschnittsbereiche der MALDI-TOF-Massenspektren der unlöslichen Fraktion von **11** unter Anwendung der lösungsmittelfreien Probenpräparation in Abhängigkeit der Schwellenleistungsanregung unterschiedlicher Matrices: a) Dithranol (basislinienkorrigiert); b) TCNQ.

3.1.2.3.3.2 Untersuchungen zur Fragmentierung mittels PSD-MALDI-TOF-MS

Um den Ursprung der Fragmentierung aufzuklären, wurden bewusst Messungen mit hoher Laserleistung durchgeführt. Das resultierende Massenspektrum (**Abb. 3-21**) zeigt eine Kaskade gleicher Massenunterschiede von dreimal -69 und -77 Da bezogen auf die Hauptsignalserie der unlöslichen Probe, welche mit TCNQ als Matrix vorbereitet wurde. Während der Massenunterschied von -77 Da dem Verlust eines Phenylsubstituenten zugeschrieben werden kann, gibt es keine rationale Erklärung für den Massenunterschied von -69 Da. Folglich wurde das Fragmentierungsverhalten mittels PSD-MALDI-TOF-MS untersucht. Von einer Probe der lösungsmittelfrei vorbereiteten unlöslichen Fraktion des Polymers **11** wurde das intensivste Signal in **Abb. 3-21** (n=7) für die Fragmentierungsuntersuchungen selektiert. Das erhaltene PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum (**Abb. 3-22a**) zeigt eine intensive Kaskade von drei Signalen mit gleichen

Massenunterschieden von -77 Da, ausgehend vom selektierten Elternion mit einer Masse von 1266 Da ($n=7$) der Struktur **11c**. Dieses weist eindeutig den Verlust von bis zu drei Phenylsubstituenten des Elternions (-77 Da, -154 Da, -231 Da) nach. Die Fragmentierung des Rückgrats der Struktur **11c** ist unter den angewendeten Bedingungen nur unwesentlich.

Die intensiven Signale für den Verlust der Phenylseitengruppen sowie der Mangel an Rückgratfragmentierung unterstreichen die hohe Fragmentierungstendenz der Seitengruppen dieses Analyten mit steifem Rückgrat unter gemäßigten Fragmentierungsbedingungen. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für andere Polymere mit steifem Rückgrat und mit Seitenkettensubstituenten beobachtet¹⁵⁹.

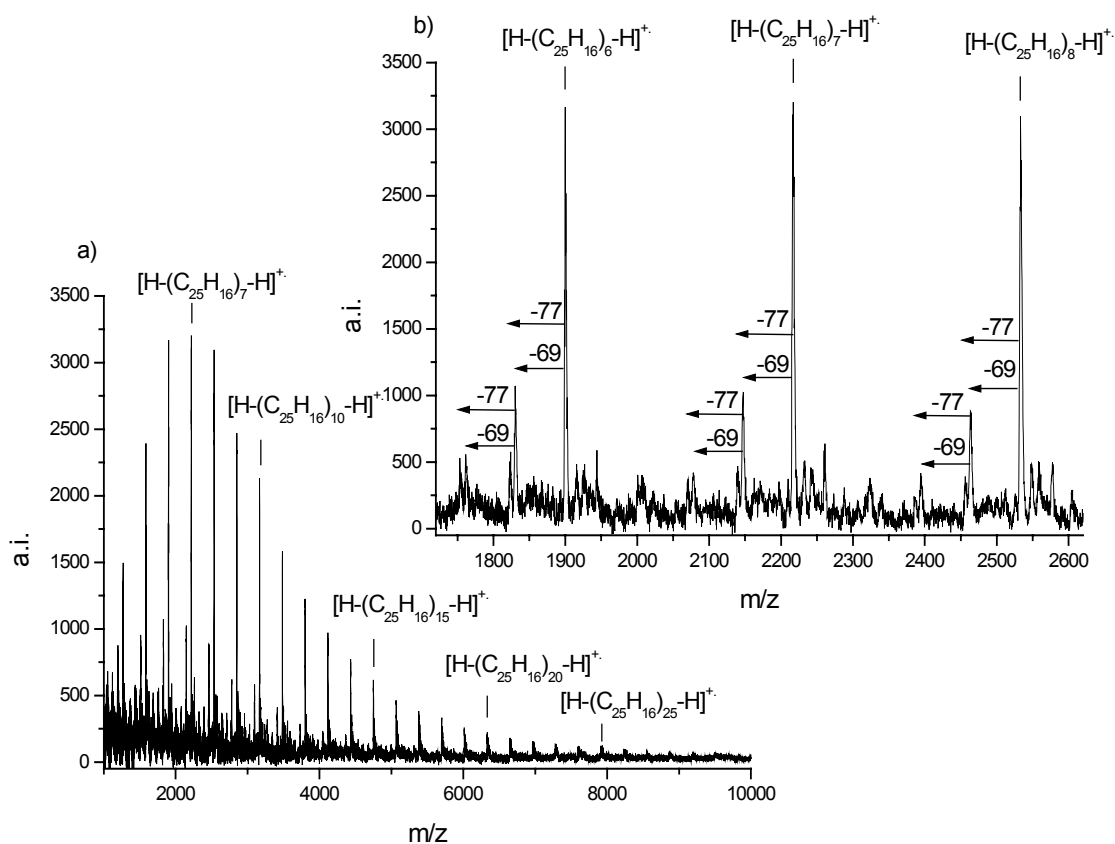


Abb. 3-21: MALDI-TOF-Massenspektren (basislinienkorrigiert) der unlöslichen Fraktion von **11** unter Anwendung der lösungsmittelfreien Probenpräparation (TCNQ) und hoher Laserleistung: a) ganzer Massenbereich; b) Ausschnittsbereich der drei intensivsten Signale.

Das Fragmentierungsverhalten ändert sich bei der Untersuchung einer Polymerkette von **11c** im niedermolekularen Bereich ($n=4$) (**Abb. 3-22b**). Im Gegensatz zum Polymer mit $n=7$ zeigt die kürzere Polymerkette auch eine Fragmentierung der Hauptkette mit intensiven Signalen bei m/z 633 Da und 949 Da, welche dem Verlust von ein bzw. zwei Wiederholungseinheiten entspricht. Die Signale unterhalb dieser dimeren und trimeren Hauptkettenfragmente zeigen ebenfalls Massenunterschiede von -77 Da und können zusätzlichen Seitengruppenbrüchen der Phenylsubstituenten zugeschrieben werden.

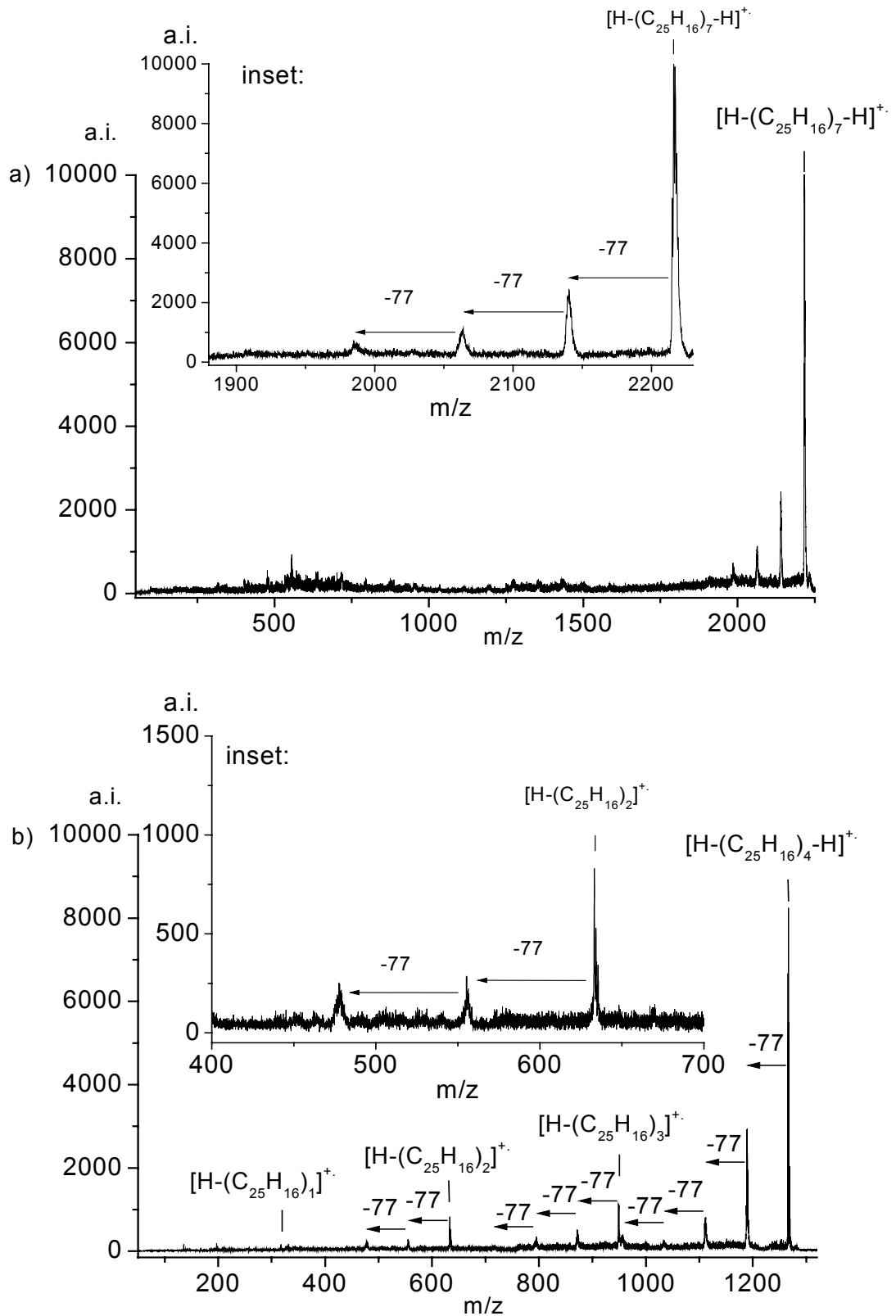


Abb. 3-22: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren: a) Struktur **11c** mit n=7 der unlöslichen Fraktion unter Anwendung der lösungsmittelfreien Probenpräparation (TCNQ): ganzer Massenbereich und Ausschnittsbereich des Elternions; b) Struktur **11c** mit n=4 der löslichen Fraktion unter Anwendung der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation (TCNQ): ganzer Massenbereich und Ausschnittsbereich des Elternions.

Somit ist für Struktur **11c** im Falle des Tetramers im Gegensatz zum Heptamer die Fragmentierung der Substituenten zweitrangig und konkurriert mit der Fragmentierung durch Bindungsbrüche des Rückgrats. Die Tendenz der Seitenkettenfragmentierung erhöht sich mit Zunahme des Molekulargewichtes von **11c**.

Durch das gewonnene Wissen über das Fragmentierungsverhalten bei PSD-Messungen kann mit Gewissheit angegeben werden, dass die Polymerisationsreaktion von 2,7-Dibromo-9,9-diphenylfluoren hauptsächlich zur gewünschten Struktur **11c** führt. Die ermittelten Nebenserien der unlöslichen Polymerfraktion (> 90 % der Polymerausbeute) können massenspektrometrischen Fragmenten zugewiesen werden und rühren folglich nicht von Nebenprodukten der Synthese her.

3.1.3 Grundlagenuntersuchungen zur Matrixunterstützung in MALDI-TOF-MS mittels lösungsmittelfreier Probenpräparation an Cytochrom C

3.1.3.1 Theorie und analytisches Konzept

Eine Reihe an grundlagenorientierten Untersuchungen^{177,178,179,180,181} zeigen, dass verschiedene Matrices Makromoleküle in deren Kristallgitter einbauen. Ende 1999 wurde, mehr als zehn Jahre nach der Einführung von MALDI-TOF-MS, die Modellvorstellung (Abb. 1-3, S. 5), dass der Analyt in eine kristalline Matrix eingebettet sein muss, um eine Desorption/Ionisation zu ermöglichen, berichtet. Der Einbau des Analyten in den Kristall ist hilfreich, jedoch keine generelle Notwendigkeit, um große Analytionen zu produzieren¹⁸⁰. Diese Annahme stützt sich auf Untersuchungen der DHB-Isomere als Matrices (Abb. 3-23) und Cytochrom C als Analyt. Weiter wird vorgeschlagen, dass bei der UV-MALDI-TOF-MS eine unmittelbare Nähe vom Analyten zur Matrix ausreicht, wie sie z.B. bei einer Adsorption an der Matrixoberfläche gefunden wird. Es wird angenommen, dass ein großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis die Chance erhöht, dass ein Analyt an einer entsprechenden Oberfläche haftet. Diese Hypothese stützt sich dabei insbesondere auf Untersuchungen der 2,6-DHB-Matrix und Cytochrom C, bei der ausschließlich die „thin-layer“-Präparation exzellente Massenspektren lieferte. Dies bildet aufgrund der schnellen Verdampfung des Lösungsmittels submikrometerkleine Matrix/Analyt-Kristalle mit einem großen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis. Es konnten keine Massenspektren des Cytochrom C von großen prismatischen Einkristallen und von langen Nadeln, die bei der „dried droplet“-Präparation gebildet wurden, erhalten werden.

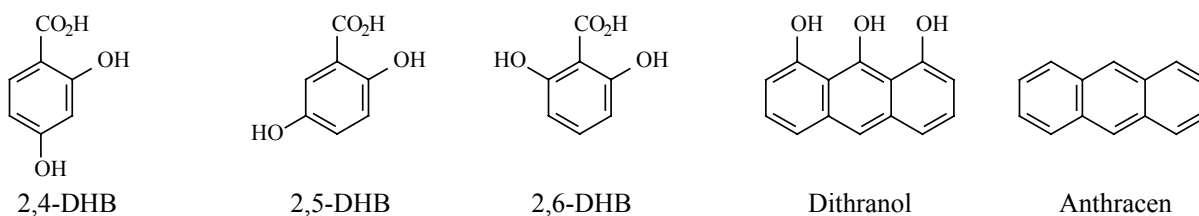


Abb. 3-23: Verwendete Matrices.

Die in Abhängigkeit der MALDI-Probenpräparationsmethode gewonnen Erkenntnisse (Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2) geben Anlass, den theoretischen Aspekt des MALDI-Prozesses neu zu beleuchten. Vor einem Vergleich der beiden MALDI-Probenpräparationen muss man sich zunächst vergegenwärtigen, dass man bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation eine Entmischung zu verhindern versucht. Durch Optimierung der konventionellen Probenpräparationsbedingungen gelingt dies in der Regel auch¹³⁷⁻¹⁵⁵. Bei Inhomogenitäten kann durch erhöhte Laserleistungen im Messbetrieb ein ausreichender Desorptions/Ionisationsprozess erzwungen werden, so dass der Analyt dennoch zugänglich wird (Kapitel 3.1.2.1.3, S. 40). Bei der lösungsmittelfreien MALDI-Probenpräparation ist man auf die Durchmischbarkeit im festen Zustand durch äußere Kräfte angewiesen. Diese Methode erlaubt jedoch nachweislich einen matrixunterstützten Desorptions/Ionisationsprozess (Kapitel 3.1.2.1, S. 30). Dabei wird keine Abhängigkeit von der Art des Analyten (Kapitel 3.1.2.1, S. 30), des Molekulargewichtes (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31), der Löslichkeit (Kapitel 3.1.2.3, S. 52) oder der

Kompatibilität zwischen den Polaritäten von Analyt und Matrix (Kapitel 3.1.2.2.1, S. 44) gefunden. Der Einfluss der angewendeten, äußeren Kräfte ist gering, da auch einfache Mörsermahlvorgänge (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31) in der Regel ausreichende Homogenität der Analyt-Matrix-Mischung gewährleisten. Jedoch kann bzw. muss in Einzelfällen die Homogenisierung im festen Zustand z.B. durch Kühlung, welche für eine höhere Sprödigkeit der zu durchmischenden Bestandteile sorgt, verbessert werden (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31). Daher scheint der Grad der Homogenisierung den größten Einfluss auf den Erfolg der massenspektrometrischen Analyse auszuüben. Da das gepresste Pellet eines MALDI-Pudergemisches im Vergleich zum lose aufgetragenen Puder (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31) den Desorptions/Ionisationsprozess zu erschweren scheint, zeigt sich die Oberflächenbeschaffenheit einer Probe auf die Analyse stark einflussnehmend.

Die Kombination von Detailerkennnissen auf sehr unterschiedlichen Gebieten der MALDI-Analytik scheint das größte Potential zu bergen, um einen tieferen Einblick zum Verständnis des Zusammenspiels zwischen Analyt und Matrix zu gewinnen. Geeignete massenspektrometrische und mikroskopische Untersuchungen eines Kristalls aus Cytochrom *C 12* und DHB und vergleichende Studien mittels lösungsmittelbasierender und lösungsmittelfreier MALDI-Probenpräparation werden aus diesem Grund als Modellexperiment durchgeführt. Hinsichtlich des Matrixeffektes werden abschließende Untersuchungen mittels inkompatibler Matrices wie Dithranol und Anthracen (**Abb. 3-23**) zur Charakterisierung von Cytochrom *C 12* einbezogen.

3.1.3.2 Charakterisierung von Kristallen

3.1.3.2.1 Züchtung von Einkristallen und lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Umkristallisation der Matrix 2,5-DHB und Züchtung der Kristalle zum Einbau von Cytochrom *C* als Analyt und 2,5-DHB als Matrix erfolgte nach literaturbekannten Beschreibungen (Synthese s. Kapitel 6.1.2.5; S. 261)^{133,180}. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen des Kristalls aus 2,5-DHB und Cytochrom *C 12* weisen ein plättchenförmiges Wachstum auf. Bei Vergrößerung der plättchenförmigen Kristallbereiche wird eine unterschiedliche Kristalloberflächenbeschaffenheit gefunden. Einige Kristalle zeigen ausgeprägte Stufenformen auf engem Raum (**Abb. 3-24a**). Diese oberflächenvergrößerten, porösen Bereiche werden im Folgenden als „defekte Bereiche“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu finden sich auf der Kristalloberfläche Bereiche, bei denen eine sehr glatte, intakte Beschaffenheit festzustellen ist (**Abb. 3-24b**). Diese werden im Folgenden als „perfekte Bereiche“ bezeichnet.

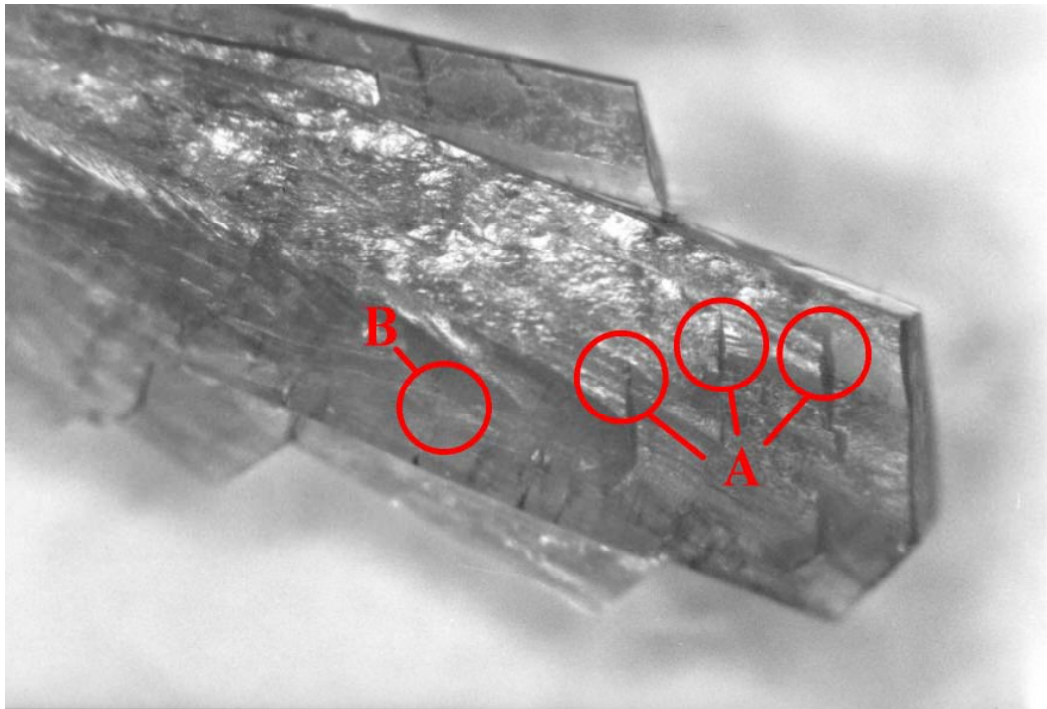


Abb. 3-24: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Oberflächenbeschaffenheit eines Kristalls aus 2,5-DHB und Cytochrom *C* 12: **A** stufenförmige Defekte; **B** glatter, perfekter Bereich.

Lichtmikroskopische Untersuchungen am Kristall der reinen 2,5-DHB-Matrix (**Abb. 3-25A**) zeigen ein unterschiedliches Kristallwachstum im Vergleich zum Kristall der 2,5-DHB-Matrix mit inkorporiertem Cytochrom *C* (**Abb. 3-24** und **Abb. 3-25B**). Beim reinen DHB-Kristall sind jedoch ebenfalls perfekte und defekte Bereiche festzustellen.

Dabei kann zusammengefasst werden, dass mikroskopische Fehlstellen und Inhomogenitätsbereiche auf der Kristalloberfläche der „Einkristalle“ aus 2,5-DHB mit und ohne eingebautem Cytochrom *C* sichtbar sind.

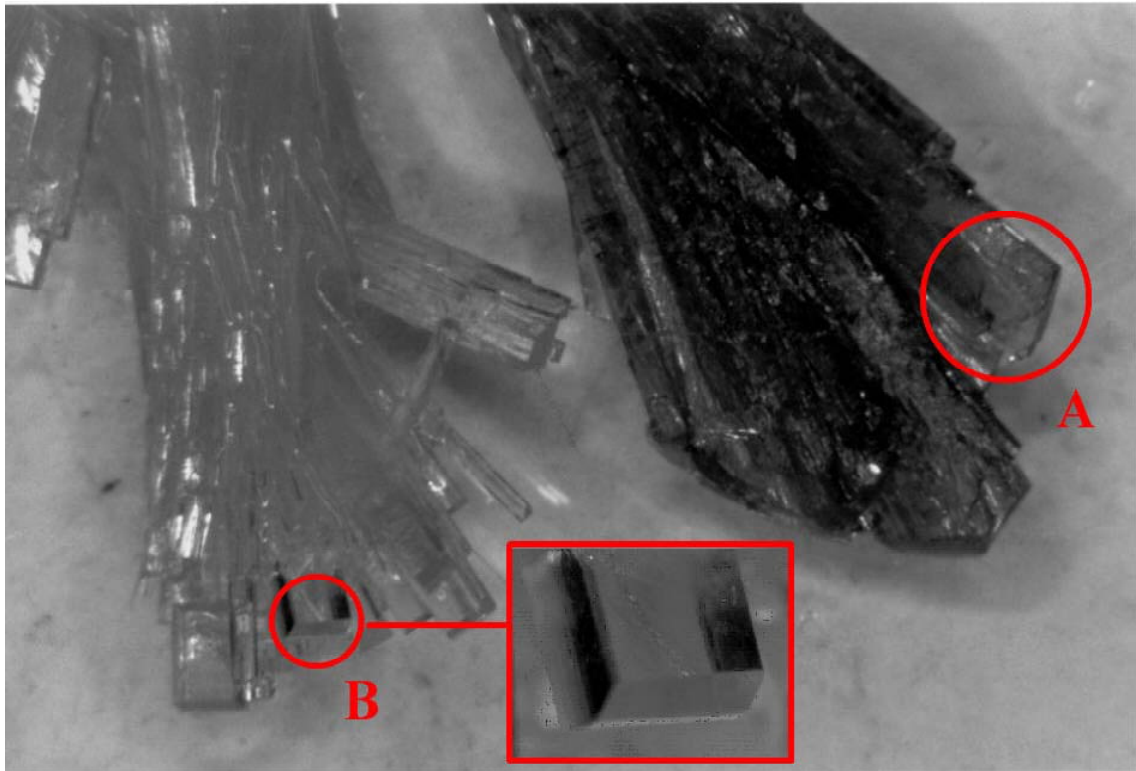


Abb. 3-25: Vergleich der lichtmikroskopischen Aufnahmen von: **A** 2,5-DHB mit inkorporiertem Cytochrom *C* 12 (Vergrößerung s. **Abb. 3-24**); **B** reiner 2,5-DHB.

3.1.3.2.2 MALDI-TOF-MS der Kristalle

Zunächst wird ein Vergleich der Schwellenleistung, die zur Desorption/Ionisation des Cytochrom *C* Analyten **12** aus dem 2,5-DHB/Cytochrom *C*-Kristall und aus dem pulverisierten Kristall führt, angestellt. Der pulverisierte Kristall wird durch Kugelmühlenbehandlung des Kristalls aus 2,5-DHB und Cytochrom *C* **12** erhalten. Dieser wird als loses Puder auf den MALDI-Proben-träger aufgetragen (**Abb. 3-26**).



Abb. 3-26: Lichtmikroskopische Aufnahme des pulverisierten, lose aufgetragenen Kristalls aus Cytochrom *C 12* und 2,5-DHB.

Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen wird eine Mittelung der Massenspektren aus allen Bereichen der Kristalloberfläche durchgeführt. Zunächst wird die Schwellenleistung ermittelt, die Cytochrom *C 12* zur Desorption/Ionisation bringt. Anschließend werden 10x20 Laserschüsse aufsummiert. Das erhaltene Massenspektrum von 200 Laserschüssen wird unter einer Experimentzahl abgespeichert. Analog wird bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation des pulverisierten Kristalls verfahren. Mit der Videokamera des MALDI-Massenspektrometers wird die Probe mit ca. 100-facher Vergrößerung auf dem Kontrollmonitor dargestellt, so dass die makroskopischen Inhomogenitäten und Oberflächenbeschaffenheiten direkt während der MALDI-TOF-MS-Messung visualisiert werden.

In **Abb. 3-27** ist die Experimentzahl gegen ein relatives Maß der Laserleistung (=100 % - Laserabschwächung) aufgetragen (Kapitel 2.1.2, S. 18). Die MALDI-TOF-Massenspektren unter Verwendung der Laserswellenleistung zeigen bei der Datenaufnahme der MALDI-TOF-Massenspektren des Kristalls aus 2,5-DHB und Cytochrom *C 12* große Schwankungen in der aufzuwendenden Laserleistung. Die Streubreite der relativen Laserleistung liegt zwischen 25 und 43 bei einer gemittelten Laserswellenleistung von 30,1. Die analogen MALDI-TOF-MS-Untersuchungen am pulverisierten Kristall aus 2,5-DHB und Cytochrom *C 12* durch lösungsmittelfreie Probenpräparation zeigen eine wesentlich geringere Streubreite von 24 bis 27 in der aufzuwendenden relativen Laserleistung und eine deutlich geringere gemittelte Laserswellenleistung von 25,4. Diese lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS des pulverisierten Kristalls ist damit hinsichtlich der aufzuwendenden Laserleistung einheitlicher, bei wesentlich geringerer Schwellenleistung, als die des

Kristalles selbst. Dies kann damit erklärt werden, dass durch die vergrößerte Oberfläche im Falle des Puders der lösungsmittelfreien Probenauftragung weniger Gitterenergie aufgewendet werden muss (vgl. **Abb. 1-3**, S. 5), um die Analyt- und Matrixmoleküle aus dem Kristallgitterverband in die Gasphase zu überführen. Aufgrund der höheren Einheitlichkeit in der lösungsmittelfreien Probenpräparation sind geringere Schwankungen in der aufzuwendenden Laserleistung zu verzeichnen. Damit lässt sich die Hypothese formulieren, dass durch Maximierung von „Defektstrukturen“ der MALDI-Desorptions/Ionisationsprozess erleichtert wird. Weiter kann vermutet werden, dass durch die geringere aufzuwendende Laserleistung eine geringere Überschussenergie in das Analyt-Matrix-System eingetragen wird, so dass der MALDI-Prozess durch die schonenderen Bedingungen verbessert und damit in Konsequenz die Fragmentierungstendenz des Analyten kleiner wird.

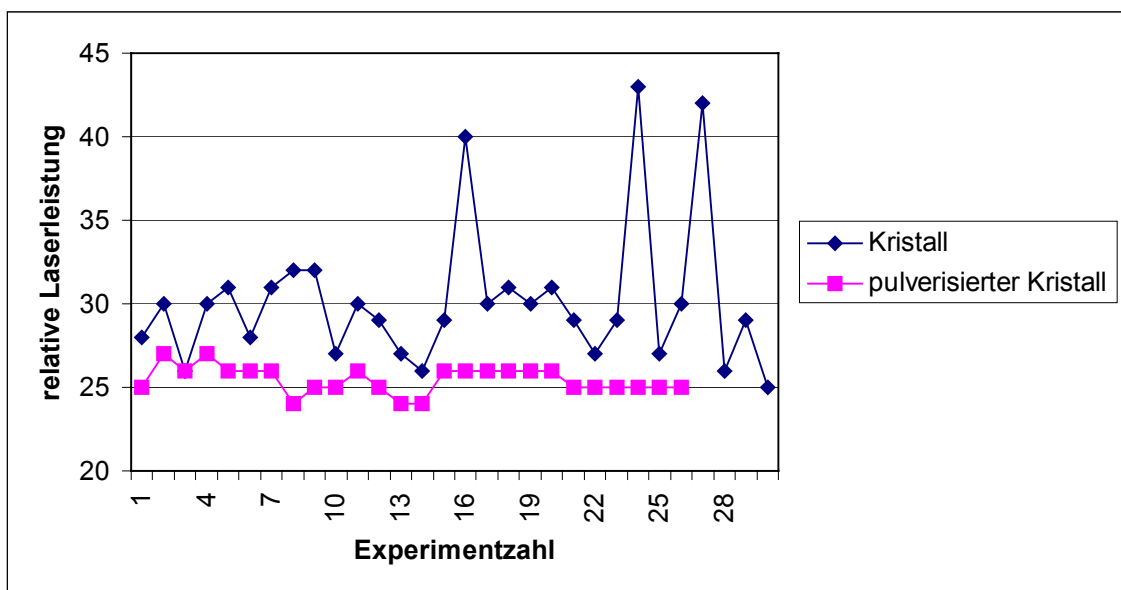


Abb. 3-27: Graphische Auftragung der Experimentzahl (Abszisse) gegen die relative Laserleistung (Ordinate), um Cytochrom C zu charakterisieren: a) MALDI-TOF-MS des Kristalls aus 2,5-DHB und Cytochrom C; b) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS des pulverisierten Kristalls von a).

Detailliertere Untersuchungen am Kristall aus 2,5-DHB und Cytochrom C **12** zeigen, dass die Experimente mit relativen Laserleistungen > 35 (**Abb. 3-27**) in strenger Korrelation mit der glatten, perfekten Kristalloberflächenbeschaffenheit stehen. Die minimalen relativen Laserleistungen < 30 werden bei defekter Beschaffenheit der Kristalloberfläche gefunden. Die Ergebnisse dieser evaluierten Inhomogenitäten in der Oberflächenbeschaffenheit des Kristalls stehen im Einklang mit der obigen Hypothese, dass aufgrund der zu überwindenden Gitterenergien im Kristall deutlich mehr Laserleistung für die erfolgreiche Desorption/Ionisation aus perfekten Kristalloberflächen als aus „Defektstrukturen“ aufgebracht werden muss und dass mit steigender Zahl an „Defektstrukturen“ eines Kristallverbandes der MALDI-Prozess erleichtert wird.

Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit in Abhängigkeit von der Kristalloberflächenbeschaffenheit sind in **Abb. 3-28a,b** gezeigt. Die perfekten Bereiche liefern nicht reproduzierbare Ergebnisse, die zum Teil erst bei einer relativen Laserleistung von 80 ein

Massenspektrum ermöglichen. Die Reproduzierbarkeit der Massenspektren der defekten Stellen ist höher als die der perfekten Bereiche. Lichtmikroskopische Untersuchungen am Kristall aus 2,5-DHB und Cytochrom C 12 im Anschluss an die massenspektrometrische Untersuchung lassen vermuten, dass nach intensivem Laserschuss am Kristall Schmelzoberflächen ausgebildet wurden, die vermutlich zusätzlich die Reproduzierbarkeit verringern.

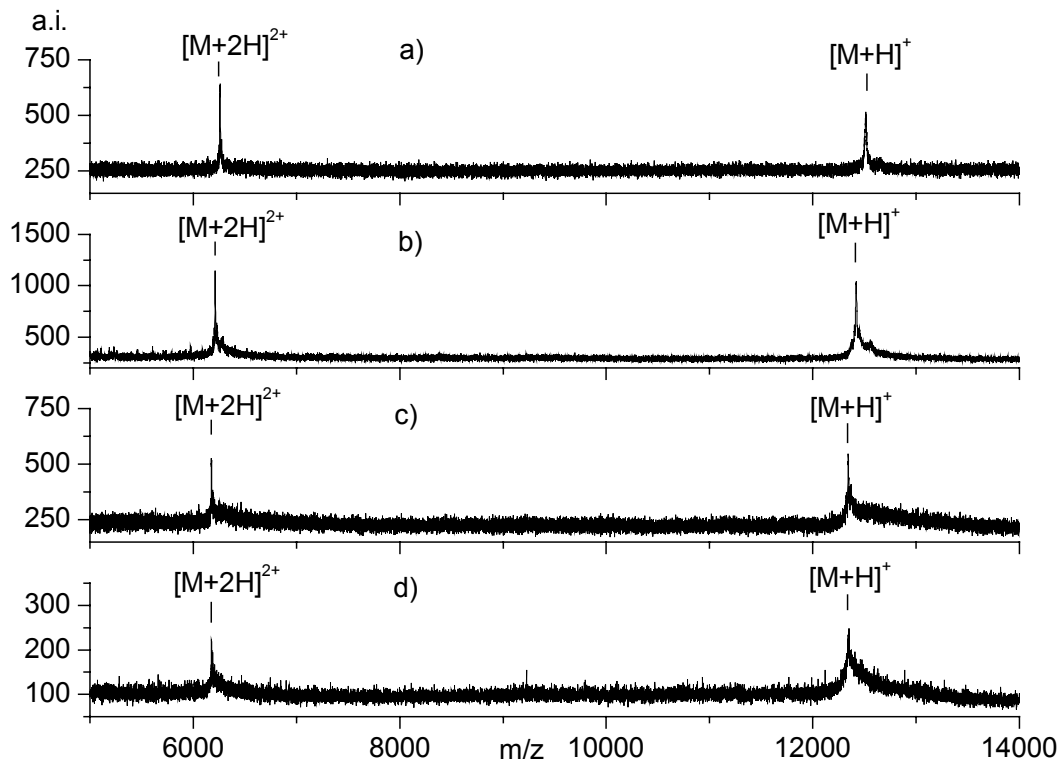


Abb. 3-28: MALDI-TOF-Massenspektren bei verschiedenen Probenpräparationen mit zugehörigen Desorptionslaserleistungen (in Klammern): a) perfekter Kristallbereich (50); b) defekter Kristallbereich (30); c) pulverisierter Kristall (25); d) lösungsmittelbasierende Probenpräparation (30).

Analoge Untersuchungen für den pulverisierten Kristall zeigen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit die besten Ergebnisse. So konnten lösungsmittelfreie Massenspektren erhalten werden, die bei konstanter relativer Laserleistung von 25 (**Abb. 3-28c**) an der gleichen Stelle sechsfach wiederholt nahezu identische Massenspektren bezüglich Signalintensitäten und -breiten lieferten, bei denen jeweils 10x20 Laserschüsse aufaddiert wurden. Diese Untersuchung weist eine sehr hohe Einheitlichkeit und Homogenität auch im Tiefenprofil dieser MALDI-Probenpräparationsmethode nach und schließt größere Veränderungen des Probengemisches durch den Laserschuss aus. Nach intensivem MALDI-Laserschuss des pulverisierten Kristalls wurden durch lichtmikroskopische Aufnahmen ein komplettes Abtragen des Analyt-Matrix-Probengemisches festgestellt. Oberflächenänderungen wurden nicht gefunden. Dies kann auf die zerstörte Gitterstruktur des Kristallverbandes im pulverisierten Kristall zurückgeführt werden, die nur noch minimierte Wechselwirkungen innerhalb der maximierten "Defektstrukturen" des Kristalls zulässt und dadurch

eine Veränderung der Kristallbeschaffenheit verhindert. Daraus muss geschlossen werden, dass der Laserschuss in erster Linie zur Desorption/Ionisation von Matrix und Analyt führt.

Vergleichende Untersuchungen am reinen Kristall der 2,5-DHB-Matrix zeigen, dass die gemittelte Schwellenleistung, die zur Desorption und Ionisation der Matrix führt, bei 19,4 liegt und die des pulverisierten Kristalls bei 16,2. Zusätzlich werden identisch zum 2,5-DHB/Cytochrom C-Kristall nach intensivem Laserschuss ebenfalls Oberflächenveränderungen gefunden, die vermutlich auf Verschmelzungen zurückzuführen sind. Dies ist beim pulverisierten Kristall nicht der Fall. Diese Ergebnisse erbringen den Nachweis, dass durch Pulverisieren des Kristalls, das formal einer Erhöhung des Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses bzw. einer Maximierung an „Defektstrukturen“ eines Kristalls entspricht, die Desorption/Ionisation im MALDI-Prozess erleichtert wird und Oberflächenveränderungen verringert werden.

Damit kann zusammengefasst werden, dass die massenspektrometrische Untersuchung hinsichtlich der Schwellenleistung, die zur Desorption/Ionisation des Cytochrom C Analyten **12** aus der 2,5-DHB-Matrix führt, eine deutliche Differenz zwischen Kristall und pulverisiertem Kristall gezeigt hat. Die ermittelten relativen Laserleistungen des Einkristalls sind jedoch ein eher unterschätzter Wert, da perfekt planare Stellen wesentlich größere Laserleistungen beanspruchen. Da deutlich mehr Laserleistung beim Kristall als beim Pulver verwendet werden musste, kann gefolgert werden, dass durch den Einbau des Analyten in den Matrixkristall zunächst die Kristallgitterenergie überwunden werden muss, um den Desorptions/Ionisationsprozess zu ermöglichen.

3.1.3.3 Untersuchungen in Abhängigkeit der MALDI-Probenpräparation

3.1.3.3.1 Lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS der „dried droplet“-Auftragung

Die praktische Bedeutung der Kristallzüchtung für MALDI-TOF-MS ist sichtlich gering. Aus diesem Grund wird die lösungsmittelbasierende „dried droplet“-Standardprobenpräparation analog obiger Kristalluntersuchungen evaluiert. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der lösungsmittelbasierenden, „dried droplet“-MALDI-Probenpräparation (**Abb. 3-29**) weisen Bereiche auf der Probenträgeroberfläche nach, die neben Bereichen mit sehr fein verteilten, submikrometerkleinen Kristallen auch ausgeprägt große, prismatische Kristalle aufweisen. Die Evaluierung der Schwellenleistung wurde analog der MALDI-TOF-MS-Untersuchungen am Kristall bzw. am pulverisierten Kristall durchgeführt (Kapitel 3.1.3.2.2, S. 66). Das arithmetische Mittel dieser Experimente ergab einen Wert von 32,2 mit einer Schwankungsbreite von 30 bis 39. In **Abb. 3-28d** ist das Massenspektrum für die relative Laserleistung 30 abgebildet.

Detailliertere Untersuchungen der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation zeigen, dass die Experimente, bei denen höhere Laserleistungen aufgewendet werden mussten, in strenger Korrelation mit den großen, prismatischen Kristallen stehen. Diese Korrelation zwischen makroskopischer Erscheinung und dem MALDI-TOF-MS-Ergebnis ist durch die Visualisierung mit Hilfe der am MALDI-Gerät installierten Videokamera möglich. Die kleinsten Laserleistungen werden bei subpicometerkleinen Kristallen gefunden.

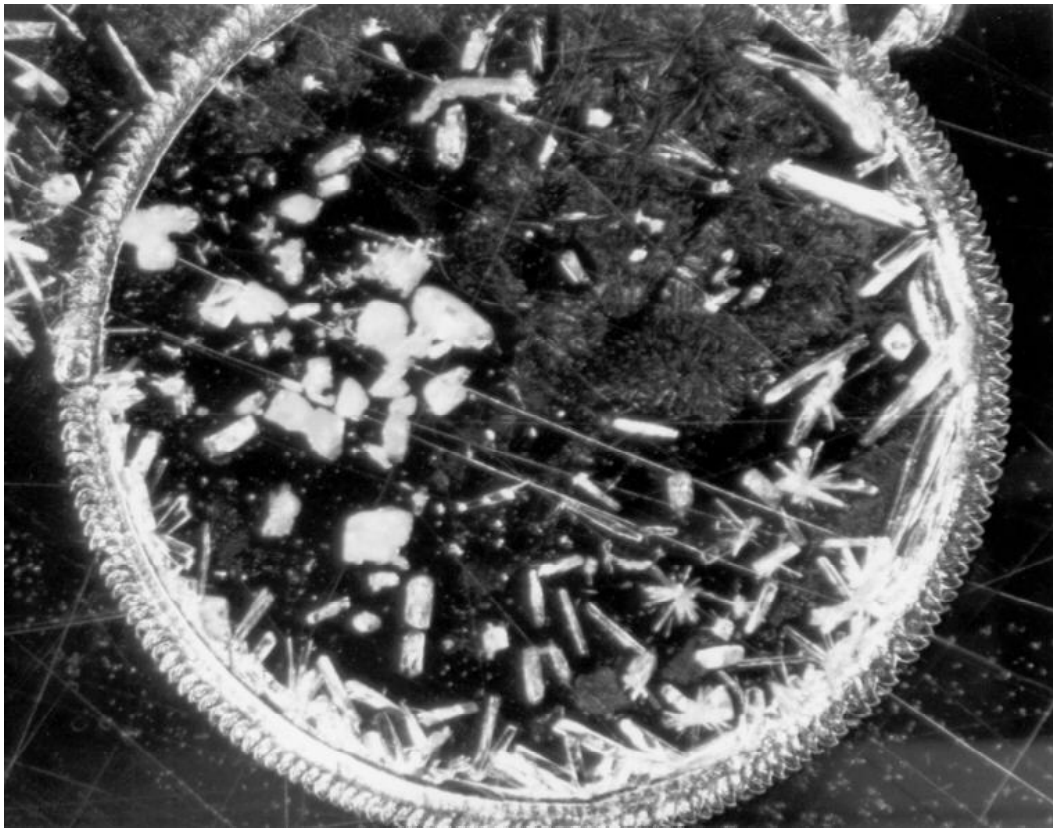


Abb. 3-29: Lichtmikroskopische Aufnahme eines typischen MALDI-Gemisches aus Cytochrom C 12 und 2,5-DHB nach lösungsmittelbasierender „dried droplet“-Probenauftragung.

Die Untersuchungen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit in Abhängigkeit der Präparation zeigen, dass die Bereiche mit den großen Kristallen nicht reproduzierbare Ergebnisse liefern, wohingegen die subpicometerkleinen Kristalle eine erhöhte Reproduzierbarkeit aufweisen. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen nach Laserschuss keine Veränderungen an den großen Kristallen, die subpicometerkleinen Kristalle sind größtenteils abgetragen. Die Ergebnisse in der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation unterstützen eindrucksvoll die Hypothese, dass aufgrund der zu überwindenden Gitterenergien im Kristall deutlich mehr Laserleistung für die erfolgreiche Desorption/Ionisation aufgewendet werden muss, ganz in Analogie zur perfekten Oberfläche im Einkristall aus 2,5-DHB und Cytochrom C 12. Mit steigender Zahl an subpicometerkleinen Kristallen steigt die Zahl an „Defektstrukturen“ bzw. sinkt die Kristallgitterenergie eines Kristallverbandes. Aufgrund der geringeren Schwellenleistung wird der MALDI-Prozess erleichtert und verbessert.

Die lösungsmittelbasierende Probenpräparation der „dried droplet“-Auftragung ähnelt aufgrund der hohen Schwellenleistung und der geringeren Reproduzierbarkeit eher den massenspektrometrischen Ergebnissen der Einkristalluntersuchungen als denen der lösungsmittelfreien Probenpräparation des pulverisierten Einkristalls aus 2,5-DHB und Cytochrom C 12.

3.1.3.3.2 Direkte lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS unterschiedlicher DHB-Isomere

Die direkte lösungsmittelfreie Probenpräparation soll zur Charakterisierung von Cytochrom C evaluiert werden, um eindeutige Aussagen zum Matrixeffekt treffen zu können. Dabei sollen unterschiedliche Experimente durchgeführt werden, die molare Analyt/Matrix-Verhältnisse und Analyt-Matrix-Kombinationen mit einschließen.

Die lösungsmittelfreie Probenpräparation von Cytochrom C **12** und 2,5-DHB im Mischungsverhältnis von 1/10.000 ermöglicht es, Massenspektren des Cytochrom C **12** (Daten nicht abgebildet) zu erhalten. Damit wird eindeutig nachgewiesen, dass die Vororganisation des Analyten im gezüchteten, pulverisierten Einkristall aus 2,5-DHB und Cytochrom C **12** nicht ausschlaggebenden Einfluss auf die Homogenität der pulverisierten MALDI-Probe und den Erfolg der massenspektrometrischen Untersuchung von Cytochrom C **12** hat. Die direkte Vermischung mittels Kugelmühle von Matrix und Analyt im gängigen Mischungsverhältnis von 1/10.000 für konventionelle lösungsmittelbasierende Probenpräparation ermöglicht eine ausreichende Homogenisierung, um einen effektiven MALDI-Prozess zu gewährleisten.

Die Ergebnisse der lösungsmittelfreien Probenpräparation zeigen, dass nicht nur der Einbau eines Analyten in einen Matrixkristall aufgrund der erhöhten Gitterenergie hinderlich ist (Kapitel 3.1.3.2, S. 64), sondern nachweislich kein zwingender Bedarf besteht, den Analyten in das Matrixkristallgitter einzubauen. Damit wird die ursprüngliche Modellvorstellung widerlegt, dass der Matrixeffekt auf einer „Mischkristallbildung“ zwischen Matrix und Analyt basiert.

Diese Schlussfolgerung wird im Detail durch folgende Überlegungen und experimentellen Ergebnisse gestützt: Es kann angenommen werden, dass die lösungsmittelfreie Probenpräparation Partikelgrößen im Mikrometerbereich liefert¹⁵⁶. Die Größenordnung eines Mikrometers ist jedoch einige Zehnerpotenzen größer als molekulare Dimensionen (Größenordnung 10^{-10} m). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass kein wirklich homogenes Gemisch von Analyt und Matrix auf molekularer Ebene erhalten wird, dass jedoch eine zumindest partielle Homogenisierung auf molekularer Ebene ausreichend für eine erfolgreiche Messung ist. Umgekehrt scheint dies nahe zu legen, dass in lösungsmittelbasierender MALDI-Probenpräparation die erhaltenen Homogenitäten im festen Zustand wesentlich schlechter sind als bislang angenommen. Um sich die These der Segregation bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation zu vergegenwärtigen, sollte man sich ins Gedächtnis rufen, dass (Um-)Kristallisation in der präparativen synthetischen Chemie als Reinigungsprozess Anwendung findet. Damit zeigt der Prozess einer jeden Kristallisation von zwei oder mehreren Komponenten Separationsphänomene in unterschiedlichem Ausmaß. So müssen bei der konventionellen lösungsmittelbasierenden MALDI-Probenpräparation die Matrix- und Analytmoleküle im Kristallisationsschritt vor einer Entmischung bewahrt werden. Die Minimierung einer Entmischung bzw. die Maximierung an Homogenität kann erfolgen, indem die lösungsmittelbasierende Probenpräparation optimiert wird (Kapitel 3.1.1, S. 29). So führt nach unseren bisherigen Erfahrungen ein Abstimmen von Polaritäten der Analyt- und Matrixmoleküle zwangsläufig zu einer geringeren Entmischung während der Kristallisation. Durch das Verwenden eines leichtflüchtigen Lösungsmittels kann die Kristallisation gezielt beschleunigt und so die Auftrennung der Komponenten weitgehend unterdrückt werden. Die Auswirkungen beim Phasenübergang vom gelösten zum festen Zustand werden minimiert. Dennoch ist der Ansatz zur Homogenisierung über

einen gelösten Zustand einfach und schnell und führt in den meisten Fällen zu hinreichenden Homogenitäten. Inhomogenität spiegelt sich in unterschiedlichen Kristallen innerhalb eines einzigen Proben-„Spots“ wieder. Durch die Suche nach „hot spots“ bzw. durch die Anwendung höherer Laserleistung (Kapitel 3.1.2.1.3, S. 40) kann eine Spektrenaufnahme auch bei geringer Homogenität erfolgen, jedoch sind hierbei Massenspektren mit geringer Qualität in Kauf zu nehmen.

Zunächst soll zwischen zwei gängigen Lösungsmittelbasierenden Probenauftragungsmethoden unterschieden werden. Bei der „dried droplet“-Auftragungsmethode werden der Analyt und die Matrix zunächst im gelösten Zustand vermischt und dann auf den Probenträger aufgetragen. Durch Verdampfen des Lösungsmittels kristallisieren die Gemischkomponenten entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften aus. Bei einer „thin layer“-Präparation wird zunächst die in Aceton gelöste Matrix auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel abgedampft. Die wässrige Analytlösung wird danach auf die auskristallisierte Matrixschicht des Probenträgers aufgebracht. Je nach Löslichkeit der Matrix in Wasser (vgl. 2,6- < 2,4- < 2,5-DHB¹⁸⁰) wird die dünne Matrixschicht unerwünschterweise teilweise wieder angelöst. Der Kontakt beider Moleküle erfolgt bei ausreichend geringer Mischbarkeit lediglich an der Grenze der beiden Schichten. Die „thin layer“-Auftragungsmethode ist daher eine Weiterentwicklung der „dried droplet“-MALDI-Probenpräparationsmethode, um Inhomogenitäten zwischen Analyt und Matrix im festen Zustand zu minimieren. Für die lösungsmittelfreie Probenpräparation muss angenommen werden, dass aufgrund der Mahlwirkung, die zur Homogenisierung führt, auch solche Analyt-Matrix-Kombinationen einer MALDI-TOF-MS-Analyse unterworfen werden können, die aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften für die lösungsmittelbasierende Probenpräparation nicht oder nur schwer zugänglich sind. Aus dieser Argumentation heraus sollen lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS-Analysen an verschiedenen DHB-Matrixisomeren durchgeführt werden, die bei ausreichender Absorption bei der Laserwellenlänge von 337 nm mittels lösungsmittelbasierender Probenpräparation keine UV-MALDI-TOF-Massenspektren lieferten¹⁸⁰. Die Massenspektren der 2,4-, 2,5- und 2,6-DHB-Isomeren zeigen, bei entsprechend optimierten Auftragungsmethoden und geeigneten Laserwellenlängen, generell bessere Qualitäten als die der 3,4- und 3,5-DHB-Matrixisomere^{180,182}. Die folgenden Modelluntersuchungen werden aus diesem Grund für die ersteren drei DHB-Matrixisomere durchgeführt. Folgende Reihe, geordnet nach abnehmenden Absorptionen bei 337 nm im UV-Spektrum, wird für diese DHB-Isomere im festen Zustand beschrieben¹⁸⁰: 2,5-DHB > 2,6-DHB > 2,4-DHB.

In literaturbeschriebenen Untersuchungen der lösungsmittelbasierenden „dried droplet“-Standardprobenpräparation lieferte nur die 2,5-DHB-Matrix MALDI-TOF-Massenspektren (337 nm). Es konnten bei dieser Laserwellenlänge bei beiden lösungsmittelbasierenden Auftragungsmethoden mit 2,4-DHB keine Massenspektren bzw. nur solche mit schlechter Qualität erhalten werden. Die 2,6-DHB ergab Massenspektren mit lösungsmittelbasierender MALDI-TOF-MS nur nach „thin layer“-Auftragung aus einer Acetonlösung. Dieser Erfolg kann durch ihre geringe Löslichkeit in Wasser im Vergleich zu anderen DHB-Isomeren erklärt werden.

Für die folgenden Untersuchungen ist es ebenfalls von Bedeutung, die Tendenz der Bildung eines Mischkristalls aus Cytochrom C 12 und der drei DHB-Matrixisomere zu berücksichtigen¹⁸⁰, da

in Mischkristallen andere Wechselwirkungen von Matrix und Analyt vorliegen. Für die DHB-Isomere werden folgende molare Analyt/Matrix-Einbauverhältnisse im Kristall festgestellt:

- 2,5-DHB: quantitativer Einbau bei $1/10^4$,
- 2,4-DHB: semiquantitativer Einbau bei ca. $1/10^5$,
- 2,6-DHB: nur geringfügiger bis gar kein Einbau ($< 1/10^5$).

MALDI-TOF-Massenspektren von Cytochrom *C* aus diesen Kristallen wurden folgerichtig nur für die 2,4- und 2,5-DHB in guter Qualität gewonnen, wobei für die 2,6-DHB-Kristalle gar keine Massenspektren erhalten wurden. Löslichkeit, Einbau bzw. Segregation stehen im engen Zusammenhang und diktieren die erfolgreiche MALDI-TOF-MS-Analyse.

Die lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS-Untersuchungen der 2,4-DHB und 2,6-DHB werden im Folgenden in **Abb. 3-30** mit den Ergebnissen der 2,5-DHB Matrix verglichen. Die lösungsmittelfreie Probenpräparation der umkristallisierten Matrices mit einem molaren Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/1.000 erlaubt im Gegensatz zur lösungsmittelbasierenden Probenpräparation die Aufnahme von Massenspektren des Cytochrom *C* **12** mit allen DHB-Isomeren (**Abb. 3-30**). Die 2,5-DHB Matrix ermöglicht Massenspektren von Cytochrom *C* **12** bei einer relativen Laserleistung von 35 in hoher Qualität zu erhalten (**Abb. 3-30a**). Mit der 2,6-DHB Matrix können Massenspektren (**Abb. 3-30b**) im ähnlichen, leicht erhöhten relativen Laserleistungsbereich von 40 erzielt werden. Das Signal des Cytochrom *C* **12** ist relativ breit. Die Massenspektren, die durch die Verwendung der 2,4-DHB Matrix (**Abb. 3-30c**) erhalten werden, liefern ebenfalls relativ breite Signale des Cytochrom *C* **12**, jedoch erst bei wesentlich höheren relativen Laserleistungen von 55. Erstaunlich bei der Untersuchung dieser Matrix ist, dass durch die Erhöhung der relativen Laserleistung auf 60 das Massenspektrum deutlich an Qualität gewinnt und Fragmentierung trotz sehr hoher Laserleistung ausbleibt (Daten nicht abgebildet).

Der Anstieg der aufzuwendenden Laserleistung für die unterschiedlichen DHB-Isomere (2,5-DHB < 2,6-DHB < 2,4-DHB) wird auf die abnehmenden Absorptionen der Matrixisomere (2,5-DHB > 2,6-DHB > 2,4-DHB) bei der verwendeten Laserwellenlänge (337 nm) zurückgeführt. Die Breite der Analytsignale kann mit der erhöhten Laserleistung und zusätzlich mit einer Cytochrome *C*-Matrixadduktbildung erklärt werden. Letzteres steht im Einklang mit Untersuchungen, bei denen die 2,5-DHB die geringste Tendenz zur Matrixadduktbildung zeigt¹⁸⁰.

Mit diesen Untersuchungen wird ebenfalls eindeutig gezeigt, dass die lösungsmittelfreie Probenpräparation auch bei der 2,6-DHB, also einer Matrix, die von den evaluierten Isomeren die geringste Tendenz zum Einbau in einen Einkristall zeigt (nur geringfügig bis gar keinen Einbau)¹⁸⁰, gute MALDI-TOF-Massenspektren liefert. Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS sorgt eindeutig für einen ausreichenden Kontakt zwischen Analyt und Matrix. Die Diskrepanz zum Misserfolg in der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS-Analyse¹⁸⁰ kann dadurch erklärt werden, dass die physikochemische Wechselwirkung der 2,6-DHB-MALDI-Matrix und der Cytochrom *C* Analytmoleküle **12** bei der Verdunstung des Lösungsmittels während der konventionellen Probenauftragung durch eine Trennung von Analyt und Matrix gestört wird. Der Kontakt zwischen Analyt und Matrix wird dabei so minimiert, dass die massenspektrometrische Analyse scheitert. Bei

der Durchmischung im festen Zustand kann eine ausreichende Homogenisierung der unterschiedlich polaren, wenig kompatiblen Moleküle, 2,6-DHB und Cytochrom C, durch äußere Kräfte erreicht werden.

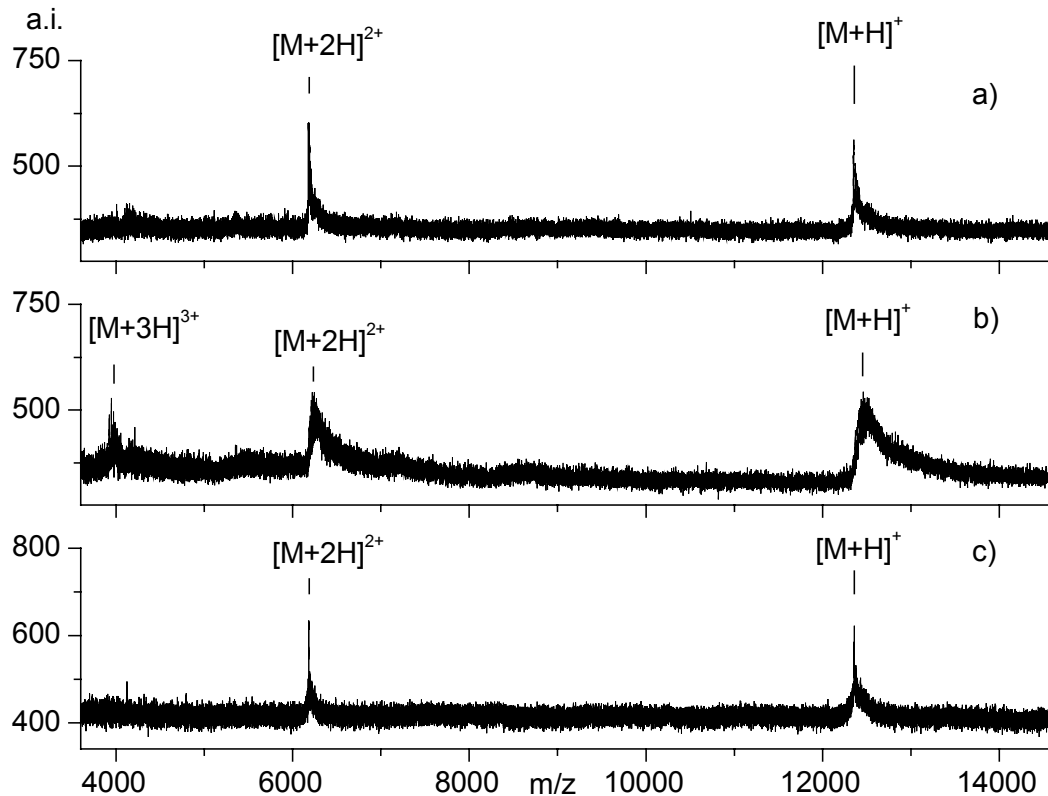


Abb. 3-30: Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS von Cytochrom C 12 mit verschiedenen DHB-Matrixisomeren bei einem konstanten molaren Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/1.000 in Abhängigkeit der relativen Laserleistung (in Klammern): a) 2,5-DHB (35); b) 2,6-DHB (40); c) 2,4-DHB (55).

Bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation kann von einer Limitierung durch Segregation abgesehen werden. Allerdings können bei dieser Probenpräparation Änderungen der Morphologie auf molekularer Ebene aufgrund mechanischer Behandlung nicht völlig ausgeschlossen werden. Eine weitere Vermutung hinsichtlich des theoretischen Aspekts der lösungsmittelfreien Probenpräparationsmethode ist, dass ein Adsorptionsmodell zwischen Analyt und Matrix in Betracht gezogen werden kann, welches jedoch unabhängig von der Kristallinität ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die erfolgreiche, lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS-Analyse von Cytochrom C mittels unterschiedlicher DHB-Derivate der eindeutige Nachweis erbracht wird, dass, neben einer ausreichenden Absorption der Matrix im verwendeten Laserwellenlängenbereich, ein enger Kontakt zwischen Analyt und Matrix ausschlaggebender Faktor im MALDI-Prozess ist. Es muss eine feine Abstimmung der Moleküleigenschaften bei der lösungsmittelbasierenden, nicht jedoch bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation erfolgen, was sich insbesondere in unterschiedlicher Durchmischung von Analyt und Matrix in der fertigen Probe

manifestiert. Ein Einbau eines Analyten in einen Matrixkristall ist für einen erfolgreichen MALDI-Prozess nicht notwendig.

3.1.3.3 Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS inkompatibler Systeme

Der Matrixeffekt steht bei den folgenden Untersuchungen im Vordergrund. Bei diesem Ansatz wird für die Cytochrom *C*-Analyse die lösungsmittelinkompatible Dithranol-Matrix (**Abb. 3-23**) und die lösungsmittel- und polaritätsinkompatible Anthracen-Matrix zur lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS-Analyse von Cytochrom *C* **12** eingesetzt. Die Ergebnisse werden mit denen der 2,5-DHB verglichen, welche die gängige Matrix für das Cytochrom *C* **12** ist.

Dithranol ist eine Matrix, die bevorzugt bei der Polymeranalytik oder bei organischen Makromolekülen eingesetzt wird (Kapitel 2.1.1, S. 15) und eine gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (z.B. THF) zeigt. Die Dithranol-Matrix ist unpolarer als die DHB-Matrix, trägt jedoch in Analogie zu dieser ebenfalls Hydroxyfunktionen. Das lösungsmittelfreie MALDI-TOF-Massenspektrum von Cytochrom *C* mittels der Dithranol-Matrix (**Abb. 3-31a**) im gängigen Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/500 kann mit einer relativen Laserleistung von 40 in guter Qualität erhalten werden.

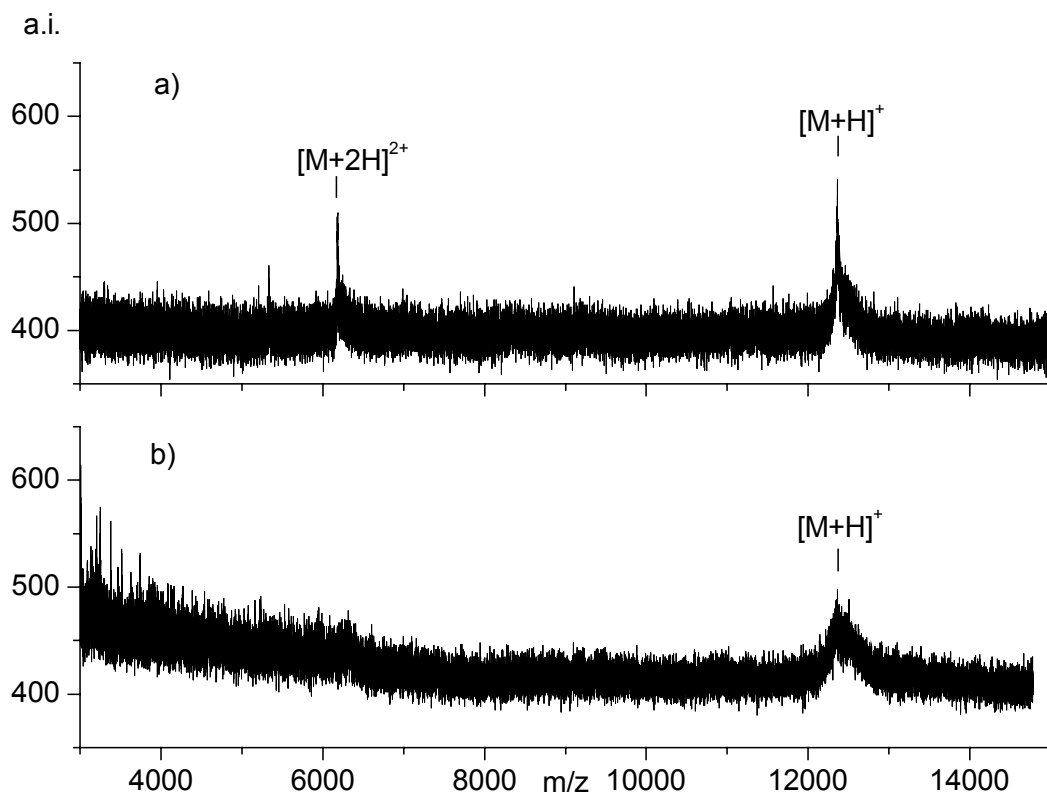


Abb. 3-31: MALDI-TOF-Massenspektren von Cytochrom *C* **12** mit inkompatiblen Matrices bei molaren Analyt/Matrix-Verhältnissen von 1/500 in Abhängigkeit der relativen Laserleistung (in Klammern): a) Dithranol (40); b) Anthracen (45).

Im Vergleich zur 2,5-DHB-Matrix zeigt sich eine erhöhte relative Laserleistung, geringere Signalintensität und ein niedrigeres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Trotz erhöhter relativer Laserleistung wird für die Dithranol-Matrix ein schmaleres Signal von Cytochrom *C* gefunden. Bei der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS wird die Signalverbreiterung bei der 2,5-DHB-Matrix auf Cytochrom *C*-Matrixadduktbildung zurückgeführt¹⁸⁰. Bei diesen lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS-Untersuchungen ist die Signalverbreiterung von Cytochrom *C* bei der 2,5-DHB (**Abb. 3-32a**) insbesondere durch Na-Pseudo-Molekülionenbildung, verursacht durch Verunreinigungen der Matrix durch Natriumsalze (Kapitel 2.1.3, S. 20), zu erklären. Damit wird das Cytochrom *C* **12** einerseits durch die herkömmliche Anlagerung eines Protons, jedoch auch eines Natriumkations sowie durch verschiedene Austauschgrade von aciden Protonen des Cytochrom *C* **12** gegen Natriumkationen zur Ionisation gebracht. Das „Tailing“ (**Abb. 3-32b**) bei Cytochrom *C* **12** unter Verwendung von Dithranol zu niedrigeren Massen wird auf Fragmentierung durch erhöhte Laserleistung zurückgeführt.

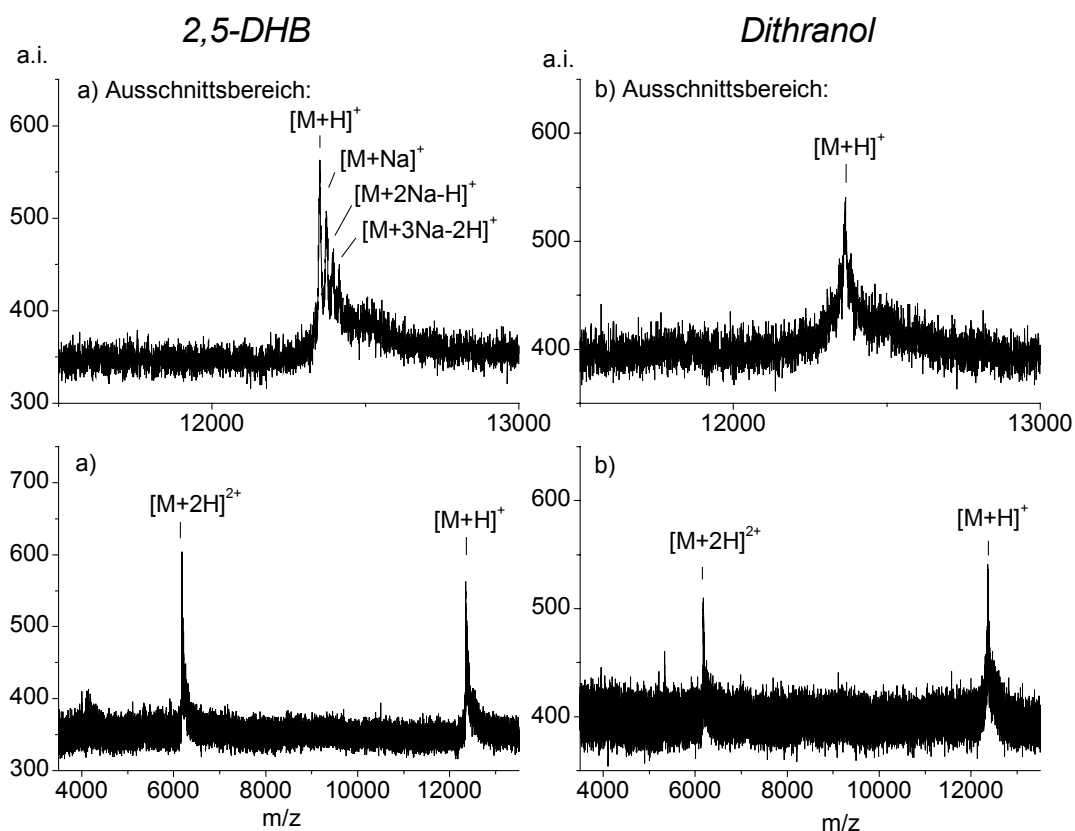


Abb. 3-32: MALDI-TOF-Massenspektren von Cytochrom *C* **12** in Abhängigkeit der relativen Laserleistung (in Klammern): a) 2,5-DHB im molaren Verhältnis 1/1.000 (35); b) Dithranol im molaren Verhältnis 1/500 (40).

Eine noch größere Differenz in den Polaritäten zwischen dem Cytochrom *C*-Analyten **12** und der Matrix ist mit Anthracen gegeben, einer sehr unpolaren Matrix, welche neuerdings Anwendung

zur Charakterisierung von unpolaren Polymeren wie Poly(butadienen), Poly(isoprenen) und Polystyrol findet^{183,184}. Sie verbessert dabei insbesondere die Reproduzierbarkeit der Messung.

In **Abb. 3-31b** (S. 76) ist das lösungsmittelfreie MALDI-TOF-Massenspektrum dargestellt, welches mittels Anthracen im Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/500 unter Anwendung der relativen Laserleistung von 45 erhalten wurde. Dabei zeigt sich eine sehr geringe Qualität im Massenspektrum, die sich insbesondere durch ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis darstellt. Die Signalintensität des Cytochrom C 12 ist gering, die Signalbreite dagegen groß. Da diese Analyt- und Matrixmoleküle aufgrund ihrer Polaritäten gänzlich inkompatibel sind, kann angenommen werden, dass sie sich ausschließlich durch die äußeren Kräfte bei der Kugelmühlenbehandlung mischen. Ferner kann angenommen werden, dass positive Wechselwirkungen zwischen Analyt und Matrix vernachlässigbar sind. Da ein MALDI-TOF-Massenspektrum eines inkompatiblen Analyt-Matrix-MALDI-Gemisches erhalten werden konnte, wird gezeigt, dass die Absorption der Matrix bei der verwendeten Laserwellenlänge den ausschlaggebenden Faktor des Matrixeffektes und damit des MALDI-Prozesses darstellt. Aufgrund der geringen Qualität des Massenspektrums muss angenommen werden, dass kompatible Polaritäten zwischen Matrix (z.B. 2,5-DHB-Matrix, **Abb. 3-30A**) und Analyt den MALDI-Prozess verbessern. Wechselwirkungen zwischen Matrix und Analyt, wie sie bei Adsorptionsphänomenen gefunden werden, stellen somit keine generelle Notwendigkeit dar. Sie scheinen jedoch den MALDI-Prozess zu begünstigen.

3.1.3.4 Diskussion zum theoretischen Aspekt

Der Versuch, ein auch nur in Grenzen einheitliches Modell des MALDI-Prozesses zu entwerfen, ist nicht Ziel dieser Untersuchungen. Sie reihen sich vielmehr in eine Vielzahl von Detailuntersuchungen ein, um neue Erkenntnisse und ein tieferes Verständnis der physikochemischen Prozesse, die dem Desorptionsprozess der MALDI-Methode zugrunde liegen und ihm ihre ungewöhnlichen Eigenschaften verleihen, zu erhalten.

Die Ergebnisse, die in diesen Untersuchungen gewonnen wurden, unterstützen die Annahme, dass eine erfolgreiche MALDI-TOF-MS-Analyse bei einer Wellenlänge von 337 nm einen engen Kontakt zwischen Analyt- und Matrixmolekülen erfordert¹⁸⁰. Die gewonnenen Erkenntnisse widersprechen nicht dem postulierten Adsorptionsmodell¹⁸⁰ zwischen Analyt und Matrix.

Die Prozesse, die jedoch ursächlich die Produktion der Analytionen zu begünstigen scheinen, sind nach den hier gewonnenen Erkenntnissen eine ausreichende Absorption der Matrix bei der verwendeten Laserwellenlänge von 337 nm und eine möglichst hohe, kristallfreie Homogenisierung zwischen Matrix und Analyt im festen Zustand, die nachweislich die Schwellenleistung der Ionenbildung herabsetzt. Aus all diesen Ergebnissen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass durch die Zunahme des Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses die „Defektstrukturen“ des Kristalls maximiert werden. Folglich wird die Gitterenergie des Kristalls minimiert, wodurch die Freisetzung der Moleküle aus dem Gitterverband erleichtert wird. Insbesondere durch den Vergleich der „Einkristall“- und „pulverisierten Einkristall“-MALDI-TOF-MS-Untersuchungen konnte explizit der Zusammenhang zwischen Kristallinität und Laserleistung aufgezeigt werden. Je geringer die Kristallinität ist, desto geringer ist auch die aufzuwendende Laserleistung. Folglich wird durch die geringere Kristallinität die Schwellenleistung, die zur Desorption und Ionisation des Analyten führt,

minimiert. Dadurch werden wiederum geringere Überschussenergien in das Analyt-Matrix-System eingetragen, so dass der MALDI-Prozess schonender und damit auch fragmentierungsärmer wird. Im Gegensatz zu Horneffer *et al.*¹⁸⁰ müssen wir mit diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass der Einbau von Analyt in Matrixkristalle nicht hilfreich, sondern hinderlich für eine MALDI-TOF-MS-Analyse ist, da genau die Kristallinität den zugrundeliegenden Prozess energetisch erschwert.

Der erkennbare Vorteil des Einbaus eines Analyten in einen Matrixkristall ist dennoch insofern gegeben, als eine gewisse „Zwangshomogenisierung“ erhalten wird. Ein möglichst schonender MALDI-Prozess wird durch einen innigen Kontakt zwischen Analyt und Matrix unabhängig von Kristallinität erzielt. Der Erfolg des generellen Matrixeffektes ist unabhängig von der Kompatibilität zwischen Analyt- und Matrixmolekülen im gelösten Zustand.

Die gewonnenen Erkenntnisse zum generellen Matrixeffekt erlauben es, gezielte Untersuchungen zur Matrixeffektivität durchzuführen. Physikochemische Eigenschaften (z.B. Affinitäten aufgrund ihrer Polaritäten) und/oder strukturbedingte Eigenschaften (z.B. Geometrien) zwischen Analyt und Matrix können vermutet werden, um die molekularen Wechselwirkungen zu beschreiben. Eine Evaluierung dieser unterschiedlichen Eigenschaften würde den wirksamen Matrixeffekt näher beleuchten. Dadurch könnten die Unterschiede in den Effektivitäten des Desorptions/Ionisationsprozesses bei verschiedenen Matrices geklärt werden, die zu signifikanten Verbesserungen bei einem geeigneten Matrixmolekül führen können. Neue Matrices könnten ebenfalls gezielter untersucht werden.

3.1.4 Resümee

Für die MALDI-Probenpräparation ergibt sich, dass die lösungsmittelfreie Methode zuverlässig für eine ausreichende Homogenisierung und für eine wesentlich bessere Reproduzierbarkeit der Massenspektren sorgt (Kapitel 3.1.2.1, S. 30). Diese wird für die lösungsmittelbasierende Probenpräparation teilweise nur durch aufwendige Optimierung der Probenpräparation (z.B. Suche nach geeigneten Matrices und Lösungsmitteln) oder durch zeitintensive Messungen (z.B. Suche nach „hot spots“), gegebenenfalls aber auch durch die Anwendung erhöhter Laserleistungen (Kapitel 3.1.2.2, S. 44) gefunden. Damit ist die lösungsmittelfreie Probenpräparation als eine vereinfachte MALDI-TOF-MS-Methode zu beurteilen und vorzuziehen. Bei all unseren vergleichenden Untersuchungen ergab sich keine Situation, bei der die lösungsmittelfreie Probenpräparation versagte, die lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS hingegen Ergebnisse lieferte. Die Ergebnisse unterscheiden sich nur in der Art, dass die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS-Methode meist sogar verbesserte Ergebnisse liefert (Kapitel 3.1.2.2, S. 44) bzw. weitere Substanzklassen wie z.B. unlösliche Polydithiathianthrene¹⁷⁵ und Polyfluorene (Kapitel 3.1.2.3, S. 52) zugänglich macht. Die neue Methode ist daher nicht nur eine Bereicherung hinsichtlich der Vereinfachung, sondern auch eine Verbesserung und Erweiterung der MALDI-TOF-MS-Analyse. Die Erwartungen, die anfänglich an diese Untersuchungen gestellt wurden, sind durch die erzielten experimentellen Ergebnisse bei weitem übertroffen worden.

Der Erfolg der MALDI-TOF-MS-Analyse wird im wesentlichen durch die Probenpräparation entschieden. Nach den bisherigen Erfahrungen ist die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS universeller und sicherer in der Anwendung. Die Homogenisierung im festen Zustand ist ein

Mehraufwand, bei dem zusätzlich ein größerer Substanzbedarf vorliegt. Bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation bestehen zum Teil effektive Lösungsansätze zur Optimierung der massenspektrometrischen Analyse, wie z.B. die Verwendung eines leichtflüchtigen Lösungsmittels und/oder kompatibler Analyt-Matrix-Systeme zur Homogenisierung der auskristallisierten Probenmischung. Die lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS hat daher im Routinebetrieb ihre Berechtigung. Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS-Analysen können bei gänzlichem Versagen der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS-Analyse, bzw. ergänzend für eine Optimierung der massenspektrometrischen Analyse, hinzugezogen werden.

Durch geeignete Modelleexperimente konnte gezeigt werden, dass die Modellvorstellung eines Analyten eingebettet in einen Matrixkristall (**Abb. 3-33a**) nicht notwendig, sondern aufgrund der erhöhten einzubringenden Laserleistung von Nachteil ist. Der MALDI-Prozess ist umso effektiver, je geringer die (Rest-)Kristallinität und je höher der innige Kontakt zwischen Analyt und Matrix ist (**Abb. 3-33b**), unabhängig von der Art der Probenvorbereitung.

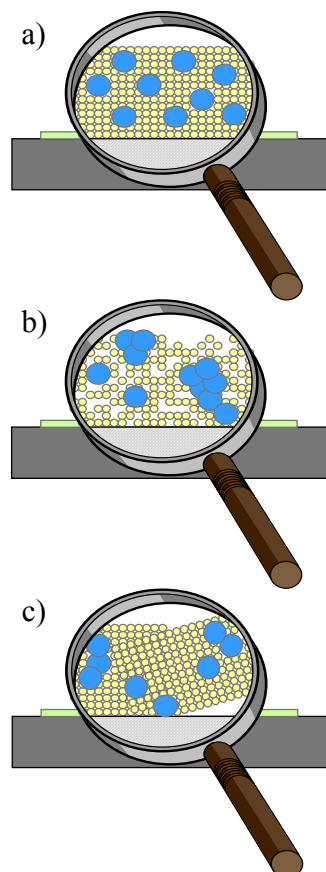


Abb. 3-33: Modellvorstellungen des MALDI-Probengemisches, welches einen möglichst effektiven MALDI-Prozess ermöglicht: a) Idealvorstellung des Analyten eingebettet in einen Matrixkristall; b) realistische Vorstellung, bei der der Analyt weitgehend homogen mit möglichst geringer (Rest-)Kristallinität in innigem Kontakt mit Matrixmolekülen steht; c) Rückschluss auf die Realvorstellung bei der konventionellen lösungsmittelbasierenden Probenpräparation.

3.2 Fragmentionenanalytik

3.2.1 Systematische Untersuchungen zur Abhängigkeit der Fragmentierung

3.2.1.1 Fragmentionenanalyse anhand des Modellhomopolymers PMMA

3.2.1.1.1 Theorie und analytisches Konzept

Im Massenbereich, bei dem einzelne Polymerketten aufgelöst wiedergegeben werden können, kann die genaue Ermittlung der molekularen Masse der synthetischen Polymeren eine Vielzahl an Informationen zur Verfügung stellen. Aus der absoluten Masse eines jeden Signals einer Polymerverteilung können die Masse der Wiederholungseinheit, der Polymerisationsgrad sowie die Masse der Endgruppen ermittelt werden. Dies ist von Bedeutung, um erwartete Endgruppen nach einer Polymerisation oder Endgruppenmodifikation zu verifizieren. Jedoch kann bei unbekanntem Polymeren oder Endgruppen das konventionelle MALDI-TOF-Massenspektrum alleine für eine eindeutige Strukturzuweisung nicht ausreichend sein. Zusätzliche Informationen können ebenfalls mittels MALDI-TOF-MS durch eine Fragmentionenanalyse erhalten werden, sofern das Polymer einen Bruch des Polymerrückgrats zeigt, so dass z.B. eine Differenzierung der Kettenenden möglich wird. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse konnte schon wichtige Beiträge zur Endgruppen- und Copolymeranalyse von Polymeren leisten^{103,104}. Der Nutzen der MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik ist auch im Bereich der synthetischen Polymere erkannt.

Die „Post-Source Decay“ (PSD)- und „Collision-Induced Dissociation“ (CID)-MALDI-TOF-Fragmentierungstechniken unterscheiden sich nur in der Art der Anregung (Kapitel 2.2.1, S. 24), die zur Fragmentierung des Analyten führt. Generell benötigt die Fragmentionenanalyse grundlegende Informationen über das Fragmentierungsverhalten der Polymerkette, da konkurrierende Prozesse Endgruppenbestimmung verhindern können wie z.B. die Dissoziation des Kations, Spaltung der Seitenkette anstatt des Rückgrates, ISD-Fragmentierung etc.. Der bisher literaturbeschriebene höchste zugängliche Massenbereich der Fragmentionenanalytik liegt bei 5.000 Da^{185,186} und ist durch den begrenzten Massenbereich des verwendeten Sektorfeld-TOF-Massenspektrometers bedingt.

An einem einfachen Homopolymersystem soll die Leistungsfähigkeit der MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse untersucht werden. Für diese systematischen Untersuchungen wurde die Wahl von PMMA als Analyt dahingehend getroffen, dass dieses im niedermolekularen Bereich schon eingehend auf dessen Fragmentierung untersucht wurde und damit auf einschlägige Literatur zurückgegriffen werden kann^{187,188,189}.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, Änderungen im Fragmentierungsverhalten von PMMA in Abhängigkeit steigender Molekulargewichte mittels MALDI-TOF-MS zu studieren^{VII,VIII}. Dabei sollte

^{VII} Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn *Dr. F.-J. Mayer-Posner*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen.

^{VIII} Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn *O. Laine* im Rahmen seiner Promotion im AK *Prof. Pirjo Vainiotalo* an der University of Joensuu, Joensuu, Finnland.

ebenfalls die Molekulargewichtsobergrenze dieser Technik ermittelt werden. Um Fragmentierungsstudien bis 10.000 Da **2c** zugänglich zu machen, sollte der probenpräparationsspezifische Einfluss einer GPC-Fraktionierung evaluiert werden. Instrumentenspezifische Parameter wie Detektorspannung und Breite des „Gate“-Fensters bei der Massenselektion sollten evaluiert werden, um die PSD-Untersuchung zu verbessern.

PMMA-Standards mit Molekulargewichten von 2.000 Da **2a**, 6.000 Da **2b** and 10.000 Da **2c** wurden für diese systematischen Untersuchungen ausgewählt. Die verwendeten Lithium-, Kalium- und Cäsiumkationen wurden zu den PMMA-Proben zugegeben, um den Einfluss der Kationengröße auf das Fragmentierungsverhalten von PMMA zu studieren. Die Fragmentspektren werden im Speziellen miteinander verglichen hinsichtlich Signalintensität und Sequenzinformation nach folgenden veränderlichen Parametern:

- Molekulargewicht des Polymers und Kationengröße (Kationendurchmesser-zu-Polymerlängen-Verhältnis),
- Matrix,
- Laserleistung und Detektionsparameter,
- Beschleunigungsspannung,
- Art der Fragmentanregung: „Post-Source Decay“ (PSD)- und „Collision-Induced Dissociation“ (CID),
- Stoßgas und Stoßgasdruck.

3.2.1.1.2 „Post-Source Decay“ (PSD)- und „Collision-Induced Dissociation“(CID)-MALDI-TOF-MS

3.2.1.1.2.1 Fragmentierungsmechanismus von PMMA

Die erhaltenen Fragmentionen entsprechen denen aus früheren Untersuchungen an PMMA-Proben, bei denen CID- und PSD-Technik gleichermaßen angewendet wurden^{185,186,187}. Die Struktur der Fragmentionen und ihrer m/z -Werte sind in **Abb. 3-34** zusammengestellt. Die Radikalkationen **A** und **B** entstehen als Konsequenz eines direkten Fragmentbruches des Polymerrückgrates¹⁸⁷. Die Ionen **C**, **D**, **E** und **F** werden durch Umlagerungsprozesse gebildet (**Abb. 3-34**)¹⁸⁶.

Die Laserleistung übt einen starken Einfluss auf das Fragmentierungsmuster und den Umfang einer Fragmentierung aus. Die Laserleistung musste jeweils optimiert werden, eine Vorhersage kann nicht gegeben werden. Eine Korrelation wird dahingehend beobachtet, dass mit Zunahme des Molekulargewichtes des Polymers höhere Laserleistung angewendet werden musste. Diese Tendenz ist bei der PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse intensiver als für die CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse. Die Unterschiede korrelieren gut mit der Theorie beider Fragmentanregungen (Kapitel 2.2.1, S. 24). Eine optimale Laserleistung liegt in jedem Fall zwischen Laserschwellenanregung des Moleküls und der Dissoziation des Kations vom Polymer.

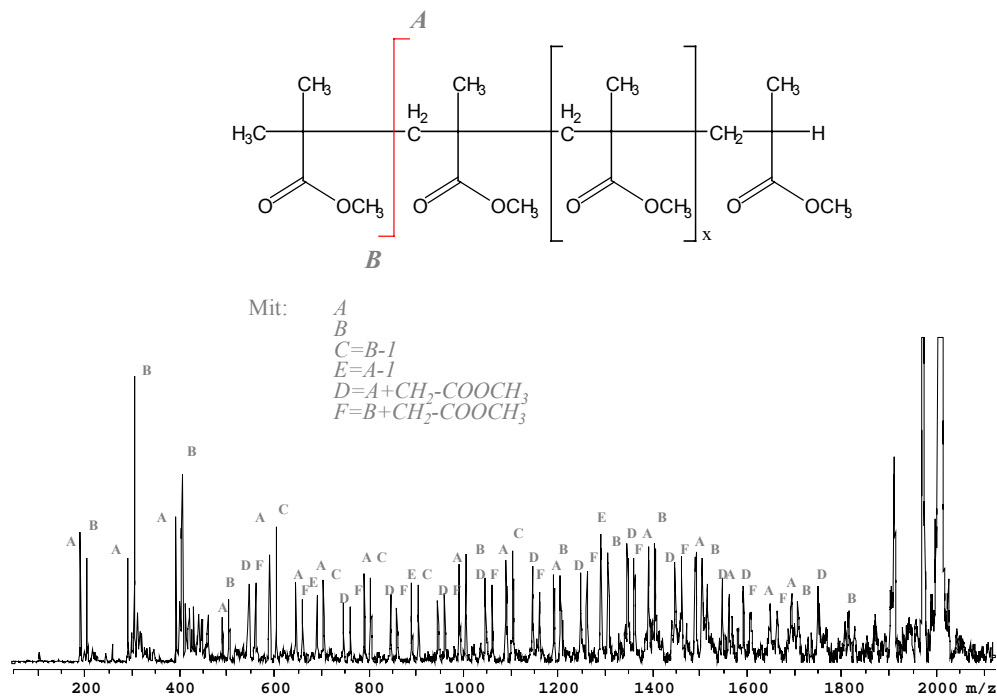


Abb. 3-34: Struktur von PMMA und Nomenklatur der Fragmente.

Bei Schwellenanregung des Polymers tritt keine nennenswerte PSD-MALDI-TOF-Fragmentierung (**Abb. 3-35b**) ein, jedoch eine ausgeprägte CID-Fragmentierung (**Abb. 3-35a**). Dies steht im Einklang mit der theoretische Erwartung zu den beiden unterschiedlichen Anregungsverfahren (Kapitel 2.2.1; S. 24) und ist von Bedeutung, da zwischen diesen beiden differenziert werden konnte, obwohl identische Fragmentionen gebildet werden. Aus den Untersuchungen an der Schwellenanregung des Polymers geht auch hervor, dass CID-MALDI-TOF-MS schonendere Fragmentierungsbedingungen gewährt, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis besser ist.

Mit Erhöhung der Laserleistung bei der CID-Fragmentionenanalyse steigt der PSD-Anteil an, so dass beide Fragmentierungsanregungen gleichzeitig eintreten. Diese Überlagerung macht sich im Fragmentspektrum durch eine erhöhte Kationendissoziation bemerkbar. Da die Fragmentionen bei beiden Fragmentanregungen gleich sind, treten keine zusätzlichen Fragmentsignale auf.

Die Detektorspannung ist ein sehr empfindlicher Parameter, um die Qualität des Massenspektrums zu verbessern. Parameter wie Lösungsmittel, Konzentration und Probenauftragung zeigen ebenfalls einen Einfluss. Für diese Parameter kann keine Vorhersage getroffen werden, so dass sie jeweils experimentell evaluiert werden müssen. Die Beschleunigungsparameter von 28,5 und 26 kV geben bei PSD-MALDI-TOF-MS oder CID-MALDI-TOF-MS keine nennenswerten Unterschiede im Ausmaß der Fragmentierung oder im Fragmentierungsmuster.

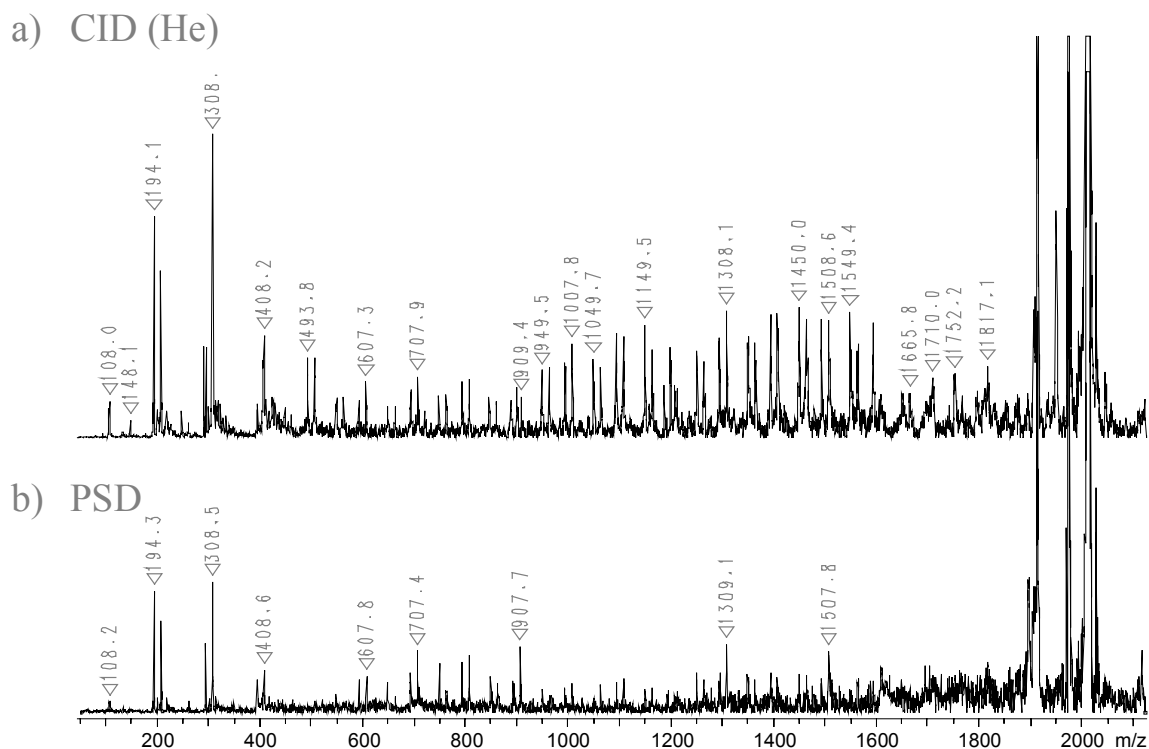


Abb. 3-35: MALDI-TOF-Fragmentspektren (Dithranol, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$) von PMMA 2.000 Da **2a** in Abhängigkeit der relativen Laserleistung: a) Schwellenleistung im CID-Technik; b) Schwellenleistung im PSD-Technik.

3.2.1.1.2.2 Fragmentionenanalyse von PMMA mit 2.000 Da

Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von $[\text{M}+\text{Li}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$ und $[\text{M}+\text{Cs}]^+$ der Pseudo-Molekülen des PMMA-20-mers **2a** sind in **Abb. 3-36** gegenübergestellt. Fragmentserien werden nur mit Li- und K-Pseudo-Molekülen erhalten. Beim Cs-Pseudo-Molekül dominiert ein unerwartetes Signal bei 1913 Da das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum. Das Li-Pseudo-Molekül (20-mer) liefert weitaus intensivere Fragmentensignale und bessere Signal-zu-Rausch-Verhältnisse als das K-Pseudo-Molekül. Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang mit experimentellen und theoretischen Fragmentuntersuchungen von PMMA, bei denen von allen Alkalimetallkationen Lithiumkationen die höchste Bindungsenergie mit niedermolekularen PMMA-Fragmenten zeigten^{187,190}.

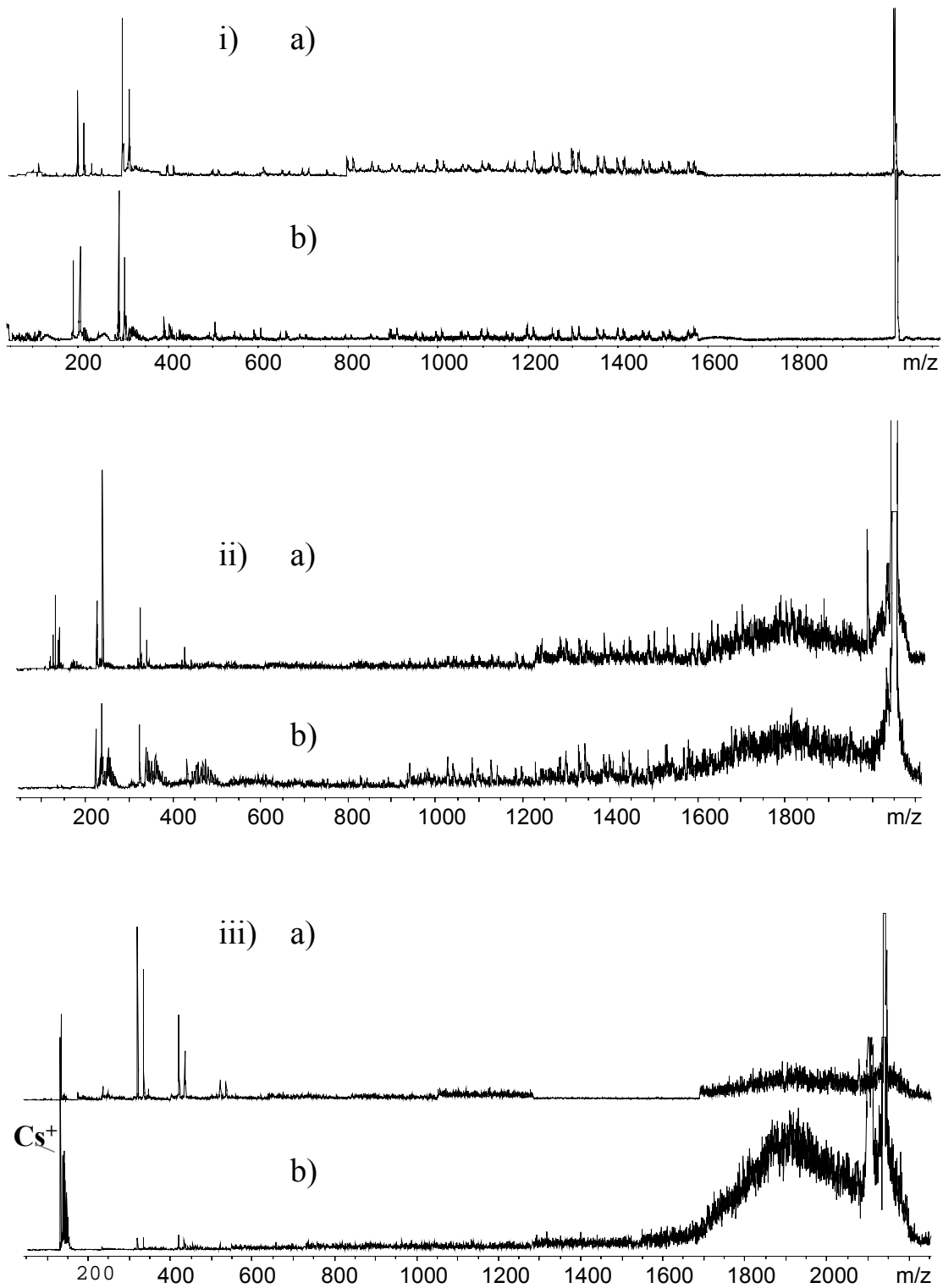


Abb. 3-36: MALDI-TOF-Fragmentspektren (Dithranol) von PMMA 2.000 Da **2a** in Abhängigkeit der Kationengröße und der Aktivierungsanregung bei N_2 als Stoßgas: i) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$: a) CID; b) PSD; ii) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{K}$: a) CID; b) PSD; iii) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Cs}$: a) CID; b) PSD.

Typ **A** und **B** Radikalkationen, aufgebaut aus einer bzw. zwei Monomereinheiten, sind die dominantesten Fragmentionen im niedermolekularen Fragmentmassenbereich von $[M+Li]^+$ und $[M+K]^+$ (**Abb. 3-36**). Typ **A** Radikalkationen werden auch für $[M+Li]^+$ gefunden, jedoch nur mit sehr geringen Signalintensitäten. Dominante niedermolekulare PMMA-Fragmentionen wurden ebenfalls in den PSD- und CID-Fragmentspektren in vorangegangenen Untersuchungen beobachtet^{185,186,187}. Die erhaltenen m/z -Werte erschienen auch in diesen Untersuchungen bei rund einem Zehntel der Masse des selektierten Elternions. Die Fragmentserie, die aus den Umlagerungsreaktionen resultiert, werden in den $[M+Li]^+$ - und $[M+K]^+$ -Fragmentspektren im Massenbereich über m/z 500 gefunden. **Abb. 3-36** zeigt diese höhermolekularen Fragmente des $[M_{20}+Li]^+$ -Molekülions. Die erhaltenen Fragmentionen sind vom Typ **C**, **D**, **E** und **F** analog vorangegangener PMMA-Fragmentuntersuchungen^{186,187}.

Theoretisch könnte die CID- und PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse aufgrund des unterschiedlichen Energieeintrages zur Anregung der Fragmentierung unterschiedliche Fragmentierungspfade induzieren. Bei Li- und K-Pseudo-Molekülionen des PMMA-20-mers werden keine beträchtlichen Unterschiede gefunden (**Abb. 3-36i-ii**). Mit zunehmender Kationengröße nimmt jedoch bei der CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse die unerwünschte Abdissoziation des Kations zu, so dass beim Cs-Pseudo-Molekülion (**Abb. 3-36iii**) diese Abdissoziation unmittelbar die CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse von PMMA-20-mers verhindert. Die CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse beruht auf einer energiereichen stoßverursachten Fragmentierung (Kapitel 2.2.1, S. 24), die bei weniger optimalen Kationendurchmesser-zu-Polymerlängen-Verhältnissen (**Abb. 3-36iii**) zu besseren Fragmentionenausbeuten des Polymers führt. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse zeigt damit eine noch größere Abhängigkeit zur optimalen Probenpräparation als die CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse. Zusätzlich erlaubt die CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse (**Abb. 3-36i,a**) durch feinabgestimmte, optimale Kationendurchmesser-zu-Polymerlängen-Verhältnisse bessere Ergebnisse zu erzielen hinsichtlich Signal-zu-Rausch-Verhältnissen als die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse (**Abb. 3-36i,b**). Bei der CID-Technik sind im niedermolekularen Fragmentbereich die Fragmentionensignalintensitäten intensiver als bei der PSD-Technik.

3.2.1.1.2.3 Fragmentionenanalyse von PMMA mit 6.000 Da

Die PSD-MALDI-TOF Massenspektren von $[M+Li]^+$, $[M+K]^+$ und $[M+Cs]^+$ der Pseudo-Molekülionen des PMMA-60-mers **2b** sind in **Abb. 3-37** gegenübergestellt. PSD-Fragmentionen werden für alle Alkalimetallkationen, die zur Kationisierung von PMMA-60-mer eingesetzt wurden, gefunden. Der ausschlaggebende Faktor um ein PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum zu erhalten ist, die Intensität des Elternions möglichst groß zu erhalten.

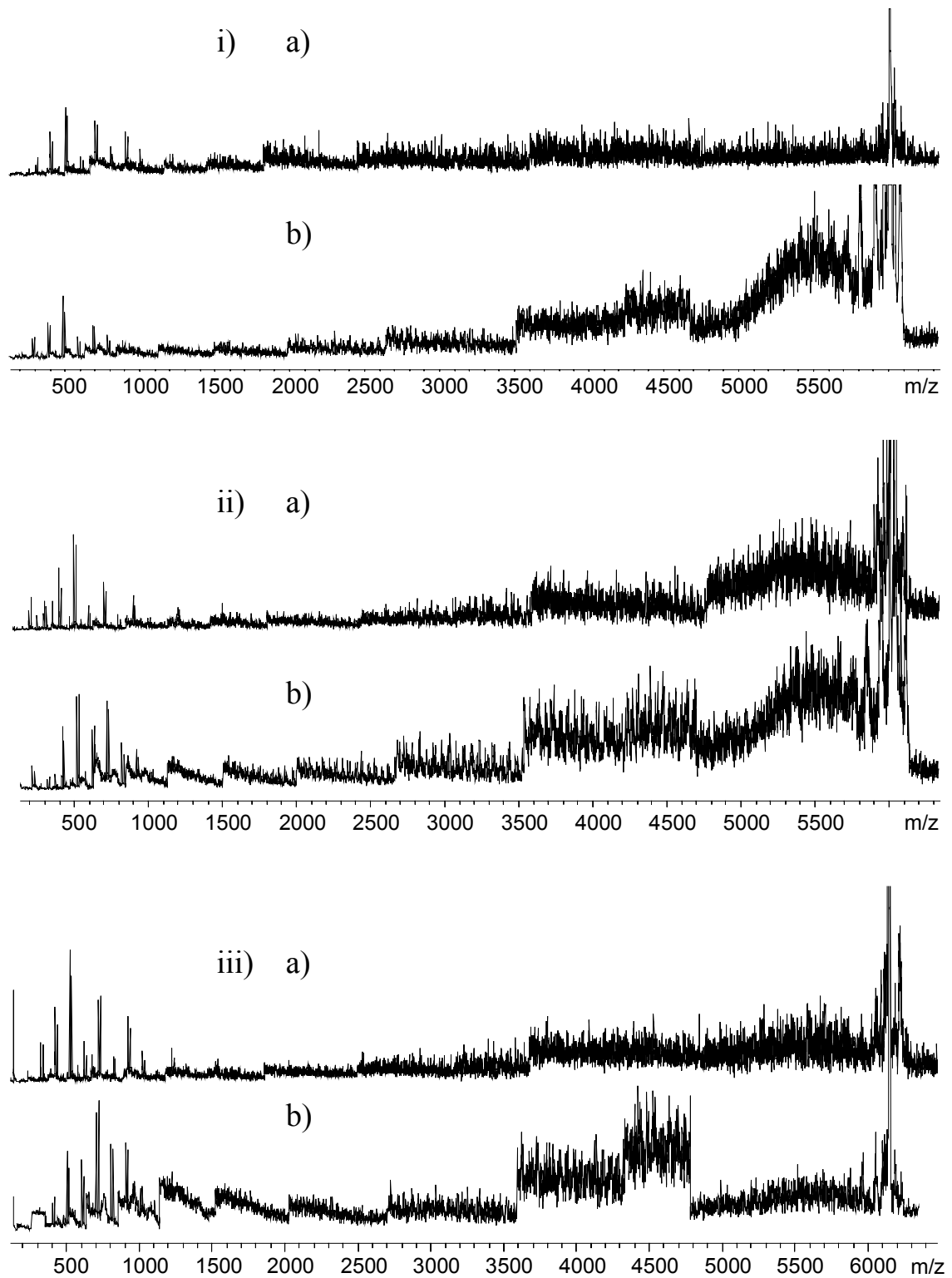


Abb. 3-37: MALDI-TOF-Fragmentspektren (Dithranol) von PMMA 6.000 Da **2b** in Abhängigkeit der Kationengröße und der Aktivierungsanregung bei N_2 als Stoßgas: i) CF_3CO_2Li : a) CID; b) PSD; ii) CF_3CO_2K : a) CID; b) PSD; iii) CF_3CO_2Cs : a) CID; b) PSD.

Die Fensterbreite, die zuvor erfolgreich zur Selektion des PMMA-20-mers eingesetzt wurde, erlaubt nicht eine ausreichende Anzahl an PMMA-60-mer Ionen durch das elektronische „Gate“ passieren zu lassen. Obwohl die Selektion des Mutterions erfolgreich verlief, können keine Fragmentationen des Elternions im Fragmentspektrum gefunden werden. Wird die Fensterbreite von m/z 50 auf m/z 100 erweitert, so ist die Signalintensität des Elternions ausreichend, so dass auch die Signalintensität der Fragmentationen über die des Signal-zu-Rausch-Verhältnis steigt. Die Fensterbreite ist dann so groß, dass benachbarte Oligomersignale fälschlicherweise teilweise mitselektiert werden. Da diese benachbarten Signale nur eine geringe Intensität aufweisen, ist mit keinem Beitrag im Fragmentspektrum zu rechnen. Die Verteilungen der niedermolekularen Fragmentationen ist bei Verwendung von Lithium- und Kaliumkationen nahezu identisch. Der Fragmentmassenbereich erstreckt sich dabei von m/z 300 bis m/z 1100. Die Fragmentsignale mit den größten Signalintensitäten liegen bei m/z 600. Jedoch sind die Signalintensitäten der Fragmentationen bei Verwendung von Kaliumkationen etwas intensiver als bei Lithiumkationen. Die intensivsten Fragmente sind Typ **A** und **B** Ionen neben weniger intensiven **C** Ionen. Im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum von $[M+Cs]^+$ erscheinen zwei intensive Fragmentationen vom Typ **A** und **B**. Die niedermolekularen Fragmente dominieren das Fragmentspektrum, obwohl diese niedrigere Bindungsenergien mit Alkalimetallkationen haben als höhermolekulare Fragmente, welches kürzlich anhand der „charge induced“ Fragmentierung der PMMA-Kette gezeigt wurde¹⁹⁰.

Eindeutige Fragmentserien werden in den Fragmentspektren über m/z 2500 Da für $[M+Li]^+$ und $[M+K]^+$ gefunden. Die höhermolekularen Fragmente sind auch hier wieder Typ **C**, **D**, **E** und **F** Ionen, welche durch Umlagerungsreaktionen gebildet werden. Höhermolekulare Fragmentationen scheinen auch bei $[M+Cs]^+$ zugegen zu sein. Jedoch ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis so gering, dass keine genaueren Angaben zu diesen Signalen gemacht werden.

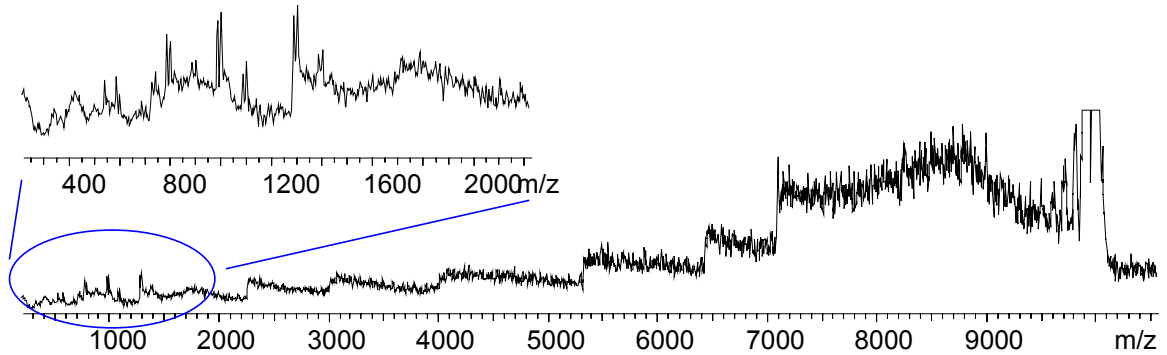
Bei Li-, K- und Cs-Pseudo-Molekülonen des PMMA-60-mers werden bis auf leicht bessere Signal-zu-Rausch-Verhältnisse bei der CID-MALDI-TOF-Fragmentationenanalyse keine beträchtlichen Unterschiede zu PSD-MALDI-TOF-Fragmentationenanalyse gefunden (**Abb. 3-37i-iii**).

3.2.1.1.2.4 Fragmentationenanalyse von PMMA mit 10.000 Da

Die Fragmentationenanalyse eines synthetischen Polymers mit einem Molekulargewicht von 10.000 Da wird hier erstmals beschrieben. Die Ionisierung erfolgt mittels MALDI. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentationenanalyse von PMMA-100-mer **2c** zeigt sich in der Durchführung wesentlich schwieriger als die von kleineren PMMA-Polymeren. Ein wesentlich größeres Selektionsfenster wird benötigt, um eine ausreichende Signalintensität des Elternions zu erhalten, so dass das Selektionsfenster bis zu m/z 230 Da vergrößert werden muss. Trotz dieser großen Fensterbreite ist die Signalintensität der Fragmentationen bei allen verwendeten Alkalimetallkationen gering. Die Ergebnisse können jedoch durch eine vorangeschaltete GPC-Fraktionierung von PMMA **2c** und anschließender PSD-MALDI-TOF-Fragmentationenanalyse der GPC-Fraktion signifikant verbessert werden. Beide Prozesse gemeinsam erlauben die Ausbeute des selektierten Elternions zu erhöhen, die erfolgreich das elektronische „Gate“ durchlaufen können. Dies stellt sich als eine unmittelbare Voraussetzung für die erfolgreiche Fragmentationenanalytik von PMMA-100-mer (**Abb. 3-38**) heraus.

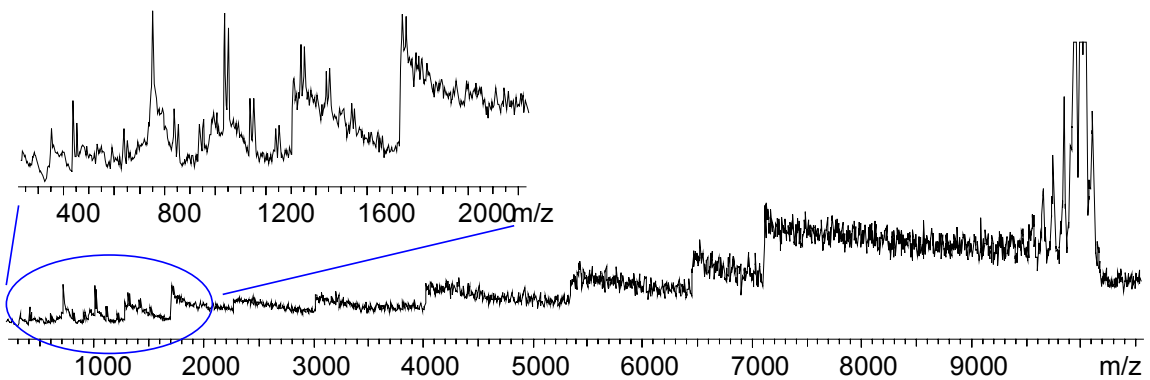
*niedermolekularer
Massenbereich:*

a)



*niedermolekularer
Massenbereich:*

b)



*niedermolekularer
Massenbereich:*

c)

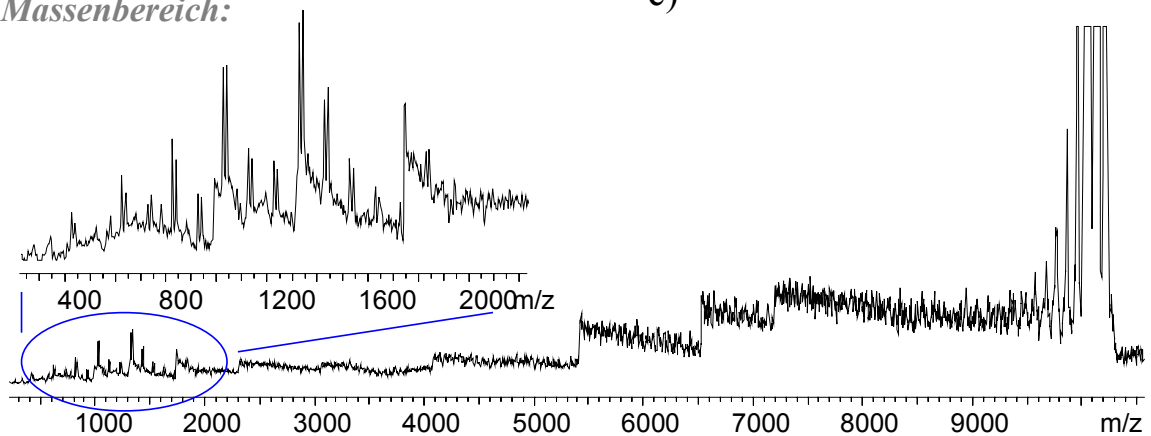


Abb. 3-38: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren (Dithranol) von PMMA 10.000 Da **2c** in Abhängigkeit der Kationengröße: a) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$; b) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{K}$; c) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Cs}$.

Die Fragmentspektren von $[M+Li]^+$, $[M+K]^+$ und $[M+Cs]^+$ der Pseudo-Molekülonen des PMMA-100-mers sind in **Abb. 3-38** dargestellt. Eine Verteilung an niedermolekularen Fragmenten werden für alle zur Kationisierung von PMMA-100-mer eingesetzten Alkalimetalle gefunden. Die Breite der Verteilung ist auch hier erneut ungefähr gleich für alle eingesetzten Alkalimetalle und reicht von m/z 400 zu m/z 2.000. Jedoch steigt die Signalintensität der Fragmentionen mit steigender Größe des verwendeten Metallkations, so dass die höchste Fragmentionensignalintensität im $[M+Cs]^+$ -Massenspektrum gefunden wird. Die m/z -Werte der intensivsten Fragmentsignale finden sich bei m/z 1.000 und liegen damit erneut bei rund einem Zehntel des m/z -Wertes des selektierten Elternions. Analog PMMA-60-mer sind die niedermolekularen Fragmente im Massenspektrum überwiegend Typ **A** und **B** Ionen und sehr untergeordnet Typ **C** Ionen. Im Bereich über m/z 5.000 könnten die Serien an Signalen möglicherweise ebenfalls Fragmente sein, aber deren Identifikation ist aufgrund der unzulänglichen Auflösung nicht möglich.

Bei Li-, K- und Cs-Pseudo-Molekülonen des PMMA-100-mers werden analog zum PMMA-60-mer bis auf leicht bessere Signal-zu-Rausch-Verhältnisse bei der CID-MALDI-TOF-Fragmentenanalyse keine beträchtlichen Unterschiede zu PSD-MALDI-TOF-Fragmentenanalyse gefunden (**Abb. 3-40**, S. 93).

3.2.1.1.2.5 Matrixabhängigkeit

Der Einfluss von CID-MALDI-TOF-MS und von PSD-MALDI-TOF-MS wird hinsichtlich des Musters und des Ausmasses einer Fragmentierung in Abhängigkeit unterschiedlicher Matrices verglichen (**Abb. 3-39**)¹²³. „Kalte“ Matrices, wie Dithranol und DHB (**Abb. 3-39a**), zeigen keine beträchtlichen Unterschiede in den CID-MALDI-TOF-Fragmentspektren und PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren. „Heiße“ Matrices, wie HCCA und HABA (**Abb. 3-39b,c**), zeigen einen deutlich niedrigeren Desorptionsschwellenwert und erlauben ohne hohe Einbußen der Ionenausbeute bei weniger Laserleistung MALDI-TOF-Fragmentenanalyse zu betreiben. CID-MALDI-TOF-Fragmentenanalyse mit „heißen“ Matrices verursachte Fragmentionen, die nicht in den vorangegangenen Untersuchungen beobachtet oder in der Literatur beschrieben sind. Eine Strukturzuordnung kann nicht gegeben werden. „Heiße“ Matrices zeigen eine hohe Ionenausbeute und produzieren zusätzlich labile Molekülonen.

Der Vergleich von „heißen“ Matrices zeigten bei PMMA höhere Fragmentenausbeuten als mit „kalten“ Matrices. Der Einfluss der Fragmentierung bei CID-MALDI-TOF-MS und PSD-MALDI-TOF-MS ist bei „kalten“ Matrices im Ausmaß und im Fragmentmuster vergleichbar. Eine wesentlich effektivere Differenzierung zwischen Ionen unterschiedlicher Fragmentanregungen können mittels „heißen“ Matrices durchgeführt werden.

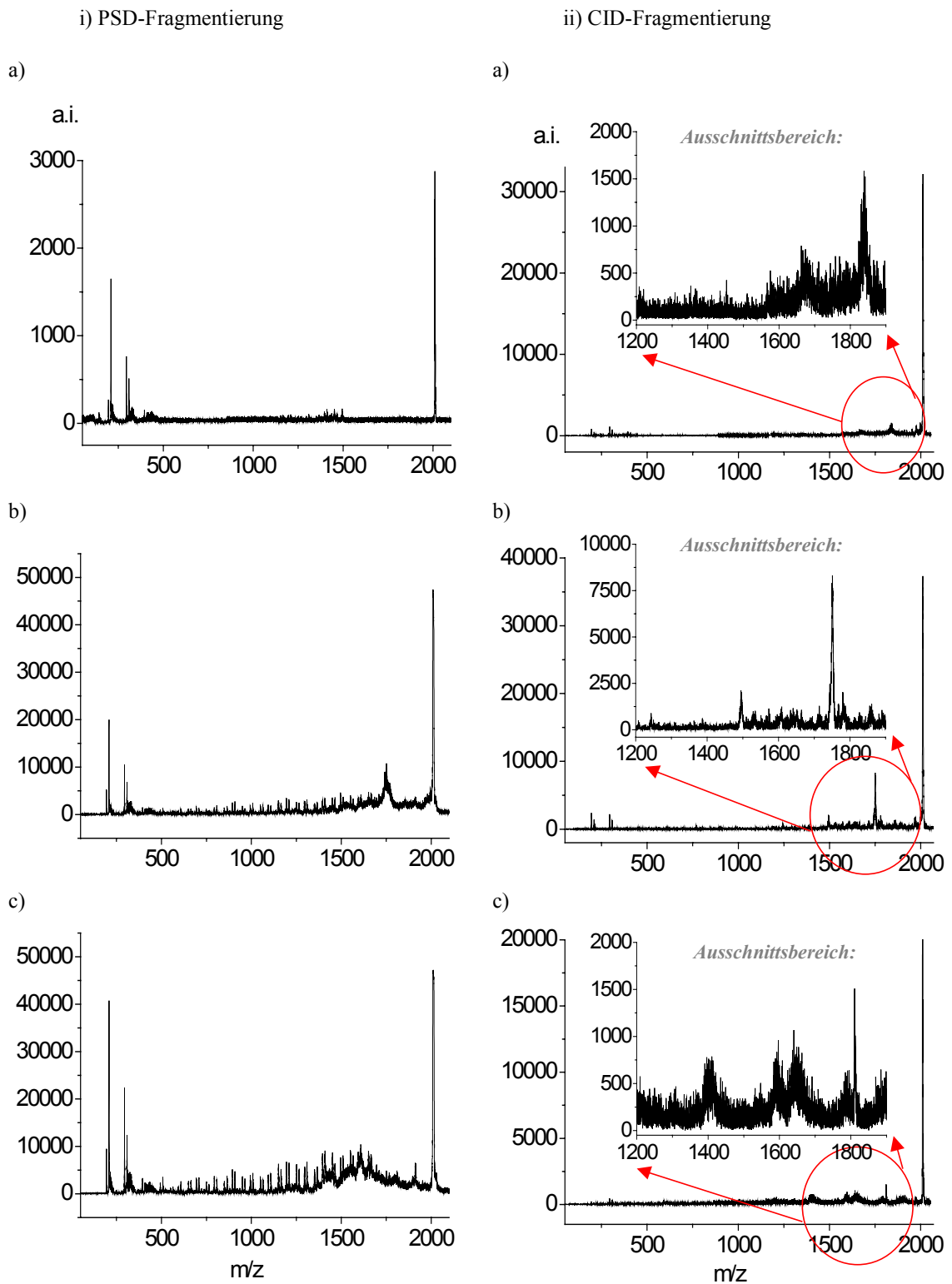


Abb. 3-39: MALDI-TOF-Fragmentspektren ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$) von PMMA 2.000 Da **2a** in Abhängigkeit der Matrices, der relativen Laserleistung (in Klammern) und der Aktivierungsanregung bei N_2 als Stoßgas: i) PSD: a) DHB (40); b) HABA (30); c) HCCA (30); ii) CID: a) DHB (30); b) HABA (28); c) HCCA (20).

3.2.1.1.2.6 Stoßgasabhängigkeit bei CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik

Die Effektivität des Stoßpartners, der zum sequenzinformativen Fragmentbruch führt, wird evaluiert. Die vorteilhafteste Wechselwirkung zwischen Metall-Pseudo-Molekülion und dem Stoßgas tritt auf, wenn der Zusammenstoß Fragmentierung induziert, ohne dass das Kation dissoziiert. Eine starke Abhängigkeit zwischen Fragmentierung und der Größe des Stoßgases wird beobachtet. Stoßgase wie He, N₂, Ar und Xe zeigen bei der Fragmentierung von Li-Pseudo-Molekülion 2.000 Da **2a** (**Abb. 3-40i**), dass das kleinste Stoßgas die stärkste Ausbeute an Fragmentionen produziert.

Im Falle von Li-Pseudo-Molekülion 10.000 Da **2c** (**Abb. 3-40ii**) führte die Variation der Stoßgase zu verbesserten Ergebnissen, wenn He oder Ar anstelle vom N₂ verwendet wurde. Xe zeigt keinen nennenswerten Unterschied zu N₂. Für die Ergebnisse der Stoßgasvariation wird kein Zusammenhang zwischen Fragmentierungsmuster und Masse des Stoßgases gefunden, während die Größe des Stoßgases eine hohe Auswirkung auf das Ergebnis der Fragmentierung hat. Mit abnehmender Größe des Stoßgases wird eine viel stärkere Fragmentierung unabhängig von der Polymerlänge oder Kationengröße verursacht.

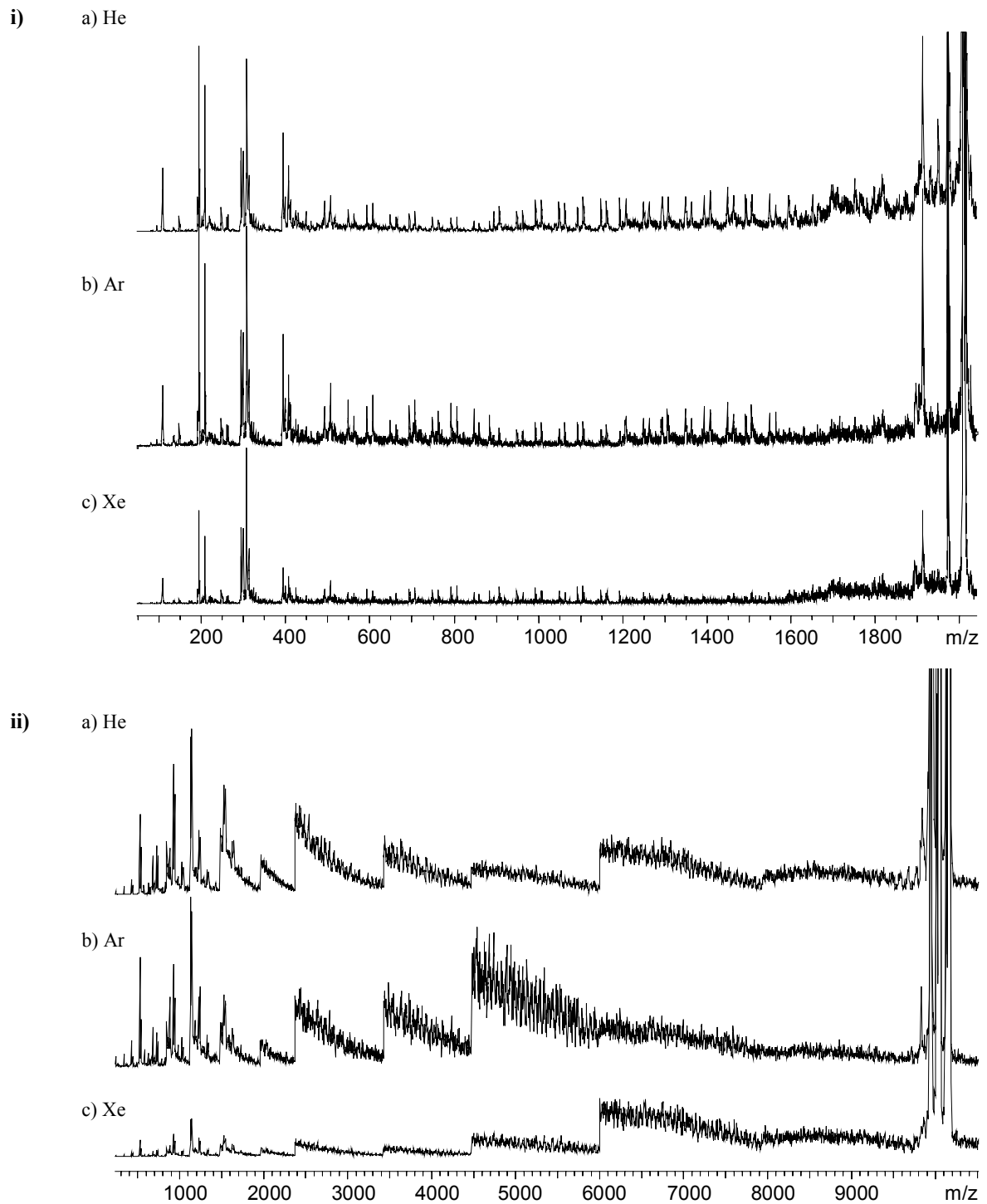


Abb. 3-40: CID-MALDI-TOF-Fragmentspektren (Dithranol) in Abhängigkeit des Stoßgases: i) PMMA 2.000 Da **2a**: a) He; b) N₂; c) Ar; d) Xe; ii) PMMA 10.000 Da **2c**: a) He; b) N₂; c) Ar; d) Xe.

3.2.1.2 Einführung einer chemisch induzierten Fragmentierung

3.2.1.2.1 Theorie und analytisches Konzept

Edelgase sind inert und unterscheiden sich nur in den Atomradien und -massen. Diese zeigten bei den systematischen Fragmentuntersuchungen an PMMA (Kapitel 3.2.1, S. 81) Unterschiede hinsichtlich der Effizienz der Fragmentierung. Der Fragmentierungsmechanismus blieb unverändert. Durch nichtinerte Stoßgase könnte sich prinzipiell die Effektivität eines Stoßes bzw. des Fragmentierungsmechanismus ändern. Diese Art Stoßgase sind jedoch nicht über den herkömmlichen Stoßgaseinlass einführbar.

Niedermolekulare, fragmentierungslabile Moleküle könnten möglicherweise eine Wolke an radikalischem Stoßgas gepulst induzieren. Eine Voraussetzung ist eine ausreichend hohe Verdampfungsenergie, so dass dieses niedermolekulare Molekül nicht unmittelbar nach dem Einschleusen in das Hochvakuum des Massenspektrometers sofort verdampft. Die hohe ISD- und PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungstendenz von Azoderivaten wird in Kapitel 3.4.3.4 gezeigt. Diese systematischen, alternativen Untersuchungen zur Stoßaktivierung sollen daher an niedermolekularem AIBN, welches zu Isobutyronitrilradikalen zerfällt, an grundsätzlich unterschiedlichen Analyten durchgeführt werden.

3.2.1.2.2 Radikalisches Isobutyronitril-Stoßgas

Bei der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS-Probenpräparation wird das gelöste AIBN mit dem Analyt-Matrix-Metallsalz-Probengemisch vermengt. Nach Auskristallisation des Gemisches auf dem Probenträger wird dieses unverzüglich in das MALDI-Gerät eingebracht und das konventionelle MALDI-TOF-Massenspektrum bzw. das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum aufgenommen.

Die systematischen Testuntersuchungen sehr unterschiedlicher Analyte unter Einwirkung von AIBN zeigen in den PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren unabhängig von der zugrundeliegenden Ionisation (z.B. PMMA 2.000 Da **2a**: Li-, K-, Cs-Pseudo-Molekülion; PS 2.000 Da **1a**: Ag-Pseudo-Molekülion; unterschiedliche PAHs: radikalkationische Ionisation) keine prinzipiellen Unterschiede im Fragmentierungsverhalten. Die Stoßeffectivität bleibt bei Zusatz von AIBN ähnlich oder nimmt ab. Für PVP **7a** werden wesentlich veränderte Fragmentspektren erhalten (**Abb. 3-41**) und daher im Folgenden eingehender untersucht und diskutiert.

Das konventionelle Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum von PVP **7a** mit AIBN ist identisch zu dem ohne AIBN-Zusatz. Veränderungen bei der Probenpräparation (z.B. chemische Reaktion der in der Probenlösung enthaltenen Komponenten) durch Anwesenheit von AIBN können damit ausgeschlossen werden. Die Prozesse, die zu den unterschiedlichen Fragmentspektren bei Li-Pseudo-Molekülionen ohne und mit AIBN-Zusatz (**Abb. 3-41a,b**) führen, müssen demnach massenspektrometrischer Natur sein.

Prinzipiell könnte dieser massenspektrometrische Unterschied auch durch eine unterschiedliche Pseudo-Fragmentationbildung verursacht werden. Bei weiterführenden PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungsuntersuchungen von PVP **7a** in Abhängigkeit der Ionisation wurden sehr unterschiedliche PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren erhalten. In **Abb. 3-41c,d** sind die Ergebnisse für die Na- und Cs-Pseudo-Molekülionen gegenübergestellt. Die Fragmentationen im niedermolekularen Bereich werden unabhängig von der zugrundeliegenden Ionisation des Elternions größtenteils als

radikalkationische Ionen detektiert (Abb. 3-41b,c,d). Die Fragmentationen, die im mittleren Molekulargewichtsbereich der PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren auftreten, können keiner Struktur zugeordnet werden. Jedoch kann durch diese PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren in Abhängigkeit der Ionisation von PVP 7a gezeigt werden, dass im Falle des Li-Pseudo-Moleküls unter Zugabe von AIBN keine zufällige Ionisation der Fragmentationen mit einem anderen Kation zu den veränderten Fragmentspektren (Abb. 3-41a,b) führt. Diese Ergebnisse stützen sich ebenfalls auf PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von K-Pseudo-Molekülen (Daten nicht gezeigt).

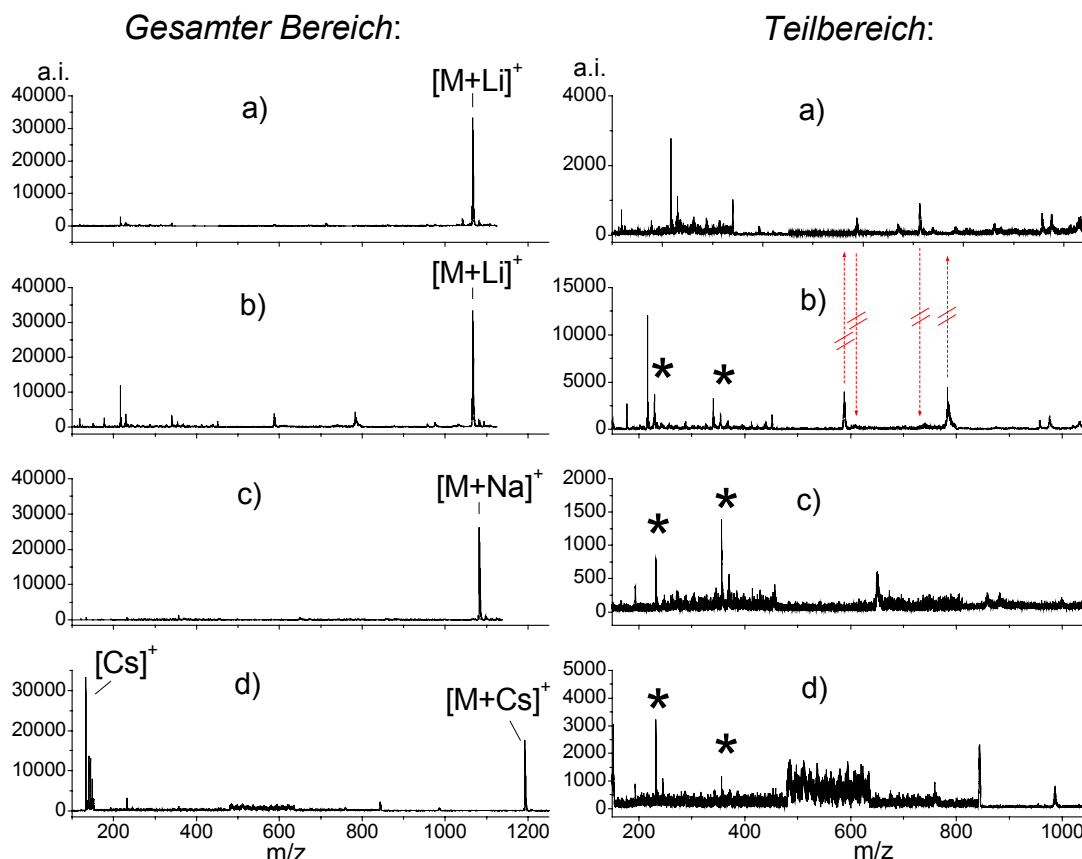


Abb. 3-41: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von PVP 7a in Abhängigkeit der Stoßaktivierung und Ionisation (* zeigt radikalkationische Ionisation an): a) AIBN-Stoßpartner und Li-Pseudo-Molekülion; b) Li-Pseudo-Molekülion; c) Na-Pseudo-Molekülion, d) Cs-Pseudo-Molekülion.

Da eine Veränderung im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum durch Zugabe von AIBN auf keine unterschiedlichen Pseudo-Molekülen zurückzuführen ist und identische gerätespezifische Einstellungen (z.B. elektronisches „Gate“) eine zufällige Selektion eines zusätzlichen Ions verhinderten, muss angenommen werden, dass ein veränderter Fragmentierungsmechanismus des Elternions durch die Anwesenheit von AIBN beim Li-Pseudo-Molekülion vorliegt.

Ein weiterer Einfluss von AIBN zeigt sich beim Cs-Pseudo-Molekülion in der Art (Daten nicht gezeigt), dass nur eine Cäsiumdissoziation gefunden wird. PVP ist als Neutralteilchen nicht mehr für

eine massenspektrometrische Detektion zugänglich. Dieser Unterschied (vgl. **Abb. 3-41**) wird auf die schwache Bindung zwischen dem relativ niedermolekularen PVP und dem großen Cäsiumkation zurückgeführt.

Der veränderte Fragmentierungsprozess beim Li-Pseudo-Molekülion kann aufgrund der anfänglich getesteten Proben grundsätzlich nicht auf die Ionisation (Pseudo-Molekülion bzw. Radikalkation) zurückgeführt werden, sondern muss an der Art des Analyten liegen. Der auffälligste Unterschied bei PVP **7a** zu den anderen untersuchten Analyten ist die heteroatomhaltige und sterisch anspruchsvollere Seitenkette. Es ist daher naheliegend, dass der veränderte Fragmentierungsprozess beim Einwirken des AIBN-Stoßgases auf eine unterschiedliche Fragmentierung an der Seitenkette von PVP zurückgeführt werden könnte. Eine Anlagerung des Radikalkations unter Ausbildung einer kovalenten Bindung kann dabei nicht völlig ausgeschlossen werden. Eine entsprechende Gasphasenreaktion ist bislang nicht literaturbekannt.

Der Fragmentierungsmechanismus konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden, da die Fragmente im konventionellen, AIBN-freien PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum von PVP **7a**, nicht eindeutig einer Struktur zugeordnet werden konnten. Der Fragmentierungsmechanismus von PVP ist auch nicht literaturbeschrieben geklärt. Jedoch konnte im Verlaufe dieser Untersuchungen eindeutig gezeigt werden, dass durch Einwirken von Isobutyronitrilradikalen die Effektivität des Stoßes, der zur Fragmentierung eines Analyten führt, und der Fragmentierungsprozess verändert werden.

3.2.2 Charakterisierung der Copolymerzusammensetzungen

3.2.2.1 Grundlagen

Die traditionelle Copolymercharakterisierung kann über Methodenkombinationen (z.B. Reaktivitätsverhältnisse, NMR-Spektroskopie) unter Berücksichtigung des Syntheseweges durchgeführt werden. Die Zahl der einsetzbaren Analysemethoden ist beschränkt und weisen Nachteile aufgrund der langen Vorbereitungs-, Mess- und Auswertzeiten auf. Dabei werden die gemittelten Eigenschaften der unterschiedlichen Kettenlängen des Polymers ermittelt. Aus diesen Gründen wird nach alternativen Analysemethoden gesucht. MALDI-TOF-MS liefert über die Bestimmung des Molekulargewichtes direkte Informationen zur Copolymerverteilung und -zusammensetzung, jedoch keine Aussagen über die Sequenzabfolge. Diese zusätzlichen Informationen sollten prinzipiell über die MALDI-TOF-Fragmentationanalytik zugänglich sein. Um grundlegende Aussagen über das Potential der MALDI-TOF-MS zur Analytik komplexer Copolymerzusammensetzungen treffen zu können, sollen an ausgewählten Beispielen Vorteile und Limitierungen erarbeitet werden.

3.2.2.2 Triblockcopolymerie

3.2.2.2.1 Theorie und analytisches Konzept

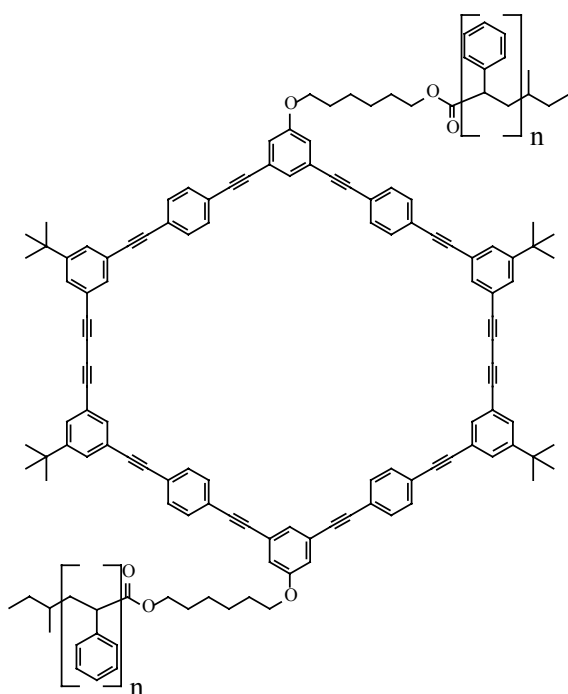
Der schematische Aufbau des symmetrischen Triblockcopolymeren **14** ist in **Abb. 3-42** dargestellt (Synthesen s. Kapitel 6.1.2, **Abb. 6-5**; S. 261)^{IX}, welcher sich prinzipiell aus einem rigiden Kern und zwei Polystyrol (PS)-Oligomeren **13** ergibt. Struktur **14a** trägt PS-Oligomere mit einem Molekulargewicht von 1.000 Da **13a**, Struktur **14b** PS-Oligomere mit einem Molekulargewicht von 1.500 Da **13b** und Struktur **14c** PS-Oligomere mit einem Molekulargewicht von 5.000 Da **13c**. Die Eigenschaften der Blockcopolymerie hängen in entscheidender Weise von der Länge der PS-Blöcke ab. So konnte gezeigt werden, dass sich bei PS-Blöcken mit einem Molekulargewicht 2.500 Da ein gänzlich anderes Material ergibt als bei PS-Blöcken mit einem Molekulargewicht 3.500 Da. Die exakte Bestimmung des Molekulargewichtes und die der Polymerverteilung ist daher von größter Bedeutung hinsichtlich eines besseren Verständnisses der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen dieser Materialien. Die Bestimmung des Molekulargewichtes ist prinzipiell durch die GPC-Untersuchungen möglich. Da **14** aus anionisch polymerisierten PS-Blöcken aufgebaut wird, welche sehr enge Polymerverteilungen zeigen, kann mit keiner gültigen Aussage über die Polymerverteilung mittels GPC-Untersuchungen gerechnet werden. Die Polydispersitäten der Blöcke und damit die der Blockcopolymerie liegen im Bereich der Diffusionsverbreiterung der GPC-Methode.

Die direkte Charakterisierung von Blockcopolymerzusammensetzungen kann üblicherweise durch die Bestimmung des Molekulargewichtes der einzelnen Blöcke durchgeführt werden. Dies sollte auch für das Triblockcopolymer **14** unter bestimmten Voraussetzungen und unter Berücksichtigung des Syntheseweges direkt möglich sein.

^{IX} Die Synthese wurde von Frau Dr. S. Rosselli im Rahmen ihrer Promotion unter Anleitung von PD S. Höger im AK Prof. G. Wegner am MPI für Polymerforschung, Mainz durchgeführt.

Die generelle Bestimmung der Copolymerzusammensetzung von polydispersen Block- und Sternpolymeren ist jedoch eine analytische Herausforderung. So kann beispielsweise bei „grafting-from“ durch die alleinige Bestimmung des Molekulargewichtes keine Aussage darüber getroffen werden, ob alle möglichen Dendronen gewachsen sind.

Um die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik auf ihr Potential zur Charakterisierung von Sternpolymerzusammensetzungen zu untersuchen, werden Untersuchungen an den wohldefinierten Triblockcopolymeren **14** (Abb. 3-42) durchgeführt, bei denen durch „grafting-onto“ endgruppenmodifiziertes Polystyrol über dessen Säurefunktion mit den beiden alkoholischen Seitengruppen des steifen zyklischen Kerngerüsts angeknüpft wurde. Das Triblockcopolymer **14** ist gezielt symmetrisch substituiert, da das Kerngerüst PS-Ketten mit identischem Molekulargewicht trägt.



14

14a: $M_W = 3.500$ Da

14b: $M_W = 4.500$ Da

14c: $M_W = 11.500$ Da

Abb. 3-42: Struktur des Sternpolymers **14**.

Zunächst sollen die Bedingungen und Erwartungen einer PSD-MALDI-TOF-Fragmentuntersuchung verdeutlicht werden. Um eine Aussage über die Copolymerzusammensetzung treffen zu können, muss der Fragmentbruch bevorzugt an entsprechend informativen Stellen (z.B. Esterfunktion) und nicht etwa am Ende der Oligomeren oder an Seitengruppen des Kerngerüsts erfolgen. Die dann zu erwartenden Fragmentenspektren dieser Verbindungen sind in **Abb. 3-43** skizziert. Bei einer Selektion eines Moleküliions aus der Polymerverteilung des Blockcopolymeren **14** sollten sich zwei Fragmentpolymerverteilungen ergeben, entsprechend den PS-Ketten mit und ohne Kern. Dies ist schematisch in **Abb. 3-43a** für das Elternion mit einem Molekulargewicht von 5.500 Da dargestellt. Die Fragmentpolymerverteilungen wären unter der Voraussetzung enger Polydispersitäten der Oligomere im Falle eines 2.000 Da PS-Oligomers und des

1.500 Da Kerngerüsts ausreichend voneinander getrennt. Durch zweifachen Bindungsbruch könnte prinzipiell auch das reine Kerngerüst bei 1.500 Da detektiert werden.

Um die mögliche Komplexität einer Blockcopolymerverteilung zu veranschaulichen, ist in **Abb. 3-43b** der unsymmetrisch substituierte Fall mit Polystyrol 1.000 Da und 3.000 Da bei einem 1.500 Da Kerngerüst skizziert. Dabei wären trotz enger Polymerverteilung der Oligomere schon teilweise überlappende Fragmentpolymerverteilungen zu erwarten.

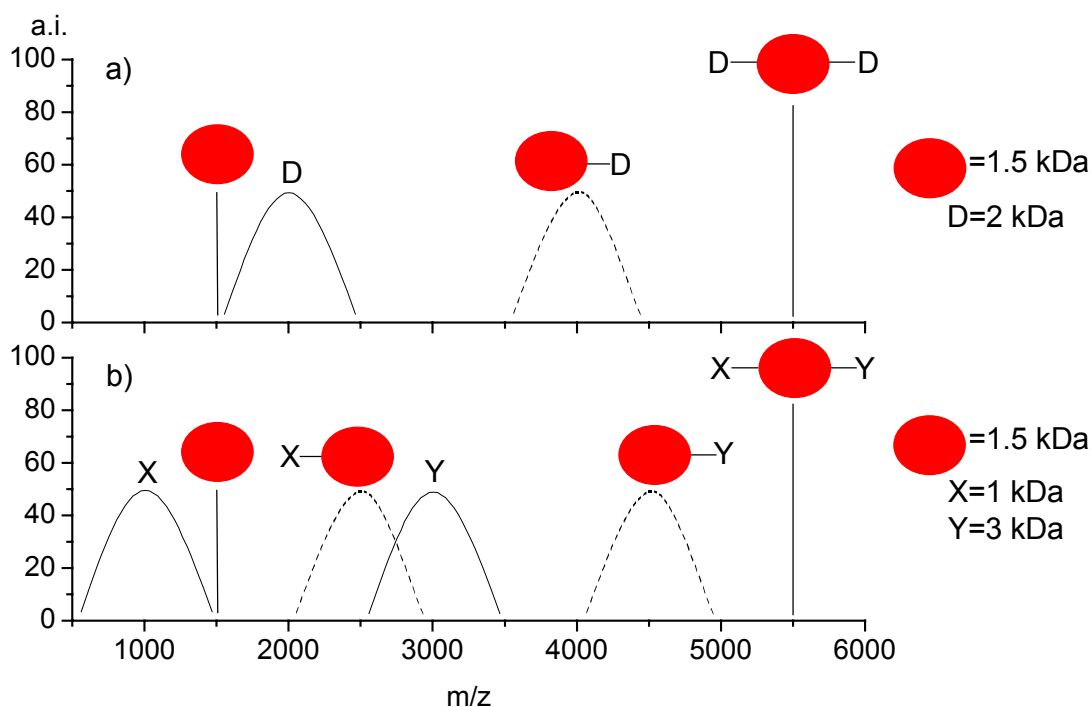


Abb. 3-43: Skizze eines PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrums eines Zwei-Dendronen-Sternpolymers, welches aus Dendronen mit engen Polymerverteilungen aufgebaut wurde: a) symmetrisch substituiertes Fall; b) unsymmetrisch substituiertes Fall.

3.2.2.2.2 Copolymercharakterisierung mittels MALDI-TOF-MS

Die Grundzüge und die Leistungsfähigkeit der MALDI-TOF-MS in der synthetischen Polymeranalytik sind beispielhaft für das Triblockcopolymer **14c** gezeigt. Dabei wurde Dithranol als Matrix verwendet und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$ als Kationisierungsmetallsalz zugesetzt. Die Messungen ergeben Massenspektren (**Abb. 3-44a**) mit guten Signalintensitäten und ein gutes Auflösungsvermögen. Das ermittelte Molekulargewicht von 11835 Da stimmt gut überein mit dem GPC ermittelten Wert von 14150 Da¹⁹¹. Dies steht im Einklang mit systematischen Untersuchungen mehrerer klassischer Polymere wie PS^{106,192,193}, Poly(ethylenglykol) (PEG)^{101,106,194}, Poly(methylmethacrylat) (PMMA)^{106,195} mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und die im Falle von engen Verteilungen eine gute Übereinstimmung mit den durch konventionelle Methoden erhaltenen Werten zeigen¹⁰⁵.

Die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse der MALDI-TOF-MS mit einer konventionellen Methode konnte hiermit auch für ein Triblockcopolymer gezeigt werden. Beim Vergleich der GPC-Werte (alle gegen PS gemessen) mit den echten Molekulargewichten aus den MALDI-TOF-

Massenspektren zeigt sich, dass von **14a** zu **14c** die Diskrepanz abnimmt. In **14a** ist der relative Anteil des starren Ringes an der Gesamtstruktur größer und führt bei der GPC-Untersuchung zu einem „scheinbaren“ höheren Molekulargewicht für das Blockcopolymer, da der Ring ein sehr hohen hydrodynamischen Radius hat im Vergleich zu PS. Bei **14c** wirkt sich der Einfluss der rigiden Struktur nur noch gering auf das gesamte hydrodynamische Volumen des Blockcopolymers aus. Die Werte stimmen gut mit der Kalibrierung gegen PS überein. Die Erkenntnis, dass der Triblockcopolymercharakter bei beiden Messmethoden keinen nennenswerten Einfluss ausübt, liegt auch hier vermutlich in der ausgesprochen geringen Polydispersität (GPC: 1.02) des Triblockcopolymers **14c** begründet. Inhomogenitäten bei der MALDI-Probenpräparation bleiben demnach aus.

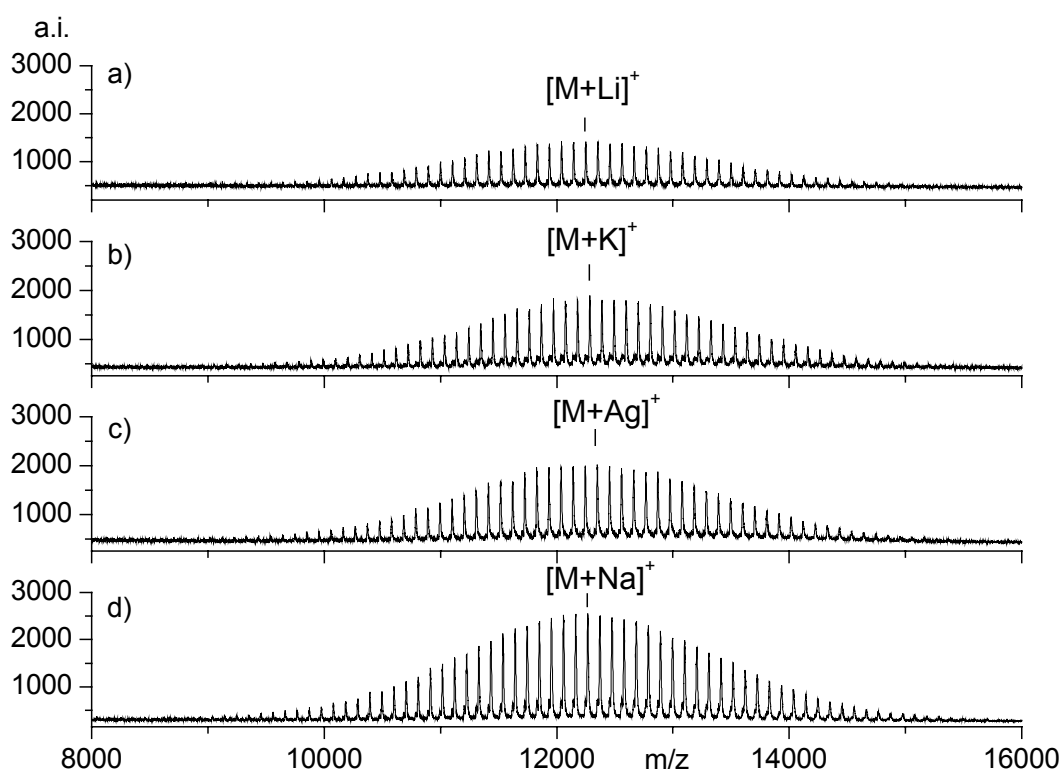


Abb. 3-44: MALDI-TOF-Massenspektren des Triblockcopolymers **14c** durch Variation der Metallsalz-Zugabe bei der Probenprobenpräparation: a) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$; b) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{K}$; c) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$; d) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$.

Die Auswertung der Massenspektren des Triblockcopolymers ermöglicht es, die genauen Massen der einzelnen Polymerketten innerhalb der Verteilung wiederzugeben, so dass die Wiederholungseinheit und folglich die Struktur sowie Endgruppen des Copolymers **14c** indirekt ermittelbar sind: der Abstand der Signale der einzelnen Kettenlängen untereinander beträgt 104 Da und gibt das Molekulargewicht der PS-Wiederholungseinheit wieder. Die absolute Masse einer jeden detektierten Kettenlänge setzt sich aus der Masse aller Wiederholungseinheiten, der beiden *sec*-Bu-

Endgruppen und der für die Ionisation verwendeten Masse des Lithiumkations zusammen. Die theoretische absolute Masse einer Polymerkette lässt sich mittels **Gleichung 3-1** berechnen. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht stimmt dabei mit dem experimentell ermittelten exakt überein. Damit werden die von der Synthese zu erwartenden *sec*-Bu-Endgruppen der PS-Blöcke von **13c** eindeutig bestätigt.

$$M[\text{g/mol}] = n \cdot 104,15 + 2 \cdot 57,12 + 1505,99 + 6,94 \quad \text{Gleichung 3-1}$$

n	Anzahl der PS-Wiederholungseinheiten
104,15	Isotopengemittelttes Molekulargewicht der Wiederholungseinheit von PS
57,12	Isotopengemittelttes Molekulargewicht der Endgruppen
1505,99	Isotopengemittelttes Molekulargewicht des Kernblocks
6,94	Isotopengemittelttes Atomgewicht des Lithiumkations

Für das Triblockcopolymer **14c** wurde zusätzlich jeweils ein Massenspektrum der Analyt-Matrix-Mischung aufgenommen, bei der statt Lithium- auch Natrium-, Kalium- bzw. Silbertrifluoracetat zugesetzt wurde. Zwischen der gemessenen und der theoretisch berechneten Masse einer Polymerkette trat jeweils eine Massendifferenz auf, die der Massendifferenz der zugesetzten Metallionen entspricht. Dadurch konnte der Ionisierungsmechanismus des untersuchten Triblockcopolymeren **14c** gezeigt werden: Der Zusatz der verwendeten Metalltrifluoracetatsalze zur Analyt-Matrix-Mischung ermöglicht die Desorption, Ionisation und Detektion eines Pseudo-Molekülions, welches sich aus dem zugesetzten Kation und einer intakten Polymerkette bildet. Da Silberkationen zu einer effektiven Kationisierung von PS-Homopolymeren führen¹⁹⁶, Alkalimetallkationen jedoch bevorzugt mit Heteroatomen¹⁸⁵ wechselwirken, kann anhand der Signalintensitäten der Massenspektren die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Bildung von Pseudo-Molekülionen zwischen Heteroatomen am Kern (Estergruppen) und Alkalimetallkationen, insbesondere denen des Natriumkations, effektiver verläuft als die der PS-Dendronen mittels Silberkationen.

Die MALDI-Methode ist, wie anhand des Triblockcopolymerensystems **14c** u.a. wegen der präzisen Endgruppenbestimmung gezeigt werden konnte, eine wertvolle und notwendige Ergänzung zu etablierten Methoden der Polymeranalytik. Im Folgenden soll an diesem wohldefinierten Triblockcopolymer die MALDI-TOF-Fragmentenanalyse zur Charakterisierung der Copolymerzusammensetzung überprüft werden.

3.2.2.2.3 Fragmentenanalyse eines Triblockcopolymeren

Die Leistungsfähigkeit der MALDI-TOF-Fragmentenanalytik zur Copolymercharakterisierung wurde an den Triblockcopolymeren **14a-c** überprüft, welches als einfache Modellsysteme eines Sternpolymeren angesehen werden können. In **Abb. 3-45** sind die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von **14a** und **14b** und die zugehörigen MALDI-TOF-Massenspektren der PS-Oligomere ($M_w \sim 1.000$ Da) **13a** und ($M_w \sim 1.500$ Da) **13b** dargestellt, welche jeweils durch Ag-Pseudo-Molekülionen der Analyten erhalten wurden. Fragmentspektren konnten ebenfalls für Li-Pseudo-Molekülionen von **14a** erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Sie sind jedoch von geringerer

Qualität. Dies steht im Einklang mit der Ionisation von **14c** (Abb. 3-44), die bei den konventionellen MALDI-TOF-Massenspektren festgestellt wurde. Mit zunehmender Größe des Alkalimetalls kann kein Fragmentspektrum mehr von **14a** erhalten werden. Eine verstärkte Abdissoziation des Kations von der PS-Kette tritt auf. Die folgenden Untersuchungen stützen sich daher auf Ag-Pseudo-Molekülonen der Analyten.

Um einen direkten Vergleich zu erhalten, ist das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum von **14a** (Abb. 3-45a) dem MALDI-TOF-Massenspektrum des PS-Oligomeren 1.000 Da **13a** (Abb. 3-45b) gegenübergestellt, welches an das Kerngerüst angeknüpft wurde. Im Fragmentspektrum werden, wie in Abb. 3-43 skizziert, beide PS-Oligomerenverteilungen als Ag-Pseudo-Molekülonen detektiert, die der PS-Oligomerfragmentstruktur mit und ohne Kerngerüst entsprechen. Das zweifache Fragmentation, welches zum reinen Kerngerüst führen würde, wird nicht detektiert. Die nachteiligen, stufenförmigen Versetzungen in den beiden Polymerverteilungen im erhaltenen PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum werden durch den der MALDI-TOF-Fragmentationanalyse zugrundeliegenden Segmentaufbau (Kapitel 2.2.2, S. 26) verursacht. Die Fragmentpolymerverteilung des PS-Oligomers ohne Kern steht in hoher Übereinstimmung mit der Polymerverteilung des PS-Oligomers **13a**.

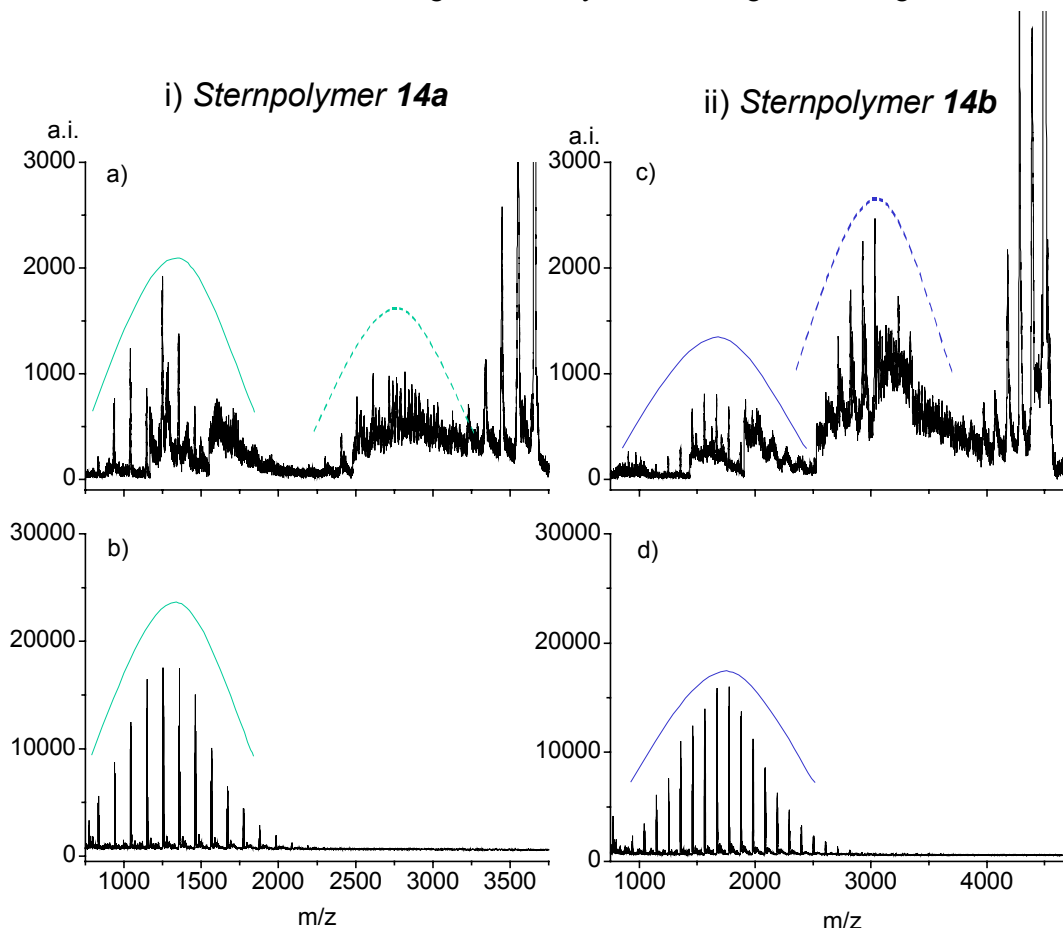


Abb. 3-45: Massenspektren des Ag-Pseudo-Molekülonen: i) Blockcopolymer **14a**: a) PSD-MALDI-TOF-Fragmentationanalyse, b) MALDI-TOF-MS des PS-Oligomers **13a**; ii) Blockcopolymer **14b**: c) PSD-MALDI-TOF-Fragmentationanalyse, d) MALDI-TOF-MS des PS-Oligomers **13b**.

Der Vergleich der Ergebnisse der MALDI-TOF-MS des PS-Oligomers ($M_w \sim 1.500$ Da) **13b** (**Abb. 3-45d**) mit der MALDI-TOF-Fragmentationsanalyse des Blockcopolymers **14b** (**Abb. 3-45c**) zeigt ein analoges Ergebnis. Damit ist die Eignung dieses analytischen Ansatzes zur Oligomerlängenbestimmung dieses Blockcopolymers gezeigt.

Bei den Fragmentationsuntersuchungen des Blockcopolymers **14c** wird nur ein sehr breites, unaufgelöstes Signal im hohen Molekulargewichtsbereich detektiert (Daten nicht gezeigt), welches vermutlich einem PS-Oligomer mit Kern entspricht. Durch dieses Ergebnis wird die Beschränkung durch das Molekulargewicht des Analyten nachgewiesen.

Eine nicht zu vernachlässigende, messtechnische Limitierung ist das zugrundeliegende Messprinzip der MALDI-TOF-Fragmentationsanalytik, die ein PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum aus 15 Einzelsegmenten aufbaut. Die daraus resultierenden stufenförmigen Versetzungen wirken sich nachteilig auf die Polymerverteilung des Gesamtfragmentspektrums (**Abb. 3-45a,c**) aus. Die neue Messtechnik LIFT-MALDI-TOF-Fragmentationsanalytik, eine Geräteweiterentwicklung der PSD- und CID-MALDI-TOF-Fragmentationsanalytik, sollte evaluiert werden. LIFT-Testmessungen^x bestätigten die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Durch geeignete messtechnische Modifikationen des Gerätes wird ein Fragmentspektrum aufgenommen, bei dem der komplette Fragmentationsbereich auf einmal abgedeckt wird. Die Qualität der Fragmentmassenspektren wird durch das nicht segmentartige Messprinzip von LIFT-MALDI-TOF-Fragmentationsanalytik in der Art verbessert, dass die Fragmentpolymerverteilungen ohne stufenförmige Versetzungen abgebildet werden. Die LIFT-Fragmentationsanalytik bietet damit den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit innerhalb eines Fragmentspektrums. Die LIFT-Fragmentationsanalyse erlaubt im Folgenden die Fragmentationsanalyse von Triblockcopolymer **14c** durchzuführen, bei der die PSD-MALDI-TOF-Fragmentationsanalyse zuvor scheiterte (Daten nicht gezeigt).

Dennoch konnte an diesem Modell eines einfachen Triblockcopolymers mit zwei symmetrischen Oligomerverteilungen gezeigt werden, dass die PSD-MALDI-TOF-Fragmentationsanalyse geeignet ist, einzelne Oligomerenlängen zu bestimmen, da die Fragmentierung bevorzugt an der Esterfunktion des Blockcopolymers eintritt und somit zu Fragmentpolymerverteilungen führt, die für das Substitutionsmuster charakteristisch sind.

^x Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn *Dr. F.-J. Mayer-Posner*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen.

3.2.2.3 Statistische Copolymere aus den Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure

3.2.2.3.1 Theorie und analytisches Konzept

Zur direkten Bestimmung der Copolymerzusammensetzung eines statistischen Peptides wurden synthetische Peptide, aufgebaut aus den Aminosäuren Lysin (Lys) und Glutaminsäure (Glu) (Synthesen s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-6**; S. 262)^{XI}, verwendet (**Abb. 3-46**).

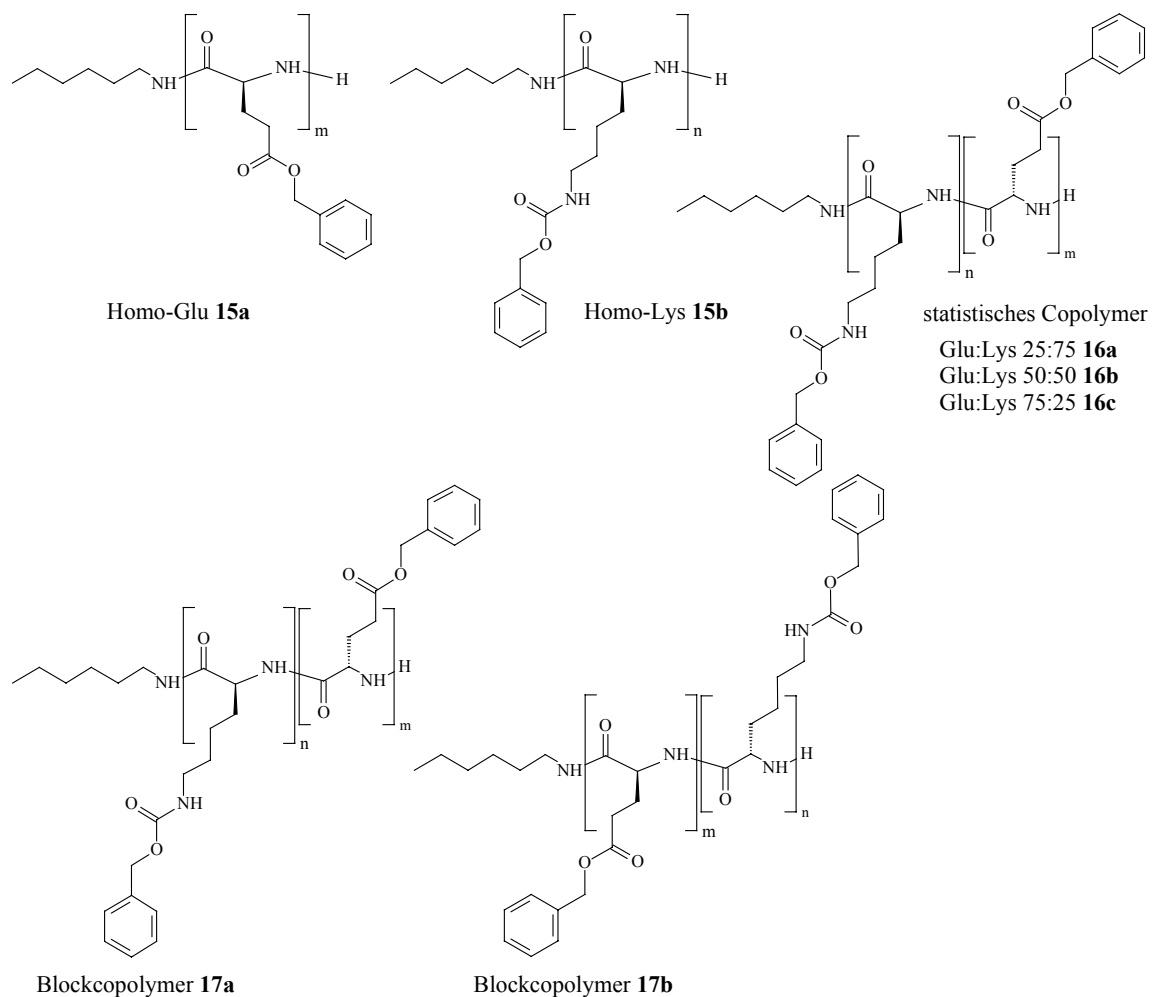


Abb. 3-46: Strukturen der untersuchten synthetischen Peptide.

Ein statistisches Copolymer kann nur dann synthetisiert werden, wenn die zugrundeliegenden Monomerbausteine annähernd gleiche chemische Reaktivitäten aufweisen. Dies kann für die Aminosäuren Glu und Lys angenommen werden. Durch das Vorhandensein der Seitengruppen der beiden Aminosäuren in geschützter Form wird eine ausreichend hohe Massendifferenz gewährleistet, um eine MS-Selektion des gewünschten Elternions im Copolymer für eine erfolgreiche

^{XI} Die Synthese wurde von *Dr. H.-A. Klok* im Rahmen seiner Habilitation im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

Fragmentionenanalyse durchführen zu können. Durch die Seitenschutzgruppen ergibt sich für CBZ-Lys eine Wiederholungseinheit von 262 Da, im Vergleich zu 128 Da, und für Bn-Glu von 219 Da statt 129 Da. Die sich daraus ergebende Massendifferenz von 43 Da anstatt von einem Dalton ist damit für eine erfolgreiche massenspektrometrische Selektion des Elternions bei der PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik zugänglich (Kapitel 2.2.2, S. 26). Diese Copolymere zeigen charakteristische Strukturelemente von natürlichen Peptiden und industriellen Polymeren:

- Aminosäurebausteine,
- keine vorgegebene Primärstruktur,
- polydispers und
- geschützte Seitenschutzgruppen.

Das analytische Konzept stützt sich dabei wie in **Abb. 3-47** skizziert auf die geeignete Kombination von Synthese, Wahrscheinlichkeitstheorie und Massenspektrometrie. Unter Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeitstheorie (s. Anhang 7, S. 287) können theoretische Ansätze zur Charakterisierung einer statistischen Copolymeranalytik erarbeitet werden, um diese in der Praxis mit MALDI-TOF-MS zu vergleichen. Zur Charakterisierung der synthetisierten Peptide könnte sich MALDI-TOF-MS für die Aufklärung der Copolymerzusammensetzung und MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik für die Sequenzanalyse dieser statistischen Peptide eignen.

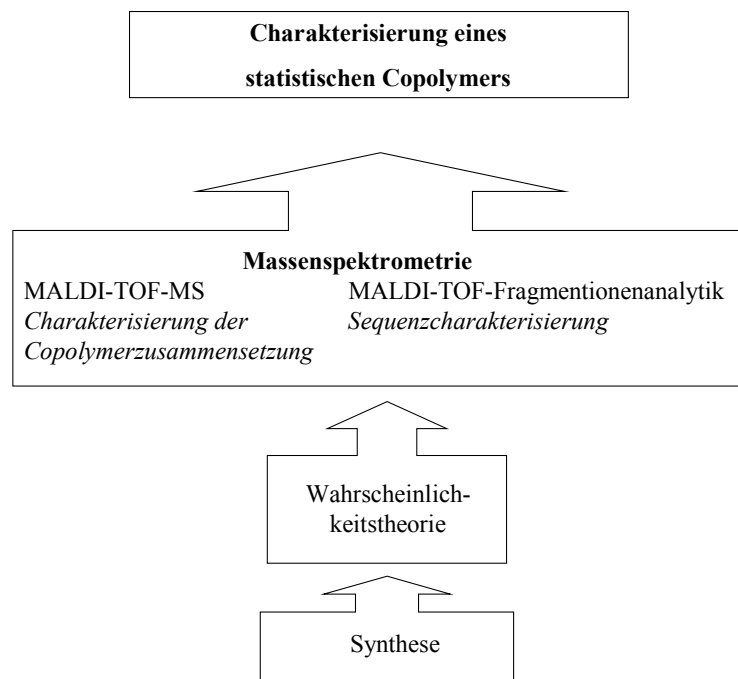


Abb. 3-47: Analytisches Konzept zur massenspektrometrischen Charakterisierung der Zusammensetzung und der Sequenz eines statistischen Copolymers mittels MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik.

3.2.2.3.2 Fragmentationenanalyse der Homopeptide

Seitengruppengeschützte Aminosäuren sind wegen der geforderten Massendifferenzen der Copolymerzusammensetzung eine unumgängliche Voraussetzung für diese Untersuchungen (Kapitel 3.2.2.3.1, S. 104). Solche Peptide sind aufgrund ihrer Hydrophobizität und erhöhten Fragmentierungstendenz¹⁹⁷ recht schwierig mittels MALDI-TOF-MS zu charakterisieren. Um eindeutige Aussagen hinsichtlich der Zusammensetzung der Copolymere treffen zu können, werden unter Berücksichtigung geeigneter Probenpräparationsbedingungen zunächst beide Homopolymere **15a,b** einer PSD-MALDI-TOF-Fragmentationenanalyse unterzogen, um anschließend Vorhersagen zum Fragmentierungsverhalten der Copolymere treffen zu können. Dabei soll sich die Interpretation auf möglichst dominante Fragmentbrüche beschränken, die Aussagen über die Polymersequenz ermöglichen. In **Abb. 3-48** sind die möglichen Fragmentierungsbrüche des Peptidrückgrates der beiden Homopolymere zusammengestellt.

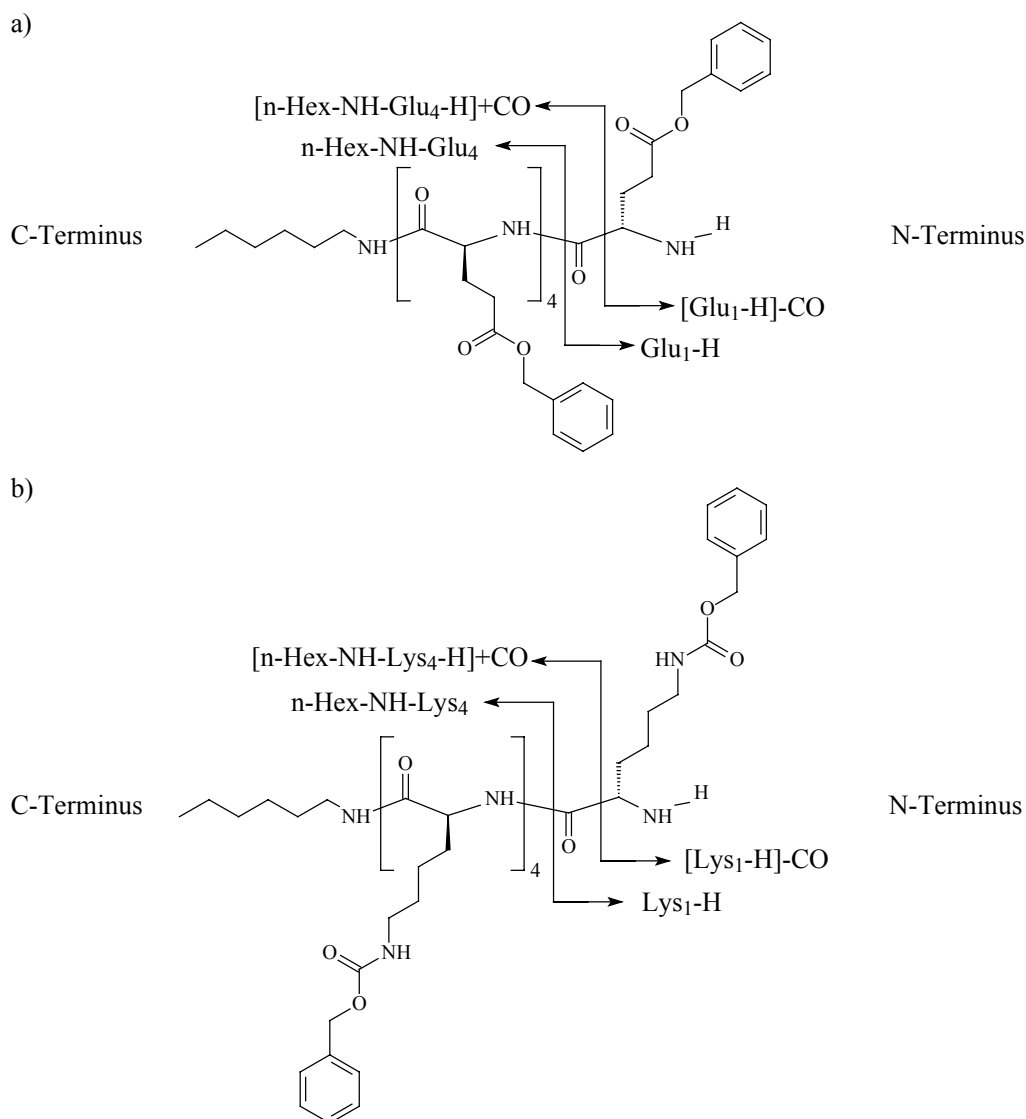


Abb. 3-48: Mögliche Fragmentbrüche des Peptidrückgrates der Homopolymere: a) Homo-Glu **15a**; b) Homo-Lys **15b**.

In **Abb. 3-49** wird das Fragmentspektrum vom protonierten Homopentamer-Glu **15a** diskutiert. Die intensivsten Signale können den Brüchen des Peptidrückgrates, die zum dimeren, trimeren und tetrameren N-terminalen Fragment führen, zugeordnet werden. Die C-terminalen Fragmente werden nicht detektiert, da die Protonierung des geschützten Peptides bevorzugt an der freien Aminogruppe des N-Terminus erfolgt, wodurch bei der Fragmentierung folglich das N-terminale Fragment die Ladung trägt. Das C-terminale Fragment wird als Neutralteilchen gebildet und damit nicht im Fragmentspektrum detektiert.

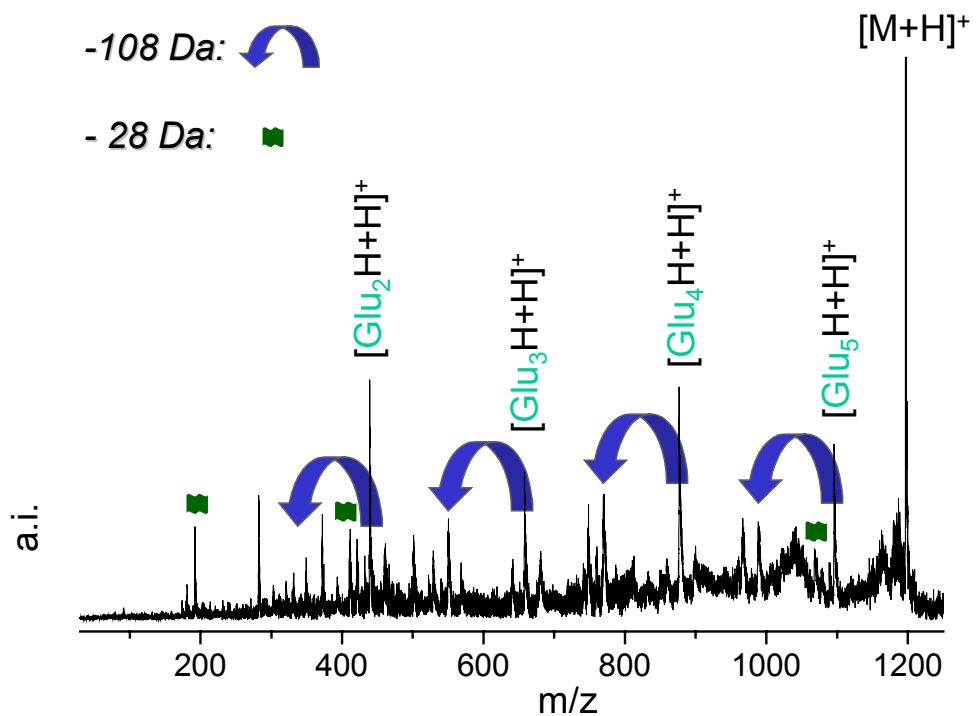


Abb. 3-49: PSD-MALDI-TOF-Fragmentationanalyse des Glu-Pentamers **15a**.

Zusätzlich wird eine Kaskade von Signalen mit geringer Signalintensität gefunden, die einer Fragmentierung der Seitengruppe zugeordnet werden kann. Die Spaltung des γ -Benzylesters durch die primäre Aminogruppe des N-Terminus führt zur Freisetzung von Benzylalkohol (C_7H_7OH , 108 Da). Der Mechanismus der Aminolyse ist in **Abb. 3-50i,a** dargestellt.

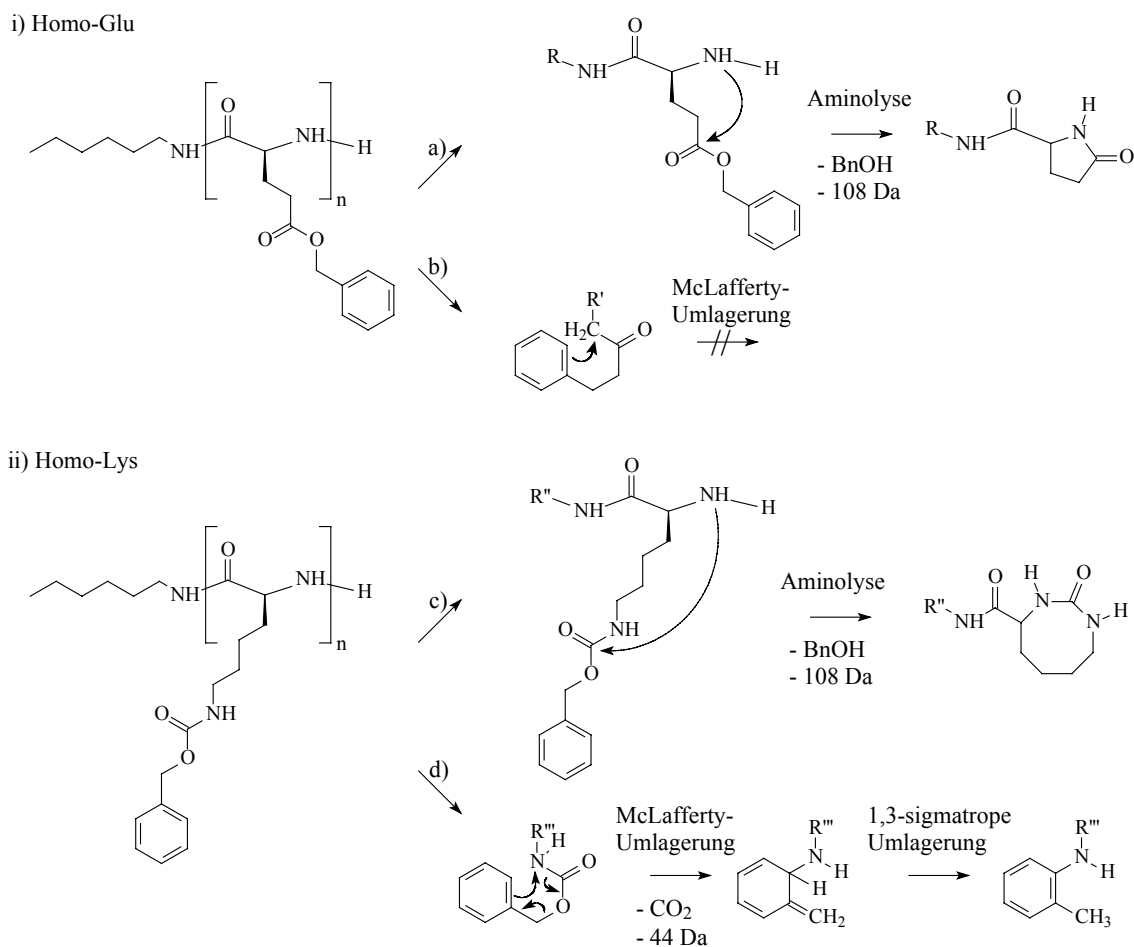


Abb. 3-50: Interpretation der Seitenkettenfragmentierungen der Homopolymere: i) Homo-Glu **15a**: a) Aminolyse der Bn-Schutzgruppe, b) Blockierte McLafferty-Umlagerung; ii) Homo-Lys **15b**: a) Aminolyse der CBZ-Schutzgruppe, b) McLafferty-Umlagerung der Z-Schutzgruppe unter Abspaltung von CO_2 und anschließende 1,3-sigmatrope Umlagerung zur Strukturstabilisierung des Fragmentes.

Analoge Fragmentuntersuchungen werden am Homo-Lys **15b** durchgeführt. In **Abb. 3-51** ist das Fragmentspektrum vom Homo-Lys dargestellt, bei dem ebenfalls das protonierte Pentamer selektiert und zur Fragmentierung gebracht wird. Die Brüche des Peptidrückgrates, die zum dimeren, trimeren und tetrameren N-terminalen Fragment führen, werden mit hohen Signalintensitäten gebildet.

Die C-terminalen Fragmente werden mit geringen Signalintensitäten gefunden. Dieses Ergebnis ist konträr zum PSD-Ergebnis des Glu-Pentamers **15a**. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Stickstoff der Lys-Seitengruppe im Elternmolekül in geringem Maße konkurrierend zum N-Terminus ebenfalls protoniert wird. Bei der Fragmentierung werden so ebenfalls protonierte C-terminale Fragmente gebildet und können damit in der PSD-MALDI-TOF-Analyse erfasst werden.

Die intensivsten Signale werden von einer Kaskade von -44 Da Massendifferenzen gebildet. Diese bevorzugte Fragmentierung wird einer CO_2 -Abspaltung zugeordnet. Der zugrundeliegende Mechanismus der McLafferty-Umlagerung an der CBZ-Schutzgruppe unter Abspaltung von CO_2 und

anschließender 1,3-sigmatropen Umlagerung ist in **Abb. 3-50ii,b** dargestellt. Das hierbei gebildete Fragmentation mit Verlust von CO₂ [-44 Da] wird im Folgenden als [CBZ-Lys] -44 Da bezeichnet.

Eine weitere Seitenkettenfragmentierung wird analog der Homo-Glu-Fragmentuntersuchungen als Aminolyse am Carbamatsubstituenten durch das primäre N-terminale Amin unter Ausbildung einer zyklischen Harnstoffgruppe und unter Abspaltung von Benzylalkohol (C₇H₇OH) mit -108 Da gefunden. Der zugrunde liegende Mechanismus ist in **Abb. 3-50ii,a** schematisch dargestellt.

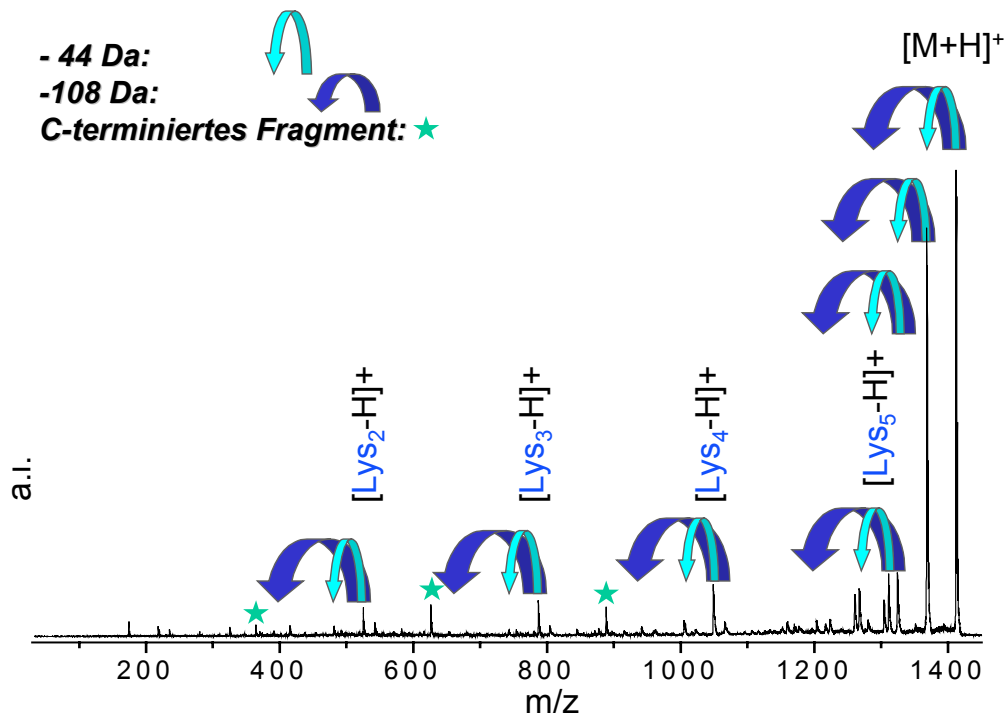


Abb. 3-51: Fragmentionenanalyse des Lys-Pentamers **15b**.

Aufgrund der Intensität der Signale, die durch CO₂-Abspaltung gebildet werden, müssen eingehendere Untersuchungen zu dessen Auswirkungen auf das konventionelle MALDI-TOF-Massenspektrum durchgeführt werden. In **Abb. 3-52** ist der Teilbereich des MALDI-TOF-Massenspektrums des Pentamers-Lys abgebildet. Die Signalintensität und die Auflösung des protonierten Elternions sowie die Basislinie und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis sind gut, so dass zu harsche Desorptionsbedingungen ausgeschlossen werden können. Es treten allerdings zusätzlich zwei relativ intensive Signale auf. Durch Vergleichsmessungen von Linear- und Reflektor-MALDI-TOF-MS-Analysen (Kapitel 2.1.4, S. 22) und unter Berücksichtigung der PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse können diese Signale eindeutig einer CO₂-Abspaltung als ISD- und PSD-MALDI-TOF-Fragmentierung zugeordnet werden. Damit wird die Labilität dieser Systeme bei der MALDI-TOF-MS-Analyse deutlich.

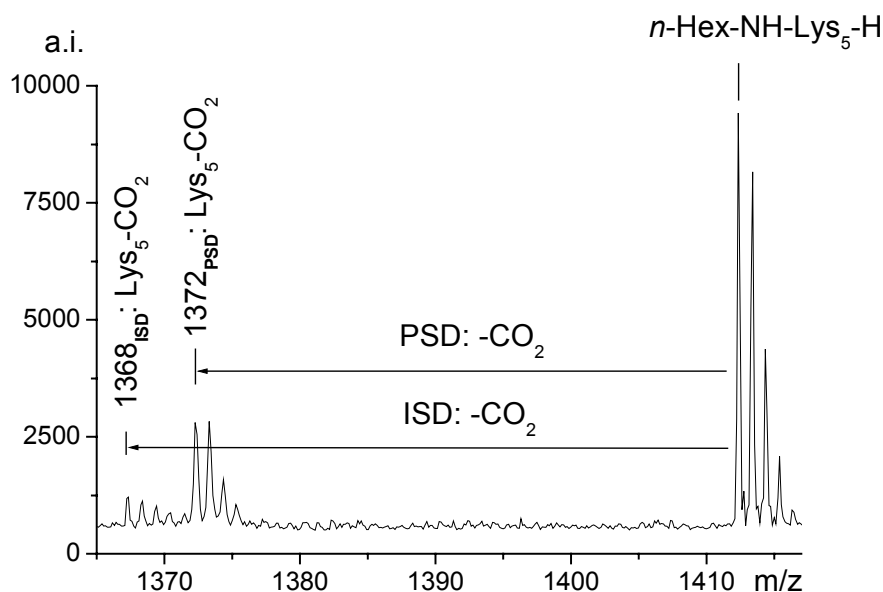


Abb. 3-52: Evaluierung des Beitrages der PSD- und ISD- CO_2 -Abspaltung durch Z-Umlagerung der Lys-Aminosäure auf das Reflektrom-MALDI-TOF-Massenspektrum des protonierten Lys-Pentamers **15b**.

Die Wiederholungseinheiten von Bn-Glu mit 219 Da und die des ISD- CO_2 -Fragmentes von [CBZ-Lys] -44 Da mit 218 Da besitzen nur eine Massendifferenz von einem Dalton (**Tabelle 3-1**). Dies hat möglicherweise erhebliche Auswirkungen auf die Fragmentionenanalyse der Copolymere, da bei der Selektion z.B. eines n -Hex-NH-Lys₄-st-Glu₁-H mit 1369 Da unvermeidbar das ISD-Fragmentation [n -Hex-NH-Lys₅-H] -44 Da mit 1368 Da mitselektiert wird.

Das analoge PSD-Fragmentation der -44 Da-Abspaltung trägt die Beschleunigungsspannung des Elternions und wird erst durch das Durchlaufen des Reflektrons separat sichtbar (Kapitel 2.2.1, S. 24). Dies führt dazu, dass das ISD -44 Da-Fragmentation im Gegensatz zum PSD -44 Da-Fragmentation bei der Selektion des Elternions zur PSD-MALDI-TOF-Fragmentuntersuchung mittels elektronischem „Gate“ entfernt wird (Kapitel 2.2.2, S. 26) und somit keinen Beitrag liefert.

Tabelle 3-1: Die Konsequenz der PSD -44 Da- und ISD -44 Da-Abspaltung durch Z-Umlagerung der Lys-Aminosäure auf MALDI-TOF-MS-Untersuchungen statistischer Peptide, welche aus Gly- und Lys-Bausteinen aufgebaut sind.

<i>AA bzw. AA-Fragmente</i>	<i>Wiederholungseinheit (in Da)</i>	<i>Vergleich von verschiedenen Copolymerzusammensetzungen und ihrer geringen Molekulargewichtsdifferenzen (in Da)</i>
Bn-Glu	219	[n -Hex-NH-Lys ₅ -H] -44 Da 1368
[CBZ-Lys] -44 Da	218	n -Hex-NH-Lys ₄ -st-Glu ₁ -H 1369

In **Abb. 3-53** ist zur Veranschaulichung des Sachverhaltes ein Teilbereich eines Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrums eines Copolymers dargestellt. Die drei Pentamere sind jeweils isotopenaufgelöst. Das $\text{Lys}_5\text{-st-Glu}_0$ ist dabei das Peptid mit dem größten Molekulargewicht und zeigt als einziges Signal die zu erwartende Isotopenverteilung. Die Verteilung der Copolymerzusammensetzung $\text{Lys}_4\text{-st-Glu}_1$ ist bedingt durch eine Signalüberlagerung nicht mehr eindeutig, wobei der Anteil durch das ISD-CO_2 -Fragment nur in Ansätzen erkennbar ist. Betrachtet man $\text{Lys}_3\text{-st-Glu}_2$ so wird das Ausmaß der CO_2 -Fragmentierung deutlich, da die Isotopenverteilung nun sowohl vom ISD- , als auch vom PSD-Zerfall von $\text{Lys}_4\text{-st-Glu}_1$ überlagert ist. Ein Beitrag durch eine zweifache CO_2 -Abspaltung des $\text{Lys}_5\text{-st-Glu}_0$ (**Abb. 3-51**) ist ebenfalls nicht auszuschließen.

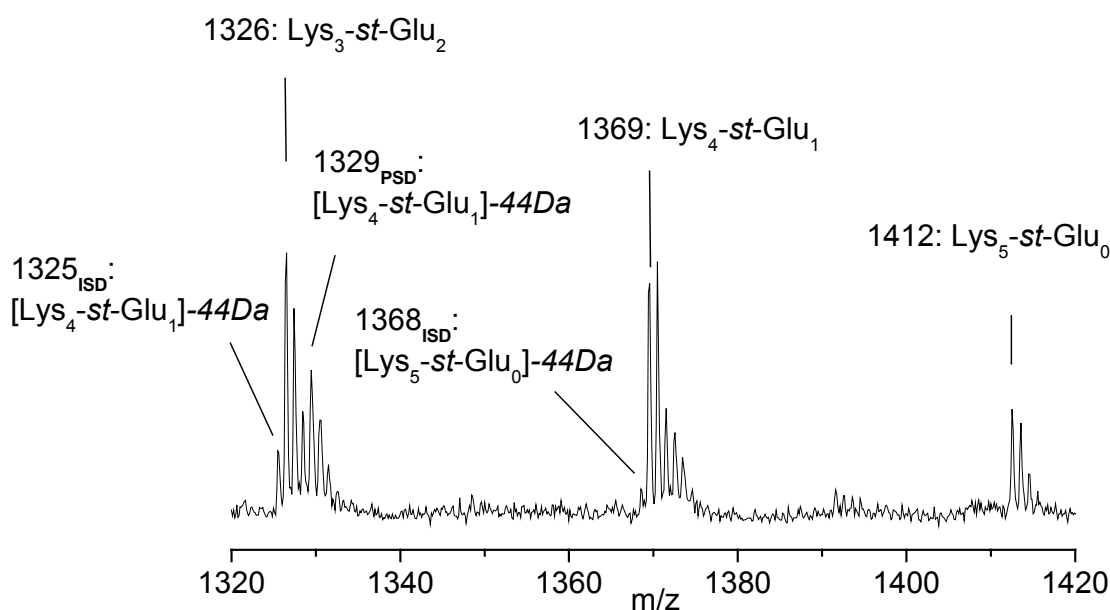


Abb. 3-53: Evaluierung des Beitrages der PSD-44 Da- und ISD-44 Da- Abspaltung durch Z-Umlagerung der Lys-Aminosäure auf das MALDI-TOF-Massenspektrum der statistisch polymerisierten Peptide aus Gly- und Lys-Bausteinen.

Um mögliche Auswirkungen der ISD-CO_2 -Fragmentierung eingehender zu untersuchen, wird $\text{PSD-MALDI-TOF-Fragmentation}$ an entsprechenden Homo- und Copolymeren durchgeführt. Die erhaltenen $\text{PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren}$ sind in **Abb. 3-54** gegenübergestellt.

Zunächst wird in **Abb. 3-54a** das Fragmentierungsverhalten von statistisch polymerisiertem Peptid untersucht. Dabei ist das konventionelle $\text{MALDI-TOF-Massenspektrum}$ (Ausschnittsbereich) abgebildet, das Signale zeigt, die zu einem gewissen Anteil mit ISD- und PSD-Fragmenten der CO_2 -Abspaltung überlagert sind. Im Folgenden wird bewusst für die $\text{PSD-MALDI-TOF-Fragmentation}$ die gewünschte Lys_4Glu_1 selektiert, und damit als Konsequenz ebenfalls Anteile des $\text{ISD-Fragmentations}$ $[\text{Lys}_5\text{-44 Da}]$. Das dabei erhaltene $\text{PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum}$ zeigt intensive, sequenzspezifische Fragmentensignale über das gesamte Fragmentmassenspektrum.

In **Abb. 3-54b** ist das konventionelle MALDI-TOF-Massenspektrum (Ausschnittsbereich) des Homopentamer-Lys abgebildet, welches ISD- und PSD-Fragmente der CO_2 -Abspaltung zeigt. Das ISD-Fragment kann hierbei für die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse separat selektiert werden. Das dabei erhaltene PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des ISD-Fragmentes zeigt intensive PSD-Fragmentsignale im niederen Massenbereich. Weiter wird im Bereich des Elternions eine Kaskade an CO_2 -Fragmenten gefunden und unterstreicht damit die große Labilität dieser Seitenschutzgruppen. Im mittleren, sequenzspezifischen Bereich treten nur Signale mit geringer Intensität auf. Im wesentlichen zeichnet sich dieser mittlere Fragmentmassenbereich durch ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus.

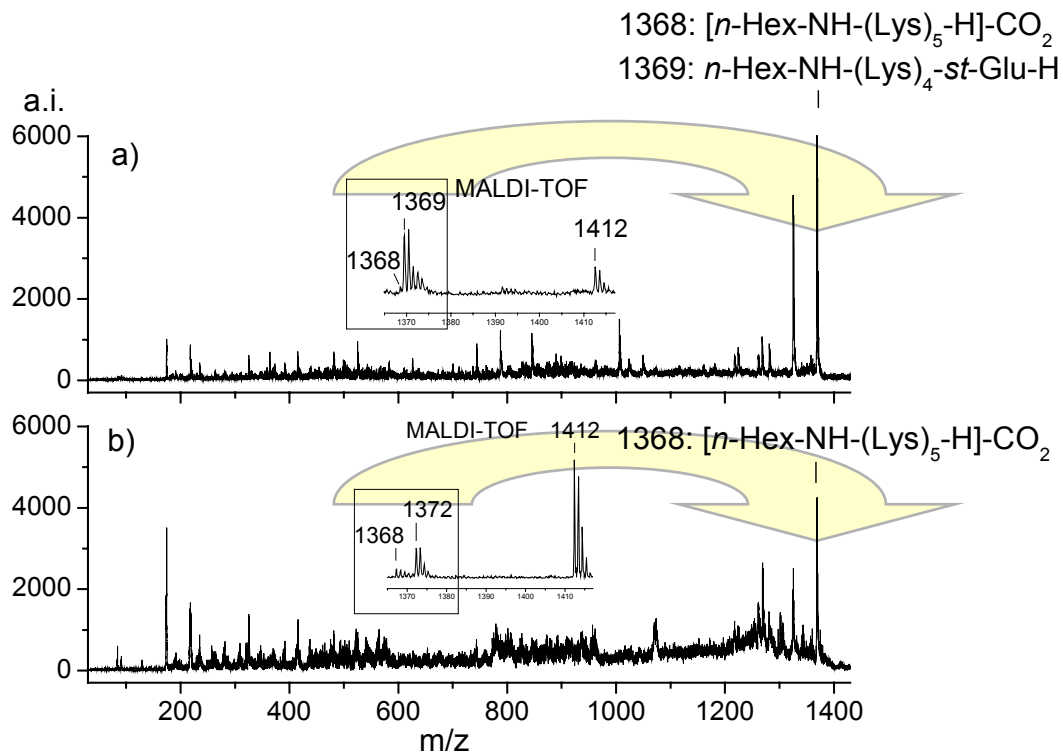


Abb. 3-54: Evaluierung der ISD-Fragmentierung durch Z-Umlagerung der Lys-Aminosäure auf die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik der statistisch polymerisierten Peptide aus Gly und Lys: a) Peptid nach statistischer Polymerisation: PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik des $\text{Lys}_4\text{-st-Glu}$ Pentamers mit m/z 1369 und des ISD-Fragmentes des Lys-Pentamers mit m/z 1368; Ausschnittsbereich: MALDI-TOF-Massenspektrum; b) Homo-Lys: PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik des reinen ISD-Fragmentes des Lys-Pentamers mit m/z 1368; Ausschnittsbereich: MALDI-TOF-Massenspektrum.

Um den Beitrag des ISD- CO_2 -Fragmentes gering zu halten und um eine möglichst eindeutige Copolymercharakterisierung der Peptide durchführen zu können, wird die nachweislich schonende lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS-Probenpräparation (Kapitel 3.1.2, S. 30) für deren Charakterisierung evaluiert.

Bei den lösungsmittelfreien MALDI-TOF-Massenspektren werden die unterschiedlich langen Ketten des Peptides **15b** jeweils als Na-Pseudo-Molekülonen detektiert. Auffällig sind dabei die

hohen Signalintensitäten. Die Evaluierung der Isotopenverteilungen zeigt eine gute Übereinstimmung mit der simulierten Isotopenverteilung. Dadurch kann angenommen werden, dass die sonst intensive CO₂-Fragmentierung effektiv unterdrückt wird.

Dies wird im Folgenden durch die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse von **15b** bestätigt, bei der nur geringfügig PSD-Fragmentsignale auftreten (Daten nicht gezeigt). Jedoch verläuft die Stabilisierung dieses Moleküls so effektiv, dass die sequenzspezifische Fragmentierung ebenfalls stark unterdrückt wird.

Diese ausgeprägte Stabilisierung wird auf die Ausbildung der Pseudo-Moleküllenstruktur zurückgeführt, in dem der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation unterschiedliche Mengen an Natriumtrifluoracetat zugesetzt wurden. Mit steigender Konzentration an Metalltrifluoracetatsalz wird die Bildung des Na-Pseudo-Moleküls erhöht und damit effektiv die Protonierung des Moleküls unterdrückt. Mit fallender Protonierungstendenz sinkt der Anteil der Fragmentierung. Umgekehrt kann gezeigt werden, dass je mehr Protonen zugegen sind, in dem das Peptid in 0,1 % TFA gelöst wird, bzw. je „heißer“ die Matrix ist (z.B. HCCA, Kapitel 2.1.1)¹²³, die Fragmentierung stark erhöht wird (Daten nicht gezeigt), insbesondere zugunsten der ISD-Fragmentierung. „Kalte“ Matrices (z.B. DHB, HABA) erlaubten keine so effektive Stabilisierung des Elternions, wie sie durch die Pseudo-Molekülenbildung erzielt werden konnte.

Die Unterdrückung der Fragmentierung verläuft am effektivsten mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS, da bei dieser Probenpräparation die Protonierung der synthetischen Peptide am geringfügigsten ist. Die erhaltenen Ergebnisse liefern bedeutende Informationen zur massenspektrometrischen Stabilität von synthetischen Peptiden in Abhängigkeit von der Probenpräparation. Da jedoch eine gewisse PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungstendenz für eine erfolgreiche Copolymeranalyse eines statistischen Copolymers nötig ist, ist der Ansatz der Stabilisierung des Elternions ungeeignet, um die in diesem Fall gewünschte Verringerung des ISD-^{44 Da}-Fragmentbeitrages zu ermöglichen.

Ein weiterer Ansatz zur Unterdrückung des Fragmentbeitrages des Peptides innerhalb der Ionenquelle ist, die Fragmentierung zeitlich der Art zu verzögern, dass sie in der Driftstrecke des Flugzeitmassenspektrometers auftritt. Eine ausreichende Fragmentierung kann in der Driftstrecke nur erzielt werden, wenn ausreichend viel Energie beim Desorptions/Ionisationsprozess innerhalb der Quelle eingebracht wird. Dies führt jedoch intrinsisch zur erhöhten Fragmentierung innerhalb der Quelle. Diese beiden ungünstigerweise gegenläufigen Ereignisse könnten der Theorie zufolge durch die CID-Fragmentionenanalytik (Kapitel 2.2.1, S. 24) behoben werden.

Geeignete Präparations- und Messbedingungen sollen für einen maximal schonenden MALDI-Prozess zur Bildung von protonierten Molekülen sorgen, so dass die Fragmentierung innerhalb der Quelle möglichst gänzlich unterdrückt ist. Eine gezielte Induzierung der Fragmentierung soll durch die eingelassenen Stoßgasmoleküle innerhalb der Flugstrecke erfolgen.

Für diese systematischen Untersuchungen wird all-trans-Retinoesäure (Vit.A) als Matrix eingesetzt, da diese eine sehr niedrige Schwellenleistung aufweist. Dadurch werden schonende Bedingungen ermöglicht, da nur sehr wenig Laserleistung zur Desorption/Ionisation des Analyten aufgewendet werden muss. Als Stoßgas für die induzierte Fragmentierung wird N₂ verwendet.

Der Vergleich der CID-MALDI-TOF-Fragmentspektren des Homopentamer-Lys **15b** und des um 44 Da kleineren ISD-Fragmentes dieses Moleküls, die jeweils bei Schwellenleistung aufgenommen wurden, ist in **Abb. 3-55** zusammengestellt. Für das ISD -44 Da -Fragmentation ergibt sich im CID-MALDI-TOF-Fragmentspektrum keine sequenzspezifische Fragmentierung, für das Homopentamer-Lys **15b** nur geringfügig. Beide Fragmentspektren zeigen gleichermaßen sehr intensive Fragmentsignale im Massenbereich unterhalb von 200 Da. Diese können den Schutzgruppen zugeordnet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse liefern wichtige Informationen zur Fragmentierungstendenz dieser Analyten mit sterisch anspruchsvollen Seitengruppen in Abhängigkeit der Stoßaktivierung. Der sequenzspezifische Bindungsbruch ist jedoch gering, so dass der Ansatz der stoßinduzierten Fragmentierung ungeeignet ist, um den ISD -44 Da -Fragmentbeitrag zu verringern.

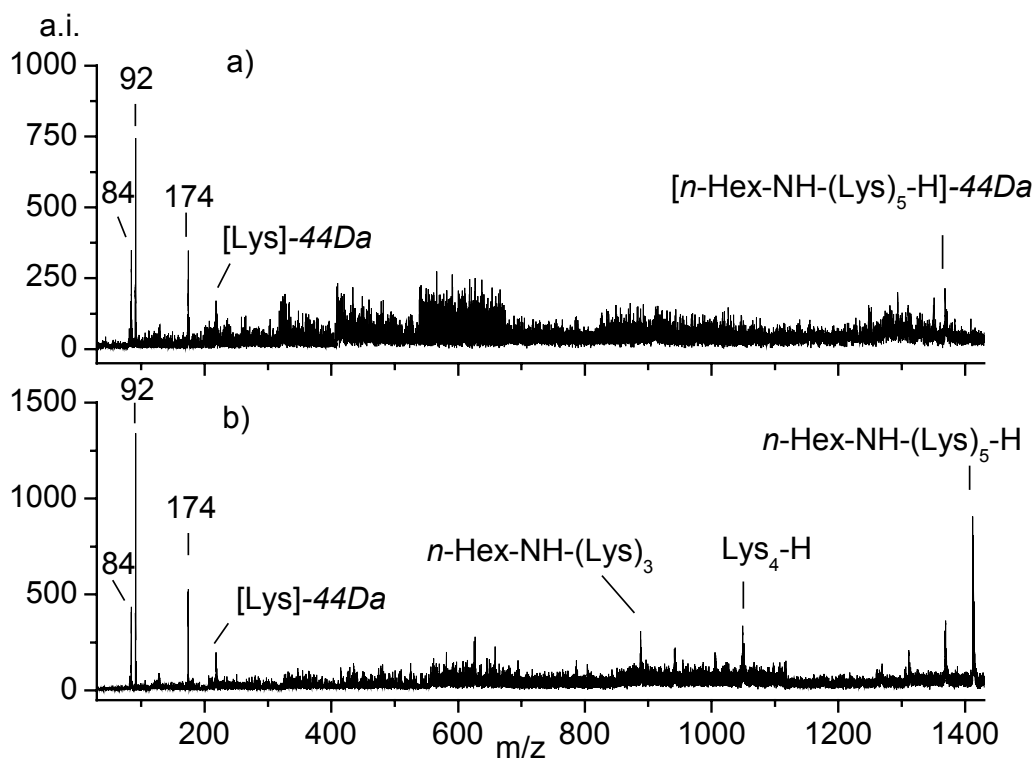


Abb. 3-55: Evaluierung der CID-MALDI-TOF-Fragmentierung zur Fragmentationsanalytik der statistischen Peptide aus Gly- und Lys-Bausteinen unter Berücksichtigung der ISD-Fragmentierung durch Z-Umlagerung der Lys-Aminosäure: a) CID-Fragmentationsanalytik des ISD-Fragmentes des Lys-Pentamers; b) CID-Fragmentationsanalytik des Elternions des statistisch polymerisierten Lys_4Glu_1 -Pentamers.

Die ISD-Fragmentierung kann bei ausreichender Fragmentierung innerhalb der Driftstrecke aus verschiedenen Gründen bei diesen geschützten Peptiden nicht völlig unterdrückt werden. Da der sequenzspezifische Beitrag in den PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren des ISD-Fragmentes (**Abb. 3-54**) vernachlässigbar ist, erlauben die gewonnen Erkenntnisse im Folgenden dennoch die

Durchführung einer Copolymersequenzanalyse. Die zu erwartenden Einbußen der Spektrenqualität aufgrund schlechterer Signal-zu-Rausch-Verhältnisse müssen dabei in Kauf genommen werden.

3.2.2.3.3 Fragmentionenanalyse der Copolymere

Nachdem ein detaillierter Bezug zwischen Fragmentierungsverhalten und -tendenz der beiden Aminosäurebausteine erarbeitet wurde, kann nun die Copolymercharakterisierung der statistisch polymerisierten Copolymere durchgeführt werden. Zunächst wird das MALDI-TOF-Massenspektrum des statistisch polymerisierten Peptides mit den Aminosäuremonomerbausteinen Lysin und Glutaminsäure in einem molaren Verhältnis von 50/50 in der Zusammensetzung der Reaktionspartner eingehender diskutiert (**Abb. 3-56**).

Die Polymerverteilung erstreckt sich bis ca. > 10.000 Da (**Abb. 3-56a**). Am informativsten zeigt sich der Massenbereich bis ca. 5.000 Da, da hier die Copolymerzusammensetzung (**Abb. 3-56b,c**) meist eindeutig zugeordnet werden kann. Wie in **Abb. 3-56b** ersichtlich, ist eine Überlappung der Signale unterschiedlicher Oligomerisationsgrade mit steigendem Molekulargewicht immer intensiver. Aufgrund der steigenden Komplexität der Copolymerzusammensetzung wird dann eine eindeutige Zuordnung immer schwieriger. Die Bestimmung des Molekulargewichtes alleine lässt aber keine Aussage zur Sequenz zu.

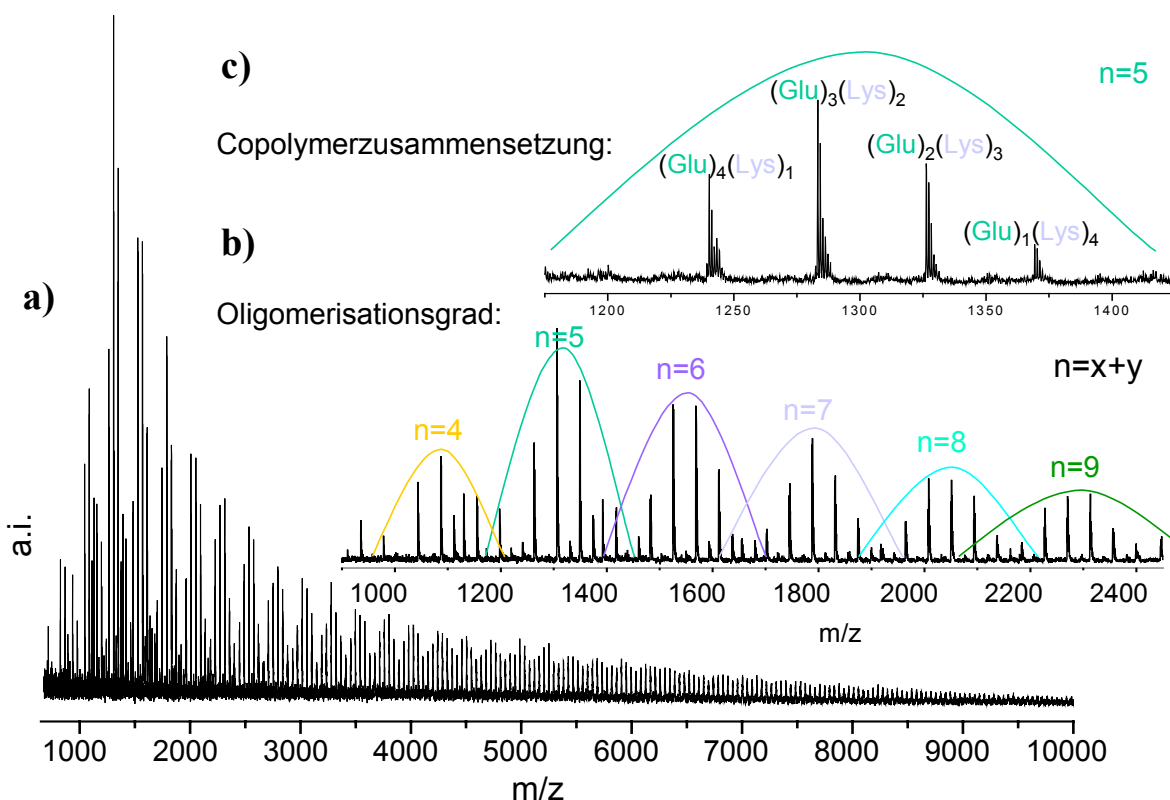


Abb. 3-56: MALDI-TOF-Massenspektrum des synthetischen Peptides mit einer Zusammensetzung der Reaktionspartner Glu/Lys von 50/50 **16b**: a) gesamter Massenbereich; b) Ausschnittsbereich zur Darstellung der Oligomerisationsgrade von n=4 bis n=9; c) Ausschnittsbereich zur Darstellung der Copolymerzusammensetzung von n=5.

Um Aussagen hinsichtlich der Sequenz mittels MALDI-TOF-MS treffen zu können, wird zunächst der Zusammenhang zwischen Synthese, Wahrscheinlichkeitstheorie und MALDI-TOF-MS (**Abb. 3-47**, S. 105) erörtert. Unter der Voraussetzung, dass die beiden verwendbaren Aminosäuren identische Reaktivitäten besitzen und sich ausschließlich durch ihre Molekulargewichte unterscheiden, müssten die erhaltenen Polymere unabhängig von der Zusammensetzung der Reaktionspartner statistisch aufgebaut sein. Da die Aminosäuremonomerbausteine unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen, müssen sich die Peptide in den Molekulargewichten unterscheiden (**Abb. 3-57**). Folglich müsste durch die Variation der Zusammensetzung der Reaktionspartner die Copolymerzusammensetzung deutlich variieren.

Für ein tieferes Verständnis dieses Sachverhaltes kann die Wahrscheinlichkeitstheorie (Kapitel 7, S. 287) herangezogen werden. Dabei wird eine erfolgreiche Bindungsknüpfung zweier Aminosäuren im Folgenden als „Treffer“ bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit eines statistischen Treffers zweier Glu, zweier Lys, eines Lys mit Glu bzw. Glu mit Lys sollte aufgrund der Annahme identischer Reaktivitäten gleich sein. Der Starttreffer des N-Hexylamines mit einem der beiden Aminosäuren ist ebenfalls identisch.

Der Start und das Wachstum des Peptidaufbaus sind damit jeweils der Wahrscheinlichkeitstheorie eines zufälligen Treffers unterworfen. Im Falle der identischen Anzahl an beiden Aminosäuren (**Abb. 3-57iii,b**) ist daher eine symmetrische Polymerverteilung zu erwarten.

Mit Erhöhung der Aminosäureanteile mit geringerem Molekulargewicht (**Abb. 3-57iii,a**) muss der Wahrscheinlichkeitstheorie zufolge eine unsymmetrische Polymerverteilung hin zu niedrigeren Molekulargewichten der Peptide in der Copolymerverteilung erhalten werden. In analoger Weise verschiebt sich die Copolymerverteilung der Pentamere zu höheren Molekulargewichten, wenn der Anteil an der Aminosäure mit höherem Molekulargewicht in den Reaktionspartnern erhöht wird (**Abb. 3-57iii,c**). Die nach der Wahrscheinlichkeitstheorie berechneten statistischen Zusammensetzungen in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Reaktionspartner (25/75 **16a**; 50/50 **16b**; 75/25 **16c**) müsste sich im MALDI-TOF-Massenspektrum durch die Signalintensitäten widerspiegeln.

Die statistisch polymerisierten Peptide der pentameren Copolymerzusammensetzung in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Reaktionspartner sind in **Abb. 3-57** direkt der Wahrscheinlichkeitstheorie gegenübergestellt. Zwischen theoretischer und experimentell gefundener Verteilung wird eine sehr gute Übereinstimmung im qualitativen Verlauf der Copolymerzusammensetzung ermittelt, jedoch nicht in den absoluten Signalintensitäten (**Abb. 3-57ii,b**). Dieser systematische Fehler kann durch Fragmentierung erklärt werden, die aufgrund einer McLafferty-Umlagerung der geschützten Lys-Seitenkette (Kapitel 3.2.2.3.2, S. 106) als ISD- und PSD-Fragmentierung Beiträge zu den Signalintensitäten der niedrigeren Molekulargewichte liefert. So profitiert z.B. die Copolymerzusammensetzung Glu_3Lys_2 von den Fragmentbeiträgen Glu_2Lys_3 an Intensität, so dass die theoretisch identischen Wahrscheinlichkeiten, die sich in den MALDI-TOF-Massenspektren durch identische Signalintensitäten widerspiegeln müssten, zugunsten der Glu_3Lys_2 -Zusammensetzung verschoben sind.

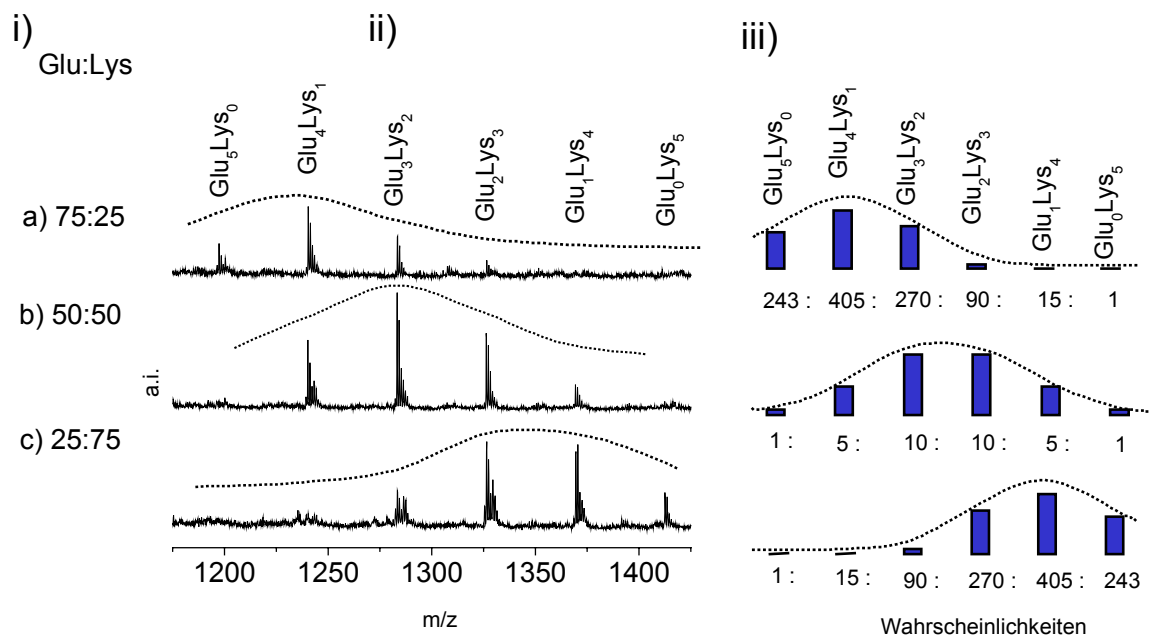


Abb. 3-57: MALDI-TOF-Massenspektren der synthetischen Polymere in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Reaktionspartner mit: a) Glu/Lys von 75/25 **16c**; b) Glu/Lys von 50/50 **16b**; c) Glu/Lys von 25/75 **16a**: i) Reaktionspartner; ii) MALDI-TOF; iii) Wahrscheinlichkeitstheorie (s. Anhang 7, S. 287).

Die qualitative Verschiebung der Polymerverteilung der pentameren Copolymerzusammensetzung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Reaktionspartner (75/25 **16c**; 50/50 **16b**; 25/75 **16a**) wie in **Abb. 3-57** ersichtlich, weist damit eine Korrelation zwischen den Anteilen der eingebauten Aminosäuren in Abhängigkeit von der Konzentration nach und schließt größere unterschiedliche Reaktivitäten der Aminosäuren aus. Die MALDI-TOF-MS-Ergebnisse sind damit der erste Nachweis, dass statistische Copolymere erhalten wurden. Sequenzspezifische Aussagen lassen sich mittels dieser vergleichenden MALDI-TOF-MS-Untersuchungen nicht treffen. Diese müssten unter Berücksichtigung der MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik prinzipiell zugänglich sein.

Für die pentamere Zusammensetzung von Glu/Lys (**Abb. 3-58a**) ergibt sich nach der Wahrscheinlichkeitstheorie (s. Anhang 7, S. 287) im einfachsten Fall von 5/0 bzw. 0/5 jeweils genau eine Möglichkeit, um ein Peptid aufzubauen. Für den Fall Glu/Lys 4/1 und 1/4 ergeben sich schon fünf gleiche Wahrscheinlichkeiten. Dies ist in **Abb. 3-58b** durch Permutation von Lys von Position eins bis fünf veranschaulicht. Für die Zusammensetzung von Glu/Lys von 3/2 bzw. 2/3 ergeben sich zehn mögliche Zusammensetzungen.

Unter der Voraussetzung, dass die Fragmentbrüche des Peptidrückgrates von Lys-Glu bzw. Glu-Lys identisch sind, ergeben sich theoretisch 18 Fragmentensignale mit gleichen Signalintensitäten (**Abb. 3-58c**). Die systematischen Untersuchungen (Kapitel 3.2.2.3.2) zu den Fragmentierungspfaden und -tendenzen zeigten, dass die n-hexylaminfunktionalisierten C-terminalen Fragmente des Homo-Glu-Peptides vollständig unterdrückt sind. Gleiche Signalintensitäten können aus praktischen Gesichtspunkten ausgeschlossen werden, da MALDI-TOF-MS eine Abhängigkeit von

Ionisationswahrscheinlichkeiten zeigt und die Fragmentionenspektren aus verschiedenen Segmenten aufgebaut sind (Kapitel 2.2.2, S. 26) und damit die Signalintensitäten methodenbedingt nicht mehr vergleichbar sind.

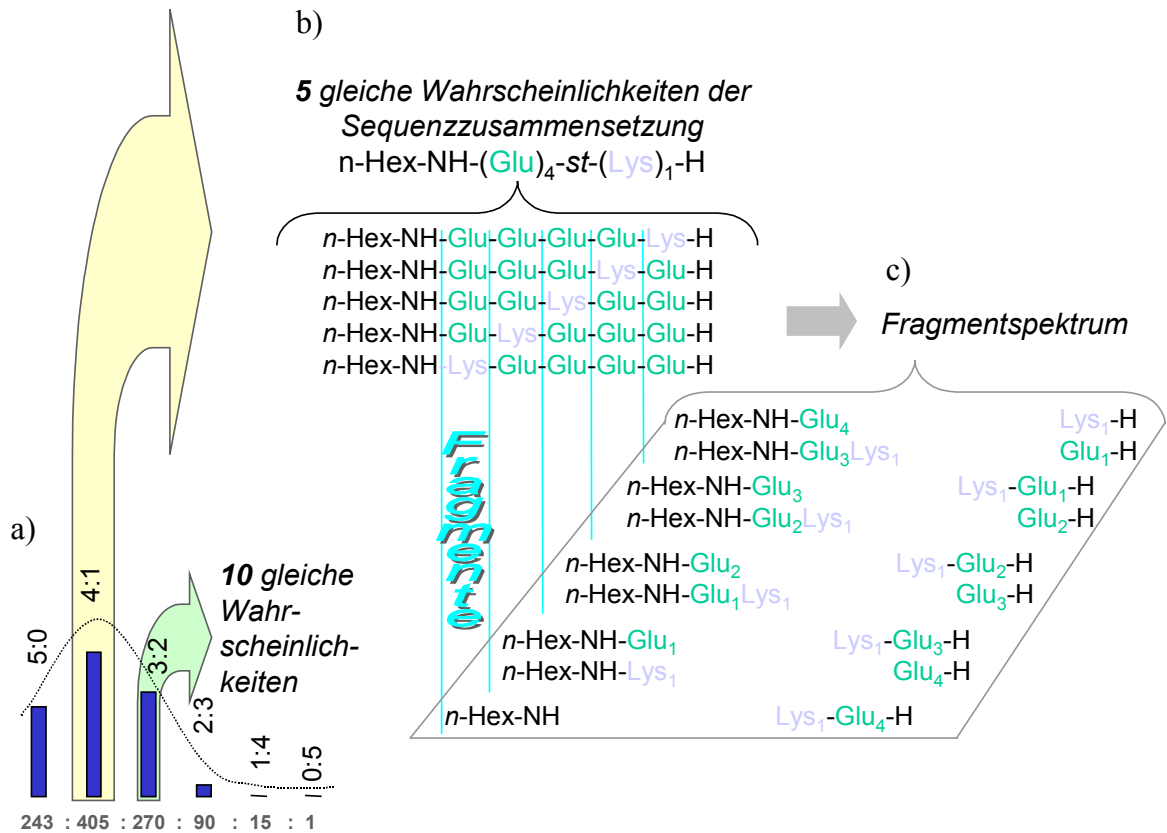


Abb. 3-58: Die Wahrscheinlichkeitstheorie zur Sequenzzusammensetzung eines statistischen Peptides aufgebaut aus fünf Monomerbausteinen ermöglicht es, die zu erwartenden MALDI-TOF-Fragmentionenspektren zu berechnen: a) berechnete Wahrscheinlichkeiten (s. Anhang 7, S. 287) der Copolymerzusammensetzung eines Pentamers in Abhängigkeit der Verhältnisse der Reaktionspartner Glu/Lys mit 75/25; b) Fünf gleich wahrscheinliche Sequenzzusammensetzungen bei einem Copolymer Glu_4Lys_1 ; c) 18 gleich wahrscheinliche Amidfragmentbrüche des Peptidrückgrates bei Glu_4Lys_1 .

In **Abb. 3-59** ist das PSD-MALDI-TOF-Fragmentenspektrum des statistisch polymerisierten Pentamers mit der Copolymerzusammensetzung von Glu_4Lys_1 dargestellt. Es werden neben der CO_2 -Abspaltung, verursacht durch die Seitenschutzgruppe an der Lys-Aminosäure (Kapitel 3.2.2.3.2, S. 106), intensive Fragmentbrüche des Peptidrückgrates gefunden. Dabei werden, wie erwartet aufgrund unterschiedlicher Ionisationswahrscheinlichkeiten, die n-hexylaminfunktionalisierten C-terminalen Fragmente nicht gefunden. Alle neun theoretisch möglichen N-terminalen Fragmente werden nachgewiesen, wenn auch in unterschiedlichen Signalintensitäten. Dies kann als ein weiterer Nachweis für ein statistisches Copolymer gewertet werden.

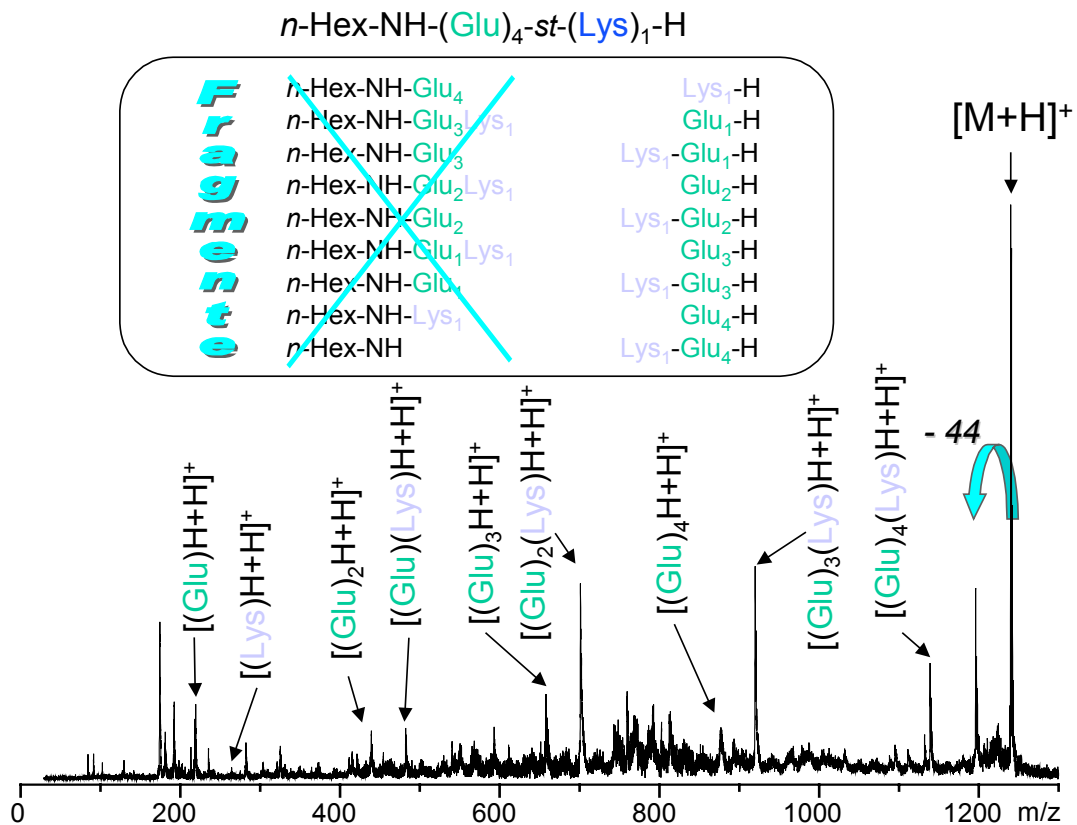


Abb. 3-59: PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse des synthetischen Polymers **16c** zur Bestimmung der Sequenzzusammensetzung.

Weitere Aussagen zur statistischen Copolymerzusammensetzung können auch über die Wahrscheinlichkeitstheorie erfolgen. Da bei zwei Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit eines statistischen Treffers gleich ist, findet sich z.B. Glu mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % an Position eins, ebenso mit 50 % an Position zwei.

Mit Erhöhung des Glu-Anteils in der Zusammensetzung der Reaktionspartner werden auch ausschließlich die Anteile an Glu-haltigen Peptiden erhöht (**Abb. 3-57**). Dies muss sich durch eine Verschiebung der Polymerverteilung im MALDI-TOF-Massenspektrum widerspiegeln. Die Wahrscheinlichkeit der Glu-Positionen im Peptid ist unabhängig von der Zusammensetzung der Reaktionspartner, und aufgrund der Wahrscheinlichkeitstheorie sollten identische Fragmentionen gebildet werden. Die Fragmentspektren müssen abhängig von der Zusammensetzung der Reaktionspartner identisch sein.

Aus diesem Grund werden die statistisch polymerisierten Pentamere in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Reaktionspartner mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse untersucht. In **Abb. 3-60** sind die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von Glu_4Lys_1 in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Reaktionspartner (Glu/Lys 75/25 **16c** und 50/50 **16b**) gegenübergestellt. Die Fragmentspektren sind bis auf geringe Unterschiede in den Signal-zu-Rausch-Verhältnissen identisch.

Auch das Ergebnis dieses dritten Experimentes ist, dass es sich bei den statistisch polymerisierten Peptiden um statistische Copolymere handelt.

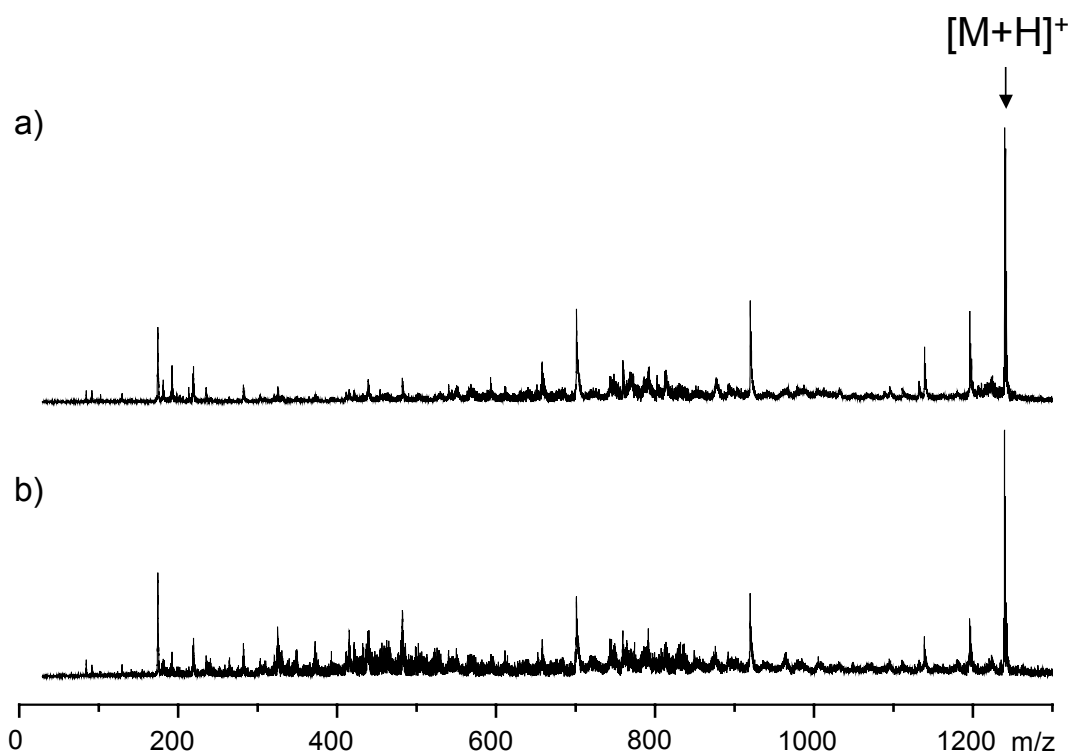


Abb. 3-60: PSD-MALDI-TOF-Fragmentationenspektren der synthetischen Polymere n -Hex-NH-Glu₄-*st*-Lys₁-H in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Reaktionspartner zeigen identische Fragmentspektren: a) Glu/Lys von 75/25 **16c**; b) Glu/Lys von 50/50 **16b**.

Um den prinzipiellen Unterschied zwischen statistischen Copolymeren und Blockcopolymeren zu zeigen, werden die zugehörigen PSD-MALDI-TOF-Fragmentenspektren unter Berücksichtigung sequenzspezifischer Unterschiede und Gemeinsamkeiten in **Abb. 3-61** gegenübergestellt. Die erhaltenen Fragmentationen des Elternions Lys₄-*st*-Glu₁ weisen sequenzspezifische Fragmentationen des statistischen Peptides nach und die beim Lys₄-*bl*-Glu₁ die des Blockcopeptides. Dadurch werden beide Copolymere gleichermaßen sequenzspezifisch mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentationsanalytik charakterisiert.

Durch die Kombination von Wahrscheinlichkeitstheorie und MALDI-TOF-MS ist es damit erstmals gelungen, auf direktem Wege eine statistische Copolymerzusammensetzung nachzuweisen. NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse.

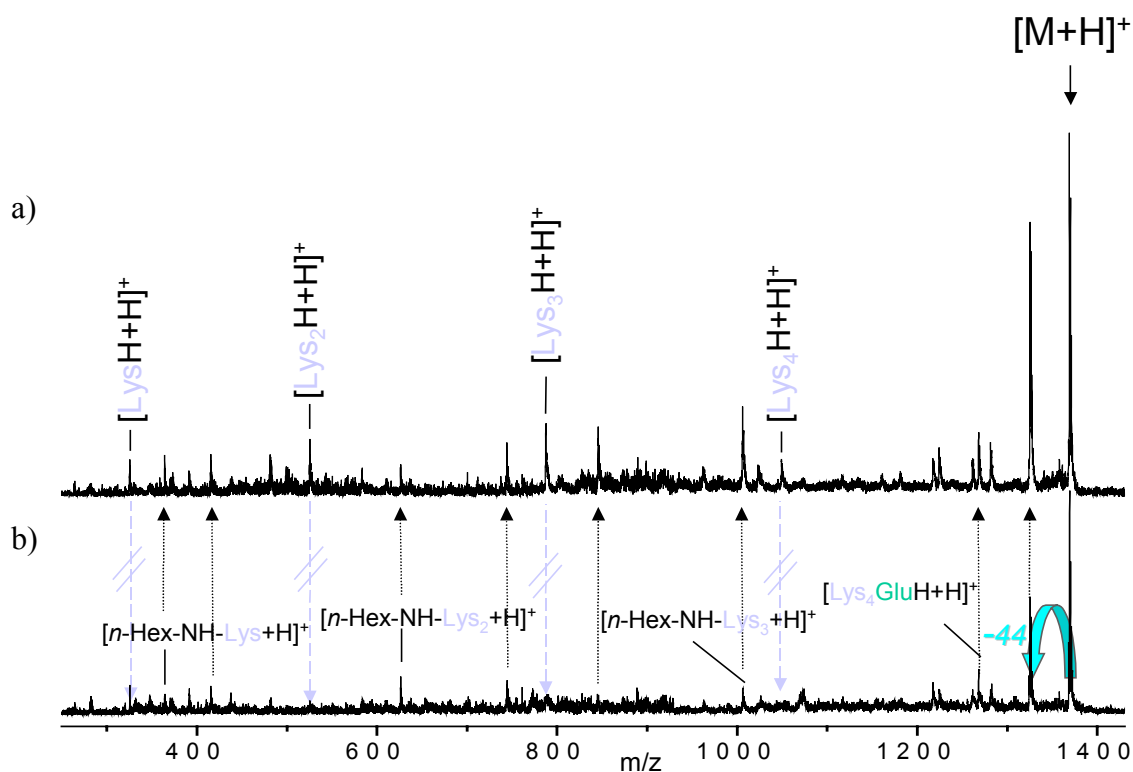


Abb. 3-61: PSD-MALDI-TOF-MS zur Sequenzanalyse von synthetischen Polymeren in Abhängigkeit des Copolymeraufbaues: a) statistisches Copolymer $n\text{-Hex-NH-Lys}_4\text{-st-Glu-H}$ **16a**; b) Blockcopolymer $n\text{-Hex-NH-Lys}_4\text{-b-Glu-H}$ **17a**.

3.2.3 Resümee

Durch den systematischen Vergleich unterschiedlicher Anregungsverfahren konnte der Einfluss von experimentellen Parametern auf das Fragmentierungsverhalten von Polymeren untersucht werden. Durch optimierte chromatographische und MALDI-Probenpräparationsbedingungen konnten im Folgenden die bislang größten Molekulargewichte einer Fragmentionenanalyse zugänglich gemacht werden. Das unterschiedliche Anregungsverfahren der CID-MALDI-TOF-MS zeigt nur im Falle sehr kleiner Stoßgaspartner eine erhöhte Fragmentionenausbeute bei der Fragmentionenanalyse von Polymeren, jedoch im gesamten untersuchten Molekulargewichtsbereich leicht verbesserte Signal-zu-Rausch-Verhältnisse. Durch den Mehraufwand des Stoßgasparameters ist die CID-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse in der praktischen Durchführung nachteilig im Vergleich zur PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse.

Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik erlaubte die direkte Charakterisierung der Copolymerzusammensetzung von Triblockcopolymeren. Diese Methode ist jedoch nur unter bestimmten Bedingungen und eingeschränkt erfolgreich einsetzbar. Extrapoliert man die erhaltenen Ergebnisse, so kann eine erfolgreiche Charakterisierung einer Copolymerzusammensetzung von Zweidendronen-Sternpolymeren mit breiterer Polymerverteilung mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik ausgeschlossen werden, da die Polymerverteilungen der beiden Dendronen

verstärkt überlappen. Eine ebenfalls verstärkte Überlappung der Fragmentpolymerverteilung muss man für Sternpolymere mit wachsender Zahl an Dendronen erwarten. Damit muss ebenfalls für diesen Fall eine erfolgreiche Charakterisierung der Copolymerzusammensetzung ausgeschlossen werden. Eine universelle, direkte Methode der Copolymercharakterisierung von Sternpolymeren bleibt daher eine analytische Herausforderung.

Die MALDI-TOF-MS, kombiniert mit der PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik, konnte unter enormem Messaufwand für die direkte Charakterisierung der Copolymerzusammensetzung von statistischen Copolymeren und von Blockcopolymeren eingesetzt werden. Unter Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeitstheorie ist leicht eine Molekulargewichtsobergrenze aufgrund der zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten zu erkennen. Von der MALDI-technischen Seite aus müsste eine Copolymercharakterisierung von statistischen Copolymeren bis in den Bereich, in dem ein Elternion erfolgreich selektiert werden kann, also rund 10.000 Da, möglich sein.

3.3 Methodenentwicklung zur qualitativen MALDI-TOF-MS-Analyse

3.3.1 Charakterisierung supramolekularer Komplexe

3.3.1.1 Grundlagen

Die supramolekulare Chemie befasst sich im Gegensatz zur „klassischen“ molekularen Chemie, bei der kovalente Bindungen im Vordergrund stehen, mit nicht-kovalent gebundenen Strukturen aus Einzelmolekülen. Dabei kommt es zunächst spontan zu einer Selbstorganisation der Moleküle, die durch zwischenmolekulare Kräfte in einer räumlich definierten Weise zusammengehalten werden^{198,199}. Die Bindungsenergien von metallo-supramolekularen Überstrukturen liegen zwischen denen kovalenter Bindungen und schwachen intermolekularen Wechselwirkungen wie z.B. elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Letztere sind ausschlaggebend bei Wirt-Gast-Systemen.

Alle Teilgebiete der supramolekularen Chemie haben gemeinsam, dass die gebildeten Überstrukturen, bedingt durch die niedrigeren Energien der nicht-kovalenten Wechselwirkungen, eine erhöhte Labilität aufweisen. Dadurch wird ihre Charakterisierung erschwert und die Zahl der einsetzbaren Analysemethoden beschränkt. Aufwendigere Methoden wie die Ultrazentrifugation²⁰⁰ und die Röntgenstrukturanalyse²⁰¹ können gleichwohl eingesetzt werden, zeigen sich jedoch nachteilig aufgrund der langen Vorbereitungs-, Mess- und Auswertzeiten. Aus diesem Grund wird nach alternativen Analysemethoden gesucht, um die Existenz von supramolekularen Komplexen zuverlässig und schnell nachweisen zu können. Prinzipiell könnte sich die MALDI-TOF-MS als eine alternative Analysemethode erweisen. Um grundlegendere Aussagen über das Potential der MALDI-TOF-MS hinsichtlich den Charakterisierungsmöglichkeiten supramolekularer Komplexe treffen zu können, sollen an ausgewählten Beispielen Vorteile und Limitierungen erarbeitet werden.

3.3.1.2 Metallo-supramolekulare Strukturen

3.3.1.2.1 Analytische Herausforderungen

Die MALDI-TOF-MS zeigte sich in ausgewählten Beispielen in der Lage die Charakterisierung nicht-kovalent gebundener Verbindungen durchzuführen^{202,203,204,205}. Die Ionisierungsmechanismen von metallo-supramolekularen Verbindungen basieren meist auf dem Verlust von Gegenionen¹²⁵. Die Ladungszahl der Moleküle wächst jedoch nicht mit der Zahl der abgespaltenen Gegenionen. Es werden nur einfach geladene Ionen detektiert, so dass auf eine Reduktion dieser Ionen während des MALDI-Prozesses geschlossen werden muss. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten metallo-supramolekularen Komplexe sind in **Abb. 3-62** zusammengestellt.

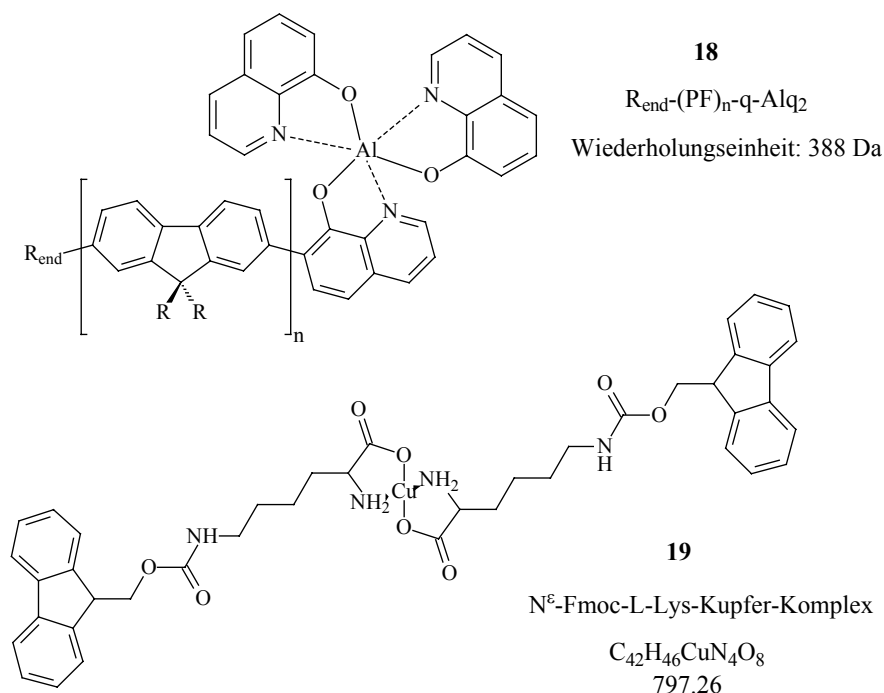


Abb. 3-62: Übersicht der untersuchten metallo-supramolekularen Strukturen.

Zunächst sollen mögliche Methoden zur Charakterisierung der supramolekularen Endgruppenmodifikation von Aluminium-Tris(8-Hydroxychinolin) (Alq_3) Polyfluoren (PF)-Komplex **18** diskutiert werden. Die Synthese wurde dahingehend geführt, dass eine einfache Endgruppenfunktionalisierung erhalten werden müsste. Das Zahlenmittel M_n des erhaltenen Alq_3 -PFs lässt sich durch GPC-Messungen (PS-Standard) zu etwa 13.000 Da mit einer Polydispersität von 2.1 ermitteln. Diese Methode lässt jedoch keine Aussage über die Endgruppenmodifikation zu. Trotz des relativ geringen Molekulargewichtes der zu untersuchenden Probe versagt die direkte und eindeutige Charakterisierung der durchgeführten Endgruppenmodifikation mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, da alle Signale des Komplexes von den aromatischen Signalen des Polyfluorenrückgrates verdeckt werden und somit keine für den Metallkomplex charakteristischen Signale zu erkennen sind. Zusätzlich zeigt sich, dass die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren nicht zur Abschätzung der Anzahl an Endfunktionalitäten herangezogen werden können, da eine Differenzierung zwischen kovalent gebundenem Alq_3 -PF oder freiem Aluminiumkomplex Alq_3 nicht geführt werden kann. Dies könnte jedoch durch eine zuvor durchgeführte präparative, chromatographische Trennung ermöglicht werden, so dass gewährleistet ist, dass die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrometer detektierten Endgruppen tatsächlich zu Polymerketten verknüpft sind. Allerdings liefert die NMR-Spektroskopie nur einen Mittelwert und keine Information über die Massenverteilung. Die GPC ist die wichtigste konventionelle Methode der Polymeranalytik, die in der Lage ist, die Polymerverteilung zu beschreiben. Sie beruht auf der Trennung von Polymeren aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens in Lösung, das vom Molekulargewicht abhängig ist. Ferner ist sie lediglich eine Relativmethode und benötigt strukturanaloge Kalibriersubstanzen. Zur Ermittlung der Molmassenverteilung eines Polymers wird eine Kalibrierkurve erstellt, die mit Daten eines Polymerstandards (z.B. PS) gewonnen wird. Aufgrund

des Einflusses unterschiedlicher Endgruppen auf das hydrodynamische Volumen wird aber gerade bei dieser Endgruppenmodifikation, die einen sterisch anspruchsvollen Substituenten darstellt, die Beziehung zwischen dem hydrodynamischen Volumen des Polymerknäuels und der Molmasse verändert. Dadurch werden die mittels der GPC ermittelten Molekulargewichte des endgruppenmodifizierten Polymers verfälscht^{206,207}. Aufgrund dieses Fehlers der GPC soll die MALDI-TOF-MS zur Bestimmung der Endgruppenmodifikation eingesetzt werden²⁰⁷. Das verwendete Polyfluorenderivat stellt insbesondere wegen der aluminiumhaltigen Endgruppenfunktionalität auch eine Herausforderung für MALDI-TOF-MS dar. Die Charakterisierung aluminiumhaltiger Analyten ist bislang mittels MALDI-TOF-MS nicht literaturbekannt, lediglich der Einsatz von Aluminium als Metallsalz zur Kationisierung von PEG200²⁰⁸ ist bisher beschrieben.

Die Struktur des schwer löslichen supramolekularen N⁶-Fmoc-L-Lys Kupfer-Komplexes **19** ist in **Abb. 3-62** dargestellt. Aufgrund der geringen Löslichkeit des supramolekularen N⁶-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplexes **19** ist dessen Charakterisierung mittels konventioneller NMR-Spektroskopie nicht möglich. Von der Festkörper-NMR-Spektroskopie sollte aufgrund des großen Substanzbedarfes bei langen Analysenzeiten abgesehen werden. Daraus resultiert die Suche nach alternativen Analysemethoden. Prinzipiell stellt sich die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS (Kapitel 3.1.2) als eine potentielle Charakterisierungsmethode dar.

3.3.1.2.2 Alq₃-Polyfluoren mittels GPC-MALDI-TOF-MS *off line*

In MALDI-TOF-Massenspektren können prinzipiell die Signale von niedermolekularen Polymeren (< 30 kDa) einzeln aufgelöst werden. Das Alq₃-Polyfluoren (GPC, 13.000 Da) **18** (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-7**; S. 263)^{xii} liegt damit im günstigen Molmassenbereich, wodurch eine direkte Überprüfung der Endgruppenmodifikation prinzipiell noch zugänglich sein sollte. Als nachteilig zeigt sich die breite Polydispersität dieser Alq₃-Polyfluorenprobe (Polydispersität ca. 2,1). Bei breiteren Verteilungen liefern MALDI-TOF-Massenspektren unzuverlässige M_n- und M_w-Werte, die viel kleiner als die durch konventionelle Methoden ermittelten Werte sind¹⁰⁶. Diesen für die MALDI-TOF-MS zu hohen Polydispersitäten^{106,107} begegnet man erfolgreich durch Kombination der massenspektrometrischen Charakterisierungsmethode mit vorangeschalteter analytischer GPC-Trennung. MALDI-TOF-MS wird quasi als „off-line“ Detektor für die GPC-Fractionen eingesetzt^{108,109,110,111,112}. Aus dem Eluat der chromatographischen Trennung werden Fraktionen gesammelt, deren Molmassenverteilung einen engen Schnitt der gesamten Probenverteilung darstellen. Von den so erhaltenen engen Molekulargewichtsverteilungen kann nun mittels MALDI-TOF-MS eine genaue Molmassenbestimmung vorgenommen werden. Eine Fraktionierung dient damit nicht nur der Genauigkeit der massenspektrometrischen bzw. der GPC-Untersuchung, sondern erlaubt in Spezialfällen, Analyte einer MALDI-Charakterisierung überhaupt erst zugänglich machen zu können. Diese Methodenkombination birgt damit die Möglichkeit von wichtiger Strukturanalytik in Sonderfällen, unter der Voraussetzung, dass das Polymer einer analytischen GPC-Trennung

^{xii} Die Synthese wurde von Herrn *Dr. C. Schmitt* im Rahmen seiner Promotion im AK *Prof. Dr. U. Scherf*, Universität Potsdam, und im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

unterzogen werden kann (Probleme wie z.B. Löslichkeit, Temperatur, Adsorptionseffekte, Nebenreaktionen) bzw. eine Kombination mit MALDI-TOF-MS möglich ist (z.B. zu hoher Salzgehalt durch Zusatz von LiBr zur Verhinderung von Adsorption bei der GPC-Trennung etc.). Dieser Ansatz erlaubt es, der intrinsischen Limitierung der MALDI-TOF-MS hinsichtlich größeren Polydispersitäten zu begegnen. Durch die zuvor durchgeführte GPC-Trennung wird gewährleistet, dass die durch die in der MALDI-TOF-MS-Analyse ermittelten supramolekularen Endgruppen tatsächlich mit den Polymerketten verknüpft sind. Damit kann eine theoretisch mögliche Aluminiumanlagerung an die Polyfluorenkette unter Bildung eines Pseudo-Moleküls analog den PEG-Untersuchungen²⁰⁸ ausgeschlossen werden.

Ein MALDI-TOF-Massenspektrum des Produktgemisches **18** konnte nicht direkt erhalten werden. Die Verringerung der Polydispersität von 2.1 (GPC: in THF, gegen PS-Standard) erfolgte durch GPC-Fraktionierung. Von den 14 vermessenen Fraktionen zeigen sich die MALDI-TOF-Massenspektren der letzteren Fraktionen am informativsten, da die Isotopenverteilungen der einzelnen Signale zur eindeutigen Charakterisierung hinzugezogen werden können (**Abb. 3-63**). Die Summation der einzelnen Fraktionen mit Molekulargewichten von 2.000 bis 10.000 Da und unter Berücksichtigung der intensivsten Signale von 2.000 bis 5.000 Da lassen auf ein mittleres Molekulargewicht von < 5.000 Da schließen. Der Gegensatz der beiden Methoden vermag einerseits auf der GPC-Kalibrierung mittels des PS-Standards, andererseits auf den für die MALDI-TOF-MS zu hohen Polydispersitäten zurückzuführen sein.

Für die Bestimmung der Endgruppen von **18** muss als erstes der Ionisierungsmechanismus des Polymers festgestellt werden, da die Polymere durch Anlagerung eines Kations einen Massenzugewinn (**Gleichung 2-3**, S. 21) erfahren. Eine Differenzierung zwischen den möglichen Ionisationen (z.B. Metall-Pseudo-Molekülen, Radikalkationen) wird durch eine Variation des Metalltrifluoracetatzusatzes ermöglicht (Kapitel 2.1.3, S. 20). Dies ist insbesondere bei der zu charakterisierenden Al₃-Endgruppenmodifikation **18** von Interesse, da keinerlei Informationen zur Aluminiumendgruppemodifikation und nur wenige zur Al-Pseudo-Molekülenbildung bekannt sind^{Fehler! Textmarke nicht definiert.}. Der Zusatz eines Kations zur Analyt-Matrix-Mischung dient der Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Bildung des Metall-Pseudo-Moleküls und ebenso, um vorkommende zufällige Ionisationen durch Verunreinigungen von Metallspuren eindeutig ausschließen zu können. Untersuchungen an Polyfluorenhomopolymeren mit gängigen Wasserstoffendgruppen zeigten, dass das steife Polyfluorenrückgrat bevorzugt eine radikalkationische Ionisation eingeht (Kapitel 3.1.2.3.3, S. 55).

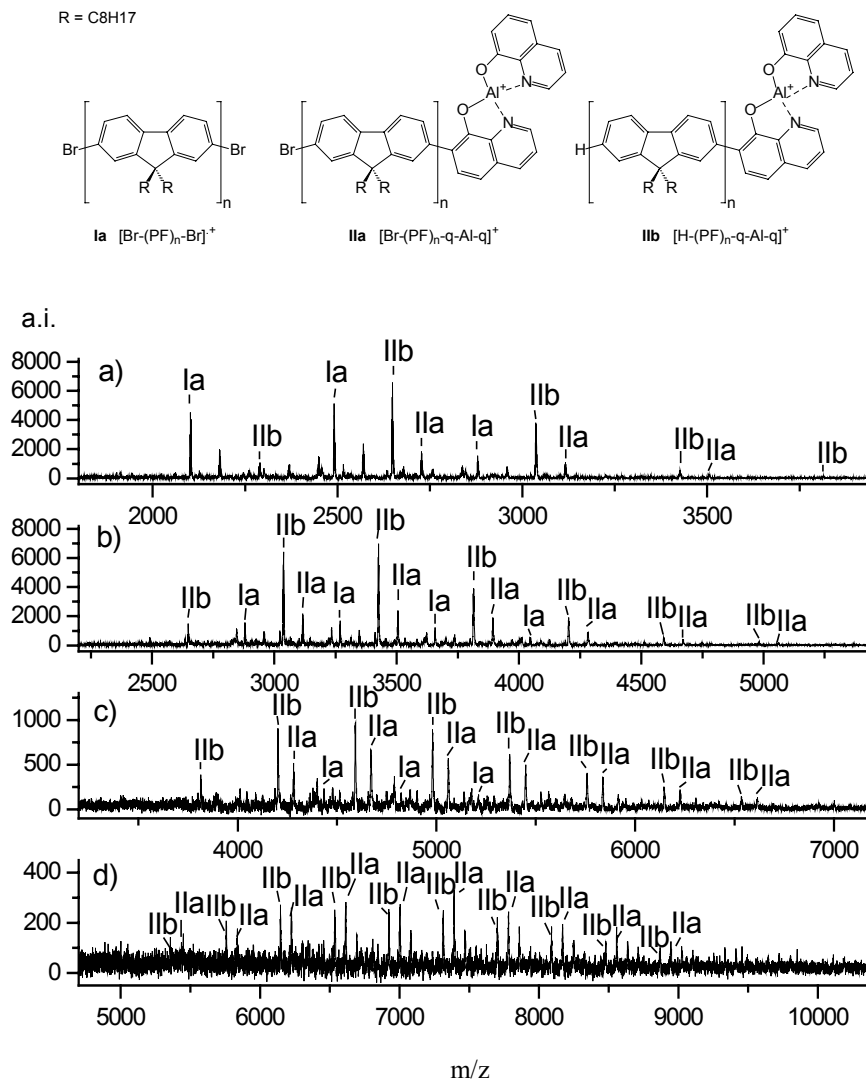


Abb. 3-63: MALDI-TOF-Massenspektren (nach Basislinienkorrektur) der GPC-Fractionen von **18** und dessen nachgewiesene Strukturen: a) Fraktion **18.10**: n=5 bis 9 der Strukturen **18.Ia** und **18.IIa,b**; b) Fraktion **18.9**: n=6 bis 12 der Strukturen **18.Ia** und **18.IIa,b**; c) Fraktion **18.8**: n=9 bis 16 der Strukturen **18.Ia** und **18.IIa,b**; d) Fraktion **18.7**: n=13 bis 22 der Strukturen **18.IIa,b**

Für die Polyfluorenefraktionen der GPC-Trennung wurden zusätzlich Massenspektren der Analyt-Matrix-Mischung aufgenommen, bei denen CF₃CO₂Li, CF₃CO₂Na, CF₃CO₂K und CF₃CO₂Ag zugesetzt wurden. Bei den abgebildeten Messungen wurde Dithranol als Matrix verwendet. Die Variation dieser Kationen zeigt, dass sich keine der Signallagen im MALDI-TOF-Massenspektrum, weder in Bezug auf die Messung ohne Metallsalzzugabe noch bei den Messungen mit verschiedenen Metalltrifluoracetatzusätzen, verschiebt. Dadurch kann der Ionisationsmechanismus des untersuchten Polyfluorens **18** bestätigt und eine Pseudo-Molekülionenbildung mit einem Metallkation ausgeschlossen werden. Die detektierten Signale sind damit jeweils radikalkationischer Natur beim unfunktionalisierten PF **18.Ia**. Ebenso kann eine zufällige Kationenverunreinigung, die zu einer

erfolgreichen Kationisierung führen könnte, oder die Bildung eines Pseudo-Molekülions aus einem freiem Aluminiumkation und einer intakten Polymerkette, damit ebenfalls ausgeschlossen werden. Bei den funktionalisierten PF werden die Strukturen **18.IIa** und **18.IIb** detektiert. Dies stellt einen besonderen Ionisationsmechanismus dar, bei dem die einfache Ladung durch den Verlust eines q-Liganden gewonnen wird.

Da das Polyfluoren **18** wie oben gezeigt bevorzugt als Radikalkation ionisiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass alle Endgruppenkombinationen prinzipiell massenspektrometrisch zugänglich sein müssten. Daraus muss geschlossen werden, dass bei der Endgruppen-Aluminium-Komplex-Spezies im Ionisationsschritt die Dissoziation des nicht-kovalent gebundenen Hydroxychinolins (q) einer Radikalkationenbildung energetisch bevorzugt ist. Diese Vermutung kann nicht näher untersucht werden, da es sich beim Ionisationsprozess um einen sehr schnellen Prozess innerhalb der Quelle handelt, so dass sich die ISD-Fragmente massenspektrometrisch nicht von intakten Molekülen des Produktgemisches unterscheiden. Berücksichtigt man die Tatsache, dass Radikalkationen eine wesentlich höhere Fragmentierungstendenz als die Pseudo-Molekülionen aufweisen (Kapitel 3.4.3.3, S. 161 und 3.4.3.6, S. 182), so werden die Strukturen [R-Polymer-q-Al-q]⁺ mit R=H,Br **18.IIa,b** als Fragmente der Endgruppen-Aluminium-Komplex-Spezies R-Polymer-q-Al-q₂ mit R=H,Br **18.IIIa,b** sehr wahrscheinlich. Der Nachweis kann jedoch methodisch bedingt nicht geführt werden. Aus synthetischem Gesichtspunkt ist die Anbindung von nur zwei Liganden nicht schlüssig.

Für die Endgruppenbestimmung ergibt sich, dass sich die absolute Masse einer jeden detektierten Kettenlänge aus den Massen der Wiederholungseinheiten und der Endgruppen zusammensetzt. **Gleichung 2-3** zur Bestimmung der Endgruppen aus der experimentell ermittelten Masse eines Signals vereinfacht sich damit zur **Gleichung 3-2**:

$$\text{Endgruppe1} + \text{Endgruppe2} = M[\text{g/mol}] - n \cdot 388.31 \quad \text{Gleichung 3-2}$$

n	Anzahl der Wiederholungseinheiten
388.31	monoisotopisches Molekulargewicht der Wiederholungseinheit
Endgruppe1	monoisotopisches Molekulargewicht der Endgruppe1
Endgruppe2	monoisotopisches Molekulargewicht der Endgruppe2

Abb. 3-63a zeigt das erhaltene MALDI-TOF-Massenspektrum der polymeranalogen Endgruppenfunktionalisierung des Polyfluorens **18** der Fraktion **10**. Die Signale jeder einzelnen Kettenlänge zeigen sich isotopenaufgelöst. Der Abstand der Signale untereinander beträgt 388 Da und gibt damit das berechnete Molekulargewicht der Wiederholungseinheit wieder. Durch **Gleichung 3-2** lässt sich für jede experimentell ermittelte Masse und deren Wiederholungseinheit die Summe für die Masse der Endgruppen berechnen, die dann den theoretisch möglichen Endgruppenkombinationen gegenübergestellt werden können. Dies wird im Folgenden am Beispiel der Fraktion 10 für jeweils eine Endgruppenkombination exemplarisch durchgeführt und in **Tabelle 3-2** zusammengestellt:

Tabelle 3-2: Mögliche Molekülzusammensetzungen von **18** und die daraus resultierenden Endgruppen der Fraktion **18.10**.

Mögliche Molekülzusammensetzungen	Summenformel (berechnete <i>m/z</i>)	Massen der Summe der Endgruppen ^a
Br-(Fluoren)₇-Br 18.Ia ^b	C₂₀₃H₂₈₀Br₂ (2876.0)	157.8
Br-(Fluoren) ₇ -H 18.Ib	C ₂₀₃ H ₂₈₁ Br (2798.1)	79.9
H-(Fluoren) ₇ -H 18.Ic	C ₂₀₃ H ₂₈₂ (2720.2)	2.0
Br-(Fluoren) ₇ -q-H 18.Id	C ₂₁₂ H ₂₈₆ BrNO (2941.2)	223.0
H-(Fluoren) ₇ -q-H 18.Ie	C ₂₁₂ H ₂₈₇ NO (2863.2)	145.0
H-q-(Fluoren) ₇ -q-H 18.If	C ₂₂₁ H ₂₉₂ N ₂ O ₂ (3006.3)	288.1
[Br-(Fluoren)₆-q-Al-q]⁺ 18.IIa	C₁₉₂H₂₅₀AlBrN₂O₂ (2721.9)	393.0
[H-(Fluoren)₆-q-Al-q]⁺ 18.IIb	C₁₉₂H₂₅₁AlN₂O₂ (2643.9)	315.0
[H-q-(Fluoren) ₆ -q-Al-q] ⁺ 18.IIc	C ₂₀₁ H ₂₅₆ AlN ₃ O ₃ (2787.0)	458.1
[q-Al-q-(Fluoren) ₆ -q-Al-q] ²⁺ 18.IId	C ₂₁₀ H ₂₆₀ Al ₂ N ₄ O ₄ (2956.0:2=1478.0)	628.1
[Br-(Fluoren) ₆ -q-Al-q ₂] 18.IIIa	C ₂₀₁ H ₂₅₅ AlBrN ₃ O ₃ (2864.9)	537.0
[H-(Fluoren) ₆ -q-Al-q ₂] 18.IIIb	C ₂₀₁ H ₂₅₆ AlN ₃ O ₃ (2787.0)	459.1
[H-q-(Fluoren) ₆ -q-Al-q ₂] 18.IIIc	C ₂₁₀ H ₂₆₁ AlN ₄ O ₄ (2930.0)	602.2
[q-Al-q-(Fluoren) ₆ -q-Al-q ₂] ⁺ 18.IIIId	C ₂₁₉ H ₂₆₅ Al ₂ N ₅ O ₅ (3099.0)	772.2
[q ₂ -Al-q-(Fluoren) ₆ -q-Al-q ₂] 18.IIIe	C ₂₂₈ H ₂₇₀ Al ₂ N ₆ O ₆ (3242.0)	916.2

^a monoisotopische Massenangaben für jeweils das Isotop eines Molekülions mit der geringsten Masse

^b fettunterlegt=Hauptsignalintensität im Spektrum; fettunterlegt und kursiv=weniger intensive Signalintensität; normal=nicht detektiert

Die Hauptsignalintensität in Fraktion **18.10** kann dem aluminiumhaltigen endgruppenfunktionalisierten Polymer [H-Polymer-q-Al-q]⁺ **18.IIb** zugeordnet werden. Als Nebenserie mit der größten Signalintensität tritt das bromierte aluminiumhaltige endgruppenfunktionalisierte Polymer [Br-Polymer-q-Al-q]⁺ **18.IIa** auf. Die nicht erfolgte Funktionalisierung wird ebenfalls mit starken Signalintensitäten als dibromsubstituiertes Polymer [Br-Polymer-Br]⁺ **18.Ia** in radikalkationischer Form nachgewiesen. Die Isotopenverteilung steht dabei im Einklang mit der Computersimulation. Der Nachweis des dibromierten Ausgangspolymers zeigt, dass diese Reaktionsbedingungen nicht vollständig zur Debromierung führen. Damit einhergehend wird auch das einfach- bzw. zweifachwasserstoffendfunktionalisierte Polymer **18.Ia,b** nicht detektiert.

Die Endgruppenkombinationen R-Polymer-q-H mit R=Br,H,q-H **18.Id,e,f** wurden nicht nachgewiesen. Daraus kann gefolgert werden, dass sich das Polymer R-Polymer-q-H mit R=Br,H **18.Id,e** ausgesprochen effektiv mit dem Aluminium supramolekular bindet und als [R-Polymer-q-Al-q]⁺ mit R=Br,H **18.IIa,b** nachgewiesen werden kann. Dies ist auch der mögliche Grund dafür, dass die Endgruppenkombination [H-q-Polymer-q-Al-q]⁺ **18.IIc** nicht gefunden werden kann, da diese effektiv zu [q-Al-q-Polymer-q-Al-q]²⁺ **18.IId** umgesetzt wird. Diese zweifach positive Spezies konnte nicht nachgewiesen werden. Die Endgruppen-Aluminium-Komplex-Spezies R-Polymer-q-Al-q₂ mit R=H,Br,q-H,q-Al-q,q-Al-q₂ **18.IIIa-e**) wurden nicht nachgewiesen.

Berücksichtigt man, dass die GPC-Methode für ionische Substanzen schlecht geeignet ist, muss das endgruppenmodifizierte Polyfluoren als Alq₃-PF vorgelegen haben. Damit zeigt sich, dass die MALDI-TOF-MS zumindest indirekt die supramolekulare Endgruppenmodifikation nachzuweisen vermag. Weiter kann gefolgert werden, dass die Polyfluorenketten unter den angewendeten Synthesebedingungen überwiegend mit nur einem Komplex verknüpft sind. Polymerketten mit zwei

Komplexen sind nicht und Polymerketten ohne Komplex sind nur geringfügig vorhanden. Dies führt zur Erkenntnis, dass bei einem Monomerverhältnis von 85/15 vor allem gewünschtes monoendfunktionalisiertes Polymer **18.IIa,b** erhalten wird.

Der Vergleich der GPC-Fractionen mit steigendem Molekulargewicht zeigt eine hohe Einheitlichkeit in der Endfunktionalisierung. Bei Fraktionen **18.9** und **18.8** liegen die Hauptsignalintensitäten analog Fraktion **18.10** beim aluminiumhaltigen endgruppenfunktionalisierten Polymer [H-Polymer-q-Al-q]⁺ **18.IIb**. Mit zunehmendem Molekulargewicht zeichnet sich jedoch eine verstärkte Konkurrenz durch das in Fraktion **18.10** als Nebenserie detektierte [Br-Polymer-q-Al-q]⁺ **18.IIa** ab, welche dann in Fraktion **18.7** als Hauptsignalserie nachgewiesen wird. Die nicht erfolgte Funktionalisierung wird mit zunehmend geringeren Signalintensitäten als dibromsubstituiertes Polymer [Br-Polymer-Br]⁺ **18.Ia** in radikalkationischer Form detektiert.

MALDI-TOF-MS erweist sich als eine Methode, die unter ausreichend schonenden Bedingungen den Nachweis der metallo-supramolekularen Endgruppenfunktionalisierung dieses komplexen Substanzgemisches führen kann. Die Fülle an Informationen, die aus einem einzigen Massenspektrum entnommen werden können, ist sonst nur unter Anwendung mehrerer verschiedener Methoden erhältlich. Auch erlaubt sie des weiteren, neue Erkenntnisse hinsichtlich der Synthese zu gewinnen wie z.B. die unvollständige Debromierungsreaktion zur Entfernung der Bromendgruppen. Die erfolgreiche Charakterisierung dieser polymeranalogen Reaktion ist hinsichtlich massenspektrometrischer Aspekte sehr wertvoll, da aluminiumhaltige supramolekulare Makromoleküle für MALDI-TOF-MS bislang unbekannt sind. Aufgrund des moderaten Analysen- und Zeitaufwandes erweist sich MALDI-TOF-Massenspektrometrie als eine attraktive Analyse- und Charakterisierungsmethode zur Charakterisierung dieser Substanzklasse.

3.3.1.2.3 N^ε-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplexe mittels der „Ag-Labeling“-Methode

Durch lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS konnte unter Variation der Probenpräparationsbedingungen (Dithranol-Matrix, CF₃CO₂Li, CF₃CO₂Na, CF₃CO₂Ag) und deren Analyt/Matrix/Metallsalz-Verhältnisse (1/50/10, 1/500/10) eine erfolgreiche Charakterisierung des supramolekularen Komplexes **19** (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-8**; S. 264)^{XIII} nicht erfolgen. Die auftretenden Signalintensitäten sind nur gering und wenig spezifisch. Die Charakterisierung sollte jedoch laut Literatur mittels der „Ag-labeling“-Methode möglich sein^{196,209,210}. Dabei macht man sich die sehr selektive Anbindung von Ag⁺ an aromatische Substituenten unter Ausbildung einer Sandwichstruktur zu Nutze. Dieser als „Ag-labeling“-Methode beschriebene Ansatz entspricht der Probenpräparation unter Zusatz von CF₃CO₂Ag zur Analyt-Matrix-Mischung, welcher die Substanz Eingangs schon nicht zu charakterisieren vermochte. Die Probenpräparation scheint daher keinen großen Spielraum zu erlauben. Es ist davon auszugehen, dass die Ionisierung unter MALDI-Bedingungen für diese labile Substanzklasse nicht ausreichend schonend verläuft, und die Substanz daher zu größten Teilen durch ISD-Fragmentierung in der Quelle einer massenspektrometrischen Detektion verloren geht, da beide N^ε-Fmoc-L-Lysine als Neutralteilchen gebildet werden.

^{XIII} Die Synthese wurde von *J. Rodriguez Hernandez* im Rahmen seiner Doktorarbeit unter Anleitung von *Dr. H.-A. Klok* im AK Prof. *K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

Eine gezielte Variation der Messbedingung soll durchgeführt werden, um die Zahl der intakt detektierten supramolekularen N^ε-Fmoc-L-Lysine-Kupfer-Komplexe zu erhöhen. Möglicherweise verhindert ein Detektorsättigungseffekt die Detektion dieses labilen supramolekularen Komplexes. Dies wurde erfolgreich durch den Einsatz des elektronischen „Gates“ des PSD-Modus (Kapitel 2.2.2, S. 26) durchgeführt. Niedermolekulare und höhermolekulare Ionen wurden gleichermaßen mittels elektronischem „Gate“ ausgeblendet, so dass die geringe Zahl an supramolekularen N^ε-Fmoc-L-Lysin-Kupfer-Komplexen unter Verwendung der „Ag-labeling“-Präparationsmethode erhöht wird. Durch die erhaltenen PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren lassen sich damit die Molekulargewichte des intakten Pseudo-Moleküls als $[M+H+Ag]^+$ beschreiben, bei dem das Cu⁺ reduziert vorliegt. Die experimentell ermittelte Isotopenverteilung steht wie in **Abb. 3-81** gegenübergestellt in sehr gutem Einklang mit der simulierten Isotopenverteilung.

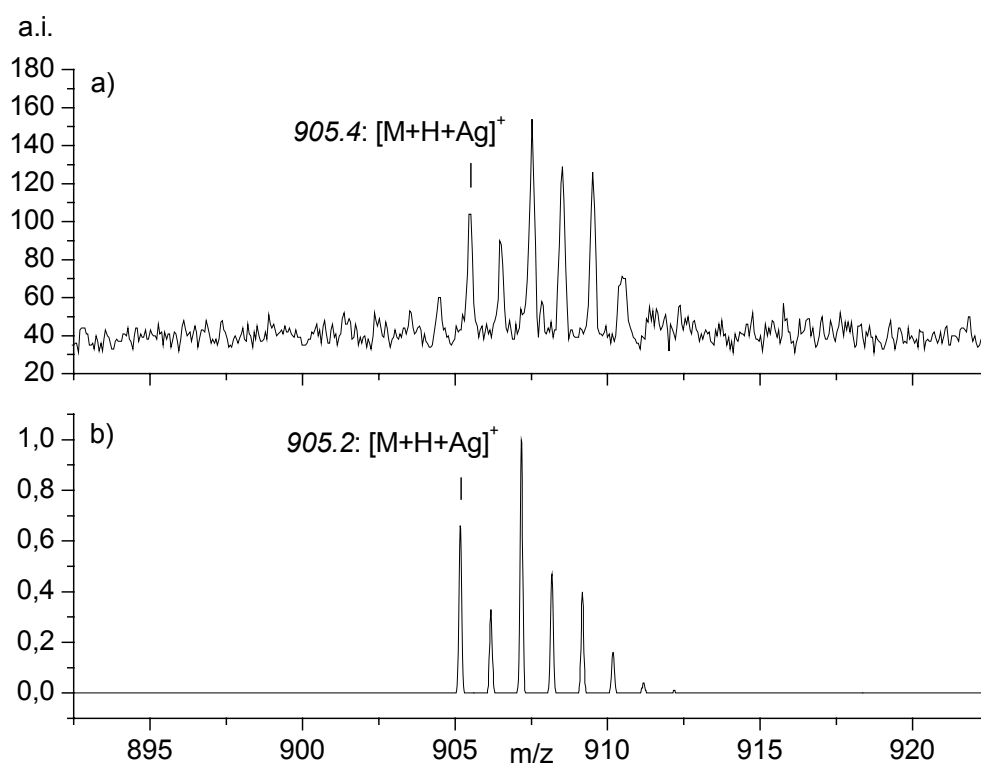


Abb. 3-64: a) PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum von **19** unter gezieltem Einsatz des elektronischen „Gates“; b) Computersimulation.

Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS zeigt sich als eine Methode, die die Molekulargewichtsbestimmung dieser Substanzklasse durchführen kann. Die Ionisation verläuft unter Wahl der geeigneten Messbedingung ausreichend schonend, so dass durch Selektion des Elternions durch das elektronische PSD-„Gate“ die Zahl der intakten supramolekularen Komplexe **19** erhöht werden kann. Das elektronische PSD-„Gate“ zeigt sich damit wesentlich effektiver und schärfer als die Deflektion zur Unterdrückung niedermolekularer Ionen.

3.3.1.3 Supramolekulare Wirt-Gast-Systeme basierend auf Cyclodextrinen (CD)

3.3.1.3.1 Analytischer Ansatz

Einschluss- oder Wirt-Gast-Komplexe sind Ausdruck molekularer Wiedererkennung und finden eine steigende Bedeutung in der Wirkstoffanalytik (z.B. Cyclodextrine). Eine Vielzahl konkaver makrozyklischer Liganden ist befähigt in ihren Hohlräumen nicht-kovalente Wechselwirkungen mit größengeeigneten Ionen oder Neutralteilchen einzugehen^{211,212}. Untersuchungen zu Einschlusskomplexen ionischer Gäste wie z.B. kationisierte Kronenether sind bereits mittels MS durchgeführt worden^{213,214}. Des Weiteren konnte MS angewendet werden, um nicht-kovalente Komplexe in der Gasphase²¹⁵ zu untersuchen.

Die MALDI-TOF-MS-Charakterisierung neutraler nicht-kovalenter Komplexe ist eher ungewöhnlich und kann möglicherweise auf die Kristallinität der Probe zurückgeführt werden, wenn sie dem Desorptions/Ionisationsprozess zugeführt wird. Dennoch wird gerade dank starker nicht-kovalenter Wechselwirkungen zwischen Metallkationen und Analyten die erforderliche Ladung für MS-Untersuchungen stabilisiert, indem diese sogenannte Pseudo-Molekülionenbildung $[M+Kation]^+$ eingehen. Folglich macht seit der letzten Dekade ein breites Anwendungsgebiet (z.B. Analytik von synthetischen Polymeren und organischen Makromolekülen, s. Kapitel 1.1.3, S. 6) Gebrauch von dieser nicht-kovalenten Wechselwirkung zur Charakterisierung von neutralen, schwer protonierbaren Makromoleküle mittels MALDI-TOF-MS. Diese hängt jedoch von einem wirkungsvollen Metallkationisierungsprozess ab.

Aus diesem Aspekt heraus ist die Wechselbeziehung zwischen Größenabhängigkeit der Metallkationen und strukturellen Eigenschaften der Makromoleküle von allgemeinem Interesse, um ein besseres Verständnis für eine erfolgreiche MALDI-TOF-MS-Untersuchung zu erarbeiten. So wird z.B. vorgeschlagen, dass Silberkationen genau dann beständige Pseudo-Molekülionen mit Makromolekülen ausbilden, wenn eine Sandwichstruktur mit zwei aromatischen Ringen eingegangen werden kann¹⁹⁶. Alkalimetalle neigen dazu, beständige Komplexe mit Sauerstoff- und Stickstoffheteroatomen zu bilden²¹⁶.

Für diese systematischen MALDI-TOF-MS-Untersuchungen scheinen Oligosaccharide ein gutes Modellsystem zu sein, um Größen- und Strukturabhängigkeiten nicht-kovalenter Komplexe zu ermitteln. Die nicht-kovalente Wechselwirkung erfolgt zwischen den Metallkationen und den Sauerstoffheteroatomen der Oligosaccharideinheiten, wobei die Zahl der beteiligten Heteroatome generel von der Größe des Kations abhängt^{216,217}. Die Konkurrenz zwischen Fragmentierung des Analyten und Abdissoziation des Kations kann auf die Bindungsaffinitäten zurückgeführt werden (Kapitel 3.2.1, S. 81). Einige Gründe für die Eignung des CD-Wirtes²¹⁸ können für diese Untersuchung angegeben werden:

- CD-Wirte sind in unterschiedlichen Größen verfügbar (α -, β -, γ -CD),
- CD-Wirte sind chemisch einfach in deren lineare Struktur umwandelbar,
- CD-Wirte tragen eine Vielzahl an bindungsfähigen Heteroatomen,
- Bindungsfähigkeiten des CD-Wirtes können chemisch einfach geändert und erhöht werden,
 - mit und ohne Änderung des CD-Torus,
 - mit und ohne bevorzugte Bindungspositionen (z.B. Säuren) und
 - mit und ohne präferentielle Spaltungspeditionen (z.B. N-Acetyl-Gruppen).
- Geringe Fragmentierungstendenz von CD kann durch Derivatisierung ohne Änderung der Geometrie des Torus in einem hohen Umfang erhöht werden und
 - Permethylierung und
 - Peracetylierung.
- Fragmentierungsmuster des Wirtes können vermutlich durch die Literatur aufgeklärt werden.

Diese ionischen Wirt-Gast-Untersuchungen werden aus obigen Gründen an symmetrisch modifizierten, acetylierten linearen und zyklischen Oligosacchariden mit variierenden Metallkationen untersucht (**Abb. 3-65a**). Dabei kann erwartet werden, dass die gewählte Derivatisierung den CD-Torus nicht erheblich beeinflusst, aber dafür ihre Bindungsfähigkeiten sowie die Fragmentierungstendenz erhöht. Folglich können mit dieser chemischen Modifikation der linearen und der zyklischen Oligosaccharide größere Unterschiede bezüglich dieser nicht-kovalenten Bindungsuntersuchungen erwartet werden. Dies müsste zu eindeutigeren Unterschieden in der MALDI-TOF-MS und PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse führen.

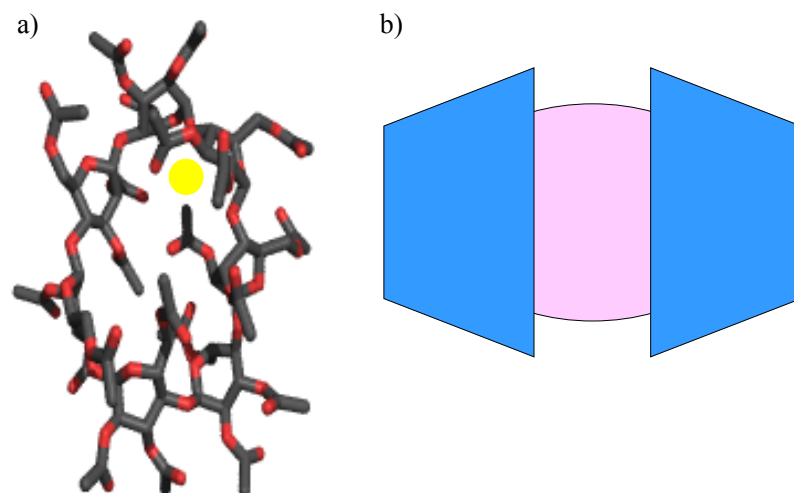


Abb. 3-65: Schematische Darstellung der Wirt-Gast-Systeme (Strukturen entsprechen jeweils nicht ihren Dimensionen): a) acetyliertes β -CD **20b** mit Kation; b) γ -CD- C_{60} - γ -CD **21a**²¹⁹: γ -CD 9 Å, C_{60} -Fulleren 7 Å im Durchmesser²²⁰.

CD ist ebenfalls ein geeignetes Wirtssystem, um die MALDI-TOF-MS auf dessen Potential zur Charakterisierung von neutralen Wirt-Gast-Systemen zu überprüfen (**Abb. 3-65b**). Dafür sollten literaturbeschriebene, wohl charakterisierte Ansätze zur Darstellung eines supramolekularen Systems gewählt werden, um dieses einer MALDI-TOF-MS-Analyse zu unterziehen.

3.3.1.3.2 Lineare und zyklische, acetylierte CDs mit ionischen Gästen

Zunächst wird β -CD **20b** (Synthesen s. Kapitel 6.3.1.4.10; **Abb. 6-9**; S. 265)^{XIV} peracetyliert, so dass ein Gemisch aus peracetyliertem linearen Mono- bis Heptameren und peracetylierten zyklischem β -CD erhalten wird. Dieses Reaktionsgemisch wird für die folgenden Untersuchungen eingesetzt.

3.3.1.3.2.1 Bindungselektivität.

Unterschiedliche Alkalimetalle wurden zum peracetylierten Reaktionsgemisch hinzugefügt, um die Bindungseigenschaften in Abhängigkeit von der Kettenlänge der linearen Strukturen und von der Konformation (lineares und zyklisches Heptamer) des acetylierten CDs zu untersuchen. Die peracetylierten linearen Oligomere zeigen, dass ≥ 2 Glukoseeinheiten erforderlich sind, um erfolgreich mit Lithium- und Natriumkationen zu binden, während ≥ 3 Glukoseeinheiten notwendig sind für eine effektive Wechselwirkung mit Rubidium- und Cäsiumkationen. Mit Zunahme der Kationengröße ist eine zunehmende Anzahl von Oligosaccharideinheiten für eine erfolgreiche Anbindung erforderlich (**Abb. 3-66**).

Die bevorzugte Wechselwirkung zwischen peracetylierten linearen Oligosacchariden mit unterschiedlichen Alkalimetallkationen wird ebenfalls untersucht, indem die höchste Signalintensität des Pseudo-Molekülions sowie die geringste Konkurrenz an unterschiedlichen Kationisierungsprozessen bestimmt wird, die in den Massenspektren erhalten werden. Die Differenzen fallen relativ gering aus. Eine schwach bevorzugte Bindung für Lithium- und Natriumkationen wird mit linearen Di- bis Hexameren gefunden. Kaliumkationen zeigen die geringste Konkurrenz an Pseudo-Molekülionenbildung bei den linearen und zyklischen Heptameren.

Die Interpretation der Massenspektren (**Abb. 3-66**) hinsichtlich der peracetylierten β -CD-Struktur stellt aufgrund der geringsten Konkurrenzionisation eine Selektivität mit Kaliumkationen fest. Analoge größenabhängige Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Alkylpolyglucosiden mittels ESI-MS gefunden. Mit zunehmender Alkylkettenlänge erfolgte eine bevorzugte Pseudo-Molekülionenbildung mit Ammonium- anstelle von Natriumkation²²¹.

Die Bindungstendenz von zyklischem CD zu Kaliumkationen ist in Korrelation mit dem linearen Heptamerderivat. Dieses Ergebnis ist überraschend, da beide aufgrund der starken Unterschiede der zyklischen und linearen Heptamerstruktur variieren. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die heptamere Kettenlänge eine ähnliche Anbindung des ionischen K^+ -Gastes an die lineare und an die zyklische Wirtstruktur erlaubt.

^{XIV} Die Synthese wurde von Herrn *Stefan Schiller* im Rahmen seiner Doktorarbeit im AK *Prof. W. Knoll*, MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

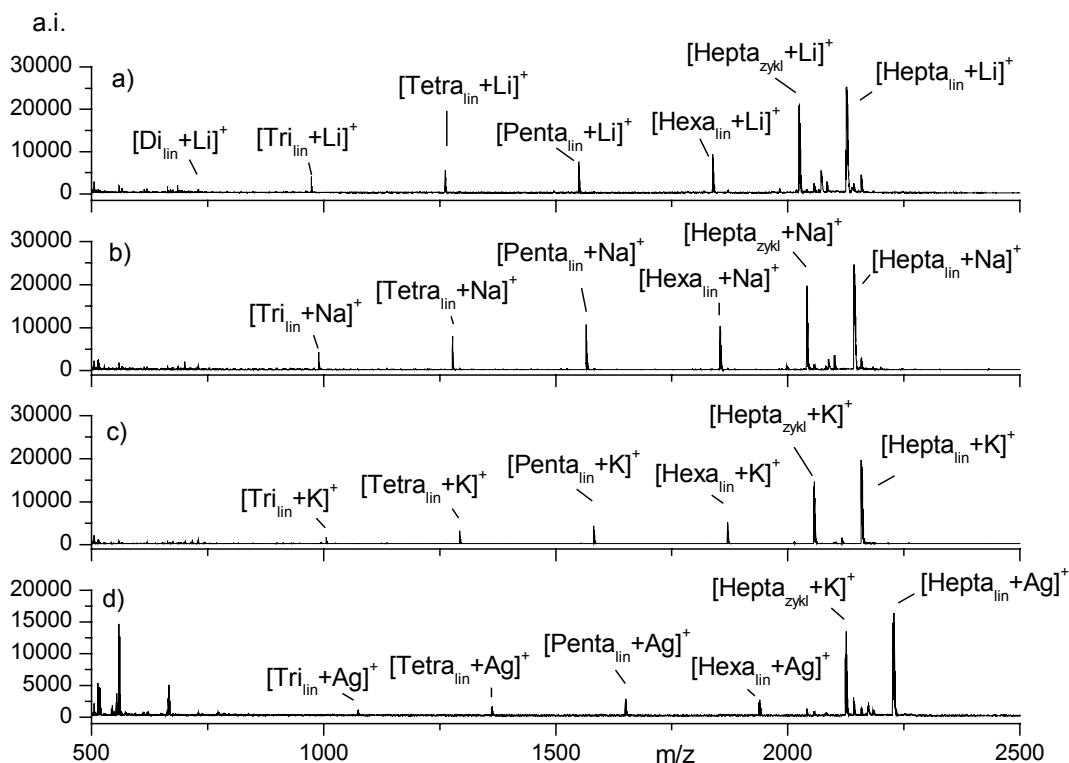


Abb. 3-66: Massenspektren von **20b** in Abhängigkeit der zugesetzten Metalltrifluoroacetate: a) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$; b) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$; c) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{K}$; d) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$.

Ag^+ kann auch als ionischer Gast in zyklisches β -CD eingebaut werden, ebenfalls wird eine hohe Wechselwirkung mit den linearen Strukturen gefunden. Diese Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass Silberkationen effektiv mit Aromaten unter Ausbildung einer Sandwichstruktur wechselwirken¹⁹⁶. Eine effektive Wechselwirkung von Ag^+ kann ebenfalls mit den freien Elektronenpaaren der Sauerstoffatome eingegangen werden. Metallsalzzusätze wie CaCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 , MgSO_4 , $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ führen nicht zur Detektion eines ionischen Wirt-Gast-Komplexes.

3.3.1.3.2.2 Größenselektivität.

Die Lithium-, Kalium- und Cäsiumalkalimetallkationen werden hinsichtlich deren Wechselwirkung mit linearem und zyklischem Heptamer untersucht (**Abb. 3-65**, S. 133). Hierfür wurden jeweils PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren in Abhängigkeit der Laserleistung aufgenommen.

Lithium als kleinstes Kation zeigt beim linearen Heptamer eine sehr hohe Tendenz zur Fragmentierung. Bei höheren Laserleistungen werden Fragmente bis zum Monomeren gefunden. Dabei zeigt dieses auch eine sehr intensive Fragmentierung der Acetylgruppen. Die Fragmentationen stehen im Einklang mit literaturbeschriebenen Untersuchungen²²². Bei Anwendung von niedrigeren Laserleistungen werden nur noch untergeordnet Fragmentierungen der Oligomerhauptkette gefunden. Es tritt bevorzugt eine Seitenkettenfragmentierung ein (**Abb. 3-68**).

Da supramolekulare Aspekte der MALDI-Fragmentierung im Vordergrund dieser Untersuchung stehen, soll an dieser Stelle nur kurz auf die Strukturzuweisung der Fragmentionen eingegangen werden. Die literaturbeschriebenen Fragmentmuster der Rückgrat- und Seitenkettenbrüche²²² werden gefunden (**Abb. 3-67**).

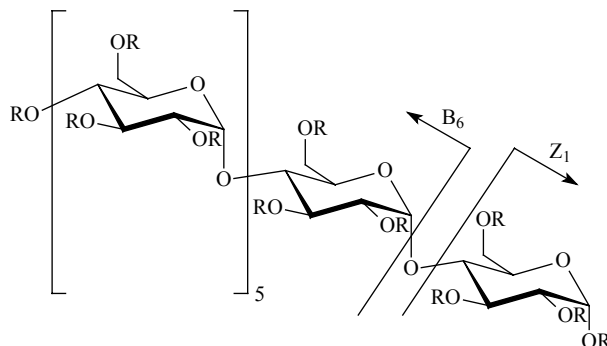


Abb. 3-67: Nomenklatur der Fragmentierung von linearem Heptamer.

Im zyklischen Fall werden für ein Lithiumkation, unabhängig von den angewendeten Laserleistungen, keine sequenzspezifischen Informationen erhalten (**Abb. 3-68**). Bei schwachen Laserleistungen werden nur im niedermolekularen Bereich Signale gefunden, die von Seitenkettenfragmentierungen herrühren müssen. Mit höheren Laserleistungen wird zusätzlich zur starken Seitenkettenfragmentierung zu einem geringen Maß Fragmentierung der Oligomerhauptkette gefunden. Die geringe Intensität kann dadurch erklärt werden, dass zwei Fragmentbrüche stattfinden müssen. Die gebildeten Fragmentionen liefern ausgesprochen breite und unaufgelöste Signale.

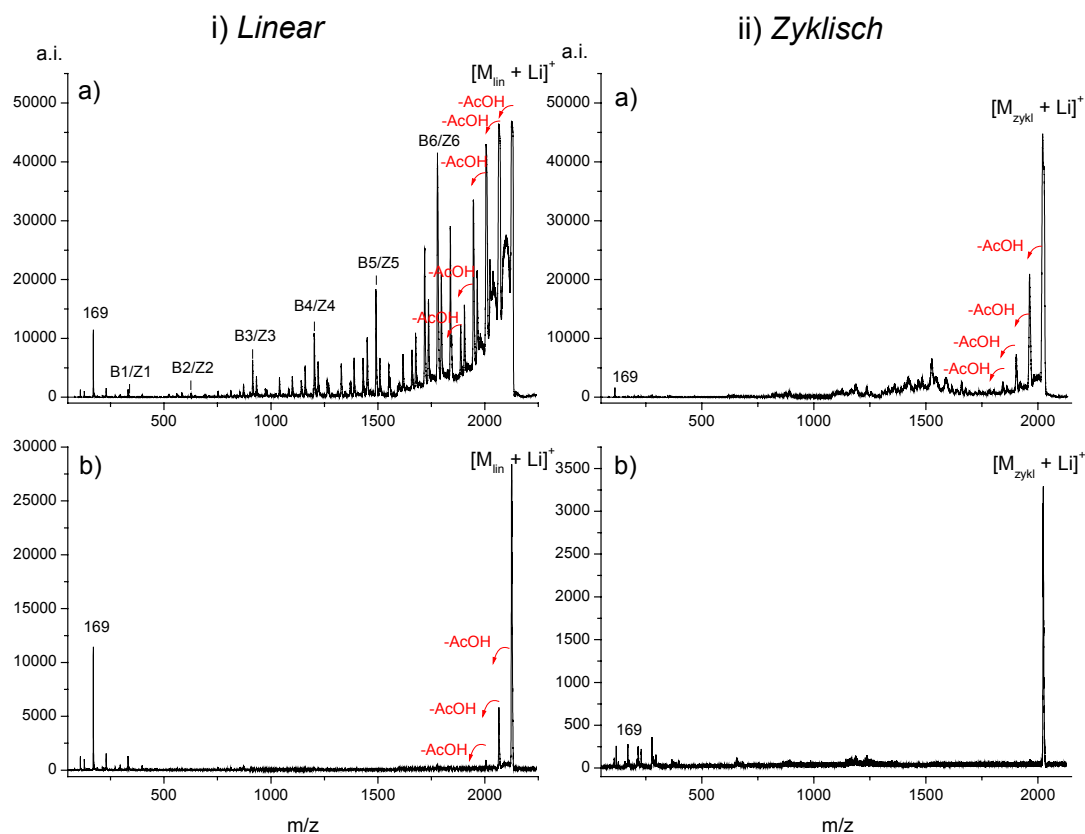


Abb. 3-68: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von **20b** mit Li⁺: i) lineares Heptamer: a) hohe Laserleistung, b) geringe Laserleistung; ii) zyklisches Heptamer: a) hohe Laserleistung, b) geringe Laserleistung).

Bei der Kaliumkationisierung wird beim linearen Heptamer bei hohen Laserleistungen eine hohe Tendenz zur Fragmentierung gefunden. Diese ist jedoch im Vergleich zur Lithiumkationisierung deutlich geringer. Es werden auch nur trimere Fragmentationen detektiert. Dies steht im Einklang damit, dass mit zunehmender Kationengröße die Kettenlänge ebenfalls ansteigen muss, um eine effektive Wechselwirkung zu ermöglichen.

Beim zyklischen Heptamer wird mit höheren Laserleistungen eine sehr intensive Fragmentierung der Acetylgruppen gefunden (**Abb. 3-69**). Die Fragmentbrüche der Oligomerhauptkette sind sehr gering und sehr breit. Im Vergleich zu Li⁺ übersteht der K⁺/Oligomer-Komplex in deutlich geringerem Maß einen zweifachen Rückgratbindungsbruch ohne dass eine unerwünschte Dissoziation eintritt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Lithiumkation effektiver mit dem Oligomer wechselwirkt als das größere Kaliumkation.

Mit niedrigen Laserleistungen nimmt die Fragmentierung bei linearem und zyklischem Heptamer deutlich ab.

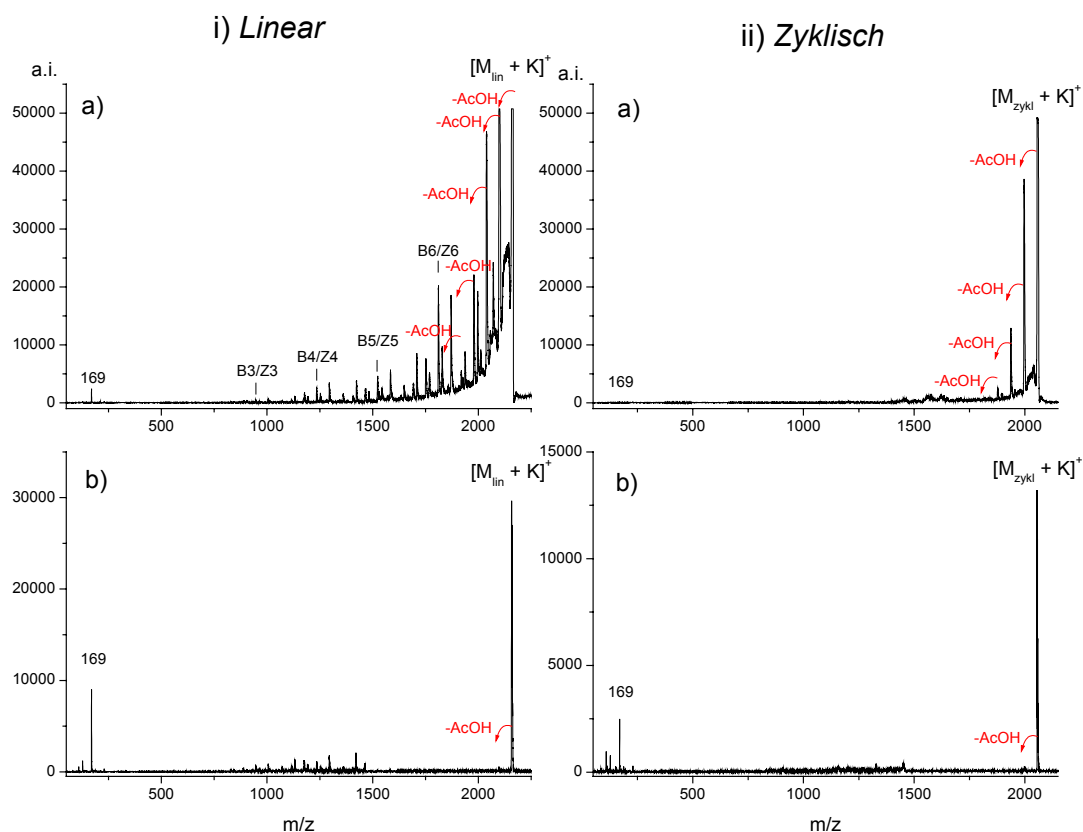


Abb. 3-69: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von **20b** mit K^+ : i) lineares Heptamer: a) hohe Laserleistung, b) schwache Laserleistung; ii) zyklisches Heptamer: a) hohe Laserleistung, b) schwache Laserleistung).

Für die Cäsiumkationisierung wird beim linearen Heptamer bei hohen Laserleistungen eine hohe Tendenz zur Seitenkettenfragmentierung gefunden (**Abb. 3-70**). Nur sehr untergeordnet werden Fragmentbrüche der Oligomerhauptkette gefunden. Die minimale Oligomerkettenlänge, die bei Cäsiumkationisierung nachgewiesen werden kann, ist das Pentamere (**Abb. 3-70**: hohe Laserleistung).

Somit kann festgestellt werden, dass mit zunehmender Kationengröße die Kettenlänge des Oligomers ebenfalls ansteigen muss, um eine effektive Wechselwirkung der beiden zu ermöglichen. Die neuen Erkenntnisse sind, dass die Fragmentierungspfade des zyklischen Oligomers nahezu identisch sind mit dem Linearen:

- nahezu ausschließlich tritt Seitenkettenfragmentierung ein (**Abb. 3-70**: hohe Laserleistung),
- relativ ähnliche Tendenz der Cäsiumdissoziation (**Abb. 3-70**: niedrige Laserleistung).

Zur Erklärung dieses Ergebnisses können aufgrund der jeweils gezielt durchgeführten laserleistungsabhängigen PSD-MALDI-TOF-Analyse laserleistungsbedingte Ursachen ausgeschlossen werden. Diese Konformität der Ergebnisse könnte durch nahezu gleichartige Wechselwirkungen zwischen Oligomer und Kation verursacht werden.

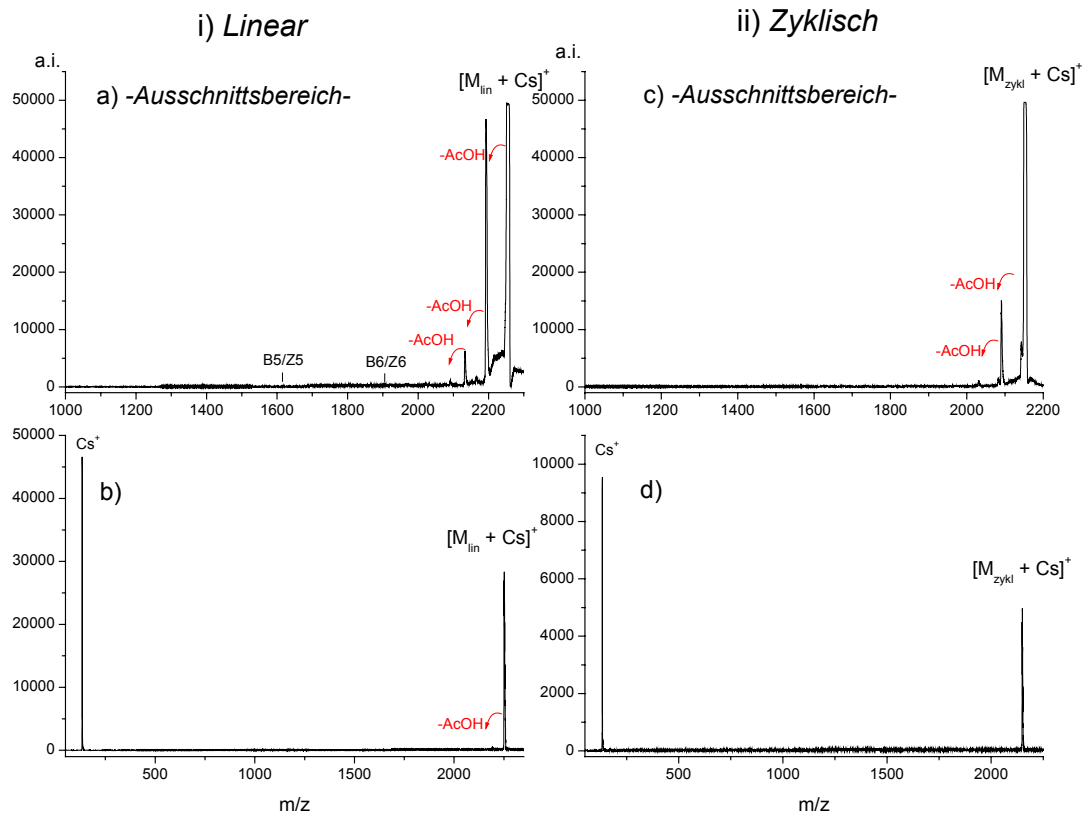


Abb. 3-70: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von **20b** mit Cs^+ : i) lineares Heptamer: a) hohe Laserleistung, b) geringe Laserleistung; ii) zyklisches Heptamer: a) hohe Laserleistung, b) geringe Laserleistung).

Weiterführende Untersuchungen ergeben, dass bei beiden Strukturen die Signalintensität des Cäsiumkations eine Abhängigkeit von der verwendeten Detektorspannung **Abb. 3-71 (b,c und f,g)** und von der Laserleistung zeigt **Abb. 3-71 (c,d und g,h)**. Bei weniger Laserleistung wird für die zyklische Struktur keine Cäsiumdissoziation mehr gefunden. Der Cs^+ -Gast wird demnach im zyklischen Heptamer-Wirt effektiver gebunden als im Linearen.

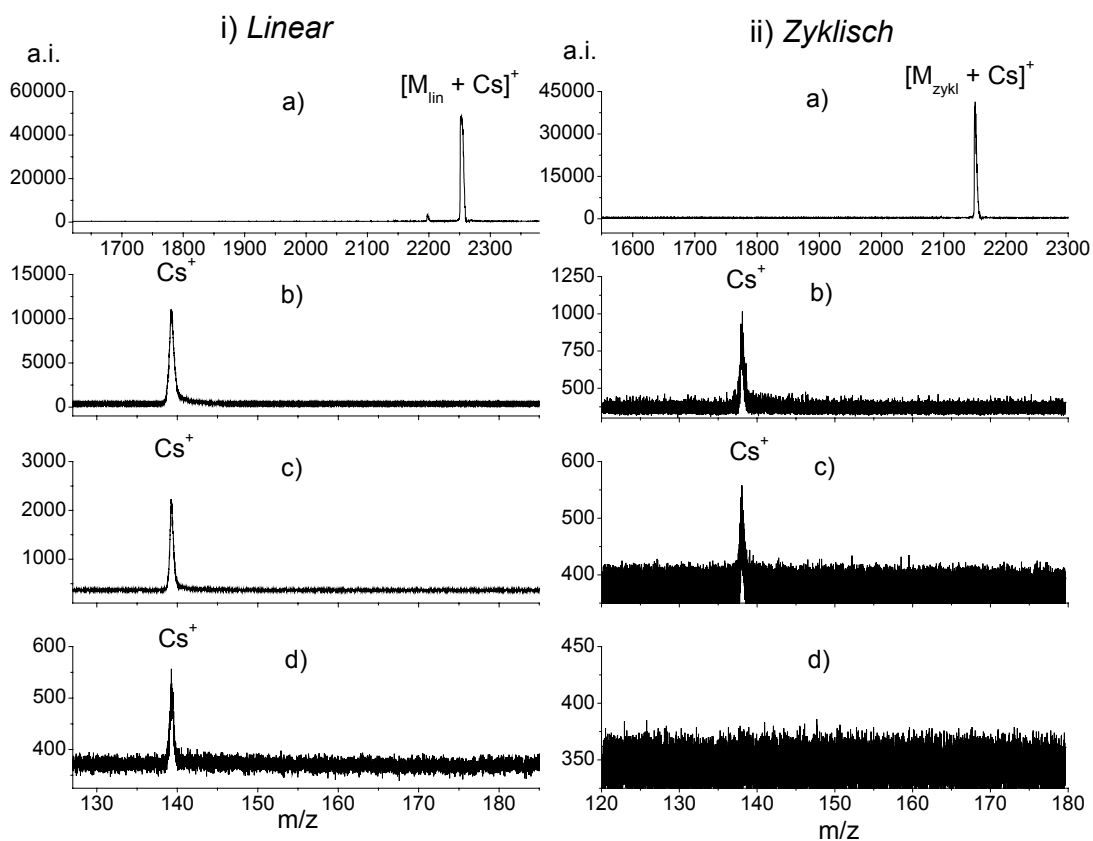


Abb. 3-71: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von **20b** mit Cs^+ in Abhängigkeit der relativen Laserleistung (in Klammern): i) Lineares Heptamer: a) Segment 1, Detektorspannung 1,6 (39); b) Segment 11, Detektorspannung 1,8 (39); c) Segment 11, Detektorspannung 1,6 (39), d) Segment 11, Detektorspannung 1,6 (35); ii) Zyklisches Heptamer: a) Segment 1, Detektorspannung 1,6 (39); b) Segment 11, Detektorspannung 1,8 (39); c) Segment 11, Detektorspannung 1,6 (39); d) Segment 11, Detektorspannung 1,6 (35).

Um den Erkenntnissen zu strukturellen, kationengrößen- bzw. oligomerenlängenabhängigen Ursachen nachzugehen, werden gezielt acetylierte Oligosaccharide mit variierenden Wiederholungseinheiten synthetisiert. Die PSD-MALDI-TOF-Analyse in Abhängigkeit von der Struktur und der Kettenlänge des Oligomers werden in der Art vergleichend durchgeführt, dass der prozentuale Dissoziationsgrad von Cs^+ ermittelt wird. Dies erfolgt über das Verhältnis der Signalintensität des Elternions in Segment 1 gegen die Signalintensität des Cäsiums in Segment 11 für Hexamer und Heptamer und Segment 12 für das Oktamer. Aufgrund der unterschiedlichen Segmente sind dies keine absoluten sondern nur vergleichende Werte. Dies ist durch die messtechnische MALDI-TOF-Fragmentationanalyse bedingt (Kapitel 2.2.2, S. 26). Das elektronische „Gate“ und die Laserleistung wurden gleichermaßen jeweils identisch gewählt.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen von linearen und zyklischen hexameren, heptameren und oktameren Oligosacchariden sind in **Tabelle 3-3** zusammengestellt. Dieser analytische Ansatz ermöglicht nachzuweisen, dass im zyklischen Fall die Cäsiumdissoziation mit

unterschiedlichen Oligomerlängen näherungsweise gleich bleibt. Damit kann angenommen werden, dass keine nennenswerten Änderungen in der Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast vorliegen.

Tabelle 3-3: Bestimmung der Cäsiumdissoziation in Abhängigkeit der Struktur des Analyten.

Dextrin	Dissoziation des Cäsiumkations aus der zyklischen Struktur (in %)	Dissoziation des Cäsiumkations aus der linearen Struktur (in %)
α -CD (6-mer) 20a	36	38
β -CD (7-mer) 20b	34	40
γ -CD (8-mer) 20c	28	8

Im Gegensatz dazu wird eine erhebliche Änderung im linearen Fall dahingehend gefunden, dass mit Verlängerung um eine Oligomereinheit eine wesentlich geringere Cäsiumdissoziation auftritt. Diese stabilere Cs^+ /Oligosaccharid-Wechselwirkung steht im Einklang damit, dass mit zunehmender Größe des Kations eine effektive Wechselwirkung nur mit zunehmender Kettenlänge eingegangen werden kann. Betrachtet man das konträre Ergebnis zwischen linearem und zyklischem Oktamer, so wird deutlich, dass das lineare Oligomer das Cäsiumkation deutlich besser komplexiert als das zyklische Oligomer. Dies kann durch die starre Konformation des zyklischen Oligomers erklärt werden, welche es nicht erlaubt, sich flexibel um das Kation zu lagern.

Aus diesen PSD-MALDI-TOF-Ergebnissen wird gefolgert, dass die Gasphasenkonformation der linearen Heptamerstruktur in gewisser Weise den Bindungseigenschaften der zyklischen Wirtstruktur mit dem ionischen Cs^+ -Gast entspricht. Dies hebt den Effekt der nicht-kovalenten Wechselwirkung zwischen Sauerstoff und dem Metallkation hervor, um Konformationen zu beeinflussen. Die bevorzugte Wechselwirkung des Oktamers mit Cäsiumkation ist aufgrund der Flexibilität zugunsten der linearen Struktur verschoben. Die Gasphasenkonformationen entsprechen sich bei Cs^+ und dem Oktamer in Abhängigkeit der zyklischen und linearen Struktur aufgrund der erhaltenen Dissoziationsergebnisse nicht mehr. Ergebnisse von LIFT-Testmessungen^{XV} bestätigen diese Untersuchungen (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.3.3 Supramolekulare Festkörperreaktionen von γ -CD mit neutralen Gästen

Der Einbau eines neutralen C_{60} -Fulleren-Gastes in γ -CD **21a** (Synthesen s. Kapitel 6.1.2, S. 266) durch supramolekulare Festkörperreaktion mittels Kugelmühle wurde zeitaufwendig durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert^{219,220}. Als neutrale Gäste wurde hier ein $\text{C}_{60}/\text{C}_{70}$ -Fulleren-Gemisch verwendet. Im Folgenden wird zur Vereinfachung auf den C_{60} -Gast Bezug genommen. Die MALDI-TOF-MS-Analyse wird parallel zur ^{13}C -NMR-Charakterisierung (in D_2O bei 323 K) durchgeführt, in dem das Reaktionsgemisch der Festkörperreaktion mit Matrix und gegebenenfalls Metalltrifluoracetatsalz versetzt und mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS untersucht wird. Die MALDI-TOF-Massenspektren sind in **Abb. 3-72** zusammengestellt.

Dithranol als Matrix erlaubt die Detektion des Na-Pseudo-Molekülions in einem geringen Maße (**Abb. 3-72a**). Ein wesentlich intensiveres Signal wird hierfür bei gezielter Zugabe von

^{XV} Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn *Dr. F.-J. Mayer-Posner*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen.

Natriumtrifluoracetat gefunden (**Abb. 3-72b**). Durch die Verwendung von Dithranol als Matrix wird der neutrale C_{60} -Gast nicht detektiert. Bei Zugabe von Natriumtrifluoracetat zur MALDI-Probenmischung wird der C_{60} -Gast ebenfalls nicht detektiert. Bei deutlich höheren Laserleistungen wird zusätzlich zum CD-Wirt als Na-Pseudo-Molekülon der C_{60} -Gast als Radikalkation charakterisiert (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis des Wirt-Gast-Komplexes **21a** erfolgt nicht bei diesen Präparationsbedingungen. Durch die Verwendung von TCNQ-Matrix wird in einem hohen Maß der neutrale C_{60} -Gast in radikalkationischer Form detektiert (**Abb. 3-72c**). Durch die Zugabe von Natriumtrifluoracetat wird der radikalkationische C_{60} -Gast neben dem Na-Pseudo-Molekülon des CD-Wirtes gefunden (**Abb. 3-72d**). Durch die Verwendung von TCNQ als Matrix ist die Charakterisierung des Wirt-Gast-Komplexes **21a** ebenfalls nicht möglich. Bei LD-TOF-Messungen wird vor allem der radikalkationische C_{60} -Gast charakterisiert (**Abb. 3-72e**).

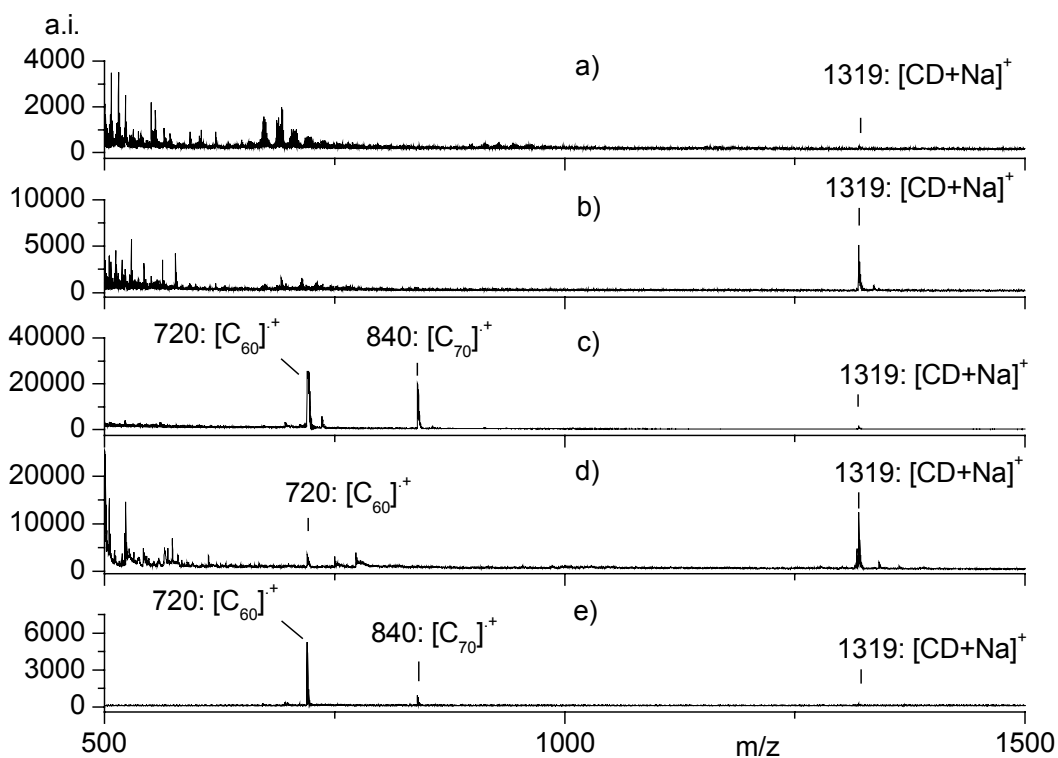


Abb. 3-72: Massenspektren des Festkörperreaktionsgemisches von γ -CD und C_{60} - und C_{70} -Fullerenen unter Variation der lösungsmittelfreien Probenpräparation und der relativen Laserleistung 25: a) MALDI: Dithranol; b) MALDI: Dithranol, CF_3CO_2Na ; c) MALDI: TCNQ; d) MALDI: TCNQ, CF_3CO_2Na ; e) LD.

Diese Ergebnisse werden wie folgt interpretiert. Die Dithranol-Matrix charakterisiert bei moderaten Laserleistungen ausschließlich den Wirt, welcher in einem zehnmolaren Verhältnis im Reaktionsgemisch vorliegt. Plausibel erscheint, dass eine supramolekulare ionische Wirt-Gast-Struktur wegen der neutralen Wirt-Gast-Struktur nicht eingegangen werden kann, da die Kavität des Wirtes (**Abb. 3-65**, S. 133) besetzt ist. Der Wirt-Gast-Komplex wird daher möglicherweise mangels Ladung

oder wegen eines schnellen Zerfalls aufgrund zu geringer zwischenmolekularer Wechselwirkungen nicht detektiert.

Erst bei höheren Laserleistungen wird soviel Energie in den Komplex eingebracht, dass auch der zunächst von zwei Seiten nahezu vollständig von CD ummantelte C₆₀-Gast (**Abb. 3-65**, S. 133) selbst eine radikalkationische Ionisation eingehen kann. Über die zeitliche Abfolge der Dissoziation des Wirt-Gast-Komplexes bzw. Ionisation des C₆₀-Gastes kann keine nähere Aussage getroffen werden. Durch die Ionisation des C₆₀-Gastmoleküls bei höheren Laserleistungen wird dann die Detektion ermöglicht.

Die TCNQ-Matrix erlaubt niedrigere Laserleistungen anzuwenden als die Dithranol-Matrix. Da diese Matrix aber die radikalkationische Ionisation des C₆₀-Gastes unterstützt, wird eine erhöhte Dissoziation des Wirt-Gast-Komplexes verursacht. Dies führt zu einer erhöhten Detektion des C₆₀-Gastes als radikalkationisches Ion. Durch Zugabe von Natriumtrifluoracetat ist dieser Effekt der Matrix weniger ausgeprägt. Dieser Erklärungsansatz ist spekulativ und die beobachteten Ergebnisse könnten ebenfalls auf starken Unterdrückungseffekten beruhen.

Um die obigen Annahmen zu verifizieren, wird die analoge Untersuchung an einem Beispiel **21b** durchgeführt, bei welchem der Gast aufgrund seiner Größe/Struktur nicht in die Kavität des γ -CDs passt wie z.B. größere PAHs. Diese sind nicht nur wegen der Größe und der planaren Molekülstruktur hierfür vorteilhafte Modellmoleküle, sondern ebenfalls, weil sie analog C₆₀-Fulleren direkt die Energie des Laserschusses aufnehmen und radikalkationische Ionisation eingehen. Das ausgewählte neutrale Gast-Molekül ist C₄₂H₁₈-PAH^{XVI}. Die Ausdehnung von 11 Å lässt den Einbau in γ -CD (9 Å) nicht zu.

Die MALDI-TOF-Massenspektren zeigen das freie, radikalkationische C₄₂H₁₈-Gastmolekülion (**Abb. 3-73**) bei sämtlichen angewendeten Probenpräparationsbedingungen, die identisch zu denen des C₆₀-Gastmoleküls durchgeführt wurden. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass im Falle des supramolekularen Komplexes (γ -CD)₂C₆₀ **21a** kein Unterdrückungseffekt bei Verwendung von Dithranol-Matrix und CF₃CO₂Na den Nachweis von C₆₀-Fulleren verhinderte (**Abb. 3-72b**). C₆₀-Fulleren sollte also bei diesen Bedingungen im CD eingebaut sein.

Diese Untersuchungen lassen die indirekte MALDI-TOF-MS-Charakterisierung eines supramolekularen Wirt-Gast-Systems zu. Diese Ergebnisse zeigen jedoch auch die starken Limitierungen der direkten MALDI-TOF-MS-Analyse auf dem Gebiet der supramolekularen neutralen Wirt-Gast-Komplexe.

^{XVI} Die Synthese wurde von Herrn C. Simpson im Rahmen seiner Promotion im AK Prof. K. Müllen am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

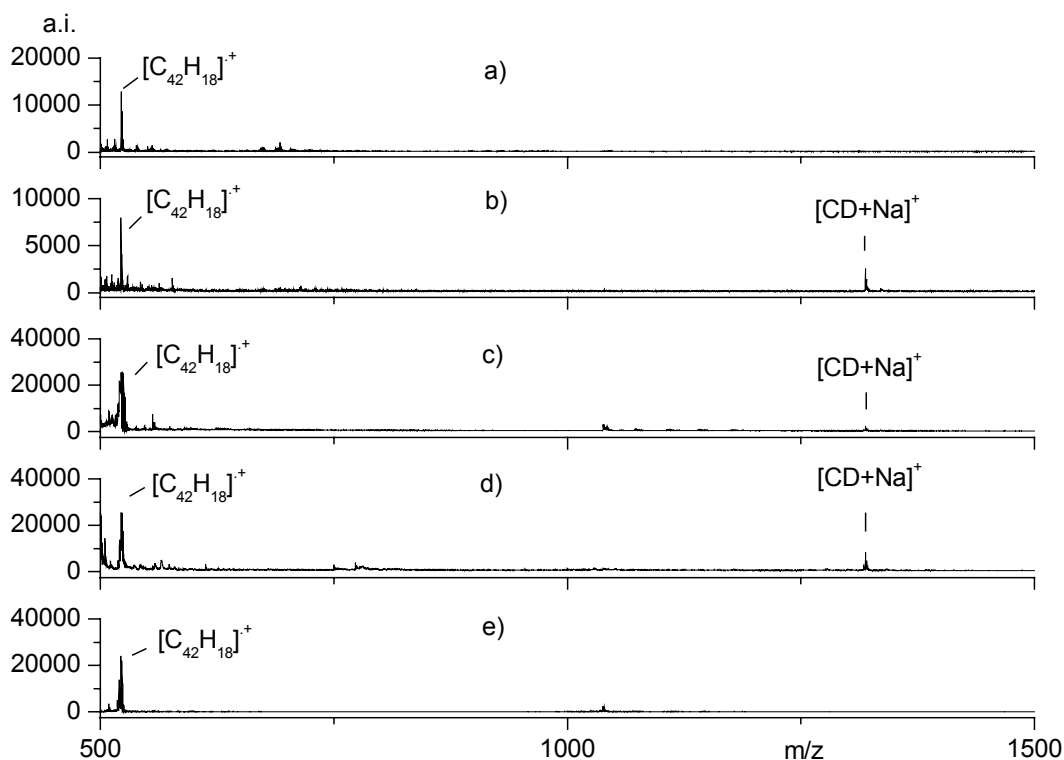


Abb. 3-73: Massenspektren des Festkörperreaktionsgemisches von γ -CD und $C_{42}H_{18}$ -PAH unter Variation der lösungsmittelfreien Probenpräparation und der relativen Laserleistung 25: a) MALDI: Dithranol; b) MALDI: Dithranol, Na^+ ; c) MALDI: TCNQ; d) MALDI: TCNQ, Na^+ ; e) LD.

3.3.2 Resümee

Die MALDI-TOF-MS kombiniert mit der PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik konnte für die direkte Charakterisierung von supramolekularem aluminiumendgruppenmodifiziertem Polyfluoren eingesetzt werden. Die Zielstruktur Alq_3 -Polyfluorene konnte nicht zugänglich gemacht werden, da die schwachen zwischenmolekularen Kräfte die Dissoziation von Hydroxychinolin unter Bildung eines einfach positiv geladenen Alq_2 -Polyfluorens verursacht. Im Falle von Strukturelementen mit besonderen Endgruppenmodifikationen ist die Bestimmung des Ionisationsmechanismus von großem Interesse, um überhaupt eine Interpretation der massenspektrometrischen Ergebnisse durchführen zu können. Dadurch konnte eine aufschlussreiche Endgruppenanalyse durchgeführt werden.

Eine weiterführende Untersuchung ermöglichte durch geeignete Probenpräparations- und Messbedingungen die Charakterisierung eines metallo-supramolekularen Kupferkomplexes. Die Detektorsättigung durch niedermolekulare Moleküle konnte durch das elektronische PSD-„Gate“ gezielt behoben werden, so dass die Detektion des supramolekularen Komplexes mit einer hohen Übereinstimmung mit der simulierten Isotopenverteilung ermöglicht wurde. Dabei muss auf eine Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^+ während des MALDI-Prozesses geschlossen werden.

Supramolekulare ionische Wirt-Gast-MALDI-TOF-MS-Untersuchungen zeigten spezifische Wechselwirkungen in Abhängigkeit der Kationengröße und der Oligosaccharidstruktur. Die PSD-MALDI-TOF-Analyse ermöglichte es, zunächst die Fragmentierung dieser Komplexe zu eruieren. Durch die Fragmentierungstendenz und den -pfad konnte eine Korrelation zwischen der Gasphasenkonformation von linearen und zyklischen Oligosacchariden mit Cäsiumkation angenommen werden.

Wirt-Gast-Systeme neutraler Moleküle, die mittels supramolekularer Festkörperreaktion hergestellt wurden, konnten nicht mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert werden. Der Nachweis erfolgte nur indirekt durch geeignete massenspektrometrische und spektroskopische Vergleichsmessungen.

3.4 Anwendung der MALDI-TOF-MS-Analyse zur Synthesekontrolle, Reinheitsbestimmung und Identifizierung von Neben- und Abbauprodukten

3.4.1 Motivation

Durch geeignete Probenpräparations- und Messbedingungen soll die Anwendbarkeit der MALDI-TOF-MS für die direkte, zuverlässige qualitative Analyse schwer zu charakterisierender Analyten (z.B. Labilität, Unlöslichkeit, Substanzgemische) evaluiert werden, bei denen andere konventionelle Methoden (z.B. NMR-Spektroskopie, GPC-Analyse) nur unzureichende Informationen liefern oder gänzlich versagen. Diese anwendungsmotivierten Untersuchungen konzentrieren sich daher nicht auf die Charakterisierung von Endprodukten, sondern schließen ebenfalls Synthesewechselstufen mit ein. Des Weiteren sollen die analytischen Möglichkeiten und Limitierungen zur quantitativen MALDI-TOF-MS-Charakterisierung von Gemischbestandteilen aufgezeigt werden.

3.4.2 Methodischer Vergleich am Beispiel der Nahe Infrarot-Farbstoffe

Die MALDI-TOF-MS-Methode ist am effektivsten im niedrigeren Massenbereich, in dem einzelne Moleküle isotopenaufgelöst dargestellt werden können (< 10.000 Da). Der zunächst als Modellstruktur ausgewählte Nahe Infrarot (NIR)-Farbstoff **22** (700 Da, **Abb. 3-74**)^{xvii} liegt in diesem Bereich, wodurch eine direkte und schnelle massenspektrometrische Charakterisierung des Syntheseproduktes ermöglicht sein sollte. Der Nachweis der erfolgreichen Cyclodehydrierung (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-10**; S. 266) muss durch den Massenverlust von zwei Wasserstoffatomen erbracht werden. Die Differenz von zwei Masseneinheiten zwischen Edukt und Produkt setzt eine hohe Auflösung der massenspektrometrischen Methode voraus, um mittels der Isotopenverteilungen und möglichen Überlagerungen eine eindeutige Strukturdifferenzierung und -zuordnung machen zu können. Mit interferierendem Matrixuntergrund muss jedoch ebenfalls in diesem Massenbereich gerechnet werden. NIR-Farbstoffe können Laserlicht zu einem gewissen Anteil direkt absorbieren und zeigen somit eine erhöhte Fragmentierungstendenz. Eine Überlagerung der Isotopenverteilungen unterschiedlicher Gasphasenprozesse könnte eine eindeutige Charakterisierung mittels MALDI-TOF-MS unmittelbar verhindern. Des Weiteren ist die Einheitlichkeit dieser Reaktion von besonderem Interesse. Eine erforderliche Semiquantifizierbarkeit mittels der MALDI-TOF-MS ist jedoch auf Ausnahmefälle beschränkt^{91,119,120,121} und muss daher durch vergleichende analytische Methoden gestützt werden. Diese Überlegungen motivieren die qualitativen und quantitativen Möglichkeiten der MALDI-TOF-MS hinsichtlich dieser Substanzklasse zu evaluieren.

Aufgrund der geringen Molekulargewichte der NIR-Farbstoffe **22**²²³ wurde zunächst die Strukturverifizierung durch die NMR- und UV/Vis-Spektroskopie sowie durch die korrekte

^{xvii} Die Synthese wurde von Herrn *Dr. S. Becker* im Rahmen seiner Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

Elementaranalyse geführt. Jedoch zeigten sich diese Methoden zur Charakterisierung zum Teil als sehr zeitaufwendig (z.B. mehrdimensionale NMR-Spektroskopie).

Die Löslichkeit dieses NIR-Farbstoffes **22** ist trotz des eingeführten 2,6-Diisopropylphenylsubstituenten gering. Das MALDI-TOF-Massenspektrum, das durch konventionelle lösungsmittelbasierende Probenpräparation erhalten wurde, zeigt in **Abb. 3-74c** die erhaltene Isotopenverteilung, die nicht eindeutig der des Cyclodehydrierungsproduktes zugeordnet werden kann. In **Abb. 3-74a** wird die entsprechende computersimulierte Isotopenverteilung des zu erwartenden Produktes dargestellt. Diese Abweichungen sind wahrscheinlich auf eine Wasserstoffradikalabstraktion zurückzuführen.

Dies steht im Einklang mit Untersuchungen größerer konjugierter Π -Systeme, die eine bevorzugte radikalkationische Ionisation und eine mit diesem Ionisationsmechanismus einhergehende Wasserstoffradikalabstraktion aufweisen. Spuren des Eduktes können bei **22** aufgrund der ergänzenden Charakterisierungsmethoden ausgeschlossen werden.

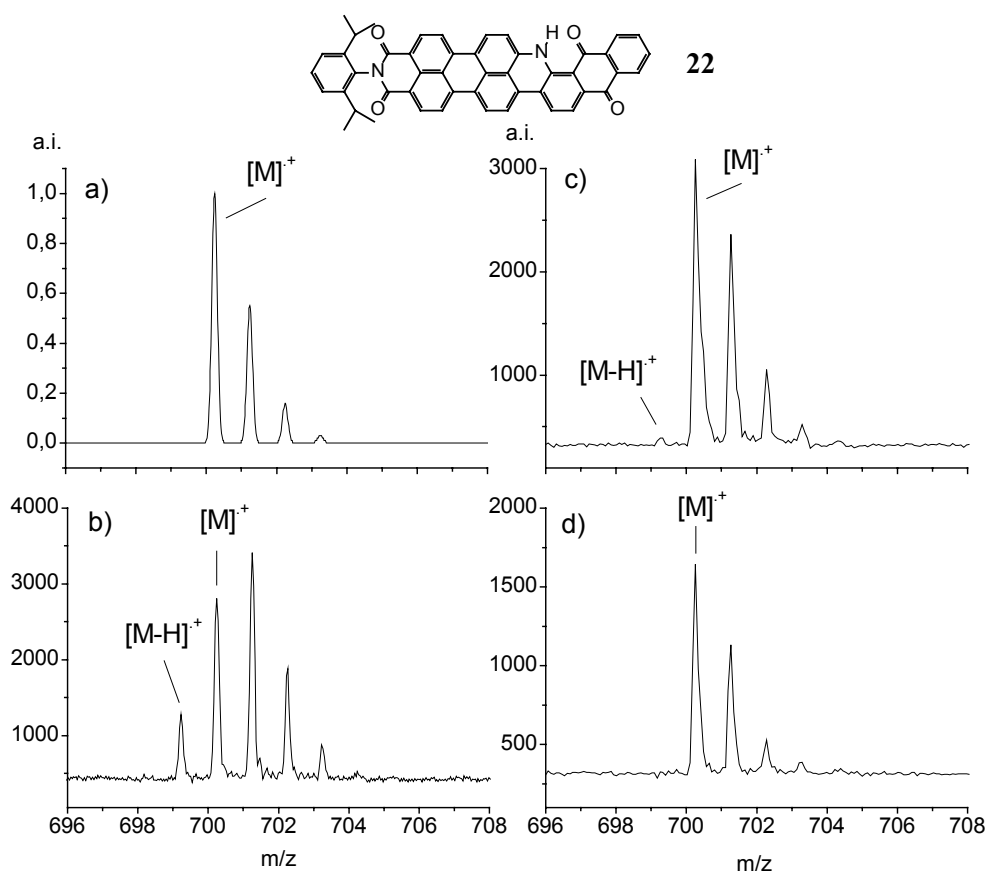


Abb. 3-74: Strukturformel und Massenspektren mit isotopenaufgelösten Signalen von **22**: a) Simulation; b) LD-TOF-MS; c) lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS; d) lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS.

Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS erlaubt, wie in **Abb. 3-74d** dargestellt, ein Massenspektrum zu erhalten, das neben der korrekten Masse auch die zu erwartende Isotopenverteilung zeigt. Eine Wasserstoffradikalabstraktion wird bei geringer Laserleistung nicht detektiert, sondern erst mit erhöhter Laserleistung jedoch ebenfalls. Dieses Ergebnis steht im Einklang

mit der Reinheit von **22**, die zusätzlich mit UV/Vis und NMR-spektroskopischen Methoden ermittelt wurden.

Nähere Untersuchungen zum Effekt der Wasserstoffradikalabstraktion bzw. der Diskrepanz zwischen lösungsmittelbasierender und lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen angewandeter Laserleistung, Wasserstoffradikalabstraktion und einem effektiven MALDI-Mechanismus der zugrundeliegenden Probenpräparation besteht. So zeigt das LD-TOF-Massenspektrum von **22** (**Abb. 3-74b**) die stärkste Wasserstoffradikalabstraktion und damit die größte Abweichung zur simulierten Isotopenverteilung. Ein Rückschluss auf das Elternion wäre mittels dieser experimentell ermittelten Isotopenverteilung nicht möglich. Die lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS ermöglicht durch die Matrix eine gewisse Unterstützung im Desorptions/Ionisationsschritt des Analyten, da dessen Tendenz der Wasserstoffradikalabstraktion verringert wird (**Abb. 3-74c**). Die milde Übertragung der Laserleistung über die Matrix ist bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation (**Abb. 3-74d**) effektiver, da keine Wasserstoffradikalabstraktion auftritt. Dies kann ausschließlich mit einer verbesserten Homogenität von Analyt und Matrix erklärt werden, welche die Anwendung geringerer Laserleistungen erlaubt und damit die Wasserstoffradikalabstraktion weniger ausgeprägt induziert. Folgende Reihe ist bezüglich der Wasserstoffradikalabstraktion und der damit verbundenen Effektivität des MALDI-Mechanismus hinsichtlich dieser Substanzklasse festzuhalten:

LD > lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS > lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS.

Eine FD-Testmessung von **22** weist Isotopensignale auf (Daten nicht gezeigt), die ausschließlich das Cyclodehydrierungsprodukt zeigen. Dadurch kann das Phänomen der Wasserstoffradikalabstraktion tatsächlich mit dem Desorptions/Ionisationsmechanismus korreliert werden. Zusätzlich wird erneut die Reinheit von **22** gezeigt, die mit UV/Vis- und NMR-spektroskopischen Methoden ermittelt wurde, und untermauert die Aussage, die mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS erzielt werden konnte.

Die MALDI-TOF-MS zeigt sich als eine Methode, die, unter Anwendung der geeigneten Probenpräparation, diese UV-absorbierende Substanzklasse der NIR-Farbstoffe intakt zu charakterisieren vermag. Aufgrund der systematischen, vergleichenden Untersuchungen hinsichtlich der Zuverlässigkeit der MALDI-TOF-MS ließen sich im Folgenden die Produkte verschiedenster NIR-Absorber, unabhängig von Synthesebausteinen und Molekulargewichten, schnell und einfach mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS fragmentierungsfrei ermitteln. Andere Methoden (Daten nicht gezeigt) erwiesen sich als nachteilig (z.B. zeitaufwendige NMR-Spektroskopie) bzw. versagten mit steigendem Molekulargewicht der NIR-Farbstoffe (z.B. FD-MS).

3.4.3 Analytik von Dendrimeren

3.4.3.1 Analytische Herausforderungen

Dendrimere sind im Idealfall monodisperse, dreidimensionale Makromoleküle und können aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes und ihrer definierten Struktur als ein „Bindeglied“ zwischen organischer und Polymerchemie betrachtet werden. In Analogie zu Biopolymeren handelt es sich bei Dendrimeren ebenfalls um strukturperfekte Verbindungen (**Abb. 3-75a**: biopolymeranalogen Dendrimertriade; **Abb. 3-75b**: Lichtsammlerkomplex). Ihr systematischer Aufbau ergibt sich durch zwei Komponenten: einem Kern und einzelnen Zweigen, den sogenannten Dendronen.

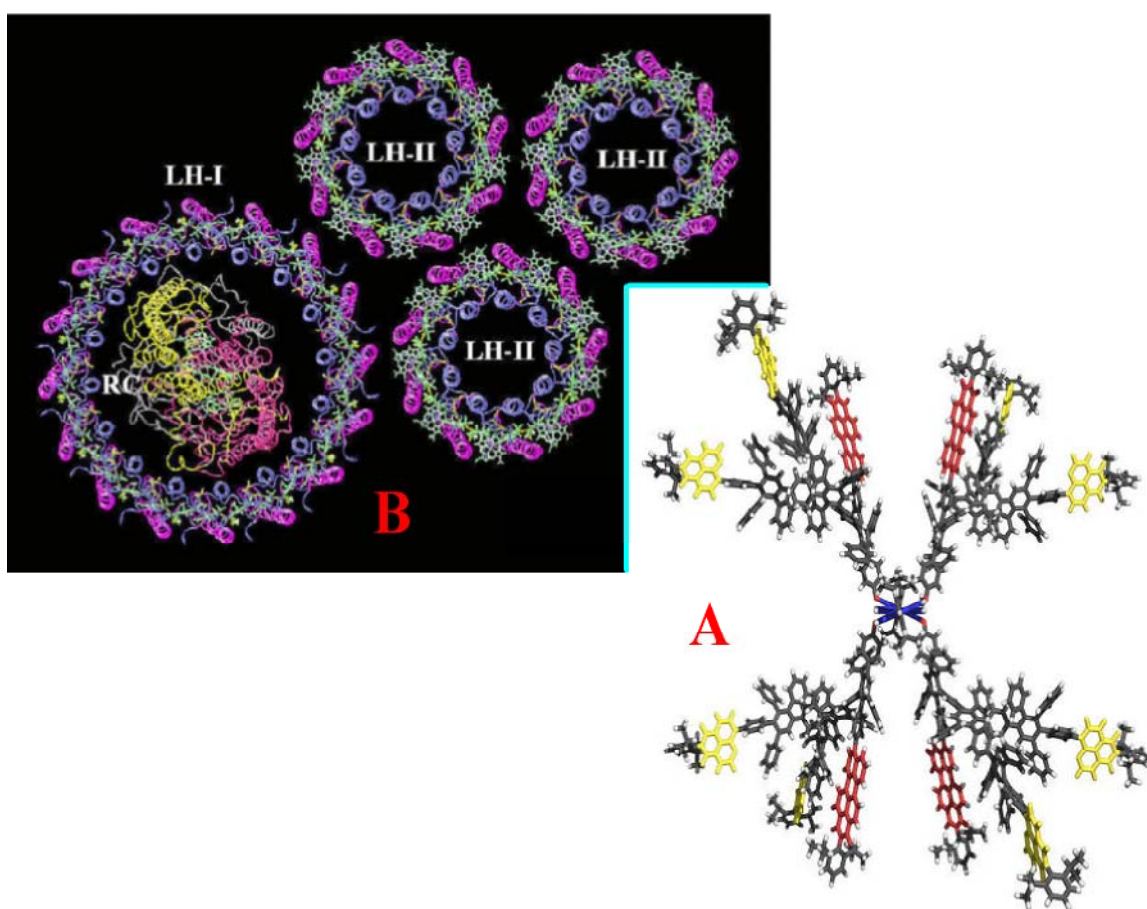


Abb. 3-75: Strukturvergleich: a) synthetische, biopolymeranaloge Dendrimertriade^{XVIII}; b) Lichtsammlerkomplex.

^{XVIII} Die Synthese wurde von Frau Dr. T. Weil im Rahmen ihrer Promotion im AK Prof. K. Müllen am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

Alle hier behandelten Dendrimere sind synthetische und analytische Herausforderungen, da klassische Analysenmethoden nicht einsetzbar sind oder keine eindeutige Charakterisierung der molekularen Zusammensetzung erlauben. Die NMR-Spektroskopie gibt wichtige Informationen, zeigt sich jedoch substanz- und zeitintensiv und versagt insbesondere bei der Charakterisierung höherer Generationen von Polyphenylendendrimeren aufgrund der hohen Anzahl überlappender Aromatensignale. Die GPC-Analyse ermittelt die Polydispersität bestenfalls bis zu 1.03, welche jedoch bei 1.00 liegen sollte, und ist damit nicht in der Lage das exakte Molekulargewicht wiederzugeben. Diese Verfälschung wird durch die chromatographische Peakverbreiterung verursacht. Die MALDI-TOF-MS ist eine Absolutmethode, die unter Wahl geeigneter Bedingungen die genaue Molekulargewichtsinformation geben kann. Dies ist ein wichtiger Vorteil gegenüber anderen analytischen Methoden und ist von besonderer Bedeutung hinsichtlich der Substanzklasse der Dendrimere, da sich für deren zuverlässige Charakterisierung nur noch wenige MS-Methoden neben MALDI-TOF-MS eignen (z.B. ESI-MS)¹¹⁶. Eine zuverlässige MALDI-TOF-MS-Charakterisierung von Dendrimeren kann z.B. für Poly(amidoamin)dendrimere (PAMAM) durchgeführt werden.

Einige Dendrimersysteme stellen jedoch auch für die MALDI-TOF-MS-Analyse eine Herausforderung dar, da diese zu einem gewissen Teil direkt die Laserleistung absorbieren und damit eine erhöhte Fragmentierungstendenz vermuten lassen. Anhand dieser schwer zu charakterisierenden Substanzklasse der Dendrimere soll die praktische Bedeutung der MALDI-TOF-MS-Analyse gezeigt und dabei sollen Problempunkte genauer erarbeitet bzw. verbessert werden. Die verwendeten Dendrimere (**Abb. 3-76**) und die des Dendrons (**Abb. 3-77**) werden im Folgenden nach unterschiedlichen chemischen und analytischen Gesichtspunkten (z.B. Einfluss der Schutzgruppen, Auswirkungen der Ionisation) ausgewählt und untersucht. Die explizite Motivation der einzelnen Dendrimersysteme wird in den zugehörigen Teilkapiteln eingehender diskutiert.

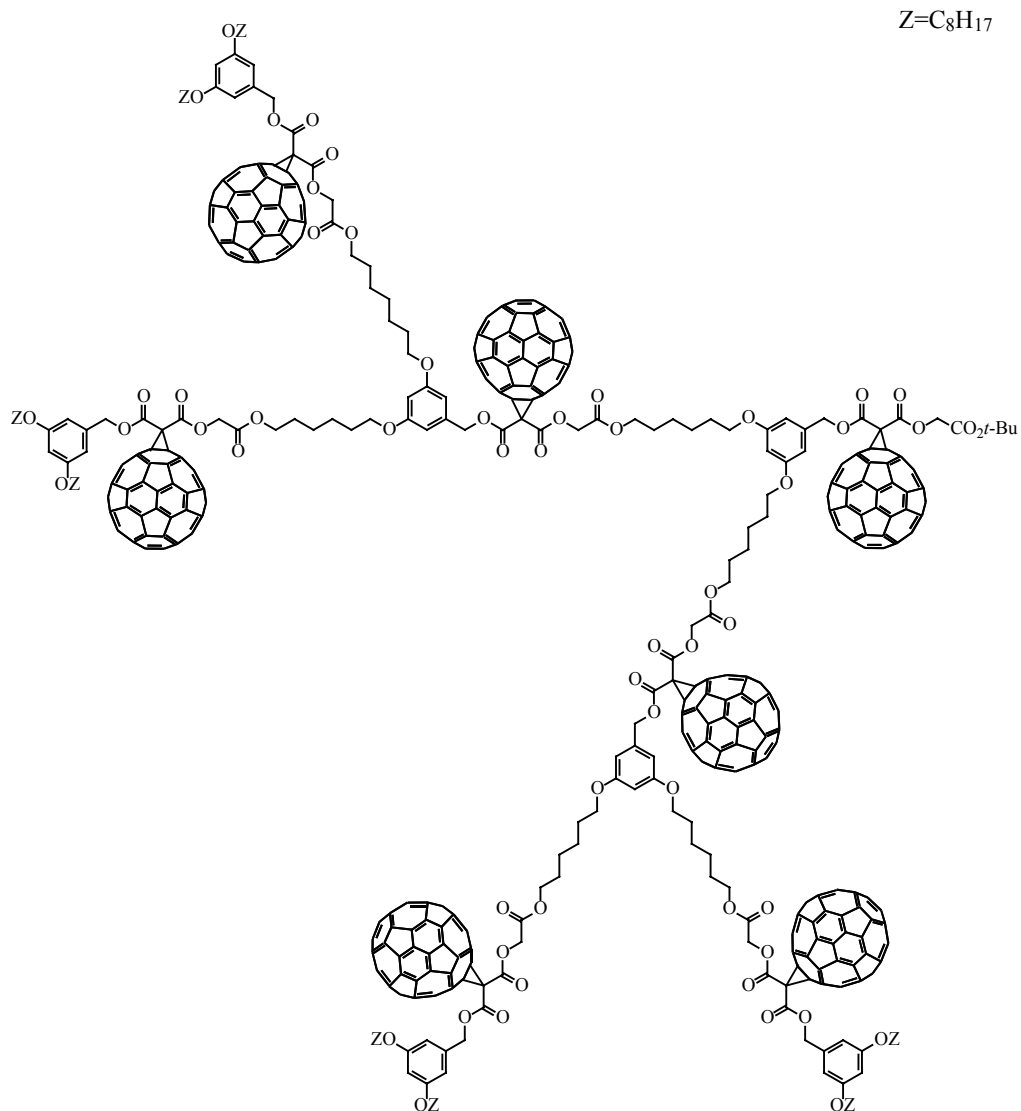


Abb. 3-77: Struktur des fullerensubstituierten Dendrons **24**.

In der MS-Analytik ist es unerlässlich, eine sichere Aussage treffen zu können, ob Signale eines Spektrums massenspektrometrischer oder chemischer Herkunft sind. Ein generelles Problem, um eine zuverlässige MALDI-TOF-MS-Analytik zu betreiben, ist die präferentielle Ionisation des Analyten, welche nur bedingt vorhersagbar ist, jedoch in der Regel zuverlässig durch gezielte Zugabe eines Metalltrifluoracetatsalzes durchgeführt werden kann (Kapitel 2.1.3, S. 20). Die wesentlichen Möglichkeiten der bevorzugten Wechselwirkungen von Metallkationen mit unterschiedlichen Strukturelementen sind in **Abb. 3-78** zusammengestellt.

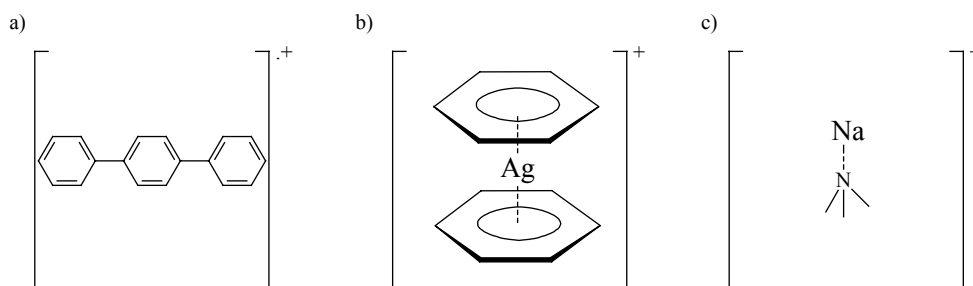


Abb. 3-78: Schematische Darstellung von möglichen Ionisationen: a) Delokalisation eines Radikalkations über ein größeres aromatisches System (Photoionisation); b) Wechselwirkung von Silberkation mit Aromaten (Ag-Pseudo-Molekülonenbildung); c) Wechselwirkung von Natriumalkalimetallkation mit dem freien Elektronenpaar eines Stickstoffatoms (Na-Pseudo-Molekülonenbildung).

Schwieriger und wesentlich aufwendiger gestaltet sich die zuverlässige Charakterisierung von Fragmenten, für deren Identifikation eine Reihe unterschiedlicher Detektions- (Kapitel 2.1.4, S. 22) und Analysenmethoden (Kapitel 2.2, S. 24) zur Verfügung stehen. Bei diesen Untersuchungen besteht das Interesse darin, den massenspektrometrischen Anteil der Signale eines Massenspektrums zu erkennen. Diese Entwicklungsarbeit soll sich dabei auf unterschiedliche Aspekte stützen. Da die konventionelle MALDI-TOF-MS-Analyse nur unzureichende Informationen bei fragmentierungslabilen Substanzen liefert, die jedoch prinzipiell durch die Fragmentenanalyse gewonnen werden können, soll aus diesem Grund ein besonderer Schwerpunkt auf der Evaluierung der Leistungsfähigkeit und der praktischen Bedeutung der MALDI-TOF-Fragmentenanalyse liegen.

Ein weiterer Schwerpunkt bei der massenspektrometrischen Untersuchung von Dendrimern liegt darin, in welchem Maße unbekannte Strukturen, die in einer chemischen Nebenreaktion gebildet werden, mittels MALDI-TOF-MS und sukzessiver MALDI-TOF-Fragmentenanalytik aufgeklärt werden können.

3.4.3.2 Boc-geschützte Gly-Perylendendrimere

Die Struktur des Boc-geschützten Gly-Perylendendrimers $\text{PerG}_1(\text{AminGlyBoc})_8$ **23** ist in **Abb. 3-76** dargestellt. Zur Charakterisierung von **23** (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-11**; S. 267)^{XIX} stehen verschiedene analytische Methoden wie z.B. die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie zur Verfügung. Jedoch kommt hier der Bestimmung des Molekulargewichtes eine besondere Bedeutung zu. Ähnliche Dendrimersysteme sind bislang keiner MALDI-TOF-MS-Analyse unterzogen worden.

Das erhaltene MALDI-TOF-Massenspektrum in **Abb. 3-79**, welches durch die konventionelle lösungsmittelbasierende Probenpräparation mit Dithranol und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ erhalten wurde, zeigt nur ein sehr schwaches Signal, welches dem Na-Pseudo-Molekülon **23** zugeordnet werden kann. Daneben zeigen sich ein sehr intensives, breites Signal (> 200 Da auf halber Höhe) bei einem Molekulargewicht

^{XIX} Die Synthese wurde von Frau *D. Grebel-Koehler* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

von 3253 Da und weitere Nebensignale mit Massendifferenzen im Mittel von 92 Da. Diese Haupt- und Nebensignale können nicht durch chemische Gesichtspunkte erklärt werden.

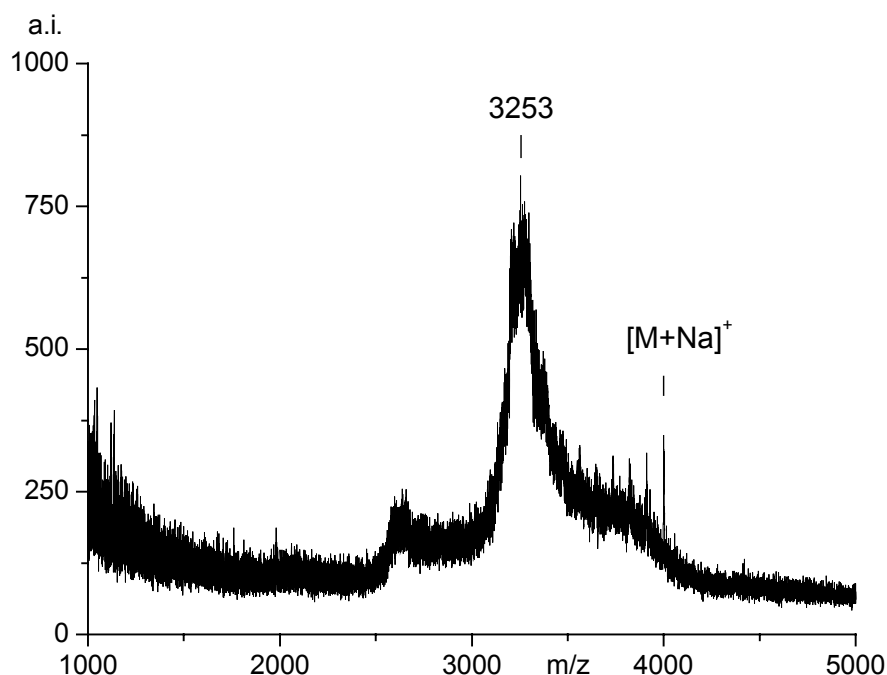


Abb. 3-79: Lösungsmittelbasierendes Reflektion-MALDI-TOF-Massenspektren des Boc-geschützten Gly-Perylendendrimer **23**.

Da das Makromolekül **23** aus verschiedenen Strukturelementen aufgebaut ist, die bei der Laserwellenlänge des UV-Lasers (337 nm) absorbieren, kann vermutet werden, dass dies ursächlich die MALDI-TOF-MS-Charakterisierung dieser Makromoleküle erschwert. Absorbiert ein Analyt bei der eingestrahnten Laserwellenlänge, so liegt kein wahrer MALDI-Mechanismus mehr vor, da nicht mehr nur die Matrix die Energie zur Anregung an den Analyten weitergibt, sondern dieser auch direkt durch den eintreffenden Laserstrahl angeregt wird. Diese harsche Anregung des Analyten entspricht der direkten Laserdesorption und gehorcht gleichermaßen den dabei bekannten höheren Fragmentierungstendenzen. Für die direkte laserinduzierte Anregung eines Makromoleküles wird u.a. wegen des höheren Molekulargewichtes wesentlich mehr Laserleistung benötigt. Eine Abhilfe könnte ein effektiverer matrixunterstützter Desorptionsprozess sein. Damit wäre gewährleistet, dass weniger Energie auf das zu charakterisierende Molekül eingebracht wird und damit weniger Überschussenergie durch Fragmentierung abgegeben wird. Aus den systematischen Untersuchungen zur lösungsmittelfreien Probenpräparation (Kapitel 3.1, S. 29) ist bekannt, dass diese die Spektrenqualität verbessert, da u.a. wesentlich weniger Laserleistung aufgewendet werden muss. Aus diesem Grund wurden lösungsmittelfreie Messungen an **23** unter Verwendung von Dithranol und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ durchgeführt und sind in **Abb. 3-80** dargestellt.

Des weiteren ist nicht völlig auszuschließen, dass in Spuren bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation unter Zugabe von $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ Säurereste vorhanden sein könnten, so dass dies eine Entschützung der Boc-Schutzgruppe verursacht.

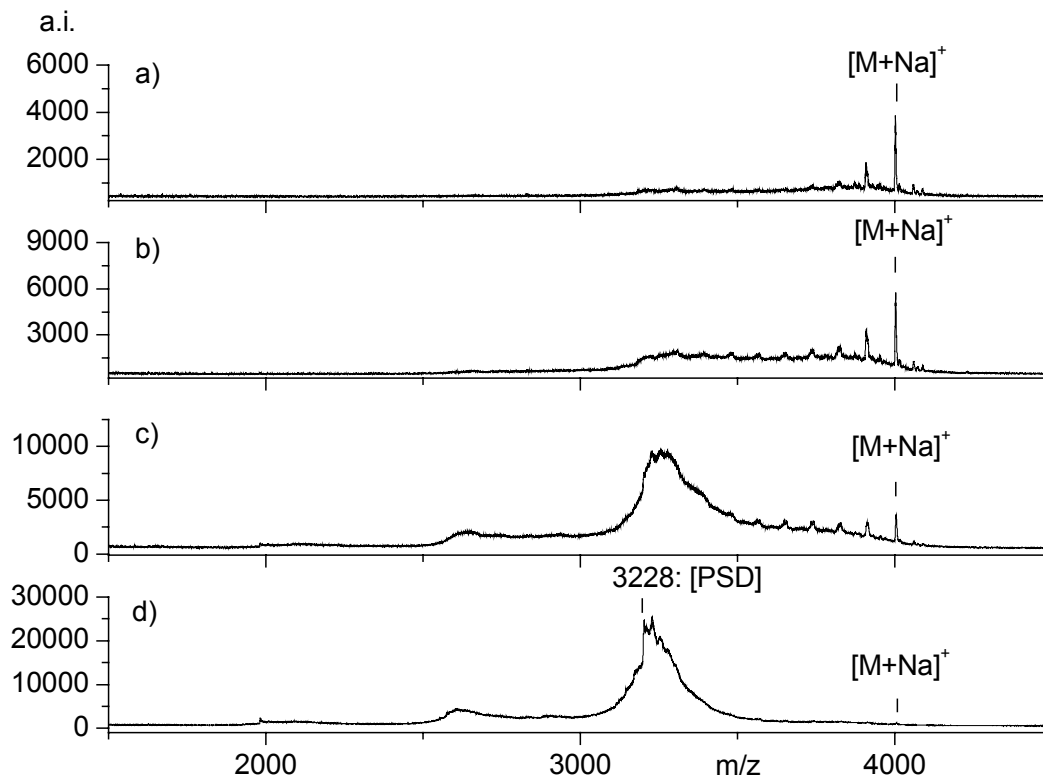


Abb. 3-80: Lösungsmittelfreie Reflekttron-MALDI-TOF-Massenspektren des Boc-geschützten Gly-Perylendendrimers **23** in Abhängigkeit der relativen Laserleistung; mit Zunahme der Laserleistung nimmt die Fragmentierungstendenz stark zu: a) 37; b) 40; c) 43; d) 46.

Das Reflekttron-MALDI-TOF-Massenspektrum zeigt bei einer Laseranregung an der Schwellenleistung, die zur Desorption/Ionisation des Analyten führt (**Abb. 3-80a**), als Hauptsignalintensität das Na-Pseudo-Molekülion $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Bei relativ geringen Veränderungen zu höheren Laserleistungen (**Abb. 3-80b,c**) werden Massenspektren erhalten, die verstärkt das Hauptsignal bei 3228 Da und die Nebensignalintensitäten mit Massendifferenzen im Mittel von 92 Da zeigen.

Die Fragmentierungstendenz wird hinsichtlich eines weiteren Parameters untersucht. Bei Erhöhung der Beschleunigungsspannung werden die Signale der Kaskade von 92 Da Massendifferenzen schärfer und intensiver, wohingegen das Signal des Elternions an Intensität verliert (Daten nicht abgebildet). Da diese Signale insbesondere mit höherer Laserleistung gebildet werden (**Abb. 3-80d**), ist naheliegend, dass es sich dabei tatsächlich um Fragmente handelt.

Aus diesem Grund werden analoge Linear-MALDI-TOF-MS-Untersuchungen (Kapitel 2.1.4, S. 22) durchgeführt. Die erhaltenen Massenspektren sind in **Abb. 3-81** in Abhängigkeit der Laserleistung dargestellt. Bei Laseranregung an der Schwellenleistung (**Abb. 3-81a**) konnte ein Massenspektrum erhalten werden, das als Hauptsignalintensität das Na-Pseudo-Molekölion $[M+Na]^+$ zeigt. Die Signale im Bereich von 3250 Da sind daher vollständig unterdrückbar. Mit steigender Laserleistung steigt der Untergrund zwar an, jedoch ist, im Gegensatz zu den Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren, keine Signalkaskade mit Massendifferenzen von 92 Da auszumachen. Daraus kann gefolgert werden, dass es sich bei den Haupt- und Nebensignalen im Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum tatsächlich um Fragmente handelt und zwar um solche, die sich in der Flugstrecke als „Post-Source Decay“ (PSD) bilden (Kapitel 2.2.1, S. 24). Beim Signal $[M_{-Boc}+Na]^+$ kann nicht ermittelt werden, ob es sich um ein Fragment handelt, welches sich schon in der Quelle als „In-Source Decay“ (ISD) Fragment bildet, oder ob es sich um eine chemische Abspaltung der Boc-Schutzgruppe als Folgereaktion des erfolgreich gekuppelten Boc-geschützten Glycins handelt. Trotzdem lässt sich mittels der Signalintensitäten aus dem Linearen-MALDI-TOF-Massenspektrum (**Abb. 3-81a**) die Ausbeute von **23** zu > 90 % berechnen.

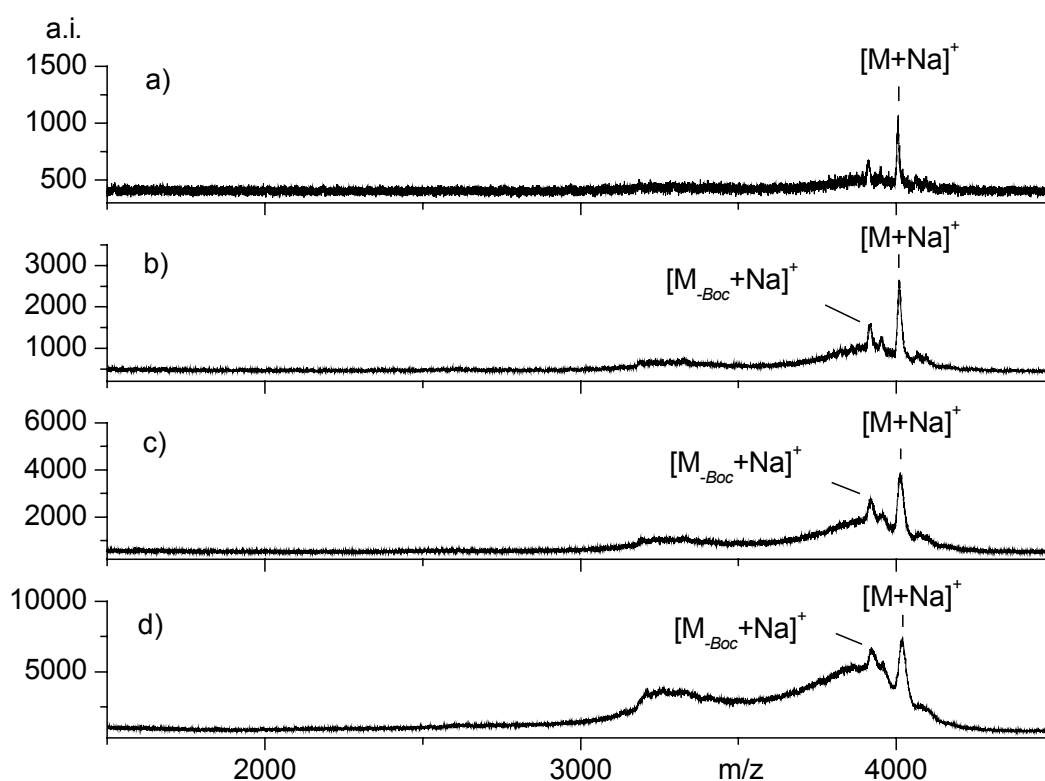


Abb. 3-81: Lösungsmittelfreie Linear-MALDI-TOF-Massenspektren des Boc-geschützten Gly-Perylendendrimers **23** in Abhängigkeit der relativen Laserleistung: a) 37; b) 40; c) 43; d) 46.

Um den eindeutigen Beweis zu führen, dass es sich bei den Reflektron-MALDI-TOF-Messungen tatsächlich um PSD-Fragmente handelt, wurde PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik

durchgeführt. Die für die verschiedenen Laserleistungen erhaltenen Fragmentspektren des selektierten Elternions $[M+Na]^+$ sind in **Abb. 3-82** zusammengestellt.

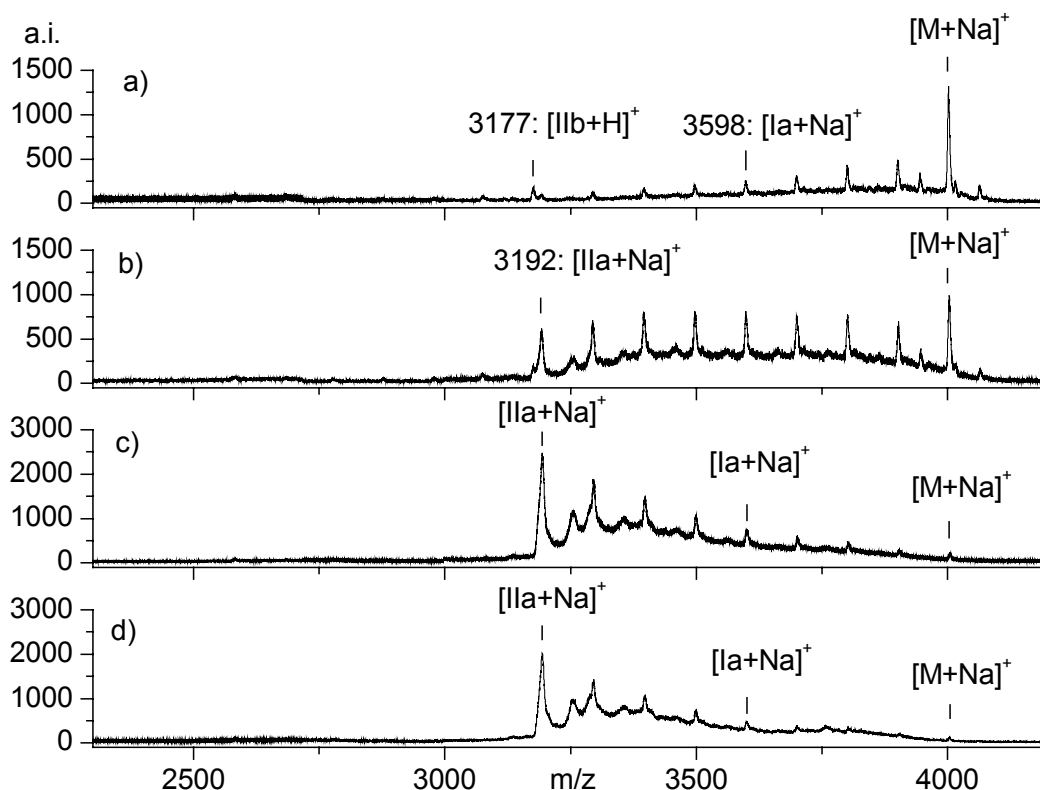


Abb. 3-82: Lösungsmittelfreie PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren des Boc-geschützten Gly-Perylendendrimers **23** in Abhängigkeit der relativen Laserleistung: a) 37: intaktes Elternion neben geringem Prozentsatz an Fragmenten; b) 40: neben der Elternionensignalintensität ein- bis achtfache Fragmentierung der Boc-Schutzgruppen; c) 43 und d) 46: neben der geringsten Elternionensignalintensität jeweils die größte Signalintensität für das Fragment nach achtfacher Boc-Fragmentierung.

Bei Laseranregung an der Schwellenleistung, die zur Desorption/Ionisation des Analyten führt (**Abb. 3-82a**), wird das Elternion als Hauptsignal detektiert. Mit zunehmender Laserleistung (**Abb. 3-82b,c,d**) werden analog zu den zuvor gezeigten MALDI-TOF-Massenspektren zunehmend Fragmente detektiert. Bei einer relativen Laserleistung von 40 (**Abb. 3-82b**) wird eine Kaskade von acht Fragmenten detektiert, die jeweils einer massenspektrometrischen Boc-Gruppen Entschützung ($C_5H_9O_2$, 101 Da) in der Gasphase entspricht. Bei Entschützungsgraden zwischen eins und sieben bilden die jeweiligen Strukturen dieser Kaskade unabhängig von der Laserleistung Na-Pseudo-Molekülonen. Beispielhaft ist die **Fragmentstruktur 23.Ia** für das vierfach massenspektrometrisch Boc-gruppenentschützte Dendrimer **23** in **Abb. 3-83** dargestellt. Das Fragment mit achtfach massenspektrometrisch entschützten Glycinresten wird bei schwächeren Laserleistungen als vollständig wasserstoffabgesättigtes, protoniertes Molekül der **Struktur 23.IIb** detektiert. Bei höheren Laserleistungen wird bevorzugt **Struktur 23.IIa** als Na-Pseudo-Molekülon gebildet und tritt

in **Abb. 3-82c,d** als Hauptsignal auf. Im Segment des unkalibrierten PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrums (Kapitel 2.2.2, S. 26) erscheint dieses PSD-Fragment mit einer Masse 3278 Da, die in den Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren (**Abb. 3-79**, **Abb. 3-80**) unter einem breiten Signal verborgen ist. Dies ist der eindeutige Beweis, dass die im konventionellen Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren erhaltenen Signale durch PSD-Fragmentsignale im großen Ausmaß überlagert sind.

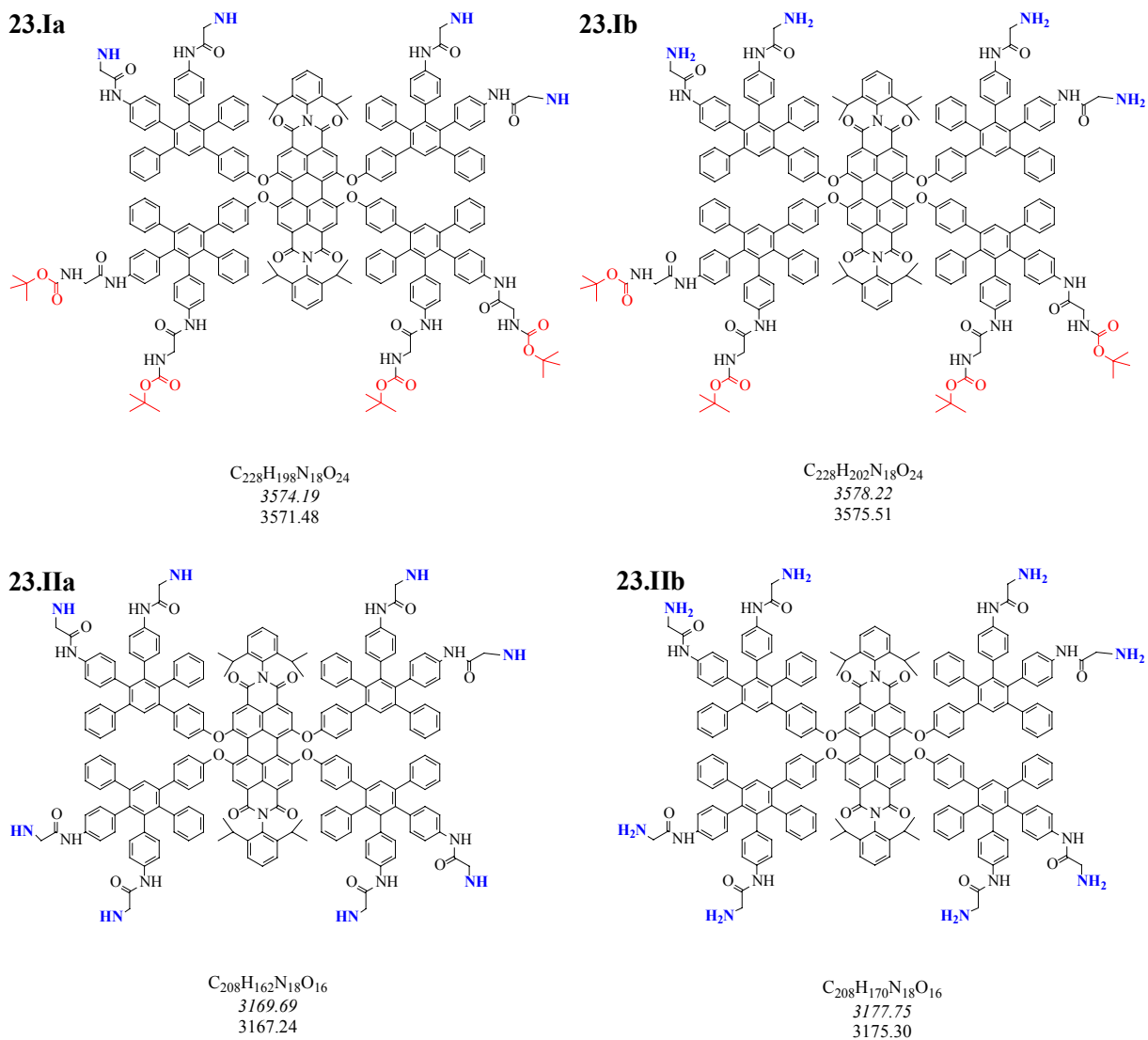


Abb. 3-83: Theoretische Fragmentstrukturen des Boc-geschützten Gly-Perylendendrimers **23**. [Angaben der Isotopenmasse in Da: kursiv/mittlere; normal/exakte].

Eine mögliche Ursache ist, dass die einzelnen Bauteile des Makromoleküls die UV-Laserwellenlänge so stark zu absorbieren vermögen, dass bei höheren Laserleistungen und bei weniger optimalen MALDI-Bedingungen, wie sie insbesondere bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation vorgelegen haben, verstärkt Bindungsbrüche der labilen Seitenschutzgruppen eintreten. Dieser stark bevorzugte Bindungsbruch weist damit die Boc-Bindung als die weitaus

massenspektrometrisch labilste Stelle in diesem Makromolekül aus. Die experimentell bestimmte Labilität der Boc-Schutzgruppe steht im Einklang mit literaturbeschriebenen Untersuchungen an Boc-geschützten synthetischen Homopeptiden¹⁹⁷. Andere Kohlenstoff-Heteroatombindungen in **23** (**Abb. 3-76**), wie sie z.B. bei der Etherbindung zwischen Perylentetracarboxydiimid und Polyphenylendendron zu finden sind, zeigen bei der massenspektrometrischen Analyse keinen Bindungsbruch. Diese Bindung scheint vergleichsweise stabil zu sein.

Da sehr geringe Erhöhungen der Laserleistungen eine deutliche Zunahme der Fragmentierung induzieren, zeigt sich dieses System außergewöhnlich labil. Um die Laserleistung, die angewendet werden muss, noch weiter herabzusetzen, wurden die analogen Untersuchungen mit TCNQ als Matrix durchgeführt, welche eine wesentlich geringere Schwellenleistung im Vergleich zu Dithranol aufweist und bevorzugt radikalkationische Ionisation eines Analyten stabilisiert¹¹⁵.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Laserschwelkenleistung, die zur Ionisation des Makromoleküles führt, durch die TCNQ-Matrix im Vergleich zu Dithranol sehr herabgesetzt wird. Jedoch kann in keiner der Messungen das intakte Molekülion weder als Radikalkation noch als Pseudo-Molekülion detektiert werden (Daten nicht abgebildet, jedoch von der Erscheinung analog **Abb. 3-80d**), unabhängig von der Zugabe an Natriumtrifluoracetat. Es kann nur ein sehr breites Signal, welches den bereits oben charakterisierten Fragmenten entspricht, detektiert werden. Hieraus kann gefolgert werden, dass nicht nur die Laserleistung, sondern auch die Art der Ionisation einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Fragmentierung bzw. die Stabilisierung des Moleküls **23** hat.

Die MALDI-TOF-MS zeigt sich unter Wahl der geeigneten Probenpräparations- und Messbedingungen aufgrund ihrer schonenden Ionisation als eine Methode, die bevorzugt die Molekulargewichtsinformation dieser Substanzklasse wiedergeben kann. Diese Methodenverbesserung konnte in einem erheblichen Maße durch die lösungsmittelfreie Probenpräparation erreicht werden. Die Möglichkeit der Bestimmung des Molekulargewichtes dieses Dendrimers ist ein wichtiger Vorteil gegenüber anderen spektroskopischen wie auch massenspektrometrischen Methoden. In Einzelfällen können wichtige Zusatzinformationen durch die Fragmentionenanalytik gegebenenfalls gewonnen werden, bei der die konventionelle MALDI-TOF-Methode nicht ausreichend zuverlässige Ergebnisse liefert. Dies wurde hier eingehend gezeigt. Hinsichtlich der Fragmentierung dieser Substanzklasse ergeben sich dabei folgende Auffälligkeiten:

i) Da sich eine streng bevorzugte Fragmentierung zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass ein sehr energiearmes Fragmention gebildet wird. Die Sollbruchstelle im Elternion ist dabei die Kohlenstoff-Heteroatombindung der Boc-Schutzgruppe. Bezogen auf die erhaltenen Signalintensitäten zeigt sich das achtfach Boc-entschützte Fragment als das energetisch günstigste Fragmention. Dabei kann keine Aussage getroffen werden, ob die kaskadenartige Fragmentierungsreaktion als konzertiert verlaufender Prozess stattfindet. Das Ausmaß dieses bevorzugten Fragmentierungspfades ist auffällig ausgeprägt, jedoch in seinem Umfang noch unverstanden. Ein tieferes Verständnis dieses intensiven Fragmentierungsprozesses würde bessere Vorhersagen hinsichtlich der Charakterisierung dieser Substanzklasse zu lassen. Aus diesem Grund soll in den folgenden Untersuchungen besonderes Augenmerk auf die Bruchstellen, insbesondere die der Kohlenstoff-Heteroatombindungen, gelegt werden.

ii) Die hohe Fragmentierungstendenz dieses Makromoleküles scheint nicht nur ausschließlich von der insuffizienten Matrixunterstützung, wie sie insbesondere im Falle der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation gefunden wird, herzurühren, sondern auch durch die Ionisation bedingt zu sein. So ist im Falle der TCNQ-Matrix die Ionisation weit zugunsten der radikalkationischen Ionisation verschoben, jedoch wird auch eine wesentlich verstärkte Fragmentierungstendenz gefunden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Pseudo-Molekülionenbildung zwischen Natriumkation und **23** die Substanz stabilisiert und damit die Fragmentierungstendenz herabsetzt. Aus diesem Grund soll in den folgenden Untersuchungen auch auf einen Zusammenhang von Ionisation und Fragmentierung geachtet werden.

iii) Durch die erhaltenen MALDI-TOF-Massenspektren und PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren lassen sich eindeutig die Molekulargewichte des intakten Pseudo-Moleküls und die der Fragmente bestimmen. Die Signale im Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum, welche insbesondere durch konventionelle lösungsmittelbasierende MALDI-Probenpräparation erhalten wurden und als Hauptsignale auftreten, konnten eindeutig als PSD-Fragmente ausgewiesen werden. Damit kann massenspektrometrisch festgestellt werden, dass Makromolekül **23** eindeutig als monodisperses Makromolekül mit acht Boc-geschützten Glycinen vorliegt und als chemisch rein einzustufen.

3.4.3.3 Fullerodendron

Für die MALDI-TOF-MS-Analyse von Fullerodendrimeren ist mit einer erhöhten Fragmentierungstendenz zu rechnen, da Fullerene die Energie beim Laserschuss absorbieren. Aus diesem Grund werden Fullerene direkt und ohne Matrixzusatz auch als Kalibriersubstanz bei MALDI-TOF-MS-Untersuchungen eingesetzt und gehen dabei radikalkationische Ionisation ein. Für diese Untersuchungen wurde ein neutrales fullerenfunktionalisiertes Dendron (Fullerodendron, **Abb. 3-77**) **24** (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-12**; S. 268)^{XX} mit möglichst hohem Molekulargewicht ausgewählt, um den Zusammenhang zwischen Laserleistung, Ionisation und Fragmentierung zu untersuchen. Das Fullerodendron **24** trägt an jeder Verzweigung einen C₆₀-Baustein. Diese sieben C₆₀-Bausteine absorbieren direkt die Energie beim Laserschuss und sollten im Desorptions/Ionisationsprozess somit mehr Energie in das gesamte Molekül einbringen. Des weiteren ist dieses Fullerodendron **24** aus mannigfachen Kohlenstoff-Heteroatombindungen aufgebaut, die eine erhöhte Fragmentierungstendenz aufweisen (Kapitel 3.4.3.2, S. 154), um überschüssige Energien im Molekül abzubauen. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieses Fullerodendron **24** durch optimierte ES-MS-Untersuchungen²²⁴ nachgewiesen werden kann. Dabei werden die C₆₀-Bausteine in der ES-Quelle reduziert. Die bevorzugte Detektion erfolgt in verschiedenen radikal-anionischen Ladungszuständen (Heptanion bis Pentanion). Es können auch radikalkationische Molekülionen generiert werden.

Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS wird zur Charakterisierung des Fullerodendrimers **24** eingesetzt, da diese Methode bislang in Grenzfällen zuverlässig schonendere MALDI-

^{XX} Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn *Dr. J.-F. Nierengarten*, Université Strasbourg, Frankreich.

Bedingungen (Kapitel 3.4.3.2, S. 154) gewährte. Da die TCNQ-Matrix¹¹⁵ bevorzugt radikalkationische Ionisation eines Moleküls unterstützt, sollte bei Verwendung dieser Matrix eine besonders schonende Ionisation dieses Fulleredendrons erfolgen können, da dies dessen bevorzugte Ionisierungsart ist. Des weiteren weist TCNQ eine sehr geringe Schwellenleistung auf und müsste daher für einen besonders schonenden Desorptions/Ionisationsprozess sorgen.

Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS unter Verwendung von TCNQ ermöglicht (**Abb. 3-84a**) die Charakterisierung des Fulleredendrons **24** neben dem Fragment, bei dem ein C₆₀-Molekül abgespalten ist. Des weiteren tritt ein Signal mit relativ ähnlichen Signalintensitäten zum Elternion im niederen Molekulargewichtsbereich auf. Bei leichter Erhöhung der Laserleistung verschiebt sich das Verhältnis der Signalintensitäten zu ungunsten des Signals, welches der Zielstruktur zugeordnet werden kann (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Sensitivität hinsichtlich der Laserleistung wird auch hier eine Fragmentierung in Betracht gezogen. Anschließende PSD-MALDI-TOF-Analyse schließt Fragmentierung in der Flugstrecke aus (Daten nicht gezeigt). Damit wird vermutlich dieses Fragmentation durch eine ISD-Fragmentierung (Kapitel 2.2.1, S. 24) gebildet. Eine Strukturzuordnung kann nicht gemacht werden.

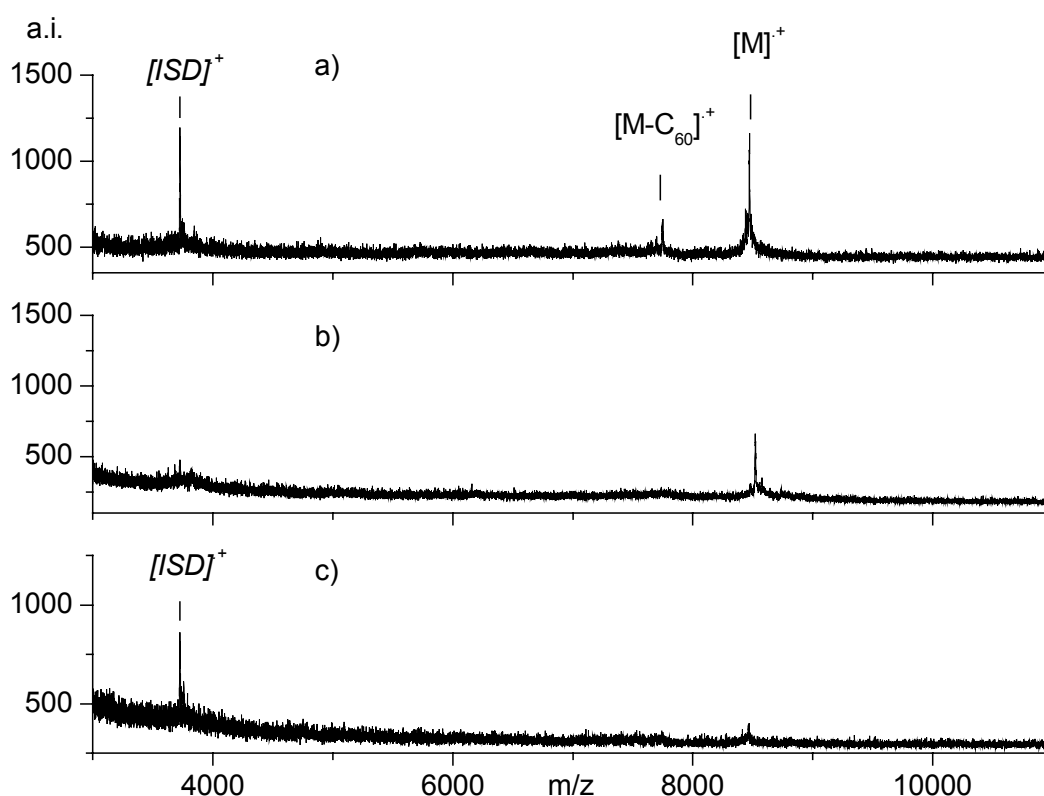


Abb. 3-84: Lösungsmittelfreie MALDI-TOF-Massenspektren des Fulleredendrimers **24**: a) mit TCNQ; b) mit Dithranol und Natriumtrifluoracetat; c) Dithranol.

Bei Messungen mit Dithranol als Matrix und ohne Metallsalzzugabe kann das Molekülion **24** nicht eindeutig nachgewiesen werden, jedoch in hohem Umfang die vermutete ISD-Fragmentation. Eine radikalkationische Ionisation dieses Analyten ist damit im MALDI-Prozess wenig favorisiert.

Durch Variation der Ionisation durch gezielte Zugabe von Natrium-, Kalium- bzw. Silbertrifluoracetat werden unter Verwendung von Dithranol als Matrix jeweils Massenspektren mit guter Qualität erhalten, obwohl mehr Laserleistung verwendet werden musste als bei der TCNQ-Matrix. In **Abb. 3-84b** ist dies für die Zugabe von Silbertrifluoracetat dargestellt und charakterisiert diese Substanz eindeutig.

Untersuchungen hinsichtlich der Fragmentierung mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentationsanalytik zeigen keine sehr intensiven PSD-Fragmentsignale. Daraus kann geschlossen werden, dass die Überschussenergie, die unvermeidlich eingetragen wird, schon sehr schnell innerhalb der Quelle als ISD-Fragmentierungsprozess und nicht erst in der Driftstrecke im Massenspektrometer abgebaut wird.

Die bevorzugte Ionisation der einzelnen Bauteile dieses Makromoleküls **24** ist die radikalkationische Ionisation. Die TCNQ-Matrix unterstützt genau diese Art der Ionisation. Trotz dieses Einklangs sind die Signalintensität des Analyten und die Qualität des Massenspektrums gering. Daraus kann gefolgert werden, dass die Ionisation durch Pseudo-Molekülionenbildung offenbar zu stabileren Gasphasenionen als die radikalkationische Photoionisation des Fullerodendrons **24** führt.

3.4.3.4 Azodendrimere

Bei der Synthese des Azodendrimers AzoG₂A₂BCp **25** (Synthese s. Kapitel 6.1.2, **Abb. 6-13**; S. 269)^{XXI} (**Abb. 3-76**) wurde ein Dendrimerengemisch erhalten, welches im Folgenden charakterisiert werden soll. Über deren strukturellen Aufbau möglicher Nebenprodukte liegen keine Informationen vor.

Die MALDI-TOF-Massenspektren der nach säulenchromatographischer Trennung erhaltenen Fraktionen sind in **Abb. 3-85** dargestellt. Diese wurden durch die konventionelle lösungsmittelbasierende Probenpräparation mit Dithranol ohne Metallsalzzugabe aufgenommen. Für **Fraktion 25.1** wird in **Abb. 3-85a** ein sehr intensives Signal gefunden, welches dem radikalkationisch ionisierten Elternion **25** zugeordnet werden kann. Daneben zeigen sich mit geringen Signalintensitäten die Pseudo-Molekülionen von **25** mit Natrium- und Kaliumkationen, die als Spuren in der Probenmischung vorhanden waren (Kapitel 2.1.3, S. 20). Im niederen Massenbereich finden sich Fragmentensignale, die mit zunehmender Laserleistung bzw. in Abhängigkeit der Ionisation des Elternions in der Intensität (Pseudo-Molekülion < Radikalkation) variieren, so dass vermutet werden kann, dass es sich um Fragmentationen handelt. Im niederen Massenbereich finden sich für **Fraktion 25.2** (**Abb. 3-85b**) analoge Ergebnisse.

Dagegen wird in **Fraktion 25.2** neben dem Zielprodukt **25** (**Abb. 3-85b**) ein sehr intensives Signal **25.N** gefunden, welches mit einer Massendifferenz von 26 Da nicht durch eine herkömmliche Pseudo-Molekülionenbildung erklärt werden kann. Dies wird massenspektrometrisch durch eine

^{XXI} Die Synthese wurde von Frau *D. Grebel-Koehler* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

gezielte Zugabe von Metallsalzen (**Abb. 3-86b-d**) und durch Computersimulation der zu erwartenden massenspektrometrischen Signale (**Abb. 3-86a**) verifiziert.

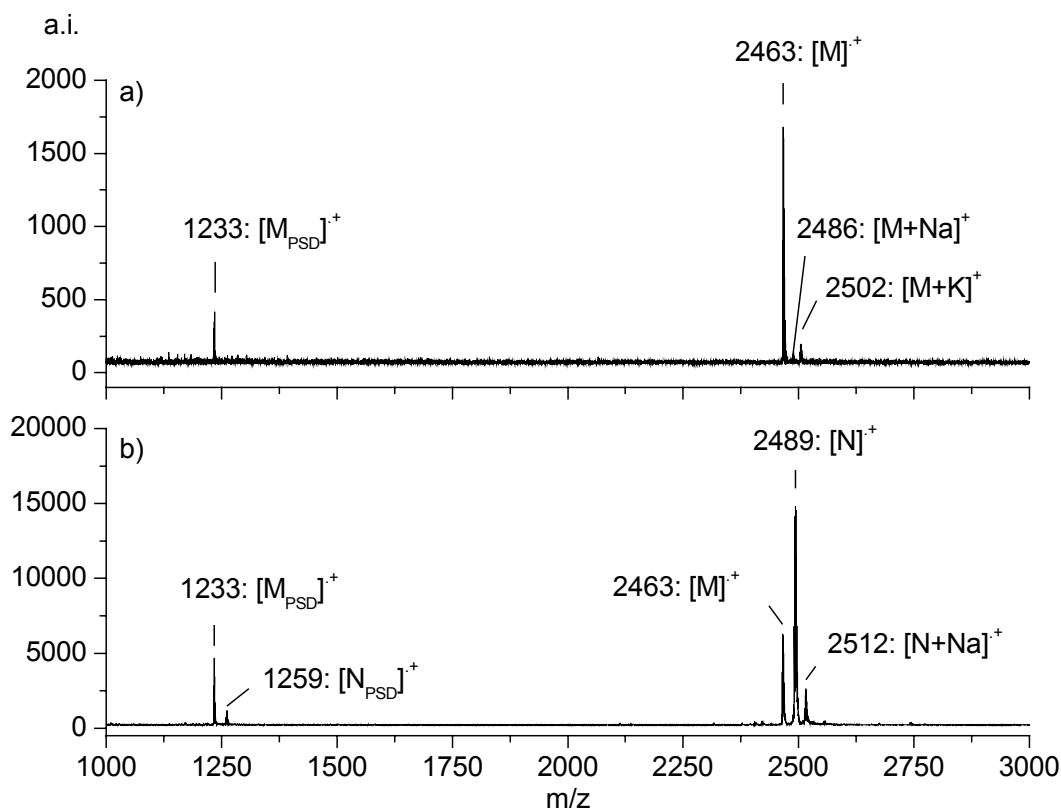


Abb. 3-85: MALDI-TOF-Massenspektren von **25** nach säulenchromatographischer Trennung unter Verwendung von Dithranol und THF: a) **Fraktion 25.1** (Radikalkationische Ionisation); b) **Fraktion 25.2** (Radikalkationische Ionisation).

Die gefundene Massendifferenz von 26 Da kann theoretisch durch $M+\text{C}_2\text{H}_2$, $M+\text{N}_2-\text{H}_2$ oder $M+\text{CO}-\text{H}_2$ beschrieben werden. Ersteres kann durch die Charakterisierung des Eduktes von **25** durch FD-Messungen ausgeschlossen werden. Die Molekulargewichte solcher hypothetischen Strukturen differieren in ihren Massen ausgehend von $M+\text{C}_2\text{H}_2$ bezüglich $M+\text{N}_2-\text{H}_2$ um 10 ppm und bezüglich $M+\text{CO}-\text{H}_2$ um 15 ppm. Zwischen $M+\text{N}_2-\text{H}_2$ und $M+\text{CO}-\text{H}_2$ ergibt sich eine Differenz von 5 ppm. Diese Massendifferenz überschreitet die Massengenauigkeit der MALDI-TOF-MS-Analyse, die in diesem Massenbereich bei > 30 ppm liegt.

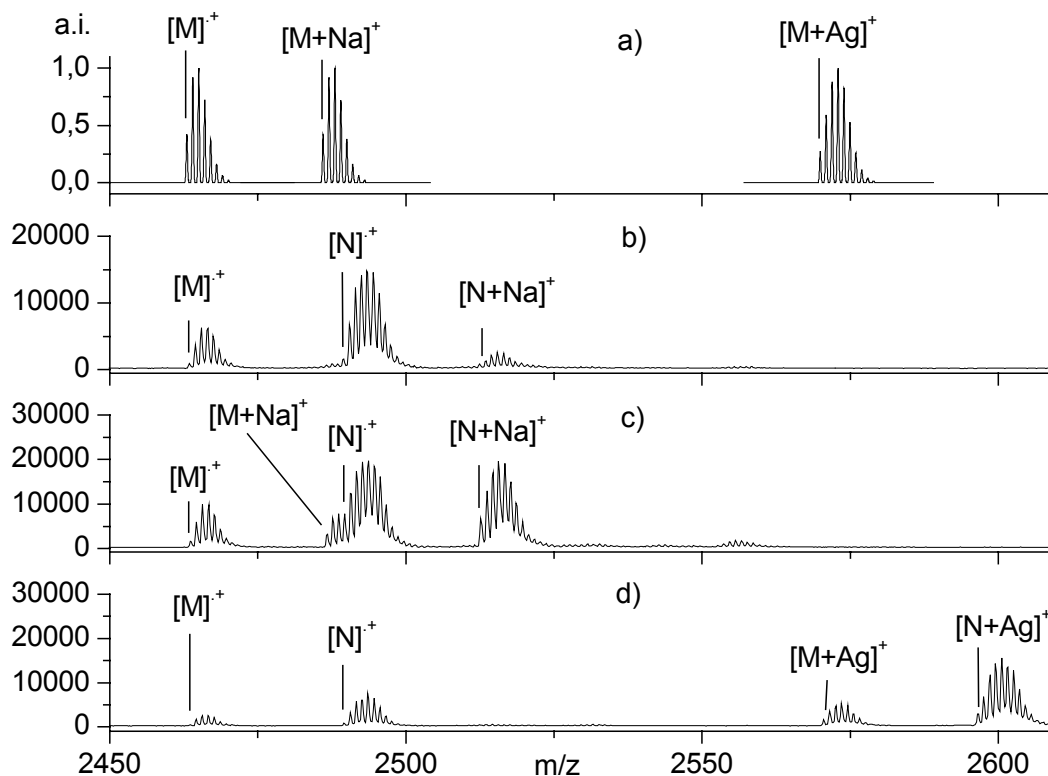


Abb. 3-86: MALDI-TOF-Massenspektren unter Verwendung von Dithranol und THF: a) Simulation von Dendrimer **25** unter Variation der Ionisation; b) Radikalkationische Ionisation von **Fraktion 25.2**; c) Na-Pseudo-Molekülionenbildung von **Fraktion 25.2**; d) Ag-Pseudo-Molekülionenbildung von **Fraktion 25.2**.

Eine unvollständige Abspaltung der Carbonylgruppe ist aus chemischen Gesichtspunkten am wahrscheinlichsten, da bei einer erfolgreichen Cycloaddition im letzten Schritt CO aus dem intermediär gebildeten Bicyclus unter Aromatisierung zu einem Benzolring extrudiert werden muss. Der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus der Diels-Alder-Cycloaddition ist in **Abb. 3-87** am Beispiel von Tetraphenylcyclopentadienon und Diphenylacetylen zu Hexaphenylbenzol dargestellt. Aus diesem Reaktionsschema geht deutlich hervor, dass bei der Isolation der carbonylhaltigen Zwischenstufe sich zum Produkt eine Massendifferenz von 28 Da chemisch schlüssig erklären lässt, nicht jedoch 26 Da. Das ^{13}C -NMR-Spektrum der **Fraktion 25.2** weist eindeutig eine Carbonylgruppe nach.

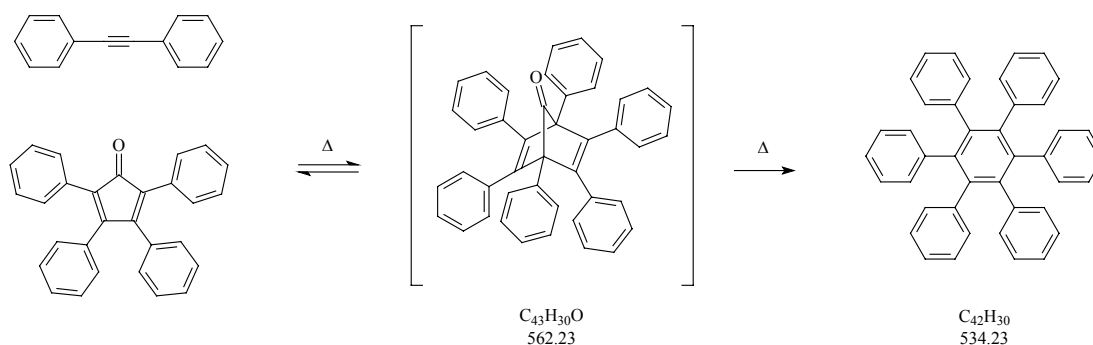


Abb. 3-87: Reaktionsmechanismus der Diels-Alder-Cycloaddition am Beispiel von Tetraphenylcyclopentadienon und Diphenylacetylen zu Hexaphenylbenzol.

Aus diesen massenspektrometrischen und spektroskopischen Ergebnissen muss die **Struktur des Nebenproduktes 25.N** auf eine verbrückende Carbonylgruppe unter Verlust von zwei Wasserstoffatomen (**Abb. 3-88**) zurückgeführt werden. Dies stellt jedoch einen chemisch weniger plausiblen Strukturvorschlag dar. Aus Vorschlag **25.N-1** zur **Struktur des Nebenproduktes 25.N** geht hervor, dass die Carbonylgruppe zwei benachbarte Aromaten im Dendron verbrückt. Über die genaue Lokalisation der Carbonylgruppe sind mit den bisherigen Erkenntnissen keine genauen Angaben möglich. Aus diesem Grund soll überprüft werden, welche Strukturinformationen durch die MALDI-TOF-Fragmentationenanalyse gewonnen werden können.

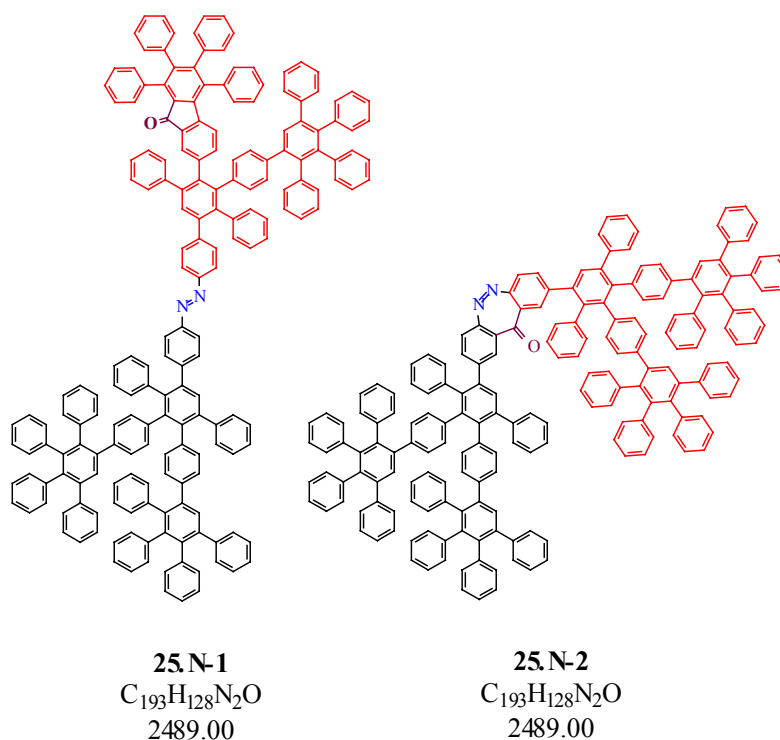


Abb. 3-88: Das experimentell ermittelte Molekulargewicht (Δ 26 Da) ermöglicht zwei hypothetische Vorschläge zur Lokalisation der Carbonylgruppe im **Nebenprodukt 25.N** mit $M+CO-H_2$. [Angaben der Isotopenmassen in Da: exakt]

Da das **Nebenprodukt 25.N** dem Zielprodukt **25** chemisch sehr ähnlich ist, wird zunächst die MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse des Zielproduktes **25** durchgeführt, um eine grundlegende Aussage zum Fragmentierungsprozess dieser Substanzklasse zu gewinnen. Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des radikalkationischen Elternions **25** zeigt, wie in **Abb. 3-89a** dargestellt, den bevorzugten Bindungsbruch der Kohlenstoff-Heteroatombindung unter Abspaltung von N_2 . Dabei wird das intakte Dendron **25.Ia** als radikalkationisches Fragment (**Abb. 3-90**) detektiert, nicht jedoch **25.Ib** als Gegenbruchstück von **25.Ia**. Dieser Fragmentierungsmechanismus ist gut rationalisierbar, da die Kohlenstoff-Heteroatombindung sich häufig als labiler darstellt als die Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen (Kapitel 3.4.3.2, S. 154) und zusätzlich N_2 eine sehr gute Abgangsgruppe ist. Mit sehr geringen Signalintensitäten wird das Fragmention **25.II** gefunden, bei dem zusätzlich zum prominenten Kohlenstoff-Heteroatombindungs- ein Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungsbruch innerhalb des Dendrons stattfindet.

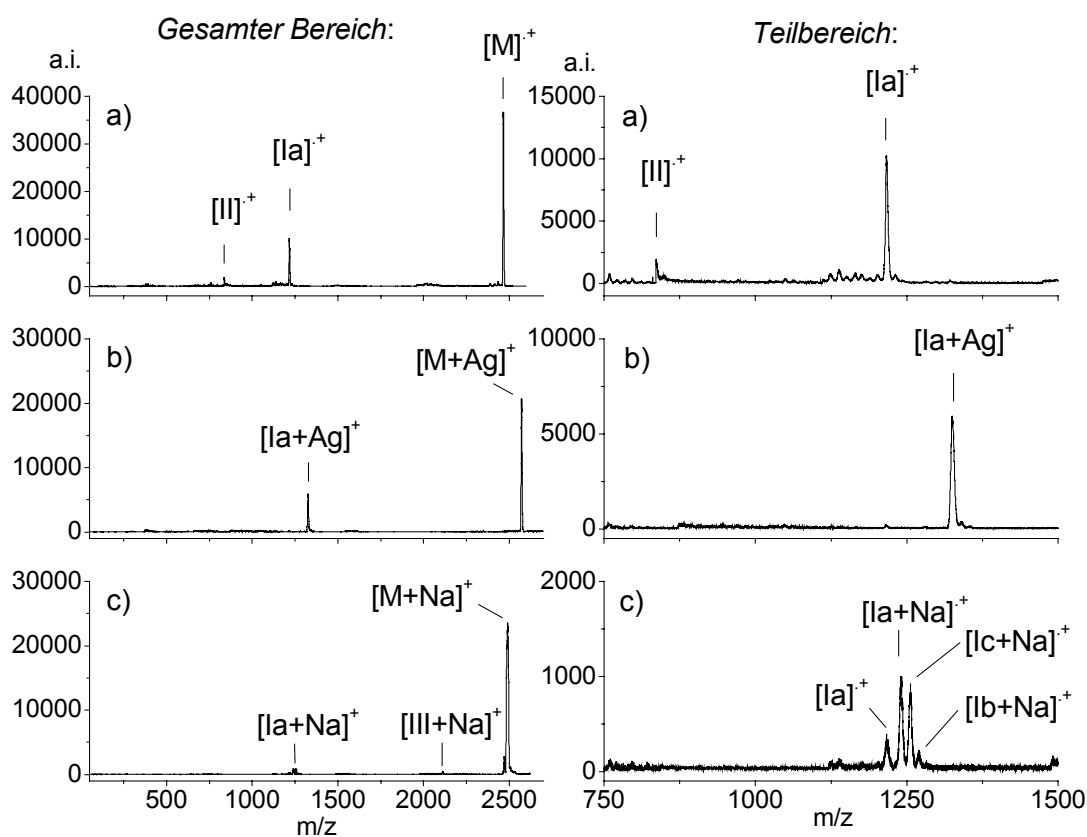


Abb. 3-89: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren der Zielstruktur **25** unter Verwendung von Dithranol und THF: a) **Fraktion 25.2**; radikalkationische Ionisation; b) **Fraktion 25.2**; Ag-Pseudo-Molekülionenbildung; c) **Fraktion 25.1**; Na-Pseudo-Molekülionenbildung.

Die Fragmentsignale entsprechen im unkalibrierten Segment des PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrums (Kapitel 2.2.2, S. 26) denen im Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum (**Abb. 3-85**, S. 164). Somit sind die im niederen Massenbereich erhaltenen Signale bei den **Fractionen 25.1**

(Abb. 3-85a) und **25.2** (Abb. 3-85b) PSD-Fragmente der Zielstruktur (M_{PSD}) bzw. der **Struktur des Nebenproduktes** (N_{PSD}).

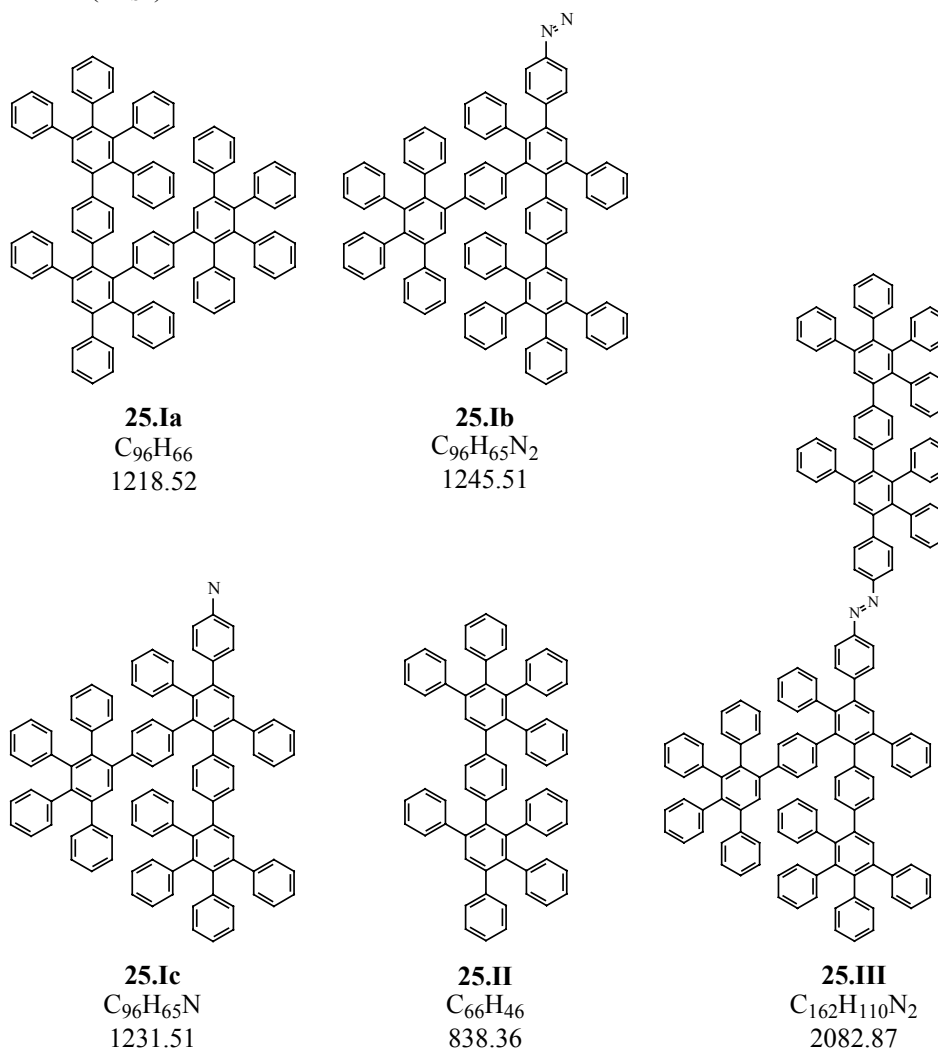


Abb. 3-90: Theoretische Fragmentstrukturen der Zielstruktur **25**. [Angaben der Isotopenmassen in Da: exakt; bezogen auf gesättigte Strukturen]

Der für das radikalkationische Elternion gefundene Fragmentierungsprozess wird ebenfalls für das Ag-Pseudo-Molekülion wie folgt nachgewiesen. Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Ag-Pseudo-Molekülion (**Abb. 3-89b**) zeigt ein intensives Fragmentation, welches dem intakten Dendron **25.Ia** als Ag-Pseudo-Fragmentation entspricht.

Ein PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Na-Pseudo-Molekülions kann aufgrund der Signalüberlappung (**Abb. 3-86c**) mit der unbekanntem **Struktur 25.N** in **Fraktion 25.2** nicht aufgenommen werden. Das intensivste Fragmentation im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Na-Pseudo-Molekülions (**Abb. 3-89c**) aus **Fraktion 25.1** kann dem intakten Dendron **25.Ia** als Na-Pseudo-Fragmentation zugewiesen werden. Zusätzlich werden auch Strukturen **25.Ia** als Radikalkation, sowie **25.Ib**, **25.Ic** und **25.III** als Na-Pseudo-Fragmentation gefunden.

Aus diesen vergleichenden PSD-Untersuchungen mittels Na- und Ag-Pseudo-Molekülionenbildung und der radikalkationischen Ionisation geht eindeutig der Fragmentierungsprozess von **25** unter Bindungsbruch der Kohlenstoff-Heteroatombindung und

Abspaltung von N_2 hervor, welcher sich unter den gewählten Bedingungen abhängig von der Ionisation des Elternions zeigt. Unabhängig von der zugrundeliegenden Ionisation lässt die MALDI-Fragmentionenanalyse dieser Substanzklasse eine Dendronenlängenbestimmung dieses Dendrimers **25** zu.

Aufgrund dieses prominenten Fragmentbruches kann für die Strukturanalyse des **Nebenproduktes 25.N** (**Abb. 3-88**, S. 166) erwartet werden, dass bei einer chemischen Modifikation eines der Dendronen (z.B. **25.N-1**) zwei intensive Fragmente mit einer Massendifferenz von 26 Da auftreten. Bei der chemischen Modifikation einer Verbrückung im Bereich der Azobrücke der beiden Dendrone **25.N-2**, könnte sich die Fragmentierung komplexer gestalten und die Zuordnung erschweren, da der für dieses Dendrimer prominente Fragmentbruch erschwert wird.

Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des radikalkationischen Elternions des **Nebenproduktes 25.N** zeigt den bevorzugten Bindungsbruch der Kohlenstoff-Heteroatombindung unter Abspaltung von N_2 (**Abb. 3-91a**). Dabei wird Struktur **Ia** als prominente Fragmentation (**Abb. 3-90**) gebildet.

Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren des Ag-Pseudo-Molekülions des **Nebenproduktes 25.N** (**Abb. 3-91b**) sind noch wesentlich aussagekräftiger, da ausschließlich zwei prominente Fragmentensignale gewonnen werden. In beiden Ionisationsfällen wird unter Berücksichtigung des Fragmentierungsprozesses der Zielstruktur **25** deutlich, dass es sich bei den Fragmentensignalen jeweils um ein Dendron mit chemischer und eines ohne chemische Carbonylmodifikation handelt.

Die Interpretation dieser beiden MALDI-TOF-Fragmentationenanalysen in Abhängigkeit von der Ionisation des Nebenproduktes **25** konnte nur dadurch eindeutig geführt werden, dass der jeweilige Fragmentierungspfad durch die Zielstruktur **25** bereits geklärt war. Wäre dies nicht der Fall gewesen, so müssten die beiden intensiven Signale auf die Fragmentdendronen **25.Ia** und **25.Ib** (**Abb. 3-90**) zurückgeführt werden.

Damit kann gefolgert werden, dass die MALDI-TOF-Fragmentationenanalyse für die Dendronenlängenbestimmung dieser Substanzklasse herangezogen werden kann. Die MALDI-TOF-MS und die MALDI-TOF-Fragmentationenanalytik können der Strukturcharakterisierung unbekannter Strukturen dienlich sein, obgleich in diesem besonderen Fall, aufgrund der geringen Massendifferenzen (5 bis 15 ppm) der theoretischen Nebenprodukte ($M+C_2H_2$, $M+N_2-H_2$ oder $M+CO-H_2$), die MALDI-TOF-MS-Analyse nicht ausreicht, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. NMR-spektroskopisch kann nur festgehalten werden, dass es sich um eine Carbonylgruppe handelt, wobei massenspektrometrisch gezeigt werden konnte, dass sich diese chemische Modifikation des **Nebenproduktes 25.N** in **Fraktion 25.2** in einem der Dendronen befinden sollte. Damit wird der Strukturvorschlag **25.N-2** (**Abb. 3-88**, S. 166) aufgrund der PSD-MALDI-TOF-Analyse sehr unwahrscheinlich, was auch unter chemischen Gesichtspunkten zu erwarten war. Keine der angewendeten analytischen Methoden erlaubt es jedoch eine eindeutige Information über die Lokalisation dieser Carbonylgruppe zu geben.

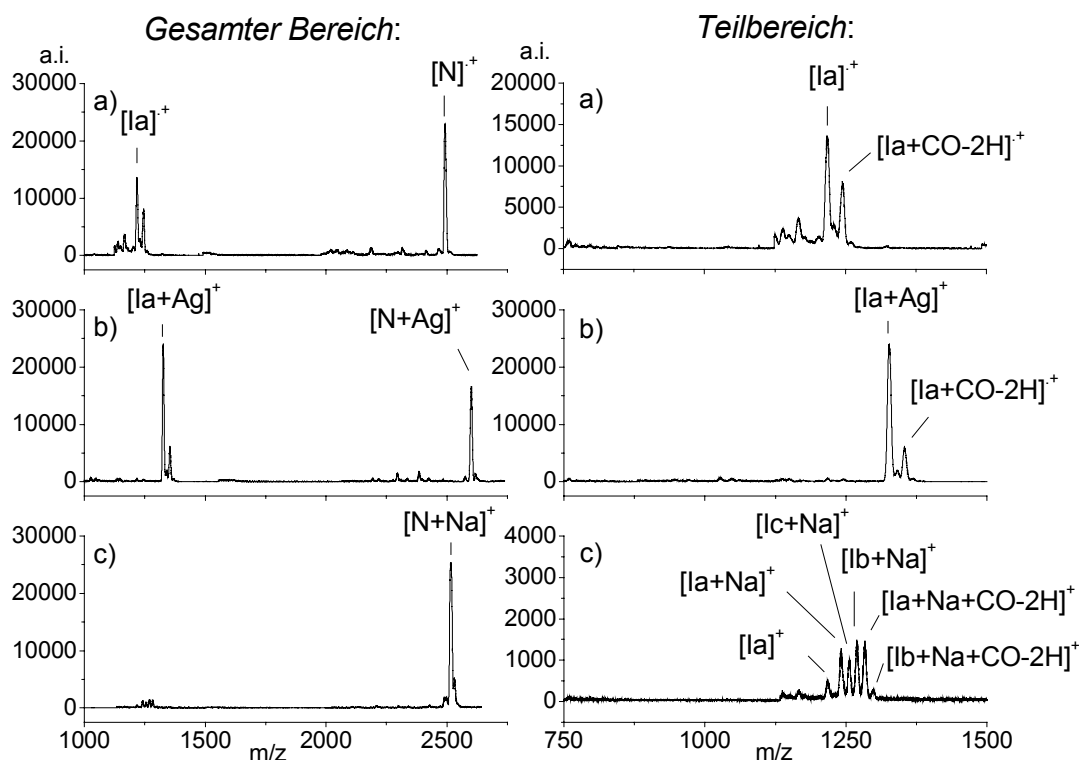


Abb. 3-91: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren des **Nebenproduktes 25.N** der **Fraktion 25.2** unter Verwendung von Dithranol, THF und gleichen Laserleistungen: a) Radikalkationische Ionisation; b) Ag-Pseudo-Molekülonenbildung; c) Na-Pseudo-Molekülonenbildung.

Damit sind grundlegende Aussagen getroffen. Weiterführende Überlegungen zur Ionisation sollen hier durchgeführt werden, um deren Bedeutung für die massenspektrometrische Analyse hervorzuheben. Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Na-Pseudo-Moleküliöns des **Nebenproduktes 25.N** ist in **Abb. 3-91c** dargestellt und zeigt deutliche Abweichungen zu den beiden anderen PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren. Aus dem PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungsverhalten des **Nebenproduktes 25.N** des Na-Pseudo-Moleküliöns wird deutlich, dass die Ionisation einen ausschlaggebenden Einfluss auf den Fragmentierungsprozess nimmt. Aus den niedrigen Signalintensitäten der Fragmente geht hervor, dass durch die Wechselwirkung der Natriumkationen mit der Molekülstruktur eine eindeutige Stabilisierung des Gesamtsystems verursacht wird. Die zusätzlichen Fragmente zeigen eindeutig, dass auch eine Änderung des Fragmentierungsprozesses beschränkt wird.

Beides ist wie folgt erklärbar. Alkalimetalle wechselwirken bevorzugt mit freien Elektronenpaaren (**Abb. 3-78**, S. 154)²¹⁶, die bei diesem Dendrimersystem ausschließlich an den Stickstoffatomen im Kern des Dendrimers vorhanden sind. In diesem Falle kommt den Stickstoffatomen jedoch eine ganz besondere, lokale Bedeutung zu, da in diesem Dendrimersystem ausschließlich bei der Azobrücke ein dominanter Bindungsbruch gefunden wird. Durch die Wechselwirkung der freien Elektronenpaare der Stickstoffatome und des Natriumkations wird der

Bindungsbruch erschwert, so dass die Fragmentationausbeute kleiner wird (vgl. radikalkationische Ionisation **Abb. 3-91a** und Na-Pseudo-Molekülionenbildung **Abb. 3-91c**). Diese Wechselwirkung muss entsprechend stark sein, da sie sogar N₂ als gute Abgangsgruppe im Fragmentierungsprozess derart zu stabilisieren vermag, dass die Fragmentstruktur **25.Ib** detektiert werden kann.

Betrachtet man nun den Fragmentierungsprozess des Ag-Pseudo-Molekülions im Vergleich, so wird der grundlegende Unterschied dieser Metall-Pseudo-Molekülionenbildung deutlich. Ein Silberkation wechselwirkt bevorzugt mit Aromaten (**Abb. 3-78**, S. 154)^{196,209,210} und übt daher auf das Zentrum des Fragmentierungsprozesses keinen Einfluss aus. Dies wird durch ein sehr prominentes Fragmentensignal des intakten Dendrons verifiziert (**Abb. 3-91b**).

Aus Sicht der massenspektrometrischen Untersuchung dieser gezielten Gemischanalytik konnten wichtige Fragen geklärt werden. Durch die massenspektrometrische Untersuchung ist **Fraktion 25.1** als rein einzustufen, da sämtliche zusätzliche Signale im konventionellen MALDI-TOF-Massenspektrum massenspektrometrischer Herkunft (Metall-Pseudo-Molekülionen, PSD-Fragmentionen) sind. Durch die Massengenauigkeit der MALDI-TOF-MS-Analyse kann in **Fraktion 25.2** für das **Nebenprodukt 25.N** auf eine chemische Modifikation der Zielstruktur mit 26 Da höherer Masse geschlossen werden, die, aufgrund des Fragmentierungsverhaltens bei PSD-MALDI-TOF-Analysen, in einem Dendron **25.N-1** lokalisiert ist. Dabei wird für die Fragmentenanalyse deutlich, dass das Fragmentierungsverhalten, ebenfalls in Abhängigkeit von der Ionisation, geklärt sein muss, bevor eine Strukturidentifikation unbekannter Gemischbestandteile betrieben werden kann. Eine zuverlässige Strukturanalyse kann bislang nur durch Vergleichsmessungen durchgeführt werden und ist auf prominente Elternionensignale und auf multiple strukturspezifische Fragmentbrüche angewiesen. Letzteres wird für **25** nicht gefunden und verhindert in diesem Beispiel eine detailliertere Identifikation der Lokalisation der Carbonylgruppe im **Nebenprodukt 25.N**, da nur ein prominenter strukturspezifischer Fragmentbruch gefunden wird. Diese massenspektrometrischen Untersuchungen werden durch die notwendigen Vergleichsmessungen mit strukturverwandten Molekülen und unter Berücksichtigung der Ionisation sehr zeitaufwendig und sind aus diesem Grund nicht routinemäßig einsetzbar. Im Bereich von Makromolekülen und synthetischen Polymeren besteht daher Entwicklungsbedarf in einer möglichst automatisierten Fragmentdatenaufnahme und -auswertung sowie Datenbankrecherche, um möglicherweise Fragmentierungsprozesse einzelner Substanzklassen ableiten zu können.

Aus diesem Beispiel geht die Bedeutung der Zusammenarbeit zwischen Massenspektrometrie, Spektroskopie und Synthese hervor. Dem Synthetiker ermöglicht die gelieferte Information die Reaktionsbedingungen der Cycloaddition durch Kenntnisse der Nebenprodukte gezielt zu verbessern.

3.4.3.5 Polyphenylendrimere mit tetraedrischem Kern

Die Struktur des Polyphenylendrimers mit tetraedrischem Kern **26** (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-14**; S. 269)^{xxii} ist in **Abb. 3-76** dargestellt. Der massenspektrometrisch motivierte Aspekt dieser Untersuchung ist die Übertragung der Kenntnisse aus der Dendronenlängenbestimmung der Azodendrimere (Kapitel 3.4.3.3, S. 161), bei denen eine offensichtliche Sollbruchstelle zugrunde liegt, auf andere Dendrimersysteme.

Da es sich bei Makromolekül **26** um ein steifes Polyphenylendrimere handelt, kann auch hier eine gewisse Absorption der Lasereinstrahlung des UV-Lasers (337 nm) durch den Analyten angenommen werden und damit Fragmentierung des Makromoleküles induzieren. Das MALDI-TOF-Massenspektrum in **Abb. 3-92** wurde durch die konventionelle lösungsmittelbasierende Probenpräparation mit Dithranol erhalten. Das intensivste Signal kann dem Elternion **26** als $[M]^+$ zugeordnet werden. Daneben zeigen sich zwei sehr intensive Signale im niederen Massenbereich: bei einem Molekulargewicht von 2626 Da erscheint ein breites unaufgelöstes Signal und bei 2523 Da ein isotopenaufgelöstes Signal. Letzteres lässt sich rechnerisch bestimmen zu $[M-1\text{Dendron}]^+$. Durch Zugabe von Metalltrifluoracetaten ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{K}$, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$) erfolgt aufgrund der Pseudo-Molekülionenbildung die Verschiebung des Elternions (Kapitel 2.1.3, S. 20) jeweils um die Masse des eingesetzten Kations. Dabei erfolgt in jedem Falle eine bevorzugte Ionisation des intakten Moleküls durch Pseudo-Molekülionenbildung, welches durch das jeweils gezielt eingesetzte Metalltrifluoracetatsalz erreicht wird. In geringem Maße wird eine radikalkationische Ionisation des intakten Moleküls gefunden. Eine entsprechende Molekulargewichtsverschiebung wird bei den einzelnen Messungen jedoch nicht für die Signale im niederen Massenbereich gefunden, wenn auch deren Signalintensitäten bei unterschiedlicher Ionisation variieren. Diese müssen daher radikalkationisch ionisiert sein.

Beide Signale im niederen Massenbereich (**Abb. 3-92**) lassen sich nicht durch unterschiedliche Pseudo-Molekülionen oder durch chemische Gesichtspunkte erklären. Sie gewinnen jedoch im Vergleich zum Elternionensignal mit Zunahme der Laserleistung stark an Signalintensität und -breite (**Abb. 3-94**). Die Vermutung verstärkt sich dahingehend, dass es sich bei diesen Signalen um Fragmente und nicht um chemische Nebenprodukte handelt. Mit Zunahme der angewendeten Laserleistung treten verstärkt Signale im Bereich des Elternions auf, die Massendifferenzen von 107, 63, 23 und 7 Da aufweisen. Diese erscheinen sogar bei der größten angewendeten Laserleistung in **Abb. 3-92d** mit einer größeren Signalintensität als das radikalkationische Elternion. Die Massendifferenzen lassen sich rechnerisch als Ag-, Cu-, Na- und Li-Pseudo-Molekülionen bestimmen und werden auf Metallspuren des MALDI-Probengemisches zurückgeführt (Kapitel 2.1.3, S. 20). Die zusätzlichen Signale im Massenbereich des zu erwartenden Elternionensignals sind daher massenspektrometrischer Natur und damit keiner chemischen Verunreinigung zuzurechnen.

^{xxii} Die Synthese wurde von Frau *Dr. T. Weil* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

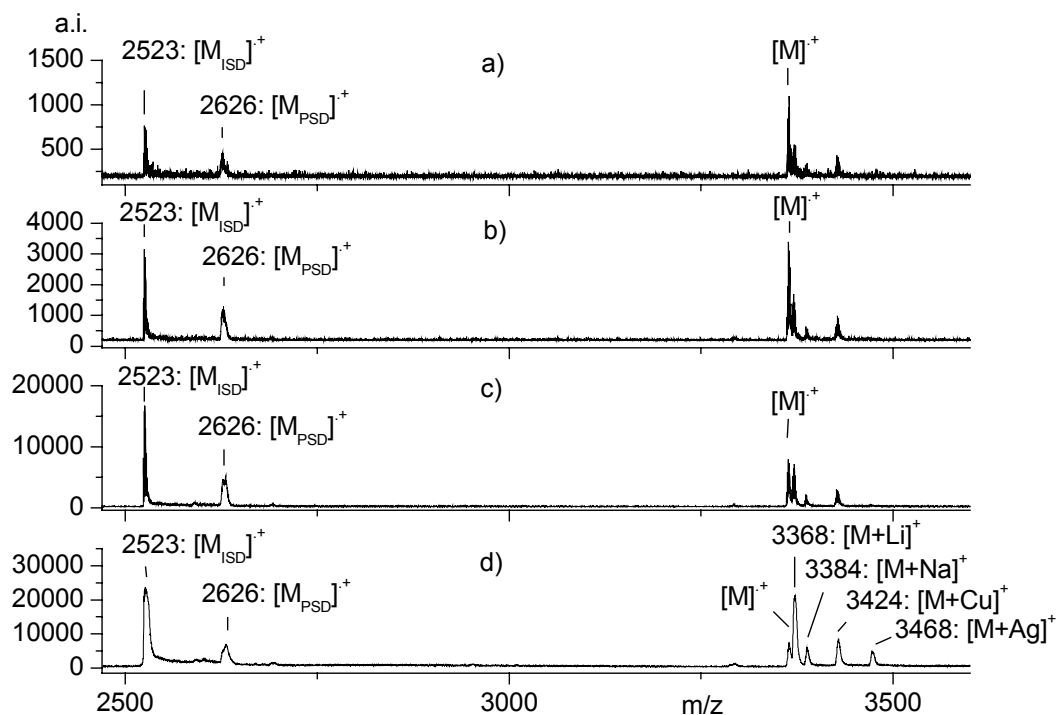


Abb. 3-92: Lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-Massenspektren von Dendrimer mit tetraedrischem Kern **26** bei gleicher Ionisation in Abhängigkeit von der relativen Laserleistung.

Für das Signal bei 2523 Da konnte die Hypothese der Fragmentherkunft durch Linear-MALDI-TOF-Messungen (Kapitel 2.1.4, S. 22) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich dabei um ISD-Fragmente der Fragmentstruktur **26.Ia** (Abb. 3-93). Das Signal mit 2626 Da erscheint nicht im Linear-MALDI-TOF-Massenspektrum und weist damit dessen PSD-Fragmentcharakter nach. Über die Fragmentstruktur kann durch diese indirekte Art der Fragmentenzuordnung keine Aussage getroffen werden, sondern nur über dessen Fragmentherkunft.

PSD-MALDI-TOF-Fragmentenanalytik wurde daher zur eindeutigen Strukturverifizierung des vermuteten PSD-Fragmentes durchgeführt. Das erhaltene PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum in **Abb. 3-94a** zeigt das selektierte radikalkationische Elternion $[M]^+$ neben einem sehr intensiven Fragmention mit 2523 Da, welches der Fragmentstruktur **26.Ia** zugeordnet werden kann.

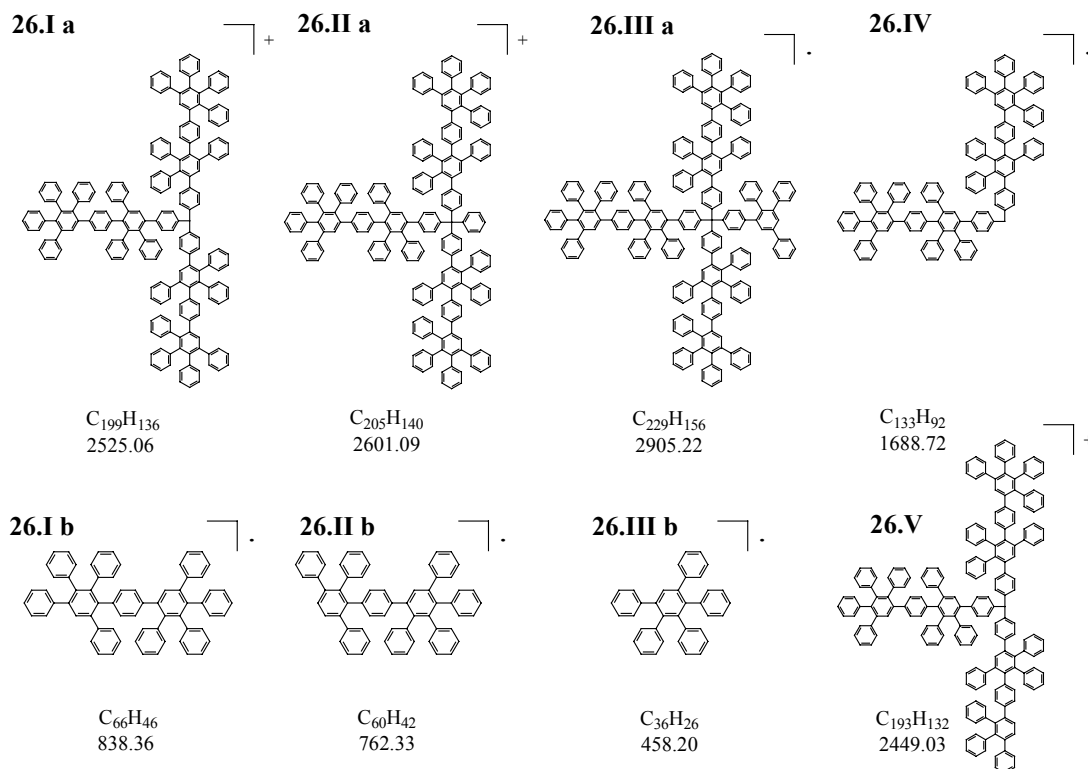


Abb. 3-93: Theoretische Fragmentstrukturen des Polyphenylendrimers mit tetraedrischem Kern **26**. [Angaben der Isotopenmassen in Da: exakt; bezogen auf gesättigte Strukturen]

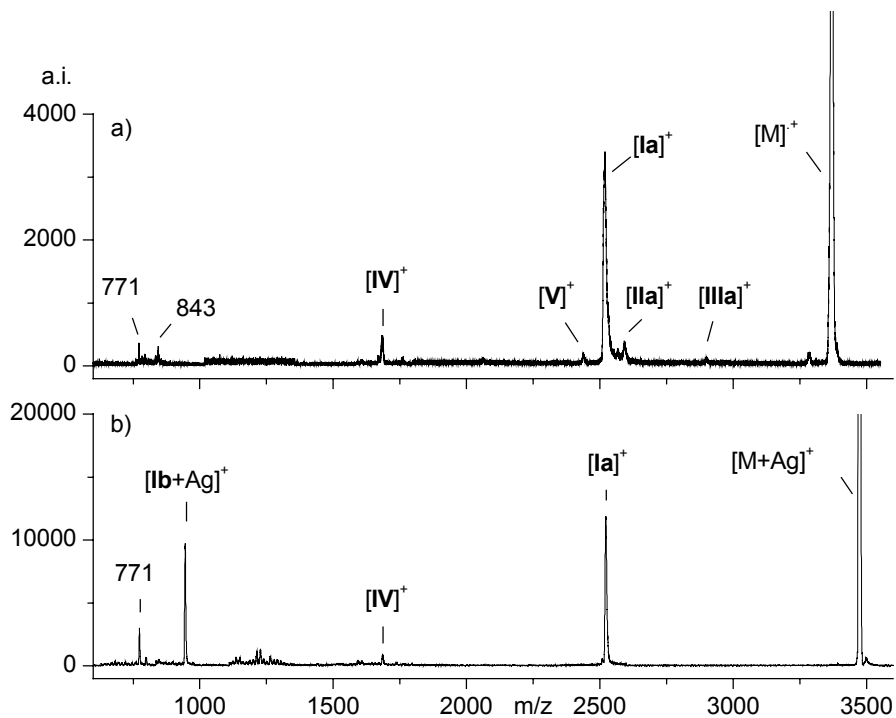


Abb. 3-94: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von Dendrimer mit tetraedrischem Kern **26**: a) Radikalkationische Ionisation; b) Ag-Pseudo-Molekülonenbildung.

Bei der Interpretation des Segmentes des unkalibrierten PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrums (Kapitel 2.2.2, S. 26) erscheint das Signal für die Fragmentstruktur **26.Ia** bei einer Masse von 2626 Da. Damit wird der eindeutige Beweis erbracht, dass es sich im Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum um das PSD-Fragment der Fragmentstruktur **26.Ia** handelt. Die Fragmentstruktur **26.Ia** tritt als ISD-Fragment bei 2523 Da und als PSD-Fragment bei 2626 Da im konventionellen Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum auf. Dies bedeutet, dass dieser Bindungsbruch über einen längeren Zeitraum auftritt, und zwar einerseits sehr schnell innerhalb der Quelle und andererseits zeitlich verzögert als ein metastabiler Zerfallsprozess in der Flugstrecke vor dem Lineardetektor.

Die sehr bevorzugte Bruchstelle kann dadurch erklärt werden, dass die Spannung in der Elternionenstruktur aufgrund des sterischen Anspruchs der vier gleichen Dendrone so hoch ist, dass hierdurch eine Fragmentierung begünstigt wird. Jedoch forciert vermutlich ebenfalls die Bildung eines stabilen Tritylkations die Abspaltung eines kompletten Dendrons. Damit wird eine atypische Art der Fragmentierung verursacht: Die Spannung im intakten Makromolekülion ist energetisch ungünstig und das Fragmention energetisch sehr günstig, so dass dieser Prozess einer „strukturgetriebenen Fragmentierung“ in ein Energieminimum gehorcht.

Fragmente im konventionellen MALDI-TOF-Massenspektrum, wie an diesem Beispiel eindrucksvoll gezeigt werden konnte, erschweren oder verhindern gar die Interpretation. Dies gilt insbesondere für PSD-Fragmente, die im Gegensatz zu ISD-Fragmenten im Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum nicht bei ihrer realen Masse erscheinen. Nur durch eine gezielte PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik mit der dazugehörigen Kalibrierung kann eine eindeutige Interpretation durchgeführt werden. Diese Untersuchungen unterstreichen damit die Bedeutung der MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik.

An diesem Punkt ist wesentliches zum praxisrelevanten Aspekt verstanden. Bei den Signalen im niedrigeren Massenbereich der erhaltenen Massenspektren handelt es sich um massenspektrometrische Fragmente unterschiedlicher Herkunft und bei den Signalen im Bereich des Elternions um unterschiedliche Ionisationen. Damit ist **26** trotz vieler Signale im Massenspektrum als eine massenspektrometrisch reine Substanz einzustufen. Nachdem der praxisrelevante Teil dieser Experimente abgeschlossen ist, sollen weiterführende Untersuchungen im Bereich der Grundlagenforschung durchgeführt werden, da das System geeignet erscheint, um unterschiedliche Arten der Ionisation und deren Stabilitäten miteinander zu vergleichen.

Untersuchungen zur Fragmentierung in Abhängigkeit von der Ionisation sollen durchgeführt werden, um qualitative Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu erarbeiten. Hierfür soll zunächst das detaillierte Fragmentierungsverhalten von Struktur **26** im erhaltenen PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum der radikalkationischen Ionisation in **Abb. 3-94** anhand der in **Abb. 3-93** zusammengefassten Fragmentstrukturen diskutiert werden. Der Hauptfragmentbruch wird durch die Abspaltung eines intakten Dendrons besprochen und führt wie schon beschrieben zu der tritylstabilisierten Fragmentstruktur **26.Ia**. Mit äußerst geringen Signalintensitäten im Massenspektrum lassen sich die Fragmente **26.IIa** und **26.IIIa** nachweisen, deren Ladungen in der jeweilig gebildeten Fragmentstruktur weniger gut stabilisiert sind als die der tritylstabilisierten Struktur **26.Ia**. Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum zeigt die größte Nebenfragmentsignalintensität, bei der zwei intakte

Dendrone abgespalten werden, und stellt damit den größten Konkurrenzfragmentbruch dar. Diese Fragmentstruktur **26.IV** ist vermutlich aufgrund der gebildeten Carbenstruktur stabiler und erklärt deren intensivere Nebensignalintensität im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum. Des Weiteren wird eine Fragmentstruktur **26.V** gebildet, bei der formal ein unversehrtes Dendron und ein Phenylring abgespalten werden. Die zugrundeliegende Fragmentierung wird dabei zwei homolytischen Spaltungen zugeschrieben.

Auffallend ist, dass die Fragmentstruktur **26.Ia**, nicht jedoch das Gegenbruchstück **26.Ib** detektiert werden kann. Dies stimmt mit der Theorie überein, dass eine radikalkationische Ladung mit zunehmender Systemgröße besser delokalisiert werden kann (**Abb. 3-78**, S. 154). Bei dieser PSD-MALDI-TOF-Fragmentierung verbleibt die Ladung nach einem Bindungsbruch der Theorie zufolge auf dem größeren Molekülbruchstück **26.Ia** (**Abb. 3-95**). Das kleinere Bruchstück wird als Neutralteilchen abgespalten und kann massenspektrometrisch nicht detektiert werden. In Analogie dazu bilden sich auch nicht die Fragmente **26.IIb** und **26.IIIb**.

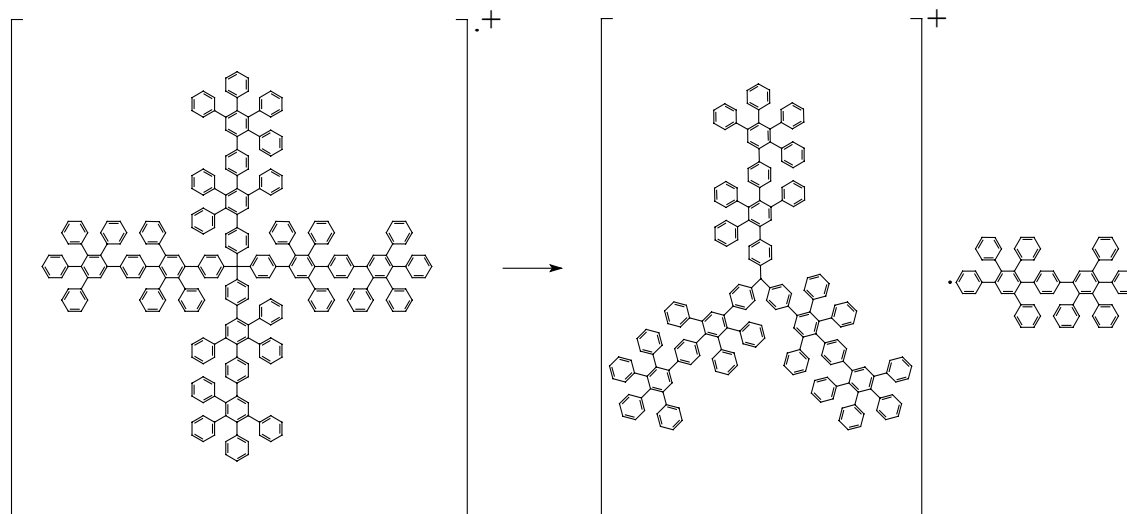


Abb. 3-95: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmechanismus bei radikalkationischer Ionisation des Moleküls **26**.

Die im unteren Massenbereich auftretenden Signale (**Abb. 3-94**, S. 174) mit geringer Intensität sind damit nicht durch einen einfachen homolytischen Bindungsbruch zu erklären, sondern möglicherweise durch Umlagerungsreaktionen. Aufgrund der geringen Signalintensität wird hier nicht näher darauf eingegangen. Die grundlegenden Fragmente und deren zugrundeliegenden Prozesse bei radikalkationischer Ionisation können somit verstanden werden.

Die gleichen Untersuchungen sollen nun für die Ionisation des Makromoleküls zu Ag- und Na-Pseudo-Molekülen durchgeführt werden. Die bevorzugte Wechselwirkung dieser Metallkationen mit unterschiedlichen Strukturelementen ist in **Abb. 3-78** (S. 154) schematisch dargestellt. Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Ag-Pseudo-Moleküls (**Abb. 3-94b**) zeigt ein intensives Hauptfragment, das durch Abspaltung eines intakten Dendrons des Makromoleküls zur Bildung der Fragmentstruktur **26.Ia** (**Abb. 3-93**, S. 178) führt. Daneben wird durch Abspaltung zwei intakter

Dendronen die Fragmentstruktur **26.IV** gebildet. Als Anomalie erweist sich, dass diese Fragmentstrukturen als Radikalkationen detektiert werden, und nicht als Ag-Pseudo-Molekülonen. Zwei Grundgedanken sollen an dieser Stelle erörtert werden, um diese Anomalie der Fragmentierung zu verstehen.

i) Da das elektronische PSD-„Gate“ in dem verwendeten Massenbereich zuverlässig Massen in einem Bereich von ± 30 Da zu selektieren vermag, kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass selektiv ein Ag-Pseudo-Molekülon fragmentiert wird. Ein Beitrag durch ein radikalkationisch angeregtes Dendrimerelternion im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum kann aufgrund der Massendifferenz zum selektierten Ag-Pseudo-Molekülon von 107 Da ausgeschlossen werden und damit auch, dass das radikalkationische Fragment aus einem radikalkationischen Elternion gebildet wurde.

ii) Würde hypothetisch das erfolgreich selektierte Ag-Pseudo-Molekülon $[M+Ag]^+$ nach dem Verlassen des elektronischen PSD-„Gates“ eine Dissoziation des Kations eingehen, so würde M als Neutralteilchen anfallen, welches massenspektrometrisch nicht mehr zugänglich sein würde. Gleichermaßen wären auch anschließende Fragmentierungen dieses Neutralteilchens nicht mehr massenspektrometrisch erfassbar.

Eine solche Anomalie kann dadurch zustande kommen, dass eine hochgradig stabilisierte Fragmentionenstruktur gebildet wird, wie z.B. die des Tritylkations. Im Unterschied zum normalen Fragmentierungspfad, der ausschließlich zu Pseudo-Fragmentionen führt, würde als Konkurrenzfragmentierungspfad zusätzlich eine Ladungsübertragung vom Silberkation auf das Fragmention stattfinden: Das aus dem normalen Fragmentierungspfad zunächst erzeugte Ag-Pseudo-Fragmention **26.Ia** bildet durch eine Ladungsübertragung das Radikalkation **26.Ia** und elementares Ag (**Abb. 3-96**). Dieser anomale Fragmentierungspfad tritt als Hauptfragmentierungspfad im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum und ebenfalls in den Reflektron- und Linear-MALDI-TOF-Massenspektren auf. Da von den erwarteten Pseudo-Fragmentionen lediglich die Ag-Pseudo-Molekülonenstruktur **26.Ib**, nicht jedoch die radikalkationische **26.Ib** gefunden werden kann, verstärkt sich die Hypothese einer Anomalie im Fragmentierungsmechanismus.

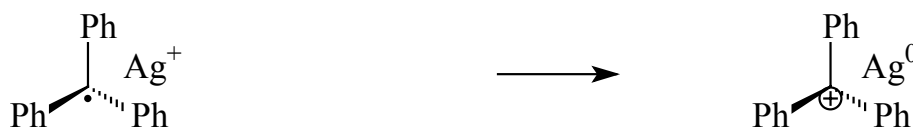


Abb. 3-96: Ein anomaler Fragmentierungspfad der Polyphenylendrimere bei Gegenwart von Silberkationen führt durch Ladungsübertragung zur radikalkationischen Tritylfragmentstruktur und zu elementarem Silber.

Die Fragmentstrukturen **26.IIa**, **26.IIIa** und **26.V** werden im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Ag-Pseudo-Molekülon nicht detektiert. Dies steht soweit mit der Theorie zur Anomalie des Fragmentierungsmechanismus im Einklang, da diese Strukturen nicht die postulierte trityl-stabilisierte Struktur aufweisen.

Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren des Na-Pseudo-Molekülon zeigen das intensivste Fragmention als Struktur **26.Ia** (Daten nicht gezeigt) und stehen damit im Einklang mit den

Fragmentierungsergebnissen des Ag-Pseudo-Molekülions. Die Anomalie bei der Fragmentierung des Pseudo-Molekülions zu einem intensiven radikalkationischen Fragmentions kann damit bestätigt werden und ist als Eigenart der Ionisation und nicht als Eigenart des verwendeten Kations anzusehen. Da nur im Falle eines Silberkations und nicht eines Natriumkations die Fragmentstruktur **26.Ib** als Metall-Pseudo-Molekülion detektiert wird, muss daraus geschlossen werden, dass ein Silberkation wesentlich besser als ein Natriumkation an ein Polyparaphenylendendron anbindet und damit der normale Fragmentierungspfad zugunsten des anormalen verschoben ist. Dies steht damit im Einklang, dass sich Silberkationen bevorzugt an aromatische Substituenten unter Bildung einer Sandwichstruktur anbinden und das Natriumkation bevorzugt Wechselwirkung mit Heteroatomen eingeht. Des weiteren kann angeführt werden, dass Na^+ weniger leicht zu Na^0 reduziert werden kann als Ag^+ zu Ag^0 .

Der Vergleich der beiden grundlegend unterschiedlichen Ionisationen zeigt, dass das radikalkationische Molekülion **26** mehr Fragmentierungspfade beschreitet als das Metall-Pseudo-Molekülion **26**. Um Aussagen zur Stabilität bei unterschiedlicher Ionisation treffen zu können, werden die erhaltenen Reflekttron-MALDI-TOF-Massenspektren unter Verwendung gleicher Laserleistungen von 35 bei einer Probenpräparation mit Dithranol als Matrix miteinander verglichen: Massenspektren unter Zugabe von $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$ und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ zeigen rund doppelt so intensive Signale des Elternions (> 10.000 a.i.) als die Massenspektren ohne Metalltrifluoracetatzugabe (um 5.000 a.i.).

Auffällig zeigt sich, dass die Fragmentanteile durch den Bruch eines intakten Dendrons unter Zugabe eines $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (um 10 %) oder $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$ (< 10 %) weniger stark ausgeprägt sind als ohne Metalltrifluoracetatzugabe (um 150 %). Daraus kann geschlossen werden, dass die Pseudo-Molekülionenbildung das Makromolekül stabilisiert, so dass weniger Fragmentierung auftritt. Dabei zeigt sich als wichtigste Information, dass diese Strukturen wesentlich zuverlässiger durch Zugabe von Metalltrifluoracetatsalzen analysiert werden können.

Hinsichtlich der Stabilität der Ionen und des Fragmentierungspfades lässt sich postulieren, dass die Pseudo-Molekülionenbildung sehr selektiv aufgrund der Wechselwirkung des Makromoleküls mit dem Metallkation nur wenige Bruchstellen bevorzugt. Das Molekülion wird dabei auch dahingehend stabilisiert, dass insgesamt weniger Fragmentierung auftritt. Die massenspektrometrisch labilste Stelle ist der tetraedrische Kohlenstoffkern. Unabhängig von der Ionisation des Makromoleküls wird ein Tritylfragmentkation gebildet. Aufgrund der sehr bevorzugten Bruchstelle zeigt sich die MALDI-TOF-MS als eine Methode, die zuverlässig die Dendronengröße dieser Dendrimere mit tetraedrischem Kern bestimmen kann.

Diese Erkenntnis veranlasste die genauere Betrachtung der Möglichkeiten der Größenbestimmung der Substanzklasse der Dendrimere mit tetraedrischem Kern. Hierzu wurde das Dendrimer **27** (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-15**; S. 270)^{XXIII} ausgewählt, welches im Vergleich zur Dendrimerstruktur **26** ein größeres Molekulargewicht und eine wesentlich dichtere Struktur bedingt durch den größeren sterischen Anspruch der A_4BCp -Dendronen aufweist. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik soll ebenfalls in Abhängigkeit von der Ionisation durchgeführt werden,

^{XXIII} Die Synthese wurde von Frau *Dr. T. Weil* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

um qualitative Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser Dendrimere mit tetraedrischem Kern **26** und **27** zu erarbeiten.

Die erhaltenen PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren in Abhängigkeit von der Ionisation von **27** sind in **Abb. 3-97a** dargestellt. Das Massenspektrum der radikalkationischen Ionisation zeigt eine vergleichsweise geringe Elternsignalintensität. Die Hauptsignalintensität wird der Fragmentstruktur **27.Ia** zugewiesen (**Abb. 3-98**), bei der ein Dendron abgespalten ist. Daneben wird mit geringen Signalintensitäten die Fragmentstruktur **27.IV** gefunden, bei der zwei Dendronen abgespalten sind.

Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren des Ag-Pseudo-Moleküls des Dendrimers **27** in **Abb. 3-97b** zeichnet das Hauptfragment als radikalkationisches Fragment der Struktur **27.Ia** (**Abb. 3-98**), neben einem vergleichsweise intensivem Fragmentensignal des Ag-Pseudo-Moleküls mit der Struktur **27.Ib** aus.

Damit werden für das TdG₂A₄BCp-Makromolekül **27** qualitativ die identischen Fragmentierungspfade und Anomalien wie für das TdG₂ABCp-Makromolekül **26** gefunden. Aufgrund des größeren Moleküls und der damit einhergehenden größeren Zahl an Bindungsbrüchen ist theoretisch auch mit verstärkter Konkurrenz von möglichen anderen Fragmentierungspfaden zu rechnen, welche jedoch nicht gefunden wurden. Beim Vergleich zum TdG₂ABCp-Dendrimer **26** steiferen TdG₂A₄BCp-Dendrimer **27** ist die massenspektrometrisch labilste Stelle auch hier die Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung des zentralen tetraedrischen Kohlenstoffkerns.

Die Signalintensitäten der Elternionen in Abhängigkeit von der Ionisation weisen deutlich größere Signalintensitäten für das Ag-Pseudo-Molekülion (um 40.000 a.i.) als für die radikalkationische Struktur (um 1.000 a.i.) auf. Im umgekehrten Maße werden die Signalintensitäten für die Hauptfragmentsignale **27.Ib** gefunden: Bei Ag-Pseudo-Molekülionen liegt die Intensität bei 2.100 a.i. und die der radikalkationischen Ionisation bei 1300 a.i.. Daraus lassen sich Fragmentierungsanteile von < 10 % für die Ag-Pseudo-Molekülionen und rund 125 % bei der radikalkationischen Ionisation berechnen. Damit zeigt sich, dass die Ionisation einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität des TdG₂A₄BCp-Dendrimers **27** ausübt.

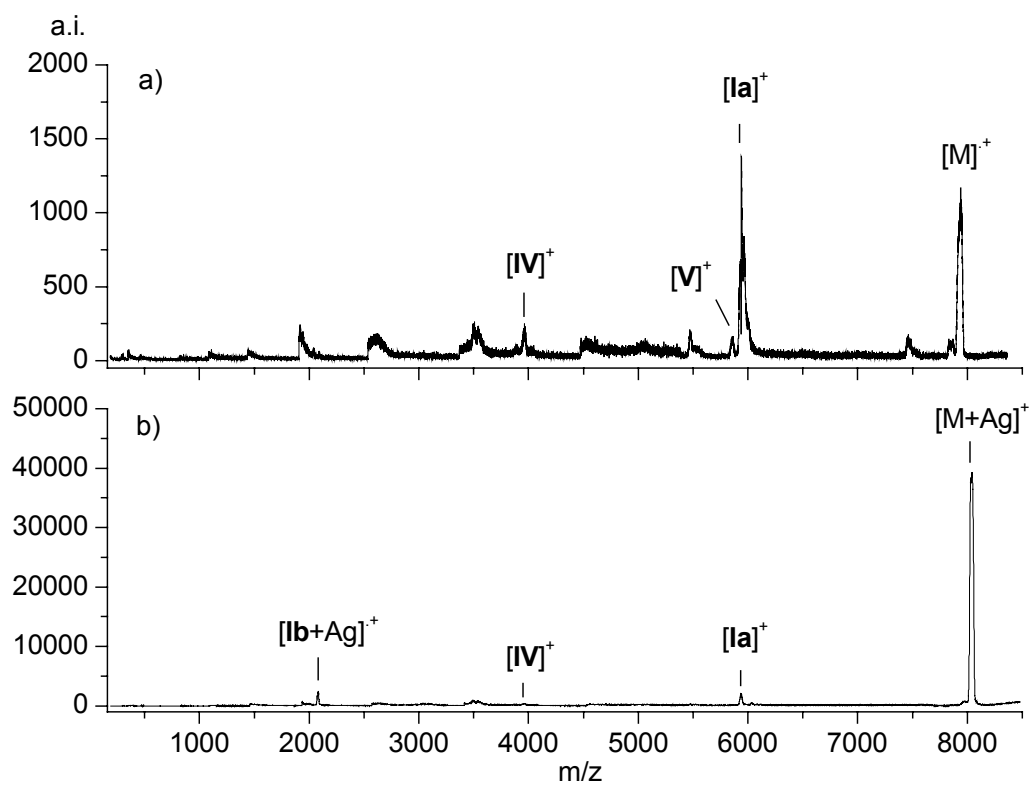


Abb. 3-97: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von Dendrimer mit tetraedrischem Kern 27: a) Radikalkationische Ionisation; b) Ag-Pseudo-Molekülonenbildung.

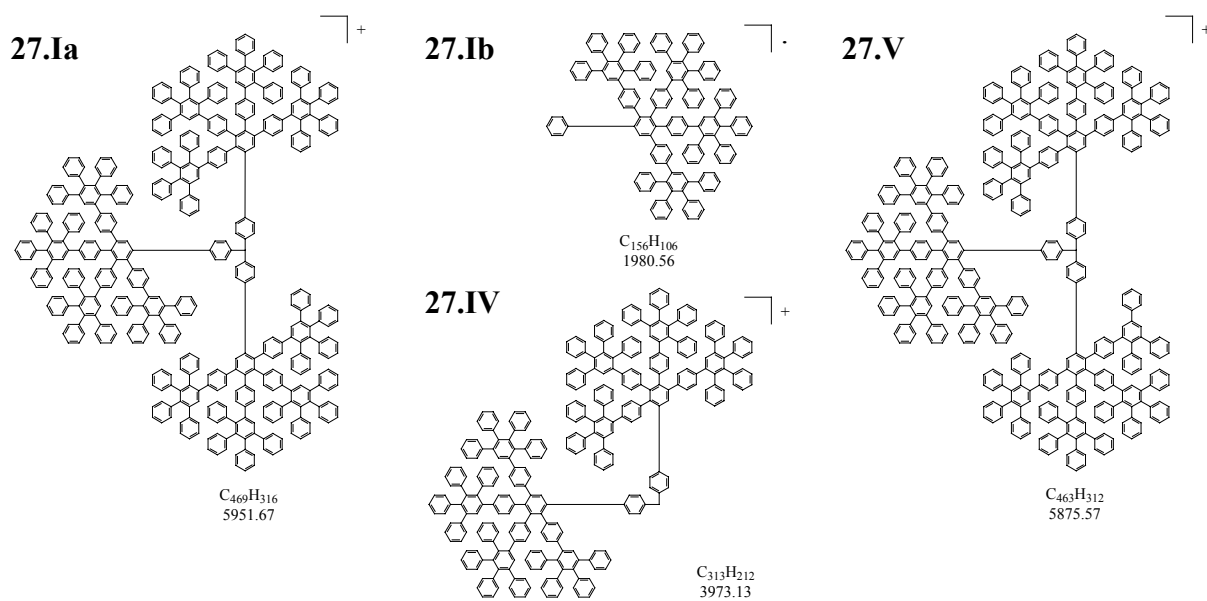


Abb. 3-98: Ermittelte Fragmentstrukturen von Dendrimer 27. [Angaben der Isotopenmassen in Da: exakt; bezogen auf gesättigte Strukturen]

Bei den weiterführenden Experimenten steht die Stabilität dieser Substanzklasse an Dendrimern in Abhängigkeit ihrer Größe im Vordergrund. Um einen möglichst direkten Vergleich zu erhalten, werden MALDI-TOF-Massenspektren in Abhängigkeit von der Metalltrifluoracetatzugabe und der Laserleistung bei identischen Messbedingungen aufgenommen. Die Ergebnisse der prozentualen Fragmentanteile von Struktur **27.Ia** gegen die Elternintensität sind in **Tabelle 3-4** zusammengestellt.

Tabelle 3-4: Fragmentierung von Dendrimern mit tetraedrischem Kohlenstoffkern in Abhängigkeit vom Molekulargewicht, der Metalltrifluoracetatzugabe und der Laserleistung. Fragmentierungsanteile beziehen sich auf die Signalintensitäten der Fragmentstruktur **26.Ia** bzw. **27.Ia** und deren relativen zur Elternionensignalintensitäten.

Metalltrifluoracetatsalz	Dendrimer 26 [in %] (4 kDa)			Dendrimer 27 [in %] (8 kDa)		
	Laserleistung 15	Laserleistung 20	Laserleistung 25	Laserleistung 15	Laserleistung 20	Laserleistung 25
Ohne	3332	128	106 ^a	717	398	81 ^a
Na	57	65	58 ^a	35	55	98 ^a
Ag	11	10	15 ^a	10	24	48 ^a

^a Messwerte besitzen aufgrund der geringen Laserleistungen größeren Fehlerbereich.

Aus dem Vergleich von TdG₂A₄BCp **27** mit TdG₂ABCp **26** kann gefolgert werden, dass Moleküle sich mit steigenden Molekulargewichten als eher fragmentierungsärmer erweisen. Folgende Tendenzen können festgestellt werden:

- Dendrimer **26** mit rund vier kDa hat höhere Fragmentierungsanteile als Dendrimer **27** mit rund acht kDa,
- identische Fragmentierungsmuster bei unterschiedlicher Ionisation,
- identische Fragmentierungstendenz in Abhängigkeit von der Metalltrifluoracetatzugabe (ohne > CF₃CO₂Na > CF₃CO₂Ag).

Aus diesen zusätzlichen Untersuchungen zum PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungsverhalten von TdG₂A₄BCp **27** geht klar hervor, dass die Dendronenlängenbestimmung dieser Dendrimere mit tetraedrischem Kern prinzipiell in einem relativ unbeschränkten Massenbereich erfolgen kann, da mit steigendem Molekulargewicht und steigender Zahl an möglichen Bruchstellen keine Konkurrenzfragmentierung auftritt. Die massenspektrometrisch bevorzugte, atypische „strukturgetriebene“ Sollbruchstelle verbleibt unabhängig vom Molekulargewicht und von der Ionisation am tetraedrischen Kohlenstoffkern. Als limitierender Faktor einer generellen Dendronenlängenbestimmung zeigt sich, dass die Qualität der Fragmentspektren unabhängig von der Ionisation aufgrund der Dacheffekte der einzelnen Segmente mit zunehmendem Molekulargewicht abnimmt (**Abb. 3-97**). Dieser Dacheffekt suggeriert nach dem elektronischen Zusammenfügen der einzelnen Segmente fälschlicherweise Signale (Kapitel 2.2.2, S. 26). Diese methodenspezifischen Nachteile könnten analog den Untersuchungen der Sternpolymere (Kapitel 3.2.2.2.3, S. 101), mittels LIFT-Fragmentionenanalytik, verbessert werden.

3.4.3.6 Biotinylierte Polyphenylendendrimere mit tetraedrischem Kern

Die Struktur des Polyphenylendendrimers mit einem Biotinsubstituenten **28** (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-16**; S. 271)^{XXIV} ist in **Abb. 3-76** dargestellt. Die erhaltenen Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren, die mittels konventioneller lösungsmittelbasierender Probenpräparation mit Dithranol bzw. mit Dithranol und unterschiedlichen Metalltrifluoracetatzusätzen erhalten wurden, sind nicht reproduzierbar hinsichtlich unterschiedlicher Substanzchargen bzw. Wiederholungsmessungen bei der selben Substanzcharge. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Chargen mit unterschiedlicher Qualität anfallen oder die Substanz chemische Alterungserscheinungen zeigt. Letzteres ist insbesondere bei biologisch aktiven Verbindungen von großem Interesse. Daher soll hier die Langzeitstabilität eines biotinylierten Polyphenylendendrimers untersucht werden. Das besondere Augenmerk liegt darauf, ob der Biotinyli substituent bei langer Lagerung abgespalten wird. Aus diesem Grund sollen systematische Vergleichsuntersuchungen an frischhergestellter **Probe 28.A** und alter **Probe 28.B** durchgeführt werden, um massenspektrometrische Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu erarbeiten.

Aus den vorangegangenen Untersuchungen an Polyphenylendendrimern mit tetraedrischem Kohlenstoffkern (Kapitel 3.4.3.5, S. 172) ist bekannt, dass diese aufgrund ihrer UV-Absorption fragmentierungslabil sind. Dabei konnte der bevorzugte Bruch eines intakten Dendrons unter Bildung des stabilisierten Tritylkationfragmentes nachgewiesen werden. Bei den Fragmentuntersuchungen der Dendrimere ohne tetraedrischen Kern erwiesen sich die Kohlenstoff-Heteroatombindungen der Boc-Schutzgruppen (Kapitel 3.4.3.2, S. 154) bzw. der Azobrücken (Kapitel 3.4.3.3, S. 161) als die labilsten Stellen in den Makromolekülen **23** und **25**. Aus den Untersuchungen des Boc-geschützten Perylendendrimers **23** in Kapitel 3.4.3.2 ist bekannt, dass die Fragmentierung dieses Dendrimers durch die Perylenchromophore so stark induziert wird, dass die Detektion des Elternions nur unter äußerst schonenden Bedingungen gelingt. Aus den vorangegangenen Untersuchungen muss damit für das Dendrimer **28**, aufgebaut aus

- einem tetraedrischem Kohlenstoffkern,
- drei Perylenchromophoren und
- einer heteroatomhaltigen biotinsubstituierten Seitenkette,

mit starker und variabler Fragmentierung gerechnet werden. Durch diese Untersuchungen sollten zusätzlich grundlegende Fragestellung wie die der bevorzugten Fragmentierungsstelle unter Berücksichtigung der Ionisation beantwortet werden.

Da sich im Verlaufe dieser Arbeit an unterschiedlichen Makromolekülen gezeigt hat (Kapitel 3.1.2, S. 30 und 3.4.3.2, S. 154), dass die lösungsmittelfreie Probenpräparation die weitaus schonendsten MALDI-Bedingungen gewährleistet und die reproduzierbarsten Ergebnisse liefert, wurden die systematischen Untersuchungen mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS an

^{XXIV} Die Synthese wurde von Frau *Dr. T. Weil* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

einer frisch hergestellten **Probe 28.A** und an einer gealterten **Probe 28.B** des Dendrimers **28** durchgeführt.

Die Reflekttron-MALDI-TOF-Massenspektren zeigen, insbesondere ohne Zusatz von Metalltrifluoracetat, mit zunehmender Laserleistung vermehrt Signale bei niedrigeren Massen (**Abb. 3-99**). Da diese Signale mit höherer Laserleistung gebildet werden, ist naheliegend, dass es sich dabei um Fragmente handelt. Diese Tendenz wird gleichermaßen für die gealterte **Probe 28.B** wie für die frischhergestellte **Probe 28.A** gefunden (**Abb. 3-99a-c**). Die vermutete Fragmentierung erscheint bei der frisch hergestellten **Probe 28.A** ausgeprägter. Des weiteren lässt sich feststellen, dass für die gealterte **Probe 28.B** weniger Laserleistung für die Spektrenaufnahme angewendet werden muss, unabhängig von der zugrundeliegenden Ionisation. Bereits geringe Spuren von Lithiumkation in der Probe führen dazu, dass kein radikalkationisches Elternion bei beiden Proben detektiert wird, sondern nur das Li-Pseudo-Molekülion.

Die Massenspektren der **Proben 28.A** und **28.B** unter Zugabe von $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (**Abb. 3-99d-f**) zeigen zunächst nur Unterschiede in den Signalintensitätslagen unterschiedlicher Pseudo-Molekülionenbildungen mit Lithium- und Natriumkationen. Das radikalkationische Elternion wird bei beiden Proben nicht detektiert.

Die größte Uneinheitlichkeit zwischen beiden **Proben 28.A** und **28.B** ist im niederen Massenbereich in Abhängigkeit von der Laserleistung und Ionisation in der Art zu finden, dass Signallagen und -intensitäten deutlich variieren. Dies ist ein erster Hinweis auf die vermutete erhöhte Fragmentierungstendenz dieser Substanzklasse. Des weiteren ist diese Labilität eine mögliche Ursache der geringen Reproduzierbarkeit bei unterschiedlichen Substanzchargen bzw. bei Wiederholungsmessungen einer Charge und der entsprechenden uneindeutigen Charakterisierung.

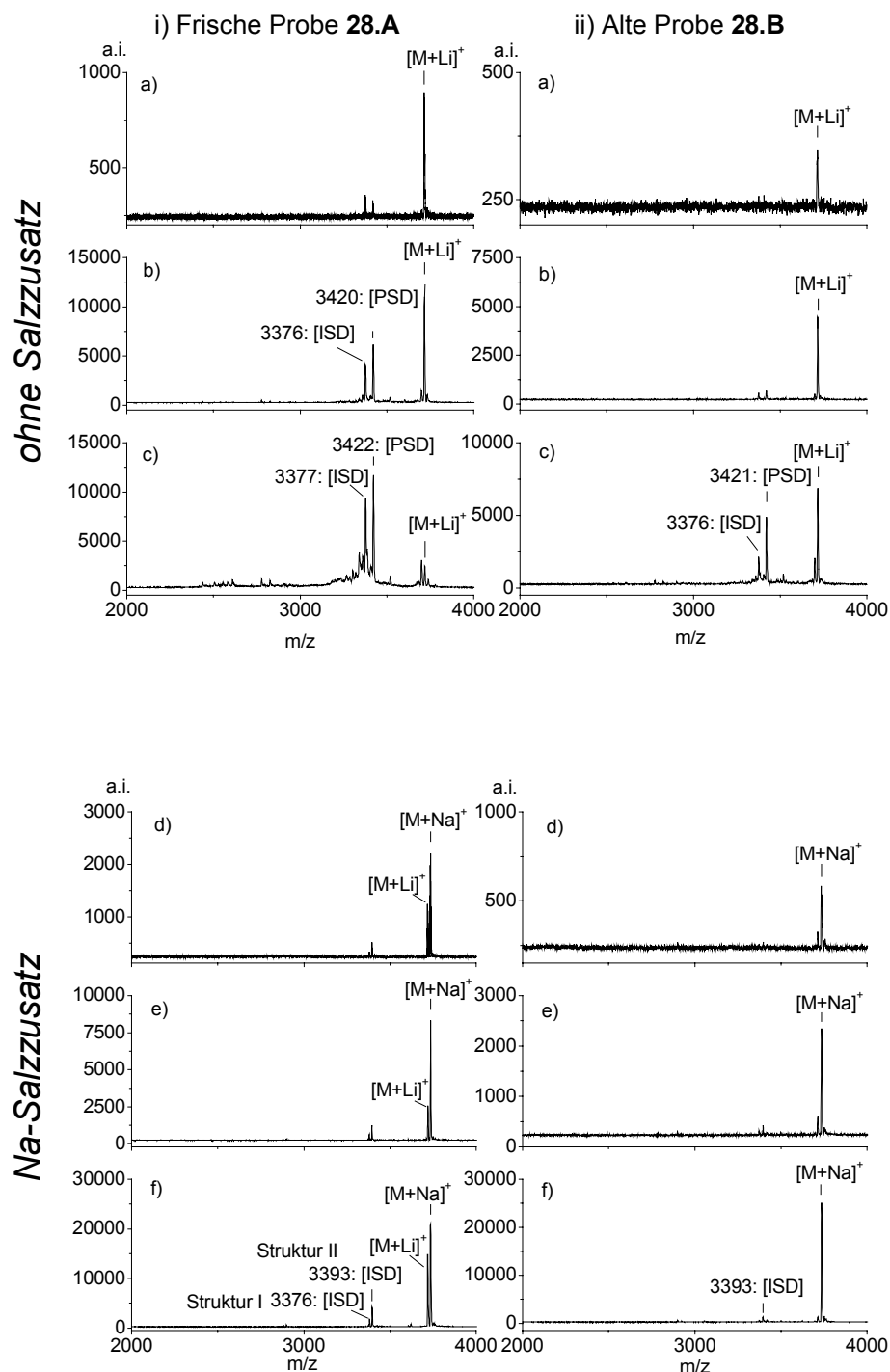


Abb. 3-99: Reflexion-MALDI-TOF-Massenspektren des Biotindendrimer **28** in Abhängigkeit von der Probenherkunft und der relativen Laserleistung: **i) Frische Probe 28.A:** ohne Metalltrifluoracetatzusatz: a) 35; b) 40; c) 45; mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$: d) 30; e) 35; f) 40. **ii) Alte Probe 28.B:** ohne Metalltrifluoracetatzusatz: a) 30; b) 35; c) 40; mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$: d) 30; e) 35; f) 40.

Um einen weiteren Einblick in die vermutete Fragmentierungstendenz (s.o.) dieses Dendrimers **28** zu gewinnen, wurden Linear-MALDI-TOF-Messungen (Kapitel 2.1.4, S. 22) unter Verwendung der lösungsmittelfreien Probenpräparation an der gealterten **Probe 28.B** und der frischen **Probe 28.A** unter Variation der Ionisation durchgeführt. Die erhaltenen Massenspektren sind in **Abb. 3-100** dargestellt. Für beide Proben sind die Messungen ohne definierte Metalltrifluoracetatzugabe (**Abb. 3-100a-c**) bzw. mit steigender Laserleistung am wenigsten informativ. Einerseits schmelzen die unterschiedlichen Fragment- und Elternionensignale $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ jeweils zu einem breiten Signal zusammen. Andererseits werden bei Schwellenleistungsanregung keine (**Probe 28.B**) oder nur geringfügige Signale (**Probe 28.A**) im niedermolekularen Massenbereich gebildet.

Durch Zugabe von Natriumtrifluoracetat wird bei den **Proben 28.A** und **28.B** (**Abb. 3-100d-f**) jedoch eine Differenzierung der unterschiedlichen Signale möglich, da die Signalüberlappung im Bereich des Elternions und der Fragmentionen mit steigender Laserleistung weniger stark ausgeprägt ist. Für beide Proben kann bei einer relativen Laserleistung von 45 eine Massenzuordnung für die Fragmente durchgeführt werden. Die intensivsten Signale erscheinen bei einem isotopengemittelten Molekulargewicht von 3371 Da und 3392 Da und stellen damit ISD-Fragmente dar (Kapitel 2.1.4, S. 22). Bedingt durch die Detektion der Fragmentionen im linearen Detektionsmodus werden sehr breite, unaufgelöste Signale mit einer relativ starken Variation der Masse von mindestens \pm einem Dalton erhalten. Bei heteroatomhaltigen dendritischen Systemen (Kapitel 3.4.3.3, S. 161) wurde eine ausgeprägte Pseudo-Molekülionenbildung gefunden. Da das Elternion eine ausgeprägte Na- und K-Pseudo-Molekülionenbildung eingeht, ist es plausibel, dass die beiden Fragmentensignale ebenfalls durch Metall-Pseudo-Molekülionenbildung zu erklären sind. Rechnerisch lässt sich dabei eine **Struktur 28.I** (**Abb. 3-101**) ermitteln, die durch einen Heteroatombindungsbruch bei der Biotinkette gebildet wird. Die berechnete mittlere Masse für **Fragmentstruktur 28.I** in **Abb. 3-101** liegt dann bei 3380 Da für das Na-Pseudo-Molekülion (Δ neun Dalton) und 3396 Da für das K-Pseudo-Molekülion (Δ vier Dalton). Dieser Strukturvorschlag ist jedoch aufgrund der großen Massendifferenz zum experimentell gefundenen Molekulargewicht unwahrscheinlich. Der Lösungsansatz unter Berücksichtigung der Pseudo-Molekülionenbildung ist aufgrund abgeleiteter Ergebnisse aus Untersuchungen an ähnlichen Systemen zwar zunächst sinnvoll, jedoch zur Fragmentstrukturcharakterisierung von **28** irreführend. Aus diesem Grund müssen nun zunächst weniger plausible Fragmentierungspfade mitberücksichtigt werden.

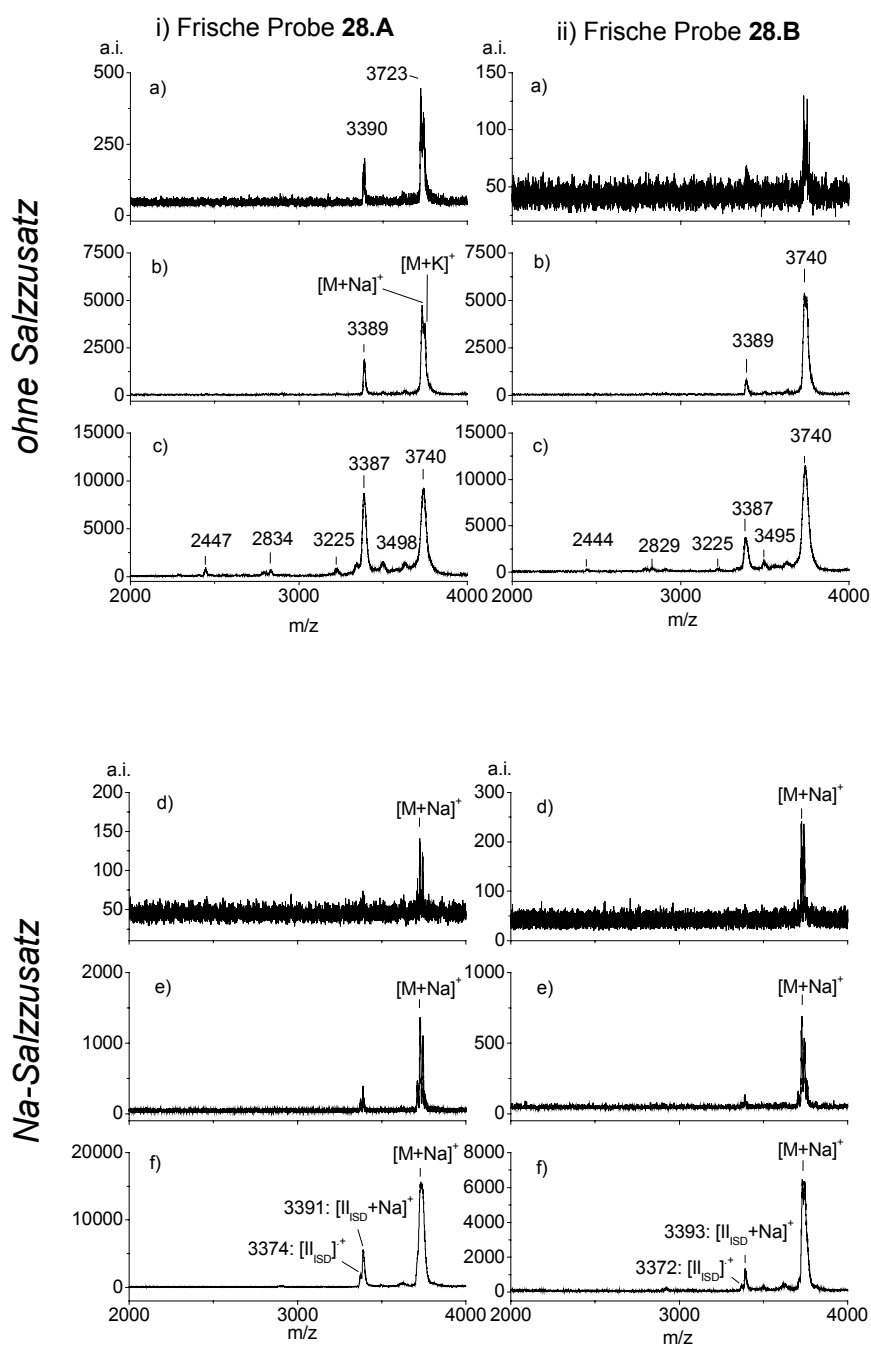
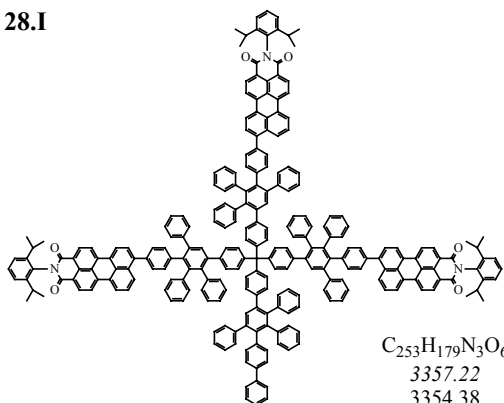


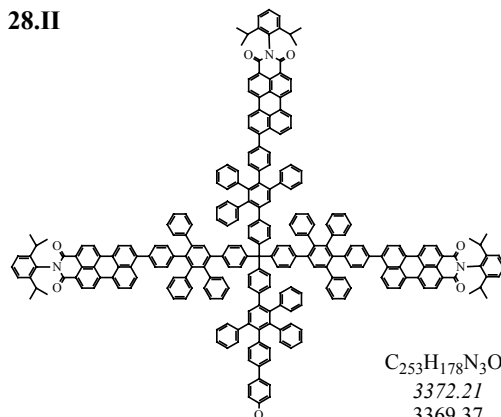
Abb. 3-100: Linear-MALDI-TOF-Massenspektren des Biotindendrimers **28** in Abhängigkeit der Probenherkunft und der relativen Laserleistung (in Klammern): **i) Frische Probe 28.A:** ohne Metalltrifluoacetatzusatz: a) 35; b) 40; c) 45; mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$: d) 35; e) 40; f) 45. **ii) Alte Probe 28.B:** ohne Metalltrifluoacetatzusatz: a) 35; b) 40; c) 45; mit $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$: d) 35; e) 40; f) 45.

28.I



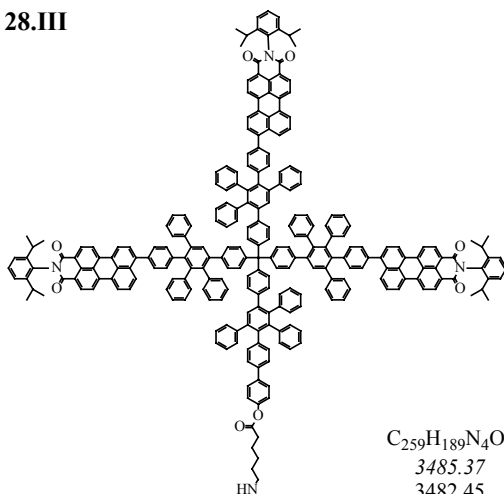
$C_{253}H_{179}N_3O_6$
3357.22
3354.38

28.II



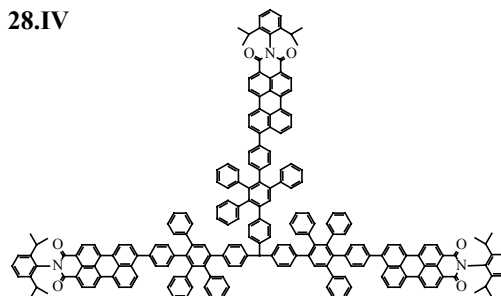
$C_{253}H_{178}N_3O_7$
3372.21
3369.37

28.III



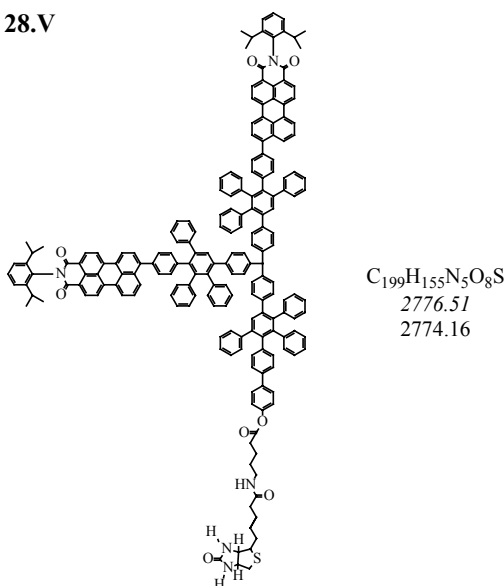
$C_{259}H_{189}N_4O_8$
3485.37
3482.45

28.IV



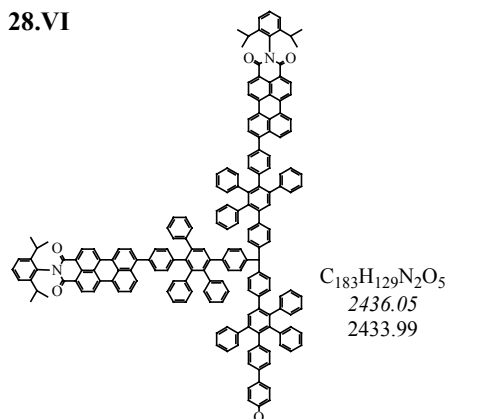
$C_{211}H_{151}N_3O_6$
2824.54
2822.16

28.V



$C_{199}H_{155}N_5O_8S$
2776.51
2774.16

28.VI



$C_{183}H_{129}N_2O_5$
2436.05
2433.99

Abb. 3-101: Theoretische Fragmentstrukturen des Biotindendrimers **28**. Angegebene Massen beziehen sich auf wasserstoffabgesättigte Radikalstellen. [Angaben der Isotopenmassen in Da: kursiv/mittlere; normal/exakte]

Obwohl die Ionisation des Makromoleküls ausschließlich als Pseudo-Molekülionenbildung erfolgt, muss, wie in Kapitel 3.4.3.5 für diese Substanzklasse gezeigt werden konnte, eine Anomalie im Fragmentierungsmechanismus berücksichtigt werden. Aus dieser Überlegung lässt sich eine weitere mögliche **Fragmentstruktur 28.II** (**Abb. 3-101**) formulieren, bei der ebenfalls die Kohlenstoff-Heteroatombindung der Esterfunktion gespalten wird.

Bei einer radikalkationischen Ionisation von **Fragmentstruktur 28.II** lässt sich das mittlere Molekulargewicht mit 3372 Da berechnen. Das zweit intensivste Signal könnte bei diesem Ansatz durch eine Na-Pseudo-Molekülionenbildung von **Fragmentstruktur 28.II** erklärt werden, wodurch sich eine mittlere Masse von 3395 Da berechnen lassen würde. Dieser Vorschlag der **Fragmentstruktur 28.II** scheint damit wesentlich wahrscheinlicher zu sein als **Fragmentstruktur 28.I**, da eine geringere Massendifferenz zum experimentell gefundenen Molekulargewicht in Abhängigkeit unterschiedlicher Ionisationen zugrunde liegt. Diese Differenzen zwischen experimentell ermittelten und berechneten Massen sind durch die sehr breiten unaufgelösten, im Lineardetektionsmodus detektierten Fragmentensignale vertretbar und zeigen die analytische Limitierung dieser Messungen. Der **Fragmentstrukturvorschlag 28.II** trifft für beide **Proben 28.A** und **28.B** gleichermaßen zu, da analoge Massenspektren (**Abb. 3-100**) gewonnen werden konnten. Fragmentensignale, die im Lineardetektionsmodus erscheinen, sind ausschließlich ISD-Fragmente (Kapitel 2.1.4, S. 22). Über PSD-Fragmente lassen sich bei dieser Art von Messung keine Aussagen treffen. Hierfür steht die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik zur Verfügung.

Für eine eindeutige Strukturverifizierung wurde daher PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik an beiden **Proben 28.A** und **28.B** unter Variation der Ionisation durchgeführt. **Probe 28.A** (**Abb. 3-102**) zeigt generell eine höhere Fragmentierungstendenz als **Probe 28.B** (Daten nicht gezeigt). Für beide Proben zeigen sich qualitativ analoge Ergebnisse. Die erhaltenen PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren der frischen **Probe 28.A** sind in **Abb. 3-102** in Abhängigkeit der Ionisation zusammengestellt. Auch hier werden ohne definierte Metalltrifluoressigsäurezugabe (**Abb. 3-102a**) sehr intensive, breite PSD-Fragmentensignale neben unterschiedlichen Pseudo-Molekülionenbildungen des Makromoleküls **28** gefunden. In keinem der Fälle tritt eine radikalkationische Ionisation des intakten Dendrimers auf, dies steht im Einklang damit, dass heteroatomhaltige Dendrimere (Kapitel 3.4.3.3, S. 161) bevorzugt Pseudo-Molekülionenbildungen eingehen. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren, die durch Zugabe von $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ erhalten wurden, zeigen bei gleicher Laserleistung intensivere Elternionensignale und wesentlich geringere Signalintensitäten der PSD-Fragmente. Auch diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen an Azodendrimern (Kapitel 3.4.3.3, S. 161) und werden nachfolgend noch eingehender für dieses biotinhaltige Dendrimersystem diskutiert. Zunächst soll eine Fragmentspektreninterpretation durchgeführt werden.

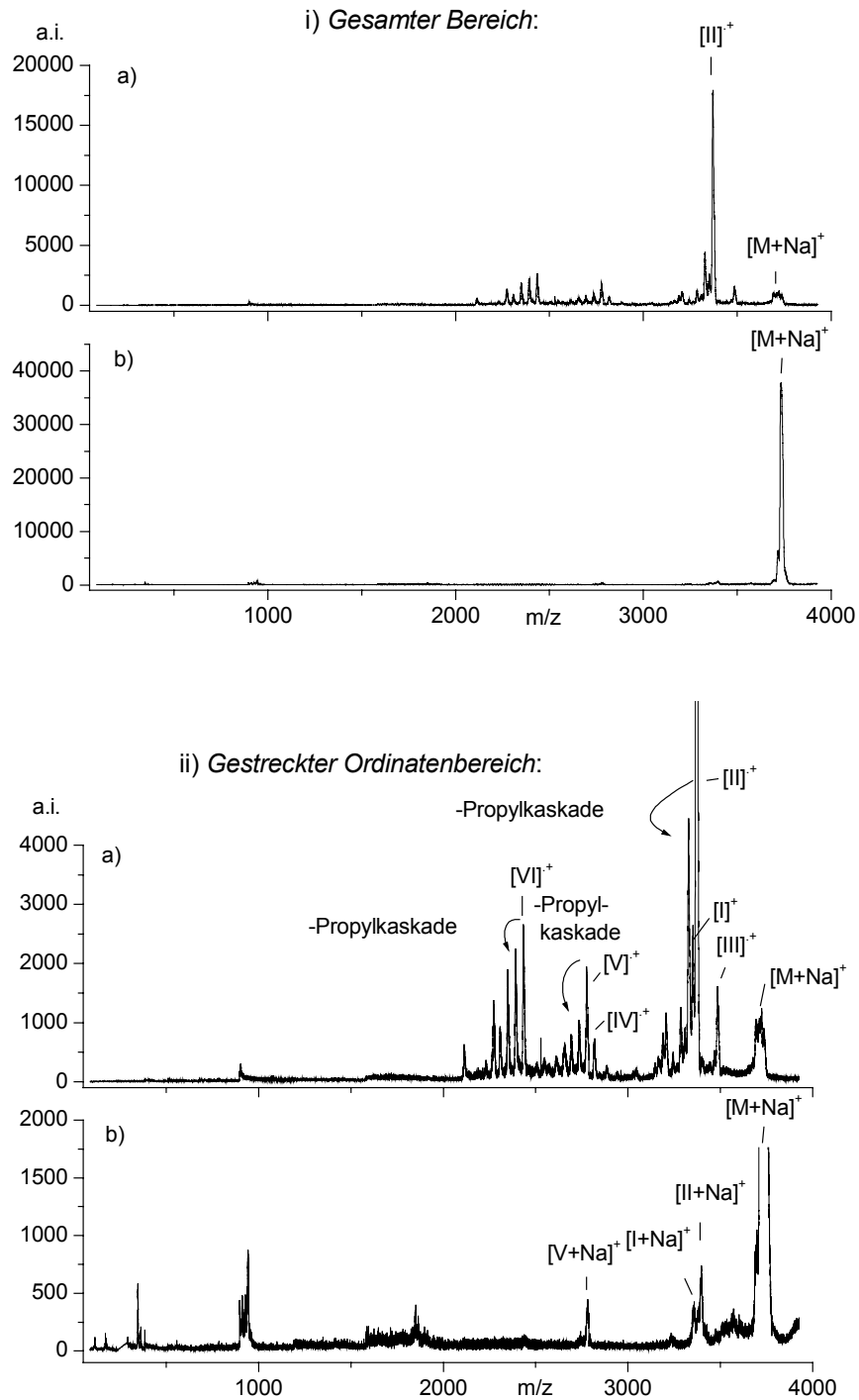


Abb. 3-102: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren der frischen **Probe 28.A** des Biotindendrimers **28** bei gleicher Laserleistung in Abhängigkeit von der Ionisation: i) a) Radikalkationische Ionisation zeigt starke Fragmentierungstendenz; b) Na-Pseudo-Molekülonenbildung zeigt nur sehr geringe Fragmentierung; ii) in der Darstellung des gestreckten Ordinatenbereichs zeigt sich: a) die Vielfalt der Fragmentbrüche, die ohne Zugabe von Metalltrifluoacetatsalz beschriftet werden; b) die Selektivität der Fragmentbrüche bei Natriumtrifluoroacetat.

Die detaillierte Interpretation der PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren der Proben ohne Metalltrifluoracetatzugabe zeigt die größte Hauptfragmentsignalintensität bei einem mittleren Molekulargewicht von 3371 Da und wird der **Struktur 28.II** (**Abb. 3-101**, S. 187) zugeordnet. Damit zeigt sich der intensivste Fragmentierungspfad für den ISD- und PSD-Mechanismus identisch. Das zweit intensivste PSD-Fragment bei einer mittleren Masse von 3328 Da entspricht der **Struktur 28.II**, bei der zusätzlich eine Fragmentierung der Propylseitenkette eingetreten ist. Dieser Seitenkettenfragmentbruch erscheint an **Struktur 28.II** relativ bevorzugt, da mindestens eine vierfache Propylfragmentkaskade ausgehend von dieser Struktur gefunden wird. Das nächst intensive Fragmentsignal erweist sich als **Struktur 28.III**, bei der der Bindungsbruch an der Kohlenstoff-Stickstoffheteroatombindung der Amidgruppe erfolgt. Aus diesen beiden prominentesten Fragmenten **28.II** und **28.III** lässt sich schließen, dass der Bindungsbruch bevorzugt an Kohlenstoff-Heteroatombindungen im biotinhaltigen Dendron stattfindet. Die aufgrund der in Kapitel 3.4.3.5 durchgeführten Untersuchungen an Dendrimeren mit tetraedrischem Kern zu erwartende Abspaltung eines intakten Dendrons, bei der Fragmentstrukturen **28.IV** und **28.V** gebildet werden, wird ebenfalls mit guten Signalintensitäten gefunden. Dabei wird die **Fragmentstruktur 28.V** mit etwas intensiveren Signalen als **28.IV** gefunden. Dies ist wahrscheinlich nicht nur statistisch bedingt, sondern ebenfalls durch die Tatsache, dass das biotinhaltige Dendron bevorzugt Kohlenstoff-Heteroatombindungsbrüche eingeht, die wie oben beschrieben die Hauptfragmentsignale im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum liefern. Daher werden am heteroatomhaltigen Dendron eher Kohlenstoff-Heteroatombindungen gebrochen als die Bindung am tetraedrischen Kohlenstoff. Damit steht auch im Einklang, dass die Struktur **28.VI** mit starker Signalintensität gefunden wird, bei der der bevorzugte Bindungsbruch der Esterbindung im biotinhaltigen Dendron und der Kohlenstoff-Kohlenstofffragmentbruch eines intakten perylenhaltigen Dendrons am tetraedrischen Kohlenstoffkern auftritt. Die **Strukturen 28.V** und **28.VI** haben mit **Struktur 28.II** gemeinsam, dass sich Kaskaden an Propylseitenkettenfragmentierungen der perylenhaltigen Dendronen nachweisen lassen.

Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren und auch die Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren sind damit für die radikalkationische Ionisation beider **Proben 28.A** und **28.B** geklärt: Die intensivsten Signale in den konventionellen Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren im Bereich von 3372 Da, ISD, und 3420 Da, PSD, sind Fragmentsignale, die aus derselben Fragmentierungsreaktion im Massenspektrometer zu unterschiedlichen Zeiten resultieren und dabei die Fragmentstruktur **28.II** bilden.

Betrachtet man nun die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren des selektierten Na-Pseudo-Molekülions der Dendrimerstruktur **28**, so finden sich nach fallenden Signalintensitäten geordnet die **Fragmentstrukturen 28.II**, **28.V**, **28.I** wieder. Am auffälligsten dabei zeigt sich, dass die **Struktur 28.II** als Na-Pseudo-Molekülium detektiert wird. Dies liefert den eindeutigen Beweis, dass es sich bei den Signalen in den Linear-MALDI-TOF-Massenspektren tatsächlich um das ISD-Fragment der **Struktur 28.II** handelt, welches im Bereich von 3372 Da als Radikalkation vorliegt und im Bereich 3395 Da als Na-Pseudo-Molekülium.

Die eindeutige Charakterisierung dieses biotinhaltigen Dendrimers **28** zeigt sich in einer großen Vielfalt, da dieses Makromolekül eine große Abhängigkeit bezüglich der angewendeten Laserleistung und der Art der Ionisation zeigt. Im Bereich des Elternionensignals findet sich daher eine Reihe an

unterschiedlichen Ionisationen, die jedoch massenspektrometrischer und nicht chemischer Herkunft sind. Ebenfalls massenspektrometrischer Herkunft sind die Signale im niedrigeren Massenbereich aufgrund intensiver Fragmentierungsprozesse. Der weitaus bevorzugte Bindungsbruch ist dabei an der Kohlenstoff-Heteroatombindung in der Biotinseitenkette vor dem des Bruches am tetraedrischen Kohlenstoff. Die erhaltenen konventionellen Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren zeigen daher Überlagerungen von Signalen aus ISD- und PSD-Fragmentierung und von weiteren Fragmentensignalen in Abhängigkeit derer Ionisation. Da die Signale, die in den ursprünglichen Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren auftraten und diese Untersuchungen motivierten, durch Fragmentensignale erklärt werden können, erscheinen die Substanzen massenspektrometrisch rein. Ein signifikanter Unterschied zwischen den **Proben 28.A** und **28.B** kann nicht gefunden werden, so dass gefolgert werden kann, dass die Proben weder in der Qualität der Chargen unterschiedlich sind, noch eine Alterungserscheinung aufweisen. Massenspektrometrisch ursächlich kann die Art der Ionisation angeführt werden, die in unterschiedlichem Ausmaß Fragmentierungsprozesse induziert und dadurch die Massenspektren unterschiedlich erscheinen lässt.

Der praxisrelevante Teil dieser Untersuchung ist damit verstanden, jedoch sollten an dieser Stelle weitere Schlussfolgerungen zur Ionisation und Stabilität des Elternions diskutiert werden. Die Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren in Abhängigkeit der Ionisation zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Fragmentierungstendenz. Die qualitativen Unterschiede wurden oben eingehend beschrieben und sollen an dieser Stelle nicht im Vordergrund stehen, sondern die der Stabilitäten der Molekülonen.

Für eine bessere Übersichtlichkeit werden an dieser Stelle nur Massenspektren der frischhergestellten **Probe 28.A** diskutiert. Als Diskussionsgrundlage dienen die Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren, die bereits in **Abb. 3-99** (S. 184) in Abhängigkeit der Ionisation gegenübergestellt wurden. Bei gleicher relativer Laserleistung von 35 zeigen sich die Signalintensitäten für das Elternion wesentlich intensiver für das Massenspektrum mit Metalltrifluoracetatsalzzugabe, als ohne Metallsalzzugabe. Da sich diese niedermolekularen Signale nun als Fragmente erweisen, können damit allgemeine Aussagen hinsichtlich der Stabilität der Molekülonen in Abhängigkeit der Ionisation getroffen werden.

Setzt man die Elternsignalintensität ins Verhältnis zur Signalintensität des Fragments, welches unabhängig von der Ionisation des Elternions als radikalkationische **Struktur 28.II** gefunden wird, so erhält man für die Messungen ohne Metallsalzzusatz einen Fragmentierungsanteil von jeweils > 30 % mit deutlich steigender Tendenz mit zunehmender Laserleistung. Die analoge Auswertung der Massenspektren, die unter Zusatz von $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$ gewonnen wurden, zeigen Fragmentierungsanteile < 10 % mit leicht steigender Tendenz bei zunehmender Laserleistung.

Auch dieses biotinhaltige Dendrimer **28** bildet bei Messungen mit und ohne Metallsalzzugabe jeweils Pseudo-Molekülonen mit unterschiedlichen Metalltrifluoracetaten, die analog zu den unsubstituierten Dendrimeren mit tetraedrischem Kern (Kapitel 3.4.3.5, S. 172) stark abhängig von der Metalltrifluoracetatsalzmenge ist. Berücksichtigt man weiter, dass die Massenspektren in Abhängigkeit der Laserleistung nur wenig erhöhte Fragmentierungstendenzen für das Na-Pseudo-Molekülion zeigen, so muss das Alkalimetallkation einen stabilisierenden Einfluss auf das Molekül ausüben. Damit ist es von praktischer Bedeutung, für eine optimale Menge an Metalltrifluoracetat in

der MALDI-Probenmischung zu sorgen, um eine schonende Ionisation und Stabilisation dieses Makromoleküls zu ermöglichen.

3.4.3.7 Polymere Farbstoffe

Die Struktur der polymeren Vier-Dendronen-Farbstoffe (Synthese s. Kapitel 6.1.2; **Abb. 6-17**; S. 271)^{XXV} ist in **Abb. 3-76** (S. 152) dargestellt. Die mittels GPC ermittelten Polydispersitäten liegen für die Polylactonsternpolymere **29** im Bereich zwischen 1,06-1,16, bei den Polystyrol (PS)-Sternpolymeren **30** zwischen 1,19 und 1,29 und bei den Polypeptidsternpolymeren **31** zwischen 1,22 und 4,96²²⁵.

Prinzipiell besteht bei synthetischen Polymeren ein großes Interesse an einem wirklichkeitstreuen Abbild, um die Polymerverteilung möglichst genau beschreiben zu können. Dies kann nachdrücklich verhindert sein, wenn die Polydispersität des Analyten ansteigt (ca. $\geq 1,2$)^{106,107}.

Die MALDI-TOF-MS-Ergebnisse dieser Sternpolymere zeigen für die Polylactone- **29** und Polystyrolsternpolymere **30** kleinere Mn-Werte als die NMR- und die GPC-Analyse²²⁵. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse kann möglicherweise durch die Polydispersität der Probe bedingt sein. Zu niedrige Mn-Werte bei der MALDI-TOF-MS-Analyse können jedoch auch auf Fragmentierung der Substanz schließen lassen²²⁶, da dadurch die Polymerverteilung ebenfalls zu niedrigeren Werten verschoben wird. Da es sich bei diesen Sternpolymeren um UV-absorbierende Systeme handelt, kann deren Fragmentierungstendenz beim MALDI-Prozess erhöht sein (Kapitel 3.1.2.1.3, S. 40; Kapitel 3.4.3.2, S. 154). Eingehende systematische MALDI-TOF-MS-Untersuchungen sollen daher durchgeführt werden, um die Herkunft des Fehlers der ermittelten Mn-Werte zu evaluieren.

In den konventionellen Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren sind insofern Auffälligkeiten zu verzeichnen, als dass die Massenspektren bei Wiederholungsmessungen in unterschiedlichen Qualitäten gewonnen werden. Untersuchungen mit zunehmender Laserleistung (**Abb. 3-103**) innerhalb einer Wiederholungsmessung bei gleicher Probenpräparation geben keinen Anhaltspunkt, jedoch wird bei allen Laserleistungen eine zusätzliche Polymerverteilung im niederen Massenbereich gefunden. Aus den Linear-MALDI-TOF-Massenspektren bzw. aus Testmessungen mit IR-MALDI-TOF-MS^{XXVI} sind keine Zusatzinformationen erhältlich. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren der Polylactonsternpolymere **Abb. 3-104a** unter Verwendung von Dithranol und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$ zeigen ein intensives Signal, welches der Fragmentierung einer Endgruppe zugeordnet werden kann. In sehr geringem Umfang werden wenig intensive Signale im Bereich des Elternions gefunden, welche Lactonwiederholungseinheiten entsprechen. Durch diese Untersuchungen kann gefolgert werden, dass die PSD-MALDI-TOF-Fragmentierung nur eine sehr untergeordnete Rolle im Fragmentierungsprozess dieses Analyten spielt.

^{XXV} Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Herrn *Dr. S. Becker* und Herrn *J. Rogriguez Hernandez* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

^{XXVI} Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit Herrn *Dr. S. M. Weidner*, Bundesanstalt für Materialforschung (BAM), Berlin.

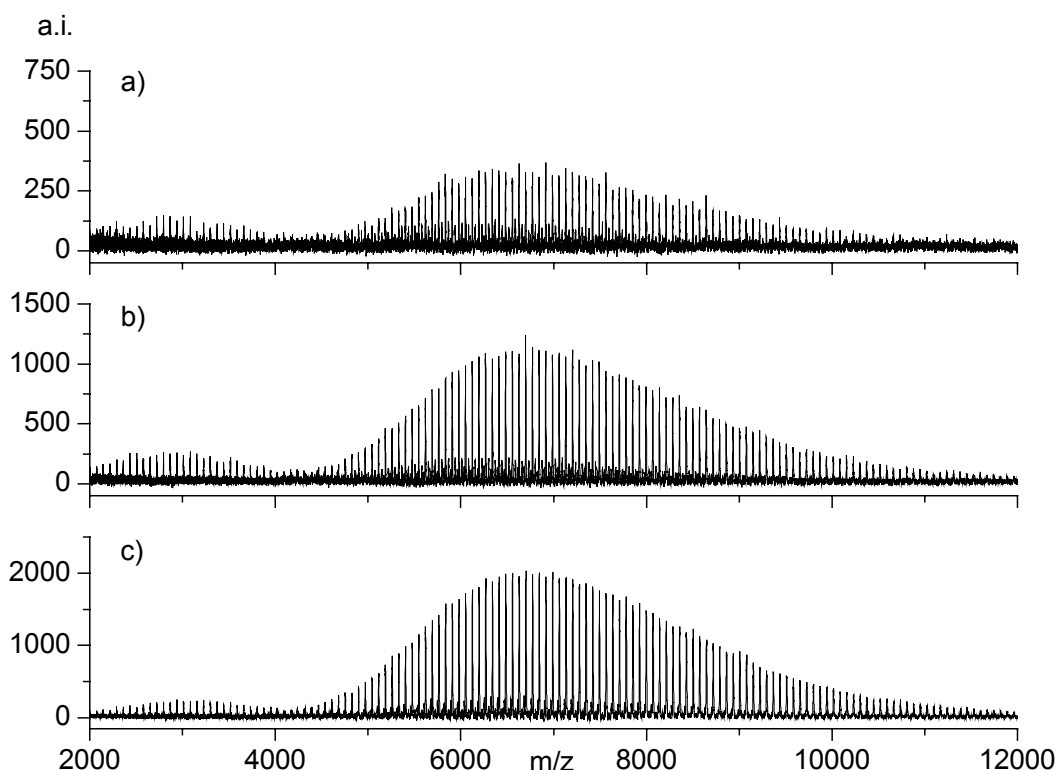


Abb. 3-103: MALDI-TOF-Massenspektren der Polyactonsternpolymere **29** mit steigender relativer Laserleistung: a) 25; b) 30; c) 35.

Um eine bessere Allgemeingültigkeit der Fragmentierungstendenz zu erarbeiten, wurde PSD-Analytik an den geschützten Polyglutamatsternpolymeren **31** (**Abb. 3-104b**) durchgeführt, da das geschützte Homo-Glu **15a** bereits eingehend auf dessen Fragmentierungsprozess und -tendenz untersucht wurde (Kapitel 3.2.2.3.2, S. 106). Konträr zu den hohen PSD-MALDI-TOF-Fragmentierungstendenzen des geschützten Homo-Glu **15a** (**Abb. 3-49**, S. 107) zeigt sich das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des geschützten Polyglutamatsternpolymers **31**, da keinerlei PSD-Fragmente auftreten. Vermutlich erhöht der Farbstoffkern die Fragmentierung insofern (Kapitel 3.4.3.2, S. 154), als die intensive PSD-Fragmentierung des Homopolymers durch Einführung des Farbstoffs zeitlich beschleunigt wird und somit bereits in der Ionenquelle als ISD-Fragmentierung stattfindet. Dieses Beispiel verdeutlicht damit auch die begrenzte Anwendbarkeit der PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse in der Art, dass die zu untersuchenden Systeme entsprechende Fragmentierung zeigen müssen.

PSD- und ISD-Fragmentierungsprozesse unterscheiden sich lediglich zeitlich (Kapitel 2.1.4, S. 22) im Massenspektrometer. Bei beiden Fragmentierungsarten erfolgen die gleichen Brüche im Molekül. Auf das Polyactonsternpolymer (**Abb. 3-104a**) extrapolierend kann indirekt angenommen werden, dass die konventionellen Reflektrom-MALDI-TOF-Massenspektren von ISD-Fragmenten

überlagert sind, welche sich nicht von den Signalen der intakten Moleküle mit kleineren Kettenlängen unterscheiden (Kapitel 2.2.1, S. 24). Die zu niedrigen M_n -Werte der MALDI-TOF-MS-Analyse sind für diese polymeren Farbstoffsysteme durch ISD-Fragmentierung zu erklären. Über deren Ausmaß kann zwar keine Aussage getroffen werden, sie erklärt jedoch eindeutig die Diskrepanz zu den Ergebnissen anderer analytischen Methoden zur Bestimmung des M_n -Wertes.

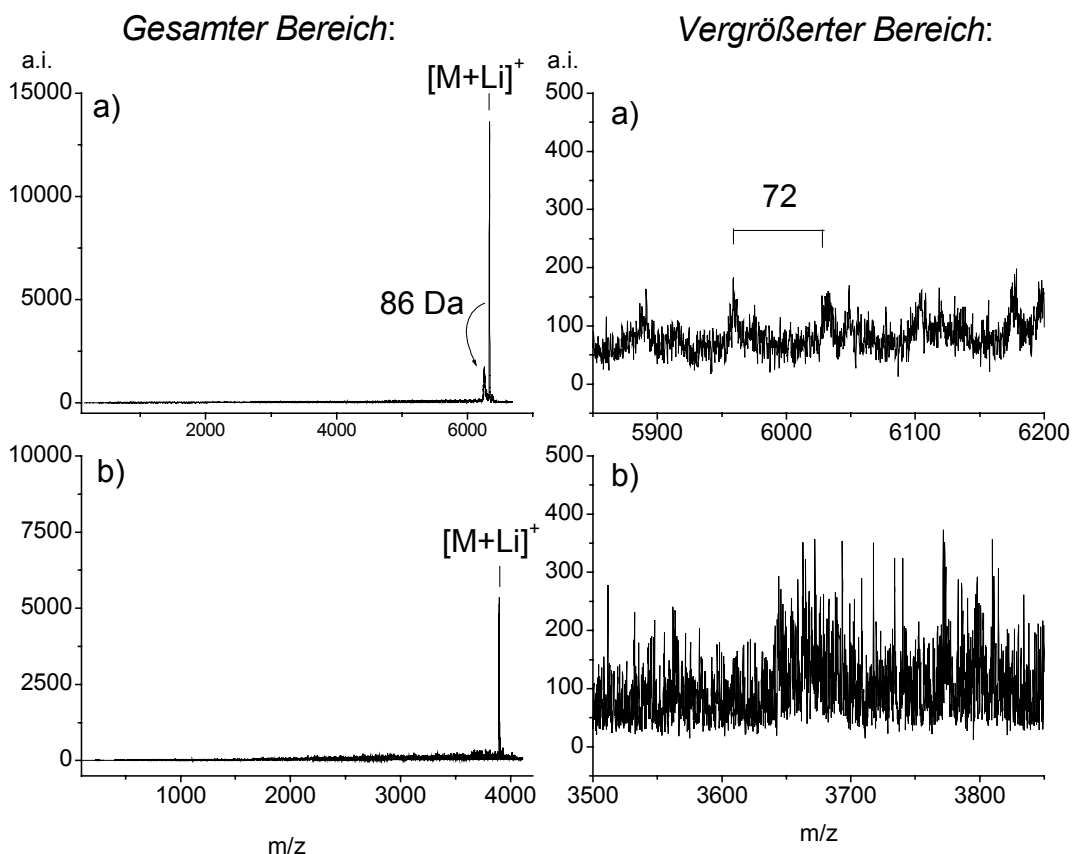


Abb. 3-104: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren der Sternpolymere:
a) Polyactonsternpolymer **29**; b) Polyglutamatsternpolymer **31**.

An dieser Stelle sollen eingehendere Untersuchungen zur Ursache der Fragmentierung und deren möglichen Begrenzung durchgeführt werden. Durch systematische Überprüfung der Probenpräparationsbedingungen (z.B. Lösungsmittel, Lösungsmittelbestandteile wie z.B. Peroxide, Matrices, Metallsalze) kann eindeutig gezeigt werden, dass Alterungserscheinungen der Matrix ursächlich zu einer Verfälschung der MALDI-TOF-MS-Ergebnisse dieser Sternpolymere führen (**Abb. 3-105**). Versuchsreihen in Abhängigkeit vom Alter der gelösten Dithranol-Matrix (**Abb. 3-105a**: 1 min; **b**: 24 h) zeigen dabei zunehmend eine Polymerverteilung im konventionellen Massenspektrum bei niedrigeren Massen. Der M_n -Wert des Polymers ermittelt am Massenspektrum der frischen Matrix liegt bei 7076 und bei der alten Matrix 6352. Aus diesem signifikanten Unterschied ist es für diese Substanzklasse von besonderer Bedeutung, dass die Matrix vor jeder

Messung frisch angesetzt wird, um die massenspektrometrische Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu verbessern.

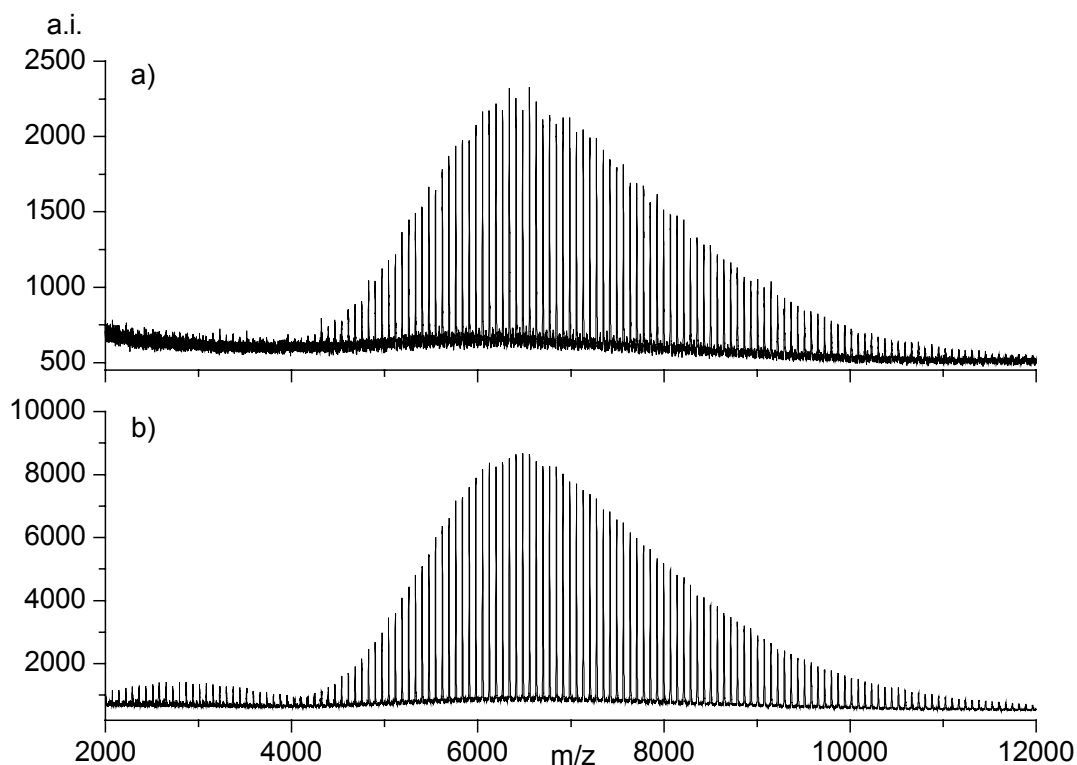


Abb. 3-105: MALDI-TOF-Massenspektren der Polylactonsternpolymere in Abhängigkeit des Alters der gelösten Matrix: a) frisch gelöste Matrix: 1 min; b) gealterte, gelöste Matrix: 24 h.

Zusätzlich zur genauen Beschreibung der Polymerverteilung besteht auch ein großes Interesse an der Bestimmung der Copolymerzusammensetzung bzw. der Dendronenlängen. Dies ist insbesondere bei Polymeren von Bedeutung, die nach dem Prinzip „grafting-from“ synthetisiert wurden.

Durch einen kombinierten chemisch-analytischen Ansatz kann die Kettenlängenbestimmung des Polystyrolsternpolymers **30** durchgeführt werden, indem dieses vier Wochen lang verseift und anschließend einer massenspektrometrischen Untersuchung (Silbertrifluoracetatzusatz) unterworfen wird (Daten nicht gezeigt). Diese indirekte Methode der Kettenlängenbestimmung zeigt eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Polymerisationsgraden des Polylactons. Dieser Ansatz ist jedoch aufgrund der notwendigen verseifbaren Estergruppen nicht generell anwendbar und zeitaufwendig.

Eine Kettenlängenbestimmung von Sternpolymeren ist in sehr speziellen Fällen mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentationanalytik möglich (Kapitel 3.2.2, S. 97). Da die Fragmentierung des Lactonsternpolymers mit einer frischen Matrix nur geringfügig eintritt (**Abb. 3-104a**), wird die PSD-MALDI-TOF-Fragmentanalyse unter Verwendung der gealterten Matrix durchgeführt.

Das erhaltene PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum, bei dem das Elternion $[M+2Li-H]^+$ mit einem Molekulargewicht von 6308 Da selektiert wurde, ist in **Abb. 3-106** dargestellt. Die Anzahl der Wiederholungseinheiten des Elternions lässt sich aus dem Molekulargewicht zu $n=70$ bestimmen. Die intensivsten PSD-Fragmente stammen von Polymerketten ohne den Perylenkern. Der Fragmentmassenbereich dieses Sternpolymers erstreckt sich bis 2.000 Da, so dass eine Zahl von maximal $n < 28$ Wiederholungseinheiten hervorgeht. Das experimentell ermittelte mittlere Molekulargewicht der Polymerkette liegt bei $n=17$.

Theoretisch lässt sich aus dem selektierten Elternion für die vier Armlängen dieses Sternpolymers ein mittleres Molekulargewicht von rund 1250 Da und damit ein $n=17,5$ berechnen. Bei einer Polymerisation von nur drei Dendronen kann ein mittleres Molekulargewicht von rund 1700 Da und damit ein $n < 24$ berechnet werden. Damit wird gezeigt, dass tatsächlich vier Lactonketten polymerisierten. Dieser direkte Ansatz der Dendronenlängenbestimmung mittels MALDI-TOF-Fragmentenanalyse beschränkt sich auf Sternpolymersysteme mit informativen Sollbruchstellen. Nur durch eine entsprechend labile Bindung zwischen Kern und Polymerkette kann die intakte Polymerkettenlänge durch die Fragmentenanalyse wiedergegeben werden. Eine generelle, direkte Längenbestimmung verbleibt eine analytische Herausforderung.

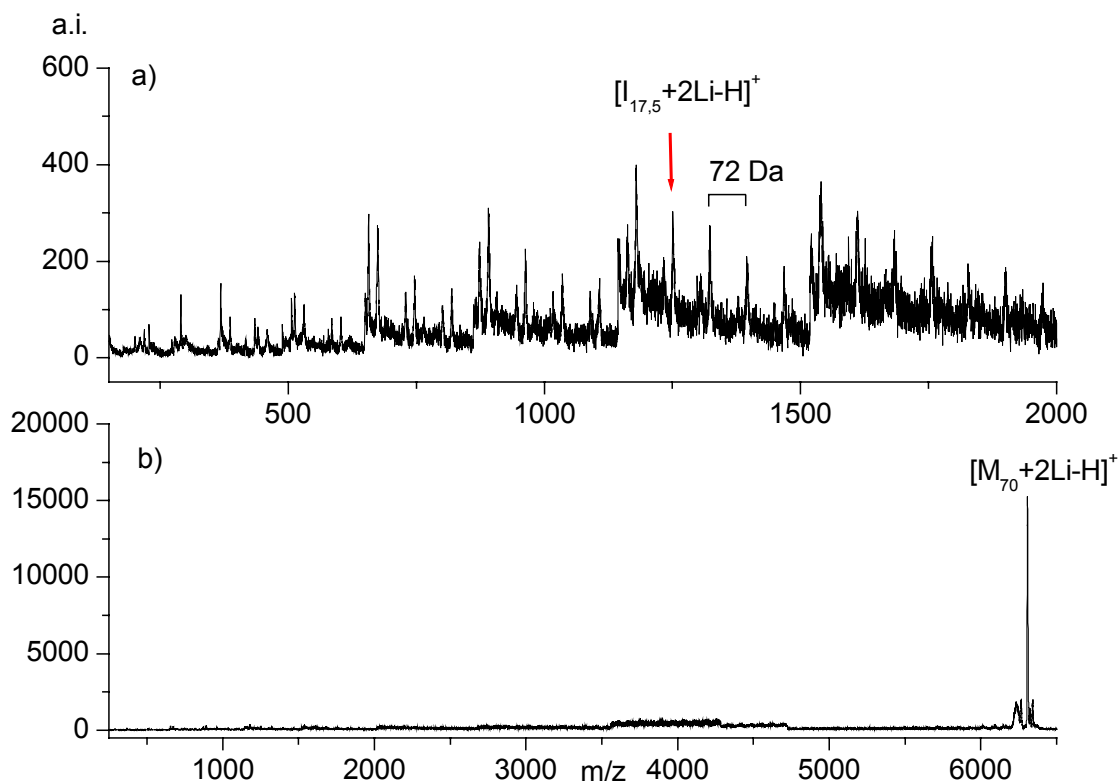


Abb. 3-106: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Polylactonsternpolymers **29** mit gealterter Dithranol-Matrix: a) niedermolekularer Massenbereich; b) gesamter Massenbereich.

3.4.4 Analytik von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs)

3.4.4.1 Analytische Herausforderungen

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) und ihre supramolekulare Anordnung sind gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung²²⁷. Eine systematische Modifikation der Form und der Größe dieser scheibenartigen ausgedehnten aromatischen Systeme ermöglicht die Untersuchung ihrer supramolekularen Struktur^{228,229,230,231} sowie der Wechselbeziehung zwischen der supramolekularen Anordnung und den resultierenden elektronischen Eigenschaften. Weiterhin dienen diese definiert synthetisierten ausgedehnten PAHs als Modellsysteme (**Abb. 3-107**^{XXVII}) zur Aufklärung des molekular unbestimmten Graphits^{232,233}.

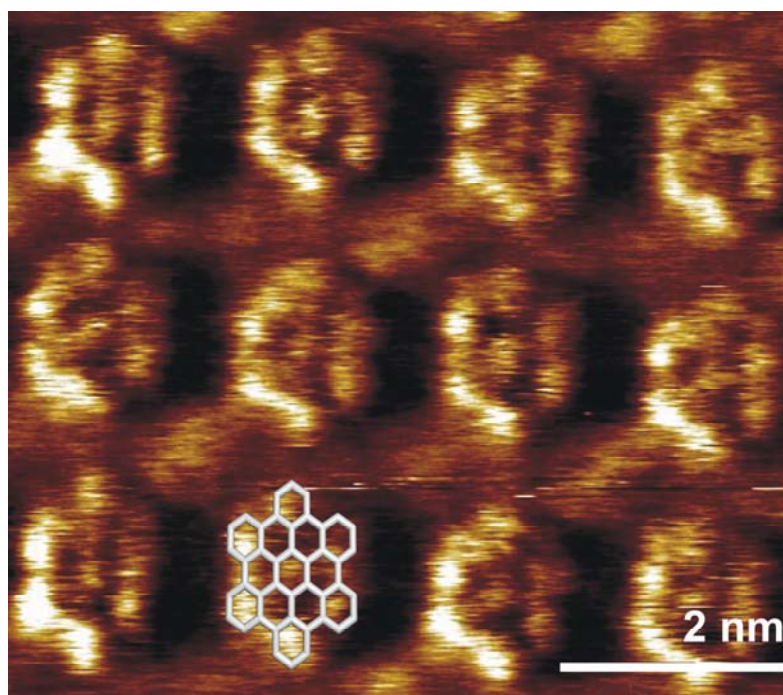


Abb. 3-107: Visualisierung von $C_{42}H_{18}$ -PAH^{XXVII} mittels „Scanning Tunneling Microscopy“.

Im Gegensatz zu konventionellen thermischen Darstellungsverfahren ausgedehnter PAHs, die meistens zu einem breiten Produktspektrum führen, wurde ein synthetischer Zugang entwickelt, der die Darstellung definierter PAHs ermöglicht^{234,235,236}. Dieses synthetische Verfahren beruht darauf zunächst eine lösliche Polyphenylenvorstufe genau definierter Struktur aufzubauen. Diese Vorstufe trägt die entsprechende Anordnung der Phenylringe wie die des Zielmoleküles und lässt sich daher im zweiten Syntheseschritt durch Cyclodehydrierung zum PAH planarisieren.

Die Charakterisierung mittels LD-TOF-MS gestaltete sich mit zunehmenden Molekulargewichten der PAHs schwieriger. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine frisch hergestellte PAH-Probe einfach mittels LD-TOF-MS charakterisiert werden kann, während nach einigen Tagen

^{XXVII} Diese Untersuchungen wurde von Herrn *C. Simpson* im Rahmen seiner Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

eine geringere Steigung der Kurve verursacht. Wenn diese Effekte auch nur eine qualitative Tendenz beschreiben, veranschaulichen sie jedoch, dass PAHs durch MALDI bis zu deutlich höheren Molekulargewichten charakterisierbar sein sollten. Über den Schnitt der Hyperbeln der Desorptionsschwelle_{MALDI} mit der Fragmentierungsschwelle des Analyten kann bislang keine quantitative Aussage getroffen werden, jedoch ist davon auszugehen, dass MALDI-TOF-MS auch noch weitaus höhermolekulare PAHs fragmentierungsfrei analysieren kann.

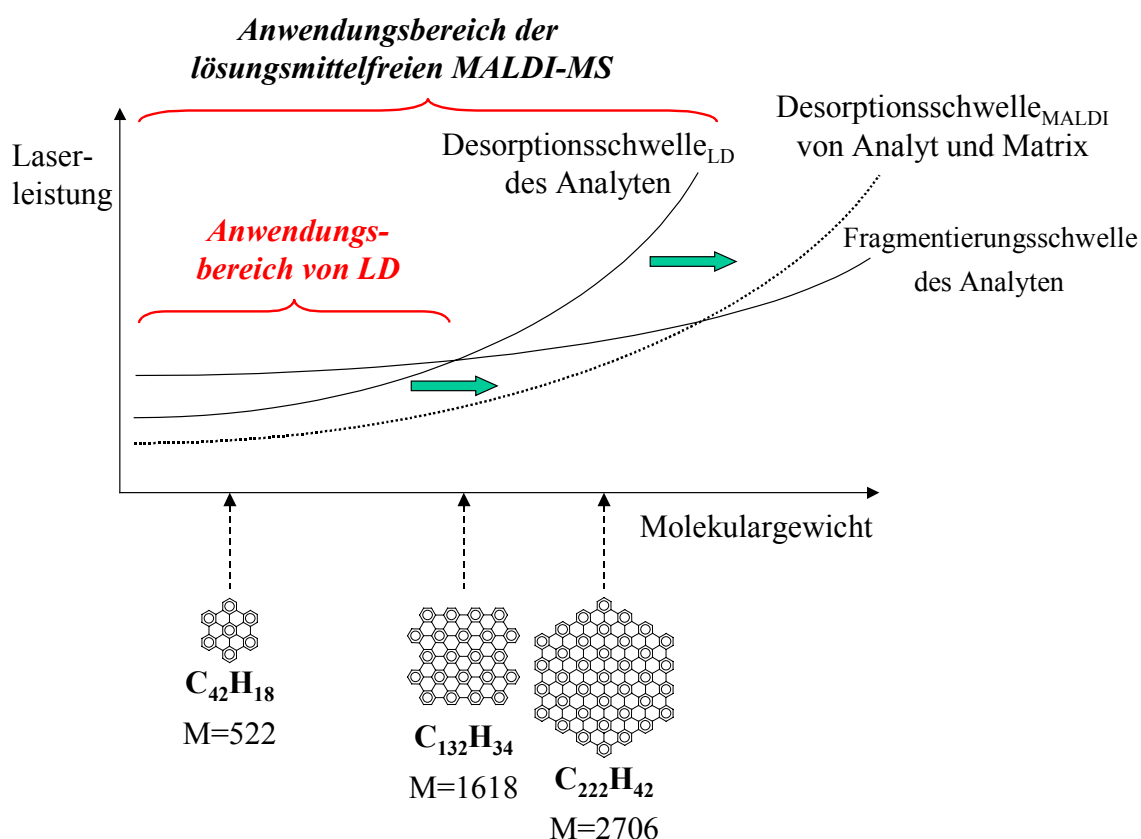


Abb. 3-109: Schematische Darstellung zur Bedeutung und zum Zusammenhang von LD-TOF- und MALDI-TOF-MS für die Charakterisierung von PAHs.

Bei systematischen MS-Untersuchungen konnte erstmals ein PAH $< 2.700 \text{ Da}^{115}$ zuverlässig nachgewiesen werden, welcher zuvor weder massenspektrometrisch noch durch andere analytische Methoden ausreichend charakterisierbar war¹⁷⁰. Zur Charakterisierung dieses Kohlenwasserstoffes $C_{222}H_{42}$ wurde gänzlich auf Lösungsmittel verzichtet. Die Homogenisierung dieses unlöslichen PAH mit der Matrix TCNQ wurde mittels Mahlvorgängen erzielt¹¹⁵. Der erfolgreiche Einsatz der MALDI-TOF-MS zur Charakterisierung unlöslicher PAHs stellt einen Durchbruch in der Analyse dieser Substanzklasse dar und steht gegenwärtig als einzige Methode zur Charakterisierung von sehr großen PAHs ($> 1.500 \text{ Da}$) zur Verfügung. Aufgrund dieser fehlenden analytischen Methoden, die bei anderen Substanzklassen als Vergleichsmethoden den MALDI-TOF-MS-Ergebnissen gegenübergestellt werden können, kommt damit der MALDI-TOF-MS-Analytik hier eine besonders große Bedeutung zu. Ob Signale eines Spektrums massenspektrometrischer oder chemischer Herkunft sind und in welchen Größenordnungen gedacht werden muss, gilt es zu evaluieren. Durch die

vorangegangenen LD- und MALDI-TOF-MS-Untersuchungen^{115,170} ist die Analytik von PAHs geebnet, um systematische massenspektrometrische Untersuchungen an dieser Substanzklasse durchführen zu können. Dabei stellen sich drei prinzipielle Herausforderungen:

- Qualitative Aspekte:
MALDI-TOF-MS erlaubt die Bestimmung der Summenformeln der Reaktionsprodukte, jedoch können daraus nicht immer die Strukturen ermittelt werden. Zusätzliche Strukturinformationen könnten aus dem Fragmentierungsverhalten gewonnen werden.
- Quantitative Aspekte:
Künstliche Mischungen aus wohldefinierten Analyten erlauben eine semiquantitative Aussage. Aus systematischen Mischungen definierter PAHs können möglicherweise allgemeine Prinzipien zu „Response“-Faktoren erarbeitet werden, die ein besseres Verständnis der Desorptions- und Ionisationsprozesse ermöglichen könnten, um folglich auf MALDI-TOF-MS-Ergebnisse unbekannter Proben semiquantitativ extrapolieren zu können.
- MALDI-TOF-MS als Reinigungsverfahren:
Es ist von großer Bedeutung, Eigenschaften eines Materials einer definierten Verbindung zuzuordnen zu können. Mit steigendem Molekulargewicht ist die chemische Abtrennung des Zielprodukts von den Nebenprodukten aufgrund der Unlöslichkeit der PAHs erschwert oder unmöglich. Daher kann die Reinheit bei $C_{222}H_{42}$ nur noch durch eine gezielte Optimierung der Synthese erhalten werden. Prinzipiell könnten sehr reine, hochmolekulare PAHs auch im Massenspektrometer isoliert, akkumuliert und abgeschieden werden. Grundlegende Untersuchungen massenspektrometrischer Parameter (z.B. Trennschärfe des elektronischen „Gates“, Fragmentierungsverhalten des Analyten bei unterschiedlichen Beschleunigungsspannungen) könnten einer ersten Abschätzung dienen.

Diese unterschiedlichen Aspekte sollen an ausgewählten Beispielen erarbeitet werden.

3.4.4.2 Charakterisierung substituierter PAHs

Bei der Analytik von substituierten PAHs geht es nicht nur um die Charakterisierung eines Endproduktes, sondern vielmehr darum, in welcher Weise die MALDI-TOF-MS einen Beitrag zur Verbesserung des Verständnisses massenspektrometrischer und synthetischer Ergebnisse liefern kann. Dies soll anhand von **32** (Kapitel 6.1.2; S. 272)^{xxviii} untersucht werden, dessen Struktur in **Abb. 3-110** dargestellt ist.

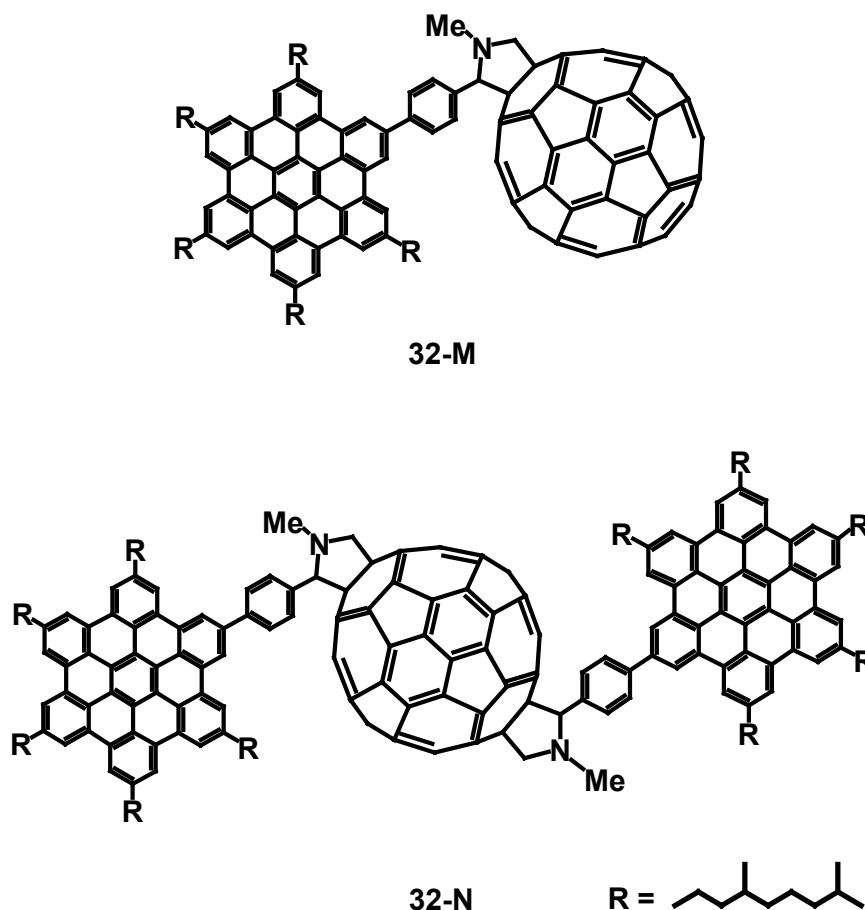


Abb. 3-110: Struktur des einfach HBC-substituierten PAHs **32-M** und des zweifach HBC-substituierten PAHs **32-N**.

Das Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektrum von **32** ist in **Abb. 3-111a** dargestellt. Das weitaus intensivste Signal, welches formal mit 1373 Da einer Struktur **M-C₆₀** entspricht, kann nicht chemisch erklärt werden. Bei diesem Signal handelt es sich möglicherweise um ein Fragmention. Daneben findet sich in sehr geringen Signalintensitäten das zweifach HBC-substituierte Makromolekül **32-N**.

^{xxviii} Die Synthese wurde von Frau *N. Tchebotereva* im Rahmen ihrer Promotion im AK Prof. *K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

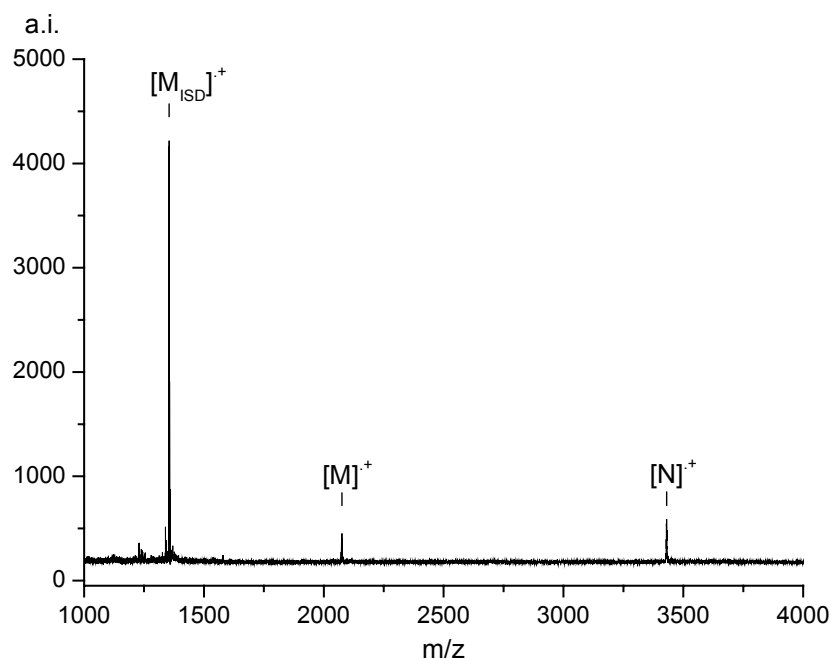


Abb. 3-111: Reflektion-MALDI-TOF-Massenspektrum von **32**.

Für die zuverlässige Charakterisierung von massenspektrometrischen Fragmenten, stehen eine Reihe unterschiedlicher Detektions- (Kapitel 2.1.4, S. 22) und Analysenmethoden (Kapitel 2.2, S. 24) zur Verfügung. Linear-MALDI-TOF-Messungen zeigen, dass das intensivste Signal kein PSD-Fragmentation ist. Darüber hinaus gibt das Ergebnis keinen Aufschluss darüber, ob dieses Signal zunächst einem ISD-Fragment oder einer chemischen Verunreinigung zugeschrieben werden muss.

Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum in **Abb. 3-112a** zeigt jedoch eindeutig, dass dieses Signal einem radikalkationischen PSD-Fragmentation $[M-C_{60}]^+$ zugeordnet werden kann. Vom zweifach HBC-substituierten Makromolekül **N** wird die identische Fragmentierung ebenfalls unter Bildung des Fragmentes von *N-HBC-C₆₀* erhalten (**Abb. 3-112b**). Daneben wird jedoch ebenfalls ein sehr intensives Signal gefunden, welches formal einer Abspaltung eines HBC-Moleküls vom Elternion **32-N** (*N-HBC*) und damit genau dem Elternion der Zielstruktur **32-M** entspricht. Damit ist das gefundene Signal der Zielstruktur **32-M** im Reflektion-MALDI-TOF-Massenspektrum eine Überlagerung der Signale des Syntheseproduktes und des massenspektrometrischen ISD-Fragmentes von **32-N**.

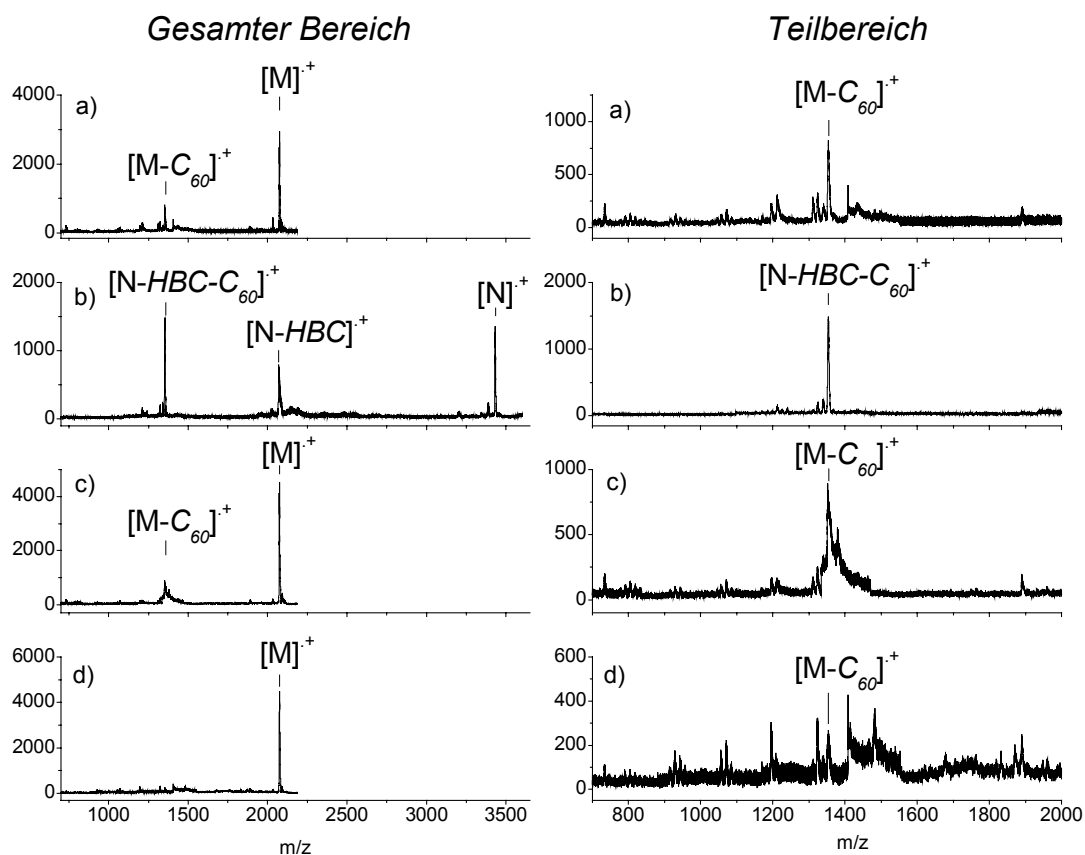


Abb. 3-112: PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren: a) Zielstruktur **32-M**;
 b) zweifach HBC-substituierte Struktur **N**; c) Zielstruktur **M** bei Anwesenheit von CF_3CO_2Na ; d) Zielstruktur **M** bei Anwesenheit von CF_3CO_2Ag .

Das intensivste Signal, das der Fragmentstruktur $M-C_{60}$ entspricht, tritt im Reflekttron-MALDI-TOF-Massenspektrum als ISD-Fragment vom Elternion **M** der Zielstruktur **32** (**Abb. 3-111a**) und vom zweifachen ISD-Fragment des Nebenproduktes **N** auf (**Abb. 3-111b**). Mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentationenanalytik können somit wichtige Informationen zur Struktur und zum Fragmentierungspfad und zur -tendenz gewonnen werden, da das weitaus intensivste Signal im konventionellen Reflekttron-MALDI-TOF-Massenspektrum einem ISD-Fragment zugeordnet werden kann.

Durch dieses Beispiel geht hervor wie stark ISD- und PSD-Fragmentierung sich in deren Fragmentierungsgraden unterscheiden können, einzig und allein aufgrund ihrer unterschiedlichen Art der Fragmentanregung. Sobald dieses organische Makromolekül bei der Desorption/Ionisation intakt in die Gasphase überführt ist, zeigt es nach dem Verlassen der Ionenquelle eine vergleichsweise geringe Tendenz der Fragmentierung. Die hohe ISD-Fragmentierungstendenz kann durch den erhöhten Energieeintrag, also wegen der direkten Laserabsorption des Analyten erklärt werden (**Abb. 3-109**, S. 199). Ein intensives Fragmentierungsverhalten wurde auch bei Untersuchungen an ähnlichen

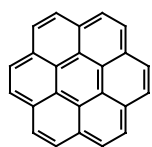
Makromolekülsystemen mit gleicher Verbrückung über Stickstoffmoleküle zum C₆₀-Fulleren gefunden, welche mittels FAB-MS charakterisiert wurden²³⁸.

Zum besseren Verständnis wurden weitere massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Reflektron-MALDI-TOF-Massenspektren unter Verwendung von TCNQ bzw. durch lösungsmittelfreie Probenpräparation brachten keine Verbesserungen und stehen soweit im Einklang mit Untersuchungen an einem Boc-geschützten Dendrimer (Kapitel 3.4.3.2, S. 154) und einem C₆₀-Fullerodendron (Kapitel 3.4.3.3, S. 161). Das Makromolekül **32** geht ausschließlich eine radikalkationische Ionisation ein. Bei Selektion des radikalkationischen Elternions wird in den PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren unter Zugabe von Natrium- (**Abb. 3-112c**) bzw. Silbertrifluoracetat (**Abb. 3-112d**) eine geringere Fragmentierung gefunden. Somit wird die PSD-MALDI-TOF-Fragmentierung durch die Anwesenheit von Metalltrifluoracetat unterdrückt, obwohl dieses nicht unmittelbar an der Ionisation des radikalkationischen Elternions beteiligt ist. Dieser Sachverhalt ist bislang unverstanden. Durch die unterschiedlichen Fragmentationen (**Abb. 3-112a,c,d**) wird deutlich, dass dies kein zufälliger Befund ist. Eine mögliche Erklärung kann wie folgt gegeben werden. Aus den ISD- und PSD-MALDI-TOF-Untersuchungen geht hervor, dass die labilste Stelle in **M** unmittelbar die Bindung zum C₆₀-Molekül ist. Da in unmittelbarer Umgebung ein Stickstoffatom lokalisiert ist, kann vermutet werden, dass sofern Metallkationen in der Probenmischung zugegen sind, diese mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffes (**Abb. 3-78**, S. 154) bei der Desorption/Ionisation wechselwirken. Diese Wechselwirkung ist ausreichend, um die Fragmentierungstendenz zu verringern, aber unzulänglich, um eine Pseudo-Molekülion auszubilden. Das Molekül **M** geht dennoch die ihm bevorzugte radikalkationische Ionisation ein. Eine ähnliche Unterdrückung der Fragmentierung durch Pseudo-Molekülionenbildung steht im Einklang mit einer Reihe an Untersuchungen dendritischer Systeme (Kapitel 3.4.3, S. 150).

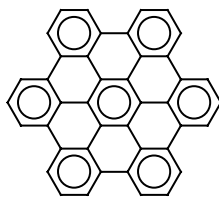
Das weitaus intensivste Signal ist massenspektrometrischer Herkunft. Dieses Fragmention wird als **M-C₆₀** und **N-HBC-C₆₀** gebildet. Da bei der Fragmentierung vom zweifach HBC-substituierten Molekül **N** ebenfalls das Fragmention **N-HBC** gebildet wird, ist die Charakterisierung von einfach HBC-substituierten **32-M** nicht mehr eindeutig. Daher ist eine gezielte Optimierung dieser Synthese sinnvoll, um das zweifach HBC-substituierte Molekül HBC-C₆₀-HBC zu unterdrücken (z.B. eine Erhöhung des Fullerenanteils, welcher bislang bei 10 % lag) um die Eineindeutigkeit der Charakterisierung des einfach HBC-substituierten **M** zu gewährleisten.

3.4.4.3 Analytik von PAHs

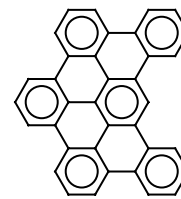
Diese Untersuchungen dienen dazu, systematische Nebenprodukte bei PAHs (Synthese s. Kapitel 6.1.2; S. 272) detailliert zu bestimmen. Aus diesem Grund werden sich die folgenden Untersuchungen und Diskussionen insbesondere auf Proben mit Nebenprodukten beziehen. Die relevanten PAHs dieser systematischen massenspektrometrischen Untersuchungen sind in **Abb. 3-113** zusammengestellt.



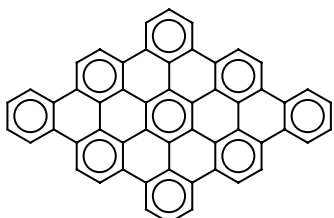
33



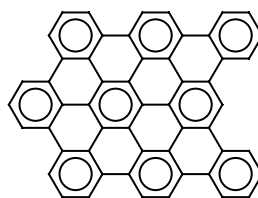
34



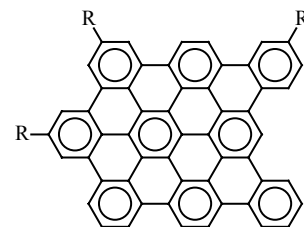
35



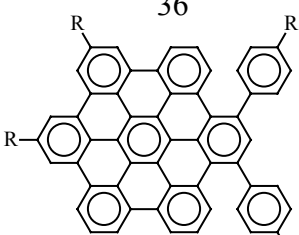
36



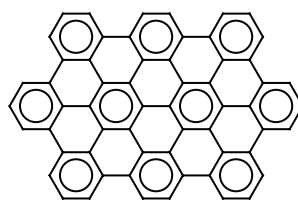
37



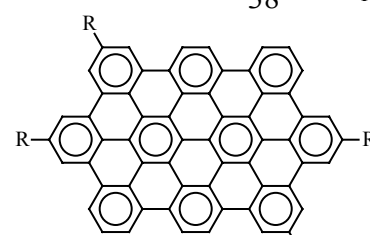
38



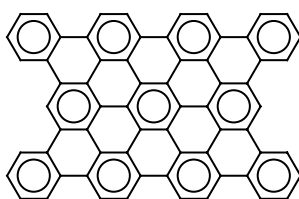
39



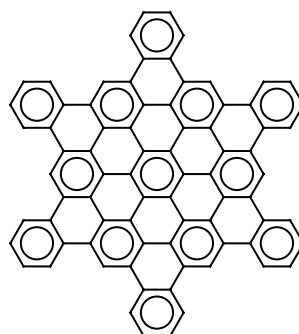
40



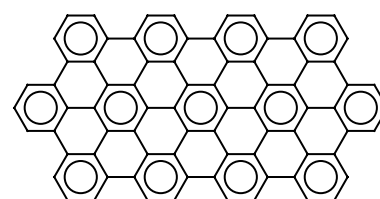
41



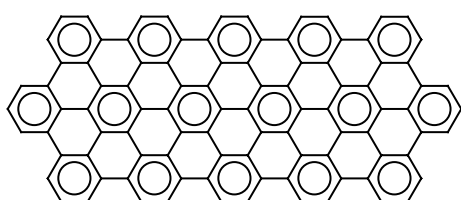
42



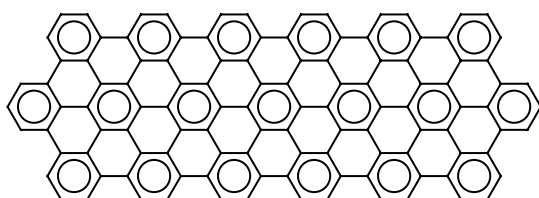
43



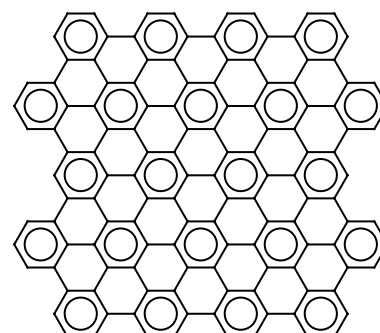
44



45



46



47

Abb. 3-113: Strukturen der untersuchten PAHs (R entspricht $C_{12}H_{25}$)

In **Abb. 3-114** ist bewusst ein lösungsmittelfreies MALDI-TOF-Massenspektrum einer Probe dargestellt, welches sehr ausgeprägte Chlorierung zeigt. Die Wichtigkeit einer wirkungsvollen massenspektrometrischen Analyse dieser bedeutsamen Substanzklasse wird eindringlich veranschaulicht.

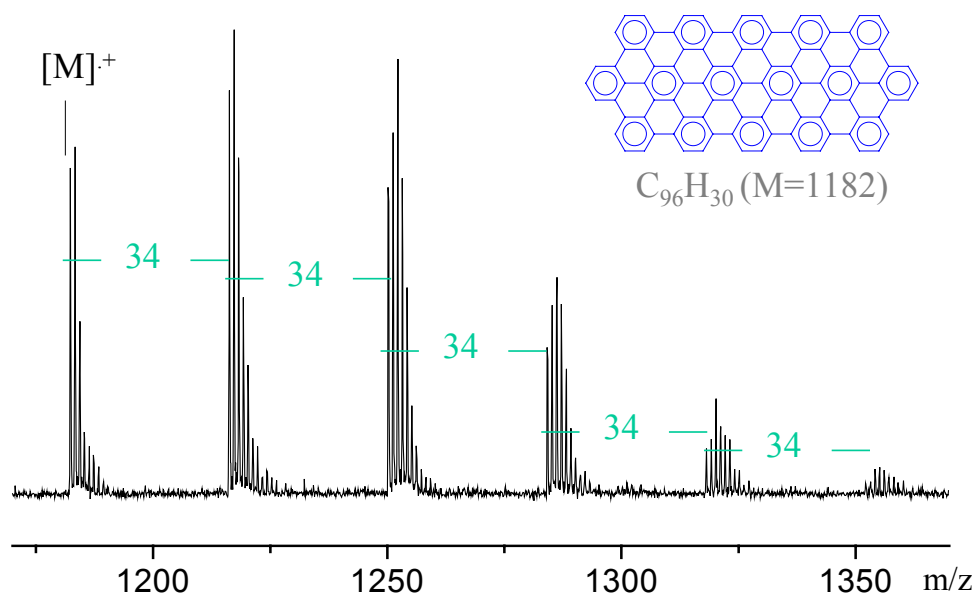


Abb. 3-114: Lösungsmittelfreies MALDI-TOF-Massenspektrum von $C_{96}H_{30}$ **45** (Isomerengemisch).

Die Massendifferenz zwischen dem Molekülion **45** und dem einfach chlorierten Nebenprodukt beträgt 34 Da. Diese Massendifferenz kann nur durch den Verlust eines Wasserstoffatoms erklärt werden. Die Chlorierungen treten daher ausschließlich an der Peripherie (**Struktur I**) des zyklisierten PAHs auf (**Abb. 3-115**). Dies ist überraschend, da man vermuten könnte, dass eine vorhandene Chlorierung bei einem Teilzyklisat, wie z.B. in **Struktur II** in **Abb. 3-115** dargestellt, eine erfolgreiche, vollständige Zyklisierung zum PAH blockiert, so dass eine Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung nicht geschlossen werden kann. Diese vermeintliche Blockade durch ein intermediäres Chlor würde entsprechend den Atomgewichten von Chlor und Wasserstoff eine Massendifferenz von mindestens +36 Da verursachen. Dies kann aufgrund der Massengenauigkeit der Methode ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Chlorierungen nahezu ausschließlich an erfolgreich zyklisierten Molekülen nachgewiesen werden können. Dabei kann keine Aussage getroffen werden, ob die Chlorierung schon im teilzyklisierten Molekül bei dem noch Bereiche als dendritischer Vorläufer unplanarisiert vorliegen oder erst am komplett zyklisierten Molekül eintritt. Für **Abb. 3-115** muss hervorgehoben werden, dass die Chlorierung in **Struktur I** eindeutig an der Peripherie des vollständig zyklisierten PAHs auftritt, dass jedoch keine definierte Aussage über die Lokalisation des

Chloratoms getroffen werden kann. In **Abb. 3-115** sind daher nicht alle möglichen Strukturen von peripherem Chlor für $C_{96}H_{29}Cl$ berücksichtigt.

Identische Massendifferenzen von 34 Da werden zwischen sämtlichen Mehrfachchlorierungen dieser Reaktionsmischung gefunden (**Abb. 3-114**). Damit treten alle Chlorierungen analog der Argumentation der Einfachchlorierung an der Peripherie des vollständig zyklisierten PAH-Produktes auf. Über die genaue Lokalisation der Chloratome an der Peripherie des Makromoleküls kann keine Aussage getroffen werden.

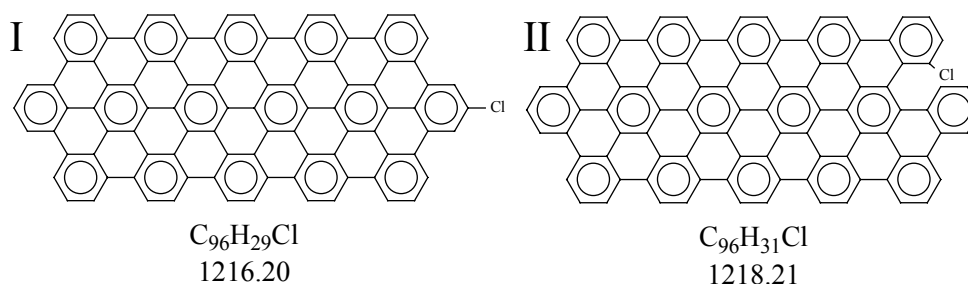


Abb. 3-115: Mögliche Strukturen von einfach chlorierten Nebenprodukten von **45**: periphere (**Struktur I**) und intermediäre Chlorierung (**Struktur II**).

Bei allen untersuchten Proben, bei denen Chlorierung aufgetreten ist (**Abb. 3-113**), werden ausschließlich periphere Chlorierungen gefunden. Des weiteren kann für die Evaluierung von PAH-Proben, bei denen Chlorierungen aufgetreten sind, wie erwartet festgestellt werden, dass diese Nebenreaktion bevorzugt mit steigendem Molekulargewicht des zu zyklisierenden Moleküls auftritt. Mit steigendem Molekulargewicht sind auch Mehrfachchlorierungen möglich.

Bei diesen Untersuchungen zu systematischen Nebenprodukten wird ein zweites, generelles Nebenprodukt deutlich, welches mit einem um vier Dalton erhöhten Molekulargewicht zum berechneten Zielprodukt auftritt. Bei allen Proben bei denen dieses Nebenprodukt auftritt, erscheint dieses nur zusätzlich zum Zielprodukt und mit in der Regel sehr geringen Signalintensitäten. In der PAH-Probe **40** tritt dieses Nebenprodukt, wie in **Abb. 3-116** dargestellt, mit einer ähnlichen Intensität wie die des Zielproduktes auf, und wird aus diesem Grund im Folgenden eingehender untersucht und diskutiert.

Durch die Massengenauigkeit der MALDI-TOF-MS-Methode kann das Zielprodukt eindeutig charakterisiert werden. Für die Struktur des Nebenproduktes kann angenommen werden, dass es sich bei dem Massenzuwachs von vier Dalton um vier nicht abgespaltene Wasserstoffatome handelt. Unter Berücksichtigung der Synthese kann vermutet werden, dass es sich um einen nicht zyklisierten Phenylring (**Abb. 3-117**) handelt, bei dem zwei Bindungsstellen nicht geschlossen werden und damit vier Wasserstoffatome nicht abgespalten sind. Sechs der acht möglichen Phenylringe können gleichermaßen diesen Strukturdefekt von vier Dalton verursachen. Die restlichen zwei der acht Phenylringe würden Massendifferenzen von sechs Dalton, entsprechend drei nicht geschlossenen Bindungsstellen, geben. Eine solche Struktur kann aufgrund der Massengenauigkeit ausgeschlossen werden. Nähere Angaben zur Lokalisation dieses vermuteten Strukturdefektes kann die MALDI-TOF-MS-Analyse nicht geben.

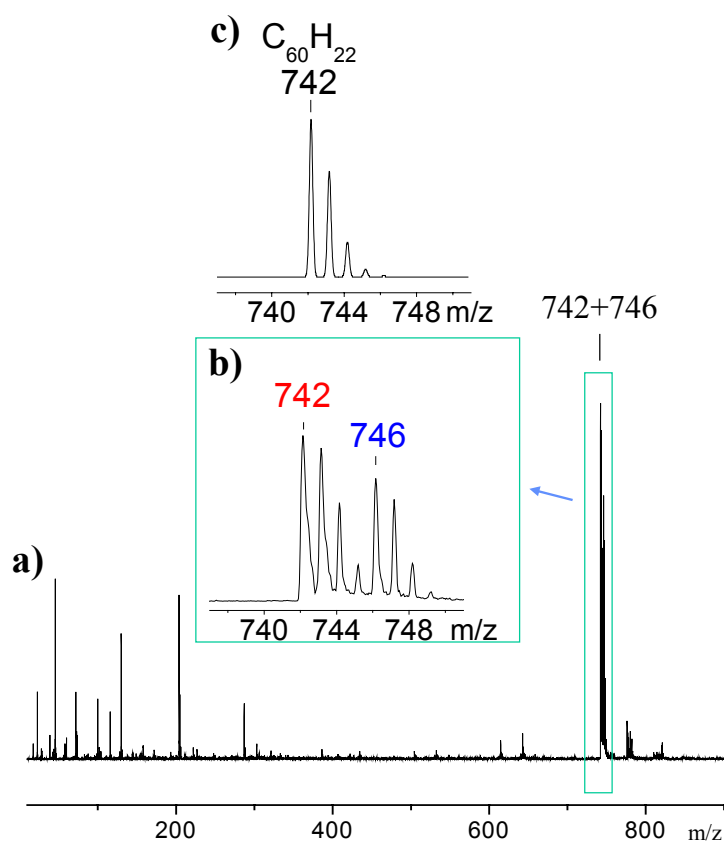


Abb. 3-116: Charakterisierung von $C_{60}H_{22}$ **40** mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS: a) gesamter Bereich des Massenspektrums; b) Ausschnittsbereich zur Darstellung der Isotopenverteilungen des Ziel- und Nebenproduktes; c) Simulation des Zielproduktes.

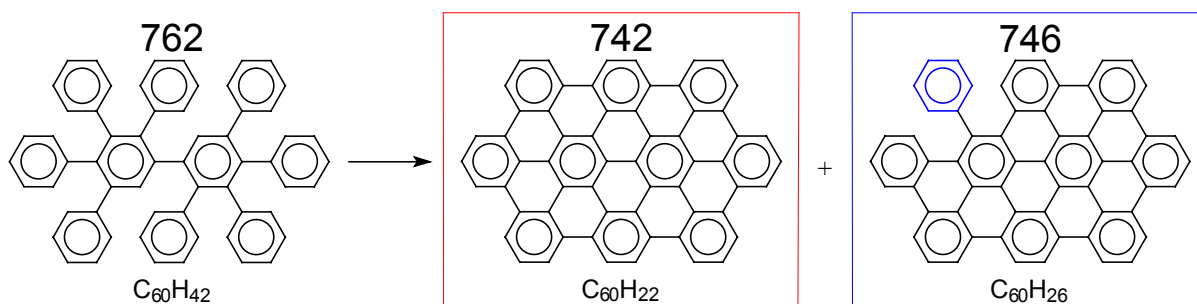


Abb. 3-117: Strukturvorschlag des Nebenproduktes, welches mit einer Masse von 746 Da detektiert wird.

In **Tabelle 3-5** sind die MALDI-TOF-MS-Ergebnisse der untersuchten Proben zusammengestellt. Die weitaus häufigsten Nebenprodukte sind dabei Chlorierungen (+34 Da) und Teilzyklisate (+4 Da). Bei den Teilzyklisaten ist keine Systematik zu erkennen. Chlorierungen und insbesondere Mehrfachchlorierungen treten verstärkt mit zunehmendem Molekulargewicht der PAHs auf. Dies ist durch die höhere Zahl an durchzuführenden Zyklisierungsschritten zu erklären, so dass der Grad zwischen Teilzyklisat, Zielstruktur und Chlorierung mit steigendem Molekulargewicht des

PAHs immer enger wird. Die erfolgreiche Synthese höhermolekularer PAHs wird damit deutlich schwieriger. Zwischen den einzelnen Strukturtypen „Arrow“ und „Bay“ ist keine systematische Nebenreaktion zu erkennen.

Tabelle 3-5: MALDI-TOF-MS-Ergebnisse der untersuchten PAH-Proben.

Verbindung	Bezeichnung	m/z	+ 34-Signal	+ 4-Signal	Andere
C ₃₆ H ₁₈	35	450	Cl _{peri}	--	--
C ₅₄ H ₂₂	36	670	Cl _{peri} (zweifach)	--	--
C ₅₄ H ₂₂	37	670	Cl _{peri}	4 H	--
	37a	670	--	--	+12, +104
C ₅₄ H ₁₈ +4xC ₁₂ H ₂₅	38	1343	Cl _{peri}	--	--
	38a	1343	Cl _{peri}	--	--
C ₅₄ H ₂₂ +4xC ₁₂ H ₂₅	39	1343	Cl _{peri}	4 H	--
C ₆₀ H ₂₂	40	742	Cl _{peri}	4 H	+46
C ₆₀ H ₁₈ +4xC ₁₂ H ₂₅	41	1415	--	4 H	+16
C ₆₆ H ₂₆	42	818	Cl _{peri}	4 H	--
C ₇₈ H ₃₀	43	966	--	4 H (zweifach)	--
C ₇₈ H ₂₆	44	962	--	--	+16, +46
	44a	962	--	--	+28
	44b	962	--	--	+28 (mehrfach)
C ₉₆ H ₃₀ (Isomers)	45	1182	Cl _{peri} (mehrfach)	--	--
C ₁₁₄ H ₃₄	46	1402	Cl _{peri} (mehrfach)	--	--
C ₁₃₂ H ₃₄	47	1618	Cl _{peri}	--	--
C ₁₃₂ H ₃₄	47a	1618	--	4 H	--

Die LD-Methode,²³⁹ die zur Untersuchung von Oberflächen entwickelt wurde, kann auch für unlösliche Substanzen eingesetzt werden (**Abb. 3-109**, S. 199). Dabei wird der Analyt durch direkten Laserbeschuss (N₂-Laser) desorbiert und ionisiert. Aufgrund ihrer UV-Absorption und der damit verknüpften effektiven Energieübertragung der Laserstrahlung können PAHs bis rund 1.500 Da mit LD charakterisiert werden. Auffällig zeigte sich bei diesen vergleichenden LD-TOF-MS-Ergebnissen im anwendbaren Massenbereich, dass die Nebenprodukte weniger betont werden als bei der analogen MALDI-TOF-MS-Analyse (Daten nicht gezeigt). Die MALDI-TOF-MS-Analyse eignet sich daher im gesamten Massenbereich wesentlich besser für eine zuverlässige Synthese- und Produktkontrolle der PAHs als die LD-TOF-MS.

Weitere Erkenntnisse zu diesem vermuteten Teilzyklisat kann ein konventionelles MALDI-TOF-Massenspektrum nicht liefern. Jedoch soll im Folgenden durch detailliertere Untersuchungen überprüft werden, in welchem Maße sich die MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik eignet, um eine eindeutige Identifikation von Nebenprodukten zu ermöglichen. Von grundlegendem Interesse ist hinsichtlich der MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik auch, inwiefern rationalisierbare Strukturen abgeleitet werden können.

3.4.4.3.1 Fragmentionenanalytik der chlorierten Nebenprodukte

Diese systematischen PSD-MALDI-TOF-Fragmentuntersuchungen der chlorierten Nebenprodukte sollen zunächst an PAHs mit niedrigeren Molekulargewichten durchgeführt werden, um systematische Aussagen treffen zu können. Hierfür wurde eine PAH-Probe ausgewählt, die möglichst intensive Chlorierungen bei möglichst geringem Molekulargewicht zeigt.

Mittels lösungsmittelfreier LD-TOF- (**Abb. 3-118**) und lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS von PAH **37** werden Massenspektren erhalten, die anhand der ermittelten Molekulargewichten und Isotopenverteilungen eine Zuordnung der Chlorierungsprodukte als periphere Chlorierungen erlaubt. In **Abb. 3-118** sind dem erhaltenen LD-TOF-Massenspektrum die simulierten Isotopenverteilungen gegenüber gestellt. Sie stehen in gutem Einklang mit den experimentell gefundenen Isotopenverteilungen. LD-TOF-MS zeigt intensive Wasserstoffabstraktionen im Bereich des Elternionensignals, die bei MALDI-TOF-MS selbst bei wesentlich höheren Molekulargewichten noch effektiv unterdrückt sind (vgl. z.B. **Abb. 3-114**).

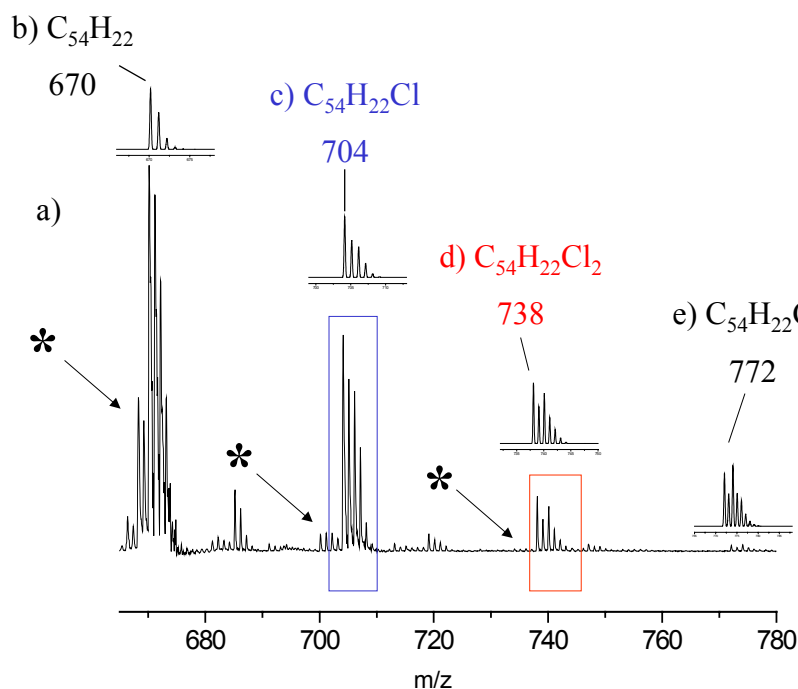


Abb. 3-118: Charakterisierung von $C_{54}H_{20}$ 37 und dessen durch Mehrfachchlorierung erhaltenen Nebenprodukte (* zeigen Wasserstoffabstraktionen an): a) LD-TOF-Massenspektrum; b-e) simulierte Isotopenverteilungen.

Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum zeigt nur sehr breite unaufgelöste Fragmentensignale (Daten nicht gezeigt). Durch Optimierung der Bedingungen kann keine wesentlich bessere Auflösung der Fragmentensignale erhalten werden. Aus diesem Grund wird PSD-LD-TOF-MS (**Abb. 3-119**) durchgeführt. Diese zeigt bei der Fragmentenanalyse des einfach chlorierten Produktes eine sehr hohe Auflösung der Fragmentensignale, so dass eine eindeutige Fragmentzuordnung von -36 Da ermöglicht ist. Diese Massendifferenz entspricht einer formalen Abspaltung von HCl. Mögliche Fragmentierungsmechanismen von peripherem Chlor sind in **Abb. 3-120** zusammengestellt. Die direkte Abspaltung von zwei Chloratomen am zweifach chlorierten PAH-Nebenprodukt ist wahrscheinlicher als der indirekte Weg über das einfach chlorierte Nebenprodukt.

Der ausgeprägte Unterschied zwischen PSD-MALDI-TOF-MS und PSD-LD-TOF-MS in der Auflösung der Fragmentensignale kann darauf zurückgeführt werden, dass durch die schonenderen MALDI-Bedingungen die Fragmentierung weniger spontan verläuft als beim härteren LD-Prozess. Die MALDI-Fragmentierung könnte daher verzögert und über einen längeren Zeitraum auftreten, wodurch verbreiterte Fragmentensignale und damit eine geringere Auflösung im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum die Folge sind.

Werden PSD-LD-TOF-Fragmentuntersuchungen (**Abb. 3-119**) am zweifach chlorierten Nebenprodukt durchgeführt, so treten zwei intensive, isotopenaufgelöste Fragmentensignale mit einer Massendifferenz von -36 und -70 Da auf. Die möglichen Fragmentierungsprozesse, die zur Abspaltung von formal Chlorwasserstoff und zwei Chloratomen führen, sind in **Abb. 3-120** dargestellt. Die Abspaltung von zwei Chloratomen auf direktem Wege ist deutlich wahrscheinlicher.

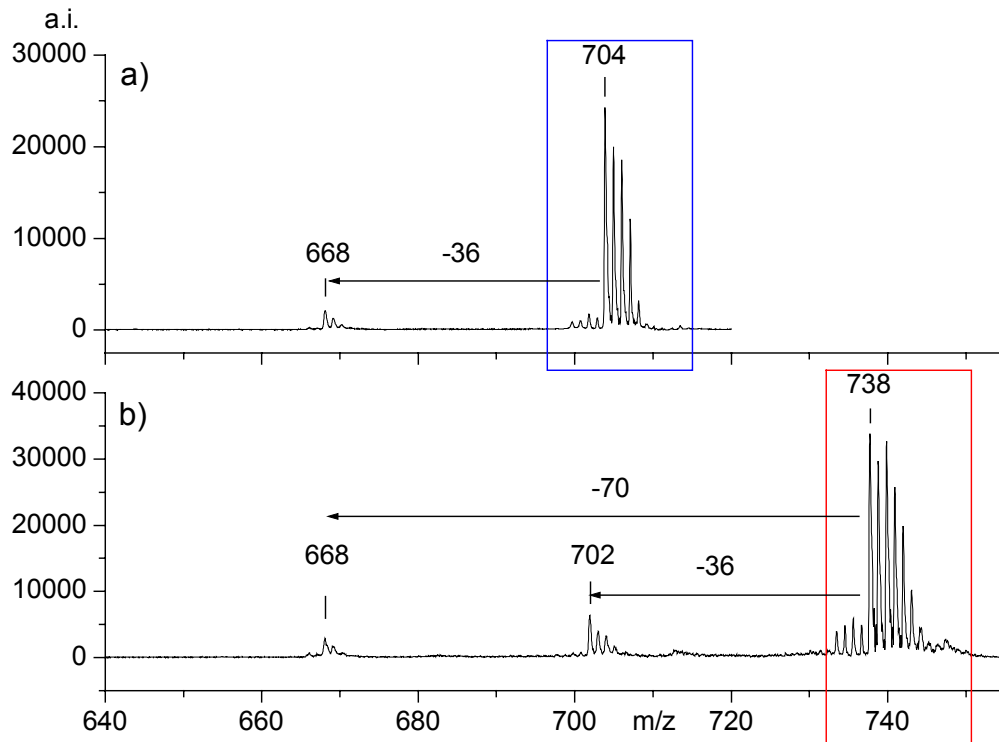


Abb. 3-119: PSD-LD-TOF-Massenspektren der chlorierten Nebenprodukte von $C_{54}H_{22}$ **37**: a) einfach chloriertes $C_{54}H_{21}Cl$; zweifach chloriertes $C_{54}H_{20}Cl_2$.

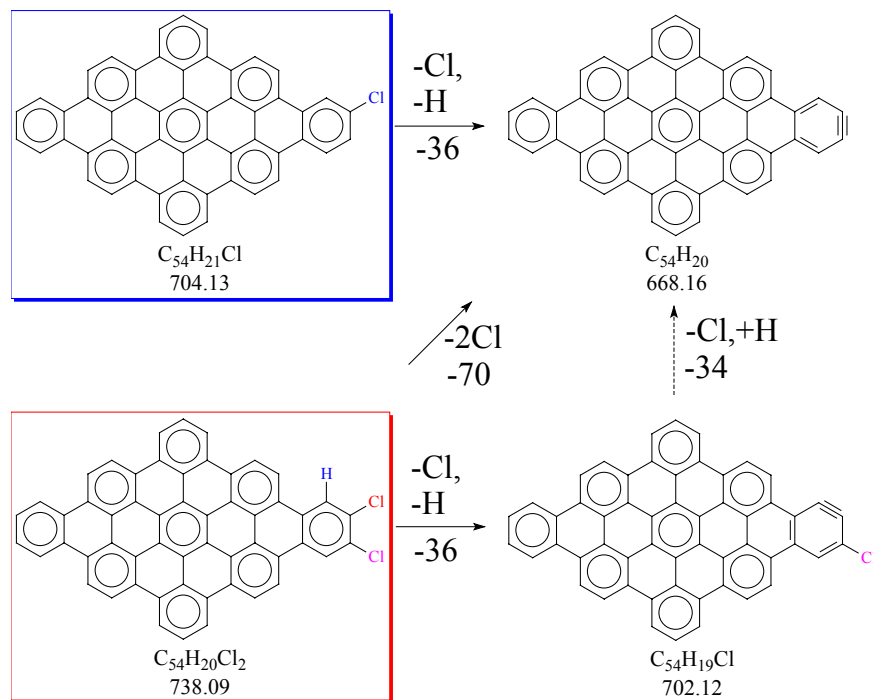


Abb. 3-120: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmechanismus von peripherem Chlor von $C_{54}H_{22}$ **37**.

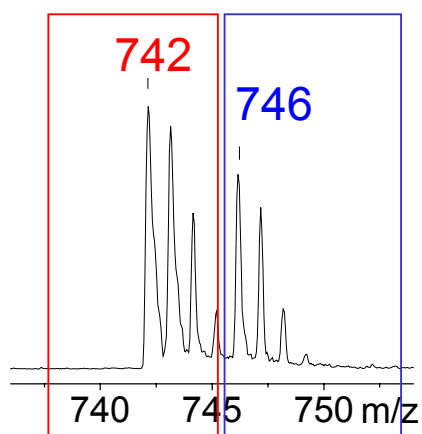
Diese Ergebnisse der PSD-MALDI-TOF-Fragmentationenanalytik der chlorierten Nebenprodukte ermutigen weitergehende Untersuchungen an höhermolekularen, unvollständig zyklisierten Nebenprodukten durchzuführen.

3.4.4.3.2 Fragmentationenanalytik der unvollständig zyklisierten Nebenprodukte

Diese systematischen PSD-MALDI-TOF-Fragmentuntersuchungen der unvollständig zyklisierten Nebenprodukte sollen zunächst an einer PAH-Probe mit einem möglichst intensiven Signal eines Nebenproduktes bei möglichst geringem Molekulargewicht durchgeführt werden. Hierfür wurde die PAH-Probe **40** ausgesucht, welche eine Massendifferenz zwischen Produkt und unvollständig zyklisiertem Nebenprodukt von vier Dalton aufweist. Der Teilbereich des lösungsmittelfreien MALDI-TOF-Massenspektrums, welcher die isotopenaufgelösten Signale des vollständig zyklisierten Zielproduktes und des Nebenproduktes wiedergibt, ist in **Abb. 3-121i** dargestellt. In **Abb. 3-121ii** sind die Ergebnisse der PSD-MALDI-TOF-Analytik gegenübergestellt. Diese Untersuchungen ermöglichen ebenfalls die Evaluierung des elektronischen „Gates“, da bei diesen Produktgemischen sich sehr geringe Massendifferenzen ergeben (**Abb. 3-116**, S. 208).

Die PSD-MALDI-TOF-MS des Zielproduktes (**Abb. 3-121ii,a**) zeigt im Massenspektrum das intensivste Fragmentsignal bei 703 Da. Diese Massendifferenz von -39 Da wird auf einen Verlust von C_3H_3 zurückgeführt. Der entsprechende Fragmentierungsprozess ist in **Abb. 3-122** dargestellt. Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum des Nebenproduktes ist in **Abb. 3-121ii,b** abgebildet. Das Signal mit einer Massendifferenz von 41 Da entspricht formal C_3H_5 und muss einer Abspaltung von C_3H_3 und einer Umlagerungsreaktion, die zur Abspaltung von zwei weiteren Wasserstoffatomen führt, zugeschrieben werden. Das weitaus bedeutendere Fragment, welches durch das Abspalten von einer Masse von 76 Da gebildet wird, entspricht formal C_6H_4 . Dieses kann wie in **Abb. 3-122** dargestellt, einer Abspaltung eines Phenylringes und einer Rehydrierung der Radikalstellen zugeordnet werden. Die Phenylringabspaltung ist bei diesem Strukturdefekt gut rationalisierbar, da nur eine einzige Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung gebrochen werden muss. Dies ist ein bedeutendes Ergebnis, da klar hervorgeht, dass aus dem vorgeschlagenen Strukturdefekt tatsächlich ein Phenylring abgespalten werden kann. Der vermutete Strukturdefekt ist somit sehr wahrscheinlich. Die MALDI-TOF-Fragmentationanalyse erlaubt mittels spezifischer Fragmente eine Differenzierung zwischen intakter Zielstruktur und defekter Molekülstruktur zu erzielen.

i) MALDI-TOF MS:



ii) PSD-MALDI-MS:

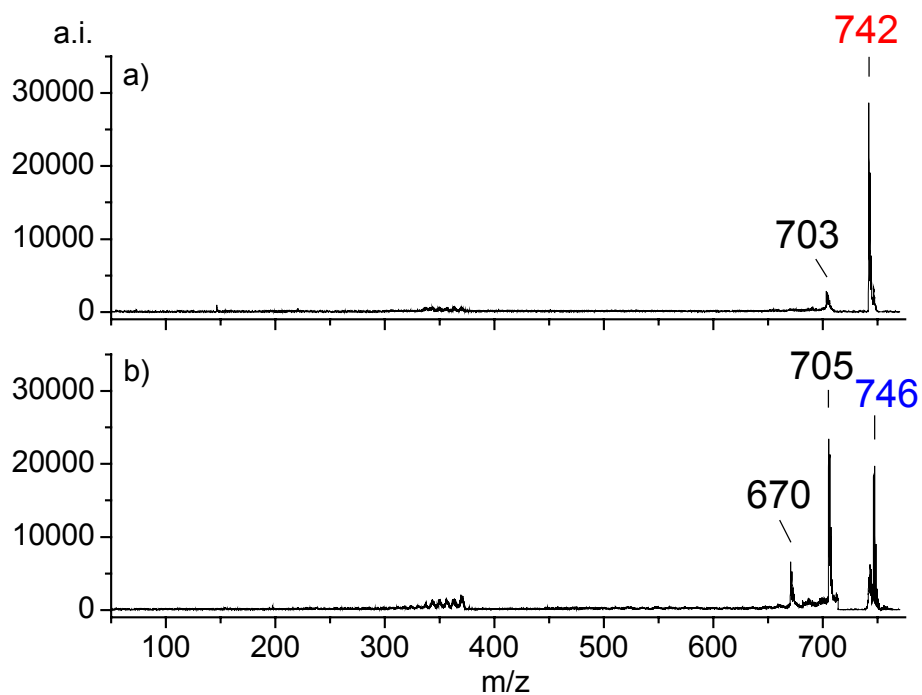


Abb. 3-121: Charakterisierung von $C_{60}H_{22}$ **40** und dessen Teilzyklisat: i) isotopenaufgelöster Bereich des MALDI-TOF-Massenspektrums; ii) PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren in Abhängigkeit des selektierten Elternions: a) $C_{60}H_{22}$ (742 Da): -39 Da; b) $C_{60}H_{26}$ (746 Da): -41 Da und -76 Da.

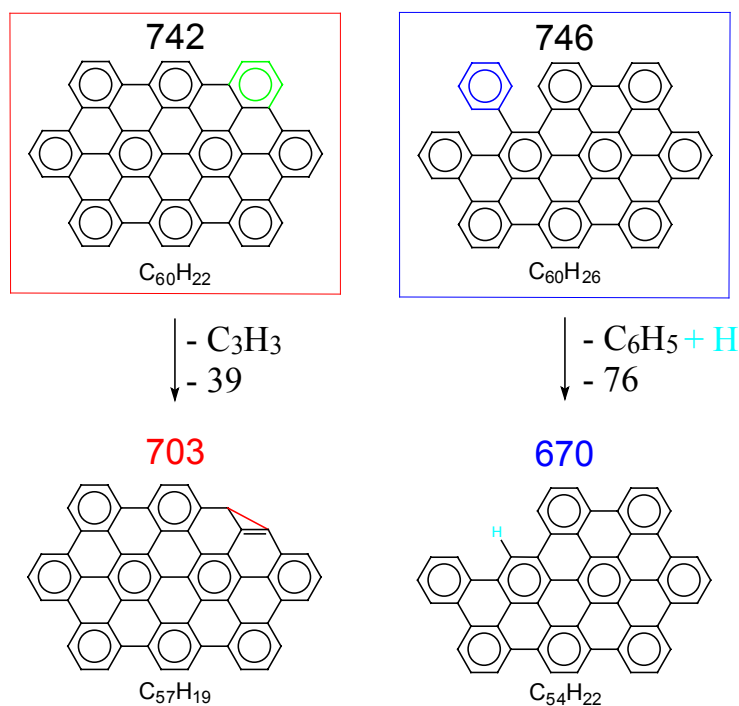


Abb. 3-122: Schematische Darstellung der Fragmentierungsmechanismen: a) C₆₀H₂₂ **40** (742 Da); b) C₆₀H₂₆ **40** (746 Da).

Damit ist eine direkte Korrelation zwischen Struktur und Fragmentierung für diese Substanzklasse zu vermuten. Gleichermaßen tritt jedoch auch die Bedeutung der MALDI-Fragmentionenanalytik hervor, die es erlaubt, aufgrund der unterschiedlichen Stabilität der Elternionen und der erhaltenen Fragmentionenintensitäten einen Strukturhinweis abzuleiten.

Analoge Untersuchungen werden zur Absicherung des Ergebnisses an C₇₈H₃₀ durchgeführt, welches den gleichen Massenzuwachs von vier Dalton aufweist. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von C₇₈H₃₀ zeigen Fragmentdifferenzen von 88, 75, 59, 47 Da und die PSD-LD-TOF von 88, 74, 52 Da relativ zum Elternion (Daten nicht gezeigt). Im PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum von C₇₈H₃₄ wird ein dominantes Fragment mit der Massendifferenz von 76 Da gefunden (Daten nicht gezeigt). Die Fragmentbrüche der intakten und defekten Molekülstruktur sind in **Abb. 3-123** schematisch dargestellt und unterscheiden sich erheblich. Für beide Molekülstrukturen werden sehr strukturspezifische Fragmentbrüche gefunden, wie z.B. die Phenylingabspaltung beim Strukturdefekt **40**. Die gefundenen und theoretischen Massendifferenzen dieser Untersuchungen können auf Rehydrierungsreaktionen der Fragmentionen zurückgeführt werden. Die Massendifferenzen < 60 Da sind keiner Struktur zuweisbar. Dennoch konnte durch Feinabstimmung des elektronischen „Gates“ auch in diesem Massenbereich gerade noch eine ausreichende Selektion des Elternions für Strukturzuweisungen von Molekülen mit einer Massendifferenz von vier Dalton erfolgreich durchgeführt werden. Aus diesen Experimenten ist davon auszugehen, dass die Selektionsmöglichkeiten unmittelbar an der methodischen Grenze des „Gates“ liegen. Jedoch wird gezeigt, dass die Fragmentionenanalyse generell zur Charakterisierung dieses speziellen Strukturdefektes eingesetzt werden kann.

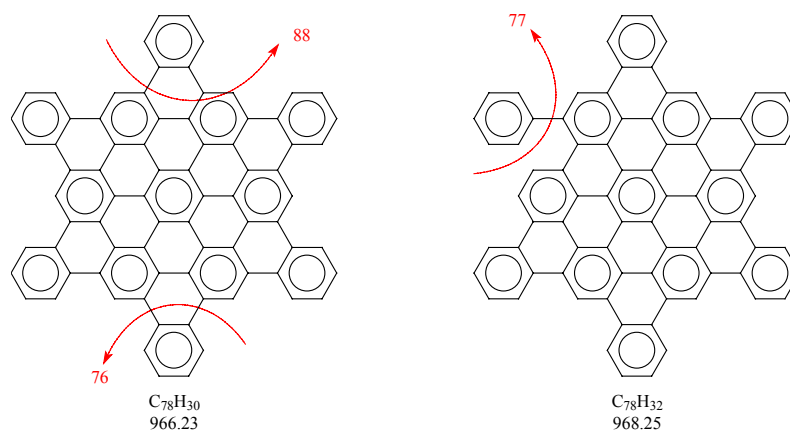


Abb. 3-123: Schematische Darstellung der Fragmentbrüche von $C_{78}H_{30}$ **43** und dessen Strukturdefekt $C_{78}H_{34}$.

Chlorierte bzw. teilzyklisierte Nebenprodukte können somit über strukturspezifische Fragmentbrüche charakterisiert werden. Die PSD-MALDI-TOF-MS ermöglicht dadurch eine bessere Absicherung von Nebenprodukten. Folgende generelle Tendenzen werden bei der PAH-Fragmentionenanalytik ermittelt:

- Strukturdefekte zeigen höhere Fragmentierungsanteile als die defektfreien Zielstrukturen,
- mit dem elektronischen „Gate“ wird mit zunehmendem Molekulargewicht die Selektion der Zielstruktur von Nebenprodukten erschwert (Grenzbereich bei rund 1.000 Da).

Inwiefern jedoch mittels der MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse Korrelationen zwischen Struktur und Fragmentierung der vollkondensierten Aromaten ableitbar sind, bleibt zunächst offen. Dies soll im nächsten Teil dieser PAH-Fragmentionenanalysen anhand von defektfreien PAHs untersucht werden.

3.4.4.3.3 Fragmentionenanalytik von vollständig zyklisierten PAHs

Untersuchungen an vollständig zyklisierten PAHs werden zunächst für $C_{78}H_{26}$ **44** durchgeführt. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren zeigen Fragmentmassendifferenzen von 492, 481, 214 Da (Daten nicht gezeigt). Die Fragmentbrüche sind in **Abb. 3-124** schematisch dargestellt. Die ermittelten und theoretischen berechneten Massendifferenzen dieser Untersuchungen können auch hier auf Rehydrierungsreaktionen der Fragmentionen zurückgeführt werden. Auffällig ist, dass bei dieser hochsymmetrischen PAH-Struktur bevorzugt sehr große Fragmente gebildet werden. Dies stimmt mit der Theorie überein, dass eine radikalkationische Ladung mit zunehmender Systemgröße besser delokalisiert werden kann. Bei dieser PSD-MALDI-TOF-Fragmentierung verbleibt die Ladung nach einem Bindungsbruch der Theorie zufolge auf dem größeren Molekülbruchstück. Das kleinere Bruchstück wird als Neutralteilchen abgespalten und kann massenspektrometrisch nicht detektiert werden.

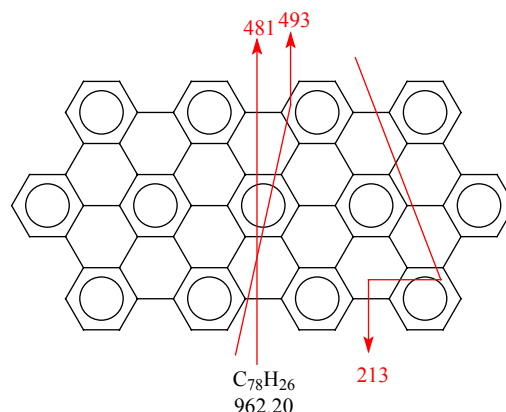


Abb. 3-124: Schematische Darstellung der Fragmentbrüche von $C_{78}H_{26}$ **44**.

Weiterführende Experimente werden an $C_{36}H_{18}$ durchgeführt. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektren von **44** zeigen Fragmentdifferenzen von 225 und 209 Da (Daten nicht gezeigt). Der Fragmentbruch, der bei moderaten Laserleistungen zu Ionen mit 225 Da führt, ist in **Abb. 3-125** schematisch dargestellt. Die experimentell gefundenen und theoretischen berechneten Massen sind in sehr gutem Einklang. Die Massendifferenz 209 Da ist keiner plausiblen Fragmentstruktur zuweisbar.

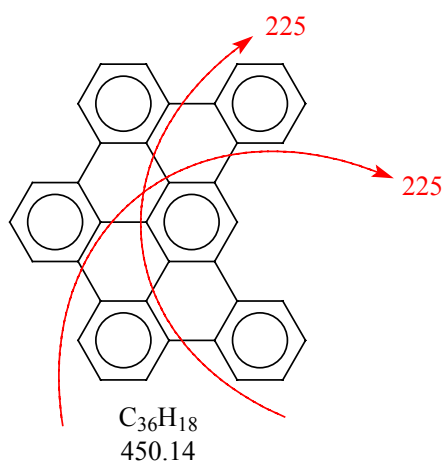


Abb. 3-125: Schematische Darstellung der Fragmentbrüche von $C_{36}H_{18}$ **35**.

Um eine generellere Korrelationen zwischen Struktur und Fragmentierung abzuleiten, werden eine Reihe von Fragmentionenanalysen der PAHs **33-47** durchgeführt. Folgende Tendenzen sind dabei ableitbar:

- je kompakter die Struktur, umso geringer die Fragmentierung (z.B. **34** und **35**),
- je höher das Molekulargewicht, umso geringer die Fragmentierung (z.B. **44** und **47**).

Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalyse ist jedoch nicht in der Lage, Strukturisomere (z.B. $C_{96}H_{30}$ **45**, $C_{114}H_{34}$ **46**) zu identifizieren, wenn die Strukturen keine entsprechend spezifischen Fragmentionen liefern. Dies ist beispielhaft in **Abb. 3-126** für $C_{114}H_{34}$ **46** dargestellt.

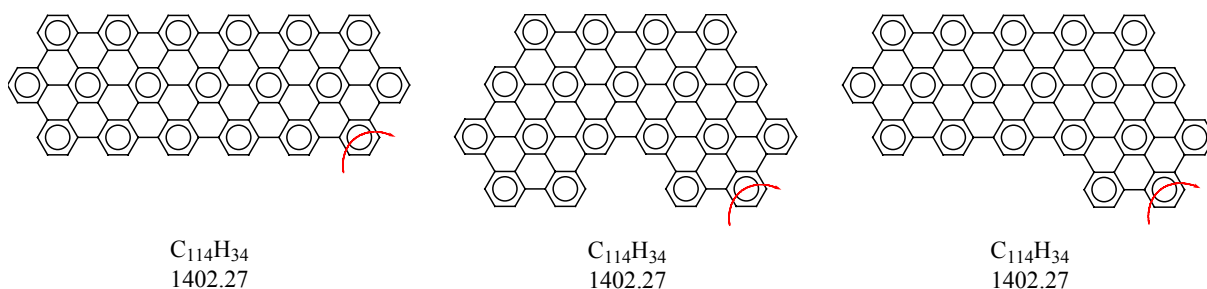


Abb. 3-126: Schematische Darstellung der Fragmentbrüche von $C_{114}H_{34}$ **46**.

3.4.4.3.4 Fragmentierung in Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung

Diese Fragmentierungsuntersuchung in Abhängigkeit der Beschleunigungsspannung soll an einem PAH mit möglichst hoher Fragmentierungstendenz durchgeführt werden. Aufgrund der messtechnischen Limitierungen der MALDI-TOF-Fragmentationsanalyse (Kapitel 2.2.2, S. 26) muss der Fragmentanteil im ersten Segment vorhanden sein, um den Verlauf der Fragmentensignale bestmöglichst verfolgen zu können. Aus den vorangegangenen Untersuchungen wird PAH **35** ausgewählt, welcher keine Nebenprodukte aufweist und bei hohen Laserleistungen z.B. ein intensives Fragmention $[M-4CH]^+$ zeigt. Die TCNQ-Matrix wird eingesetzt. Die Beschleunigungsspannung wird sukzessiv verringert, so dass die Verweildauer des PAHs in der Flugstrecke und damit die zur Verfügung stehende Zeit zur Fragmentierung erhöht wird.

Diese systematischen Untersuchungen zeigen, dass bei gleich gehaltener Laserleistung mit abnehmender Beschleunigungsspannung die Fragmentationenausbeute zunimmt (vgl. **Abb. 3-127a-d**). Des weiteren werden auch andere, intensive Fragmentbrüche gefunden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass im niedermolekularen Massenbereich noch weitere aussagekräftige Fragmentationen gefunden werden. Wegen der experimentellen Vergleichbarkeit beschränkt sich diese PSD-MALDI-TOF-Fragmentuntersuchung auf das erste Segment. Daher bleiben kleinere Fragmentationen bei dieser vergleichenden Untersuchung unberücksichtigt.

Diese Untersuchung lassen darauf schließen, dass ein niedermolekulares, fragmentierungsstabiles PAH-Molekül tendenziell mit zunehmender Verweildauer in der Flugstrecke eine erhöhte Fragmentierungstendenz zeigt. Die PSD-MALDI-TOF-Fragmentationsanalyse ist für beschleunigungsspannungsabhängige Fragmentuntersuchungen aufgrund der limitierten, massenbegrenzten Vergleichbarkeit eher ungeeignet. Im einzelnen muss dieses Ergebnis mit geeigneten, segmentfreien Fragmentmethoden (z.B. LIFT-MALDI-Fragmentationsanalyse Kapitel 3.2.2.2.3, S. 101) überprüft und auf höhermolekulare PAHs übertragen werden.

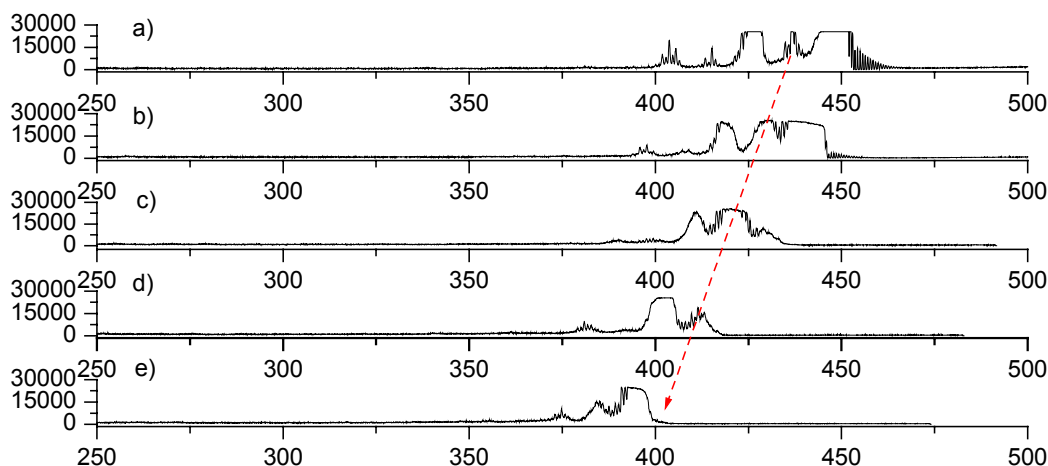


Abb. 3-127: PSD-MALDI-TOF-Fragmentierung von PAH **35** in Abhängigkeit der Differenz der Beschleunigungsspannung in [kV] ausgehend von 28,5 kV: a) Δ 0; b) Δ 0,5; c) Δ 1; d) Δ 1,5; e) Δ 2.

3.4.4.4 Ermittlung von „Response“-Faktoren

Von Interesse ist nicht nur der qualitative, sondern auch der quantitative Aspekt einer massenspektrometrischen Untersuchung. Bei systematischen quantitativen Untersuchungen konnten erstmals „Response“-Faktoren hinsichtlich $C_{222}H_{42}$ ermittelt werden¹¹⁵. Bei der Evaluierung der Überrepräsentation des Eduktes $C_{222}H_{150}$ gegen das Produkt $C_{222}H_{42}$ wurde eine 145-fache Überrepräsentation festgestellt, wohingegen das Teilzyklisat gegen das Produkt eine 285-fach Überrepräsentation des Teilzyklisates verursachte.

In **Abb. 3-12** (S. 47) konnte an einem Modellgemisch aus einem Dendrimervorläufer $C_{132}H_{90}$ **9** und PAH-Produkt $C_{132}H_{34}$ **10** gezeigt werden, dass die lösungsmittelfreie MALDI-Probenpräparation eine entscheidende Verbesserung bringt. Dennoch bleibt bei der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS die bevorzugte Ionisation des Eduktes gegenüber der des Produktes, so dass bei PAH $C_{132}H_{34}$ gegen dessen Dendrimervorläufer $C_{132}H_{90}$ eine 180-fache Überrepräsentation festgestellt wurde. Damit kann vermutet werden, dass aufgrund bevorzugter Ionisationstendenzen unvollständig zyklisierte PAHs generell mit größerer Signalintensität als die vollständig zyklisierten Zielmoleküle nachgewiesen werden. Damit ist eine wichtige grundlegende Aussage getroffen.

Dennoch sollten weiterführende Modellmischungen hergestellt werden, um eine mögliche weitere Systematik zu evaluieren. Die TCNQ-Matrix soll eingesetzt werden, da diese die Ionisation speziell der PAHs unterstützt. Die Analyt/Matrix-Verhältnisse werden konstant bei 1/100 gehalten. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen (**Tabelle 3-6**), dass bei Strukturen mit gleicher Zahl an Kohlenstoffatomen und unterschiedlicher Zahl an Wasserstoffatomen ($C_{78}H_{30}$ **43** versus $C_{78}H_{26}$ **44**) das Molekül mit höherem Gehalt an Wasserstoffatomen unabhängig von der Laserleistung überrepräsentativ im Massenspektrum dargestellt ist. Bei den Strukturen $C_{54}H_{18} + 4x C_{12}H_{25}$ **38** versus $C_{54}H_{22} + 4x C_{12}H_{25}$ **39** wird das Molekül mit geringerem Gehalt an Wasserstoffatomen unabhängig von

der molaren Verhältnisse und der Laserleistung überrepräsentiert. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass dieses abweichende Ergebnis durch die Alkylgruppen der PAHs **38** und **39** verursacht wird. Entscheidende Auswirkungen auf das Desorptions/Ionisationsverhalten von Analyten haben generell schon die Fällungsweise bzw. Aufarbeitung der Probe sowie auch das Alter. Letzteres führt z.B. zu verstärkten „Stagging“-Effekten bei perfekt, planaren Analyten aufgrund der Kohlenstoff-Kohlenstoffwechselwirkungen, welches für eine erfolgreiche Desorption erhöhte Laserleistungen verlangt (vgl. **Abb. 3-108**, S. 198)²⁴⁰. Um die chemischen oder massenspektrometrischen Ursachen dieses Ergebnisses genauer definieren zu können, müssten beide Proben frisch hergestellt erneut systematischen MALDI-TOF-„Response“-Untersuchungen unterworfen werden. Dieses Ergebnis veranschaulicht stellvertretend die intrinsischen Schwierigkeiten der quantitativen MALDI-TOF-MS in der PAH-Analytik.

Tabelle 3-6: Modellmischungen unterschiedlicher PAHs in Abhängigkeit der molaren Verhältnisse und der Laserleistung.

PAH 1	PAH 2	Molares Verhältnis PAH 1/ PAH 2	Laserleistung	Ergebnis
$C_{36}H_{18}$ 35	$C_{42}H_{18}$ 34	47/53	15	Überrepräsentation von $C_{42}H_{18}$
			20	unabhängig von der
			25	Laserleistung
$C_{60}H_{22}$ 40	$C_{54}H_{22}$ 37	91/9	15	Überrepräsentation von $C_{54}H_{22}$
			20	umso größer je mehr
			25	Laserleistung
		46/54	15	Überrepräsentation von $C_{60}H_{22}$
			20	bei geringer Laserleistung
			25	Überrepräsentation von $C_{54}H_{22}$ bei höherer Laserleistung
11/89	15	Überrepräsentation variiert stark mit Laserleistung		
	20			
	25			
$C_{78}H_{30}$ 43	$C_{78}H_{26}$ 44	53/47	15	Überrepräsentation von $C_{78}H_{30}$
			20	unabhängig von der
			25	Laserleistung
$C_{54}H_{18}$ $+4xC_{12}H_{25}$ 38	$C_{54}H_{22} + 4xC_{12}H_{25}$ 39	93/7	15	Überrepräsentation von $C_{54}H_{18}$
			20	$+4xC_{12}H_{25}$ unabhängig von der
			25	Laserleistung
		55/45	15	Überrepräsentation von $C_{54}H_{18}$
			20	$+4xC_{12}H_{25}$ unabhängig von der
			25	Laserleistung
		10/90	15	Überrepräsentation von $C_{54}H_{18}$
			20	$+4xC_{12}H_{25}$ unabhängig von der
			25	Laserleistung

Bei der Evaluierung von Strukturen mit gleicher Zahl an Wasserstoffatomen und unterschiedlicher Zahl an Kohlenstoffatomen ($C_{60}H_{22}$ **40** versus $C_{54}H_{22}$ **37**) wird keine Abhängigkeit hinsichtlich der Molekülzusammensetzung gefunden. Mit unterschiedlichen Laserleistungen und

molaren Verhältnissen von $C_{60}H_{22}$ zu $C_{54}H_{22}$ variiert die Überrepräsentation der beiden PAH-Komponenten. Bei den Strukturen $C_{42}H_{18}$ **34** versus $C_{36}H_{18}$ **35** wird $C_{42}H_{18}$ unabhängig von der Laserleistung überrepräsentativ detektiert. Generell kann zusammengefasst werden, dass hinsichtlich der Überrepräsentation eines PAHs

- keine Abhängigkeit von der Zahl der Kohlenstoffatome,
- keine Abhängigkeit von der Zahl der Wasserstoffatome,
- keine Abhängigkeit vom molaren Analytenverhältnis und
- keine Abhängigkeit von der Laserleistung

gefunden wird. Jeder dieser Faktoren hat Einfluss auf den „Response“-Faktor. Eine Extrapolation oder Vorhersage ist nicht möglich. Für jedes einzelne System ist der „Response“-Faktor neu zu bestimmen. Diese geringen Extrapolationsmöglichkeiten zeigen die Grenzen der MALDI-TOF-MS-Analytik auf. Dabei ist nicht auszuschließen, dass ebenfalls Alterungserscheinungen der Proben oder synthesebedingte Veränderungen einen entscheidenden Einfluss bei diesen vergleichenden quantitativen Untersuchungen ausüben. Des Weiteren sind Verfälschungen der massenspektrometrischen „Response“-Faktoren durch probenspezifische Ursachen denkbar (z.B. Clusterbildung). Probenspezifische Ursachen sind bei massenspektrometrischen Methoden, bei denen der Analyt in gelöster Form vorliegt (z.B. ESI-MS), geringer als bei der MALDI-TOF-MS-Methode. Nichts desto trotz ist MALDI-TOF-MS die einzige MS-Methode, die diese Substanzklasse der unlöslichen PAHs in einem bislang unbegrenzten Massenbereich charakterisieren kann. Darüber hinaus erlaubt diese Methode unter sehr fein abgestimmten experimentellen Bedingungen „Response“-Faktoren der PAHs zu ermitteln und damit bei Vorhandensein von Vergleichsverbindungen semiquantitative Analytik zu betreiben.

Weiterführende Experimente hinsichtlich der Matrixverdünnung und der probenspezifischen Eigenschaften (z.B. Clusterbildung) zeigen, dass bei PAH $C_{132}H_{34}$ **47** für sehr niedrige, gängige Analyt/Matrix-Verhältnisse (1/500) aufgrund der erhaltenen Signalintensitäten die höchste Tendenz zur Clusterung besteht (**Abb. 3-128**). Die Signalintensität des Elternions geht in einem unbestimmten Maße in die Signalintensitäten der Dimer-, Trimer-, Tetramerstrukturen ein. Mit zunehmender Matrixverdünnung (bis 1/300.000) nimmt die Clusterbildung stark ab. Dabei muss mit erhöhter Laserleistung gearbeitet werden, um eine ausreichende Signalintensität des PAHs zu erhalten. Aus diesem Modellexperiment geht hervor, dass geringe Analyt/Matrix-Verhältnisse die größten Verfälschungen der Signalintensität des Analyten verursachen.

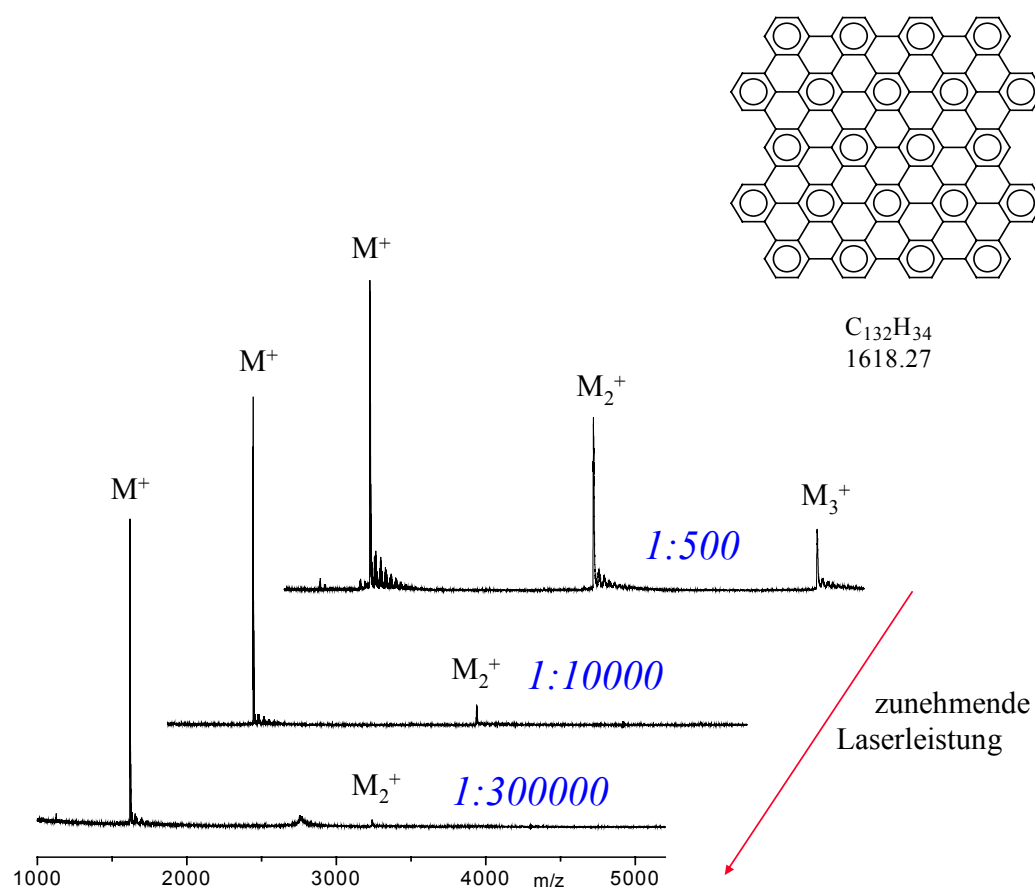


Abb. 3-128: Clusterbildung als einflussnehmender Parameter bei der Ermittlung des „Response“-Faktors bei den planaren Analyten $C_{132}H_{34}$ **47** in Abhängigkeit der Laserleistung.

3.4.5 Analytik von Poly(vinylpyrrolidon)

3.4.5.1 Grundlagen und analytisches Konzept

In den bisherigen Untersuchungen lag der Schwerpunkt auf der analytischen Evaluierung von Synthesenebenprodukten. Ein bedeutendes analytisches Forschungsgebiet ist jedoch auch die Aufklärung von Abbauprodukten synthetischer Polymere. Bei diesen umweltspezifischen Fragestellungen liegt zusätzlich zur qualitativen Strukturidentifizierung ein sehr großes Interesse auf einer zuverlässigen quantitativen Analyse.

Poly(N-vinylamide) wie Poly(vinylpyrrolidon) (PVP, **Abb. 3-129**) sind in hohem Grade wasserlösliche synthetische Polymere mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 2,5 bis 1.200 kDa und breiten Molekulargewichtsverteilungen. Diese physikochemischen Parameter unterscheiden den Bereich ihrer Anwendung. Lösliches PVP in fast jedem Molekulargewicht wird durch radikalische Polymerisation von Vinylpyrrolidon in Wasser oder in Isopropanol erhalten²⁴¹.

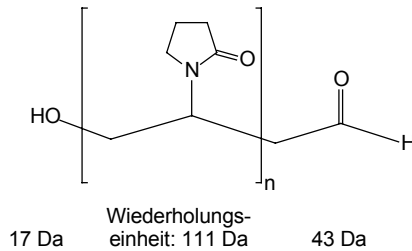


Abb. 3-129: Struktur von Poly(vinylpyrrolidon) (PVP).

Die nützlichste chemische Eigenschaft von PVP ist seine Wechselwirkung mit nieder- und hochmolekularen Verbindungen wie anorganischen Anionen, organische Verbindungen (z.B. Azofarbstoffe, Phenole), Aminosäuren, oberflächenaktive Substanzen, Polymere, Proteine und pharmakologische Wirkstoffe²⁴² in wässriger Lösung. Diese Eigenschaft ist besonders bedeutend bei der Entwicklung medizinischer Formulierungen. Die PVP-Verbindungen mit unterschiedlichen Molekulargewichten werden durch die K-Zahl wie PVP K12, K17, K25 und K30 unterschieden, die ihre Anwendbarkeit in der pharmazeutischen Industrie sowie in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie haben, um z.B. die Löslichkeit- und Transporteigenschaften in den Tabletten zu erhöhen.

Lösliches PVP wurde zuerst während des 2. Weltkrieges als Blutplasmaersatz verwendet. Da es nicht abgebaut wird, können nach intravenöser Verabreichung geringe Mengen höhermolekularer Bestandteile innerhalb des Körpers verbleiben. Folglich ist heute die Anwendung in diesem Bereich auf orale Verabreichungen beschränkt. Die zahlreichen Studien hinsichtlich der Ausscheidung und des Metabolismus von PVP nach intravenöser Verabreichung stellte eine Korrelation zwischen der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Ausscheidung der PVP-Makromoleküle durch die Nieren mit der molekularen Größe von PVP her^{243,244}.

Heute ist lösliches PVP (z.B. Kollidon, Polyvidon(e), Povidone, Plasdone) einer der vielseitigsten und am meisten verwendeten pharmazeutischen Hilfsstoffe. PVP wird auch in der Produktion von einem der wichtigsten aktuellen Desinfektionsmittel, PVP-Jod, verwendet. Ein anderer wichtiger Anwendungsbereich ist der Einsatz von homomerem und copolymerem PVP (10-60 kDa mit Polydispersitäten > 10) als Farbübertragungsinhibitor in der Formulierung von Waschmitteln^{245,246}. Um den Verbleib dieser umweltrelevanten Verbindung zu adressieren, sollen die durchzuführenden Untersuchungen die qualitative und quantitative Charakterisierung des Analyten und der möglichen Abbauprodukte umfassen. In vorangegangenen Arbeiten ist die primäre Abbaubarkeit einer Vielzahl chemisch unterschiedlicher Verunreinigungen, wie z.B. Schädlingsbekämpfungsmittel, Tenside und chelatisierenden Agenzien, auf einem in „Laboratory-Scale Fixed-Bed Bioreactor“ (FBBR) entweder in Verbindung mit Liquid Chromatography/Electrospray massenspektrometrischen (LC/ESI-MS) oder mit gaschromatographischen (GC)/MS Detektionsmethoden studiert worden und erweist sich dadurch als ein gutes Modellreaktorsystem für entsprechende Untersuchungen^{247,248,249,250,251}. Dabei wird der zu untersuchende Analyt in die wässrige Lösung der FBBR-Vorrichtung (**Abb. 3-130**) eingetragen und über mehrere Tage zirkulieren gelassen. Durch die natürlichen Mikroben kann der zu untersuchende Analyt metabolisiert werden. Durch kontinuierliche Probenahme kann die Abbaubarkeit des

Analyten mittels geeigneter MS-Methoden verfolgt und die Analyten gegebenenfalls charakterisiert werden. Keine dieser bislang angewendeten MS-Methoden ist jedoch für PVP geeignet, da schon jene kommerziell eingesetzten PVP-Proben mit dem niedrigsten Molekulargewicht bereits den anwendbaren Massenbereich kommerziell erhältlicher massenspektrometrischer Methoden übersteigen.

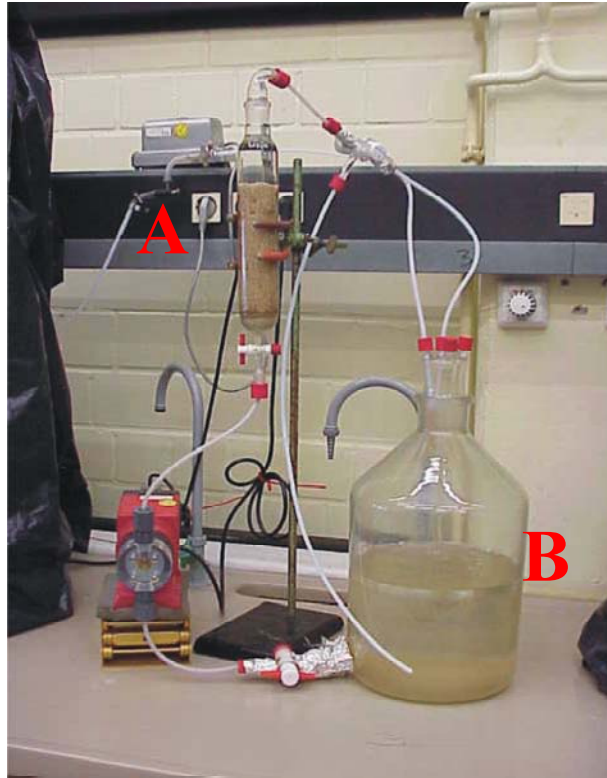


Abb. 3-130: Aufnahme eines „Laboratory-Scale Fixed-Bed Bioreactors“ (FBBR): **A** poröse Glaskugeln; **B** Vorratsbehälter für Flusswasser.

Literaturbeschriebene Charakterisierungsmethoden für PVP sind z.B. Infrarotspektroskopie für die qualitative Analyse, Photometrie des PVP-Jodkomplexes^{252,253} oder pyrolytische Gaschromatographie^{254,255} für die quantitative Analyse von PVP, während Lichtstreuung^{242,256}, Sedimentation²⁵⁷ und Gelpermeationschromatographie (GPC)²⁵⁸ allgemein angewendet werden, um Molekulargewichtsmittelwerte zu bestimmen. Da alle diese analytischen Ansätze nicht für die Detektion von PVP im niedrigen mg L^{-1} -Bereich und in einer komplexen Umweltmatrix wie Abwasser oder Abwasserschlämme anwendbar sind, wird die MALDI-TOF-MS als Extension einer Detektionsmethode für FBBR-Untersuchungen in Erwägung gezogen. Des Weiteren soll MALDI-TOF-MS als Methode zur Analyse von natürlichen Umweltproben eingesetzt werden.

Die qualitative MALDI-TOF-MS-Analyse ist für eine Vielzahl an Analyten innerhalb der letzten 10 Jahre auf sehr unterschiedlichen Gebieten der analytischen Chemie eingeführt worden, zeigte jedoch nur eine geringe Leistung hinsichtlich quantitativer Untersuchungen^{91,119,120,121}. So ist eine erfolgreiche Quantifizierung mittels MALDI-TOF-MS nur auf Sonderfälle beschränkt¹¹⁹. Um den

Verbleib von PVP während des biologischen Abbauversuches und durch Adsorptionsstudien am Schlamm festzustellen, soll folgender methodischer Ansatz verfolgt werden:

- Adaptation der FBBR-Methode für Nonylphenolpoly(ethoxylat) (NPEO) basierend auf MALDI-TOF-MS,
- Anwendung der herkömmlichen Probenpräparationsmethode der MALDI-TOF-MS für die Anwendbarkeit zur qualitativen Charakterisierung von PVP,
- Anwendung des Ankerprobenträgers (S. 284) als vielversprechende Vorrichtung für Semiquantifizierungsuntersuchungen von PVP und
- Durchführung von PSD-MALDI-TOF-MS-Untersuchungen für eine eindeutige Endgruppenanalyse von PVP.

3.4.5.2 Evaluierung der qualitativen und quantitativen MALDI-TOF-MS-Analytik für Studien des biologischen Abbauverhaltens

Da MALDI-TOF-MS nicht nur das erste mal auf die qualitative Charakterisierung von PVP selbst geprüft wird, sondern außerdem als eine Detektionsmethode für biologische Abbaustudien abwasserrelevanter polymerer Verbindungen mit breiten Polydispersitäten, sind im Folgenden einige unterschiedliche Untersuchungen erforderlich.

Zunächst soll eine Adaptation der FBBR-Methode durch Abbauversuche von Nonylphenolpoly(ethoxylat) (NPEO) auf die MALDI-Detektionsmethode erfolgen, welche in vorangegangenen FBBR-Abbauuntersuchungen in Kombination der LC/ESI-MS-Detektionsmethode zeigte, dass NPEO zu Nonylphenolcarboxylaten abgebaut werden. Diese Voruntersuchungen beinhalten zunächst die MALDI-TOF-MS-Charakterisierung von NPEO, welche die Detektion der Pseudo-Molekülonen in Abhängigkeit des zugesetzten Metalltrifluoracetates (Kapitel 2.1.3, S. 20) erlaubt und entsprechend die Wiederholungseinheiten von 44 Da wiedergibt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der intensivsten Signalintensitäten kann die bevorzugte Ionisation mit Kaliumkation festgestellt werden. Die FBBR-Abbauuntersuchungen, die mittels der MALDI-TOF-MS-Detektionsmethode verfolgt werden, zeigen, dass MALDI-TOF-MS die Detektion des Metaboliten sehr wohl ermöglicht. Im Gegensatz zu früheren LC/ESI-MS-Ergebnissen, werden diese Nonylphenolcarboxylate nicht bevorzugt als Anionen im negativen Detektionsmodus charakterisiert, sondern als K-Pseudo-Molekülonen. Damit wird gezeigt, dass sich MALDI-TOF-MS prinzipiell eignet, um FBBR-Abbauuntersuchungen zu verfolgen, da keine grundlegenden Suppressionseffekte gefunden werden.

Im Folgenden wird dann die MALDI-TOF-MS für die FBBR-Abbauuntersuchungen von PVP evaluiert. So wird die MALDI-TOF-MS zunächst für die Molekulargewichtsobergrenze zur Charakterisierung von PVP untersucht und dann auf seine Anwendbarkeit im niedrigen Konzentrationsbereich zur zuverlässigen Charakterisierung von PVP in Oberflächen- und Abwasser entsprechend seinem Empfindlichkeits-, Reproduzierbarkeits-, Homogenitäts- und Quantifizierungspotential überprüft. Bei einer ausreichenden Reproduzierbarkeit der MALDI-TOF-MS-Analyse kann der biologische Abbau und die damit verbundene Verminderung des PVP verfolgt werden. Der Abbau kann im Massenspektrum durch eine Deformation und Verschiebung der

Polymerverteilung zu niedermolekularen Oligomeren und/oder durch die Bildung einer neuen Verteilung, z.B. durch Oxidation einer terminalen Gruppe, sichtbar werden. Zunächst müssen jedoch erst experimentelle Voruntersuchungen durchgeführt werden, deren Hauptzweck es ist, die Evaluierung der Molekulargewichtsobergrenze für die Charakterisierung von PVP und von experimentellen Versuchsbedingungen zu erfassen, um den biologischen Abbau dieses Analyten und möglicher Abbauprodukte verfolgen zu können.

Obgleich qualitative MALDI-TOF-MS-Untersuchungen von PVP K17 (7-11 kDa) die Masse der Wiederholungseinheiten detektieren können (111 Da, **Abb. 3-129**), sind die Molekulargewichtsverteilungen stark zu niedermolekularen Oligomeren in einen Massenbereich von ca. 1.000 bis 5.000 Da verschoben (Daten nicht gezeigt). Die Unterdrückung höhermolekularer Bestandteile, die in einer überbetonten Detektion niedermolekularer Polymere resultieren, rührt her vom entscheidenden Punkt hoher Polydispersitäten von $D > 3$, welches bekanntermaßen generell die Molekulargewichtsverteilung in der MALDI-TOF-MS-Analyse verfälschen kann^{106,107}. So müssen Proben mit hohen Polydispersitätswerten vor der MALDI-TOF-MS-Analyse GPC-fractioniert werden, um die Polydispersitäten der Probe durch enge Fraktionsschnitte zu schmälern. GPC-Fraktionierung von PVP K17 macht somit erst die genaue massenspektrometrische Charakterisierung möglich. Die MALDI-TOF-MS ermittelten Molekulargewichte der Fraktionen reichen von < 1.000 Da bis zu ungefähr 17.000 Da (**Abb. 3-131**).

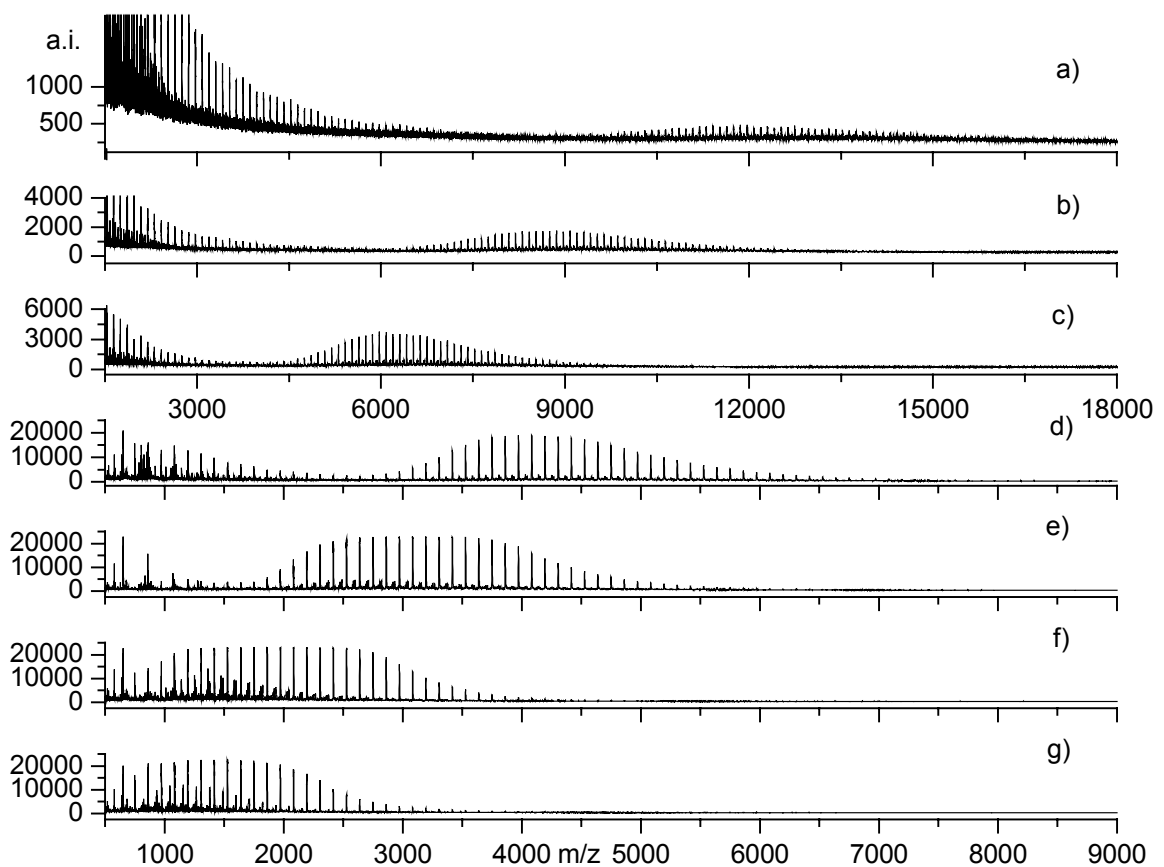


Abb. 3-131: MALDI-TOF-Massenspektren von PVP K17 nach GPC-Fraktionierung: a) Fraktion 1; b) Fraktion 2; c) Fraktion 3; d) Fraktion 4; e) Fraktion 5; f) Fraktion 6; g) Fraktion 7.

In jeder PVP-Probe werden niedermolekulare Oligomere der GPC-fraktionierten PVP-Proben (z.B. **Abb. 3-131**) mittels MALDI-TOF-MS in einem solch hohen Umfang detektiert, dass schließlich, insbesondere mit Zunahme der Molekulargewichte der untersuchten Proben, die Detektion des hochmolekularen Anteils der Fraktionen durch niedermolekulare Oligomere verhindert ist. So erlaubt dieser kombinierte analytische Ansatz bei der Analyse von PVP K25 (28.000-34.000 Da) eine Molekulargewichtsverteilung der individuellen GPC-Fraktionen nur bis zu 15.000 Da zu ermitteln. Dieser zu niedrige Molekulargewichtsbereich wird Suppressionseffekten aufgrund niedermolekularer Anteile zugeschrieben.

Der methodische Ansatz erlaubt außerdem die erfolgreiche Charakterisierung von PVP 14.000 Da (D 10,87), aber nur in begrenztem Maße die Analyse von PVP 22.100 Da (D 7,37), von K25 und von K30 (Daten nicht gezeigt). Um Fehler auszuschließen, wird eine erneute GPC-Fraktionierung der Hauptfraktion von PVP K17 durchgeführt. Aus der Gesamtheit (**Abb. 3-132**) der erhaltenen GPC-Fraktionseluogramme der Hauptfraktion der ersten GPC-Fraktionierung geht hervor, dass die erste und zweite GPC-Fraktionierung erfolgreich verlaufen ist. Ein prinzipieller Fehler in der praktischen Durchführung der GPC-Trennung kann damit ausgeschlossen werden. Dennoch muss aufgrund der erhaltenen MALDI-TOF-MS-Ergebnisse hinsichtlich hoher niedermolekularer Anteile eine ausreichende GPC-Trennung angezweifelt werden. Eine mögliche Ursache ist die ausgesprochen hohe Polydispersität der Probe. Aus diesem Grund scheint die Kombination der GPC-Fraktionierung und der MALDI-TOF-MS-Methode Beschränkungen für die Analyse von höhermolekularen PVP-Bestandteilen (> 20.000 Da) zu haben. Diese Methodenkombination ist daher für einen FBBR-Abbau von PVP und für Quantifizierungsansätze ungeeignet.

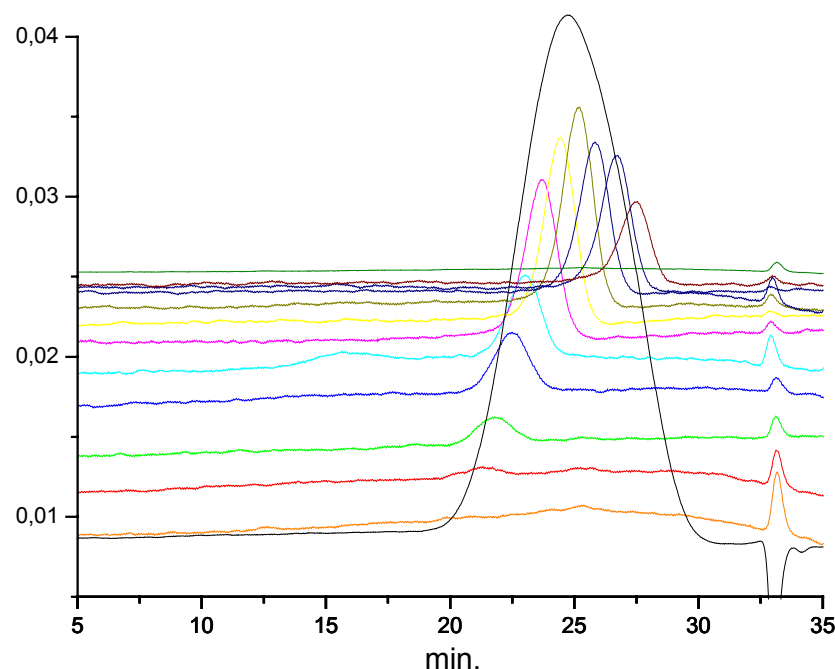


Abb. 3-132: Erneute Fraktionierung der GPC-Hauptfraktion PVP K17: Eluogramm der Hauptfraktion (schwarz); Eluogramme der Fraktionen der Re-Chromatographie (bunt).

Folglich wird eine niedermolekulare PVP-Probe mit 2.500 Da für die FBBR-Abbauuntersuchungen ausgewählt. Dieser Massenbereich des Analyten erscheint insofern auch günstig zu sein, da dieser eine genügende Spanne zeigt, um einen Abbau des Analyten ohne Einbußen in der Qualität der Massenspektren aufgrund störender Untergrundeffekte bzw. Matrixadduktbildungen, die generell im Massenbereich unter tausend Dalton beobachtet werden, zu ermöglichen. Der zusätzliche Vorteil dieses Massenbereiches ist die erreichbare Isotopenauflösung und folglich eine erhöhte Genauigkeit und Interpretationssicherheit aufgrund zusätzlicher Informationen.

Da PVP nur in Wasser in höheren Konzentration löslich ist²⁵⁹, ist die Wahl der MALDI-Matrices auf wasserkompatible Matrices wie 3 β -Indolyl Acrylsäure (IAA), α -Cyanohydroxymizsäure (HCCA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) begrenzt. Von diesen ergibt nur IAA eine ausreichende Probenhomogenität, während die anderen stärkere Probeninhomogenitäten und eine geringe Qualität in den Massenspektren (Daten nicht gezeigt) zeigen.

Die Ionisation polymerer Analyten ist im allgemeinen abhängig vom gezielten Zusatz eines Metalltrifluoracetates (Kapitel 1.1.3.2, S. 7), um eine erfolgreiche Detektion und Interpretation in der Massenspektrometrie zuzulassen. Die stabile Bildung von Pseudo-Molekülonen wird durch unterschiedliche Effekte wie Polymerlänge, Kationengröße, Struktur des Analyten (z.B. Heteroatome, aromatische Ringe, Endgruppen) bestimmt^{189,260}. Wenn kein Metalltrifluoracetat gezielt hinzugefügt wird, wird eine Überlagerung unterschiedlicher Pseudo-Molekülonen ermittelt, wodurch die erhaltenen Massenspektren nur schwer interpretierbar sind. Die MALDI-TOF-Massenspektren von PVP zeigen eine Qualitätszunahme mit jedem eingesetzten Metalltrifluoracetat (**Abb. 3-133**) und weisen aufgrund der intensivsten Signale die stabilste Pseudo-Molekülonenbildung mit dem Natriumkation nach (**Abb. 3-133a**). Die Massenspektren des Li-Pseudo-Molekülonen (**Abb. 3-133c**) zeigen eine Überbetonung der niedermolekularen Oligomere. Hinsichtlich der Signalintensität und -qualität in den Massenspektren wird damit folgende Reihe der Effektivität von Kationisierungsmetallsalzen (**Abb. 3-133**) für PVP gefunden:

Natrium- > Lithium- > Kalium- > Silberkation > ohne Metalltrifluoracetatzugabe.

Mit den damit einhergehenden Verschiebungen der Signallagen können durch die gezielte Metalltrifluoracetatzugabe analog Kapitel 2.1.3, S. 20 die Massen der beiden unbekanntenen Endgruppen errechnet werden, die zusammen 60 Da ergeben. Diese Masse entspricht formal der Summenformel C₂H₄O₂. Dieser Strukturvorschlag steht im Einklang mit dem Syntheseweg der freien radikalischen Polymerisation von Vinylpyrrolidon in Wasser unter Verwendung von Wasserstoffperoxid als Initiator, welcher zu einer Hydroxyl- (HO-, 17 Da) und einer Aldehydendgruppenfunktion (-CH₂CHO, 43 Da; **Abb. 3-129**) führt. Die Ergebnisse der Bestimmung der Endgruppen können auch zusätzlich mit PSD-MALDI-TOF-Fragmentuntersuchungen eines Li-Pseudo-Molekülonen gegen eine Standardprobe von PVP K12 mit bekannten Endgruppen^{241,242} verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

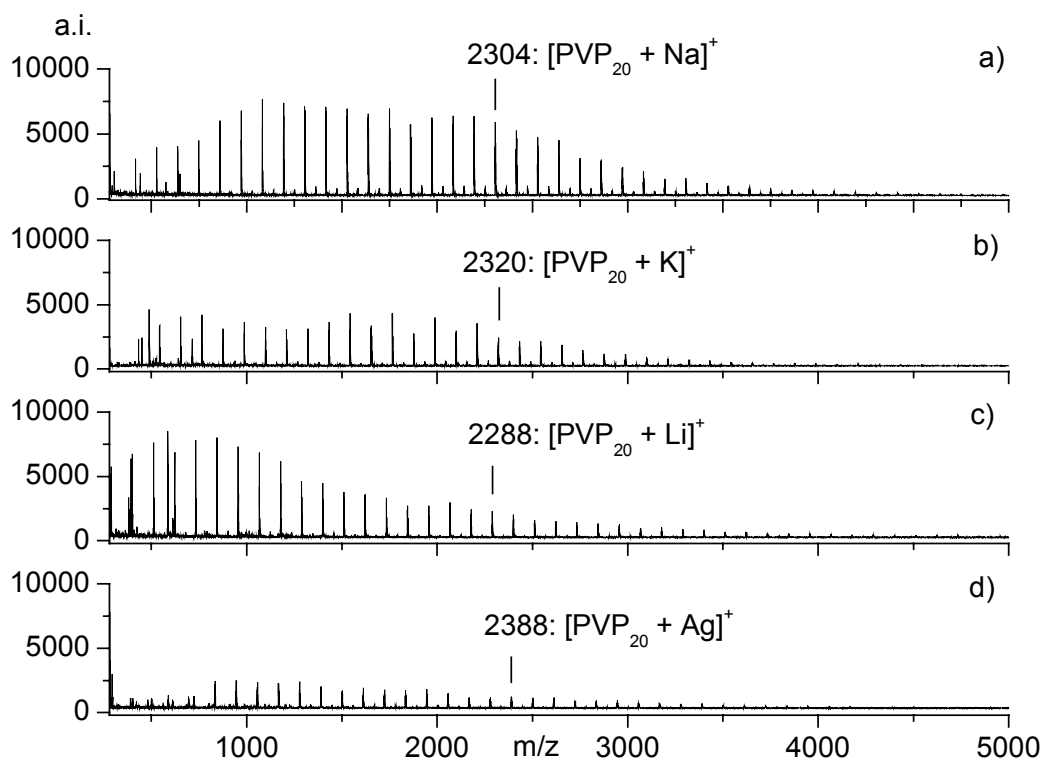


Abb. 3-133: MALDI-TOF-Massenspektren von PVP 2.500 Da in Abhängigkeit der Ionisation induziert durch variierende Metalltrifluoacetatzugabe: a) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Na}$; b) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{K}$; c) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Li}$; d) $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Ag}$.

Der Einfluss der relativen Laserleistung zeigt sich als ein sehr empfindlicher Parameter, der die Auflösung und die Signalintensität beeinflusst. Das letzte sogar zugunsten stark konkurrierender Signale (**Abb. 3-134**). Das Massenspektrum, bei dem niedrige Laserleistung verwendet wird (**Abb. 3-134a**: von 70), zeigt die intensivste Signallerie mit einer Wiederholungseinheit von 111 Da (=Vinylpyrrolidon). Dieses Signal erscheint bei -38 Da bezogen zur Hauptsignallerie (**Abb. 3-134b, c**), welche der evaluierten Struktur entspricht (**Abb. 3-129**), kann nicht durch andere mögliche Endgruppen erklärt werden oder einer Pseudo-Molekülionenbildung mit irgendeinem gängigen Metallkation zugeordnet werden. Folglich kann diese uns unbekannt PVP-Struktur nicht irgendeiner Metall-Pseudo-Molekülionenbildung zugewiesen werden, resultiert aber am wahrscheinlichsten von einem PVP mit unbekannter Endgruppenfunktionalität. Bei Zunahme der Laserleistung verringert sich die Signalintensität des PVPs mit unbekannter Endgruppenfunktionalität (**Abb. 3-134b**: mittlere relative Laserleistungen von 35; **Abb. 3-134c**: hohe relative Laserleistung von 40) während die Signalintensität für das Na-Pseudo-Molekülion mit der bekannten Endgruppenfunktionalität steigt. Dieser Effekt ist so stark, dass sich die Verhältnisse der Signalintensitäten der intensivsten Signale umgekehrt proportional verhalten (**Abb. 3-134**). Bei Laserleistungen erfährt die Basislinie eine Verschiebung. Folglich wird für weitere Untersuchungen von PVP die relative Laserleistung auf einer mittleren Stufe von 35 gehalten.

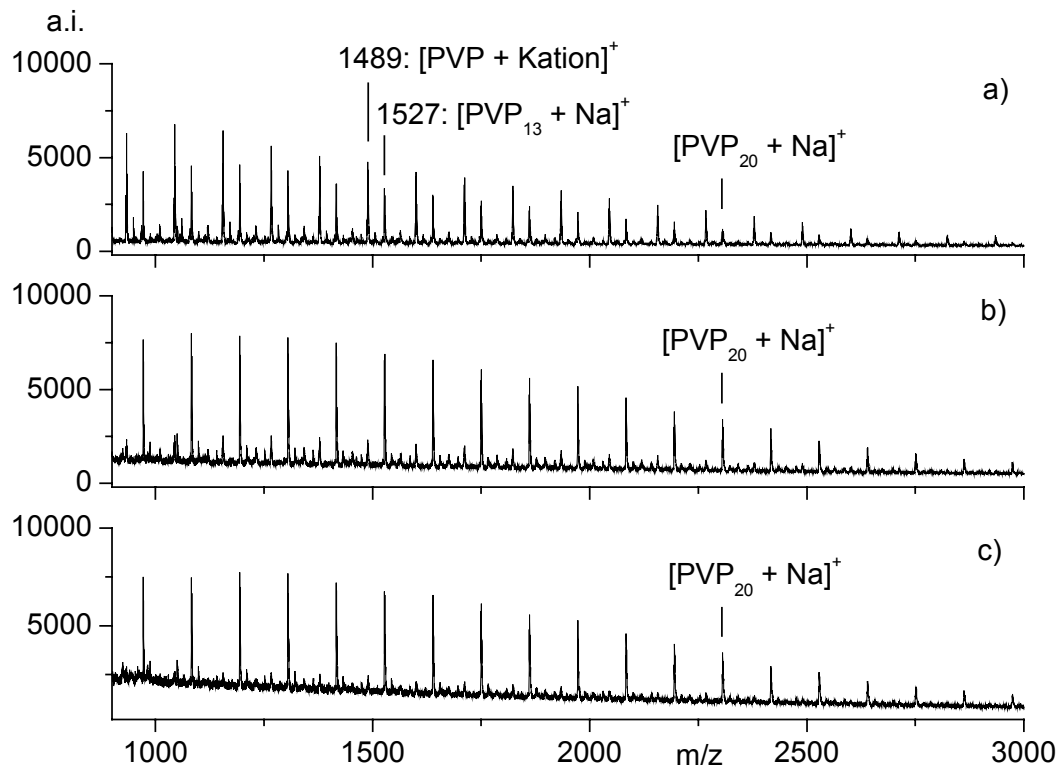


Abb. 3-134: MALDI-TOF-Massenspektren von PVP 2.500 Da in Abhängigkeit der relativen Laserleistung: a) 30; b) 35; c) 40.

PVP, das zu entmineralisiertem Wasser (Daten nicht gezeigt) und zu Wasser des Flusses Rheins (**Abb. 3-135**) in Konzentrationen von 1.000, 100 und 10 mg L⁻¹ zu dosiert wurde, bestätigt die Unabhängigkeit der Resultate von dem gewählten wässrigen Matrixmedium. Die MALDI-TOF-MS ist somit eine sehr robuste und schnelle Methode, die zeitraubende Reinigungs- und/oder Entsalzungsprozesse für die direkte Analyse von PVP in natürlichen Wasserproben entbehrlich macht. Folglich zeigt sich MALDI-TOF-MS als eine leistungsfähige Methode für direkte Charakterisierung eines Analyten sogar in einem Molekulargewichtsbereich, in der andere Methoden vollständig versagen. Der größte Nachteil der Methode ist die Nichtlinearität zwischen Signalintensität und der Konzentration von PVP im MALDI-TOF-Massenspektrum. Weder in der angewendeten Konzentrationsserie mit entmineralisiertem Wasser noch mit Flusswasser wird eine Abnahme der Signalintensität in den Massenspektren erhalten, die mit der vorgegebenen Analytkonzentration korreliert (**Abb. 3-135a-c**). Die Konzentration von 1 mg L⁻¹ gibt irreproduzierbare MALDI-TOF-Massenspektren mit geringer Qualität und sehr niedrigen Signalintensitäten (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wird eine Konzentration von 10 mg L⁻¹ PVP im Flusswasser als Anfangswert festgesetzt, um die biologischen Abbauntersuchungen zu verfolgen. Niedrigere Konzentrationen zeigen eine erhöhte Genauigkeit hinsichtlich der Quantifizierung, obgleich der Untergrund und die Matrixadduktbildung eine stärkere Auswirkung auf das Massenspektrum haben. Zusätzlich ist es wichtig zu beachten, dass sich die Abnahme der Konzentration von PVP im MALDI-TOF-

Massenspektrum durch eine Abnahme der Signalintensität widerspiegelt (**Abb. 3-135a-c**) und dass dabei besonders die Detektion der höhermolekularen Oligomere verhindert wird. Damit wird durch die Verringerung der Konzentrationen vor allem eine Verschiebung der Molekulargewichtsverteilung (**Abb. 3-135b, c**) zu kleineren Massen beobachtet. Dieses Ergebnis beeinträchtigt nachdrücklich eine direkte Interpretation der Molekulargewichtsverteilung beim Verfolgen des biologischen Abbaus. Infolgedessen zeigt nur eine starke Deformation und Abnahme des mittleren Molekulargewichtes des Polymers oder die Bildung einer bimodalen Verteilung eindeutig einen biologischen Abbau von PVP an.

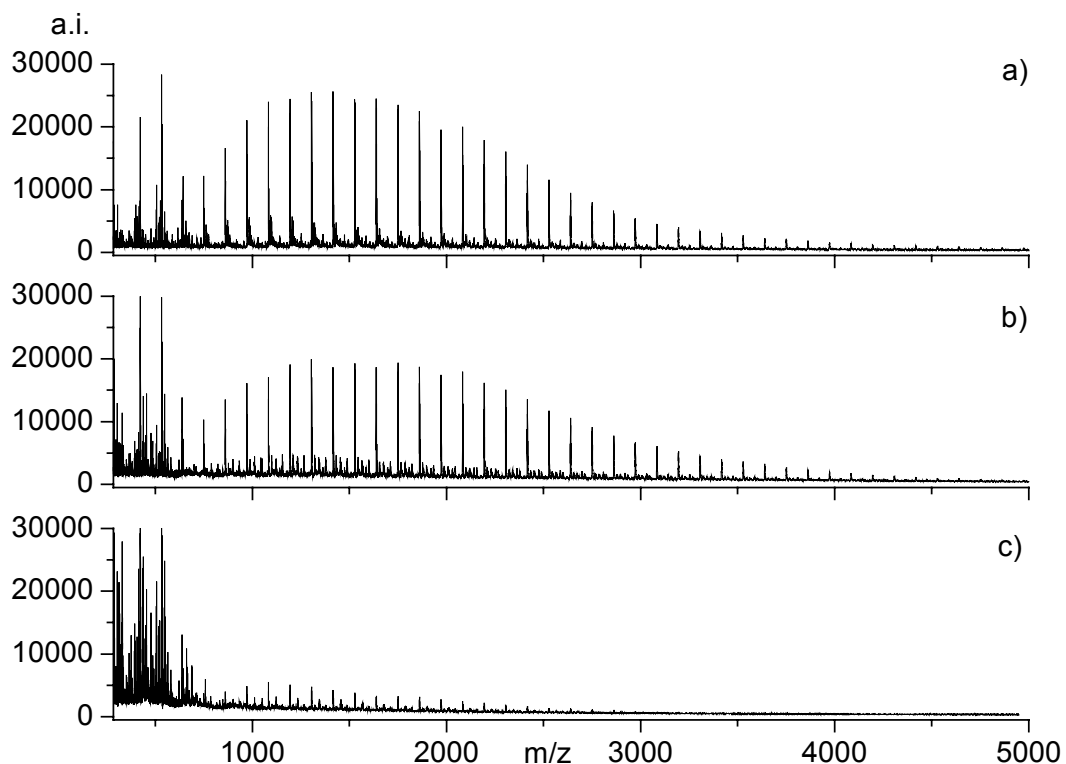


Abb. 3-135: MALDI-TOF-Massenspektren von PVP 2.500 Da in Abhängigkeit der Konzentration: a) 1.000 mg L⁻¹; b) 100 mg L⁻¹; c) 10 mg L⁻¹.

Die Reproduzierbarkeit der MALDI-TOF-Messung wird durch eine Versuchsreihe an zweimal 10 analogen MALDI-TOF-MS-Probenpräparationen von PVP (10 mg L⁻¹) überprüft. Eine hohe „shot-to-shot“-Reproduzierbarkeit wird auf jedem „Spot“ gefunden, während sich die Probe-zu-Probe-Reproduzierbarkeit von einem zum anderen „Spot“ nur begrenzt zeigt (Daten nicht gezeigt). Die Reproduzierbarkeit scheint sogar unabhängig vom wässrigen Matrixmedium zu sein, da entmineralisiertes Wasser und Flusswasser ähnliche Resultate ergeben. Die Gesamtheit der Reproduzierbarkeit der PVP-Analyse, die erzielt wird, ist ausreichend für FBBR-Abbauversuche, jedoch nicht um genaue Quantifizierungsuntersuchungen durchführen zu können.

Einige Gründe erklären die Insuffizienz einer generellen, quantitativen MALDI-TOF-MS-Analyse. Bei MALDI-TOF-MS besteht zwischen der Signalintensität im Massenspektrum weder eine

quantitative Wechselbeziehung zur Menge der desorbierten/ionisierten Probe noch zur relativen Laserleistung. Zusätzlich gibt es keine zuverlässigen Informationen zur Größe und zur Stärke der Schichtdicke der kristallisierten Analyt-Matrix-MALDI-Probenmischung. So können in der Massenspektrometrie Signalintensitäten im MALDI-TOF-MS viel stärker als bei lösungsmittelbasierenden Methoden wie LC/ESI-MS variieren. Trotz all dieser Vorbehalte ist MALDI-TOF-MS die vielversprechendste analytische Methode, um eine qualitative und semiquantitative Analyse von PVP durchzuführen.

Auf die Eignung der angewendeten Methode zur Verfolgung der Verringerung der Konzentrationen während des biologische Abbauexperimentes unter Konzentrationen von 1 mg L^{-1} und schließlich der Möglichkeit, reale Proben zu analysieren, wurde die Festphasenextraktion (SPE) und Lyophilisation zur Anreicherung von PVP in Oberflächenwasser untersucht. **Abb. 3-136a** zeigt das Massenspektrum von PVP, das zum Flusswasser zu dosiert ist. Dabei fällt auf, dass das Massenspektrum nach SPE-Anreicherung (**Abb. 3-136c**) eine Überrepräsentation der niedermolekularen Oligomere und eine Anreicherung der PVP-Oligomere mit unbekannten Endgruppen in größerem Umfang zeigt (**Abb. 3-134**), während die Lyophilisation des zu Flusswasser zu dosierten PVPs (**Abb. 3-136b**) reproduzierbare Ergebnisse liefert bei denen die Molekulargewichtsverteilung am wenigsten beeinflusst wird.

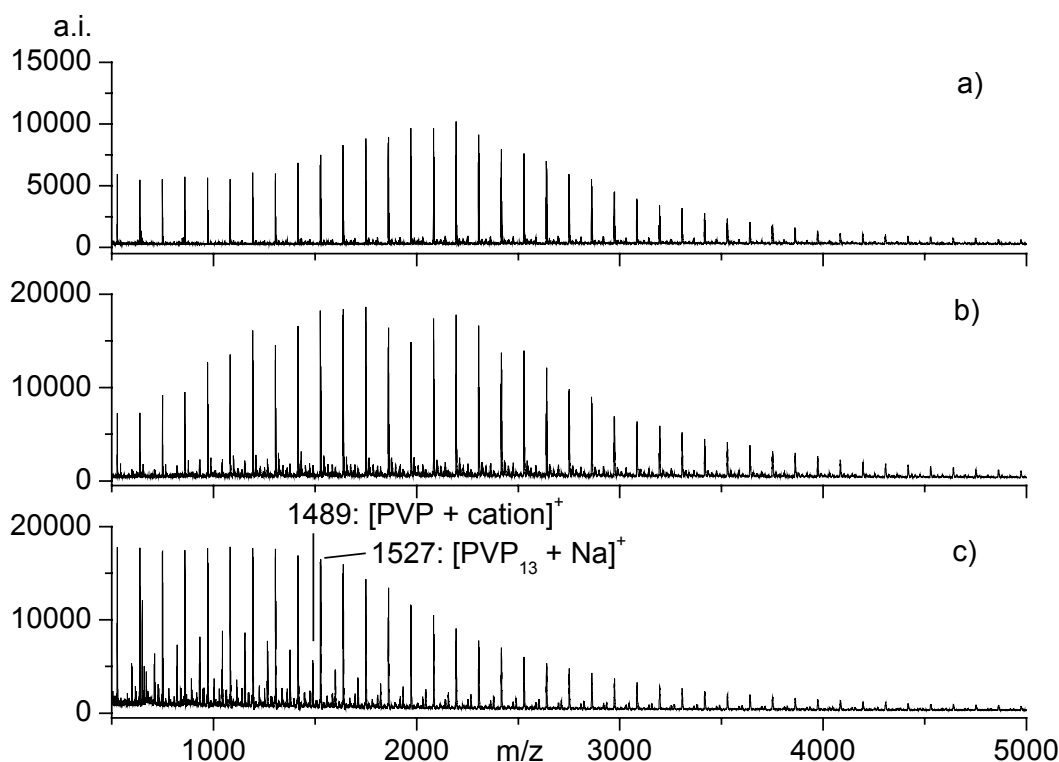


Abb. 3-136: MALDI-TOF-Massenspektren von PVP 2.500 Da (100 mg L^{-1}) in Abhängigkeit der Anreicherungsmethode: a) PVP zu Flusswasser zu dosiert; b) Lyophilisierung von PVP zu dosiert zu Flusswasser (10 mg L^{-1}); c) Festphasenextraktion (SPE) von PVP zu dosiert zu Flusswasser (10 mg L^{-1}).

3.4.5.3 Untersuchungen zum Abbauverhalten und zum Verbleib von PVP

Beim Abbauersuch (Kapitel 6.1.2.21, S. 273)^{XXIX} von PVP über eine Zeitdauer von 30 Tagen, welches in einer Konzentration von 10 mg L^{-1} auf das FBBR zu dosiert wird, wird weder ein Einbruch in der Polymerverteilung, welcher gängigerweise bei einem biologischen Abbau nach einer bestimmten Zeit der Einwirkung stattfindet, beobachtet, noch eine ansteigende Verteilung eines möglichen Abbauproduktes (**Abb. 3-137**). Eine biologische Nichtabbaubarkeit von PVP wird damit zunächst angedeutet.

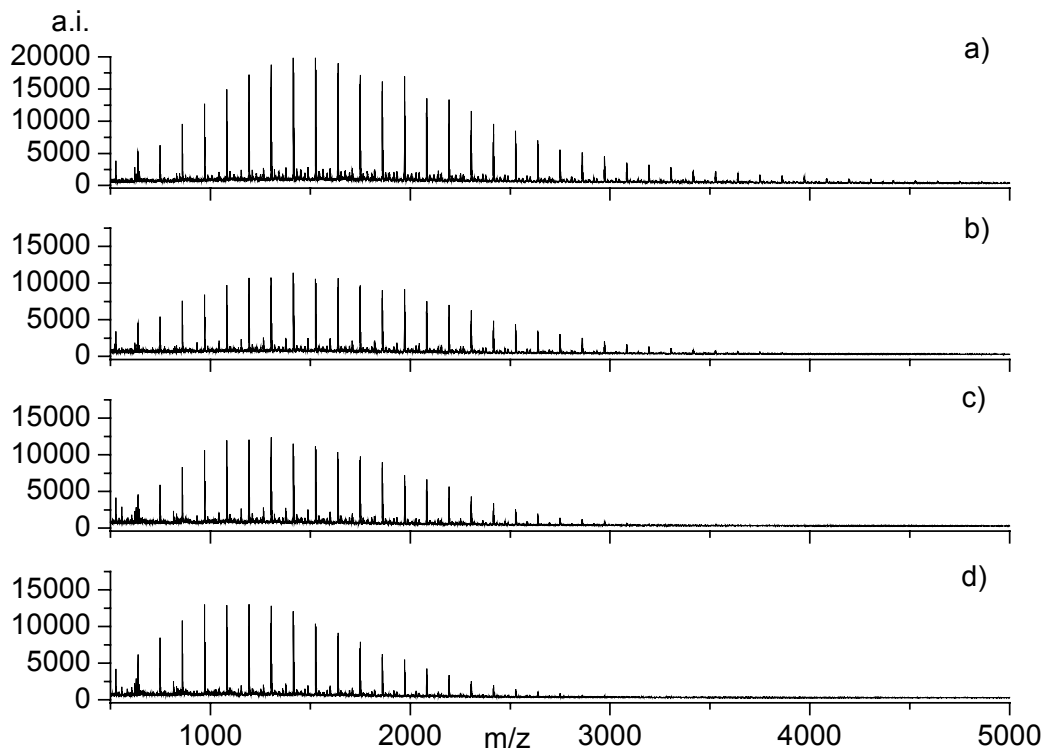


Abb. 3-137: MALDI-TOF-Massenspektren des FBBR-Abbauperlaufs von PVP 2.500 Da: a) 0 h; b) 5 h; c) 8 d; d) 16 d.

Die gefundene, langsame Verminderung der höhermolekularen Oligomere während des FBBR-Experimentes (**Abb. 3-137a-d**) kann durch eine Abnahme der Konzentration erklärt werden, die eine Abnahme an der Signalintensität höhermolekularer Anteile nach sich zieht. Dieser langsame Prozess der Konzentrationsverminderung deutet sehr wahrscheinlich nicht einen biologischen Abbau an, da die Signalintensität der niedermolekularen Oligomere der Polymerverteilung nach einem Tag (Daten nicht gezeigt) während der kompletten Versuchsdauer ungefähr gleich sind (**Abb. 3-137c, d**) und nur Schwankungen im Fehlerbereich der Reproduzierbarkeit zeigen. Diese langsame wenig signifikante

^{XXIX} Die biologischen Abbaureaktionen wurden von Herrn *Dr. Peter Eichhorn* im Rahmen seiner Promotion unter Anleitung von Herrn *Dr. Th. P. Knepper* im AK *Prof. Dr. R.-D. Wilken*, ESWE-Institut Wiesbaden/ Universität Mainz, durchgeführt.

Änderung kann eher einem Adsorptionsphänomen der höhermolekularen Oligomeren von PVP zu geschrieben werden.

Die FBBR-Abbauergebnisse werden durch MALDI-TOF-MS-Wiederholungsmessungen des kompletten biologischen Abbauxperimentes verifiziert. Die gleiche Tendenz der Molekulargewichtsverschiebung wird erneut beobachtet, so dass eine Fehlinterpretation aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit der MALDI-TOF-MS ausgeschlossen werden kann. Das FBBR-Experiment zeigt eine langsame, insignifikante Konzentrationsabnahme an.

Eine Überprüfung der Nichtabbaubarkeit von PVP durch mikrobiellen Abbau bei starker Adsorptionstendenz soll durch ein zusätzliches Experiment erreicht werden, bei dem das Verhalten von PVP in Gegenwart von Schlammsuspensionen mittels MALDI-TOF-MS überwacht und verfolgt wird. Hierfür wird getrockneter Abwasserschlamms mit einer wässrigen PVP-Lösung von 100 mg L^{-1} in einem Massenverhältnis von 500/1 versetzt und intensiv geschüttelt.

Die PVP-Probe wird unter dem Aspekt ausgewählt, dass sie möglichst höhermolekular ist mit einem möglichst geringen Anteil an niedermolekularen Oligomeren. Folglich wird die GPC-Hauptfraktion von K17 genommen, welche eine Molekulargewichtsverteilung mit guten Signalintensitäten (Verwendung von Natriumtrifluoracetat) von ungefähr 5.000 bis 8.000 Da im MALDI-TOF-Massenspektrum (vergleichbar mit **Abb. 3-131c**) aufweist. Die Adsorption von PVP an Abwasserschlamms wird verifiziert, indem Aliquote des wässrigen Überstandes analysiert werden, um die Abnahme des PVP in der Mutterlage in Abhängigkeit der Inkubationszeit zu ermitteln.

Die Empfindlichkeit der herkömmlichen MALDI-TOF-MS ist nicht ausreichend, um die Abnahme von PVP bereits nach einer kurzen Inkubationszeit mit Abwasserschlamms zu ermitteln (1 h; Daten nicht gezeigt). Solch ein bedeutender Prozess erfordert eine hohe Empfindlichkeit des Detektionsschrittes. Diese wird durch MALDI-TOF-MS-Untersuchungen mit dem sogenannten Ankerprobenträger verwirklicht. Dieser Probenträger wurde dahingehend für die Proteinanalytik entwickelt, um eine zuverlässige Charakterisierung bei sehr niedrigen Konzentrationen zu ermöglichen. Die unterschiedliche Beschichtung des Probenträgers sorgt beim Verdampfen des Lösungsmittels dafür, dass die Probenmischung sehr punktgenau und mit wesentlich geringerem Flächendurchmesser auskristallisiert. Dadurch kommt es formal zu einer Aufkonzentration. In **Abb. 3-138** sind die Ergebnisse für PVP 2.500 Da gegenübergestellt (**Abb. 3-138a**: konventioneller Probenträger; **Abb. 3-138b**: Ankerprobenträger). Dabei wird deutlich, dass die Homogenität ebenfalls verbessert wird. Die Ermittlung der optimalen Konzentration für den MALDI-Ankerprobenträger weist verglichen mit dem herkömmlichen MALDI-Probenträger eine zehnfache Zunahme der Empfindlichkeit nach.

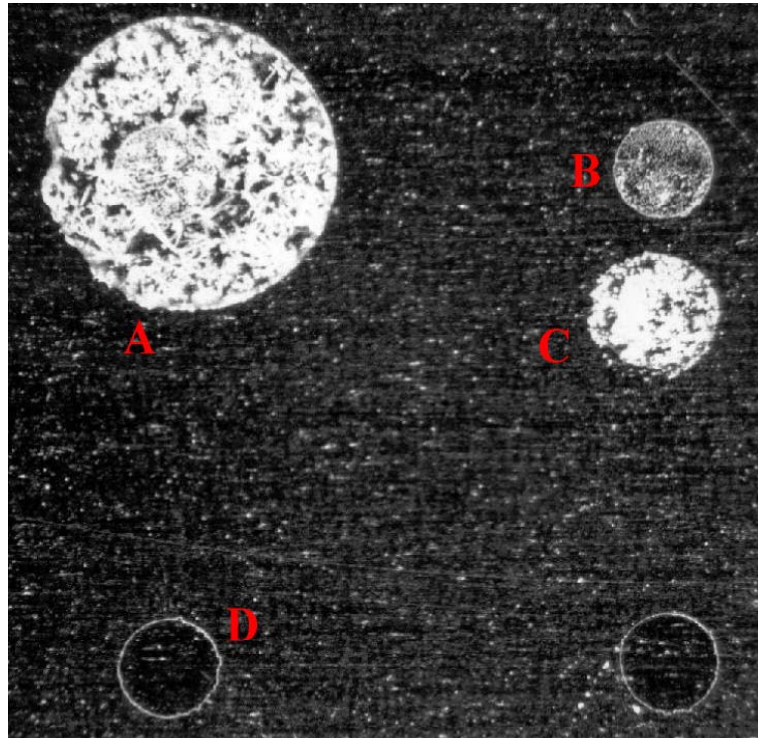


Abb. 3-138: Vergleich unterschiedlicher Kristallisationen: a) nicht optimierte Probenpräparation und Auftragung; b) optimierte Probenpräparation und Auftragung auf Anker-, „Spot“; c) optimierte Probenpräparation und Auftragung neben Anker-, „Spot“; d) reiner Anker-, „Spot“ (Durchmesser 600 μm).

Die MALDI-TOF-MS-Messung mit dem Ankerprobenträger des Adsorptionsexperimentes (**Abb. 3-139i**) kann in der Tat PVP (Massenbereich zwei bis vier Dalton) in der wässrigen Mutterlauge nach einer Inkubationszeit von 1 h ermitteln, versagt jedoch nach 2,5 h. Somit zeigen diese MALDI-TOF-MS-Messungen, dass die Adsorption von PVP an Abwasserschlämme ein sehr schneller Prozess ist und dass die PVP-Konzentration in der Mutterlauge unter 10 mg L^{-1} nach 1 h und unter 1 mg L^{-1} nach 2,5 h liegt. Zusätzlich wird nachgewiesen, dass der Adsorptionsprozess dieser PVP-Probe ein vom Analyt größenabhängiger Prozess ist, da nur die niedermolekularen Oligomere nach 1 h (**Abb. 3-139a**) nachweisbar sind, während die höhermolekularen Bestandteile der GPC-Fraktion vollständig verschwunden sind. Dieses Erkenntnis steht in Übereinstimmung mit dem FBBR-Experiment selbst, bei dem ebenfalls die höhermolekularen Bestandteile mit zunehmender Abbauezeit nicht mehr detektiert werden konnten (**Abb. 3-137**).

Das parallel geführte Kontrollexperiment (**Abb. 3-139ii**), bei dem PVP mit Wasser jedoch ohne Schlamm aufgelöst wurde, zeigt keine Abnahme an der PVP-Konzentration in der Mutterlauge. Dies ist exemplarisch in **Abb. 3-139ii** für die MALDI-TOF-Massenspektren (**Abb. 3-139a**: 1 h; **Abb. 3-139b**: 32 h) unter Verwendung des Ankerprobenträgers dargestellt. Die Ergebnisse der Adsorption zusammen mit dem Kontrollexperiment bestätigen eindeutig, dass das PVP schnell und in einem sehr hohen Maße am Schlamm adsorbiert wird.

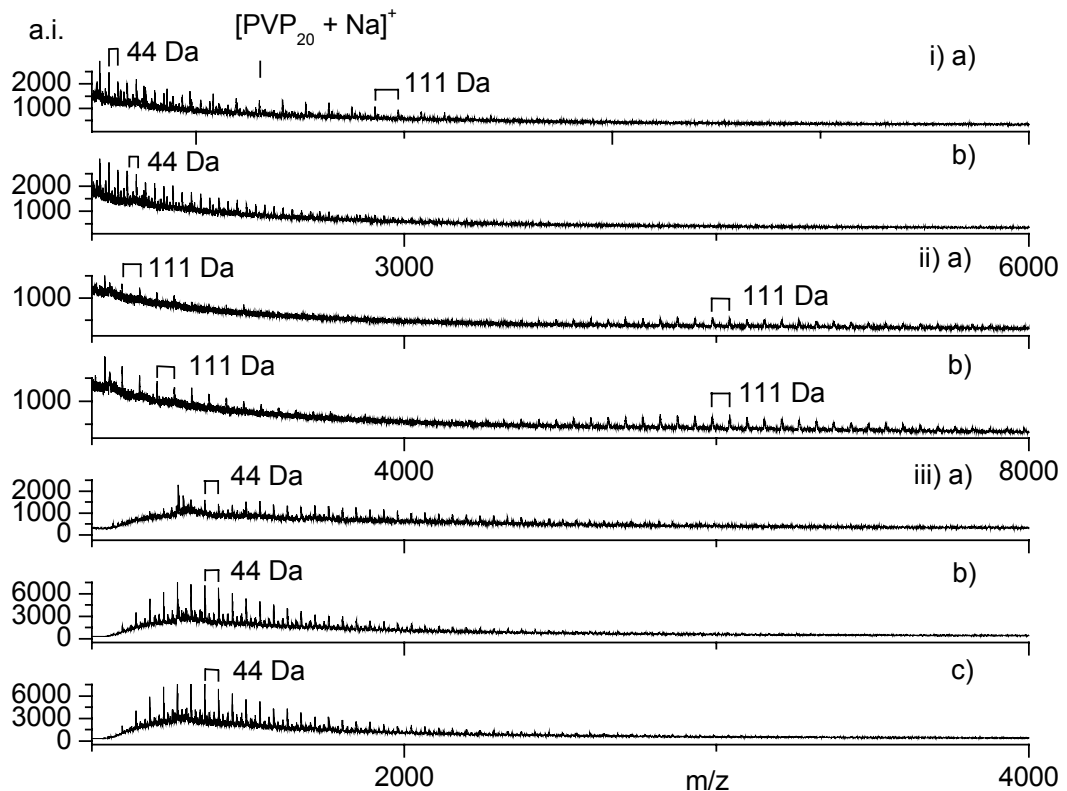


Abb. 3-139: MALDI-TOF-Massenspektren des Adsorptionsexperimentes der GPC-Fraktion von PVP K17 (5-8 kDa): i) PVP-Fraktion zu dosiert zu Schlamm/MilliQ-Wasser: a) 1 h; b) 2,5 h; ii) Kontrollexperiment PVP-Fraktion zu dosiert zu MilliQ-Wasser: a) 2,5 h; b) 32 h; iii) Kontrollexperiment Schlamm/MilliQ-Wasser: a) 1 h; b) 2,5 h; c) 32 h.

In jeder MALDI-TOF-MS-Messung der Mutterlauge des eigentlichen PVP-Adsorptionsexperimentes gab es eine zusätzliche Polymerverteilung, die mit einer Wiederholungseinheit von 44 Da auftritt, und damit Poly(ethylenglykol) (PEG) zugeschrieben werden kann. Die Überprüfung wird einfach durch das Kontrollexperiment erreicht (**Abb. 3-139iii**), bei dem die Schlammprobe mit Wasser jedoch ohne PVP aufgenommen und intensiv geschüttelt wird. Dabei ergibt sich eine sichtbare Zunahme in Abhängigkeit der Zeit in der Art, dass die Signalintensität des PEGs zwischen 1 h (**Abb. 3-139iii,a**) und 2,5 h (**Abb. 3-139iii,b**) stark ansteigt und danach konstant bleibt (**Abb. 3-139iii,c**: 32 h). Diese hohe Konstanz ist durch identische Signalintensitäten in den MALDI-TOF-Massenspektren unter Verwendung des Ankerprobenträgers gekennzeichnet und hebt dabei die hohe Reproduzierbarkeit dieser neuen Probenträger hervor. Dieses Kontrollexperiment zeigt damit, dass die zusätzliche Polymerverteilung in der Tat von PEG resultiert, der schon im verwendeten Abwasserschlämme zugegen war und sich während des Adsorptionsexperimentes von PVP ablöste. PEG fällt als Metabolit beim biologischen Abbau von polyethoxylierten Tensiden wie z.B. Alkoholethoxylaten an²⁶¹.

Um weitere Erkenntnisse hinsichtlich der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS (Kapitel 3.1.2, S. 30) zu gewinnen, wurde diese auf ihr Potential zur direkten Charakterisierung von umweltrelevanten Substanzen aus festen Umweltproben getestet. Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS des getrockneten Abwasserschlammes konnte bei keinem der gewählten Bedingungen (Matrices: IAA, Dithranol, TCNQ) den PEG-Analyten analysieren (Daten nicht gezeigt). Zusätzliche Experimente zeigen, dass beim Auflösen des Schlammes und anschließender konventioneller lösungsmittelbasierender MALDI-TOF-MS ausschließlich die zentrifugierte Lösung der gelösten Schlammprobe, nicht jedoch die Lösung der unzentrifugierten Schlammprobe den PEG-Analyten eindeutig charakterisiert (Daten nicht gezeigt). Dies kann damit erklärt werden, dass auch PEG eine so hohe Adsorptionstendenz zu Schlammpartikeln hat, dass die starken Wechselwirkungen bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation nicht aufgebrochen werden. Gleichmaßen kann für die unzentrifugierte Lösung angenommen werden, dass bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation die starken Adsorptionseffekte beim Kristallisationsschritt auf dem Probenträger sofort wieder eingegangen werden, sofern der Schlamm noch zugegen ist. Dabei kann angenommen werden, dass dies eine generelle Tendenz von umweltrelevanten Analyten und festen Proben bei der MALDI-TOF-MS-Analyse ist.

3.4.5.4 Evaluierung des analytischen Ansatzes

Die herausragenden Vorteile von MALDI-TOF-MS werden in der Robustheit bei eindeutiger Charakterisierung von PVP gefunden, welches zu einer Umweltmatrix wie Flusswasser zu dosiert ist. Die Anwendung dieser MS-Methode erlaubt auch eine weniger zeitintensive Anreicherungsprozedur. Der Nachteil von MALDI-TOF-MS ist insbesondere die Nichtlinearität zwischen relativer Laserleistung und Konzentration für quantitative PVP-Untersuchungen. Diese geringe MALDI-TOF-Leistung sowie deren Empfindlichkeit wurden durch den gezielten Einsatz des Ankerprobenträgers verbessert und zeigt sich damit als wertvoll für zukünftige Abbaustudien. Die Beschränkungen, die weiterhin bleiben, sind die hohen Polydispersitäten der unterschiedlichen PVP-Proben (z.B. $D \sim 10$ in den pharmazeutischen Anwendungen, in $D \sim 15$ in den Waschmitteln), welche MALDI-TOF-MS nur nach einer erfolgreichen GPC-Fraktionierung anwendbar macht.

Der biologische Abbau von PVP kann mit diesen FBBR-Abbauexperimenten, die mittels MALDI-TOF-MS verfolgt wurden, vollständig ausgeschlossen werden, während das Adsorptionsexperiment zeigt, dass PVP eher bevorzugt mit Schlamm komplexiert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese geringe biologische Abbaubarkeit aus der Art der Endgruppe der untersuchten PVP-Probe resultiert und dass mit einer anderen Endgruppe ein höherer biologischer Abbau erreicht werden kann. Diese Untersuchungen zeigen, dass MALDI-TOF-MS als breite Detektionsmethode für FBBR-Experimente zugänglich ist. Damit wird das analytische Fenster für polymere Analyten vergrößert und umweltrelevante Studien werden möglich.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit und zum Adsorptionsverhalten von PVP darf angenommen werden, dass in Kläranlagen dieses Polymer wegen seiner außerordentlichen Adsorption an Schlamm aus der gelösten Phase entfernt wird. Diese Ergebnisse extrapolierend, verbleibt die Frage des Schicksals und des endgültigen Verbleibs des adsorbierten PVP weiterhin beantwortet zu werden.

Somit konnten semiquantitative MALDI-TOF-MS-Aussagen bei einer umweltrelevanten Fragestellung eines Analyten erfolgreich getroffen werden, bei der andere Detektionsmethoden aufgrund des Molekulargewichtes bzw. der Polydispersität der Proben gänzlich versagen. Um weitere generelle Aussagen zur quantitativen MALDI-TOF-MS-Analyse treffen zu können, sollen im Folgenden entsprechende Modelluntersuchungen durchgeführt werden.

3.4.6 Wege der Quantifizierung mittels MALDI-TOF-MS

Einschränkungen der quantitativen MALDI-TOF-MS sollen im Folgenden verdeutlicht werden, die bislang durch lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS festgestellt werden konnten:

- Endgruppenbedingte Unterschiede in der Ionisation²⁶²,
- kationengrößenbedingte Unterschiede in der Ionisation¹²⁵,
- matrixbedingte Fragmentierung¹²⁵ und
- Suppression von höhermolekularen Bestandteilen bei polydispersen Proben^{106,107}.

Die Bedeutung der Probenpräparation bei der MALDI-TOF-MS wurde in den vorangegangenen Kapiteln unter sehr unterschiedlichen Gesichtspunkten deutlich. Der Einsatz des Ankerprobenträgers bei der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS-Analyse führte zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit bei einem synthetischen Polymer (Kapitel 3.4.5, S. 222). Durch die Entwicklung der universellen lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS (Kapitel 3.1.2, S. 30) konnte ein grundlegender Schritt in Richtung Quantifizierung mittels MALDI-TOF-MS gegangen werden. Diese ermöglicht eine wesentlich gezieltere Optimierung, da die Präparationsmethode unabhängig von Löslichkeit und Kompatibilität (Kapitel 3.1.2.2.1, S. 44) der zu mischenden Komponenten ist. Folgende Verbesserungen ergaben sich im Einzelnen:

- höhere Homogenität (Kapitel 3.1.2.1.3, S. 40),
- höhere „shot-to-shot“- und „sample-to-sample“-Reproduzierbarkeit (Kapitel 3.1.2.1.3, S. 40),
- breiterer Bereich optimaler Analyt/Matrix-Verhältnisse (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31),
- höhere Signalintensitäten bei gleichsam geringerer Schwankung (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31),
- keine Segregation (Kapitel 3.1.2.2, S. 44),
- keine Suppression von unlöslichen Bestandteilen gegenüber löslichen Bestandteilen (Kapitel 3.1.2.2.2, S. 46),
- keine Suppression von löslichen Bestandteilen gegenüber deren Nebenprodukte (Kapitel 3.1.2.2.3, S. 49),
- keine Unterdrückungseffekte aufgrund unterschiedlicher Analyt/Matrix-Verhältnisse (Kapitel 3.1.2.2.3, S. 49),
- vernachlässigbarer Matrixuntergrund (Kapitel 3.1.2.3.2, S. 54),
- vernachlässigbare Konkurrenzionisierung (Kapitel 3.1.2.1.1, S. 31 und 3.1.2.3.2, S. 54),
- keine Fragmentierung durch gezielte Optimierung der Matrix (Kapitel 3.1.2.3.3, S. 55 und 3.4.3.2, S. 154),
- keine Fragmentierung durch gezielte Metalltrifluoracetatzugabe (Kapitel 3.2.2.3.2, S. 106),
- keine Fragmentierung aufgrund der Verwendung eines Lösungsmittels (Kapitel 3.2.2.3.2, S. 106 und 3.4.3.7, S. 192) und
- geringere Laserleistungen anwendbar (Kapitel 3.4.3.2, S. 154).

Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, dass die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS die Methode der Wahl ist für eine optimierte Quantifizierungsanalyse. Daher sollen einige lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS-Modelluntersuchungen definierter Gemische durchgeführt werden, um generelle Tendenzen zu erarbeiten. Ein besonderer Schwerpunkt wird auf die Ionisation gelegt.

Zunächst werden Modelluntersuchungen bei möglichst gleichem Molekulargewicht in Abhängigkeit der Endgruppen eines Polymers und deren bevorzugter Ionisation durchgeführt. Hierfür werden Polystyrol (PS) 1.600 Da mit den gängigen Butyl- und Wasserstoffendgruppen sowie säureendgruppenfunktionalisiertes PS (PSCO₂H) 1500 Da^{xxx} ausgewählt (**Abb. 3-42**, S. 98). Polystyrole werden gängigerweise als Ag-Pseudo-Molekülonen detektiert, da eine effektive Ausbildung einer Sandwich-Struktur zwischen Silberkation und zwei Aromaten möglich ist. Mit Alkalimetalltrifluoracetaten ist ebenfalls eine Ionisation möglich, sofern geringste Spuren von Silberkationen entfernt sind.

Die bevorzugte Ionisation von PSCO₂H wird mittels der lösungsmittelbasierenden MALDI-TOF-MS festgelegt, in dem dieser Analyt mit CF₃CO₂Li, CF₃CO₂Na, CF₃CO₂K und CF₃CO₂Ag

^{xxx} Die Synthese wurde von Frau *Dr. S. Rosselli* im Rahmen ihrer Promotion unter Anleitung von *PD Dr. S. Höger* im *AK Prof. G. Wegner* am *MPI für Polymerforschung, Mainz*, durchgeführt.

vermessen wird. Die intensivsten Signalintensitäten werden für die Ag-Pseudo-Molekülonen festgestellt. Bei den Alkalimetallen wird die größte Signalintensität für Na-Pseudo-Molekülonen $[\text{PSCO}_2\text{H}+2\text{Na-H}]^+$ und $[\text{PSCO}_2\text{H}+\text{Na}]^+$ gefunden.

Im Folgenden wird eine Modellmischung von 53 % PSCO_2H und 47 % PS hergestellt und mit Dithranol in einem Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/500 mittels Kugelmühle vermengt. Ein Teil der erhaltenen MALDI-Probenmischung wird gezielt mit Silber- bzw. Natriumtrifluoracetat versetzt und mittels Kugelmühle durchmischt. Ein lösungsmittelfreies MALDI-TOF-Massenspektrum ohne Metallsalzzugabe konnte nur bei hohen relativen Laserleistungen 45 erhalten werden. Dabei wurde ausschließlich $[\text{PSCO}_2\text{H}+2\text{Na-H}]^+$ detektiert (Daten nicht gezeigt).

Das lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS unter Silbertrifluoracetatzugabe (**Abb. 3-140**) detektiert bei geringen Laserleistungen $[\text{PS}+\text{Ag}]^+$, $[\text{PSCO}_2\text{H}+\text{Ag}]^+$ und $[\text{PSCO}_2\text{H}+2\text{Ag-H}]^+$. Über die Signalintensitäten im Massenspektrum im Bereich der Signale von 1.400 bis 1.500 Da kann bei einer relativen Laserleistung von 30 ein „Response“-Verhältnis von 46 % PSCO_2H und 54 % PS errechnet werden. Diese relativen Signalintensitäten der Ag-Pseudo-Molekülonen $[\text{PS}+\text{Ag}]^+$ und $[\text{PSCO}_2\text{H}+\text{Ag}]^+$ bleiben mit zunehmender Laserleistung relativ ähnlich (**Abb. 3-140b,c**). Jedoch wird bei einer relativen Laserleistung von 45 (**Abb. 3-140d**) eine intensive Konkurrenzionisation $[\text{PS}+\text{Na}]^+$ gefunden, welche die „Response“-Verhältnisse noch weiter zu fehlerhaften Ergebnissen (35 % PSCO_2H und 65 % PS) verschiebt. Bei einer sehr hohen relativen Laserleistung 50 (**Abb. 3-140e**) wird fast ausschließlich $[\text{PS}+\text{Ag}]^+$ detektiert. Das ermittelte „Response“-Verhältnis im Massenspektrum liegt nur noch bei 16 % PSCO_2H und 84 % PS.

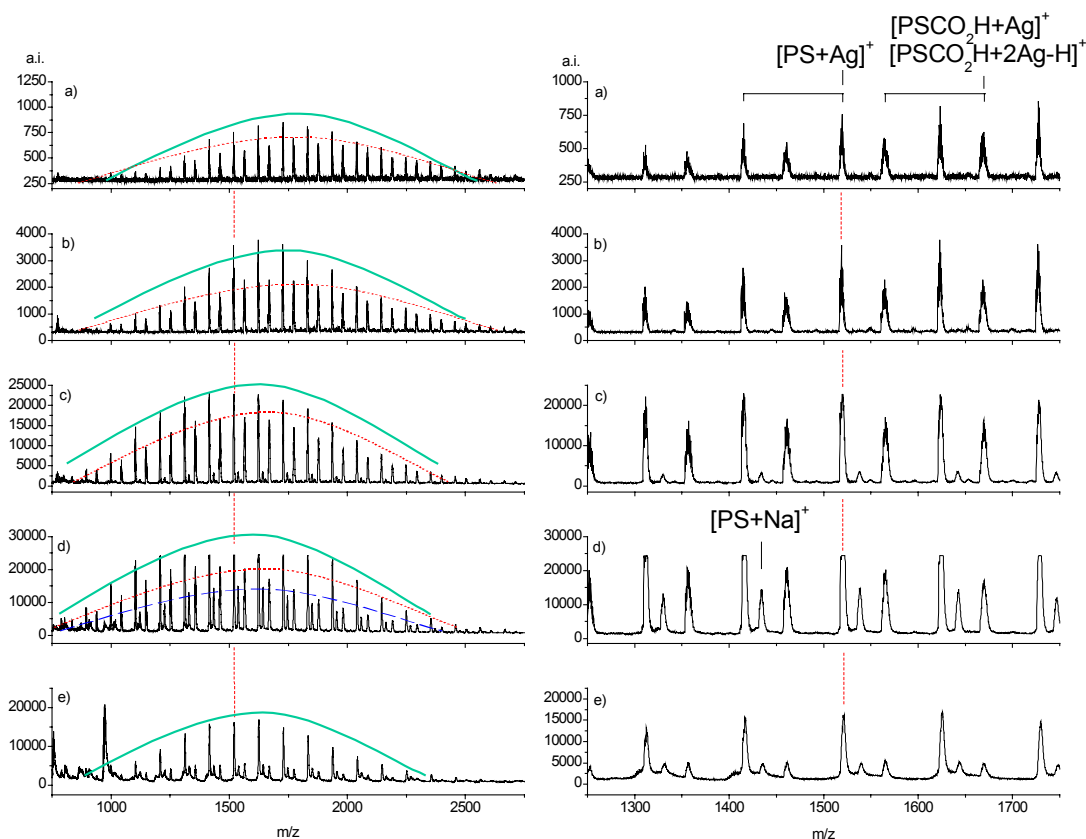


Abb. 3-140: MALDI-TOF-Massenspektren des PS-Modellgemisches (53 % PSCO₂H und 47 % PS) unter Verwendung von Silbermetallsalz in Abhängigkeit der relativen Laserleistung: a) 30, b) 35; c) 40; d) 45; e) 50.

Das lösungsmittelfreie MALDI-TOF-Massenspektrum zeigt bei Zugabe von Natriumtrifluoracetat zur Modellmischung bei geringen relativen Laserleistungen 30 (**Abb. 3-141a**) Signale für [PS+Na]⁺, [PSCO₂H+Na]⁺ und [PSCO₂H+2Na-H]⁺. Das „Response“-Verhältnis im Massenspektrum beträgt dabei 72 % für PSCO₂H und 28 % für PS. Mit zunehmender Laserleistung nimmt der Fehler stark zu (**Abb. 3-141b,c**). Bei einer relativen Laserleistung von 45 (**Abb. 3-141d**) wird ein „Response“-Verhältnis von 82 % PSCO₂H und 18 % PS und bei 50 (**Abb. 3-141e**) von 96 % PSCO₂H und 4 % PS ermittelt.

Aus diesen Modelluntersuchungen geht die Bedeutung der Endgruppen, der Ionisation und der Laserleistung zur Ermittlung von „Response“-Faktoren hervor. PS mit der gängigen Butylendgruppe ionisiert bevorzugt mit Silberkationen über die aromatischen Seitengruppen. Das „Response“-Verhältnis der Modellmischung ist zugunsten von PS verschoben. Bei PSCO₂H bestehen konkurrierende Ionisationsmöglichkeiten, welche bei Zugabe von Natriumtrifluoracetat stark an Attraktivität gewinnen. Bei der präferentiellen Ionisation können folgende allgemeine Abhängigkeiten zusammengefasst werden, die die „Response“-Faktoren nachträglich verfälschen:

- Konkurrierende Ionisation (z.B. Na-Pseudo-Molekülonen bei PS),
- Austausch von aciden Protonen (z.B. durch Natriumkation bei PSCO₂H).

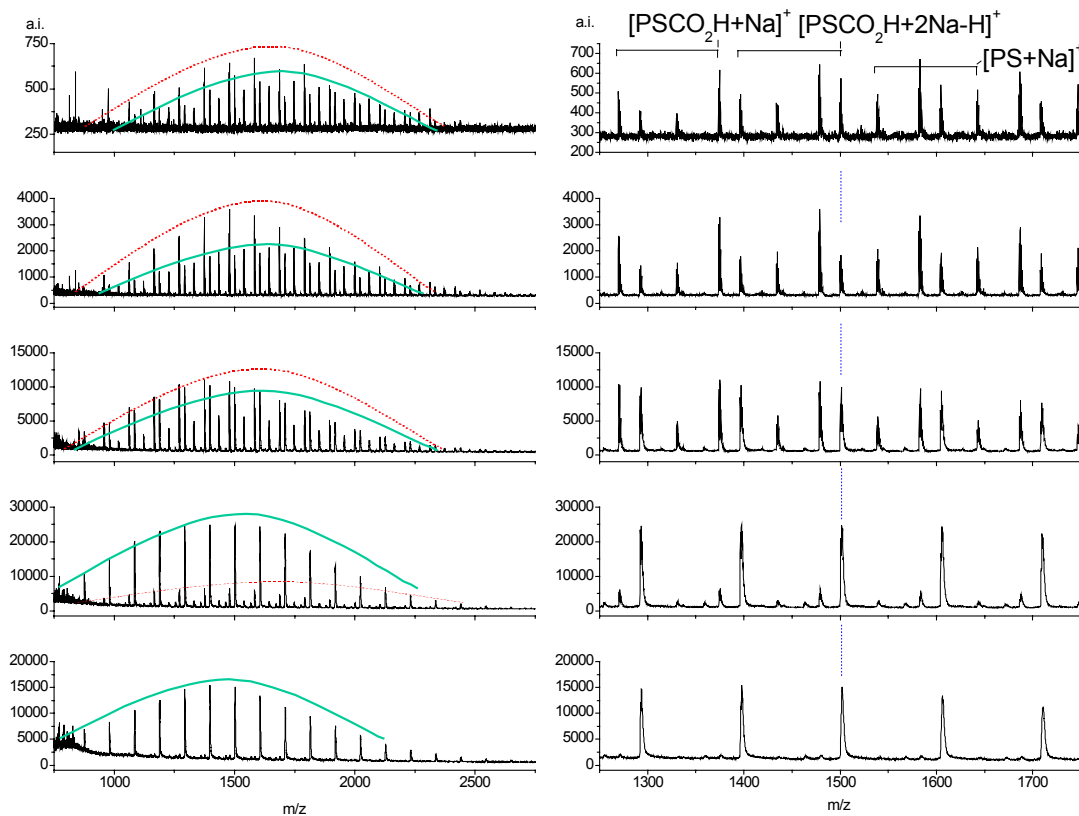


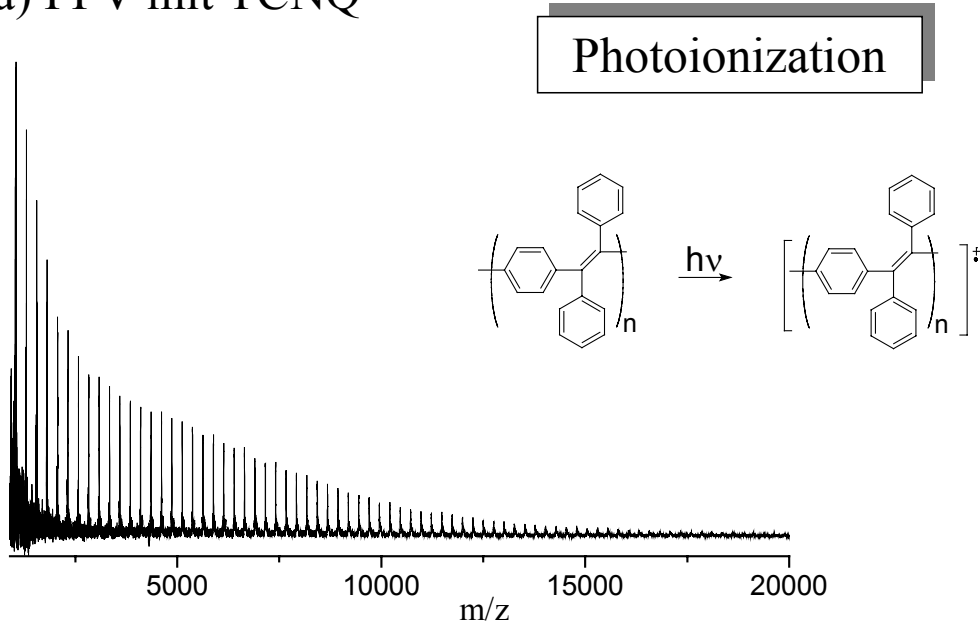
Abb. 3-141: MALDI-TOF-Massenspektren des PS-Modellgemisches (53 % PSCO₂H und 47 % PS) unter Verwendung von Natriumtrifluoracetat in Abhängigkeit der relativen Laserleistung: a) 30, b) 35; c) 40; d) 45; e) 50.

In Abhängigkeit von der Laserleistung wird bei beiden PS-Proben bei den geringsten Laserleistungen der geringste Fehler bei den „Response“-Verhältnissen gefunden. Bei den stärksten Laserleistungen ist das Verhältnis jeweils sehr stark zur Überrepräsentation der jeweiligen PS-Probe verschoben, welche die bevorzugte Wechselwirkung mit dem zugesetzten Kationisierungsmetallsalz eingeht. Die bevorzugte Ionisation wurde zuvor an den reinen PS-Proben in Abhängigkeit ihrer Endgruppen festgestellt.

Präferentielle Ionisationen können nicht alleine nur durch die Zugabe von Metallsalzen beeinflusst werden. Dies soll im Folgenden durch eine weitere Modelluntersuchung veranschaulicht werden. Modelluntersuchungen zu Unterdrückungseffekten aufgrund der Matrixeigenschaften und der Ionisierungsarten der Analyten sollen auch hier mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS durchgeführt werden. Die reinen Substanzen wurden zunächst jeweils als Reinsubstanzen unter Berücksichtigung ihrer präferentiellen Ionisation vermessen. Poly(paraphenylenvinyl) (PPV) mit der TCNQ-Matrix liefert Massenspektren mit guten Signalintensitäten unter radikalkationischer

Ionisation (**Abb. 3-142**). PEG, IAA-Matrix und Natriumtrifluoracetat ermöglicht Massenspektren mit ebenfalls guten Signalintensitäten unter Na-Pseudo-Molekülonenbildung zu erhalten (**Abb. 3-142**).

a) PPV mit TCNQ



b) PEG mit IAA

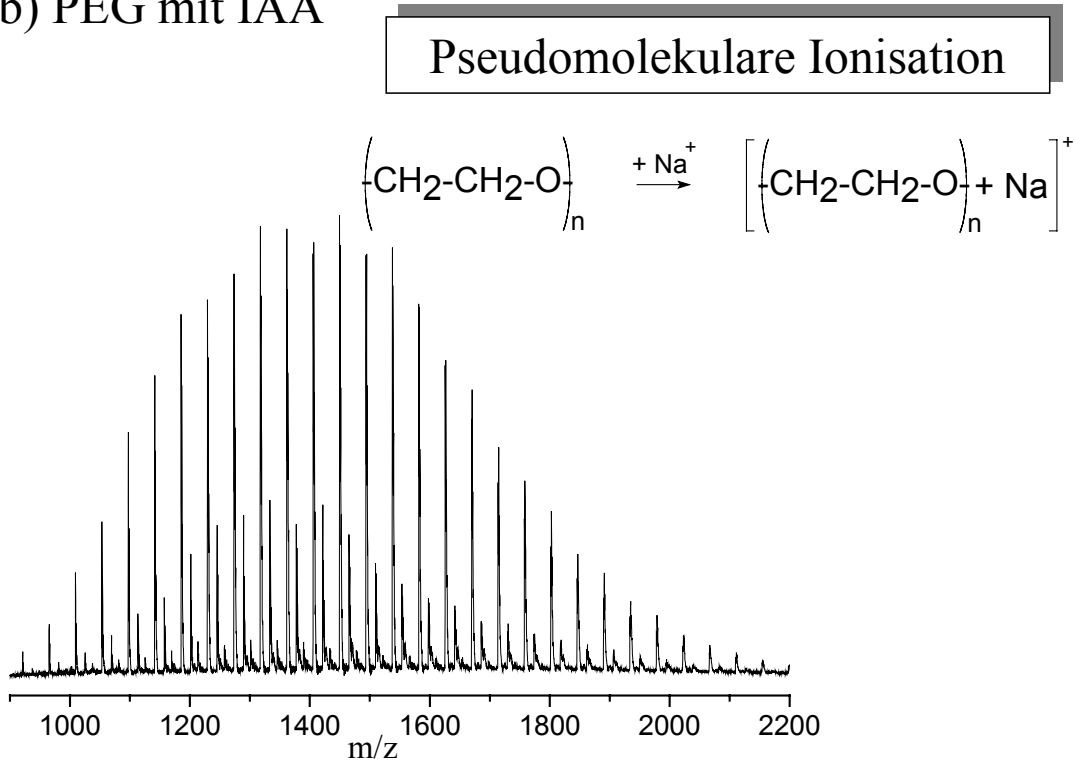
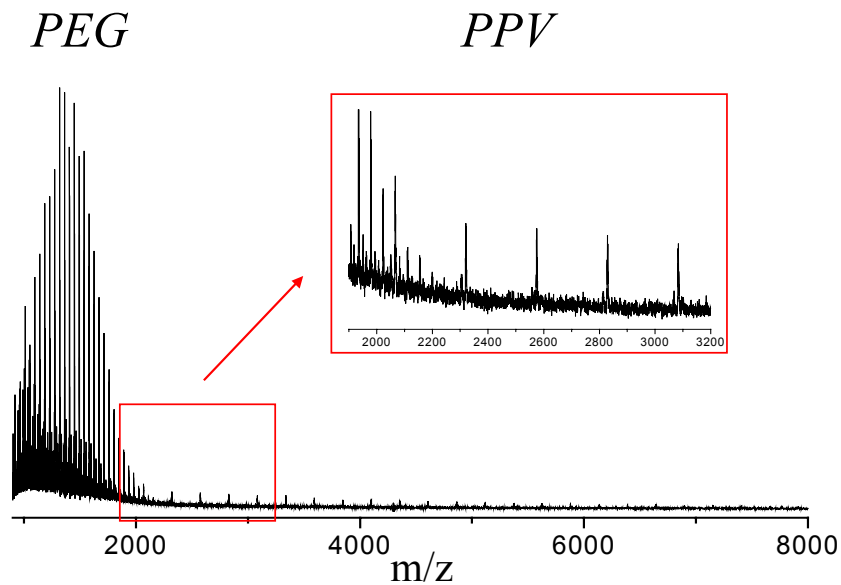


Abb. 3-142: MALDI-TOF-Massenspektren der reinen Analyten und deren geeigneten Matrices: a) PPV und TCNQ-Matrix: Photoionisation unter Ausbildung eines Radikalkations; b) PEG und IAA-Matrix: Pseudo-Molekülonenbildung unter Ausbildung eines Na-Pseudo-Molekülon.

Werden nun die beiden Analyten in einem 1/1 molaren PPV/PEG-Verhältnis gemischt und mit TCNQ-Matrix mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS vermessen, so werden beide Analyten zwar detektiert (**Abb. 3-143a**) jedoch entsprechen die Signalintensitäten bei weitem nicht den zu erwartenden „Response“-Verhältnissen (96 % PEG und 4 % PPV).

a) TCNQ



b) IAA

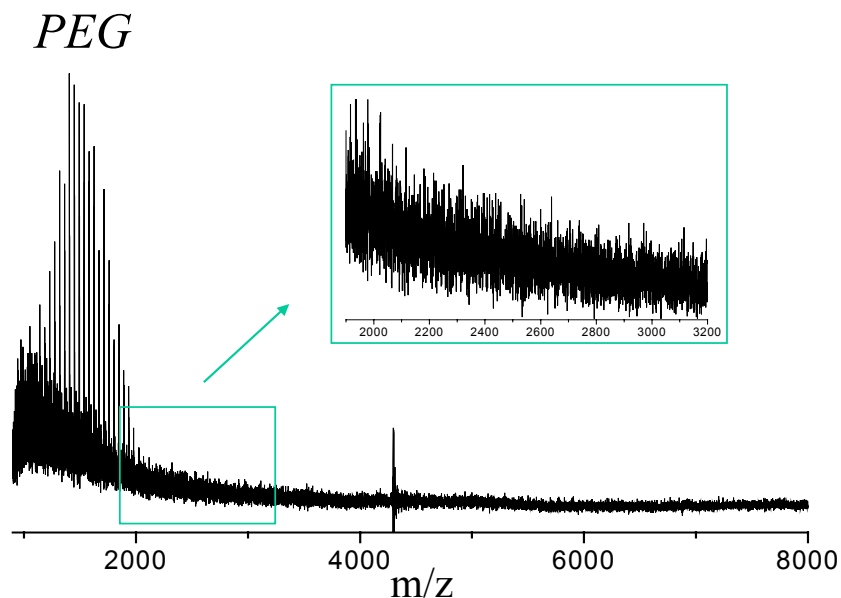


Abb. 3-143: MALDI-TOF-Massenspektren von Gemischuntersuchungen von äquimolare Anteilen an PPV und PEG ermittelt durch lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS unter Variation der Matrices: a) TCNQ; b) IAA und Natriumtrifluoracetat.

Wird dieses 1/1 molare Analytgemisch mit IAA-Matrix und Natriumtrifluoracetat mittels lösungsmittelfreier MALDI-TOF-MS vermessen, so wird ausschließlich PEG nachgewiesen (**Abb. 3-143b**). Signale von PPV sind unter diesen Bedingungen vollständig unterdrückt. Dies wird auf die IAA-Matrixeigenschaft zurückgeführt, welche die radikalkationische Ionisation des PPV nicht zu unterstützen vermag.

Aus diesem Modellbeispiel wird die Bedeutung der Matrix- und Ionisationseigenschaften bei MALDI-TOF-MS und deren Limitierungen klar ersichtlich. Bei der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS-Analyse bleiben durch die optimierte Probenpräparationsmethode dennoch folgende, bedeutende Aspekte unbeeinflusst:

- Ionisationswahrscheinlichkeiten (s. auch Kapitel 3.1.2.2.2, S. 46),
- Suppression von höhermolekularen Bestandteilen bei polydispersen Proben (Kapitel 3.1.2.1.3, S. 40).

Diese sind als ernsthafte Limitierungen für eine generellere Quantifizierung mittels MALDI-TOF-MS zu beurteilen. Ein weiterer konkreter Meilenstein der MALDI-TOF-Quantifizierungsanalytik wäre der Einsatz gezielt synthetisierter, interner ^{13}C -Standards des zu quantifizierenden Analyten, um unterschiedliche Ionisationstendenzen bestmöglichst zu vermeiden.

3.4.7 Resümee

Bei diesen anwendungsorientierten Untersuchungen sehr unterschiedlicher Substanzklassen konnte das qualitative und quantitative Anwendungsgebiet der MALDI-TOF-MS-Analyse erweitert werden. So konnte z.B. bei NIR-Farbstoffen die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS durch geeignete Vergleichscharakterisierungsmethoden als semiquantitative Methode eingestuft werden.

Die Bedeutung der MALDI-TOF-MS-Analyse ist bislang unterschätzt. Bei den Dendrimeren diente sie gezielt zu Strukturcharakterisierung von Fragmentionen und Nebenprodukten. Die bisherige Annahme, dass heteroatomhaltige Verbindungen aufgrund der im Vergleich zu Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen vergleichsweise labileren Kohlenstoff-Heteroatombindungen eine erhöhte Fragmentierungstendenz besitzen, konnte bestätigt werden. Die Ergebnisse zur Verbesserung der Analyse des intakten Molekülions sind schematisch in **Abb. 3-144** zusammengestellt. Die Hyperbel der Desorptionsschwelle des Analyt-Matrix-Gemisches kann bei der Dendrimeranalytik insbesondere durch die Anwendung der lösungsmittelfreien Probenpräparation gesenkt werden. Dadurch kann die Fragmentierungstendenz bei Boc-geschützten Gly-Perylendendrimeren effektiv unterdrückt werden (Kapitel 3.4.3.2, S. 154). Durch die gezielte Beeinflussung der Ionisation bei Polyparaphenyldendrimeren konnten die resultierenden Makromolekülionen stark stabilisiert werden (Kapitel 3.4.3.4, S. 163, Kapitel 3.4.3.5, S. 172, Kapitel 3.4.3.6, S. 182). Wichtige generelle Erkenntnisse zum Grundverständnis der Ionisation von Makromolekülen wurden dabei gewonnen: Pseudo-Molekülionenbildung stabilisiert ein Molekül. Die radikalkationische Ionisation verursacht eine erhöhte Fragmentierungstendenz. Des Weiteren konnte eine atypische Fragmentierung bei den Polyparaphenyldendrimeren mit tetraedrischem Kern (Kapitel 3.4.3.5, S. 172) gefunden werden. Diese Effekte in **Abb. 3-144** beschreiben nur eine qualitative Tendenz, dennoch veranschaulichen sie,

dass die komplexe Dendrimeranalytik durch geeignete MALDI-Probenpräparationsbedingungen die Charakterisierung des intakten Moleküls erlaubt. Über die Schnitte der Hyperbeln der Desorptionsschwelle bzw. der Ionisationsschwelle mit der Fragmentierungsschwelle des Analyten kann bislang keine quantitative Aussage getroffen werden, jedoch ist davon auszugehen, dass in diesem Grenzbereich der MALDI-TOF-MS unter feiner Abstimmung der Probenpräparationsbedingungen auch noch weitaus höhermolekulare Dendrimere fragmentierungsfrei analysiert werden können. Zusätzlich veranschaulicht diese Zusammenstellung, dass keine generellen Aussagen zur Probenpräparation gemacht werden können, sondern jeweils auf das gestellte Problem zu evaluieren und abzustimmen ist.

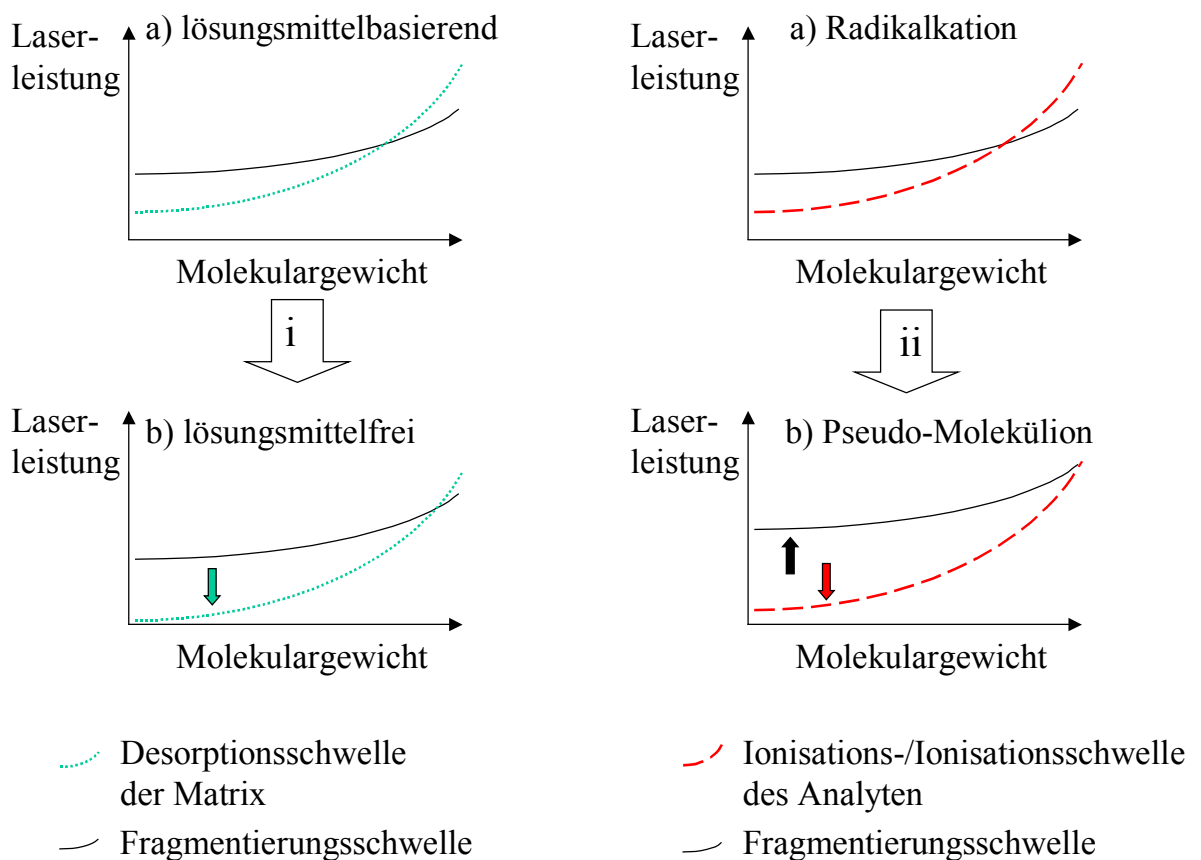


Abb. 3-144: Schematische Darstellung des vermuteten Zusammenhangs zwischen Desorption, Ionisation und Fragmentierung bei der Untersuchung der effektiven Unterdrückung der Fragmentierung von Dendrimeren: i) lösungsmittelfreie Probenpräparation setzt die Desorptionsschwelle der Matrix herab (Boc-geschützte Gly-Perylendendrimere); ii) Bildung eines Pseudo-Molekülions senkt die Überschussenergie des Moleküls in der Gasphase und vermindert die Fragmentierungstendenz (Polyphenylendendrimere mit tetraedrischem Kern).

Im Bereich der PAH-Analytik konnten wertvolle Ergebnisse hinsichtlich chemischer und massenspektrometrischer Gesichtspunkte erarbeitet werden. Systematische Überchlorierung tritt bevorzugt mit steigendem Molekulargewicht der PAHs auf. Bei den Nebenprodukten der Teilzyklisate ist keine Systematik hinsichtlich der Molekulargewichte der PAHs erkennbar. Die PSD-Analytik zeigt sich als geeignet entsprechende Nebenprodukte eindeutig strukturell zu charakterisieren. Bei vollständig zyklisierten Zielprodukten wird gezeigt, dass mit zunehmendem Molekulargewicht die Fragmentierungstendenz abnimmt. Mit geringerer Beschleunigungsspannung nimmt die Fragmentierungstendenz zu.

Durch geeignete Ansätze können quantitative MALDI-TOF-MS-Aussagen ermittelt werden. Die MALDI-TOF-MS-Analyse konnte erstmals erfolgreich auf eine umweltspezifische Fragestellung angewendet werden, bei der quantitative Aussagen von größtem Interesse sind. Dabei zeigte sich die MALDI-TOF-MS als eine leistungsfähige Methode für den qualitativen Nachweis von PVP in einem Molekulargewichtsbereich < 20.000 Da, die insbesondere eine hohe Empfindlichkeit und „shot-to-shot“-Reproduzierbarkeit aufwies. Die „sample-to-sample“-Reproduzierbarkeit wurde durch die Einführung des Ankerprobenträgers erhöht. PSD-MALDI-TOF-MS-Untersuchungen stellten die unbekanntenen Endgruppen von umweltrelevantem PVP fest. Der biologische Abbau von PVP kann mit den durchgeführten Abbau- und Adsorptionsexperimenten, die mittels semiquantitativer MALDI-TOF-MS verfolgt wurden, vollständig ausgeschlossen werden.

Eine Quantifizierung mittels MALDI-TOF-MS steht noch in den Anfängen. Jedoch konnte durch die Einführung der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS ein wichtiger Beitrag zur Quantifizierung geleistet werden. Anhand geeigneter Modellmischungen konnten die Schwierigkeiten der quantitativen MALDI-TOF-MS verdeutlicht werden (z.B. Laserleistungsabhängigkeit). Eine MALDI-TOF-MS-Quantifizierung eines Analyten sollte am effektivsten mit Hilfe eines gezielt synthetisierten, markierten ^{13}C -Standards von gleicher Struktur erfolgen können, da dadurch Unterschiede im Desorptions- und Ionisationsverhalten zwischen Analyt und Standard aufgrund ähnlicher Molekulargewichte und Ionisationswahrscheinlichkeiten am geringsten sind. Dabei lässt sich vorhersagen, dass eine universelle MALDI-TOF-MS-Quantifizierung wahrscheinlich immer ausgeschlossen bleibt.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die methodische Entwicklung der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations- (MALDI) Time-of-Flight-(TOF) Massenspektrometrie (MS) zur Charakterisierung von synthetischen Polymeren und Makromolekülen. Durch geeignete Experimente und unter Berücksichtigung der Ergebnisse ergänzender analytischer Methoden wurden neue Möglichkeiten der MALDI-TOF-MS-Methode erarbeitet, deren bisherige Grenzen genauer definiert und auf Basis eines besseren Verständnisses der limitierenden Faktoren in vielen Fällen auch überwunden.

Die MALDI-Probenpräparation gestaltet sich generell sehr komplex. In einer vorangegangenen Arbeit wurde eine lösungsmittelfreie Probenpräparation für eine bestimmte Substanzklasse unlöslicher Polyzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAH) Analyten entwickelt. Basierend auf diesen neueren Entwicklungen wurden in dieser Arbeit zunächst konkrete Experimente zum matrixunterstützten Effekt dieser lösungsmittelfreien Probenpräparation durchgeführt. Am nachdrücklichsten wurde dieser durch die Charakterisierung von Polystyrol (PS), Poly(methylmethacrylat) (PMMA) und Rinderserumalbumin (BSA) bis 100 kDa festgestellt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Vorteile der lösungsmittelfreien Probenpräparationsmethode nicht auf die analytische Erschließung bisher nicht massenspektrometrisch erfassbarer unlöslicher Substanzen beschränkt sind, wurde ein systematischer Vergleich zwischen der konventionellen, auf Lösungsmittel basierenden Probenvorbereitung, und der neuen lösungsmittelfreien Probenvorbereitung durchgeführt. Bei diesen vergleichenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei Anwendung der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS die Qualität wie z.B. die Auflösung und die Genauigkeit der erhaltenen Massenspektren gleich oder sogar verbessert ist. Bei identischer Signallage ist die Signalintensität in diesen Massenspektren generell höher. Die genaue Darstellung der Polymerverteilung ist über ein wesentlich breiteres molares Analyt/Matrix-Verhältnis konstant als bei konventioneller Probenvorbereitung. Das optimale molare Analyt/Matrix-Verhältnis für Dithranol liegt beispielsweise unverändert bei 1/500. Zusätzlich führte diese Probenpräparation zu einer verblüffend guten Homogenität der Mischung, wodurch sich eine erhöhte „shot-to-shot“-Reproduzierbarkeit bei der Aufnahme der Massenspektren ergibt. Da bei der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS generell weniger Laserleistung angewendet werden muss, erlaubt sie einen schonenderen MALDI-Prozess. Eine wesentliche Schlussfolgerung dieser experimentellen Ergebnisse ist, dass die Homogenität die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche MALDI-Analyse ist. Diese Ergebnisse implizieren weiter, dass die mittels traditioneller, lösungsmittelbasierender Probenpräparation erhaltene Homogenität im allgemeinen deutlich geringer ist als bislang erwartet.

Mit den gewonnenen Erkenntnissen konnten im Folgenden wichtige Vorteile dieser Probenpräparation bei einem breiten Spektrum unterschiedlicher Analyten herausgearbeitet werden. Fragmentierungslabile Analyte (z.B. Peptide) waren zuverlässig charakterisierbar, da weniger Laserleistung für den Desorptionsschritt in das Probengemisch eingebracht werden musste. Oxidationslabile bzw. thermolabile Substanzen (z.B. Pigmente) konnten charakterisiert werden, da auf den Löseschritt verzichtet werden konnte, der zu unerwünschten Veränderungen des Analyten führen

kann. Generell konnte gezeigt werden, dass diese MALDI-Probenpräparation geeignet ist, um schwer- und unlösliche Substanzen wie z.B. Poly(dithiathianthren)e und Poly(fluorene) zu charakterisieren und ermöglicht damit genaueren Einblick in die Chemie dieser Substanzklasse. Entmischungseffekte (z.B. bei Poly(etherimid)en und Poly(dimethylsiloxan)en), die in der konventionellen Probenpräparation während des Verdampfungsschrittes des Lösungsmittels zu einer inhomogenen Kristallisation des MALDI-Probengemisches führen, können überwunden werden, da vollständig auf Lösungsmittel verzichtet wird. So konnten beispielsweise nur durch den gezielten Einsatz der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS PS-Proben analysiert werden, bei denen trotz optimierter Bedingungen die lösungsmittelbasierende MALDI-TOF-MS aufgrund unerwünschter Lösungsmittelinflüsse fälschliche Ergebnisse lieferte.

Die lösungsmittelfreie Probenpräparation verbessert die MALDI-Methode in der Art, dass Ergebnisse generell einfacher und schneller zugänglich sind. Diese Probenpräparationsmethode ist unabhängig von der Löslichkeit der Analyten und Matrices bzw. deren Kompatibilität. Die Polarität der Matrix spielt keine unmittelbare Rolle mehr. Der Einsatz der Matrices ist frei gestaltbar und damit einfacher auf den jeweiligen Analyten optimierbar. Das lässt prinzipiell die Charakterisierung des Analyten auch in gänzlich polaritätsinkompatiblen Analyt-Matrix-Gemischen zu.

Die analytischen Möglichkeiten und Limitierungen zur quantitativen Charakterisierung von Gemischbestandteilen mittels MALDI-TOF-MS wurden durch geeignete Modelluntersuchungen aufgezeigt. Diese künstlichen Mischungen definierter Analyten erlaubten „Response“-Faktoren in Abhängigkeit von den Matrices bzw. von der zugrundeliegenden Ionisation des Analyten zu ermitteln, um semiquantitative Abschätzungen zu treffen. Die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS machte in besonderen Fällen eine Quantifizierung überhaupt erst möglich. Dies konnte zum Beispiel durch Modelluntersuchungen eines unlöslichen PAHs und dessen löslichen Dendrimervorläufers aufgezeigt werden.

Die lösungsmittelfreie Probenpräparation erwies sich in Optimierungsversuchen als wesentlich zeiteffektiver, jedoch ist der Aufwand, der für die sorgfältige Durchführung betrieben werden muss, größer und kostenintensiver als bei der konventionellen Probenpräparation. Der Probenbedarf ist höher und Memoryeffekte sind ausgeprägter, wodurch die Entwicklung von Einwegschüttelbechern für die mechanische Homogenisierung mittels Kugelmühle erforderlich war. Diese Methode ist immer dann anwendbar, solange die Bestandteile im festen Zustand homogenisierbar sind. Die lösungsmittelfreie Probenpräparation ist eine wichtige Ergänzung zur Charakterisierung von synthetischen Polymeren und Makromolekülen und erschließt neue Bereiche der Analytik, insbesondere bei unlöslichen Verbindungen und bei Analyt-Matrix-Entmischungsphänomenen.

Die erzielten Ergebnisse sind qualitativ und quantitativ zuverlässiger. Diese äußerst positiven experimentellen Ergebnisse der lösungsmittelfreien Probenpräparation widersprachen dem bisherigen Verständnis des zugrundeliegenden MALDI-Prozesses, der den homogenen Einbau des Analyten in den Matrixkristall postuliert. Mittels lösungsmittelfreier Probenpräparation ist eine molekulare Durchmischung von Analyt und Matrix auszuschließen, sorgt jedoch für einen äquivalenten Matrixeffekt. Modellexperimente wurden daher entwickelt, um weiterführende Erkenntnisse hinsichtlich der gültigen Modellvorstellungen der MALDI-TOF-MS-Methode zu erhalten. Durch die lösungsmittelfreie MALDI-TOF-MS am Modellanalyten Cytochrom C konnte nachgewiesen werden,

dass der Einbau eines Analyten in einen Matrixkristall nicht zwingend notwendig, sondern aufgrund der erhöhten einzubringenden Laserleistung sogar eher von Nachteil ist. Der MALDI-Prozess verläuft umso effektiver, je geringer die (Rest)-Kristallinität und je inniger der Kontakt zwischen Analyt und Matrix sind. Diese Anforderung an eine möglichst kristallfreie homogene MALDI-Probenmischung kann durch lösungsmittelfreie, aber auch durch Optimierung der lösungsmittelbasierenden Probenpräparationsmethode erzielt werden.

Mit Hilfe der MALDI-Fragmentionenanalytik wurde der Einfluss von experimentellen Parametern auf das Fragmentierungsverhalten der Polymere und die Anwendbarkeit zur direkten Bestimmung von Copolymerzusammensetzungen untersucht. Durch einen systematischen Vergleich von unterschiedlichen Anregungsverfahren an geeigneten Makromolekülen wurde deren Potential, Gemeinsamkeiten und Unterschiede definiert. So konnte demonstriert werden, dass prinzipiell Molekulargewichte bis 10.000 Da für die „Post-Source Decay“ (PSD)- und „Collision-Induced Dissociation“ (CID)-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik zugänglich sind, ein Molekulargewichtsbereich, der bisher für Fragmentionenanalytik nicht zugänglich war (4.500 Da, Autospec-TOF). Im Detail müssen jedoch weitere analytspezifische Verfahrensweisen entwickelt werden. Bei der Fragmentionenanalytik von PMMA wurden molekulargewichtsabhängige Fragmentierungsunterschiede gefunden, die eine gezielte Optimierung der Probenvorbereitung (z.B. Metallsalzzusatz) und andere instrumentelle Einstellungen (z.B. Wahl des Selektionsbereiches des Elternions) erforderten. Für die Fragmentionenanalytik synthetischer Polymere kann generalisiert werden, dass die Signalintensität des Elternions ausschlaggebend für den Erfolg der Analyse ist. Das kann durch Optimierung der Mischungsverhältnisse und der Ionisierung bzw. durch eine vorangeschaltete GPC-Fraktionierung erzielt werden.

Die traditionelle Copolymeranalyse erfordert eine Kombination analytischer Methoden und liefert dabei gemittelte Eigenschaften unterschiedlicher Polymeranteile. Durch den gezielten Einsatz der MALDI-Fragmentionenanalytik konnte erstmals direkt die Analyse einer statistischen Copolymerzusammensetzung durchgeführt werden. Dabei handelte es sich um statistische Copeptide, aufgebaut aus zwei unterschiedlichen Monomerbausteinen. Im Gegensatz zu natürlichen Peptiden handelt es sich um polydisperse, seitenkettengeschützte Peptide ohne definierte Sequenz. Bei diesen PSD- und CID-MALDI-TOF-Fragmentuntersuchungen wurde deutlich, dass die zu untersuchenden Systeme sehr genau verstanden werden müssen, um zuverlässige Aussagen bei der Spektreninterpretation treffen zu können. Als ein Ergebnis konnten bei diesen Copeptiden Beiträge massenspektrometrisch labiler Struktureinheiten, die zu komplexen Umlagerungsreaktionen führten, erkannt und bewertet werden. Diese komplexe Analyse statistischer Copolymere ist nur auf Basis eines grundlegenden Verständnisses chemischer und massenspektrometrischer Prinzipien erfolgreich. Nur durch detaillierte chemische Hintergrundinformation sind diese massenspektrometrischen Ergebnisse sinnvoll interpretierbar.

Durch eine ähnliche Synergie von Synthese und Massenspektrometrie gelang im Folgenden die direkte Analyse eines Triblockcopolymers mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik, welches durch „grafting onto“ von zwei PS-Dendronen an ein starres Kerngerüst synthetisiert wurde. Diese

Modellfragmentierungsuntersuchung eines einfachen Sternpolymers erlaubte die Charakterisierung der Polymerverteilung der PS-Dendronen und damit die direkte Bestimmung der Dendronenlänge.

Weiterhin konnte bei einem Sternpolymer, welches durch „grafting from“ aufgebaut wurde, gezeigt werden, dass alle vier möglichen Dendronen verknüpft waren. Damit konnte die Dendronenlänge und der Substitutionsgrad genau bestimmt werden. Diese Information ist nicht aus dem reinen Massenspektrum erhältlich und auch mit anderen Methoden nicht unmittelbar zugänglich.

In den vorangegangenen Untersuchungen lag der Schwerpunkt darauf, ein tieferes Verständnis für die Methode zu entwickeln. Mit diesem grundlegenden Verständnis wurden im Folgenden versucht, bislang gültige Barrieren zu überwinden. Bei diesen anwendungsorientierten Untersuchungen zur Charakterisierung problematischer Analyten mittels MALDI-TOF-MS wurden zunächst die individuellen Schwachstellen der Analyse festgestellt. Durch geeignete Probenpräparations- und Messbedingungen (z.B. Evaluierung des Ankerprobenträgers) wurde die Anwendbarkeit der MALDI-TOF-MS für die direkte Analyse schwer charakterisierbarer, labiler bzw. unlöslicher Analyten und Substanzgemische ermöglicht (z.B. Dendrimere, PAHs, umweltrelevantes Poly(vinylpyrrolidon)). Dabei wurden außerdem die analytischen Möglichkeiten und Limitierungen zur Charakterisierung von supramolekularen Komplexen anhand geeigneter Modellsysteme (z.B. Cyclodextrine) ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden am Beispiel der Strukturklasse der Dendrimere, die mit konventionellen Methoden der Strukturaufklärung nur unzulänglich charakterisiert werden können, besonders deutlich. Eine zuverlässige massenspektrometrische Charakterisierung macht es erforderlich, sicher zwischen chemischen Gemischbestandteilen und Fragmentierungsanteilen im Massenspektrometer zu differenzieren. Obwohl MALDI-TOF-MS einen sehr schonenden Desorptions/Ionisationsprozess gewährleistet, können dennoch Fragmentierungen in Sonderfällen auftreten, die im Extremfall eine Charakterisierung vollständig verhindern. Im Vordergrund dieser MALDI-TOF-MS-Untersuchungen stand damit die fragmentierungsfreie Anregung und Detektion des intakten Moleküls labiler Analyten. Aus unterschiedlichen Gründen zeigen diese Makromoleküle eine erhöhte massenspektrometrische Labilität. Daher musste zunächst ein grundlegendes Verständnis dieser Schwachstellen der Makromolekülanalytik entwickelt werden. Nur dadurch ist eine gezielte Optimierung und ein möglichst schonender MALDI-Prozess gestaltbar.

Eine der Ursachen für die hohe Labilität kann in der resonanten Absorption der Lasereinstrahlung begründet sein oder aber auf die chemische Labilität des Analyten zurückgeführt werden (z.B. gute Abgangsgruppe). Eine Fragmentierung konnte zunächst durch laserleistungsabhängige Untersuchungen festgestellt werden. Ein direkter Beweis einer Fragmentierung konnte dann durch gezielt eingesetzte Messmodi des Massenspektrometers (z.B. Linear- bzw. PSD-MALDI) geführt werden. Die Fragmentstrukturzuordnung wurde mittels PSD-MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik erhalten. Dabei gelang es im Falle von Polyphenylendrimern mit tetraedrischen Kohlenstoffkern, zusätzlich einen atypischen Fragmentierungsmechanismus aufzuzeigen. Bei diesem atypischen Fragmentierungspfad eines Ag-Pseudo-Moleküls tritt eine Ladungsübertragung auf, die zur radikalkationischen Tritylfragmentstruktur und zu elementarem Silber führt.

Der MALDI-Prozess kann generell schonender gestaltet werden, wenn die Desorptionsschwelle der verwendeten Matrices herabgesetzt wird. Durch den gezielten Einsatz von Matrices mit sehr geringer Desorptions/Ionisationsschwelle konnte der MALDI-Prozess bei den unterschiedlichen Systemen jedoch nicht ausschließlich optimiert werden. Durch die zusätzliche Verwendung der lösungsmittelfreien MALDI-TOF-MS gelang es, aufgrund der amorphen Probenbeschaffenheit, möglichst wenig Überschussenergie für eine erfolgreiche Desorption der Matrix in den Analyten einzubringen. Dies erlaubte, die Fragmentierung auf direktem Wege effektiv zu unterdrücken.

Eine bestimmte Art der Ionisierung (z.B. Protonen- oder Kationenanlagerung, Photoionisation) kann nicht erzwungen werden, da diese durch die chemischen Strukturelemente überwiegend festgelegt ist. Dendrimere sind dabei ein Sonderfall, da diese grundlegend unterschiedliche Ionisationswege einschlagen können. Diese Systeme lassen sowohl die Bildung von Radikalkationen als auch von Pseudo-Molekülonen und damit prinzipiell eine Wahl der geeigneten Ionisation zu. Ein besseres Verständnis dieser Ionisationswege ermöglicht zusätzlich zu den theoretischen Aspekten eine gezieltere Probenpräparation. Aus diesem Grund wurde der Ionisationsprozess ermittelt, bei dem das Molekül möglichst schonend in die Gasphase überführt und stabil gehalten wird. Generell zeigte sich, dass Pseudo-Molekülonen stabiler sind als Radikalkationen. Im Falle der Dendrimere konnten die experimentellen Bedingungen gezielt dahingehend verändert werden, dass die Ionisation durch Radikalkationenbildung zugunsten einer Kationenanlagerung verschoben wurde. Über das geeignete Kation zur Bildung eines Pseudo-Molekülonen kann keine sichere Voraussage getroffen werden, jedoch konnte gezeigt werden, dass durch gezielte Variation einiger Metallsalze bei der Probenpräparation das effektivste Kationisierungsmetallsalz ermittelt und somit Fragmentierungsanteile minimiert bzw. gänzlich unterdrückt werden können.

5 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die MALDI-Methode in besonderen Fällen auch für bisher nicht ausreichend charakterisierbare Makromoleküle eingesetzt werden kann und eine wichtige Ergänzungsmethode in der Polymeranalytik darstellt. Die MALDI-Methode ist universell in einem breiten Molekulargewichtsbereich einsetzbar. Dennoch ist diese Technik aufgrund des großen Einflusses der Probenpräparation als sehr komplex einzustufen. Bedingt durch ein vertieftes Verständnis für grundlegende Prinzipien wurde eine hohe Erfolgsquote und Interpretationssicherheit erreicht. Eine neue, lösungsmittelfreie MALDI-Methode wurde entwickelt, die neben den allgemeinen, anwendungsbezogenen Aspekten bereits in dieser Arbeit wesentliche Beiträge zum Verständnis des MALDI-Mechanismus liefern konnte. Weitere grundlagenorientierte Fragestellungen sind nun besser zugänglich, da die lösungsmittelfreie Probenpräparation durch den Ausschluss des für die Analyt-Matrix-Kompatibilität wichtigen Parameters ‚Lösungsmittel‘ weitaus größere Spielräume eröffnet. Darüber hinaus sind Matriceigenschaften von größter Bedeutung, jedoch weitgehend ungeklärt und im Wechselspiel mit den Analyten im Grunde noch unverstanden. Die Effektivität der Matrices im MALDI-Prozess beruht auf einer optimalen Wechselwirkung zwischen Analyt-Matrix und spiegelt sich unter anderem in den Signalintensitäten und den Signal-zu-Rausch-Verhältnissen wieder. So wird beispielsweise für den MALDI-Prozess vermutet, dass Analyten, die eine radikalkationische Ionisation eingehen, bevorzugt mittels Matrices analysiert werden können, die eine erhöhte Tendenz zum Elektronenaustausch aufweisen und damit unmittelbar den Ionisationsprozess begünstigen. Dies konnte bislang experimentell nicht sicher nachgewiesen werden. Ungeklärt ist des Weiteren, warum TCNQ eine der effektivsten Matrices für radikalkationenbildende Analytionen ist, dessen fluoriertes Analogon jedoch im Gegensatz dazu deutlich schlechtere Matriceigenschaften besitzt. Eine Vermutung ist, dass die Stabilität mit einem besonders schonenden Ionisationsschritt zusammenhängt und zusätzlich mit der Gasphasenstabilität unterschiedlich ionisierter Analyten korreliert. Ein besseres Verständnis der Desorptions- und Ionisationsprozesse würde dazu beitragen, Massenspektren von Produktgemischen quantitativ besser einschätzen zu können. Der MALDI-Mechanismus ist prinzipiell verstanden, jedoch müssen noch viele Feinheiten aufgeklärt werden. Die lösungsmittelfreie MALDI-Probenpräparationsmethode wird hierbei einen unmittelbaren Beitrag liefern können.

Optimierungen der Probenpräparation und Messbedingungen lassen einen Spielraum zur Verbesserung der Fragmentationenausbeute zu. In der PAH-Fragmentationanalytik konnten zwei wesentliche gerätespezifische Limitierungen der MALDI-TOF-Fragmentationanalyse erarbeitet werden. Die geringe Trennschärfe der Primärionenselektion limitiert mit steigendem Molekulargewicht der PAHs eine saubere Selektion des gewünschten Elternions, so dass benachbarte Molekülionen zu einem gewissen Teil mitselektiert werden. Die Molekülionen unterscheiden sich mitunter nur um zwei bis vier Nominalmassen. Das beeinträchtigt oder verhindert eine eindeutige Fragmentationanalyse. Ein Sektorfeldgerät hat eine wesentlich bessere Trennschärfe für die Primärionenselektion und vermag bis zu isotoopenreinen Substanzen zu selektieren. Um eine möglichst präzise Selektion des gewünschten PAH-Produktes zu gewährleisten, wäre ein Wechsel zum Sektorfeldanalysator vorteilhaft. Dadurch könnte sehr effektiv eine Interferenz durch Fragmentationen

unterschiedlicher Molekülonen verhindert und die Zuverlässigkeit der Fragmentationsanalyse deutlich erhöht werden. Beim TOF-Analysator lassen sich die Energieeinträge zur Fragmentierung des zu untersuchenden Analyten nur geringfügig variieren, so dass bei den relativ fragmentierungsarmen PAH-Analyten nur eine vergleichsweise geringfügige Fragmentierung verursacht werden konnte. Beim Tandem-Sektorfeld-Massenspektrometer ist ein relativ großer Spielraum zur Optimierung der Fragmentierungsenergie gegeben, da die stoßinduzierte Aktivierungsenergie effektiv steuerbar ist. Das Tandem-Sektorfeld-Massenspektrometer ermöglicht zusätzlich eine bessere Auflösung der Fragmentionen. Der Einsatz der bislang nur theoretischen MALDI-Sektorfeld-Massenspektrometrie würde damit eine deutliche Verbesserung in der Selektion des Molekülonen und der Fragmentationenausbeute erbringen und damit unmittelbar die bislang methodenbegrenzte PAH-Strukturanalyse vorantreiben. Eine entsprechende MALDI-Sektorfeld-Kombination ist jedoch eine aufwendige technische Methodenentwicklung, die eine Anpassung der gepulsten MALDI-Methode an den kontinuierlichen Messbetrieb des Sektorfeldanalysators erfordert. Dessen Detektion ist ebenfalls auf einen kontinuierlichen Ionenstrom ausgelegt.

Die Aufreinigung löslichkeitslimitierter Proben gestaltet sich generell schwierig (z.B. PAH). Eine chromatographische Aufreinigung entfällt daher vollständig. Sublimationsaufreinigungen sind zum Teil wenig effektiv, im Molekulargewicht beschränkt und auf zersetzungsfreie Substanzen angewiesen. Die MALDI-MS ist bislang die einzige Methode die diese Substanzklasse molekulargewichtsunabhängig, intakt in die Gasphase überführen kann. Theoretisch könnte damit die MALDI-Methode modifiziert eingesetzt werden. Bei dieser quasi massenspektrometrischen Aufreinigung würden die löslichkeitslimitierten PAH-Produkte effektiv getrennt (z.B. Sektorfeldanalysator) und molekulargewichtsgenau aufgereinigt. Gelänge im Folgenden durch entsprechende gerätespezifische Modifikationen eine fragmentfreie Ablagerung („soft landing“) dieser Graphitausschnitte könnten reine PAHs gezielt akkumuliert und anderen hochempfindlichen Analytikmethoden zugänglich gemacht werden (z.B. eine Visualisierung mit „Scanning Tunneling Microscopy“).

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Materialien

6.1.1 Reagenzien, Lösungsmittel, Matrices, Kalibriersubstanzen

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Lösungsmittel und Kalibriersubstanzen waren generell von p.A. Qualität oder von höchster kommerziell erhältlicher Reinheit und wurden von den jeweils in **Tabelle 6-1** vermerkten Quellen bezogen und gegebenenfalls aufgereinigt (Kapitel 6.2, S. 274). Wasser wurde deionisiert oder in MilliQ Reinheit eingesetzt.

Tabelle 6-1: Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien, Matrices, Reagenzien und Lösungsmittel.

D-Sorbitol	Aldrich (Steinheim, Germany)
p-Tolylaldehyd	Aldrich (Steinheim, Germany)
C60/C70 Fulleren	Aldrich (Steinheim, Germany)
PS 2 kDa	Polymer Standards (Mainz, Germany)
PEG 2 kDa	Polymer Standards (Mainz, Germany)
1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol)	Aldrich (Steinheim, Germany)
7,7,8,8-tetracyanoquinodimethan (TCNQ)	Aldrich (Steinheim, Germany)
α -Cyano-4-hydroxycinnamoylensäure (HCCA)	Sigma (St. Louis, USA)
3 β -Indolylacrylsäure (IAA)	Aldrich (Steinheim, Germany)
2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Aldrich (Steinheim, Germany)
9-Nitroanthracene (NA)	Aldrich (Steinheim, Germany)
2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB bzw. DHB)	Aldrich (Steinheim, Germany)
Sinapinsäure (SA)	Aldrich (Steinheim, Germany)
all-trans-Retinoesäure (VitA)	Fluka (Buchs, Switzerland)
2,4-Dihydroxybenzoesäure (2,4-DHB)	Aldrich (Steinheim, Germany)
2,6-Dihydroxybenzoesäure (2,6-DHB)	Lancaster (Mülheim, Germany)
Silbertrifluoroacetat	Aldrich (Steinheim, Germany)
Lithiumtrifluoroacetat	Aldrich (Steinheim, Germany)
Natriumtrifluoroacetat	Aldrich (Steinheim, Germany)
Kaliumtrifluoroacetat	Aldrich (Steinheim, Germany)
Cäsiumtrifluoroacetat	Aldrich (Steinheim, Germany)
CaCl ₂ ,	Aldrich (Steinheim, Germany)
FeCl ₃ ,	Aldrich (Steinheim, Germany)
CuCl ₂ ,	Aldrich (Steinheim, Germany)
MgSO ₄	Aldrich (Steinheim, Germany)
Cer(SO ₄) ₂	Aldrich (Steinheim, Germany)
Tetrahydrofuran (THF)	Fluka (Buchs, Switzerland)
o-Dichlorobenzol	Aldrich (Steinheim, Germany)
Dichloromethan	Fisher Chemicals (Loughborough, UK)
Acetonitril	Riedel-DeHaen (Seelze, Germany)
Toluol	Riedel-DeHaen (Seelze, Germany)
Methanol	Riedel-DeHaen (Seelze, Germany)
Ethanol	Riedel-DeHaen (Seelze, Germany)

6.1.2 Analyte und Synthesen

Die verwendeten, käuflich erhältlichen Analyte wurden in kommerziell erhältlicher Qualität eingesetzt und sind in **Tabelle 6-2** hinsichtlich ihrer Bezugsquellen zusammengestellt. Im Folgenden sind dann die verwendeten, akademisch ausgerichteten Substanzen mit den jeweiligen Bezugsquellen und Synthesen aufgelistet.

Tabelle 6-2: Bezugsquellen der verwendeten Analyten.

Polystyrol (PS) 1 2 kDa 1a , 7 kDa 1b , 27 kDa 1c , 44 kDa 1d , 96 kDa 1e	Polymer Standards (Mainz, Germany), zum Teil zur Verfügung gestellt
Polymethylmetacrylat (PMMA) 2 2 kDa 2a , 7 kDa 2b , 12 kDa 2c , 28 kDa 2d , 52 kDa 2e , 100 kDa 2f	Polymer Standards (Mainz, Germany)
Rinderinsulin 3	Fluka (Buchs, Switzerland)
Rinderserumalbumin 4	Fluka (Buchs, Switzerland)
Polyetherimid (PEI) 30 kDa 5	Polysciences Europe (Eppelheim, Germany)
Pigmente wie C.I. Pigment Red 144 6	Clariant GmbH (Frankfurt, Germany) zur Verfügung gestellt
Polyvinylpyrrolidon (PVP) 7 2.5 kDa (pharmazeutische Reinheit) 7a and 10 kDa 7b PVP 22.1 (D 7.37) 7c and 14.4 kDa (D 10.87) 7d PVP K12 (2-3 kDa) 7e , K17 (7-11 kDa) 7f and K25 (28-34 kDa) 7g PVP K25 7h and K30 7i	Polysciences Europe (Eppelheim, Germany) Polymer Standards (Mainz, Germany) BASF (Ludwigshafen, Germany) zur Verfügung gestellt Aldrich (Steinheim, Germany)
Cytochrom C 12	Fluka (Buchs, Switzerland)

6.1.2.1 Dendrimer **8**

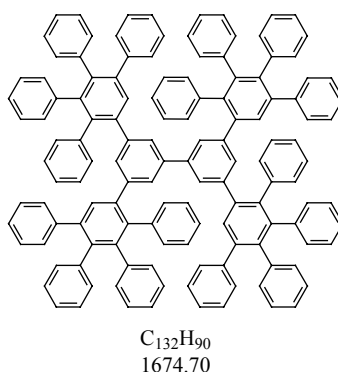


Abb. 6-1: Synthese und Struktur von C₁₃₂H₉₀ **8**.

Die Synthese wurde von Herrn *Dr. A. J. Berresheim* im Rahmen seiner Doktorarbeit im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt. **Abb. 6-1** veranschaulicht das Syntheschema zur Darstellung von $C_{132}H_{90}$ **8**.

6.1.2.2 Polyzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoff $C_{132}H_{34}$ **9**

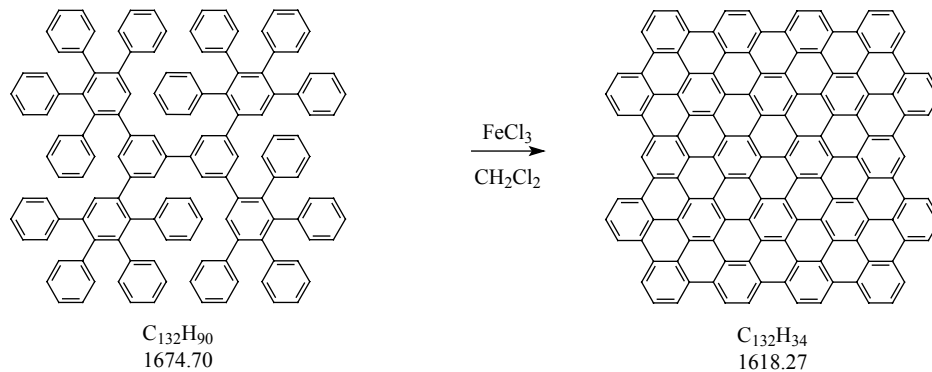


Abb. 6-2: Synthese und Struktur von $C_{132}H_{34}$ **9**.

Die Synthese wurde von Frau *Dr. A. Veyland* im Rahmen ihrer Postdoktorandenzeit im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt. **Abb. 6-2** veranschaulicht das Syntheschema zur Darstellung von $C_{132}H_{34}$ **9**.

6.1.2.3 Bis(p-methyl benzylidene)sorbitol **10**

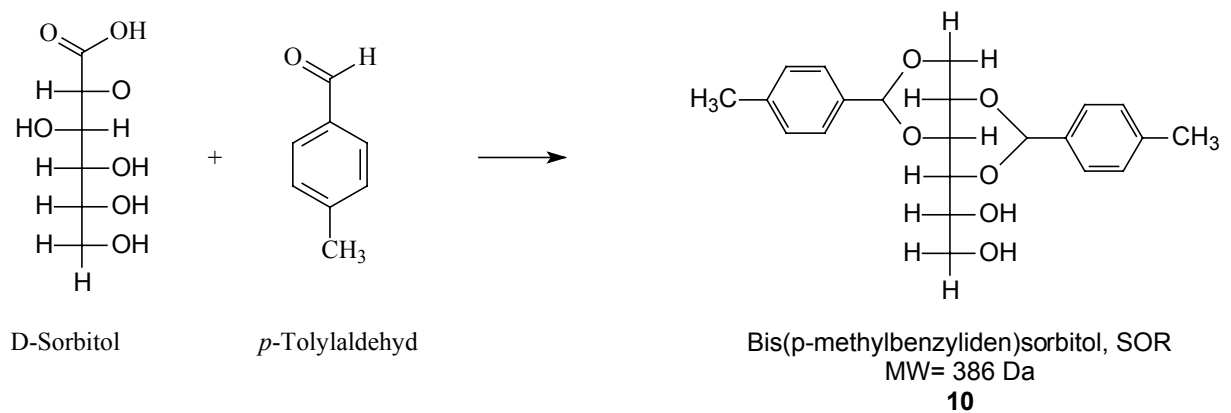


Abb. 6-3: Synthese zur Darstellung von Bis(*p*-methylbenzylidene)sorbitol (SOR) **10**.

In **Abb. 6-3** wird die Synthese zur Darstellung des *Bis*(p-methyl benzylidene)sorbitol (SOR) **10**, ausgehend von D-Sorbitol und p-Tolylaldehyd veranschaulicht. Die Benzyldierung erfolgt nach Werder²⁶³. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

6.1.2.4 Poly(9,9-diphenylfluorene) **11**

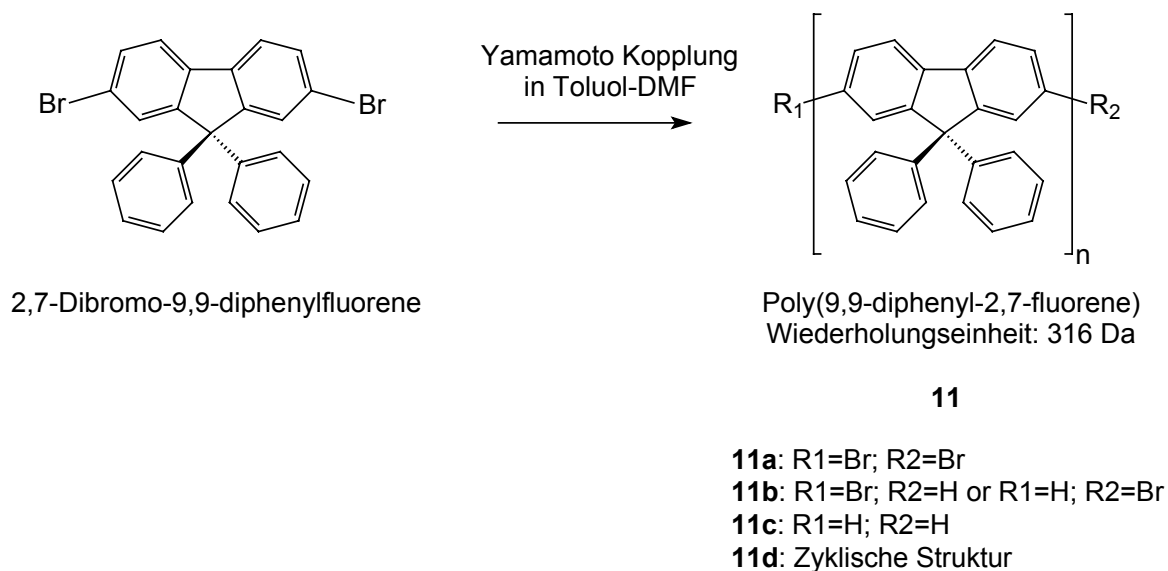


Abb. 6-4: Synthese und Struktur von Polyfluoren **11** und dessen möglichen Endgruppenfunktionalitäten.

Die Synthese wurde von Herrn *Ph.D. A. C. Grimsdale* im Rahmen seiner Postdoktorandenzeit im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung durchgeführt. Poly(9,9-diphenylfluorene) **11** wurde durch Yamamoto Ni(0) Kupplung im Toluol-DMF synthetisiert (72 h)¹⁷⁶. Der Polymerisationsschritt und die Struktur des Analyten wird in **Abb. 6-4** dargestellt. Das Rohprodukt **11** wurde mit Toluol für fünf Tage mit einem Soxhletapparat extrahiert. Der unlösliche Fraktion wurde getrocknet und der lösliche Teil wurde zu einem Öl konzentriert.

6.1.2.5 Züchtung von Einkristallen aus 2,5-DHB mit und ohne Inkorporation von Cytochrom C

Die Kristallisation wurde durchgeführt, um den Cytochrom C-Analyten in den Matrixkristall einzubauen. Hierfür wurde die literaturbeschriebene Methode verfolgt^{133,180}. Die 2,5-DHB-Matrix wurde in Wasser/Ethanol (9/1; v/v) aufgelöst (50 g/l) und für 2 h in einem Wasserbad bei 36 ° C gehalten, um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten. Der Cytochrom C-Analyt wurde ebenfalls gelöst (in destilliertem Wasser) und bei 36 ° C im Wasserbad gehalten.

Die erhaltene Matrix-Lösung wurde in zwei Teile getrennt: ein Teil wurde mit der erhaltenen Cytochrom C-Analyt-Lösung im molaren Analyt/Matrix-Verhältnis 10^{-5} mol L⁻¹ vereint und dann mittels einer Fritte (0.2 µm) filtriert. 5 mL Volumen des Analyt-Matrix-Gemisches wurden in Präparatgläschen abgefüllt und mit perforierten Plastikdeckeln verschlossen.

Der zweite Teil der Matrix-Lösung wurde direkt filtriert (0.2 µm). 5 mL Volumen der Matrix-Lösung wurden in Präparatgläschen abgefüllt und mit perforierten Plastikdeckeln verschlossen. Die abgefüllten Lösungen wurden dann für einige Wochen im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Die Cytochrom C-Analyt-Lösung bildete rötliche Kristalle, die reine DHB-Matrix-Lösung ergab farblose Kristalle. Die erhaltenen Kristalle wurden aus der Mutterlauge entnommen und vorsichtig mit geringen Mengen an eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen, um mögliche Rückstände von nicht eingebautem Cytochrom C-Analyt, welcher an der Kristalloberfläche absorbiert sein könnte, zu entfernen. Dem Kristall wurde kurz die Gelegenheit gegeben zu trocknen und dann mittels Doppelklebeband zur Haftung am Probenträger gebracht. Der Probenträger wurde danach zügig in das Massenspektrometer eingeführt.

6.1.2.6 Triblockcopolymer 14

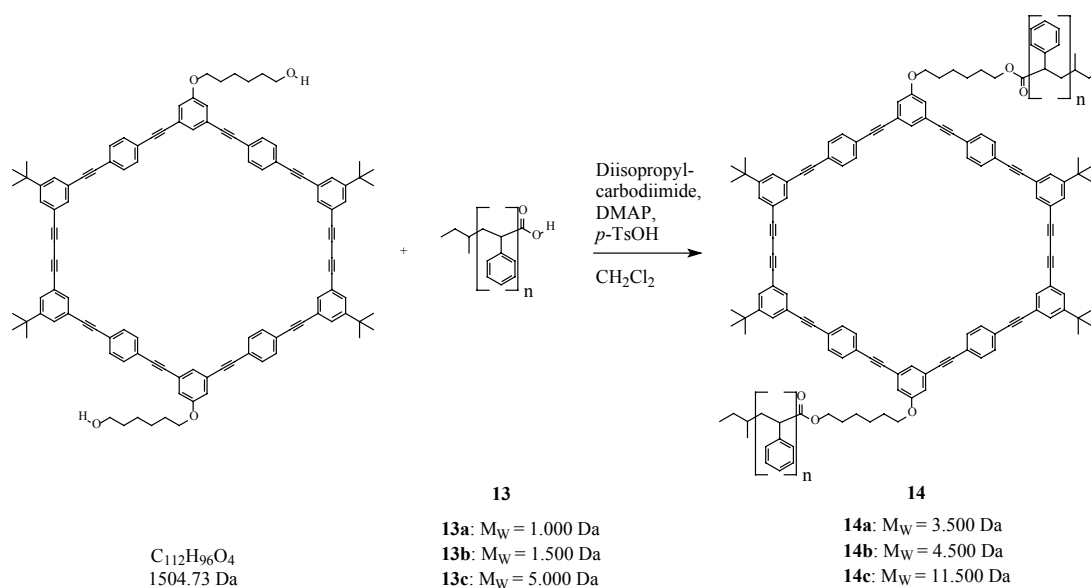


Abb. 6-5: Syntheschema zur Darstellung des Triblockcopolymer 14.

Das Triblockcopolymer **14** wurde von Frau *Dr. S. Rosselli* unter Anleitung von *PD Dr. S. Höger* im AK *Prof. G. Wegner*, MPI für Polymerforschung, Mainz im Rahmen ihrer Doktorarbeit synthetisiert. Die **Abb. 6-5** veranschaulicht das Syntheschema zur Darstellung des Triblockcopolymers. Das Polystyrol wird über dessen Säurefunktion mit den beiden alkoholischen Seitengruppen des steifen zyklischen Kerngerüsts verestert.

6.1.2.7 Synthetische Peptide

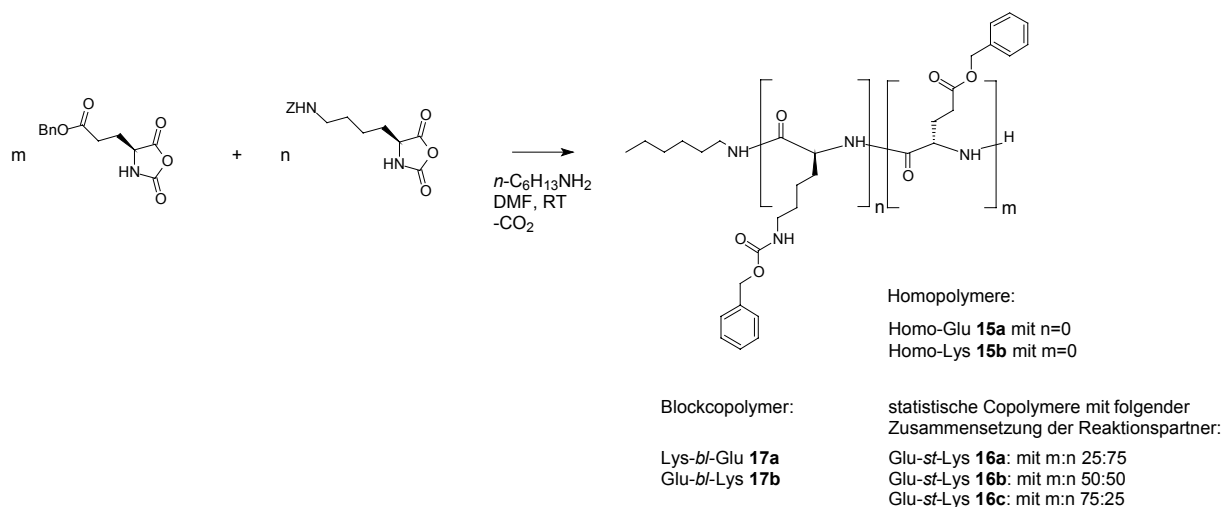


Abb. 6-6: Syntheschema zur Darstellung der Homo- und Copolymere **15**, **16**, **17**.

Die Synthese wurde von Dr. H.-A. Klok im Rahmen seiner Habilitation im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

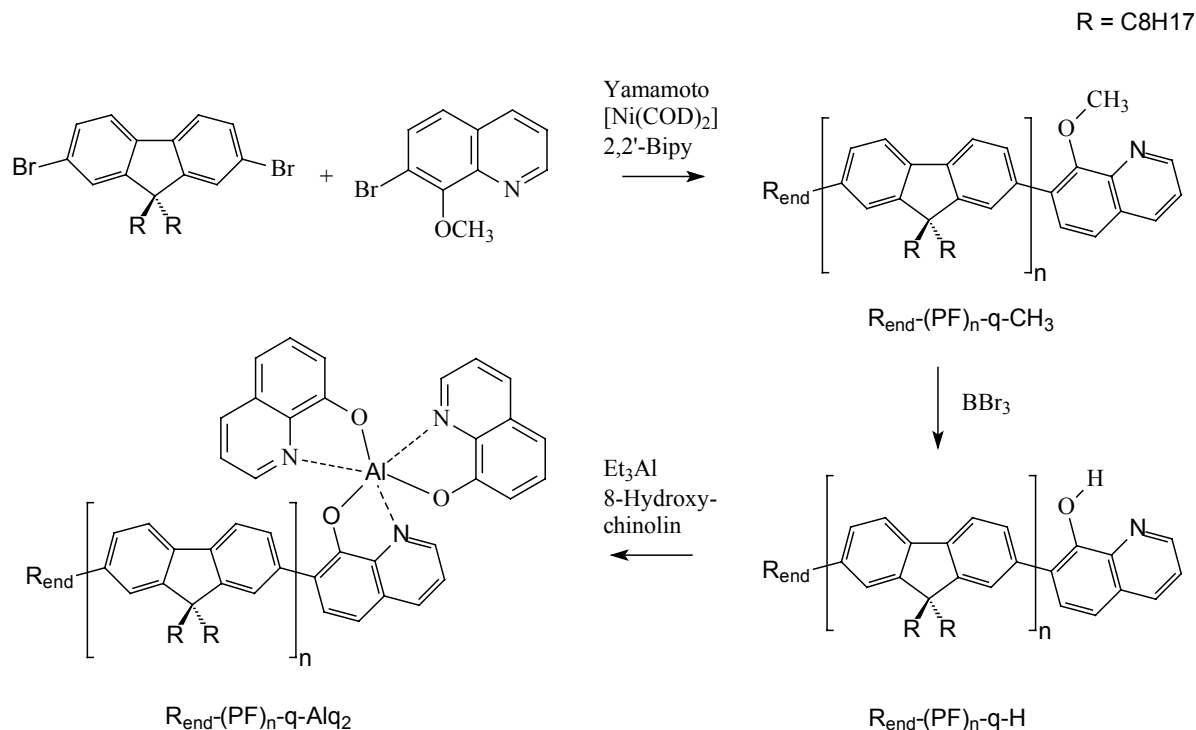
6.1.2.8 Poly[9,9-di-(2-ethylhexyl)fluoren]-Tris(8-Hydroxychinolin)-Aluminium (Alq₃-PF) 18

Abb. 6-7: Syntheschema des Alq₃-endfunktionalisierten PFs (Alq₃-PF) 18.

Das endruppenmodifizierte Polyfluoren wurde von Herrn *Dr. Christopher Schmitt* (AK Prof. U. Scherf, Universität Potsdam/AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert. Das Syntheschema zur Darstellung von Poly[9,9-di-(2-ethylhexyl)fluoren]-Tris(8-Hydroxychinolin)-Aluminium (Alq₃-PF) ist in **Abb. 6-7** dargestellt. Die Polykondensation erfolgt durch eine Nickel-katalysierte Yamamoto-Kupplung von 2,7-Dibrom-9,9'-diethylhexylfluoren und 8-Hydroxychinolin mit einem „Endcapper“-Anteil von 85/15. Das erhaltene PF wird anschließend mit BBr₃ in THF behandelt, so dass durch Spaltung der Etherschutzgruppe des Endcappers die Hydroxygruppe zurückgewonnen wird. Schließlich wird das Polymer mit einem leichten Überschuss an Triethylaluminium (Et₃Al) versetzt und der gebildete Aluminiumkomplex abschließend mit einem Überschuss an 8-Hydroxychinolin umgesetzt.

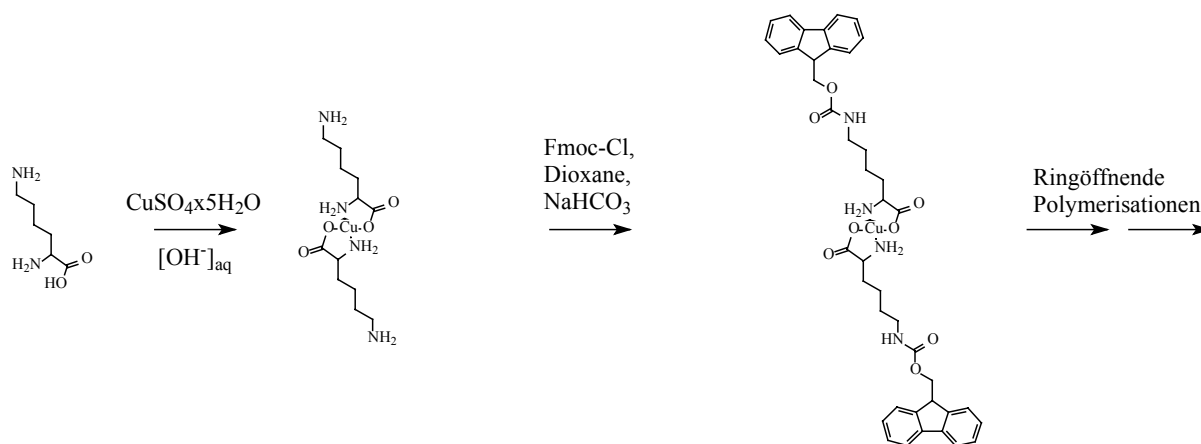
6.1.2.9 Supramolekularer N^ε-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplex 19

Abb. 6-8: Synthese des supramolekularen N^ε-Fmoc-L-Lys Kupfer Komplexes **19**.

Die Synthese des N^ε-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplexes **19** wurde von Herrn *Juan Rodriguez Hernandez* (AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. **Abb. 6-8** zeigt das Syntheschema zur ringöffnenden Polymerisation von N^ε-Fmoc-L-Lys über die schwerlösliche Zwischenstufe des supramolekularen N^ε-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplexes. Zunächst wird die Aminosäure L-Lysine (Lys) mittels Kupfercuprat komplexiert, um dann die ε-endständige Aminogruppe mittels der Fmoc-Gruppe zu schützen²⁶⁴. Der dabei erhaltene schwerlösliche supramolekulare N^ε-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplex dient als Edukt-Baustein für die ringöffnende Polymerisation.

6.1.2.10 Acetylierung von α -, β - und γ - Cyclodextrinen 20

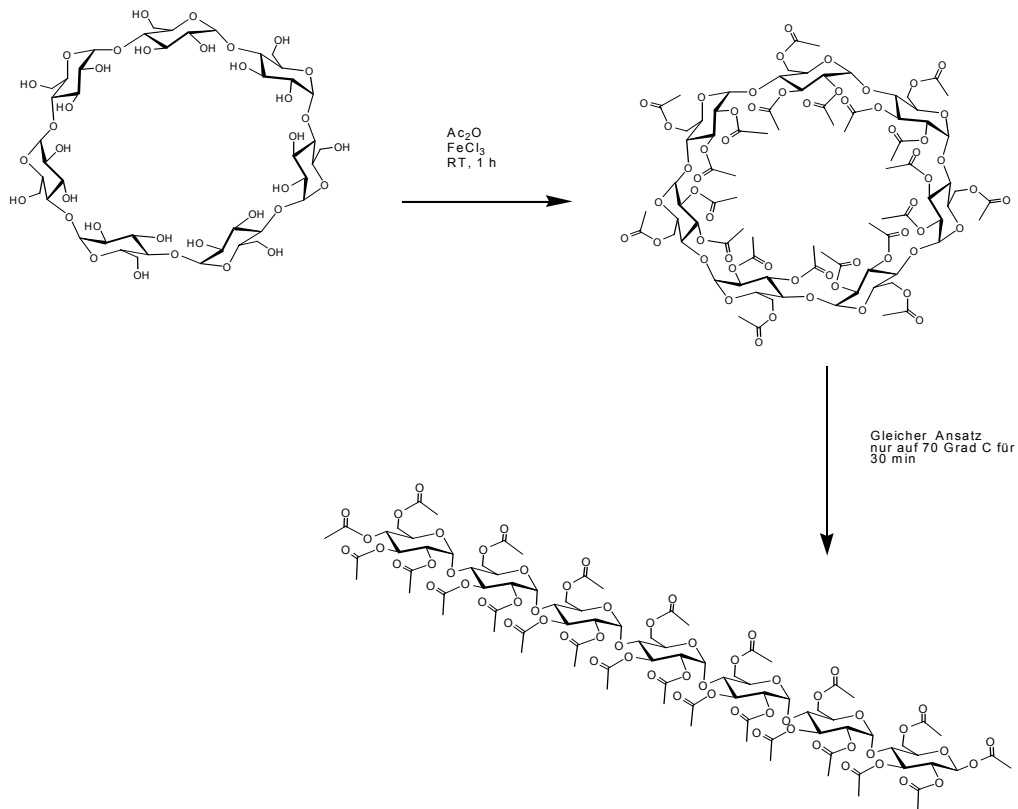


Abb. 6-9: Syntheschema zur Acetylierung von β -CD **20b** zum zyklischen und linearen Heptamer.

Die Synthese von β -CD **20b** wurde von Herrn *Stefan Schiller* (AK Prof. *W. Knoll*, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt. Das Syntheschema ist in **Abb. 6-9** dargestellt. Die Reaktionsführung verläuft analog für α -CD **20a** und γ -CD **20c**.

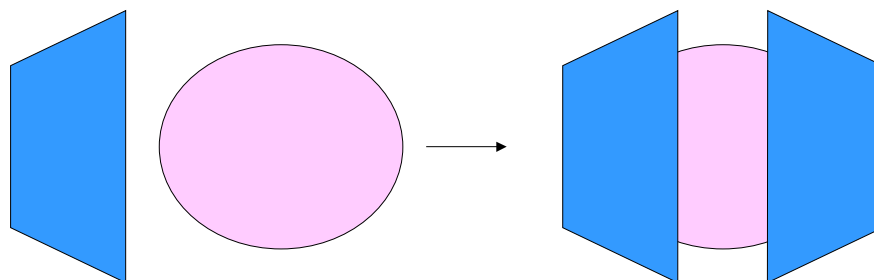
6.1.2.11 Supramolekulare γ -Cyclodextrin-Gast-Komplexe 21

Abb. 6-10: Schematische Darstellung der Wirt-Gast-Systeme **21a** (Strukturen entsprechen jeweils nicht ihren Dimensionen): γ -CD- C_{60} - γ -CD **21a**.

Der supramolekulare Komplex γ -CD- C_{60} - γ -CD **21a**²²⁰ wurde durch Kugelmühlenbehandlung (10 min, 90% Schüttelkraft) des 1/10 molaren Gemisches aus C_{60} und γ -CD erhalten.

21b wurde durch Kugelmühlenbehandlung (10 min, 90% Schüttelkraft) des 1/10 molaren Gemisches aus $C_{42}H_{18}$ und γ -CD erhalten.

6.1.2.12 Naher Infrarot (NIR)-Farbstoff 22

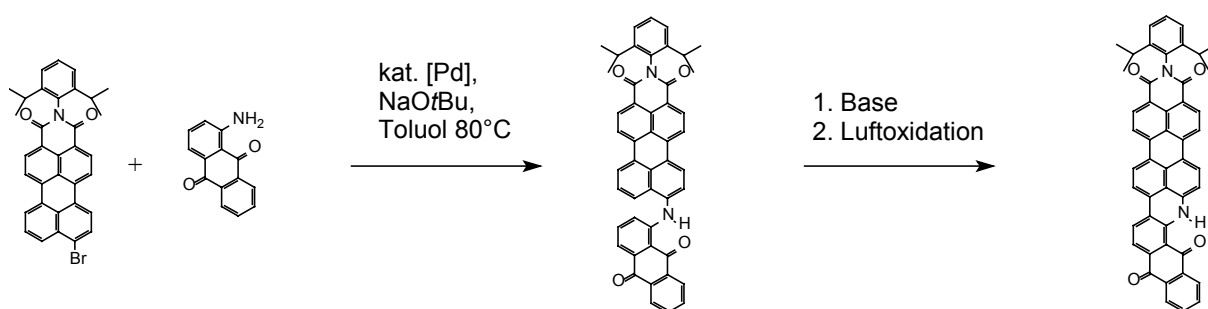


Abb. 6-10: Syntheschema zur Darstellung des NIR-Chromophores **22** durch Cyclodehydrierung von N-(2,6-Diisopropylphenyl)-9-[N'-1-(aminoanthrachinonyl)]perylene-3,4-di-carbonsäureimid.

Die NIR-Farbstoffe wurden von Herrn *Dr. Stefan Becker* (AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert. Die **Abb. 6-11** veranschaulicht das Syntheschema zur Darstellung des NIR-Absorbers. Durch eine palladiumkatalysierte Aryl-N-Kupplung wird das 9-Brom-N-(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4,3',4'-dicarbonsäureimid mit 1-Aminoanthracinon in Gegenwart von Natrium-tert.-butanolat und des Palladiumkatalysators in Toluol bei 80 °C umgesetzt. Das erhaltene Kupplungsprodukt wird mittels einer Cyclodehydrierung durch Baseneinwirkung, bei der Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungsknüpfung unter Ringschlussreaktion zwischen den beiden aromatischen Systemen erfolgt, zum erweiterten NIR-Chromophor **22** umgesetzt.

6.1.2.13 Geschützte Boc-Gly-Perylendendrimere **23**

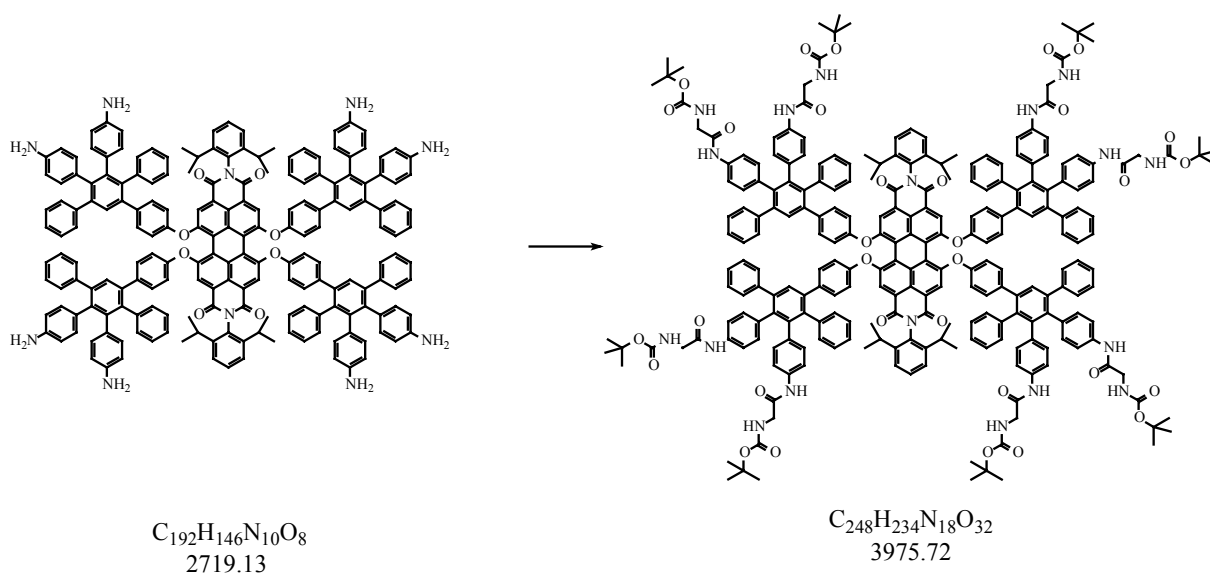


Abb. 6-11: Reaktionsgleichung der Boc-geschützten Perylendendrimere **23**.

Die Synthese des PerG₁(AminGlyBoc)₈ **23** wurde von Frau *Dörthe Grebel-Köhler* (AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. **Abb. 6-12** zeigt das Syntheschema zur Darstellung des Boc-geschützten Perylendendrimers **23**.

6.1.2.14 Fullerodendron 24

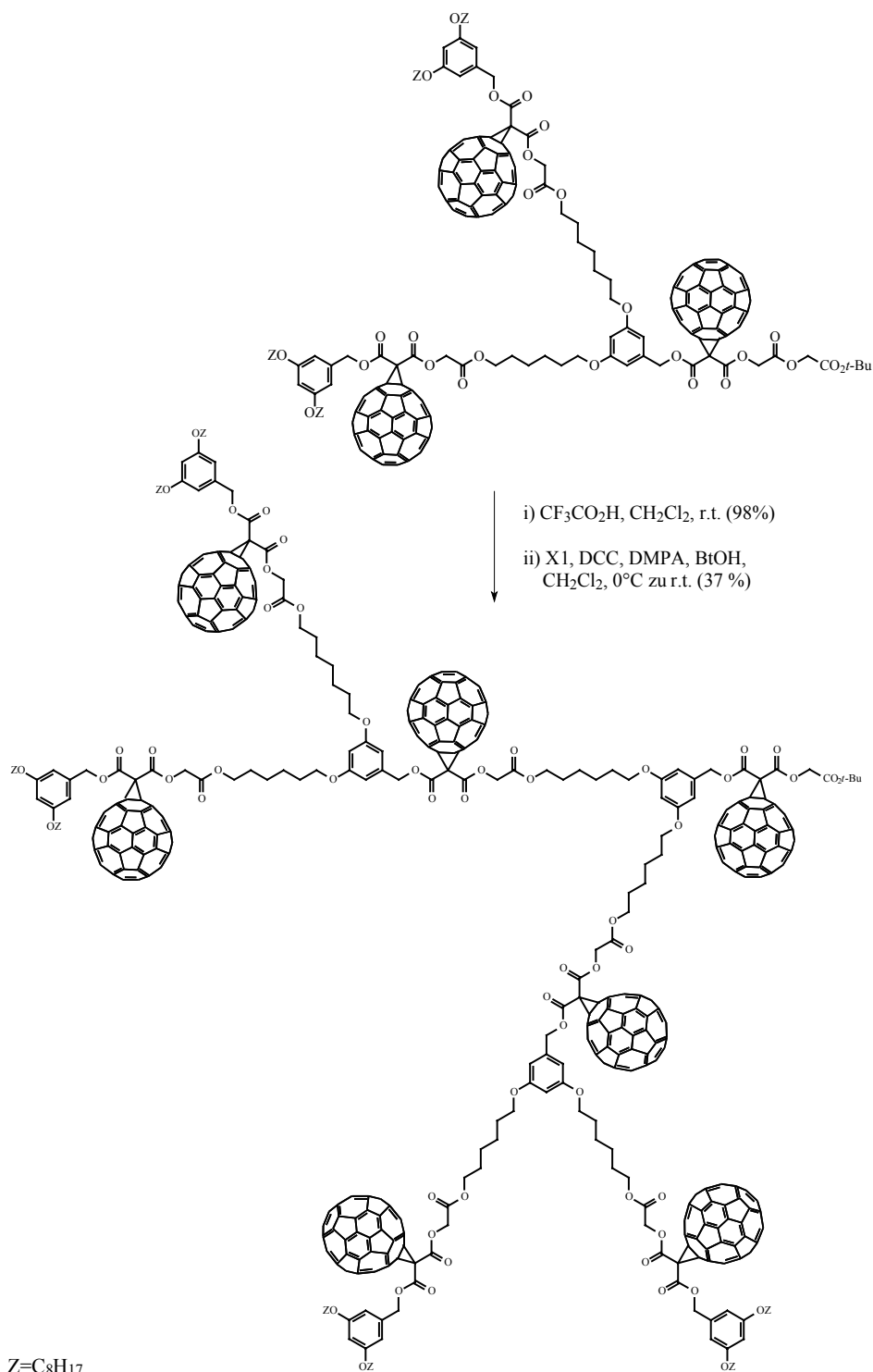


Abb. 6-12: Synthese des Fullerodendrons 24.

Fullerodendrons 24 wurde im AK *Dr. J.-F. Nierengarten* hergestellt. Abb. 6-13 zeigt das Syntheschema zur Darstellung des Fullerodendrons 24.

6.1.2.15 Azodendrimer 25

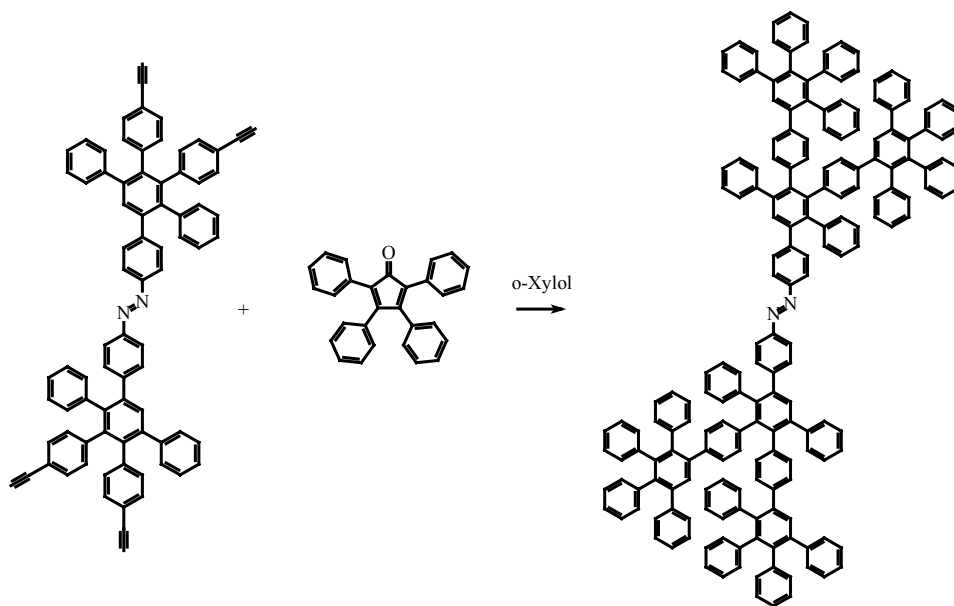
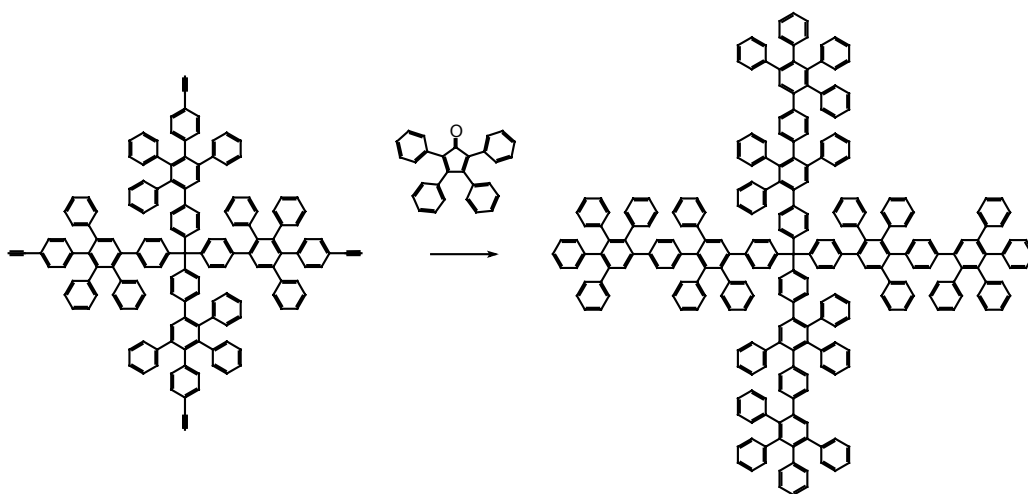


Abb. 6-13: Synthese des Azodendrimers 25.

Die Synthese des Azodendrimers **25** wurde von Frau *Dörthe Grebel-Koehler* (AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. **Abb. 6-14** zeigt das Syntheschema zur Darstellung des Azodendrimers **25**.

6.1.2.16 TdG₂ABCp-Polyphenylendendrimer 26Abb. 6-14: Synthese des Polyphenylendrimers TdG₂ABCp 26.

Die Synthese des TdG₂ABCp **26** wurde von Frau *Dr. Tanja Weil* (AK Prof. *K. Müllen*, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. **Abb. 6-15** zeigt das Syntheschema zur Darstellung des TdG₂ABCp **26**. Die Synthese erfolgte nach literaturbekannten Vorschriften^{265,266,267}.

6.1.2.17 TdG₂A₄BCp-Polyphenylendendrimer **27**

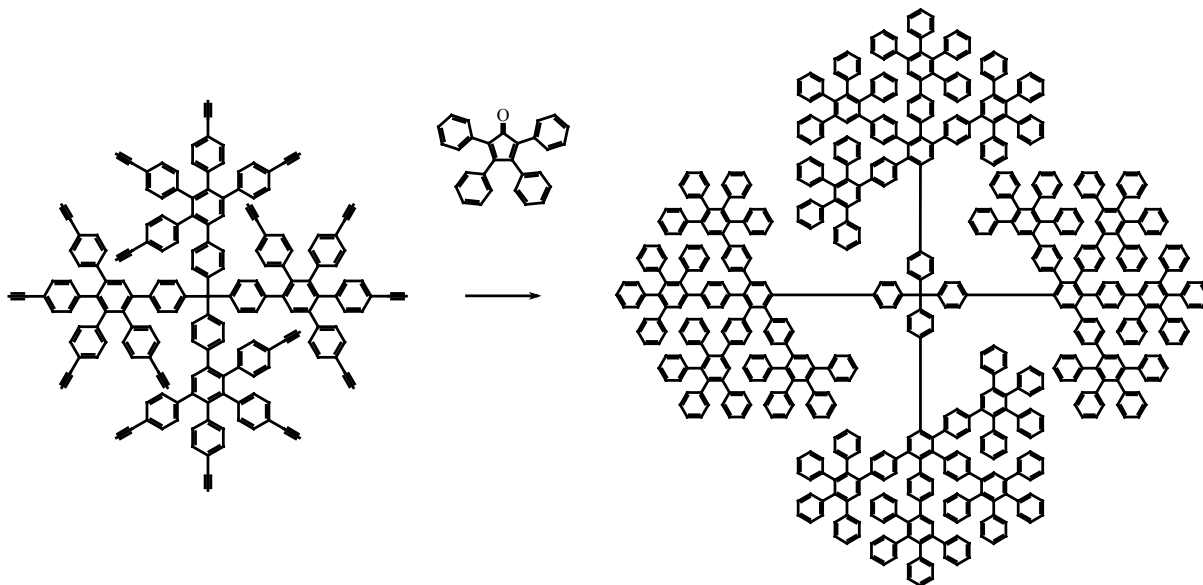


Abb. 6-15: Reaktionsschema des Polyphenylendrimers TdG₂A₄BC **27**.

Die Synthese des Polyphenylendrimers TdG₂A₄BCp wurde von Frau *Dr. Tanja Weil* (AK Prof. *K. Müllen*, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. **Abb. 6-16** zeigt das zugrundeliegende Syntheschema zur Darstellung von **27**. Die Synthese erfolgte nach literaturbekannten Vorschriften^{265,266,267}.

6.1.2.18 Biotinpolyphenylendendrimer 28

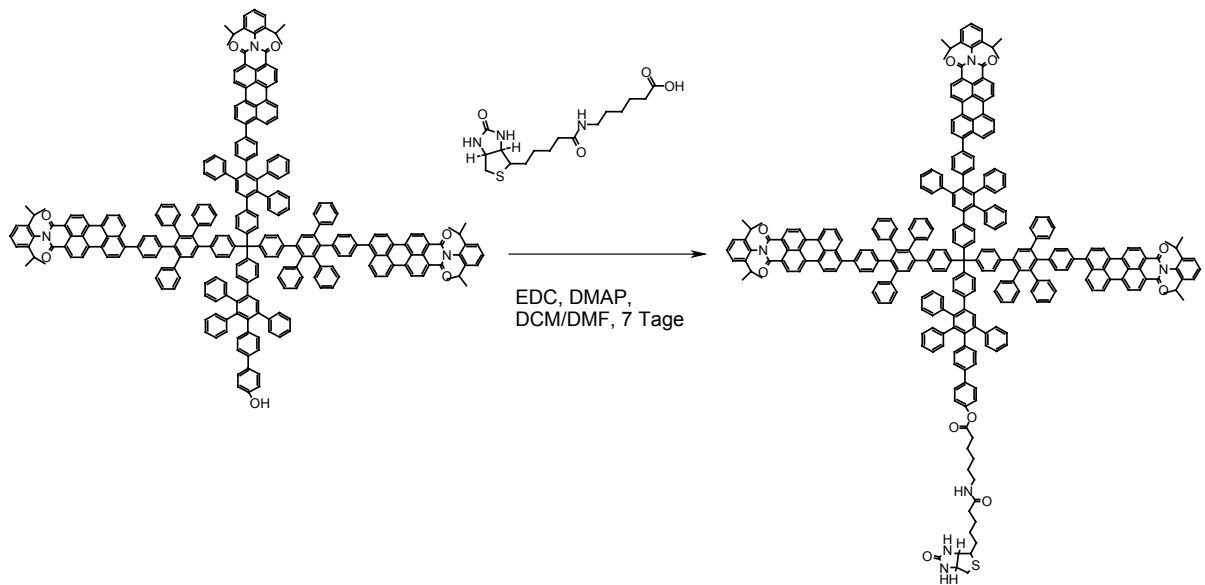


Abb. 6-16: Synthese des Biotindendrimer 28.

Die Synthese des Biotindendrimer **28** wurde von Frau *Dr. Tanja Weil* (AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. **Abb. 6-17** zeigt das Syntheschema zur Darstellung von **28**.

6.1.2.19 Sternpolymere mit photolabilem Kern 29-31

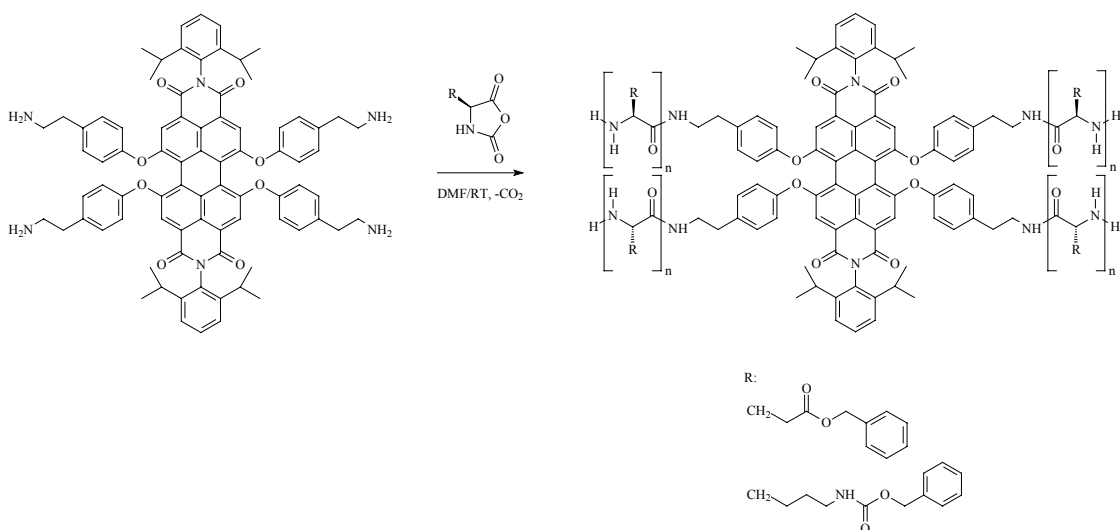


Abb. 6-17: Synthese der polymeren Farbstoffe 29-31.

Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Herrn *Dr. S. Becker* und Herrn *J. Rogriguez Hernandez* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

6.1.2.20 Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) 32-47

Die PAH-Analyten wurden in der gesamten Synthesegruppe „Graphit“ im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, synthetisiert. Die Synthese $C_{132}H_{34}$ wurde von *Frau Dr. A. Veyland* im Rahmen ihrer Postdoktorandenzeit im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt. Das Syntheseverfahren für die einzelnen PAHs verläuft analog $C_{132}H_{34}$ **9** und soll hier nicht im einzelnen erneut aufgeführt werden.

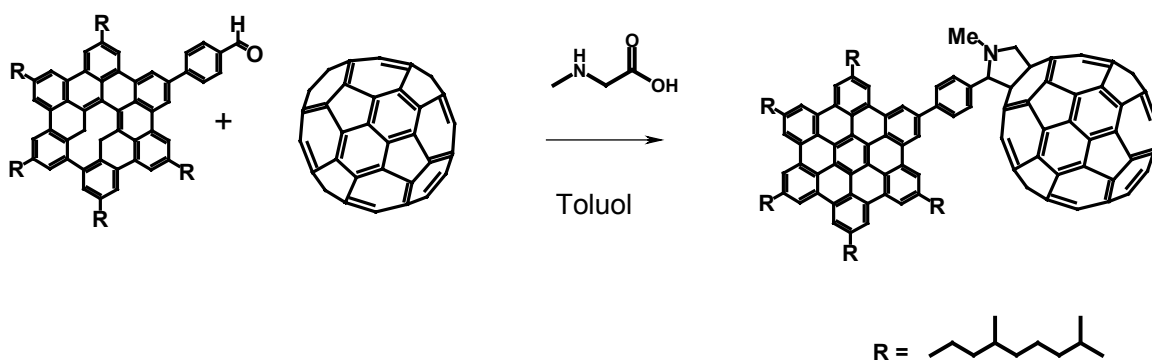


Abb. 6-18: Struktur ($R=C_{10}H_{21}$) des einfach HBC-substituierten PAHs **32-M** und des zweifach HBC-substituierten PAHs **32-N**.

Die Synthese von **32** wurde von *Frau N. Tchebotereva* im Rahmen ihrer Promotion im AK *Prof. K. Müllen* am MPI für Polymerforschung, Mainz, durchgeführt.

6.1.2.21 Proteolytische Abbauxperimente

Die biologischen Abbaureaktionen wurden von Herrn *Dr. Peter Eichhorn* im Rahmen seiner Promotion unter Anleitung von Herrn *Dr. Th. P. Knepper* im AK *Prof. Dr. R.-D. Wilken*, Universität Mainz/ESWE-Institut Wiesbaden, durchgeführt.

Das Prinzip der FBBR-Untersuchungen wird im Detail in einer vorhergehenden Arbeit²²¹ beschrieben. Kurz, im „Laboratory-Scale Fixed-Bed Bioreactor“ (FBBR) wird Flußrheinwasser in einem Kreislauf über ein örtlich-fixiertes Mikrobennett gepumpt, welches auf der Oberfläche des porösen Glases gebildet wird. Die Lösung im Sammelbehälter wird über eine Glasfritte mit Kohlensäure durchgesetzt, um aerobe Bedingungen im System zu garantieren.

6.1.2.21.1 Biologische Abbauxperimente von Polyvinylpyrrolidone (PVP) 7a

Flussrheinwasser wurde mit PVP 2,5 kDa bei einer Konzentration von 10 mg L⁻¹ über eine Zeitdauer von 30 Tagen untersucht. 20 mL-Proben wurden nach allen zwei Tagen genommen; außer am ersten Tag bei dem die Beprobung in kürzeren Abständen erfolgte. Die Proben wurden sofort durch Hinzufügung von einem mL Formaldehyd konserviert. Für MALDI-TOF-Messungen wurden 10 mL jeder Probe lyophilisiert, wieder mit einem mL des Wasser/Acetonitrils (95/5, v/v) aufgenommen und 0,45 µm filtriert.

6.1.2.21.2 Adsorptionsexperimente von Polyvinylpyrrolidone (PVP) 7a

Anaerob verdauter und entwässerter Schlamm einer städtischen Kläranlage wurde lyophilisiert und der erhaltene Trockenschlamm im Mörser homogenisiert. Von diesem wurde 250 mg in fünf mL Wasser in ein 10 mL-Zentrifugengefäß gegeben. Eine wässrige Lösung von PVP mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 6.000 Da, erhalten durch GPC-Fraktionierung von PVP K17, wurde eine abschließende Konzentration von 100 mg L⁻¹ eingestellt. Zwei Kontrollproben wurden gleichermaßen vorbereitet: eine ohne PVP-Zugabe, die andere ohne Schlamm. Nachher wurden die Gefäße horizontal über eine Zeitdauer von einem Tag gerüttelt. Einhundert µL-Proben vom Überstand wurden nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 3.000 min⁻¹ genommen und zur MALDI-Probenvorbereitung eingesetzt.

6.2 Reinigung und analytische Trennmethode

6.2.1 Umkristallisation der Matrices

Matrices wurden mit folgenden Ausnahmen in kommerziell erhältlicher Qualität verwendet: Die DHB Matrices der 2,4-, 2,5- und 2,6-Derivate werden durch Aktivkohle mit anschließender Umkristallisation aufgereinigt. Die Aufreinigung wird wiederholt (2 bis 3 mal) bis weiße Kristalle erhalten werden. Der erhaltene Niederschlag wird vorsichtig mit kaltem Ethanol gewaschen und unter Vakuum bis zur vollständigen Trockenheit gebracht.

6.2.2 GPC-Fraktionierung

Die eingesetzten Gelpermeationschromatographie (GPC)-Anlagen der Polymeranalytik, AK Prof. G. Wegner, MPI für Polymerforschung, Mainz, sind in **Tabelle 6-3** zusammengestellt.

Tabelle 6-3: Gerätespezifische Daten der GPC-Anlagen.

Anlage / Lm:	1 : TriChlorBenzol	2 : Toluol	3 : THF
Temperatur:	135° C	20° C	20° C
Pumpe:	Waters Alliance 2000	Waters 590	Waters 510
Autosampler:	Waters Alliance 2000	WISP 717 - Waters	WISP 717 - Waters
Säulenofen:	Waters Alliance 2000	Waters	Waters
Säulen:	2x Waters Linear HT6E 1x PSS-SDV 300 x 8 mm, Partikelgröße 10 _u , Porengröße 10 ⁷ A	PSS-SDV 300 x 8 mm, Partikelgröße 10 _u , Porengröße 500A, 10 ⁵ A, 10 ⁶ A	PSS-SDV 300 x 8 mm, Partikelgröße 10 _u , Porengröße 500A, 10 ⁵ A, 10 ⁶ A
Detektoren:	RI Waters	RI - ERC	UV - Soma / RI - ERC
Eichkurven:	PS	PS, PDMS, Pbut	PS, PC, PI, PMMA, PPP, POS, Pm60Me, PtBMA
Meßbereich:	1000 < M _n < 7.000.000	1000 < M _n < 1.500.000	1000 < M _n < 1.500.000
Anlage / Lm:	4 : DMF	5 : Wasser	6 : Experimentalaufbau
Temperatur:	60°C	20°C	20°C

Pumpe:	Waters 510	Waters 590	Waters 590
Autosampler:	Manuelle Probenaufgabe: Rheodyne	Manuelle Probenaufgabe: Rheodyne	Manuelle Probenaufgabe: Rheodyne
Säulenofen:	Waters	-	ERC
Säulen:	PSS-SDV 300 x 8 mm, Partikelgröße 10 μ , Porengröße 500Å, 10 ⁵ Å, 10 ⁶ Å	Hema 300 x 8 mm, Partikelgröße 10 μ , Porengröße 500Å, 10 ⁵ Å, 10 ⁶ Å	-
Detektoren:	UV - Soma / RI - ERC	UV - Soma / RI - ERC	UV
Eichkurven:	PS, PqVP, PVP, PEO	PEO, PqVP, PVP, PSSNa, PMANa	-
Meßbereich:	1000 < M _n < 1.500.000	1000 < M _n < 1.500.000	< M _n <
Probenmenge:	ca.10 mg, in 20 ml Schnappdeckelglas exakt eingewogen		
Datenerfassung:	PC, Interface und Software WINGPC- PSS Auf Wunsch Daten in ASCII		

6.2.2.1 Alq₃-Polyfluoren

Alle Alq₃-Polyfluoren-Proben wurden mittels der GPC-Methode fraktioniert. Die Proben wurden in THF gelöst.

6.2.2.2 Poly(vinylpyrrolidon) (PVP)

Alle PVP-Proben mit einem Molekulargewicht über 5.000 Da wurden mittels der GPC-Methode fraktioniert. Die Proben wurden in entionisiertem Wasser aufgelöst. Die Extraktion wurde durch 0,1 molares NaNO₃-Lösung in 20 %-Acetonitril erreicht.

6.2.2.3 Poly(methylmethacrylat) (PMMA)

Gerät: Gilson von *Abimed Analysetechnik GmbH* (Langenfeld)
Säulen: 3 Jordi-Gel DVB-Säulen (10x500 mm) mit 100, 1.000 und 10.000 Å
Detektor: Gilson Refraktivindex-Detektor
Flussrate: 0,5 mL min⁻¹

Alle PMMA-Proben mit einem Molekulargewicht über 6.000 Da wurden mittels der GPC-Methode fraktioniert. Die Proben wurden in THF aufgelöst.

6.3 Massenspektrometrische Methoden

6.3.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

6.3.1.1 Massenspektrometer

Der Aufbau und das Messprinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometer sind in Kapitel 2.1.2, S. 18 beschrieben. In **Tabelle 6-4** sind die wichtigsten Bestandteile der angewendeten Geräte der Firma *Bruker Daltonik GmbH* (Bremen, Deutschland) zusammengefasst.

Tabelle 6-4: Wichtigste Gerätedaten der verwendeten MALDI-TOF-Massenspektrometer.

Bruker Reflex I:	N ₂ -Laser, Pulsdauer 3 ns
	MALDI-Ionenquelle: einstufige Beschleunigungszone, maximale Beschleunigungsspannung +/-35 kV; elektrostatische Linse
	Deflektionpulsler
	Linearer Analysator mit HIMAS [®] -Spezialdetektor
	Zweistufiger, gitterloser Ionenreflektor
	Reflektordetektor: „dual microchannel plates“ (MCP)
	1 GHz Transientenrekorder
	SUN-Workstation mit Bruker XTOF Software zur Datenauswertung
Bruker Reflex II:	Unterschiede zum Reflex I-Massenspektrometer:
	MALDI-Ionenquelle: zweistufige, mit „delayed extraction“ ausgerüstete Beschleunigungszone („delay“: 50, 150 oder 600 ns), maximale Beschleunigungsspannung +28,5 kV (-25 kV)
	Elektronisches „Gate“ zur „In-Flight“-Selektion von Ionen in einem sehr engen Massenbereich (Auflösung rund $m/\Delta m$ 100)
	Linear- und Reflektordetektor: MCP, ausgerüstet mit „detector gating“

6.3.1.2 Kalibrierung

6.3.1.2.1 MALDI-TOF-MS

In der Flugzeitmassenspektrometrie wird aus der Flugzeit des Ions nach Umrechnung über eine Kalibrierfunktion das m/z -Verhältnis bestimmt. In der Polymeranalytik wird eine Mehrpunktkalibrierung mit einem Polymerstandard (z.B. Polystyrol, Poly(ethylenglycol)) bevorzugt angewendet. Eine Mehrpunktkalibrierung hat den Vorteil, eine größere Anzahl von Messpunkten zu liefern, die eine Zuordnung zwischen Flugzeit und m/z -Verhältnis exakter macht.

Dabei wird 0,5 mg eines Poly(ethylenglycol)standards mit einer Polymerverteilung zwischen 2000 und 6000 Da in einem mL THF gelöst. 10 μL dieser Polymerlösung werden mit 10 μL einer 0,1 M Lösung von 1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol) in THF vermischt. Zu dieser Analyt-Matrix-Mischung wird ein μL einer Lösung von Natriumtrifluoracetat in THF ($3,5 \text{ mg mL}^{-1}$) als Kationisierungsmetallsalz zugegeben. Ein μL dieser Mischung wird auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

Das erhaltene Massenspektrum zeigt eine Serie von Signalen, die den Flugzeiten der Na-Pseudo-Molekülonen entsprechen. Diese Vielzahl an Signalen können jeweils ihren bekannten m/z -Verhältnissen zugeordnet werden.

6.3.1.2.2 MALDI-TOF-Fragmentionenanalytik

6.3.1.2.2.1 Aufnahme

Das Prinzip der CID-Methode wurde bereits im Kapitel 2.2.2, S. 26 erklärt. An dieser Stelle sollen nur die wesentlichen Schritte für die praktische Erzeugung eines CID-Massenspektrums zusammengefasst werden. Nach Kalibrierung des Massenspektrometers (Kapitel 6.3.1.2.1, S. 276) wird die zu untersuchende Substanz vermessen. Dabei wurden folgende Parameter angewendet:

- Beschleunigungsspannung (IS1): +28,5 kV
- Spannung der ersten Lochblende (IS2): +20,0 kV
- Delay: 50 ns (short)
- Reflektorspannung: 30,0 kV

Das Elternion wird anhand des elektronischen „Gates“ selektiert. Es werden dann 16 Einzelspektren (sogenannte Segmente) mit immer kleiner werdenden Reflektorspannungen (**Tabelle 6-5**) aufgenommen. Für jedes Segment werden 200 Laserschüsse aufaddiert. Die Laserleistung wird der Art gewählt, dass eine starke Fragmentierung mit möglichst hoher Auflösung im Massenspektrum erhalten wird. Die erhaltenen Massen der Fragmentensignale müssen nun mit der CID-Kalibrierung in die tatsächliche Masse umgerechnet werden. Nach der Kalibrierung eines jeden Segments werden nun die 16 Segmente zusammengefügt und ergeben das CID-MALDI-TOF-Fragmentmassenspektrum.

Tabelle 6-5: Verwendete Reflektorspannungen in den Segmenten.

Segment	Reflektorspannung [kV]	Segment	Reflektorspannung [kV]
1	30,00	9	5,47
2	28,30	10	4,12
3	22,59	11	3,10
4	17,01	12	2,33
5	14,60	13	1,76
6	11,50	14	1,45
7	8,60	15	1,11
8	6,80	16	0,85

Für die FAST-Kalibrierung wird ganz analog der CID-Kalibrierung verfahren. Das PSD-MALDI-TOF-Fragmentspektrum wird jedoch im Gegensatz zum CID-MALDI-TOF-Fragmentspektrum aus 15 Segmenten aufgebaut. Die dabei verwendeten Reflektorspannungen sind in **Tabelle 6-6** zusammengestellt.

Tabelle 6-6: Verwendete Reflektorspannungen in den Segmenten.

Segment	Reflektorspannung [kV]	Segment	Reflektorspannung [kV]
1	30,00	9	4,12
2	27,20	10	3,10
3	22,59	11	2,33
4	17,01	12	1,76
5	12,81	13	1,45
6	9,64	14	1,13
7	7,26	15	0,95
8	5,47 kV		

6.3.1.2.2 CID-Kalibrierung

Für die CID-Kalibrierung werden zwei Peptide mit geringem Molekulargewicht verwendet, die viele bekannte CID-Fragmentationen liefern. Mit dem ACTH-„Clip“ (18-39) wird die CID-Kalibrierung erzeugt und mit Angiotensin II überprüft. ACTH wird wie folgt präpariert:

0,24 mg ACTH wird in einem mL TA-Lösung (Wasser/Acetonitril/Trifluoressigsäure im Verhältnis 70/30/0,1%) gelöst. 20 µL dieser Lösung werden anschließend mit 180 µL TA-Lösung verdünnt und ergeben die ACTH-Lösung. Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von HCCA, ebenfalls in gelöst TA-Lösung, verwendet. Matrix- und Analytlösung werden im Verhältnis 1/1 vermengt. Ein µL der erhaltenen Analyt-Matrix-Lösung werden auf den Probenträger aufgetropft. Das Lösungsmittel wird verdampft, so dass die kristalline Analyt-Matrix-Probenmischung erhalten wird.

Die 16 Segmente eines Fragmentspektrums werden wie oben beschrieben und mit den gleichen Parametern für ACTH aufgenommen. Die CID-Kalibrierung erfolgt nun durch eine Zuordnung der auftretenden Fragmentationenmassen zu den tatsächlichen Molekulargewichten dieser ACTH-Fragmente. Nachdem für jedes Segment mindestens drei signifikante Signale zugeordnet worden sind, werden Korrekturfaktoren für jedes Teilspektrum berechnet. Eine Überprüfung der CID-Kalibrierung erfolgt dann durch die Aufnahme eines CID-Massenspektrums von Angiotensin II.

Hierzu wird 0,12 mg Angiotensin in einem mL TA-Lösung gelöst. 20 µL dieser Lösung werden anschließend mit 180 µL TA-Lösung verdünnt und ergeben die Angiotensinlösung. 10 µL dieser Lösung werden mit 10 µL einer gesättigten HCCA-Lösung (in TA) vermengt. Ein µL dieser Analyt-Matrix-Mischung wird auf den Probenträger aufgebracht. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels werden die Segmente des Fragmentationenmassenspektrums mit den selben vorgegebenen Parametern aufgenommen. Diese werden dann mit Hilfe der zuvor erstellten CID-Kalibrierung zusammengefügt. Anschließend werden die gemessenen Molekulargewichte der Angiotensinfragmente mit den bekannten Fragmentmassen verglichen. Liegen hierbei noch zu hohe

Abweichungen vor, wird die Zuordnung der ACTH-Fragmente korrigiert. Die dadurch erhaltene neue Kalibrierung wird erneut überprüft. Dieser Vorgang wird wiederholt bis eine ausreichend geringfügige Massenabweichung erhalten wird.

6.3.1.3 Allgemeine Probenpräparation

6.3.1.3.1 Lösungsmittelbasierende Probenpräparation

Bei der konventionellen MALDI-TOF-MS-Probenpräparation synthetischer Polymere oder Makromoleküle wird die zu untersuchende Probe in einem organischen Lösungsmittel (meist THF) gelöst und mit einem 1/500 molaren Überschuss einer geeigneten, ebenfalls gelösten Matrix gemischt. Als Matrix dienen niedermolekulare organische Verbindungen (Kapitel 2.1.1, S. 15), die im Bereich der verwendeten Laserwellenlänge (337 nm) ausreichend absorbieren. Bei synthetischen Polymeren wird zu dieser Analyt-Matrix-Mischung oft ein zehnmolarer Überschuss eines gelösten Metalltrifluoracetatsalzes zugesetzt, um die Ionisierung des Analyten zu begünstigen. Die Reproduzierbarkeit der Pseudo-Molekulationbildung wird dadurch erhöht und unterdrückt die in der Analyt-Matrix-Mischung vorkommenden zufälligen Verunreinigungen durch Metallspuren. Diese Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-Mischung wird auf den mobilen MALDI-Probenträger gegeben, wobei das organische Lösungsmittel schnell verdampft. Nach Auskristallisation des MALDI-Gemisches wird der Probenträger in die unter Vakuum stehende Probenkammer des Massenspektrometers überführt.

6.3.1.3.2 Lösungsmittelfreie Probenpräparation

Die Analyten und die Matrix wurden mit der Kugelmühle MM2000 der Firma *F. Kurt Retsch GmbH & Co. KG* (Haan, Deutschland) mechanisch zermahlen und homogenisiert. Für eine Mindestgesamtmenge von 5 mg an Analyt-Matrix-Probenmischung musste Sorge getragen werden. Mahlbecher wie rostfreier Stahl oder Wolframcarbid kamen zum Einsatz. Wegen Memoryeffekten wurden Einwegschüttelbecher entwickelt (**Abb. 6-19**). Unabhängig von der Beschaffenheit der Mahlbecher wurde in der Regel eine ausreichende Homogenität nach 10 min Mahldauer erhalten.

Zunächst wurde eine Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-Probenmischung mit einem molaren Verhältnis von 1/50/10 erzeugt. Aus dieser MALDI-Probenmischung wurde im Anschluss durch Zugabe von weiterer Matrix eine Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-Probenmischung mit einem molaren Verhältnis von 1/500/10 hergestellt und weitere 10 min in der Kugelmühle homogenisiert. Die daraus resultierende MALDI-Probenmischung kann in analoger Weise weiter bis 1/300.000 (Analyt-Matrix) verdünnt werden.

Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde sehr dünn mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgerieben und für eine ausreichende Haftung auf dem Probenträger gesorgt. Überschüssige Bestandteile wurden durch Luftzufuhr entfernt.

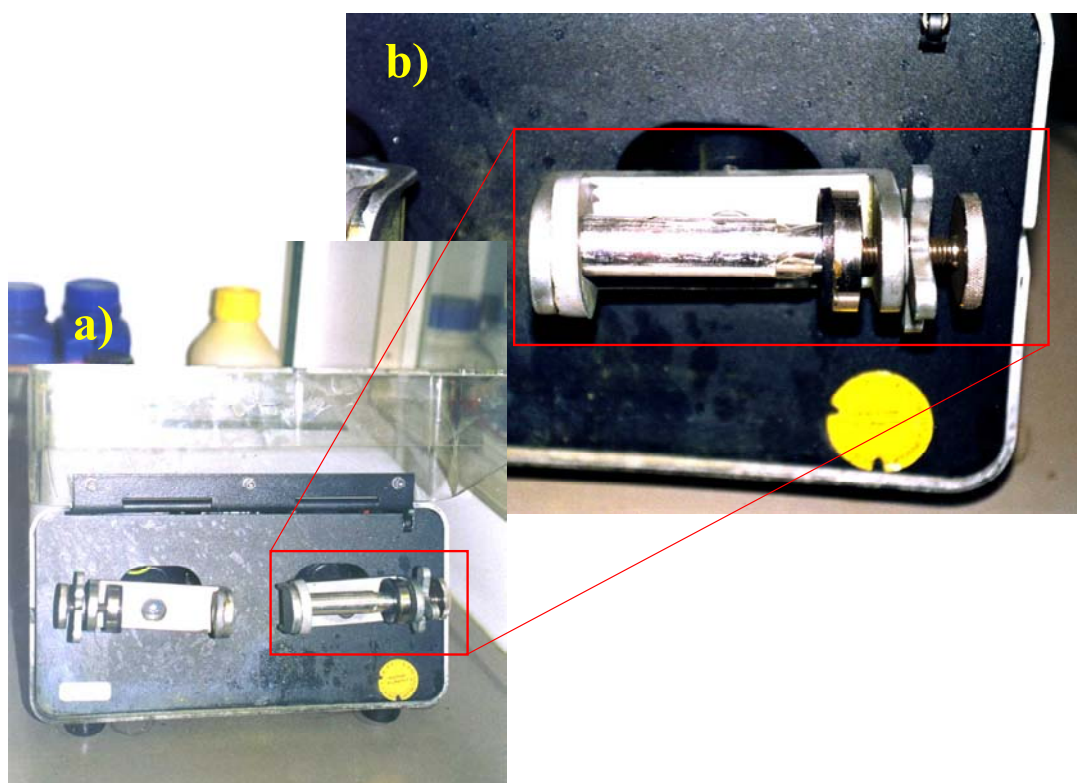


Abb. 6-19: Kugelmühle MM2000 stationiert im Abzug: a) Gesamtbild und b) Vergrößerung eines Teilbereichs zur Visualisierung eines Einwegschtütelbechers.

6.3.1.4 Probenpräparation im Speziellen

6.3.1.4.1 Untersuchungen zu der universellen Anwendbarkeit der lösungsmittelfreien Probenpräparation

Um die Untersuchungen möglichst vergleichbar zu halten, wurden die gleichen experimentellen Bedingungen für die unterschiedlichen Proben (z.B. molare Analyt/Matrix/Metallsalz-Verhältnisse, Laserleistung, Extraktionsspannung, Detektionsspannung) angewendet.

Für den direkten Vergleich wurde das erhaltene lösungsmittelfreie MALDI-Probengemisch in zwei Teile getrennt: der eine wurde direkt auf den Probenträger aufgetragen, der andere Teil wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und aufgetragen. Unmittelbar nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde die Messung durchgeführt.

Beim Vergleich der unterschiedlichen lösungsmittelfreien Auftragungsmethoden wurde das erhaltene lösungsmittelfreie MALDI-Probengemisch in zwei Teile gespalten: der eine wurde direkt auf den Probenträger aufgetragen, der andere Teil wurde ein dünnes Pellet analog eines KBr-Pellets gepresst und mittels doppelseitigem Klebeband den Probeträger aufgetragen.

Die LD-Probenpräparation wurde ebenfalls lösungsmittelfrei bzw. lösungsmittelbasierend durchgeführt.

6.3.1.4.2 Untersuchungen zu den Vorteilen der lösungsmittelfreien Probenpräparation

Der Vergleich der lösungsmittelfreien und lösungsmittelbasierenden Probenpräparation wurde analog 6.3.1.4.1 durchgeführt. Der dendritische Dendrimervorläufer $C_{132}H_{90}$ **8** (weis) und das PAH-Produkt $C_{132}H_{34}$ **9** (schwarz) wurden zunächst unabhängig voneinander charakterisiert, um deren Reinheit festzustellen. Die beiden Substanzen wurden dann in einem molaren Verhältnis Vorläufer/Produkt von 10/90 gemischt und mittels Kugelmühle homogenisiert. Das lösungsmittelfreie MALDI-Probengemisch wurde in einem Verhältnis von 1/500 eingestellt (TCNQ als Matrix) und ergab ein schwarzes Pudergemisch. Für einen direkten Vergleich mit der lösungsmittelfreien Probenpräparation würde das MALDI-Gemisch in Dichlormethan gelöst.

PS(2.000 Da)/Dithranol/Silbertrifluoracetat in molaren Analyt/Matrix/Metalltrifluoracetat-Verhältnis 1/50/10, 1/500/10, 1/5.000/10 hergestellt. Das jeweilige Gemisch wurde dann in THF bzw. Dichlormethan aufgelöst. Von dieser MALDI-Probenlösung wurde ein μL auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

PS(2.000 Da)/IAA/Silbertrifluoracetat, PMMA(2.000 Da)/IAA/Lithiumtrifluoracetat sowie PVP(2.500 Da)/Dithranol/Natriumtrifluoracetat wurden in molaren Verhältnissen von 1/500 und 1/5.000 hergestellt. PVP (10.000 Da) wurde in einem molaren Analyte/Matrix-Verhältnis von 1/50 (Matrices: IAA, DHB, HABA, Dithranol, HCCA, NA, SA, VitA, TCNQ) verwendet.

6.3.1.4.3 Polyfluoren 11

Das erhaltene Produktgemisch **11** wurde extrahiert (Toluol, 5 Tage, Soxhlet). Die unlösliche Fraktion wurde getrocknet, der lösliche Teil wurde zu einem Öl konzentriert. Bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation (Toluol) und lösungsmittelfreien Probenpräparation wurde jeweils die identische Matrix (Dithranol, TCNQ) verwendet (Analyte/Matrix/Verhältnis von 1/500). Die erhaltene lösungsmittelfreie MALDI-Probenmischung der unlöslichen Fraktion wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen. Lithium-, Natrium-, Kalium- und Silbertrifluoracetat wurden lösungsmittelfrei mit einem molaren Analyt/Metalltrifluoracetat-Verhältnis von 1/50 angefertigt. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen. Bei den Laserdesorptionmessungen wurden die PAH-Proben mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen.

Bei der lösungsmittelbasierenden Probenpräparation (Toluol) der löslichen Fraktion wurde ein Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/500 eingestellt. Lithium-, Natrium-, Kalium- und Silbertrifluoracetat wurden gegebenenfalls mit einem molaren Analyt/Metalltrifluoracetat-Verhältnis von 1/10 angefertigt.

6.3.1.4.4 Kristall 12

Die gezüchteten Kristalle wurden mit einem Doppelklebeband auf dem Probenträger befestigt. Die lösungsmittelfreie Probenpräparation erfolgte einerseits durch die Kugelmühlenbehandlung der gezüchteten Kristalle, andererseits durch die direkte Vermengung von Analyt und Matrix (DHB-Isomere, Dithranol, Anthracen). Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen.

6.3.1.4.5 PMMA 2: Fragmentionenanalytik

Dithranol- und Lithium-, Natrium-, Kalium- und Cäsiumtrifluoracetatlösungen wurden mit einer Konzentration von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ bzw. $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ in THF angefertigt. Für die MALDI-Messung von **2** wurde $0,4 \text{ mg}$ des Analyten in $80 \mu\text{L}$ THF gelöst.

Bei den GPC-Fraktionen (Kapitel 6.2.2.3, S. 275) wurde zunächst das Lösungsmittel abgedampft und anschließend mit $50 \mu\text{L}$ THF aufgenommen. Die Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-Lösung wurde in einem Verhältnis von 10/10/1 (v/v/v) hergestellt. Von dieser MALDI-Probenlösung wurde ein μL auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

6.3.1.4.6 Triblockcopolymer 14 und dessen Homopolymervorläufer PSCO₂H 13: Fragmentionenanalytik

Dithranol- und Lithium-, Natrium-, Kalium- und Silbertrifluoracetatlösungen wurden mit einer Konzentration von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ bzw. $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ in THF angefertigt. Für die MALDI-Messung von PSCO₂H **13** wurde $0,4 \text{ mg}$ des Analyten in $100 \mu\text{L}$ THF gelöst. Bei den Analytlösungen der Triblockcopolymeren **14** wurden jeweils $0,2\text{-}0,4 \text{ mg}$ in $100 \mu\text{L}$ THF gelöst. Für die Analyten **13** und **14** wurde die Analyt/Matrix/Metalltrifluoracetat-Lösung im Verhältnis 10/10/1 (v/v/v) hergestellt. Anschließend wurde ein μL dieser MALDI-Probenmischung auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

6.3.1.4.7 Synthetische Peptide 15, 16, 17: Fragmentionenanalytik

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelhaltiger Probenpräparation (THF, Dichlormethan) erzielt und mit lösungsmittelfreier Probenpräparation ergänzt. Dithranol, IAA, 2,5-DHB und HCCA wurden als Matrices eingesetzt. Für alle Matrices wurde eine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ -Lösung in THF angefertigt. $0,2\text{-}0,3 \text{ mg}$ wurden in 100 bis $200 \mu\text{L}$ THF gelöst. $10 \mu\text{L}$ der Matrixlösung wurden mit $10 \mu\text{L}$ der Analytlösung versetzt. Lithium-, Natrium-, Kalium-, und Silbertrifluoracetatlösungen wurden mit einer Konzentration von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ bzw. $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ in THF angefertigt. Die Analyt/Matrix/Metalltrifluoracetat-Lösung wurde in einem Verhältnis von 10/10/1 (v/v/v) hergestellt. Von dieser MALDI-Probenlösung wurde ein μL auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

Bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation wurde Dithranol als Matrix eingesetzt. Die molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse lagen bei 1/500. Lithium-, Natrium- und Kaliumtrifluoracetat wurden lösungsmittelfrei mit einem molaren Analyt/Metalltrifluoracetat-Verhältnis von 1/10 angefertigt. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgerieben.

6.3.1.4.8 Messung von Alq₃-Polyfluoren 18 mittels GPC-MALDI-TOF-MS *off line*

Dithranol- und Lithium-, Natrium-, Kalium- und Silbertrifluoracetatlösungen wurden mit einer Konzentration von $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ bzw. $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ in THF angefertigt. Für die MALDI-Messung von Alq₃-Polyfluoren **18** wurde $0,4 \text{ mg}$ des Analyten in $80 \mu\text{L}$ THF gelöst.

Bei den GPC-Fraktionen von **18** (Kapitel 6.2.2.1, S. 275) wurde zunächst das Lösungsmittel abgedampft und anschließend mit $80 \mu\text{L}$ THF aufgenommen. Die Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-

Lösung wurde in einem Verhältnis von 10/10/1 (v/v/v) hergestellt. Von dieser MALDI-Probenlösung wurde ein μL auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

6.3.1.4.9 Messung von N^ε-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplexe 19 mittels der „Ag-Labeling“-Methode 19

Dithranol- und Lithium-, Natrium-, Kalium- und Silbertrifluoracetatlösungen wurden lösungsmittelfrei mit einem molaren Analyt/Matrix/Metalltrifluoracetat-Verhältnis von 1/50/10 und 1/500/10 angefertigt. Für die MALDI-Messung von N^ε-Fmoc-L-Lys-Kupfer-Komplexe **19** wurde die Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-Probenmischung mit einem Spatel auf den Probenträger aufgetragen.

6.3.1.4.10 Wirt-Gast-Systeme acetylierter CDs mit ionischen Gästen 20

Dithranol und TCNQ wurden als Matrices eingesetzt. Für beide Matrices wurde eine 0,1 mol L⁻¹-Lösung in THF angefertigt. 0,4-0,5 mg des CD **20** wurden in 250 μL THF gelöst. 10 μL der Matrixlösung wurden mit 10 μL der Analytlösung versetzt. Lithium-, Kalium-, Cäsium- und Silbertrifluoracetatlösungen wurden mit einer Konzentration von 0,1 mol L⁻¹ bzw. 0,01 mol L⁻¹ in THF angefertigt. Die Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-Lösung wurde in einem Verhältnis von 10/10/1 (v/v/v) hergestellt. Von dieser MALDI-Probenlösung wurde ein μL auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

6.3.1.4.11 Supramolekulare Cyclodextrin-Gast-Komplexe 21

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelfreier Probenpräparation erzielt. TCNQ und Dithranol wurden als Matrices eingesetzt (1/50 bis 1/500 im molaren Analyt/Matrix-Verhältnis). Natriumtrifluoracetat wurde lösungsmittelfrei mit einem molaren Analyt/Metalltrifluoracetat-Verhältnis von 1/10 angefertigt. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen. Bei den Laserdesorptionsmessungen wurden die Proben mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen.

6.3.1.4.12 Nahe Infrarot (NIR)-Farbstoffe 22

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelfreier Probenpräparation erzielt. TCNQ und Dithranol wurden als Matrices eingesetzt. Metalltrifluoracetate wurden nicht eingesetzt. Die molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse lagen bei 1/500. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen. Für den direkten Vergleich mit der lösungsmittelfreien Probenpräparation wurde das lösungsmittelfreie MALDI-Gemisch in THF suspendiert und aufgetragen. Ein μL dieser Mischung wurde auf den Probenträger gebracht und das Lösungsmittel verdampft. Bei den Laserdesorptionsmessungen wurden die PAH-Proben mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen.

6.3.1.4.13 Dendrimeren 23-29

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelhaltiger Probenpräparation erzielt und mit lösungsmittelfreier Probenpräparation ergänzt. Dithranol und TCNQ wurden als Matrices eingesetzt.

Für beide Matrices wurde eine 0,1 mol L⁻¹-Lösung in THF angefertigt. 0,2-0,3 mg wurden in 100 µL THF gelöst. 10 µL der Matrixlösung wurden mit 10 µL der Analytlösung versetzt. Lithium-, Natrium-, Kalium-, und Silbertrifluoracetatlösungen wurden mit einer Konzentration von 0,1 mol L⁻¹ bzw. 0,01 mol L⁻¹ in THF angefertigt. Die Analyt-Matrix-Metalltrifluoracetat-Lösung wurde in einem Verhältnis von 10/10/1 (v/v/v) hergestellt. Von dieser MALDI-Probenlösung wurde ein µL auf den Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft.

Bei der lösungsmittelfreien Probenpräparation wurden TCNQ und Dithranol als Matrices eingesetzt. Die molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse lagen bei 1/500. Lithium-, Natrium-, Kalium- und Silbertrifluoracetat wurden lösungsmittelfrei mit einem molaren Analyt/Metalltrifluoracetat-Verhältnis von 1/50/10 bis 1/100 angefertigt. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgerieben.

6.3.1.4.14 Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffen (PAHs) 32-47

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelfreier Probenpräparation erzielt. TCNQ wurde als Matrix eingesetzt. Metalltrifluoracetate wurden nicht eingesetzt. Die molaren Analyt/Matrix-Verhältnisse lagen bei 1/500. Für einige Untersuchungen wurden molare Verhältnisse von 1/50 bis 1/300.000 verwendet. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgerieben. Bei den Laserdesorptionsmessungen wurden die PAH-Proben mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgetragen.

6.3.1.4.15 Polyvinylpyrrolidon (PVP)

6.3.1.4.15.1 Konventionelle MALDI-TOF-MS-Probenvorbereitung.

Der herkömmliche MALDI-Probenträger mit 26 „Spots“ von Bruker (Bremen, Deutschland) wurden angewendet. Die optimale Konzentration für die Adsorptionsstudien wurde evaluiert: 7,5 g L⁻¹ IAA-MALDI-Matrix (in Methanol) und 3 g L⁻¹ Natriumtrifluoroacetat (in Methanol). 10 µL die IAA-Lösung, 10 µL der wässrigen PVP-Probe und 1 µL der Metalltrifluoracetatsalzlösung wurden zusammengefügt, gemischt und auf den MALDI-Probenträger (1 µL) aufgetragen. Die Messungen wurden sofort nach Verdampfung des Lösungsmittels durchgeführt. Die unterschiedlichen Lithium-, Kalium-, Silbermetalltrifluoracetatlösungen wurden in den gleichen Konzentrationen wie das Natriumtrifluoracetat vorbereitet, und die Probenvorbereitung wurde analog durchgeführt. Die Signalintensität von PVP hing stark von der angewandten Laserleistung ab und erhöhte sich schnell an den höheren Werten, während Massenauflösung sich verringerte. Zum Versichern wurden die gleichen experimentellen Bedingungen für die unterschiedlichen Proben (z.B. Laserleistung, Extraktionsspannung, Detektionsspannung) die Analyten unverändert gehalten.

6.3.1.4.15.2 Probenvorbereitung mit dem Ankerprobenträger

Ein Anker-Targetchip-Device™ (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland), kurz Ankerprobenträger, bestehend aus einer hydrophoben Oberfläche und einigen hydrophilen Spots, auf die die Proben aufgetragen werden. Für die MALDI-TOF-MS-Messung mit der Ankerprobenträger (600-Millimeter-Durchmesser) wurde die Metalltrifluoracetatsalzmenge so gesenkt, dass 0,5 µL die IAA-Lösung und 1 µL der wässrigen Lösung hinzugefügt wurden.

6.3.1.4.15.3 Lösungsmittelfreie Probenvorbereitung

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelhaltiger Probenpräparation erzielt. Der getrocknete Schlamm wurde hierfür eingesetzt. Die Matrices (IAA, Dithranol, TCNQ) wurden in einem molaren Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/500 verwendet. Die Natriumtrifluoracetat wurde lösungsmittelfrei mit einem molaren Analyt/Metalltrifluoracetat-Verhältnis von 1/10 angefertigt. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgerieben.

6.3.1.4.16 Quantifizierungsexperimente

6.3.1.4.16.1 Polystyrole

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelhaltiger Probenpräparation erzielt. Die Polystyrole wurden in einem molaren Verhältnis von 1/1 vermengt und mittels Kugelmühle homogenisiert. Dieses Gemisch wurde mit Matrix (Dithranol) in einem molaren Analyt/Matrix-Verhältnis von 1/50 und 1/500 vermengt. In den einen Teil der Mischung wurde Silbermetalltrifluoracetat gegeben, in den anderen Natriummetalltrifluoracetat. Beide Mischungen wurden erneut mittels Kugelmühle vermengt. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgerieben.

6.3.1.4.16.2 PPV und PEG

Die MALDI-Messungen wurden mittels lösungsmittelhaltiger Probenpräparation erzielt. PPV und PEG wurden zunächst unabhängig voneinander charakterisiert, um deren Ionisation festzustellen. Die beiden Substanzen wurden dann in einem molaren Vorläufer/Produkt-Verhältnis von 1/1 gemischt und mittels Kugelmühle homogenisiert. Das lösungsmittelfreie MALDI-Probengemisch wurde in einem Verhältnis von 1/500 eingestellt (einerseits mit TCNQ als Matrix, andererseits mit Dithranol). Einen Teil der jeweiligen MALDI-Mischung wurde dann jeweils mit Natriummetalltrifluoracetat. Beide Mischungen wurden erneut mittels Kugelmühle vermengt. Die erhaltene MALDI-Probenmischung wurde mittels eines Spatels direkt auf den Probenträger aufgerieben.

6.3.2 Weitere massenspektrometrische Methoden

VG ZAB 2-SE-FPD, *S. Türk*, AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz.

IR-MALDI, *Dr. S. M. Weidner*, Bundesanstalt für Materialforschung (BAM), Berlin.

LIFT-MALDI, *Dr. F.-J. Mayer-Posner*, Bruker Daltonik, Bremen.

Electrospray-Q-TOF, *Dr. J. Spickermann*, Micromass, Deutschland.

6.4 Spektroskopische Methoden

Hochaufgelöste ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie:

Bruker AMX 300 und Bruker Avance DRX 500, *Dr. M. Wagner*, AK Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz.

UV-Spektroskopie:

Perkin Elmer UV/VIS/NIR Spectrometer Lambda 900, *L. Ghergel*, AK *Prof. K. Müllen*, MPI für Polymerforschung, Mainz.

Lichtmikroskopie:

Zeiss Stereomikroskop SR mit Photozusatz, *Dr. G. Lieser*, AK *Prof. G. Wegner*, MPI für Polymerforschung, Mainz.

7 ANHANG: STOCHASTIK ZUR STATISTISCHEN COPOLYMERANALYSE

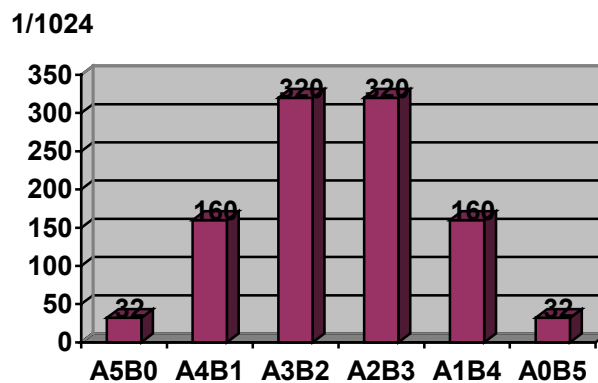
Fall 1: Ein statistisch polymerisiertes Peptid mit den Aminosäuremonomerbausteinen Glutaminsäure (A) und Lysin (B) in einem molaren Verhältnis von 50/50 in der Zusammensetzung der Reaktionspartner.

Die Wahrscheinlichkeit einer beliebigen Kette ist $\left(\frac{1}{2}\right)^5$

Tabelle 7-1: Wahrscheinlichkeiten der statistischen Pentamerzusammensetzungen aufgebaut aus zwei unterschiedlichen Monomerbausteinen im Verhältnis Glutaminsäure (A) zu Lysin (B) 50/50.

Anzahl der Möglichkeiten	Kette mit 5 Bausteinen, davon		Wahrscheinlichkeit
	A	B	
$1 = \binom{5}{0}$	5	0	$1 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^5 = 32 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$5 = \binom{5}{1}$	4	1	$5 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^5 = 160 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$10 = \binom{5}{2}$	3	2	$10 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^5 = 320 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$10 = \binom{5}{3}$	2	3	$10 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^5 = 320 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$5 = \binom{5}{4}$	1	4	$5 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^5 = 160 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$1 = \binom{5}{5}$	0	5	$1 \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^5 = 32 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$

Wahrscheinlichkeiten der Bildung einer beliebigen Kette:



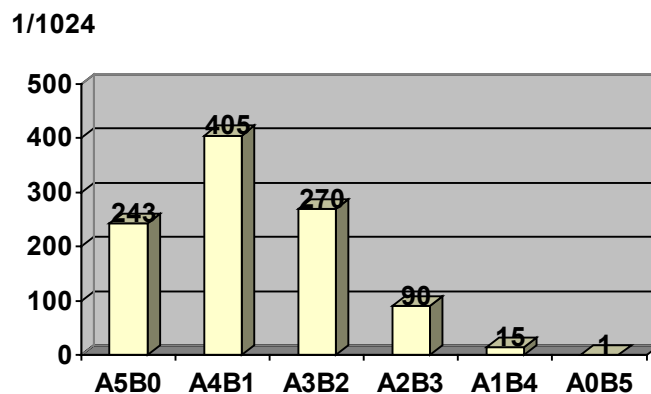
Fall 2: Ein statistisch polymerisiertes Peptid mit den Aminosäuremonomerbausteinen Glutaminsäure (A) und Lysin (B) in einem molaren Verhältnis von 75/25 in der Zusammensetzung der Reaktionspartner.

Wahrscheinlichkeit einer beliebigen Kette ist $\left(\frac{1}{4}\right)^{\sum B}$ und $\left(\frac{3}{4}\right)^{\sum A}$

Tabelle 7-2: Wahrscheinlichkeiten der statistischen Pentamerzusammensetzungen aufgebaut aus zwei unterschiedlichen Monomerbausteinen im Verhältnis Glutaminsäure (A) zu Lysin (B) 75/25.

Anzahl der Möglichkeiten	Kette mit 5 Bausteinen, davon		Wahrscheinlichkeit
	A	B	
$1 = \binom{5}{0}$	5	0	$3^5 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5 = 243 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$5 = \binom{5}{1}$	4	1	$5 \cdot 3^4 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5 = 405 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$10 = \binom{5}{2}$	3	2	$10 \cdot 3^3 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5 = 270 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$10 = \binom{5}{3}$	2	3	$10 \cdot 3^2 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5 = 90 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$5 = \binom{5}{4}$	1	4	$5 \cdot 3^1 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5 = 15 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$
$1 = \binom{5}{5}$	0	5	$1 \cdot 3^0 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5 = 1 \cdot \left(\frac{1}{4}\right)^5$

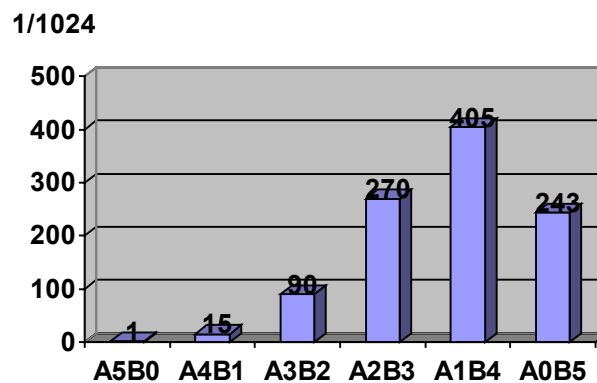
Wahrscheinlichkeiten der Bildung einer beliebigen Kette:



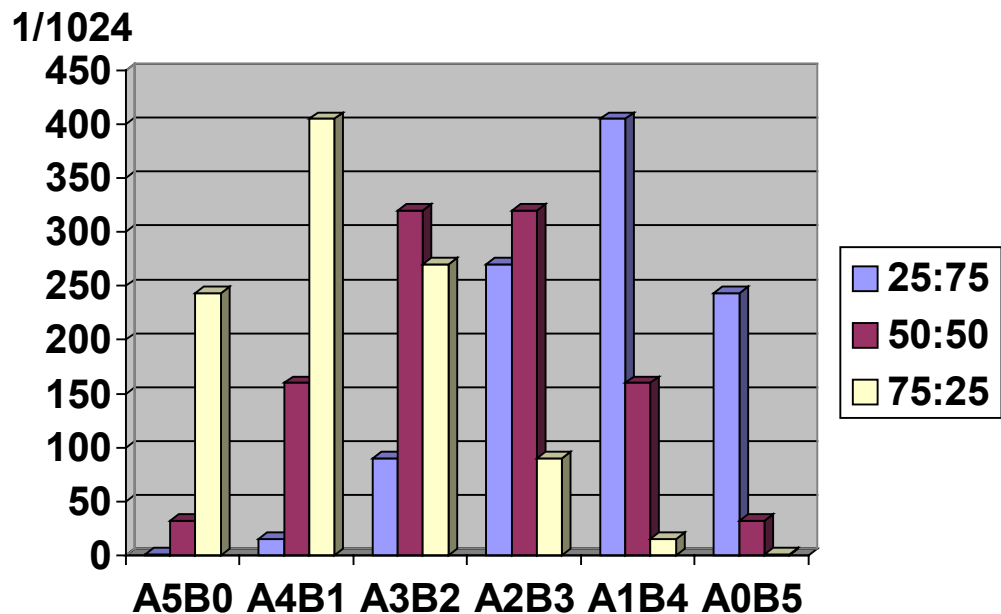
Fall 3: Ein statistisch polymerisiertes Peptid mit den Aminosäuremonomerbausteinen Glutaminsäure (A) und Lysin (B) und in einem molaren Verhältnis von 25/75 in der Zusammensetzung der Reaktionspartner.

Lösungsweg verläuft analog **Fall 2**.

Wahrscheinlichkeiten der Bildung einer beliebigen Kette:



Damit ergibt sich der folgende Gesamtverlauf der Wahrscheinlichkeiten einer beliebigen Kette in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen der Reaktionspartner:



8 BIBLIOGRAPHIE

-
- ¹ Wien, W. *Ann. Phys. Leipzig* **1902**, *8*, 224ff.
- ² Thomson, J. J. *Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analysis*, Longmans Green and Co Ltd, London **1913**.
- ³ Aston, F. W. *Phil. Mag.* **1920**, *39*, 449ff.
- ⁴ Dempster, A. J. *Phys. Rev.* **1918**, *11*, 316-325.
- ⁵ McLafferty, F. W. *Anal. Chem.* **1962**, *34*, 2-15, 16-25, 26-30.
- ⁶ Biemann, K. *Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications*, McGraw-Hill, New York **1962**.
- ⁷ McLafferty, F. W.; Bente, P. F.; Kornfeld, R.; Tsai, S.-C.; Howe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2120-2129.
- ⁸ Johnsson, R. S.; Biemann, K. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1209-1214.
- ⁹ Waller, G. R.; Dermer, O. C. *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Wiley&Sons, New York **1980**.
- ¹⁰ Djerassi, C. *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 171-184.
- ¹¹ Gupta, D.; Voelter, W. *Hypothalamic Homones – Structure, Synthesis and Biological Function*, Verlag Chemie, Weinheim **1975**.
- ¹² Self, R. *Biomed. Mass Spectrom.* **1979**, *6*, 361-373.
- ¹³ Blau, K.; King, G. S. *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden, London **1978**.
- ¹⁴ Schwartz, D. P.; Bright, R. S. *Anal. Biochem.* **1974**, *61*, 271-274.
- ¹⁵ Montaudo, G.; Przybylski, M.; Ringsdorf, H. *Makromol. Chem.* **1975**, *176*, 1763-1776.
- ¹⁶ McFadden, W. H. *Techniques of Combined Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, New York **1973**.
- ¹⁷ Halpern, B. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **1981**, *10*, 49-78.
- ¹⁸ Przybylski, M. *Habilitationsschrift*; Johannes Gutenberg-Universität: Mainz, **1987**.
- ¹⁹ Barber, M.; Green, B. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1987**, *1*, 80ff.
- ²⁰ Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. *Nature* **1981**, *293*, 270-275.
- ²¹ Biemann, K.; Martin, S. A. *Mass Spectrom. Rev.* **1987**, *6*, 1-75.
- ²² Aberth, W.; Straub, K. M.; Burlingame, A. L. *Anal. Chem.* **1982**; *54*; 2029-2034.
- ²³ Przybylski, M. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1983**, *315*, 402-421.
- ²⁴ Morris, H. R.; Pucci, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *126*, 1122-1128.
- ²⁵ Beckey, H. D. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1969a**, *2*, 500-503.
- ²⁶ Beckey, H. D. *Angew. Chem.* **1969b**, *81*, 662-690.

- ²⁷ Lattimer, R. P.; Schulten, H.-R. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, A1201.
- ²⁸ Beckey, H. D.; Schulten, H. R. *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 425-438.
- ²⁹ Blakley, C. R.; Vestal, M. L. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 750-754.
- ³⁰ Iribarne, J. V.; Dziedzic, P. J.; Thomson, B. A. *Int. J. Mass Spectrom.* **1983**, *50*, 331-347.
- ³¹ Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- ³² Meng, C. K.; Mann, M.; Fenn, J. B. *Z. Phys. D10* **1988**, 361-368.
- ³³ Feng, R.; Konishi, Y.; Bell, A. W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1991**, *2*, 387-401.
- ³⁴ Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240-2249.
- ³⁵ Clegg, G. A.; Dole, M. *Biopolymers* **1971**, *10*, 821-826.
- ³⁶ Covey, T. R.; Bonner, R. F.; Shushan, B. I.; Henion, J. D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 249ff.
- ³⁷ Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 377-390.
- ³⁸ Macfarlane, R. D.; Torgerson, D. F. *Science* **1976**, *191*, 920-925.
- ³⁹ Macfarlane, R. D.; McNeal, C.J.; Hunt, J. E. *Adv. Mass Spectrom.* **1980**, *8*, 349-354.
- ⁴⁰ Jonsson, G. P.; Hedin, A. B.; Hakansson, P. L.; Sundqvist, B. U. R.; Säve, G.; Nielsen, P. F.; Roepstorff, P.; Johanson, K. E.; Kamensky, I.; Lindberg, M. S. L. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1084-1087.
- ⁴¹ Nielsen, P. F.; Klarskov, K.; Horjup, P.; Roepstorff, P. *Biomed. Env. Mass Spectrom.* **1988**, *17*, 355-362.
- ⁴² Roepstorff, P.; Nielsen, P. F.; Klarskov, K.; Horjup, P. *Biomed. Env. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 9-18.
- ⁴³ Mann, M.; Meng, K.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1702-1708.
- ⁴⁴ Suckau, D.; Manz, I.; Schneider, K.; Przybylski, M.; Thomas, H.; Milbert, U.; Klein, J.; Post, K.; Oesch, F. *Adv. Mass Spectrom.* **1989**, *11*, 492-493.
- ⁴⁵ McNeal, C. J.; Ogilvie, K. K.; Theriault, N. Y.; Nemer, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 972-975.
- ⁴⁶ Viari, A.; Ballini, J. P.; Vigny, P.; Voituriez, L.; Cadet, J. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1989**, *18*, 547-552.
- ⁴⁷ Jardine, I.; Scanlan, G.; McNeil, M.; Brennan, P. J. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 416-422.
- ⁴⁸ Schneider, K. *Dissertation*; Universität Konstanz: **1991**, S. 90.
- ⁴⁹ Posthumus, M. A.; Kistenmaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 985-991.
- ⁵⁰ Stoll, R.; Rollgen, F. W. *Org. Mass Spectrom* **1979**, *14*, 642-645.
- ⁵¹ Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1995**, *145*, 51-77.
- ⁵² Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935-2939.
- ⁵³ Hillenkamp, F.; Karas, M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 71-77.

- ⁵⁴ Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, *78*, 53-68.
- ⁵⁵ Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N.; *Biomed. Mass Spectrom.* **1981**, *8*, 492-495.
- ⁵⁶ Hsu, B. H.; Xie, K. L.; Cooks, R. G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1983**, *51*, 225-233.
- ⁵⁷ Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151ff.
- ⁵⁸ Zakett, D.; Schoen, A. E.; Cooks, R. G.; Hemberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1295-1297.
- ⁵⁹ Wright, L. G.; Cooks, R. G.; Woods, K. V. *Biomed. Mass Spectrom.* **1985**, *12*, 159-162.
- ⁶⁰ Karas, M.; Hillenkamp, F. *International Mass Spectrometry Conference, Bordeaux*, **1988**.
- ⁶¹ Karas, M.; Bahr, U.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1989**, *92*, 231-242.
- ⁶² Chan, T. W. D.; Colburn, A. W.; Derrick, P. J.; Gardiner, D. J.; Bowden, M. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 188-194.
- ⁶³ Doktycz, S. J.; Savickas, P. J.; Krüger, D. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 145-148.
- ⁶⁴ Westman, A.; Demirev, P.; Huth-Fehre, T.; Bielawski, J.; Sundqvist, B. U. R. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *130*, 107-115.
- ⁶⁵ Spengler, B.; Kaufmann, R. *Analysis* **1992**, *20*, 91-101.
- ⁶⁶ Zhigilei, L. V.; Garrison, B. J. *J. Appl. Phys. A* **2000**, *88*, 1281-1298.
- ⁶⁷ Hillenkamp, F.; Karas, M.; Bahr, U.; Ingendoh, A. *Ion Formation from Organic Solids V*, Hedin, A.; Sunquist, B. U. R.; Benninghoven, A. (Eds.), Wiley, Chichester, **1990**, S. 111-118.
- ⁶⁸ Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1995**, *141*, 127-148.
- ⁶⁹ Karas, M.; Bahr, U.; Ingendoh, A.; Hillenkamp, F. *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 805-806.
- ⁷⁰ Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, A1193-A1203.
- ⁷¹ Gibson, B. W.; Biemann, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 1956-1960.
- ⁷² Roepstorff, P.; Nielsen, P. F.; Klarskov, K.; Horjup, P. *Biomed. Env. Mass Spectrom.* **1988**, *16*, 9-18.
- ⁷³ Svoboda, M.; Bauhofer, A.; Schwind, P.; Bade, E.; Rasched, I.; Przybylski, M. *Biochem. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 35-41.
- ⁷⁴ McIlhinney, R. A. J. *Trends in Biotechnol. Sci. USA* **1984**, *81*, 1956-1960.
- ⁷⁵ Shefton, B. M.; Buss, J. R. *J. Cell Biol.* **1987**, *104*, 1449-1453.
- ⁷⁶ Wada, Y.; Gu, J. G.; Okamoto, N.; Inui, K. *Biol. Mass Spectrom.* **1994**, *23*, 108-109.
- ⁷⁷ Suckau, D.; Mak, M.; Przybylski, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5630-5634.

- ⁷⁸ Glocker, M. O.; Borchers, C.; Fiedler, W.; Suckau, D.; Przybylski, M. *Bioconj. Chem.* **1994b**, *5*, 583-590.
- ⁷⁹ Przybylski, M. *Adv. Mass Spectrom.* **1995**, *13*, 257-283.
- ⁸⁰ van Baar, B. L. M. *FEMS Microbiology Reviews* **2000**, *24*, 193-219.
- ⁸¹ Hillenkamp, F. in W. Ens, K.G. Standing and I.V. Chernushevich (Editors), *New Methods for Study of Biomolecular Complexes, NATO ASI Series C: Mathematical and Physical Sciences*, Vol. 510, Kluwer, Dordrecht, **1998**, S. 181.
- ⁸² Moniatte, M.; Lesieur, C.; Vecseysemjen, B.; Buckley, J. T.; Pattus, F.; Vandergoot, F. G.; Vandorsselaer, A. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, *169*, 179-199.
- ⁸³ Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 198-202.
- ⁸⁴ Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R., Jäger, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6*, 105-108.
- ⁸⁵ Gross, J.; Strupat, K. *Trends in Analytical Chemistry* **1998**, *17*, 470-484.
- ⁸⁶ Grishko, V. P.; Grishko, V. I.; Glick, B. R. *Biotechn. Advances* **1999**, *17*, 341-362.
- ⁸⁷ Larsen, M. R.; Roepstorff, P. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 677-690.
- ⁸⁸ Kellner, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 517-524.
- ⁸⁹ Ross, L. P.; Belgrader, P. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3966-3972.
- ⁹⁰ Kirpekar, F.; Nordhoff, E.; Kristiansen, K.; Roepstorff, P.; Lezius, A.; Hahner, S.; Hillenkamp, F. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3866-3870.
- ⁹¹ Harvey, D. J. *Mass Spectrom. Reviews* **1999**, *18*, 349-450.
- ⁹² Yamagaki, T.; Nakanishi, H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1069-1074.
- ⁹³ Juasz, P.; Costello, C. E. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 785-796.
- ⁹⁴ Juasz, P.; Costello, C. E.; Biemann, K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 399-409.
- ⁹⁵ Nordhoff, E.; Kirpekar, F.; Karas, M.; Cramer, R.; Hahner, S.; Hillenkamp, F.; Kristiansen, K.; Roepstorff, P.; Lezius, A. *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 2460-2465.
- ⁹⁶ Limbach, P. A.; Crain, P. F.; McCloskey J. A. *Current Opinion in Biotechn.* **1995**, *6*, 96-102.
- ⁹⁷ Griffin, T. J.; Tang, W.; Smith, L. M. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 1368-1372.
- ⁹⁸ Jiang-Baucom, P.; Girard, J. E.; Butler, J.; Belgrader, P. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4894-4898.
- ⁹⁹ Ross, P. L.; Lee, K.; Belgrader, P. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4197-4202.
- ¹⁰⁰ Dalluge, J. J. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 701-711.
- ¹⁰¹ Bahr, U.; Deppe, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2866-2869.
- ¹⁰² Schriemer, D. C.; Li, L. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2721-2725.
- ¹⁰³ Przybilla, L.; Räder, H. J.; Müllen, K. *Eur. Mass Spectrom.* **1999**, *5*, 133-143.
- ¹⁰⁴ Przybilla, L.; Francke, V.; Räder, H. J.; Müllen, K. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4401-4405.

- ¹⁰⁵ Kim, Y. L.; Hercules, D. M. *Macromolecules* **1994**, *27*, 7855-7871.
- ¹⁰⁶ Montaudo, G.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 453-460.
- ¹⁰⁷ Martin, K.; Spickermann, J.; Räder, H. J.; Müllen, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1471-1474.
- ¹⁰⁸ Garozzo, D.; Impallomeni, G.; Spina, E.; Sturiale, L.; Zanetti, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 937-941.
- ¹⁰⁹ Montaudo, G.; Garozzo, D.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F. *Macromolecules* **1995**, *28*, 7983-7989.
- ¹¹⁰ Montaudo, G.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1158-1163.
- ¹¹¹ Fei, X.; Murray, K. K. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3555-3560.
- ¹¹² Pasch, H.; Rode, K. *J. Chromatogr. A* **1995**, *699*, 21-29.
- ¹¹³ Hanton, S. D. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 527-569.
- ¹¹⁴ Zhu, H. H.; Yalcin, T.; Li, L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 275-281.
- ¹¹⁵ Przybilla, L. M.; Brand, J. D.; Yoshimura, K.; Räder, H. J.; Müllen, K. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4591-4597.
- ¹¹⁶ Bosman, A.W.; Janssen, H. M.; Meijer, E. W. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665-1688.
- ¹¹⁷ Süßmuth, R. D.; Jung, G. *J. Chromatogr. B* **1999**, *725*, 49-65.
- ¹¹⁸ Rucareanu, S.; Mongin, O.; Schuwey, A.; Hoyler, N.; Gossauer, A.; Amrein W.; Hediger, H. U. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4973-4988.
- ¹¹⁹ Hensel, R. R.; King, R. C.; Owens, K. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1785-1793.
- ¹²⁰ Zhang, L.K.; Gross, M.L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 854-865.
- ¹²¹ Griffin, T.J.; Gygi, S.P.; Rist, B.; Aebersold, R.; Loboda, A.; Jilkine, A.; Ens, W.; Standing, K.G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 978-986.
- ¹²² Skelton, R.; Dubois, F.; Zenobi, R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1707-1710.
- ¹²³ Stimson, E.; Truong, O.; Richter, W. J.; Waterfield, M. D.; Burlingame, A. L. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *169/170*, 231-240.
- ¹²⁴ Moniatte, M.; Lesieur, C.; Vecseysemjen, B.; Buckley, J. T.; Pattus, F.; Vandergoot, F. G.; Vandorsselaer, A. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1997**, *169/170*, 179-199.
- ¹²⁵ Przybilla, L. M. *Dissertation*; Johannes Gutenberg-Universität: Mainz, **2000**, S. 90.
- ¹²⁶ Krüger, R. P. *GIT Fachz. Lab.* **1995**, *3*, 189ff.
- ¹²⁷ Mandell, J. G.; Falick, A. M.; Komives, E. A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3987-3995.
- ¹²⁸ Rusconi, F.; Schmitter, J.-M.; Dossier, J.; le Maire, M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3046-3052.

- ¹²⁹ Langley, G. J.; Herniman, J. M.; Davies, N. L.; Brown, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1717-1723.
- ¹³⁰ Vandell, V. E.; Limbach, P. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 2014-2021.
- ¹³¹ Tang, W.; Krause, J.; Zhu, L.; Smith, L. M. *Intern. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, *169/170*, 301-311.
- ¹³² Nielen, M. W. F. *Mass Spectrom. Reviews* **1999**, *18*, 309-344.
- ¹³³ Kampmeier, J.; Dreisewerd, K.; Schürenberg, M.; Strupat, K. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *169/170*, 31-41.
- ¹³⁴ Cotter, R. J. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1027A-1039A.
- ¹³⁵ Kaufmann, R.; Kirsch, D.; Spengler, B. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *131*, 355-385.
- ¹³⁶ Kaufmann, R.; Spengler, B.; Lützenkirchen, F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 902-910.
- ¹³⁷ Cohen, S. L.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 31-37.
- ¹³⁸ Latourte, L.; Blais, J.-C.; Tabet, J.-C. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2742-2750.
- ¹³⁹ Karas, M.; Bahr, U.; Strupat, K.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 675-679.
- ¹⁴⁰ Juhasz, P.; Costello, C. E.; Bierman, K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 399-409.
- ¹⁴¹ Chou, C. W.; Williams, P.; Limbach, P. A. *Intern. J. Mass Spectrom.* **1999**, *193*, 15-27.
- ¹⁴² Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Rossel-Larsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J. Mizgorodskaya, E.; Kroll-Kristensen, A.; Palm L.; Roepstorff, P. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 593-601.
- ¹⁴³ Dale, M. J.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3321-3329.
- ¹⁴⁴ Simmons, T. A.; Limbach, P. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 668-675.
- ¹⁴⁵ Kassis, C. M.; DeSimone, J. M.; Linton, R. W.; Lange, G. W.; Friedman, R. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1462-1466.
- ¹⁴⁶ Schnaible, V.; Michels, J.; Zeth, K.; Freigang, J.; Welte, W.; Bühler, S.; Glocker, M. O.; Przybylski, M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, *169*, 165-177.
- ¹⁴⁷ Lin, S. H.; Cotter, R. J.; Woods, A. S. *Proteins (Suppl 2)* **1998**, 12-21.
- ¹⁴⁸ Jensen, C.; Haebel, S.; Andersen, S. O.; Roepstorff, P. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, *160*, 339-356.
- ¹⁴⁹ Tang, X. D.; Dreifuss, P. A.; Vertes, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1141-1147.
- ¹⁵⁰ Hoberg, A. M.; Haddleton, D. M.; Derrick, P. J.; Jackson, A. T.; Scrivens, J. H. *European Mass Spectrom.* **1998**, *4*, 435-440.
- ¹⁵¹ Bolbach, G.; Riaki, K.; Spiro, M.; Brunot, A.; Breton, F.; Blais, J. C. *Analisis* **1993**, *21*, 383-387.
- ¹⁵² Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1998**, *60*, 2299-2301.
- ¹⁵³ Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3281-3287.

- ¹⁵⁴ Onnerfjord, P.; Ekstrom, S.; Bergquist, J.; Nilsson, J.; Laurell, T.; Marko-Varga, G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 315-322.
- ¹⁵⁵ Perera, I. K.; Kantartzoglou, S.; Dyer, P. E. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1996**, *156*, 151-172.
- ¹⁵⁶ Retsch GmbH & Co. KG (Haan, Germany), Herstellerangaben.
- ¹⁵⁷ Morozov, V.; Merron, B.; Williams, I. D.; Davies, R. J. H.; Hughes, I. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 97-103.
- ¹⁵⁸ Polyscience Europe GmbH (Eppelheim, Germany), Herstellerangaben.
- ¹⁵⁹ Räder, H. J.; Spickermann, J.; Kreyenschmidt, M.; Müllen, K. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 3285-3296.
- ¹⁶⁰ Remmers, M.; Müller, B.; Martin, K.; Köhler, W.; Räder, H. J. *Macromolecules* **1999**, *32*, 3190-3194.
- ¹⁶¹ Trimpin, S.; Eichhorn, P.; Räder, H. J.; Müllen, K.; Knepper, T. P. *J. Chrom. A* **2001**, *938*, 67-77.
- ¹⁶² Trimpin, S.; Keune, S.; Räder, H. J.; Müllen, K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* submitted.
- ¹⁶³ Cotter, R. J. *Anal. Chim. Acta* **1987**, *195*, 45-59.
- ¹⁶⁴ Constantin, F.; Schnell, A. *Mass Spectrometry*, Ellis Horwood Limited: Chichester, **1991**.
- ¹⁶⁵ Nuwaysir, L. M.; Wilkins, C. L. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 279-282.
- ¹⁶⁶ Nuwaysir, L. M.; Wilkins, C. L.; Simonsick, W. J. Jr. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1990**, *1*, 66-77.
- ¹⁶⁷ Jones, R. M.; Lamb, J. H.; Lim, C. K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 921-923.
- ¹⁶⁸ Srinivasan, N.; Haney, C. A.; Lindsey, J. S.; Zhang, W. Z.; Chait, B. T. *J. Porphyrins & Phthalocyanines* **1999**, *3*, 283-291.
- ¹⁶⁹ Herod, A. A.; Lazaro, M.-J.; Rahman, M.; Domin, M.; Cocksedge, M. J.; Kandiyoti, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1627-1634.
- ¹⁷⁰ Domin, M.; Moreea, R.; Lazaro, M.-J.; Herod, A. A.; Kandiyoti, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 638-645.
- ¹⁷¹ Yoshimura, K.; Przybilla, L. M.; Brand, J.-D.; Wehmeier, M.; Ito, S.; Räder, H. J.; Müllen, K. *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 215-222.
- ¹⁷² Williams, J. B.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. *Macromolecules* **1997**, *30*, 3781-3787.
- ¹⁷³ Burkoth, A. K.; Anseth, K. S. *Macromolecules* **1999**, *32*, 1438-1444.
- ¹⁷⁴ Kim, S. H.; Shin, C. M.; Yoo, J. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 701-704.
- ¹⁷⁵ Leuninger, J.; Trimpin, S.; Räder, H. J.; Müllen, K. *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 2832-2842.
- ¹⁷⁶ Setayesh, S.; Grimdale, A. C.; Weil, T.; Enkelmann, V.; Müllen, K.; Meghdadi, F.; List, E. J. W.; Leising, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 946-953.
- ¹⁷⁷ Beavis, R. C.; Bridson, J. N. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1993**, *26*, 442-447.

- ¹⁷⁸ Xiang, F.; Beavis, R. C. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1424-1429.
- ¹⁷⁹ Fournier, I.; Beavis, R. C.; Blais, J. C.; Tabet, J. C.; Bolbach, G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1997**, *169/170*, 19-29.
- ¹⁸⁰ Horneffer, V.; Dreisewerd, K.; Ludemann, H. C.; Hillenkamp, F.; Lage, M.; Strupat, K. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *187*, 859-870.
- ¹⁸¹ Horneffer, V.; Forsmann, A.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Kubitscheck U. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1016-1022.
- ¹⁸² Krause, J.; Stoeckli, M.; Schlunegger, U. P. *Rap. Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1927-1933.
- ¹⁸³ Macha, S. F.; Limpach, P. A.; Hanton, S. D.; Owens, K. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12*, 732-743.
- ¹⁸⁴ Macha, S. F.; Limpach, P. A.; Savickas, P. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 731-737.
- ¹⁸⁵ Jackson, A. T.; Yates, H. T.; Scrivens, J. H.; Critchley, G.; Brown, J.; Green, M. R.; Bateman, R. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1668-1674.
- ¹⁸⁶ Jackson, A. T.; Scrivens, J. H.; Simonsick, W. J.; Green, M. R.; Bateman, R. H. *47th ASMS, Dallas Tx*, **1999**.
- ¹⁸⁷ Jackson, A. T.; Yates, H. T.; Scrivens, J. H.; Green, M. R.; Bateman, R. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 1206-1213.
- ¹⁸⁸ Jackson, A. T.; Jennings, K. R.; Scrivens, J. H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 76-85.
- ¹⁸⁹ Scrivens, J. H.; Jackson, A. T.; Yates, H. T.; Green, M. R.; Critchley, G.; Brown, J.; Bateman, R. H.; Bowers, M.T.; Gidden, J. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *165/166*, 363-375.
- ¹⁹⁰ Gidden, J.; Jackson, A. T.; Scrivens, J. H.; Bowers, M. T. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 121-130.
- ¹⁹¹ Rosselli, S. *Dissertation*; Johannes Gutenberg-Universität: Mainz, **2001**, S. 44.
- ¹⁹² Lloyd, P. M.; Suddaby, K. G.; Varney, J. E.; Scrivener, E.; Derrick, P. J.; Haddleton, D. M. *Eur. Mass Spectrom.* **1995**, *1*, 293-300.
- ¹⁹³ Montaudo, G.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 1011-1015.
- ¹⁹⁴ Montaudo, G.; Montaudo, M. S.; Puglisi, C.; Samperi, F. *Macromolecules* **1995**, *28*, 4562-4569.
- ¹⁹⁵ Pasch, H.; Gores, F. *Polymer* **1995**, *36*, 1999-2005.
- ¹⁹⁶ Jolliffe, K. A.; Calama, M. C.; Fokkens, R.; Nibbering, N. M. M.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1247-1251.
- ¹⁹⁷ Green-Church, K. B.; Limbach, P. A. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5322-5325.
- ¹⁹⁸ Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*, VCH: Weinheim, **1995**.
- ¹⁹⁹ Lehn, J.-M. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347-1362.
- ²⁰⁰ Weidl, C. H. *Diplomarbeit*, Technische Universität: München, **1997**.
- ²⁰¹ Stang, P. J.; Chen, K.; Arif, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8793-8797.

- ²⁰² Woods, A. S.; Buchsbaum, J. C.; Worall, T. A.; Berg, J. M.; Cotter, R. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4462-4465.
- ²⁰³ Vitalini, D.; Mineo, P.; Di Bella, S.; Fragalà, I.; Maravigna, P.; Scamporrino, E. *Macromolecules* **1996**, *29*, 4478-4487.
- ²⁰⁴ Dai, Y.; Katz, T. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1274-1285.
- ²⁰⁵ Juhasz, P.; Costello, C. E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 343-351.
- ²⁰⁶ Lee, S.; Winnik, M. A.; Whittal, R. M.; Li, L. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3060-3072.
- ²⁰⁷ Whittal, R. M.; Li, L. *Macromol. Rapid Commun.* **1996**, *17*, 59-64.
- ²⁰⁸ Kinumi, T.; Saisu, T.; Takayama, M.; Niwa, H. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 417-422.
- ²⁰⁹ Calama, M. C.; Hulst, R.; Fokkens, R.; Nibbering, N. M. M.; Timmerman, P.; Reinhoudt, D. N.; *Chem. Commun.* **1998**, 1021-1022.
- ²¹⁰ Schubert, U.; Eschbaumer, C. *J. Incl. Phenomena Macroc. Chem.* **1999**, *35*, 101-109.
- ²¹¹ Balzani, V.; De Cola, L. *Supramolecular Chemistry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht **1991**.
- ²¹² Lehn, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89-112.
- ²¹³ Vincenti, M. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 925-938.
- ²¹⁴ Mele, A.; Pezzetta, D.; Sevva, A. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *193*, L1.
- ²¹⁵ Glocker, M. O.; Bauer, S. H. J.; Kast, J.; Volz, J.; Przybylski, M. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1221-1227.
- ²¹⁶ Wang, Y. Q.; Rashidzadeh, H.; Guo, B. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 639-643.
- ²¹⁷ Rashidzadeh, H.; Wang, Y.; Guo, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 439-443.
- ²¹⁸ Ashton, P. R.; Gattuso, G.; Königer, R.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9553-9555.
- ²¹⁹ Gubskaya, A. V.; Aksyonov, S. A.; Kalinkevich, A. N.; Lisnyak, Y. V.; Chuev, V. P.; Chivanov, V. D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1874-1878.
- ²²⁰ Yoshida, Z.; Takekuma, H.; Takekuma, S.; Yoshiharu, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1597-1599.
- ²²¹ Eichhorn, P.; Knepper, T. P. *J. Chrom. A* **1999**, *854*, 221-232.
- ²²² Ngoka, L. C. Gal, J. F.; Lebrilla, C. B. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 692-698.
- ²²³ Becker, S. *Dissertation*; Johannes Gutenberg-Universität: Mainz, **2001**, S. 67-98.
- ²²⁴ Nierengarten, H.; Felder, D.; Leize, E.; Nierengarten, J.-F.; Gisselbrecht, J.-P.; Van Dorselaer, A. in *Proceedings of the 48th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, Ca, **2000**.
- ²²⁵ Becker, S. *Dissertation*; Johannes Gutenberg-Universität: Mainz, **2001**, S. 133-186.
- ²²⁶ Martin, K. *Dissertation*; Johannes Gutenberg-Universität: in Bearbeitung.
- ²²⁷ M. Zander, *Polycyclische Aromaten - Kohlenwasserstoffe und Fullerene*, Teubner: Stuttgart, **1995**

- ²²⁸ A. Gavezzoti, *Acta Cryst.* **1988**, B44, 427-434.
- ²²⁹ G.R. Desiraju, A. Gavezzoti, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 621-622.
- ²³⁰ H. Bengs, F. Closs, T. Frey, D. Funhoff, H. Ringsdorf, K. Siemensmeyer, *Liq. Cryst.* **1991**, 15, 565-574.
- ²³¹ D. Adam, P. Schumacher, J. Simmerer, L. Häussling, W. Paulus, K. Siemensmeyer, K.H. Etzbach, H. Ringsdorf, *Adv. Mater.* **1995**, 7, 276-280.
- ²³² E. Clar, *Aromatische Kohlenwasserstoff - Polycyclische Systeme*, Springer: Berlin, **1952**; E. Clar, *The Aromatic Sextet*, Wiley: London, **1972**.
- ²³³ J. R. Dias, *Handbook of Polycyclic Hydrocarbons - Part a: Benzenoid Hydrocarbons*, Elsevier: Amsterdam, **1987**; *Top. Curr. Chem. 153 (Advances in the Theory of Benzenoid Hydrocarbons)*, **1990**
- ²³⁴ Stabel, A.; Herwig, P.; Müllen, K. Rabe, J. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1609-1611.
- ²³⁵ Berresheim, A. J.; Müller, M.; Müllen, K. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1747-1785.
- ²³⁶ Simpson, C. D.; Brand, J. D.; Berresheim, A. J.; Przybilla, L.; Räder, H. J.; Müllen, K. *Chem. Europ. J.* **2002**, 8, 1424-1429.
- ²³⁷ G.R. Desiraju, A. Gavezzotti, *Acta Cryst.* **1989**, B45, 473-482.
- ²³⁸ Eckert, J.-F.; Nicoud, J.-F.; Nierengarten, J.-F.; Liu, S.-G.; Echegoyen, L.; Barigelletti, F.; Armaroli, N.; Ouali, L.; Krasnikov, V.; Hadziioannou *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7467-7479.
- ²³⁹ E. Constantin, A. Schnell, *Mass Spectrometry*, Ellis Horwood Limited, Chichester **1991**.
- ²⁴⁰ van de Craats, A. M.; Warman, J. M.; Müllen, K.; Geerts, Y.; Brand, J. D. *Adv. Materials* **1998**, 10, 36ff.
- ²⁴¹ Fikentscher, H.; Herrle, K. *Modern Plastics* **1945**, 23, 157ff.
- ²⁴² Bühler, V. Kollidon, 4th Edition BASF AG **1999**.
- ²⁴³ Wessel, W.; Schoog M.; Winkler, E. *Arzneim-Forsch (Drug Res)* **1971**, 21, 1468ff.
- ²⁴⁴ Robinson, B. V.; Sullivan, F.M., Borzelleca, J.F.; Schwartz, S.L. PVP - A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone) Lewis, Michigan, **1990**, S. 209
- ²⁴⁵ Jäger, U.; Denzinger, W. *Tenside Surf. Det.* **1991**, 28, 6ff.
- ²⁴⁶ Hazenkamp, M. F.; Bachmann, F.; Dannacher, J.J.; Schlingloff, G. *Tens., Surf., Det.* **1999**, 36, 393-398.
- ²⁴⁷ Eichhorn, P.; Knepper, T. P. *J. Chrom. A* **1999**, 854, 221-232.
- ²⁴⁸ Eichhorn, P.; Knepper, T. P. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 468-475.
- ²⁴⁹ Jonkers, N.; Knepper, T. P.; deVoogt, P. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 335-340.
- ²⁵⁰ Knepper, T. P.; Kirschhöfer, F.; Lichter, I.; Maes, A.; Wilken, R.-D. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 945-950.
- ²⁵¹ Knepper, T. P.; Sacher, F.; Lange, F. T.; Brauch, H. J.; Karrenbrock, F.; Roerden, O.; Lindner, K. *Waste Managem.* **1999**, 19, 77-99.

- ²⁵² Müller, K. *Pharm. Acta Helv.* **1968**, *43*, 107ff.
- ²⁵³ Breinlich, J. *Pharm. Ztg* **1973**, *118*, 440ff.
- ²⁵⁴ Ericsson, I.; Ljunggren, L. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1990**, *17*, 251-260.
- ²⁵⁵ Uchiyama, T.; Kawachi, A.; Duval, D. L. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1998**, *45*, 111-119.
- ²⁵⁶ Levy, G. B.; Frank, H. P. *J. Polym. Sci.* **1955**, *17*, 247-254.
- ²⁵⁷ Scholtan, W. *Macromolek. Chem.* **1951**, *7*, 209-235.
- ²⁵⁸ Kirsh, Yu. E.; Karaputadze, T. M.; Svergun, V. N.; Soos, T. A.; Sutkevich, L. A.; Tverdohlebova, N. P.; Panov, V. P. *Khim-Farm. Zh.* **1980**, *7*, 107-110.
- ²⁵⁹ Kirsch, Y. E. *Water Soluble Poly-N-Vinylamides. Synthesis and Physicochemical Properties*, Wiley, Chichester **1988**, S. 81.
- ²⁶⁰ Gidden, J.; Wytttenbach, T.; Batka, J. J.; Weis, P.; Jackson, A. T.; Scrivens, J. H.; Bowers, M. T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 883-895.
- ²⁶¹ Cavalli, L.; Cassani, G.; Lazzarin, M. *Tenside, Surf., Det.* **1996**, *33*, 158ff.
- ²⁶² Simone Junker, Staatsexamensarbeit **1998**.
- ²⁶³ Karrer, P.; Büchi, J. *Helv. Chim. Acta* **1937**, *20*, 86-90.
- ²⁶⁴ Henczi, M.; Weaver, D. F. *OPPI BRIEFS*, **1994**, *26*, 578-580.
- ²⁶⁵ Morgenroth, F.; Müllen, K. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15349-15366.
- ²⁶⁶ Berresheim, A. J. *Dissertation*; Johannes Gutenberg-Universität: Mainz, **2000**.
- ²⁶⁷ Wiesler, U. M. *Dissertation*; Johannes Gutenberg-Universität: Mainz, **2001**.