

Review

MATRICOM POTPOMOĞNUTA IONIZACIJA LASERSKOM DESORPCIJOM

Marko ROŽMAN

Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Primljeno veljače 2003.

Veliki zamah u razvoju spektrometrije masa omogućilo je uvođenje matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom (MALDI) te ionizacije elektroraspršenjem. Usprkos velikoj popularnosti i analitičkoj primjeni MALDI metode, temeljni procesi formiranja iona i desorpcije još uvijek nisu razjašnjeni. Kemijski procesi u MALDI procesu događaju se kako prilikom pripreme uzorka, tako i tijekom desorpcije/ionizacije pa se oba procesa odražavaju na spektar masa. U radu su opisani priprema uzorka i model procesa desorpcije/ionizacije kojeg je predložila istraživačka skupina M. Karasa početkom 2000. godine.

KLJUČNE RIJEČI: *desorpcija, elektroraspršenje, ionizacija*

POPIS KRATICA

| | | | |
|------------------|--|-------|--|
| Ani ⁻ | Anion / Anion | IR | Infracrveno / Infrared |
| Cat ⁺ | Kation / Cation | LDI | Ionizacija laserskom desorpcijom / Laser Desorption Ionization |
| DE | Odgodena ekstrakcija / Delayed Extraction | M | Analit / Analyte |
| DHB | 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina / 2,5-dihydroxybenzoic acid | MALDI | Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom / Matrix Assisted Laser Desorption Ionization |
| DNA | Deoksiribonukleinska kiselina / Deoxyribonucleic Acid | MS | Spektrometrija masa / Mass Spectrometry |
| ESI | Elektroraspršenje / Electrospray Ionization | PAN | Poliakrilnitril / Polyacrylnitrile |
| FAB | Bombardiranje brzim atomima / Fast Atom Bombardment | PEG | Polietilenglikol / Polyethyleneglycol |
| FIB | Bombardiranje brzim ionima / Fast Ion Bombardment | PMMA | Polimetilmetakrilat / Polymethylmethacrylate |
| FTMS | Fourier transformirana spektrometrija masa / Fourier Transform Mass Spectrometry | PS | Polistiren / Polystyrene |
| ICR | Ionsko Ciklotronska Rezonancija / Ion Cyclotron Resonance | RNA | Ribonukleinska kiselina / Ribonucleic Acid |
| | | T | Matrica / Matrix |
| | | TOF | Vrijeme proleta / Time-of-Flight |
| | | UV | Ultraljubičasto / Ultraviolet |

Nedavno razvijene ionizacijske tehnike spektrometrije masa, matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom, MALDI, (1-4) te ionizacija elektroraspršenjem, ESI, (5-7) imaju istaknutu primjenu u analizi sintetskih i bioloških polimera (peptida, proteina, glikoproteina, oligonukleotida, oligosaharida) zahvaljujući svojstvima koja nadilaze

ograničenja što su ih postavljale klasične tehnike, npr. ionizacija udarom elektrona. Naime, MALDI i ESI su ionizacijske tehnike koje uspijevaju ionizirati i prevesti masivnu, termolabilnu i nehlapivu molekulu u plinsku fazu što je osnovni zahtjev za daljnju analizu spektrometrom masa.

Prije otkrića MALDI-a iskušavane su različite ionizacijske tehnike za ionizaciju nehlapljivih makromolekula, npr. bombardiranje brzim atomima, FAB, (8,9), bombardiranje brzim ionima, FIB, (10) te ionizacija laserskom desorpcijom, LDI (11).

Od gore spomenutih tehnika najviše je obećavala LDI. Šezdesetih godina prošlog stoljeća počinju istraživanja glede uporabe lasera za generiranje iona organskih molekula koji bi se potom analizirali u spektrometru masa. Istraživači su eksperimentirali s različitim valnim duljinama laserskog zračenja (od dalekog ultraljubičastog, UV, do dalekog infracrvenog, IR) te različitim vremenima trajanja laserskog pulsa (od ps do kontinuiranog pulsa)¹²⁻¹⁶. Najboljima su se pokazali laseri koji emitiraju u dalekom UV-u, dakle pobuđuju elektronska stanja, te laseri koji pobuđuju rotacijsko-vibracijska stanja, dakle valne duljine u dalekom IR-u. Trajanje laserskog pulsa najčešće je u intervalu od 1 do 100 ns čime izbjegavamo raspad termički labilne molekule jer je energija prenesena u vrlo kratkom vremenu.

LDI je kao metoda bila ograničena na biomolekule relativnih molekulskih masa ne većih od 2000, i sintetske polimere relativnih molekulskih masa ne većih od 9000. Kao još jedno ograničenje javljala se smanjena reproducibilnost rezultata. Ograničenja su uzrokovana desorpcijskim procesom koji općenito inducira fragmentaciju molekula analita (4).

Veliki iskorak u primjeni laserske desorpcije za analizu molekula velikih masa učinjen je 1987. godine kada je istraživačka grupa *Hillenkampa i Karasa* (1) predložila uvođenje matrice kao rješenje problema fragmentacije analita. Tehniku kakvu danas poznajemo, a to je mala koncentracija molekula analita koji vrlo slabo apsorbira na valnoj duljini laserskog pulsa u smjesi s čvrstom ili tekućom matricom, koja se sastoji od malih molekula koje jako apsorbiraju na valnoj duljini laserskog pulsa, predlažu u svojim radovima *Tanaka i suradnici*, (2) te *Hillenkamp i Karas* (3). *Kiochi Tanaka* je upravo za taj rad koji je omogućio daljnji razvoj MALDI ionizacijske tehnike u analizi bioloških makromolekula, primio 2002. godine Nobelovu nagradu za kemiju.

PRIPREMA UZORKA I ODABIR MATRICE

Važno je istaknuti da se kemijski procesi u MALDI procesu događaju kako prilikom pripreme uzorka, tako i u procesu desorpcije/ionizacije te se oba procesa odražavaju na spektar masa.

Priprema uzorka i odabir matrice od presudne je važnosti za uspjeh MALDI eksperimenta. Postupak uključuje dva koraka. Prvi je otapanje i eventualno pročišćavanje pojedine komponente ili smjese uzorka od moguće prisutnih pufera, soli, detergenata i spojeva za denaturaciju. Nije loše napomenuti da su MALDI pokusi izuzetno otporni na prisutne nečistoće uzorka za razliku od ESI pokusa. Neki od uobičajenih onečišćivača i maksimalne koncentracije koje ne utječu na rezultate eksperimenta navode se u radovima *Hillenkampa i suradnika* (4), *Posthumusa i suradnika* (16) te u knjizi *Ashcrofta* (17). Velika analitička prednost ove tehnike je mogućnost primjene s osjetljivošću do ~1 fmol analita unesenog u instrument, a sama količina analita upotrebjenog u analizi mnogo je manja od one unesene u instrument (4). Također, MALDI tehnika nema ograničenja vezana s primarnom, sekundarnom ili tercijskom molekulskom strukturom analita (4).

Drugi korak u postupku je odabir pogodne matrice, miješanje matrice i analita, moguće dodavanje aditiva, nanošenje smjese na podlogu-metu koja je načinjena od inernih materijala te na kraju izbor kristalizacijskih uvjeta.

Za MALDI eksperimente, dobra matrica je ona koja producira primarno molekulske ione analita s malo ili bez fragmentacije te koja zadovoljava nekoliko općih uvjeta. Matrica mora dobro apsorbirati na valnoj duljini zračenja laserskog pulsa, dobro izolirati molekule analita jednu od druge, zatim kokristalizirati s molekulama analita i ne producirati ionske interferencije s molekulama ispitivane tvari (4). Optimalni molarni odnos analit : matrica za MALDI ionizaciju je u intervalu od 1:100 do 1:50000 (4).

Izbor odgovarajuće matrice mora biti prilagođen svojstvima samog analita i tehnici pripreme uzorka, npr.:

- sinapinska kiselina se često upotrebljava u analizi proteina, a upotrebljava se i u analizi glikopeptida i glikoproteina (18-20),
- kvaliteta spektra masa glikopeptida u 2,5-dihidroksibenzojevoj kiselini, DHB, kao matrici jako ovisi o morfologiji kristala uzorka (21),
- glicerol sprječava desorpciju kod primjene UV lasera, dok je izuzetno dobar kao IR matrica (4),
- generiranje satelitskih signala koji su nešto većih masa od molekulskog iona. Nastanak ovakvih iona je uzrokovan adicijom fotokemijski generiranih fragmenata molekule matrice, dok je intenzitet ovih signala u čvrstoj vezi s odabirom matrice npr. nikotinska kiselina producira vrlo

intenzivne signale ovakvih adukata za razliku od 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline (4,22).

U tablici 1 dan je popis najčešće korištenih matrica u analizi pojedinih grupa biopolimera (17).

Tablica 1 Prikaz najčešće korištenih matrica u MALDI analizi pojedinih grupa biopolimera. Uspješna matrica je označena znakom +

| Matrica | Peptidi i proteini | Oligonu- kleotidi | Oligosaharidi i glikoproteini |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina | + | + | - |
| 3-hidroksipikolinska kiselina | - | + | - |
| 2,4,6-trihidroksi-acetofenon | - | + | - |
| 2,5-dihidroksi-benzojeva kiselina | + | + | + |
| Sinapinska kiselina | + | - | - |
| Nikotinska kiselina | + | - | - |
| 3-amino-4-hidroksi-benzojeva kiselina | - | - | + |

Prikaz najčešće rabljenih matrica u analizi sintetskih polimera dan je u tablici 2 (23). U tablici 2 analizirana su četiri tipa polimera: polistiren, PS, (nepolaran, topljiv u organskim otapalima), polimetilmetakrilat, PMMA, (dijelomično polaran, topljiv u organskim otapalima), polietilenglikol, PEG, (polaran, topljiv u vodi) i poliakrilnitril, PAN, (djelomično polaran, topljiv u organskim otapalima) u kombinaciji s devet matrica.

Tablica 2 Prikaz MALDI analize četiri polimera (PEG, PS, PMMA, PAN) s 9 različitih matrica. Uspješna matrica je označena znakom +

| Matrica | PEG | PS | PMMA | PAN |
|---|-----|----|------|-----|
| α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina | + | + | + | - |
| 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina | + | - | + | - |
| 3-hidroksipikolinska kiselina | - | + | + | - |
| 4-hidroksibenziliden malononitril | + | + | + | + |
| 5-klorosalicilna kiselina | + | + | + | - |
| 2-aminobenzojeva kiselina | - | + | + | - |
| 1,8,9-trihidroksiacetofenon | + | + | + | - |
| 2-(4-hidroksifenilazo) benzojeva kiselina | + | + | + | - |
| Sinapinska kiselina | + | - | + | - |

Najčešće upotrebljavane tehnike za pripremu uzoraka za MALDI eksperiment, metoda sušene kapljice, metoda tankog sloja te «sandwich» metoda, opisane su u radovima *Karasa i suradnika* (24,25), u knjizi *Ashcrofta* (17) te u radu *Srzić i suradnika* (26).

Naboj analita u otopini zadržan je i nakon njegovog ugrađivanja i kokristalizacije s molekulama matrice što vrlo dobro pokazuju eksperimenti s organskim pH-indikatorima koji su bili ugrađeni u kristale matrice te su zadržali obojenje za dani pH (25).

Moguće su sljedeće situacije unutar kristala matrice, [...] (27):

1. $[\infty T/M_n]$ za neutralnu molekulu analita, M, u idealno čistoj matrici, T.
2. $[\infty T/M_n/Cat_m^+/Ani_m^-]$ za neutralnu molekulu analita onečišćenu solju koja se sastoji od kationa, Cat^+ , i aniona, Ani^- .
3. $[\infty T/(M+xH^+)/_n/nxAni^-]$ za nabijenu protoniranu molekulu analita.
4. $[\infty T/(M-xH^+)/_n/nxCat^+]$ za nabijenu deprotoniranu molekulu analita.

MALDI TEHNIKA

Sama tehnika se temelji na desorpciji analita prethodno ugrađenog u kristalnu strukturu molekula matrice koja služi kao nosač za ione koji trebaju biti generirani iz polarnih ili nabijenih molekula uzorka. Nakon što laserski puls svoju energiju zračenja, najčešće valne duljine u UV području, preda matrici, dolazi do njenog naglog zagrijavanja jer molekule matrice apsorbiraju energiju zračenja oslobađaju u obliku topline (28). Na površini matrice dolazi do fazne promjene (čvrsto - tekućina pod visokim tlakom/plin pod visokim tlakom) te se događa adijabatska ekspanzija u vakuum (29). Molekule matrice u plinovitoj fazi formiraju karakterističan plinoviti oblik perjanice (plume) koji osim molekula matrice sadrži i molekule analita. Kao posljedica adijabatske ekspanzije javlja se ubrzanje perjanice te njezino hlađenje. Brzina iona može se razdijeliti na dvije komponente: aksijalnu (okomitu na uzorak) i radijalnu (paralelnu s uzorkom) (30). U aksijalnom smjeru molekule analita se u perjanici ubrzavaju do određene maksimalne brzine koja ovisi o matrici (tablica 3), dok u radijalnom smjeru brzina molekula analita opada s povećanjem mase (24, 30). Temperatura perjanice se kao rezultat početne adijabatske ekspanzije te sporijeg, postupnog

hlađenja perjanice razrijeđenjem u vakuumu (nakon 50 ns), stabilizira na oko 400 K (24, 30-32).

Tablica 3 Početna brzina iona [inzulin+H]⁺ desorbiranog iz raznih matrica N₂ laserom valne duljine 337 nm

| Matrica | Početna brzina (ms ⁻¹) |
|--|------------------------------------|
| 2-(4-hidroksifenilazo)benzojeva kiselina | 273 |
| α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina | 291 |
| 2,4,6-trihidroksiacetofenon hidrat | 306 |
| 6-aza-2-tiotimin | 315 |
| Sinapinska kiselina | 332 |
| 2,6-dihidroksiacetofenon | 353 |
| 2-hidroksi-5-metiksibenzojeva kiselina | 384 |
| Ferulična kiselina | 410 |
| 3-hidroksipikolinska kiselina | 444 |
| 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina | 543 |

Budući da za određeni uzorak početna brzina iona matrice i analita ovisi samo o vrsti matrice, nađene su sljedeće karakteristike:

- ioni analita mogu biti ubrzani do maksimalne brzine matrice samo u slučaju kada su ugrađeni u kristal matrice, a ne samo adsorbirani na površini (30).
- početne brzine iona ne ovise o trajanju laserskog pulsa, tj. o vremenu izlaganja uzorka fotonima laserskog zračenja (24).
- različite skupine analita imaju različite početne brzine iona. Npr. ioni proteina i peptida imaju signifikantno veće početne brzine od iona ugljikohidrata (24).
- dodavanje aditiva u smjesu matrice i analita znatno utječe na početne brzine iona (24).
- matrice koje produciraju molekulske ione bez ili s malo fragmentacije, proizvode ione veće brzine (24).

Brzina desorbiranih molekula, mogućnost efikasnog mjerenja generiranih iona u širokom području masa, točno određivanje i visoko razlučivanje u području velikih masa, postali su novi zahtjevi za analizatore na spektrometrima masa.

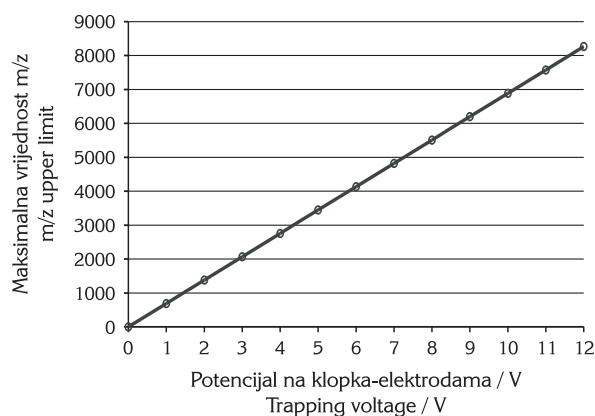
Gore navedeni zahtjevi ograničavaju tipove spektrometara masa koji mogu biti jednostavno korišteni uz ovu ionizacijsku tehniku. Na prvi pogled gore navedene zahtjeve najbolje zadovoljavaju analizator masa s vremenom proleta, TOF, i analizator ionsko-ciklotronske rezonancije, ICR, koji koristi Fourier transformirana spektrometrija masa, FTMS (11-12), mada su i oni u početku razvoja tehnike pokazivali određene nedostatke.

Kod TOF analizatora glavni nedostatak je bio slabo razlučivanje. Kod prvih MALDI TOF instrumenata mijenjala se raspodjela kinetičke energije po ionima, tako da je bilo otežano fokusiranje iona iste vrijednosti omjera mase i naboja, m/z , što je uzrokovalo širenje signala. Širenje signala se reduciralo ugradnjom ionskog zrcala koje može korigirati manje razlike u raspodjeli kinetičke energije za ione iste m/z vrijednosti, što omogućava bolje fokusiranje te smanjenje širine signala (33). Ovo rješenje bilo je samo ublažavanje problema koji je konačno riješen uvođenjem odgođene ekstrakcije, DE, (34-36). Naime, prije uvođenja odgođene ekstrakcije ioni analita su ubrzavani u električnom polju od samog trenutka formiranja, tj. ubrzavani su kroz gustu perjanicu desorbiranog materijala što je bio glavni razlog otežanog fokusiranja iona iste m/z vrijednosti. U odgođenoj ekstrakciji ubrzanje iona tj. primjena električnog polja odgođena je dok se perjanica ne rasprši (nakon 200 ns), tako da je izbjegnuta mogućnost međusobnog sudara molekula analita, matrice i desorbiranog materijala tijekom ubrzanja (37).

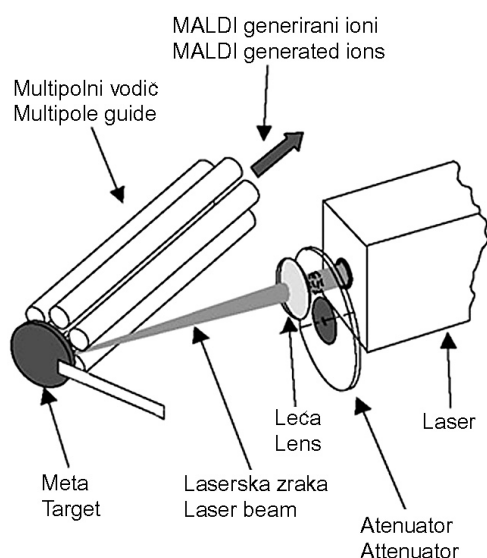
U slučaju FT ICR MS analizatora masa najveći nedostatak je bila nemogućnost mjerenja molekula velikih masa generiranih MALDI tehnikom. Naime, velike molekule generirane na ovaj način imaju visoke translacijske energije te ne mogu biti jednostavno uhvaćene u FTMS analizatorskoj ćeliji (38).

Budući da početna brzina iona ovisi o matrici, npr. korištenju najčešće upotrebljavane MALDI matrice, 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline, ioni $m/z > 15000$ imaju u pravilu kinetičku energiju veću od 20 eV. Tako velika kinetička energija i napon na elektrodama klopke koji bi eventualno zaustavio ion, remeti željeno ciklotronsko gibanje te je nemoguće detektirati ion.

Na slici 1 dan je odnos m/z iona generiranog MALDI tehnikom koji ima aksijalnu brzinu od 440



Slika 1 Odnos maksimalne vrijednosti m/z i potencijala klopka-elektrode pri aksijalnoj brzini od 440 m/s



Slika 2 Vanjski MALDI ionski izvor

m/s i potencijal klopka-elektrode koji ga uspijeva zaustaviti.

Problem je ublažen uvođenjem sudarnog plina (npr. He, mala masa, inertan plin) koji je sudarima ion-molekula smanjivao aksijalnu brzinu molekula. Uvođenje plina narušavalo je visoki vakuum u analizatorskoj ćeliji što je često rezultiralo gubitkom spektra (38). Problem je riješen uklanjanjem MALDI ionskog izvora iz analizatorske ćelije, slika 2 (39-41). U tom slučaju MALDI ionski izvor je smješten izvan magnetskog polja i visokog vakuuma. Ioni su generirani u vanjskom izvoru, sudarnim plinom smanjena im je brzina te su multipolnim ionskim vodičem dovedeni u analizatorsku ćeliju. Zbog velike osjetljivosti, točnosti i razlučivanja koja je viša nego kod bilo koje druge tehnike spektrometrije masa, u ovoj kombinaciji (vanjski MALDI ionski izvor i FT ICR MS) (40,41) dobivena je osjetljivost do 10 atto mola analita te rezolucija od 10^6 .

U plinovitoj fazi, unutar perjanice, neutralno nabijene molekule (matrice, analita i ostalih ionskih vrsta koje su se nalazile u kristalima matrice) međusobno su povezane vodikovim vezama i

Coulombovim privlačnim silama te tvore malene, kratkoživuće klasterne koji nastaju pri prijelazu iz čvrste u plinovitu fazu (27,31). Coulombova privlačna sila između samih klastera ne dolazi do izražaja zbog značajne kinetičke energije koja je posljedica procesa desorpcije. Početni naboj klastera je statističke prirode i povezan je sa suviškom/manjkom kationa ili aniona. Također je nađeno da je višestruki naboj karakterističan za vrlo male klasterne što je posljedica nemogućnosti da se svi ioni suprotnog naboja koji bi globalno neutralizirali klaster, smjeste u tako mali prostor. Kod početnih, višestruko nabijenih, pozitivnih klastera dolazi do smanjenja naboja elektronima koji nastaju u procesu fotoionizacije matrice. U slučaju negativnih klastera, redukcija naboja je posljedica reakcije s protoniranom matricom koja je također produkt fotoionizacije. Nađeno je da su procesi redukcije naboja u vrlo jakoj vezi s nabojnim brojem. Neutralizacija klastera je dominantan proces tako da krajnje opaženi ioni mogu biti samo jednostruko nabijeni (27,31,32).

Smanjivanje i konačan nestanak klastera te formiranje krajnjih ionskih vrsta, rezultat je gubitka neutralnih molekula matrice i neutralnih produkata kemijskih reakcija (27). U tablicama 4 i 5 prikazani su samo reakcijski putevi klastera koji vode do stvaranja iona analita. U svim slučajevima prikazanim u tablici postoji kompeticija za naboj između analita i matrice (u slučaju a, b, c, i f smatra se da analit ima veći protonski afinitet od matrice kao što je to slučaj i s tipičnim analitima npr. peptidima).

Kationski i anionski adukti trebali bi se pojaviti u MALDI spektrima u skladu s brojem i polarnošću naboja na analitu. Metalni kationi često se pojavljuju, osobito ako analit ima negativan naboj koji nije u ravnoteži s pozitivnim (d,e). Anionski adukti podliježu transferu sa susjednih pozitivnih mjesta na analitu te se uglavnom ne pojavljuju u spektrima. Moguće ih je zamijetiti u slučaju kada se u klasteru pojavljuju dvije anionske vrste, jače i slabije bazična (42). Tada se u

Tablica 4 Klasteri te njihovi ionski i neutralni produkti ($x > 0, x > y$), pozitivan način snimanja

| Klaster | Ionski i neutralni produkti | |
|--|--|---|
| $\{nT-MH^+\}^+$ | $\rightarrow MH^+ + nT$ | a |
| $\{nT-MH_x^{x+}-(x-1)Ani\}^+$ | $\rightarrow MH^+ + (x-1)HAni + nT$ | b |
| $\{nT-MH_x^{x+}-(x-y-1)Ani1-yAni2\}^+$ | $\rightarrow (MH_{y-1}^{(y-1)+} + yAni2)^+ + (x-y-1)HAni + nT$ | c |
| $\{nT-M-Cat^+\}^+$ | $\rightarrow M-Cat^+ + nT$ | d |
| $\{nT-M-Me^{2+}-Ani\}^+$ | $\rightarrow ((M-H)+Me)^+ + nT + HAni$ | e |
| $\{(n-1)T-M-T^{+}\}^{+}$ | $\rightarrow MH^+ + (n-1)T + (T-H)^+$ | f |

Tablica 5 Klasteri te njihovi ionski i neutralni produkti ($x > 0$), negativan način snimanja

| Klaster | | Ionski i neutralni produkti | |
|--|---------------|-----------------------------------|---|
| $\{nT \rightarrow (M-H)\}^-$ | \rightarrow | $M-H + nT$ | a |
| $\{nT \rightarrow M-xH\}^{x-} \rightarrow (x-1)NH_4^+\}$ | \rightarrow | $(M-H)^+ + (x-1)NH_3 + nT$ | b |
| $\{nT \rightarrow (M-xH)^{x-} \rightarrow (x-1)Cat^+\}$ | \rightarrow | $((M-xH)^{x-} + (x-1)Cat^+) + nT$ | c |
| $\{nT \rightarrow MH_x^{x+} \rightarrow (x+1)Ani^-\}$ | \rightarrow | $(M-H)^+ + (x+1)HAni + nT$ | d |
| $\{nT \rightarrow M \rightarrow Ani^-\}$ | \rightarrow | $(M-H)^+ + nT + HAni$ | e |
| $\{nT \rightarrow M \rightarrow Ani^-\}$ | \rightarrow | $M + nT + Ani^-$ | f |

spektru pojavljuje molekulski ion s vezanim aduktima slabije bazične anionske vrste (c).

MALDI spektri peptida i proteina (17)

U MALDI analizi peptida i proteina, molekule uzorka ioniziraju se vezanjem protona, tako da u spektrima prevladava intenzivan MH^+ signal koji u nekim slučajevima može biti praćen signalom dimera $[2M+H]^+$ (npr. kada se koristi α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina kao matrica, ali samo u uzorcima relativne molekulske mase manje od 12000). Ako se kao matrica koristi sinapinska kiselina, u uzorcima koji imaju relativnu molekulsku masu veću od 12000 amu, uz dominantan MH^+ signal može se pojaviti i prateći signal mase $[M+206]^+$ koji odgovara vezanju dehidrirane sinapinske kiseline.

MALDI spektri oligosaharida i glikoproteina

Molekule oligosaharida i glikoproteina ioniziraju se gotovo isključivo vezanjem Na^+ , tako da je za njihove MALDI spektre karakterističan osamljeni signal MNa^+ u pozitivnom načinu snimanja (43). Oligosaharidi i glikoproteini koji sadrže karboksilne funkcionalne grupe daju dobre MH^+ signale u negativnom načinu snimanja (21).

MALDI spektri oligonukleotida (44-47)

U MALDI analizi oligonukleotida molekule uzorka ioniziraju se vezanjem alkalijevih metala. Kationizacija alkalijevim metalima može se izbjeći dodatkom amonijevog iona u smjesu matrice i analita. Preporučljivo je MALDI analizu oligonukleotida započeti korištenjem 3-hidroksipikolinske ili sinapinske kiseline kao matrice u kombinaciji s IR laserom.

MALDI spektri sintetskih polimera

Prednosti MALDI tehnike u analizi sintetskih polimera su velika osjetljivost koja omogućava dobivanje spektara velike rezolucije korištenjem male količine uzorka te određivanje brojčanog

prosješka relativnih molekulskih masa (M_n) i masenog prosješka relativnih molekulskih masa (M_w) u kratkom vremenu (23,48,49). Neovisnost o strukturi uzorka, primjenjivost u području niskih molekulskih masa i superiorna osjetljivost omogućuju nam primjenu u analizi krajnjih skupina te u detekciji kopolimera, aditiva i nečistoća. U MALDI analizi sintetskih polimera, nabijeni ioni nastaju vezanjem kationa Li^+ , Na^+ , K^+ i Ag^+ (23). Kationizacija se potiče dodatkom soli u smjesu matrice i uzorka.

Usporedba MALDI i ESI

Najčešće upotrebljavane blage tehnike za ionizaciju sintetskih i biopolimera u spektrometriji masa su MALDI i ESI. Obje tehnike imaju svoje prednosti i mane te ih je relativno teško usporediti, budući da su općenito povezane s različitim analizatorima masa. Razvoj obiju tehnika omogućio je povezivanje oba ionska izvora s gotovo svim raspoloživim analizatorima masa. Kako bi što bolje usporedili obje ionizacijske tehnike, razmatrat ćemo ih zajedno s analizatorom masa koji daje najbolje performanse za danu tehniku. Kao što je već rečeno, MALDI tehnika daje najbolje rezultate povezana s TOF analizatorima te u novije vrijeme i s FT ICR MS analizatorima. Kod ESI tehnike najbolji rezultati su dobiveni u kombinaciji s FT ICR MS. U tablici 6 dana je usporedba MALDI i ESI tehnike s obzirom na mogućnost analize različitih spojeva, dok je u tablici 7 dana usporedba karakteristika MALDI-a i ESI-a.

Tablica 6 Usporedba MALDI i ESI s obzirom na mogućnost analize različitih spojeva. Uspješna metoda je označena oznakom +

| Klase spojeva | Elektroaspršenje | MALDI |
|--------------------|------------------|-------|
| Proteini i peptidi | + | + |
| Oligonukleotidi | + | + |
| Oligosaharidi | + | + |
| Polarni spojevi | + | + |
| Nepolarni spojevi | - | + |
| Sintetski polimeri | -/+ | + |

Tablica 7 Usporedba karakteristika MALDI i ESI tehnika

| | Elektroraspršenje | MALDI |
|---------------------------|---|---|
| Spektar masa | - višestruko nabijeni ioni i fragmenti, najčešće: $(M+nH)^{n+}$ i $(M+nH)^{n-}$ - složeni spektri masa, potrebna dekonvolucija | - najčešće osamljeni signal analita MH^+ - jednostavni spektri masa |
| Adukti | - pojava kationskih i anionskih adukata | - pojava kationskih adukata - anionski adukti se pojavljuju u rijetkim slučajevima kad se u klasteru pojavljuju dvije anionske vrste |
| Onečišćenja | - slaba tolerancija onečišćenja | - puno veća tolerancija onečišćenja |
| Kromatografske metode | - moguće je povezati ESI izvor s tekućinskom kromatografijom i kapilarnom elektroforezom | - ne |
| Rezolucija i krajnje mase | - bolja rezolucija budući da višestruki naboji smještaju molekulu u područje manjeg m/z | - nešto slabija rezolucija zbog značajne brzine/kinetičke energije iona |
| Osjetljivost | - amol | - amol |
| MS-MS | - da | - da |

LITERATURA

- Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* 1987;78:53-68.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988;2:151-3.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299-301.
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 1991;63:1193A-203A.
- Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* 1984;88:4451-9.
- Yamashita M, Fenn JB. Negative ion production with the electrospray ion source. *J Phys Chem* 1984;88:4671-5.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
- Macfarlane RD, Torgerson DF. Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. *Science* 1976;191:920-5.
- Benninghoven A, Sichtermann WK. Detection, identification and structural investigation of biologically important compounds by secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem* 1978;50:1180-4.
- Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RS, Tayler AN. Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): A new ion source for mass spectrometry. *J Chem Soc Chem Commun* 1981;7:325-7.
- Cotter RJ. Laser mass spectrometry: an overview of techniques, instruments and applications. *Anal Chim Acta* 1987;195:45-59.
- Lubman DM. *Lasers and Mass Spectrometry*. Oxford (NY): Oxford University Press; 1990.
- Vanvaeck L, Vanroy W, Struyf H, Adams F. Organic and inorganic analysis with laser microprobe mass spectrometry.1. Instrumentation and methodology. *Mass Spectrometry Rev* 1994;13:189-208.
- Kovalev ID, Maksimov AG, Schukov IA, Larin NV. Analytical capabilities of laser-probe mass spectroscopy. *Int J Mass Spectrom* 1978;27:101-37.
- Conzemius RJ, Capellen MJ. A review of the applications to solids of the laser ion source in mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* 1980;34:197-271.
- Posthumus MA, Kistemaker PG, Meuzelaar HLC. Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules. *Anal Chem* 1978;50:985-91.
- Ashcroft AE. *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*. Cambridge (UK): RSC Analytical Spectroscopy Monographs; 1997.
- Chou JZ, Kreek MJ, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of biotransformation products of dynorphin a in vitro. *J Am Soc Mass Spectrom* 1994;5:10-6.
- Gusev AI, Wilkinson WR, Proctor A, Hercules DM. Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in maldi analysis. *Anal Chem* 1995;67:1034-41.

20. Billeci TM, Stults JT. Tryptic mapping of recombinant proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 1993;65:1709-16.
21. Harvey DJ, Rudd PM, Batteman RH, Bordoli RS, Howes K, Hoyes JB, i sur. Examination of complex oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on time-of-flight and magnetic sector instruments. *Org Mass Spectrom* 1994;29:753-66.
22. Beavis RC, Chait BT. Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1989;3:233-7.
23. Linnemayr K, Vana P, Allmaier G. Time-delayed extraction matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polyacrylonitrile and other synthetic polymers with the matrix 4-hydroxybenzylidene malononitrile. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1344-50.
24. Glückmann M, Karas M. The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *J Mass Spectrom* 1999;34:467-77.
25. Krüger R, Pfenninger A, Fournier I, Glückmann M, Karas M. Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Anal Chem* 2001;73:5812-21.
26. Kazaić S, Pećur S, Srzić D. Matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja. *Kem Ind* 1999;48:181-7.
27. Karas M, Glückmann M, Schäfer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* 2000;35:1-12.
28. Senko MW, McLafferty FW. Mass spectrometry of macromolecules - has its time now come. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994;23:763-85.
29. Beavis RC, Chait BT. Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption. *Chem Phys Lett* 1991;181:479-84.
30. Garrison BJ, Zhigilei LV. Velocity distributions of analyte molecules in matrix-assisted laser desorption from computer simulations. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1273-7.
31. Zhigilei LV, Kodali PBS, Garrison BJ. On the threshold behavior in laser ablation of organic solids. *Chem Phys Lett* 1997;276:269-73.
32. Vertes A, Irinyi G, Gijbels R. Hydrodynamic model of matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Anal Chem* 1993;65:2389-93.
33. Mamyryn BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA. The mass-reflectron, a new non-magnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov Phys JETP* 1973;37:45-8.
34. Brown RS, Lennon JJ. Sequence specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein peptide ions. *Anal Chem* 1995;67:3990-9.
35. Juhasz P, Vestal ML, Martin SA. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1995;9:1044-50.
36. Juhasz P, Roskey MT, Smirnov IP, Haff LA, Vestal ML, Martin SA. Applications of delayed extraction matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to oligonucleotide analysis. *Anal Chem* 1996;68:941-6.
37. Juhasz P, Vestal ML, Martin SA. On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption/ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* 1997;8:209-17.
38. Wood TD, Schweikhard L, Marshall AG. Mass-to-charge ratio upper limits for Matrix-assisted laser desorption Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 1992;64:1461-9.
39. McIver RT, Li Y, Hunter RL. Matrix-assisted laser desorption/ionization with an external ion source fourier-transform mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994;8:237-41.
40. Baykut G, Jertz R, Witt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with pulsed in-source collision gas and in-source ion accumulation. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14:1238-47.
41. Baykut G, Fuchser J, Witt M, Weiss G, Gosteli C. A combined ion source for fast switching between electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16:1631-41.
42. Krüger R, Karas M. Formation and fate of ion pairs during MALDI analysis: Anion adduct generation as an indicative tool to determine ionization processes. *J Am Soc Mass Spectrom* 2002;13:1218-26.
43. Huberty MC, Vath JE, Martin SA. Site-specific carbohydrate identification in recombinant proteins using maldi-tof ms. *Anal Chem* 1993;65:2791-800.
44. Karas M, Bahr U. Laser desorption/ionization mass spectrometry of large biomolecules. *Trends Anal Chem* 1990;9:321-5.
45. Nordhoff E, Ingendoh A, Cramer R, Overberg A, Stahl B, Karas M, i sur. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1992;6:771-6.
46. Kirpekar F, Nordhoff E, Kristiansen K, Roepstorff P, Lezius A, Hahner S, i sur. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa. *Nucleic Acid Res* 1994;22:3866-70.

47. Kirpekar F, Nordhoff E, Kristiansen K, Roepstorff P, Hahner S, Hillenkamp F. 7-deaza purine bases offer a higher ion stability in the analysis of DNA by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1995;9:525-31.
48. He M, He J, Mi Q, Zhou Q. Characterization of mesogen-jacketed liquid crystalline polymers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000;14:1806-12.
49. Mincheva Z, Hadjieva P, Kalcheva V, Seraglia R, Traldi P, Przybylski M. Matrix-assisted laser desorption/ionization, fast atom bombardment and plasma desorption mass spectrometry of polyethylene glycol esters of (2-benzothiazolon-3-yl) acetic acid. *J Mass Spectrom* 2001;36:626-32.

Summary

MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION

Since its invention, matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) has found wide application in mass spectrometry of high molecular weight compounds such as synthetic polymers and biopolymers. Despite widespread application of MALDI, the fundamental processes of ion formation and desorption are still poorly understood. The chemistry of the MALDI process, occurring both during sample preparation and during ionization is reflected in the mass spectrum.

As the MALDI technique now stands, a low concentration of analyte molecules, which usually exhibit only moderate absorption per molecule, is embedded in matrix crystals consisting of a small, highly absorbing species. In this manner the efficient and controllable energy transfer is retained while the analyte molecules are separated from excessive energy that would lead to their decomposition.

The matrix is believed to serve two major functions: adsorption of energy from the laser light and the isolation of analyte molecules from each other. There are 3 major methods for the preparation of samples for analysis which are quite quick and simple: dried droplet, surface and sandwich preparation. Experiments with pH indicator dyes serve as proof that analyte's charge state in the matrix crystals is the same as in solution.

Upon laser desorption a sudden and explosive phase transition occurs and a dense plume of desorbed material is formed. The initial velocity of analyte ions in the plume depends only on the matrix used. Initial species formed as a result of laser desorption are tiny clusters. They consist of a matrix, analyte and other ionic species embedded in the matrix crystals all held together by hydrogen bonds and coulombic interactions. The first essential charging and thus ionization process is the statistical occurrence of clusters with a deficit/excess of anions or cations. Very small initial clusters are a likely to be highly charged. Highly charged initial clusters cannot survive in the matrix plume and their charge drops. Clusters shrink by evaporation of neutral molecules. This paper presents only those cases leading to analyte ions and compares MALDI and the electrospray ionization technique.

KEY WORDS: *desorption, electrospray, ionization*

REQUESTS FOR REPRINTS:

Marko Rožman
Institute Ruđer Bošković
Bijenička 54, HR-10000 Zagreb
E-mail: marko@joker.irb.hr

