

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1425/2006**

(22) Anmeldetag: **25.08.2006**

(43) Veröffentlicht am: **15.03.2008**

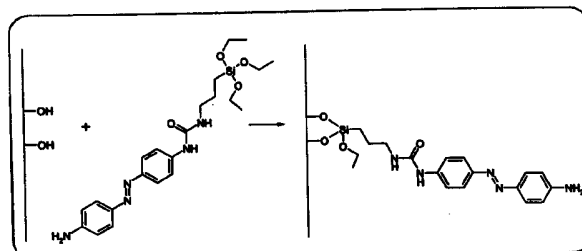
(51) Int. Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/68** (2006.01),  
**H01J 49/16** (2006.01)

(73) Patentanmelder:

LEOPOLD-FRANZENS-UNIVERSITÄT  
INNSBRUCK  
A-6020 INNSBRUCK (AT)

(54) **MATRIX-FREIE MALDI MASSENSPEKTROMETRIE**

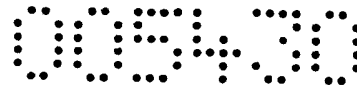
(57) Die Erfindung bezieht sich auf Partikel und Monolithen, welche ionisierte Analyten in einer Größenordnung von 0,5-100 µm für die massenspektroskopische Analyse durch Photodesorption zur Verfügung stellen können, wobei genannte Partikel oder Monolithen mit einer chemischen Verbindung modifiziert sind, welche Photonen mit einer Wellenlänge von mindestens 300 nm absorbieren kann. Die genannten Partikel und Monolithen ermöglichen den Gebrauch von MALDI-MS für Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 700 µ. ohne Störsignale oder mit einer limitierten Anzahl an Hintergrundsignalen bei hohem Probendurchsatz ("high throughput screening").



Zusammenfassung:Matrix-freie MALDI Massenspektrometrie

Die Erfindung bezieht sich auf Partikel und Monolithen, welche ionisierte Analyten in einer Größenordnung von 0,5-100  $\mu\text{m}$  für die massenspektroskopische Analyse durch Photodesorption zur Verfügung stellen können, wobei genannte Partikel oder Monolithen mit einer chemischen Verbindung modifiziert sind, welche Photonen mit einer Wellenlänge von mindestens 300 nm absorbieren kann. Die genannten Partikel und Monolithen ermöglichen den Gebrauch von MALDI-MS für Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 700  $\mu$  ohne Störsignale oder mit einer limitierten Anzahl an Hintergrundsignalen bei hohem Probendurchsatz ("high throughput screening").

**NACHGEREICHT**



U 9678

1

## Matrix-freie MALDI Massenspektrometrie

### GEGENSTAND DER ERFINDUNG

Die gegenständliche Erfindung bezieht sich auf Partikel und Monolithen, welche durch Photonen-Desorption ionisierte Analyten für die massenspektroskopische Analyse zur Verfügung stellen.

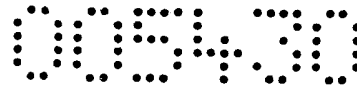
### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Der Einsatz von Maldi-MS für die Analyse von kleinen Molekülen wie zum Beispiel pharmakologisch aktiven Inhaltsstoffen – und auch Metaboliten – ist nur bedingt möglich, da diese Moleküle in einen Massenbereich fallen, der mit dieser Analysentechnik normalerweise nicht erfasst werden kann. Dies ist bedingt durch die eingesetzte Matrix, welche notwendig ist, um eine Analyse der intakten Moleküle (normalerweise Peptide, Proteine) überhaupt erst zu ermöglichen. Mindestgröße der Analyten sollte deshalb zwischen 500 und 700  $\mu$  betragen, im Idealfall größer als 1000  $\mu$ .

Standardsysteme für das *Screening* von kleinen Molekülen sind zur Zeit die Gaschromatographie und die Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC-MS, LC-MS). Ein wesentlicher Nachteil dieser Systeme ist der z. T. hohe Zeitaufwand für die Probenvorbereitung und die einzelne massenspektroskopische Analyse von 20 Min. und mehr. Dadurch ist der maximal tägliche Probendurchsatz limitiert. MALDI-MS ist dem gegenüber ein System, mittels welchem ein hoher automatisierter Probendurchsatz erreicht werden kann.

In der Literatur findet man Beispiele zu Systemen, welche eine direkte Analyse von kleinen Molekülen durch MALDI-MS zulassen. In diesen Fällen wird ein Probenteller (target) verwendet, welches so weit modifiziert ist, dass es Laserenergie im Bereich 337 nm absorbieren kann. Dies ist der Fall für poröse Siliconschichten (Zhang et al. Rap. Commun. Mass Spect. 2001 15 217-223; Shen et al. Anal. Chem. 2001 73 612-619; Jing Wei et al. Nature 1999 399 243-246; Kraj et al. Acta Biochimica Polonica 2003 50 (3) 783-787), kann aber auch durch Einsatz von Polymeren (Peterson et al. Rap. Commun. Mass Spect. 2004 18 1504-1512; Frechet et al. U.S. 20050023456 A1) oder von speziell modifizierten Oberflächen wie z.B. Silica mit Triphenylmethylgruppen oder Silica modifiziert mit Matrixsystemen wie Dihydroxybenzoesäure (DHB) und  $\alpha$ -Hydroxyzimtsäure (HCCA) (Zhang et al. Rap. Commun. Mass Spect. 2001 15 217-223) erzielt werden.

**NACHGEREICHT**



U 9678

2

Weiters ist auch der Einsatz von immobilisierten Nanotubes (Shi-fang Ren et al. JASMS 2005 16 (3) 333-339) und von Graphit dokumentiert (Hie-Joon Kim et al. Anal. Chem. 2000 72 5673-5678), und die Kombination der Probe mit anorganischen Partikeln wie z.B. Mn, Mo, Si, Sn, TiO<sub>2</sub>, W, WO<sub>3</sub>, Zn, ZnO beschrieben (Kinumi et al. J. Mass Spectr. 2000 35 417-422). Fonash et al. beschreiben in ihrer Patentschrift den Einsatz von amorphen Silicon- und porösen SiO<sub>2</sub> Schichten („Layers“) für die matrixfreie MALDI-MS (Fonash et al. WO 02/093170 A1, US20020144456). Hutchens beschreibt den Einsatz von Azodianilin für die Kopplung von Biomolekülen im Sinne der „photolabilen Kopplung“ (Ching et al. J. Org. Chem. 1996 61 3582-3583; Hutchens et al. US6124137), differenziert in seiner Patentschrift aber deutlich zwischen matrixfrei und photolabiler Kopplung: Für matrixfreie MALDI-MS wurden immobilisierte Matrices wie HCCA oder DHB benutzt, während für photo-labile Anlagerung Azodianilin beschrieben ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Schaffung eines Systems, welches den Einsatz von MALDI-Massenspektrometrie für Analyten mit einem Molekulargewicht kleiner als 700  $\mu$  bei hohem Probendurchsatz („high throughput screening“) ermöglicht (die kleinste bisher gemessene Masse ist Natrium mit  $m/z = 23$ , Abb. 15), so zum Beispiel pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe, als auch Arzneistoffmetaboliten und sekundäre Pflanzenmetaboliten. Zudem soll das System auch für Verbindungen in der Größe von mehreren 1000  $\mu$  geeignet sein. Da die meisten der beschriebenen und publizierten Systeme dominante Hintergrundsignale aufweisen, ist ein weiterer Punkt die Etablierung eines Systems, welches keine Störsignale oder nur eine limitierte Anzahl an Hintergrundsignalen aufweist.

#### KURZFASSUNG DER ERFINDUNG

Die oben angeführten Aufgaben werden gemäß der Erfindung gelöst durch Gebrauch von Partikeln und Monolithen der eingangs beschriebenen Art, wobei diese Partikel oder Monolithen mit einer chemischen Verbindung modifiziert sind, welche Photonen im Wellenlängenbereich von mindestens 300 nm absorbieren können, unter der Bedingung, dass der Analyt nicht chemisch an die genannten organischen Verbindungen gebunden ist. Der Analyt ist an den Partikeln oder Monolithen adsorbiert.

Gemäß einer bevorzugten Anwendungsform sind die genannten Partikel oder Monolithen porös.

**NACHDRECK**

Gemäß einer weiteren Anwendungsform haben die Partikel eine Größe im Bereich 0,5 – 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt im Bereich 10 – 80  $\mu\text{m}$ , insbesondere im Bereich 35 – 70  $\mu\text{m}$ .

Eine weitere bevorzugte Anwendungsform ist dadurch charakterisiert, dass die Partikel Poren im Bereich 60-4.000  $\text{Å}$ , bevorzugt 800-3.000  $\text{Å}$ , insbesondere 900-1.100  $\text{Å}$  aufweisen.

Gemäß einer Anwendungsform der Erfindung bestehen die genannten Partikel und Monolithen aus Silica.

Gemäß einer weiteren Anwendungsform bestehen die genannten Partikel aus Zellulose, Zucker, Kohlenhydraten, Agarose, Dextran, und Derivaten derselben, weiters aus organischen Polymeren, Styrol, Divinylbenzol, (Meth)acrylaten und Derivaten derselben, sowie  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{In}_2\text{O}_3$  und Diamant.

Geeigneterweise ist die genannte chemische Verbindung mit der Fähigkeit, Photonen mit einer Wellenlänge von mindestens 300 nm zu absorbieren, Azodianilin und/oder ein Stilben oder Derivate derselben.

Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung wird eine Vorrichtung, welche ionisierte Analyten für die massenspektroskopische Analyse verfügbar macht und einen Träger (target) beinhaltet, welcher die Partikel oder den Monolithen wie oben angeführt trägt, bereitgestellt.

Weiters stellt die gegenständliche Erfindung ein Verfahren zur Verfügung, um ionisierte Analyten für die massenspektroskopische Analyse verfügbar zu machen, beinhaltend die Bereitstellung eines Gerätes wie oben beschrieben, die Verbindung einer Menge an Analyten mit den genannten Partikeln oder Monolithen, und die Bestrahlung der genannten Partikel oder Monolithen, um genannte Analyten zu desorbieren und ionisieren.

Die gegenständliche Erfindung wird nun weiter im Detail durch Abbildungen mit folgenden Beispielen beschrieben.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

**Abb. 1** zeigt die Reaktion zwischen Azodianilin und einem Triethoxysilanderivat. Die Modifikation von einer oder von beiden freien Aminofunktionen hängt vom molaren Verhältnis der Edukte ab.

NACHGEREICHT

**Abb. 2** zeigt die Immobilisierung des Azodianilin-Derivats am Silica-Partikel. In Abhängigkeit des molaren Verhältnisses der Edukte wie in Abb. 1 gezeigt, kann eine oder beide Seiten der Verbindung an die Silicaoberfläche binden.

**Abb. 3** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum des produzierten Azodianilin-Silicas.

**Abb. 4** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Ribose unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 5** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Glucose unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 6** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Maltose unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 7** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Maltotriose unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 8** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Maltotetraose unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 9** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Glucoseoligomeren von G4 bis G10 unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 700 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 10** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Glycin unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 11** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Threonin unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 12** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Glutamin unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 1 µg.

**Abb. 13** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum des Metaboliten 1,2 diheptadecanoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1-glycerol)) unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen; die Konzentration am Target beträgt 10 ppm.

**Abb. 14** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von *Taxus* Standards und Pflanzenextrakten unter Verwendung von Azodianilin-Silica. (A = Deacetylbaaccatin III (Standard), b = Baaccatin III (Standard), C = Cephalomannin (Standard), D = Paclitaxel ("alter" Standard), E = Paclitaxel ("neuer" Standard), F, G = aufgereinigter *Taxus* Extrakt, H = *Taxus* Rohextrakt).

**Abb. 15** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von partiell hydrolysiertem Weizenstroh unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen.

**Abb. 16** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von Weizenstroh nach einer Aquasolv® Behandlung und nach enzymatischem Verdau unter Verwendung von Azodianilin-Silica. Das Spektrum entspricht der Summe von 500 Laserschüssen.

**Abb. 17** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum eines *Cimicifuga racemosa* Rohextrakts (hergestellt mit 50 % Ethanol, getrocknet und erneut gelöst in Wasser).

**Abb. 18** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum von eines BSA Verdaus unter Verwendung von Azodianilin-Silica.

**Abb. 19** zeigt das matrix-freie MALDI-MS Spektrum einer am modifizierten Azodianilin-Silica angereicherten Glucose-6-Phosphat Probe (Modifikationstyp: Iminodiessigsäure Fe<sup>3+</sup>).

## BEISPIELE

Silica Partikel mit 35-70  $\mu\text{m}$  und 1000  $\text{\AA}$  wurden als Basismaterial ausgewählt. Dieses Basismaterial wird mit dem Azodianilin-System modifiziert, wodurch es ein Absorptionsmaximum im Wellenbereich  $\lambda > 300 \text{ nm}$  aufweist.

**1. Reinigung und Aktivierung des Silicagels**

1 g Silicagel (unregelmäßiges Silica: 35-72  $\mu\text{m}$ , 1000 $\text{\AA}$ , Grace Vydac, Columbia, MD, USA; reguläres Silica: 5  $\mu\text{m}$ , 60 $\text{\AA}$ , 120 $\text{\AA}$ , 300 $\text{\AA}$ , 1000 $\text{\AA}$  von Grom Analytik, Rottenburg-Hailfingen, Deutschland) wurde aktiviert und gereinigt, indem es je zwei mal mit 5 mL 20%  $\text{HNO}_3$  (65% Reinheit, Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,5 M NaCl (analytische Qualität, Sigma),  $\text{H}_2\text{O}$ , Aceton (analytische Qualität, Sigma) and Diethyläther (analytische Qualität, Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen wurde. Danach wurde das Material in ein Becherglas gegeben, dieses in einen Exsikkator gestellt und das ganze bei Unterdruck und bei 150  $^\circ\text{C}$  für 4 Stunden getrocknet.

**2. Reaktion von 4,4'-Azodianilin mit  $\gamma$ -Isocyanatopropyl-triethoxysilan**

0,98 g 4,4'-Azodianilin (95% Reinheit, Acros Organics, Geel, Belgien) wurden mit 2,35 g  $\gamma$ -Isocyanatopropyl-triethoxysilan (analytische Qualität, Sigma) und 12 ml trockenem Tetrahydrofuran (analytische Qualität, Sigma) in einem Rundkolben vereint. Die Mischung wurde unter Rückfluss für 24 Stunden bei 75  $^\circ\text{C}$  unter Rühren (Magnetrührer) und bei Raumlicht gekocht. Ein nadelähnlicher gelber Niederschlag wurde erhalten, abzentrifugiert, drei mal mit je 10 mL Hexan gewaschen und bei Unterdruck im Exsikkator getrocknet.

Abbildung 1 zeigt die einfach-derivatisierte (eine Aminosäurefunktion) Form. Neben dieser Form ist in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis der Edukte auch die di-derivatisierte (beide Aminofunktionen) Form möglich (Abb. 1). Um die Verfügbarkeit von freien Aminofunktionen für die Aufkonzentrierung von Metaboliten und Zuckern auf der Oberfläche des Materials zu gewährleisten, wurde die Synthese des Azodianilin-Silicas modifiziert: Alle Schritte wurden durchgeführt wie bereits beschrieben mit Ausnahme von Schritt 2, wo das verwendete  $\gamma$ -Isocyanatopropyl-triethoxysilan auf 1,17 g reduziert wurde.

**3. Synthese des Endprodukts**

0,5 g Produkt aus Schritt 2 wurden in einen Rundkolben gegeben, mit 10 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und mit 0,5 g Silicagel aus Schritt 1 vermengt. 200  $\mu\text{l}$  n-Propylamin (extra rein, Acros Organics) wurden als Katalysator beigegeben. Die Mischung wurde bei 75 $^\circ\text{C}$  unter Rückfluss für 16 Stunden mit Rühren (Magnetrührer) gekocht, zentrifugiert und

zuerst einmal mit Tetrahydrofuran gewaschen, um nicht reagiertes Material zu entfernen, und zweimal mit 10 mL Methanol gereinigt (analytische Qualität, Sigma). Schließlich wurde das Material in ein Becherglas überführt, in einen Exsikkator gestellt und bei Unterdruck getrocknet. Abbildung 2 zeigt die einfach gekoppelte Modifikation. Abhängig von Schritt 2 ist die doppelt gekoppelte Modifikation möglich.

### **MALDI-TOF-MS Analyse:**

#### **Probenpräparation am "Target"**

Die Probenpräparation von Azodianilin-Silica-Partikeln am "target" wurde durch Herstellung einer Suspension mit Methanol (analytische Qualität, Sigma) durchgeführt. 10 mg modifiziertes Silicagel wurden in 1 mL Methanol suspendiert und für 3 Minuten ins Ultraschallbad gegeben. Für die MALDI-TOF Analyse wurde 1 µl der Suspension auf das rostfreie Stahltarget gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet, wodurch sich ein dünner Film von modifiziertem Silica Material gebildet hat. Auf diese Schicht wurde 1 µL Probelösung aufgegeben und unter Stickstoff getrocknet.

Herstellung der Probenlösungen: Zucker, deren Abbauprodukte und Aminosäuren wurden in reinem Wasser gelöst (0,5 mg/ml). Deoxycholinsäure und 1,2-Diheptadecanoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-Glycerol)] (Natriumsalz) wurden in Methanol gelöst.

#### **Gerät**

Alle Experimente wurden auf einem MALDI Massenspektrometer (Ultraflex MALDI TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) unter Verwendung von rostfreien Stahltargets (MTP 384 target ground steel TF, Bruker Daltonics) durchgeführt. Desorption wurde durch Verwenden eines Stickstofflasers (337 nm) erreicht. Die Laserenergie wurde eingestellt wie benötigt. Die an die Ionenquelle 1 und 2 angelegte Spannung betrug 20,0 bzw. 18,6 kV. Die Detektionsspannung betrug 1601 V. Flex Control V 2.0 wurde für die Analyse, Flex Analysis V 2.0 für die Datenauswertung verwendet.

#### **Ergebnisse**

Die direkte Analyse des synthetisierten Materials zeigt im MALDI-MS nur Rauschen. Dies ist ein sehr wichtiges Ergebnis, da dadurch bewiesen werden kann, dass keine Störsignale bedingt durch das Material selbst erzeugt werden. Die Leistungsfähigkeit betreffend matrixfreier Analyse wurde schließlich durch eine Analyse von Ribose getestet, einem Kohlenhydrat, welche unter normalen Bedingungen nicht detektiert werden kann. Abb. 4

zeigt das entsprechende Massenspektrum von Ribose unter Verwendung von 1  $\mu$ L Probe (es befindet sich schließlich 1  $\mu$ g reine Substanz am Target). Die beiden detektierten Signale entsprechen dem Natrium- und dem Kaliumaddukt der reinen Verbindung. Weiters wurden Glucose (Abb. 5), Saccharose, Maltose (G2, Abb. 6), Maltotriose (G3, Abb. 7), Maltotetrose (G4, Abb. 8 and 9), and Glucoseoligomere bis zu G10 untersucht (Abb. 9). Neben der optimalen Leistung des etablierten Systems im niedrigen Massenbereich, muss auch das exzellente Signal zu Rauschen Verhältnis von höheren Zuckern angeführt werden. Weiters wurde beobachtet, dass beim Arbeiten mit dem Azodianilinsystem höhere Signalintensitäten erreicht werden konnten (z.B.: Glucose lieferte auf Azodianilin-Silica eine relative Signalintensität von 15000, während der Analyt auf kovalent gebundenem DHB nur einen Wert von 5000 zeigte).

Die Analyse von Aminosäuren zeigte, dass die Einzelstandards sowohl für die protonierte Form als auch für Natrium und Kaliumaddukte detektiert werden. Glycin, Threonin und Glutamin sollen als Beispiel dienen (Abb. 10-12).

Die Analyse von typischen Metaboliten, die in diagnostischen Tests Anwendung finden, wird für Phenylalanin, Deoxycholsäure und dem Phospholipid 1,2 Diheptadecanoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1-glycerol)) gezeigt (Abb. 13). Alle drei Typen von Metaboliten konnten ohne Probleme bei einer Konzentration von 50 bis 10 ppm detektiert werden. Nachweisgrenzen wurden in diesem Zusammenhang nicht ermittelt.

Die Analyse der Standards 10-Deacetylbaccatin und Baccatin III mittels matrixfreier MALDI-MS lieferte Natrium- und Kaliumaddukte wie auch bei der Analyse von Zuckerverbindungen beobachtet. Im Falle des Paclitaxels und des Cephalomannins (Standards) konnten dagegen nur Fragmente detektiert werden. Abb. 14D zeigt das MALDI-TOF-MS Spektrum eines Paclitaxelstandards (7 Tage alt, gelagert bei 8°C). Das dominante Signal bei m/z 308 entspricht der Seitenkette des Paclitaxels (Natriumaddukt), das Signal bei m/z 550 dem deacetylierten Ringsystem (Kaliumaddukt). Interessanterweise lieferte frisch hergestellter Paclitaxelstandard sowohl das Natrium- als auch das Kaliumaddukt-Signal der intakten Verbindung (Abb. 14E). Dieselbe Instabilität und Tendenz konnte über ein HPLC-Ionenfallen-MS System bestätigt werden.

Um die Effizienz des entwickelten Systems zu belegen, wurden *Taxus baccata* Wasser-Methanol-Extrakte durch matrixfreie MALDI-MS untersucht. Im Vordergrund stand dabei nicht nur die Analyse von Paclitaxel (Taxol) sondern auch Vorstufen desselben, z.B. 10-Deacetylbaccatin, Cephalomannin und Baccatin III. Diese Vorstufen können aus den Nadeln

der Pflanze isoliert werden und durch in vitro Derivatisierung in das pharmazeutisch benötigte Paclitaxel überführt werden. Die Analyse eines frisch hergestellten Rohextrakts zeigte für 10-Deacetylbaaccatin III eindeutig ein Natriumsignal. Neben einigen anderen Signalen konnten die Vorstufen des Paclitaxels und Fragmente davon identifiziert werden (Abb. 14 F,G,H).

Ein weiteres Beispiel ist die Analyse von hydrothermal behandeltem Weizenstroh (Abb. 15). Weizenstroh wurde in einem speziellen Verfahren genannt Aquasolv<sup>®</sup> aufgeschlossen und solubilisiert.

In diesem speziellen Verfahren wird das Pflanzenmaterial primär mit Wasserdampf ( $p = 17$  bar) und später mit heißem Wasser behandelt. Die aufgeschlossene Fraktionen wurden schließlich enzymatisch verdaut.

Analysen von partiell hydrolysierten Proben (mit Schwefelsäure, Beispiel A) und von Proben aus der kombinierten Aquasolv<sup>®</sup> - Enzymverdau Behandlung (Beispiel B) mittels matrixfreiem MALDI-MS sind in Abb. 15 und 16 dargestellt. Die Analyse der Probe A zeigt Signale für eine Hexose, ein Di- sowie Tri-, Tetra- und Pentasaccharide (Abb. 15). Probe B lieferte Signale für Xylose, Glucose, Sorbitol, Cellobiose und reduzierte Cellobiose (Abb. 16). Alle Signale wurden als Natrium- und Kaliumaddukte detektiert. Xylose, Glucose und Cellobiose sind Monomer- bzw. Dimereinheiten, die durch vollständige Hydrolyse von Weizenstroh entstehen. Sorbitol und reduzierte Cellobiose werden durch die Behandlung der Probe bei hohen Temperaturen und bei hohem Druck gebildet (während Aquasolv<sup>®</sup>). Wie erwartet konnten keine höheren Zucker detektiert werden.

*Cimicifuga racemosa* Extrakte sind sehr komplex, aber reich an Kohlenhydraten und an speziellen Formen von Triterpenen, den so genannten Saponinen. Nach Extraktion von *Cimicifuga racemosa* mit unterschiedlichen Lösungsmitteln wie Wasser, Aceton, Ethanol oder Diethyläther, konnten bei der Analyse mit matrixfreier MALDI-MS dominante Signale für Kohlenhydrate in der Wasserfraktion und dominante Signale für Triterpene in der Acetonfraktion gefunden werden. Die Wasserfraktion zeigte auch relativ kleine Signale für die Triterpene, die wegen ihrer schlechten Wasserlöslichkeit in nur niedrigen Konzentrationen vorhanden waren (Abb. 17).

Generell konnte während der Messungen festgestellt werden, dass fast jeder Typ an ionisierbaren Verbindungen analysiert und detektiert werden kann. Nur Proteine und Peptide lieferten während der ersten Versuche keine Ergebnisse. Nach Optimierung des Systems, d.h. nach Optimierung der Beschleunigungs- und Detektionsspannung, konnten Peptide

eines BSA Verdaus ohne Zugabe von Matrix detektiert werden. Biomoleküle wie Proteine konnten nicht analysiert werden (Abb. 18).

Eine weitere Modifikation des hergestellten Materials wurde durchgeführt, um die selektive Anreicherung der Zielkomponenten und die folgende matrixfreie MALDI-MS Analyse zu kombinieren. Dies wurde durch Zufuhr einer Iminodiessigsäuregruppe über eine freie Aminofunktion des Azodianilins durch Reaktion mit n-BuLi und Natriumchloroacetat erreicht. Aus der Literatur ist bekannt, dass an Iminodiessigsäure immobilisiertes  $\text{Fe}^{3+}$  hohe Affinität gegenüber Phosphatgruppen und dementsprechend gegenüber phosphorylierten Systemen aufweist. Aus diesem Grund wurde eine Glucose-6-Phosphat-Standardlösung mit dem Affinitätsmaterial vereint. Nach intensivem Waschen wurde das Material für die matrixfreie MALDI-MS Analyse verwendet. Das erhaltene Massenspektrum ist in Abb. 19 dargestellt. Sowohl Natrium- als auch Kaliumadduktensignale sind zu erkennen. Ein weiteres Beispiel ist die selektive Anreicherung von Kohlenhydraten. Dies kann erreicht werden durch Immobilisierung von Borsäure und Borsäurederivaten.

Die Kombination von Dünnschichtchromatographie (DC) mit MALDI-MS ist wegen der Probleme mit Desorption und Ionisation der Analyten fast unmöglich. In der Literatur findet man mehrere Beispiele für die Kopplung von DC mit MALDI-MS. In diesen Beispielen wird die Matrix direkt der mobilen Phase der DC vor der Entwicklung zugegeben oder sie wird nach der Entwicklung des Separationssystems auf die DC-Platte gesprüht. Trotzdem gibt es wie bereits erwähnt einige Probleme während des gesamten Trenn- und Detektionsprozesses. Gibt man die hergestellten Azodianilin-Silicapartikel auf eine Glasplatte (durch Besprühen oder als Suspension), kann man darauf komplexe Mischungen mittels DC trennen. Die direkte Analyse mittels matrixfreier MALDI-MS kann danach ohne negative Beeinträchtigungen durchgeführt werden. Ein zentrales und wichtiges Ergebnis im Zusammenhang mit DC-MALDI-MS ist der Punkt, dass dünne Schichten Signale mit höherer Signalintensität liefern als dicke Schichten. Deshalb wird eine Optimierung des Systems durchgeführt, indem unmodifizierte Silicapartikel auf einer Glasplatte kovalent gebunden werden. An diese Monolayer wird schließlich das Azodianilin gekoppelt, wodurch das Arbeiten mit matrixfreier MALDI-MS ermöglicht wird.

Zur Untersuchung der Nachweisgrenze des hergestellten Materials wurden dem System verschiedene Xylosekonzentrationen zugeführt und mit matrixfreier MALDI-MS analysiert. Die Nachweisgrenze wurde bei 70 fmol erreicht.

**NACHGEREICHT**

Ansprüche:

1. Partikel und Monolithen, die ionisierte Analyten für die massenspektroskopische Analyse durch Photodesorption zur Verfügung stellen, wobei die genannten Partikel oder Monolithen mit einer organischen Verbindung modifiziert sind, welche Photonen mit einer Wellenlänge von mindestens 300 nm absorbieren kann, mit der Maßgabe, dass der genannte Analyt nicht chemisch an die genannte organische Verbindung gebunden ist.
2. Partikel und Monolithen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Partikel und Monolithen porös sind.
3. Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Größe zwischen 0,5 und 100  $\mu\text{m}$  aufweisen.
4. Partikel gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Größe zwischen 10 und 80  $\mu\text{m}$  aufweisen.
5. Partikel gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Größe zwischen 35 und 70  $\mu\text{m}$  aufweisen
6. Partikel gemäß einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass sie Poren aufweisen mit einer Porengröße von 60 - 4000  $\text{\AA}$ .
7. Partikel gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Poren eine Porengröße von 800-3000  $\text{\AA}$  aufweisen.
8. Partikel gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Poren eine Porengröße von 900-1100  $\text{\AA}$  aufweisen.

**NACHGEREICHT**

9. Partikel und Monolithen gemäß einem der Ansprüche 1-8 bzw. 1-2, dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Partikel und Monolithen aus Silica sind.
10. Partikel und Monolithen gemäß einem der Ansprüche 1-8 bzw. 1-2 und 9 dadurch gekennzeichnet, dass die genannten Partikel und Monolithen aus Zellulose, Zucker, Kohlenhydraten, Agarose, Dextran, deren Derivaten, aus organischen Polymeren, Styrol, Divinylbenzol, (Meth)acrylat, deren Derivaten oder aus  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{In}_2\text{O}_3$  oder Diamant bestehen.
11. Partikel und Monolithen gemäß einem der Ansprüche 1-10 bzw. 1, 2, 9 und 10 dadurch gekennzeichnet, dass die genannte chemische Verbindung, welche Photonen mit einer Wellenlänge von mindestens 300 nm absorbieren kann, Azodianilin und/oder Stilben oder ein Derivat davon ist.
12. Vorrichtung zur Bereitstellung von ionisierten Analyten für die massenspektroskopische Analyse durch Photodesorption, umfassend eine Probenplatte (target), welche Partikel oder Monolithen gemäß den Ansprüchen 1-11 und den Ansprüchen 1, 2, 9, 10 und 11 trägt.
13. Verfahren zur Bereitstellung von ionisierten Analyten für die massenspektroskopische Analyse, umfassend:
- Bereitstellen eines Gerätes gemäß Anspruch 12,
- Kontaktieren von Analyt mit den genannten Partikeln oder Monolithen gemäß einem der Ansprüche 1-11 und den Ansprüchen 1, 2, 9, 10 und 11, und
- Bestrahlen der genannten Partikel oder der genannten Monolithen, um den genannten Analyten zu desorbieren und ionisieren.

**NACHGEREICHT**

U 9678

1/13

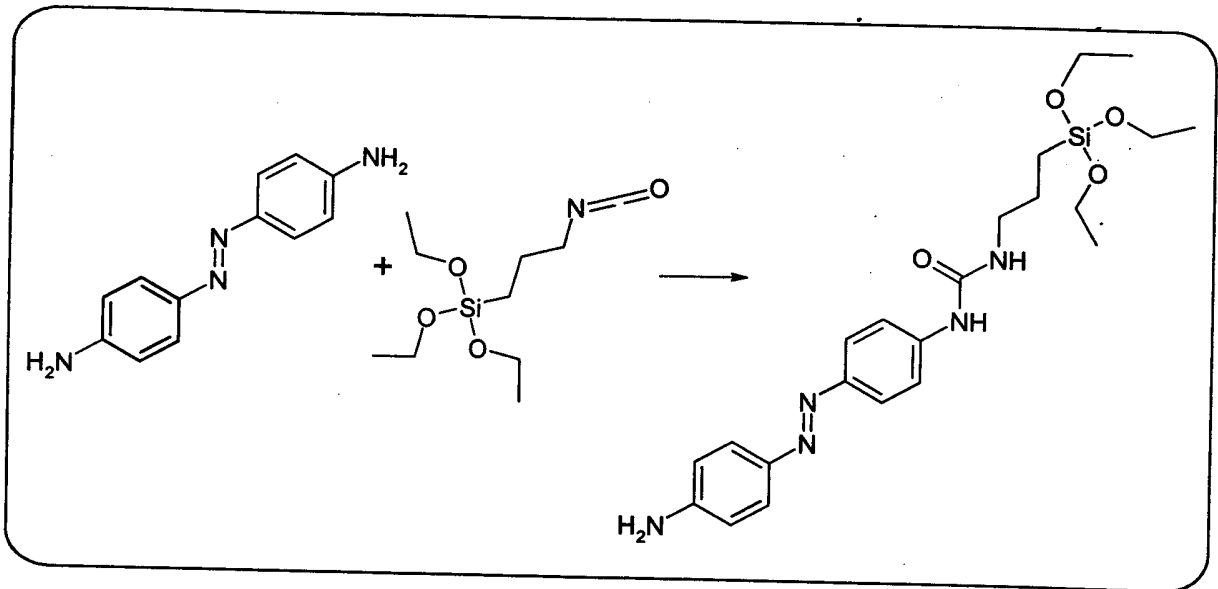


Abb. 1

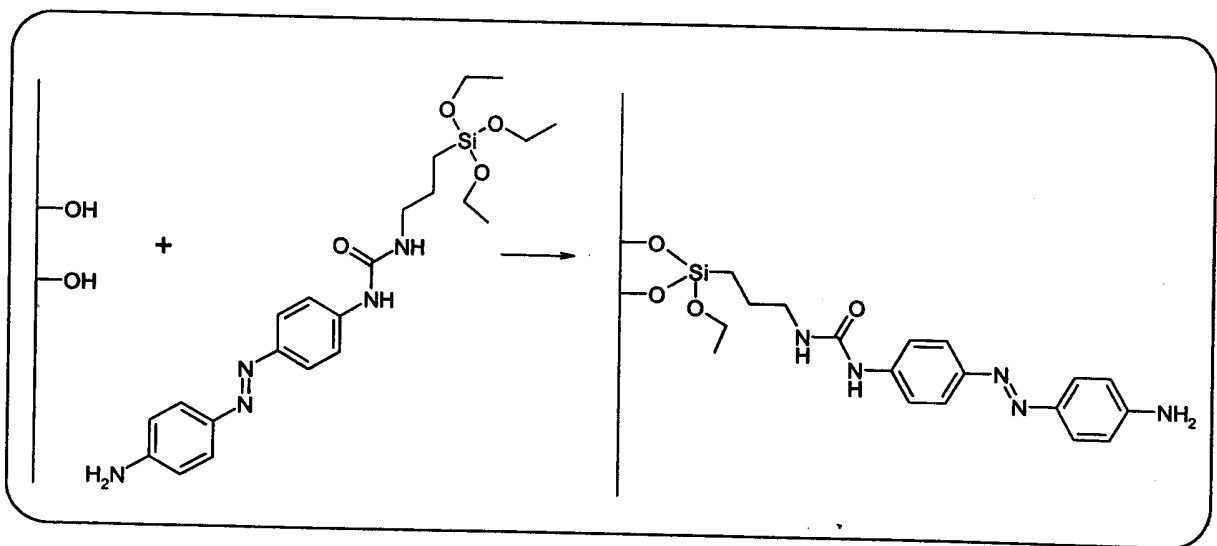


Abb. 2

NACHGEREICHT

005430

U 9678

2/13

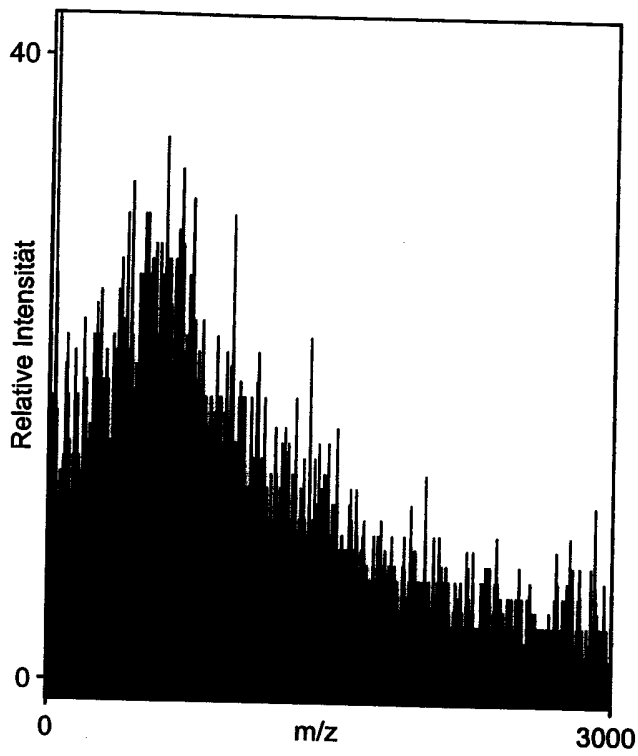


Abb. 3

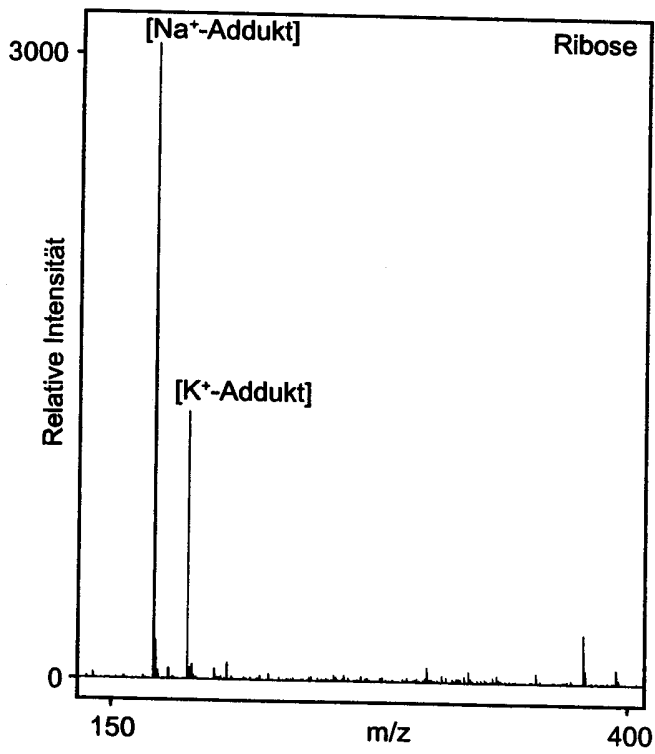


Abb. 4

NACHGEREICHT

U 9678

3/13

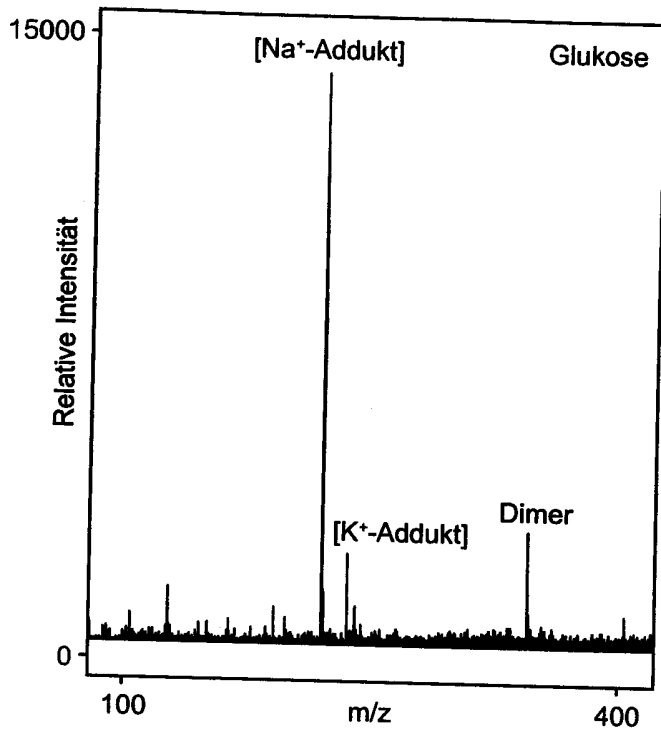


Abb. 5

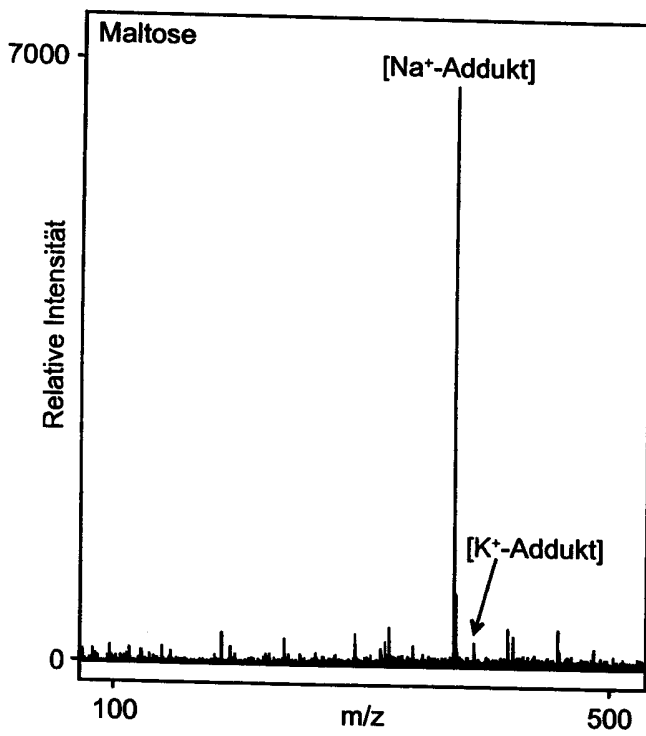


Abb. 6

U 9678

4/13

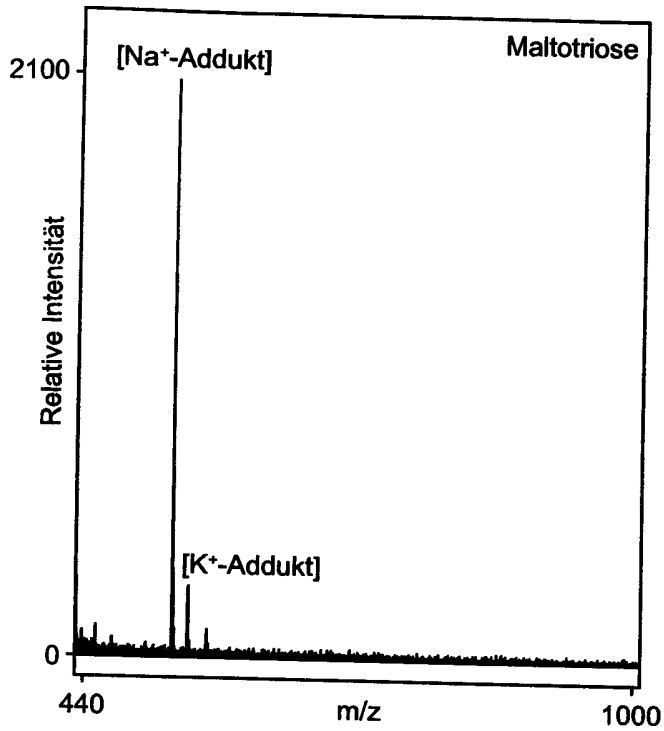


Abb. 7

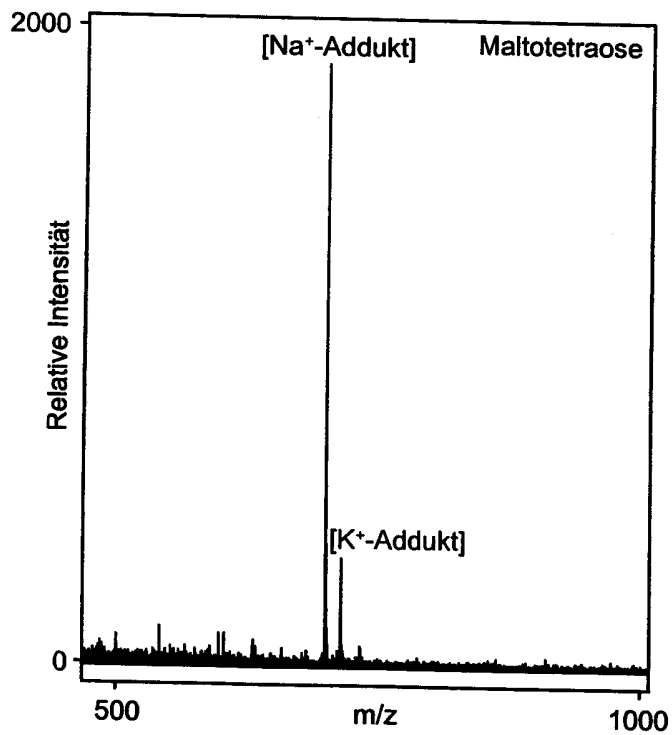


Abb. 8

NACHGEREICHT

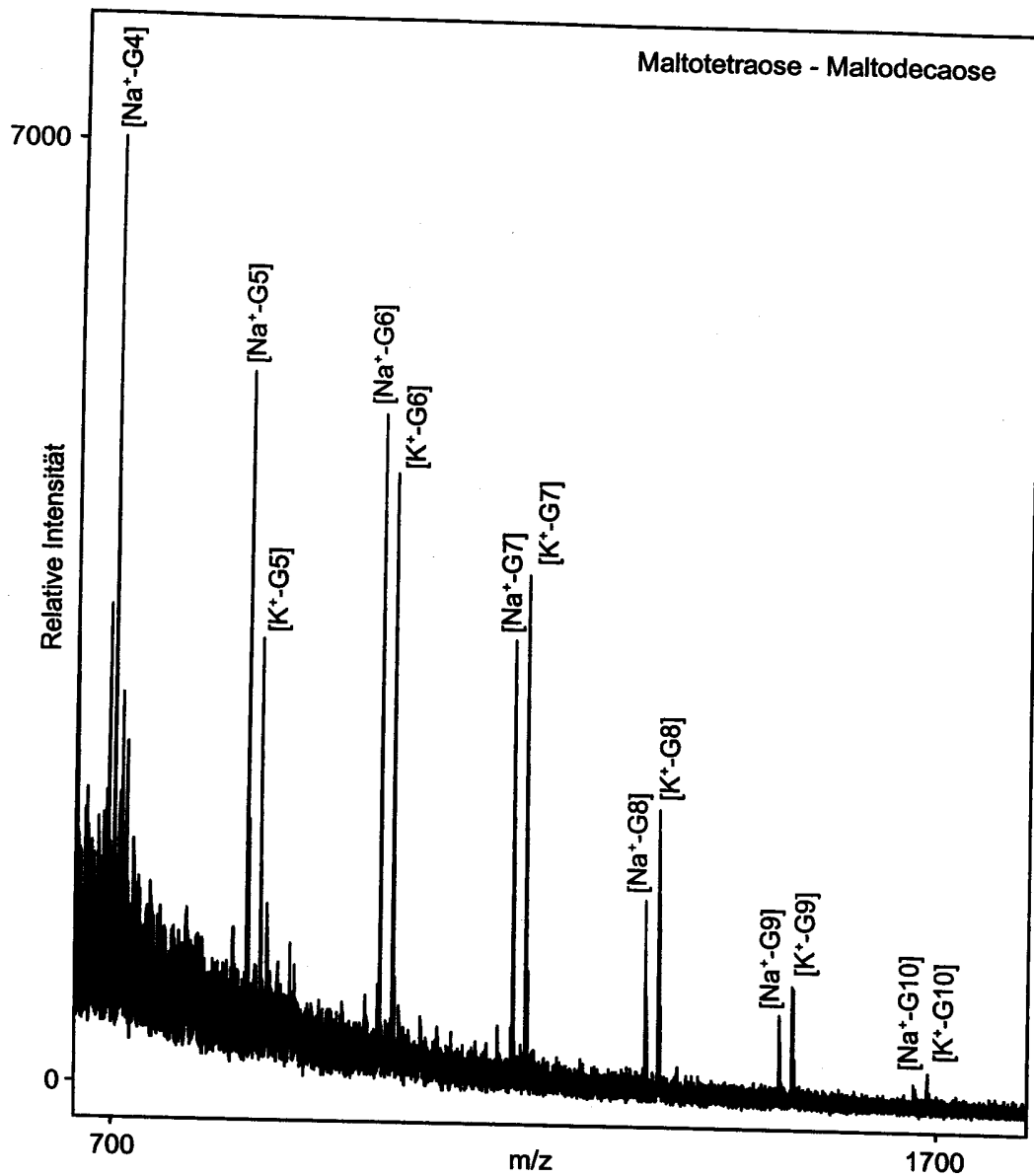


Abb. 9

U 9678

6/13

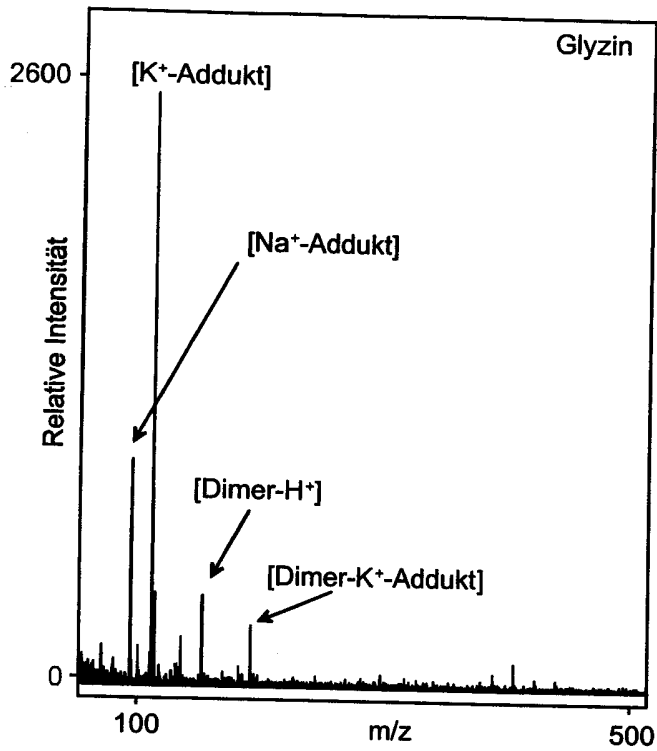


Abb. 10

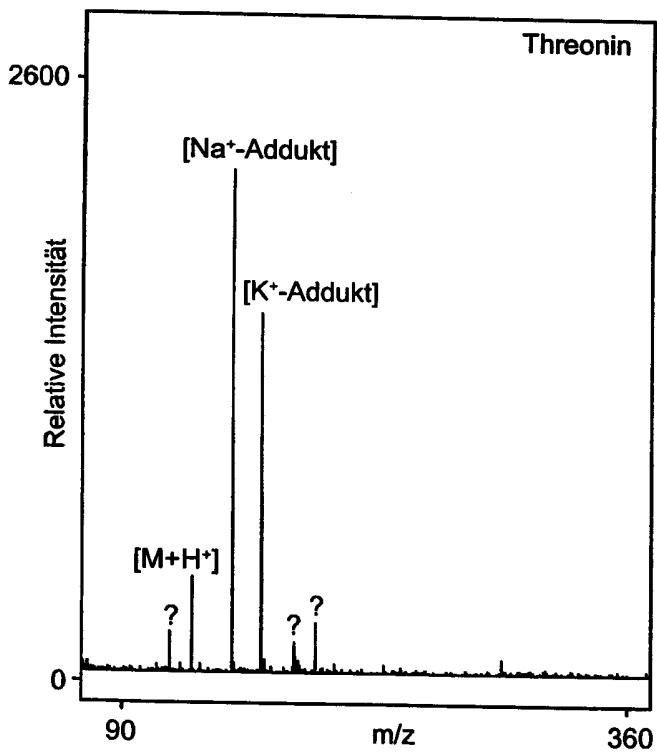


Abb. 11

NACHGEREICHT

U 9678

7/13

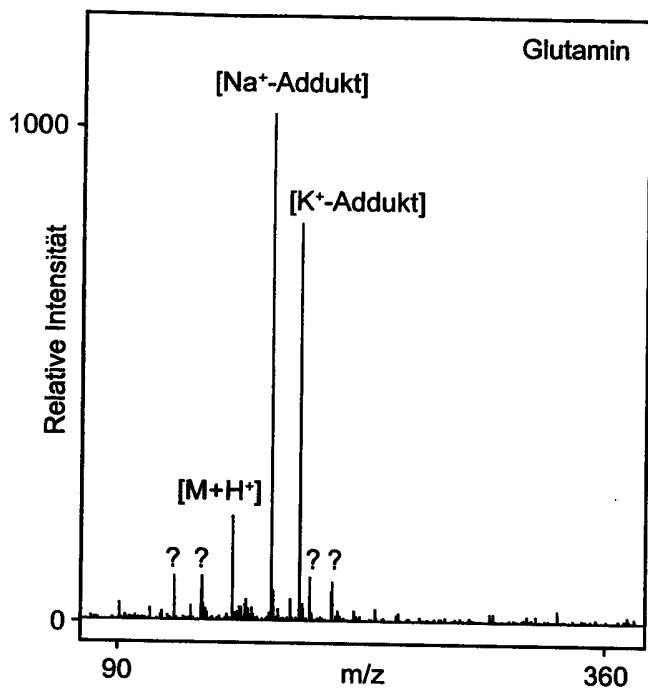


Abb. 12

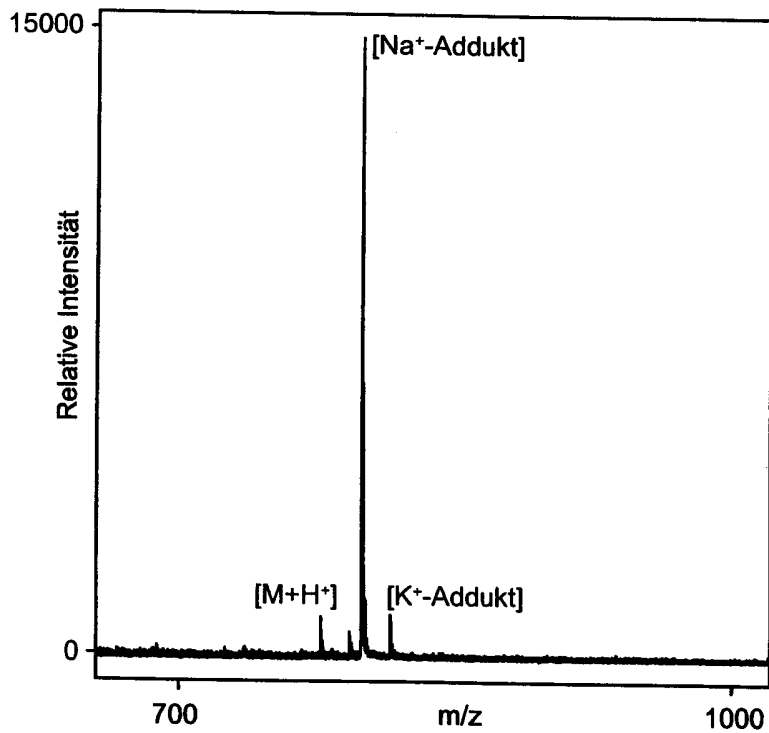


Abb. 13

NACHGEREICHT

009430

U 9678

8/13

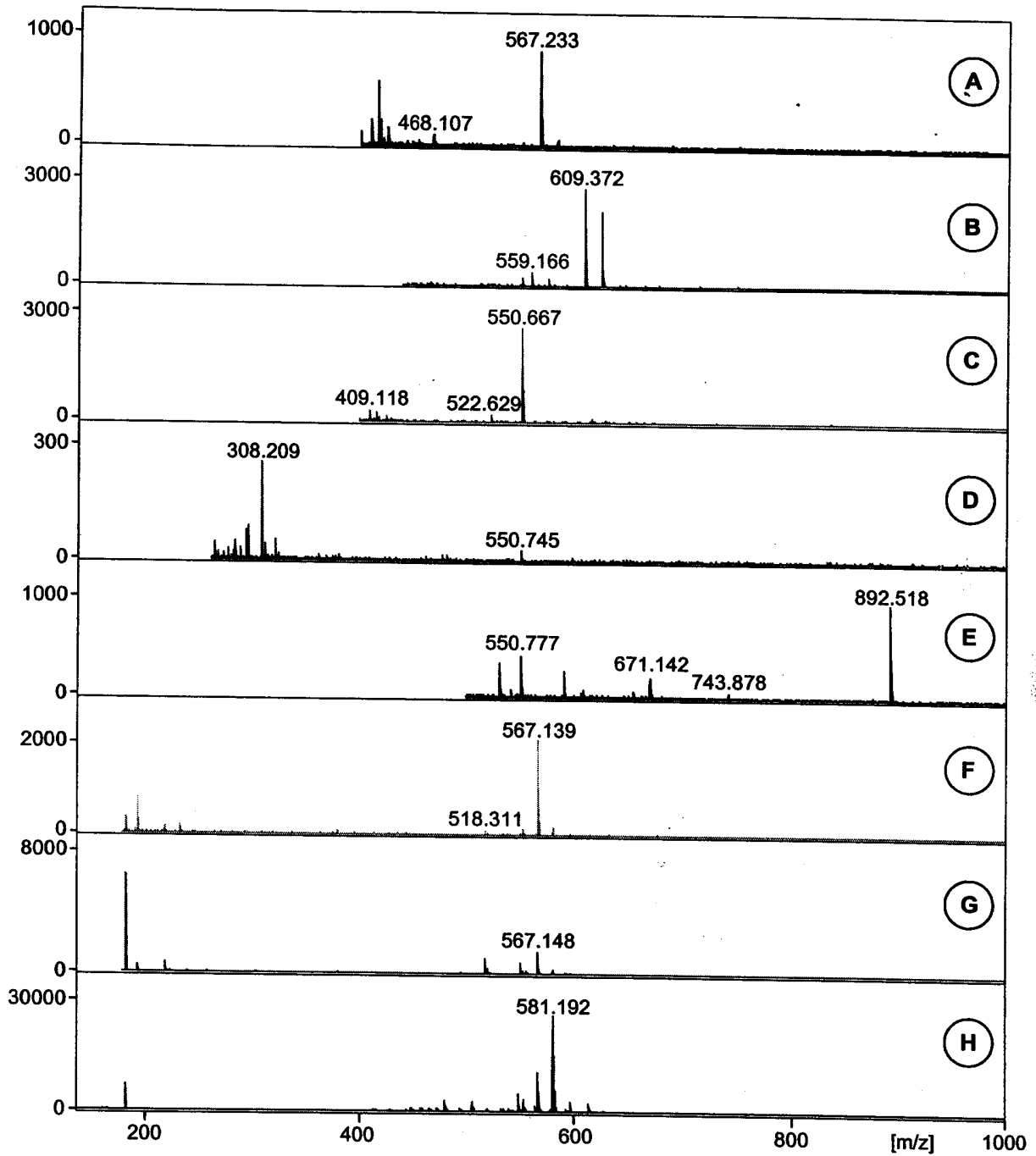


Abb. 14

NACHGEREICHT

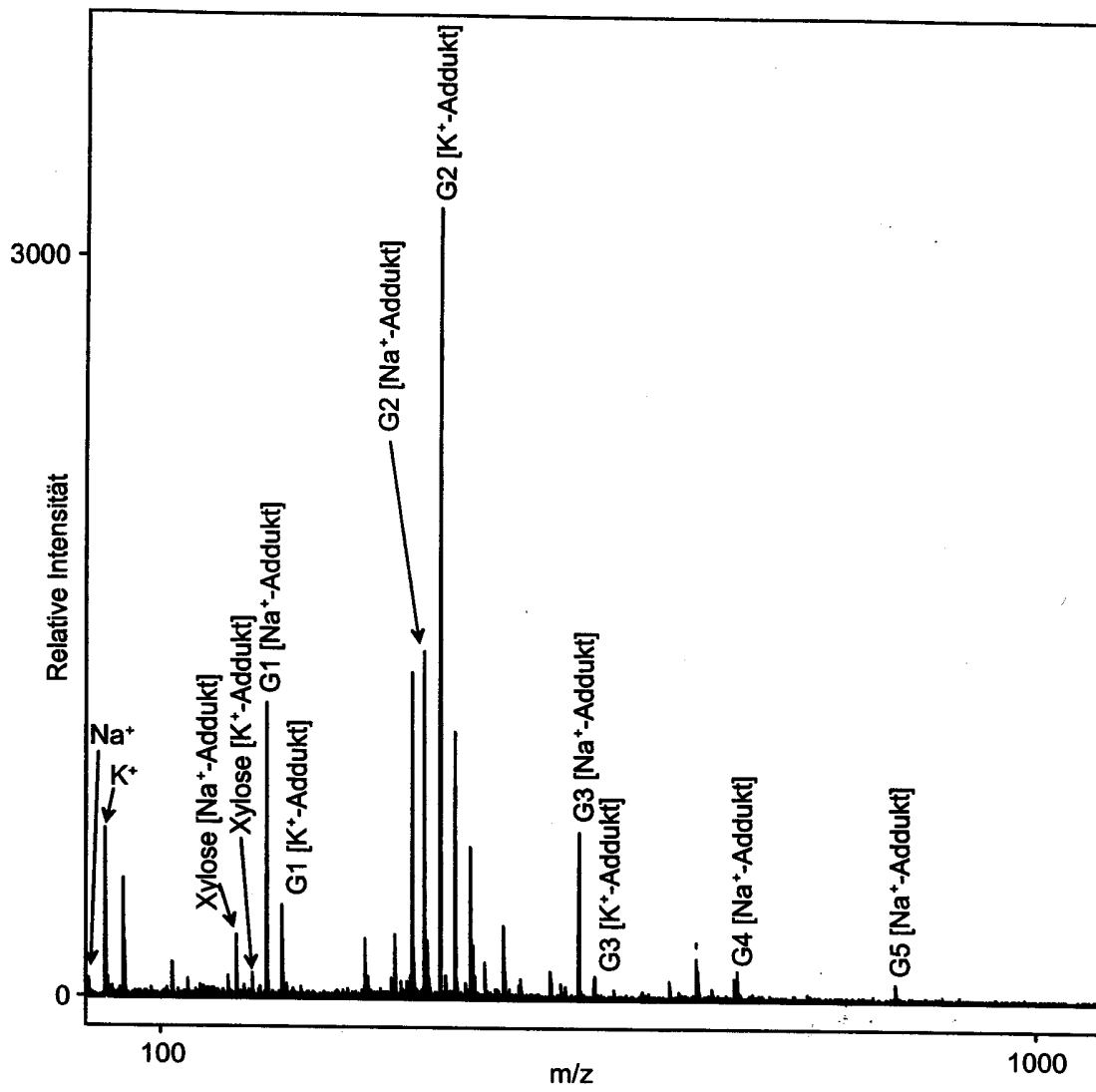


Abb. 15

U 9678

10/13

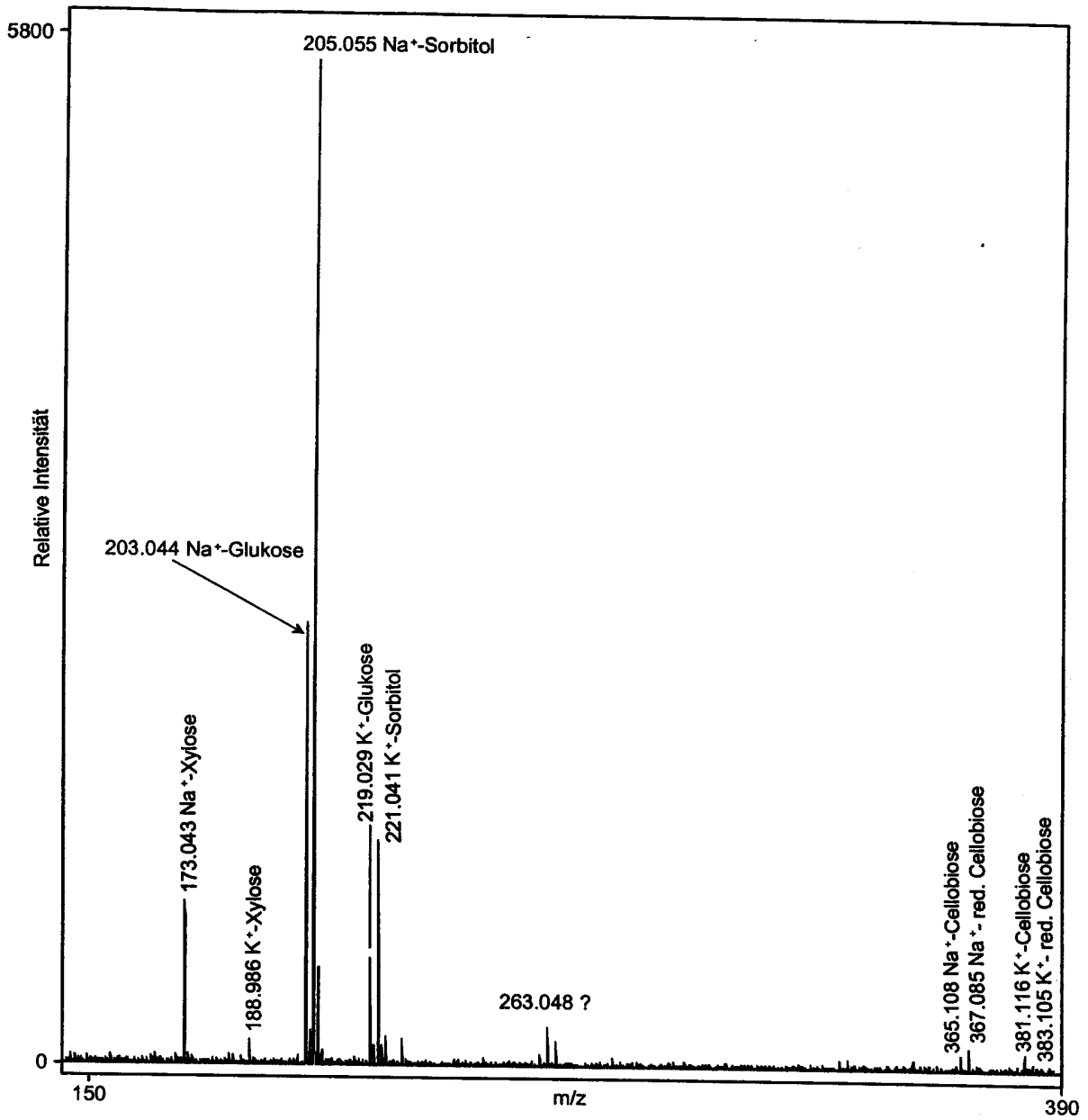


Abb. 16

U 9678

11/13

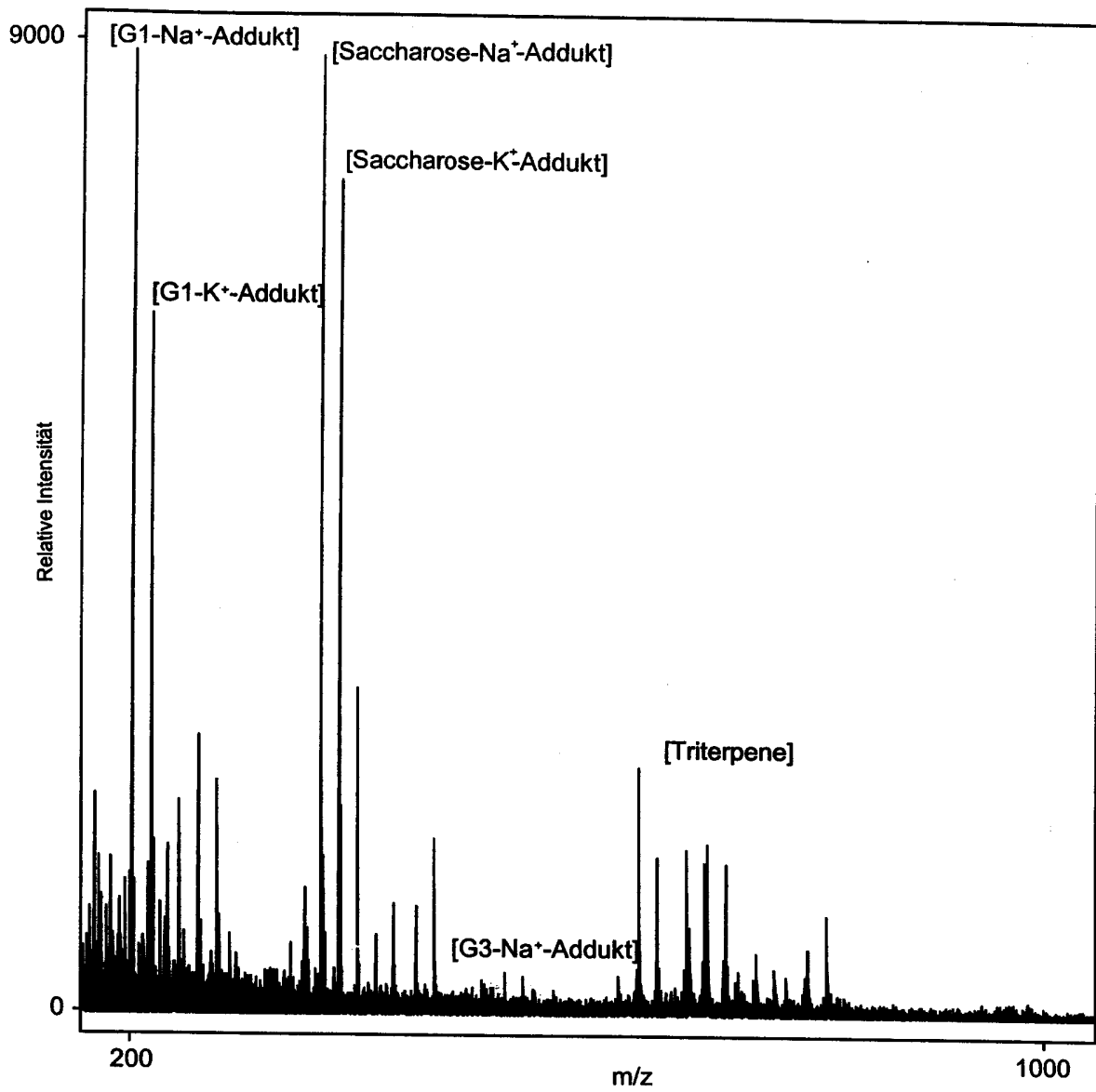


Abb. 17

NACHGEREICHT

U 9678

12/13

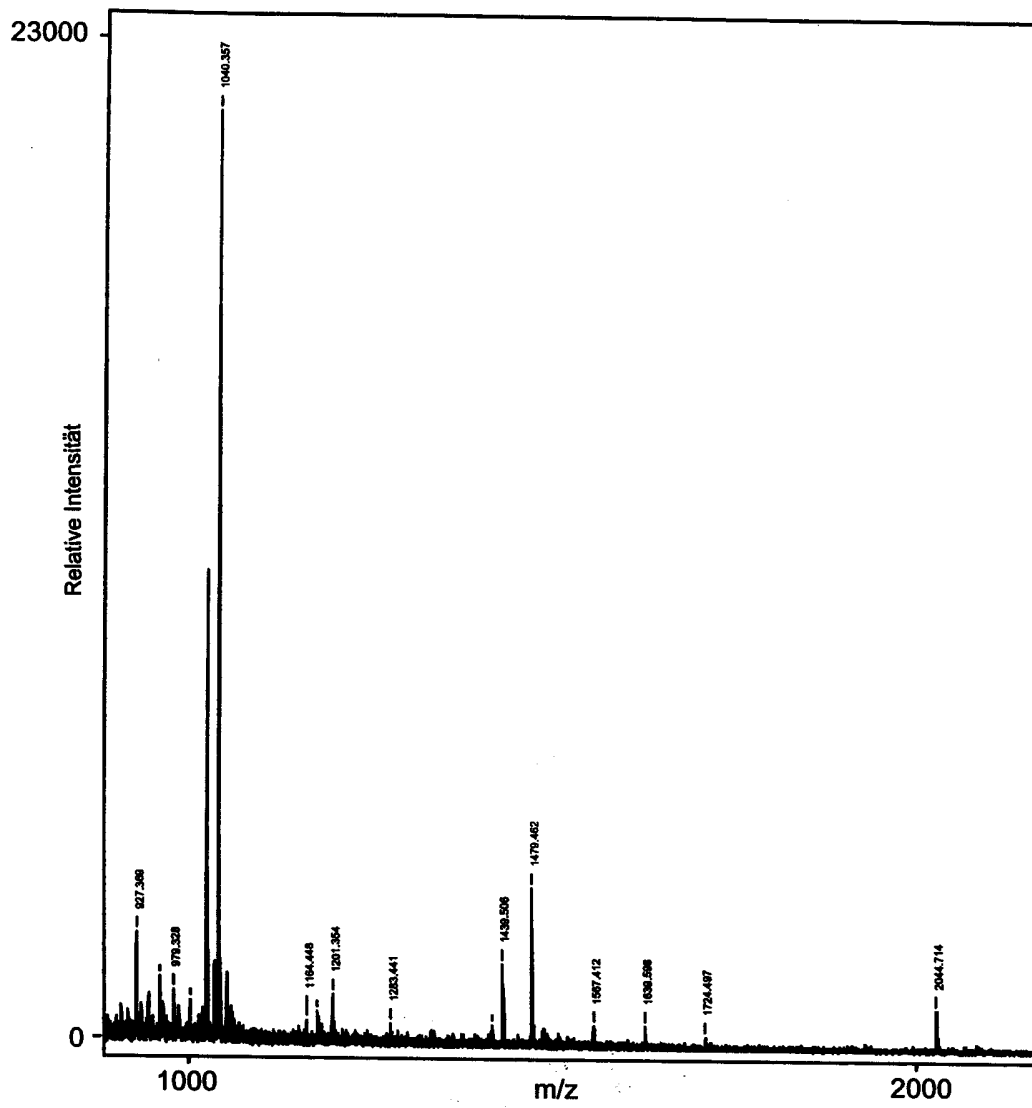


Abb. 18

NACHGEREICH

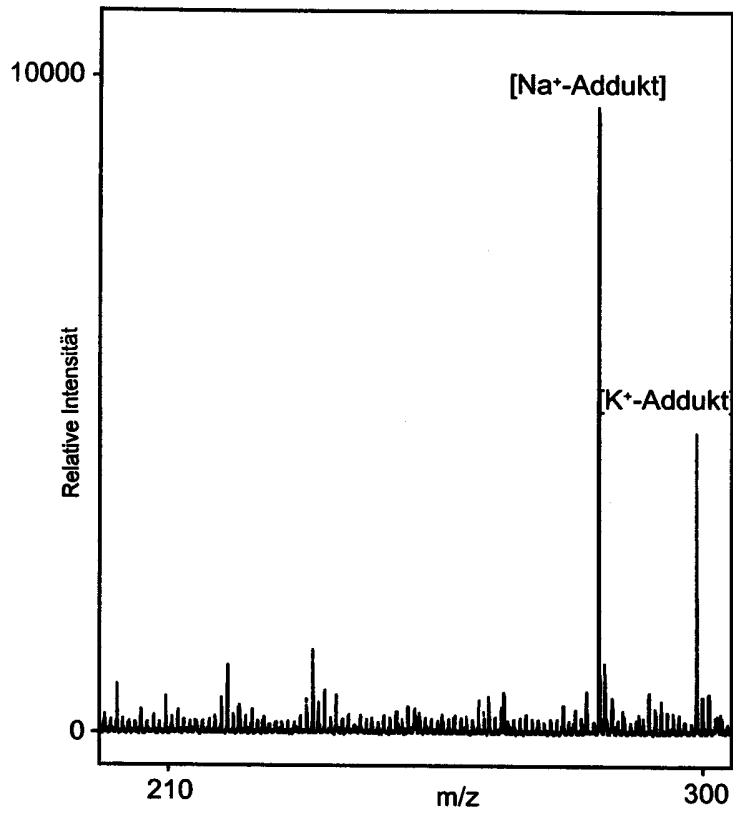


Abb. 19

Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß IPC <sup>B</sup> : <b>G01N 33/68 (2006.01); H01J 49/16 (2006.01)</b>		
Klassifikation des Anmeldegegenstands gemäß ECLA: <b>G01N33/68A12A; H01J49/16A</b>		
Recherchierter Prüfstoﬀ (Klassifikation): <b>H01J, G01N</b>		
Konsultierte Online-Datenbank: <b>EPODOC, WPI, TXT, INSPEC, XPESP, XPI3E, XPIEE</b>		
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am <b>25. August 2006</b> eingereichten Ansprüchen 1-13 erstellt.		
Kategorie <sup>1)</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreﬀend Anspruch
X	US 6124137 A (HUTCHENS) 26. September 2000 (26.09.2000) <i>Zusammenfassung; Spalte 4, Zeilen 24-27; Spalte 5, Zeilen 1-25; Spalte 14, Zeilen 61-67; Spalte 18, Zeilen 49-56; Spalte 36, Zeilen 54-63; Beispiele 2 und 3; Ansprüche</i>	1-8, 10, 12, 13
Y	--	9
Y	GORECKA-DRZAZGA, A. et al. "Desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon dioxide". Sensors and Actuators B. 2004, 103, S. 206-212; XP4560582 <i>gesamtes Dokument</i>	9
X	US 2002/0187312 A1 (FONASH) 12. Dezember 2002 (12.12.2002) <i>Zusammenfassung; Absätze 0007, 0008, 0038, 0042; Ansprüche</i>	1-10, 12, 13
A	LEWIS, W. et al. "Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry: background and applications". International Journal of Mass Spectrometry. 2003, 226, S. 107-116; XP4413196 <i>gesamtes Dokument</i>	1-13
Datum der Beendigung der Recherche: <b>17. Dezember 2007</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Fortsetzung siehe Folgeblatt Prüfer(in): <b>Dr. HARASEK</b>
<sup>1)</sup> Kategorien der angeführten Dokumente: <b>X</b> Veröffentlichung von <b>besonderer Bedeutung</b> : der Anmeldegegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden. <b>Y</b> Veröffentlichung von <b>Bedeutung</b> : der Anmeldegegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese <b>Verbindung für einen Fachmann naheliegend</b> ist. <b>A</b> Veröffentlichung, die den <b>allgemeinen Stand der Technik</b> definiert. <b>P</b> Dokument, das <b>von Bedeutung</b> ist (Kategorien X oder Y), jedoch <b>nach dem Prioritätstag</b> der Anmeldung <b>veröffentlicht</b> wurde. <b>E</b> Dokument, das <b>von besonderer Bedeutung</b> ist (Kategorie X), aus dem ein <b>älteres Recht</b> hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen). <b>&amp;</b> Veröffentlichung, die Mitglied der selben <b>Patentfamilie</b> ist.		

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	<p>GORECKA-DRZAZGA, A. et al. "Desorption/ionization mass spectrometry on an array of silicon microtips". Journal of Vacuum Science and Technology B. 2005, 23, S. 819-823; XP12079903 <i>gesamtes Dokument</i></p> <p style="text-align: center;">----</p>	1-13