

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1204/2005** (51) Int. Cl.⁸: **H01J 49/04** (2006.01),
(22) Anmeldetag: **02.04.2004** **G01N 1/28** (2006.01)
(43) Veröffentlicht am: **15.01.2007**

(62) Ausscheidung aus A 589/04

(73) Patentanmelder:

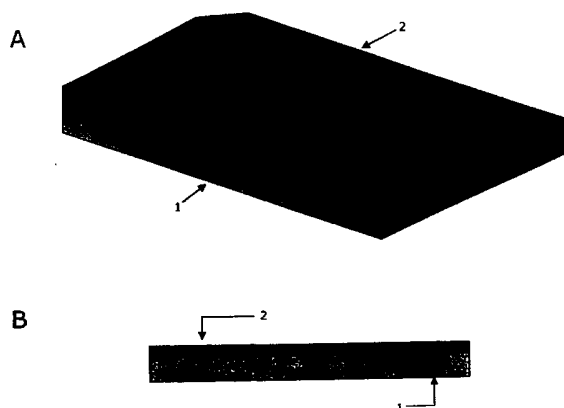
PHYSIKALISCHES BÜRO STEINMÜLLER GMBH
A-6074 RINN/ALDRANS (AT)
BONN GÜNTHER DR.
A-6020 INNSBRUCK (AT)

(72) Erfinder:

BONN GÜNTHER
ZIRL (AT)
FEUERSTEIN ISABEL
INNSBRUCK (AT)
HUCK CHRISTIAN WOLFGANG
INNSBRUCK (AT)
NAJAM-UL-HAQ MUHAMMAD
INNSBRUCK (AT)
RAINER MATTHIAS
GRINZENS (AT)
STECHE GÜNTHER
NATTERS (AT)
SCHWARZMANN GEORG
ZIRL (AT)
STEINMÜLLER-NETHL DORIS
RINN/ALDRANS (AT)
STEINMÜLLER DETLEF
RINN/ALDRANS (AT)

(54) **TARGET FÜR MALDI/SELDI-MS**

(57) Massenspektrometrisches Target umfassend ein Substrat, wobei das Substrat zumindest teilweise mit einer kohlenstoffhaltigen Schicht, welche chemisch-physikalisch modifiziert ist, überzogen ist. Die kohlenstoffhaltige Schicht kann Bindefunctionalitäten in Form von mindestens einem Linker aufweisen, an dem mindestens ein Analyt gebunden werden kann.



Zusammenfassung:

Massenspektrometrisches Target umfassend ein Substrat, wobei das Substrat zumindest teilweise mit einer kohlenstoffhaltigen Schicht, welche chemisch-physikalisch modifiziert ist, überzogen ist. Die kohlenstoffhaltige Schicht kann Bindefunktionalitäten in Form von mindestens einem Linker aufweisen, an dem mindestens ein Analyt gebunden werden kann.

In der Massenspektrometrie werden seit drei Jahrzehnten Laser mit dem Ziel eingesetzt durch eine geeignete Primäranregung eine direkte Desorption intakter Moleküle aus kondensierten Phasen zu erreichen. Bei den anfänglichen Versuchen wurden Proben in dünner Schicht auf eine elektrisch leitfähige Probenhalterung aufgebracht und anschließend mit einem gepulsten Laser bestrahlt. Diese Methode war zunächst nur für kleine Moleküle geeignet. Durch eine Weiterentwicklung, die zur Einbettung der zu untersuchenden Proben in eine Matrix bestehend aus kleinen organischen Molekülen führte, konnten schließlich größere Biomoleküle (> 1 kDa), allen voran Peptide und Proteine, erfolgreich und ohne die Erzeugung einer nicht auswertbaren Anzahl von Fragmenten analysiert werden. Diese Methode ist als Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) und in einer weiteren Entwicklung als oberflächenaktivierte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (SELDI-MS; surface enhanced laser desorption ionisation mass spectrometry) bekannt. Eine detaillierte Beschreibung der Grundlagen beider Technologien findet sich beispielsweise in „Massenspektrometrie in der Biochemie“ (W.D.Lehmann, Spektrum Akademischer Verlag, 1996, ISBN 3-86025-094-9), in "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: A New Approach to Mass Spectrometry of Large Biomolecules" (Biological Mass Spectrometry, Burlingame and McCloskey, editors, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 49-60, 1990) und in der EP 0 700 521 B1.

Bei MALDI/SELDI-MS wird auf ein sogenanntes „Target“ (d.h. eine festphasige Oberfläche) eine zu analysierende Substanz und eine sogenannte „Matrix“, in der die Analysensubstanz eingebettet ist, aufgebracht und im Anschluss mit einem Laserstrahl aktiviert. Die Laserenergie ist in ihrer Wellenlänge und Intensität passend zur Matrix ausgelegt, sodass diese verdampft wird und dabei die idealerweise unbeschädigten biologischen Substanzen von der Oberfläche des Targets herunterreißt. Im Zuge dieser Aktivierung kommt es zur Ionisierung der biologischen Probe, die dadurch über elektrische Felder beschleunigt werden kann und beispielsweise abhängig von der Flugzeit der Moleküle, die wiederum proportional der Wurzel der Masse des Moleküls ist, analysiert werden kann.

An das Target werden verschiedene Anforderungen gestellt: einerseits muss es elektrisch leitfähig sein, um eine gleich-

mäßige Verteilung des elektrischen Feldes zu ermöglichen, andererseits dürfen die Oberflächeneigenschaften des Targets nicht zur Veränderung oder Zerstörung der Probe führen, was vor allem bei Biomolekülen, wie beispielsweise bei DNA, Proteinen oder Peptiden, sehr wichtig ist.

Im Zuge der Entwicklung solcher Targets wurden verschiedene Ausführungsformen vorgeschlagen. Beispielsweise werden in der US 5,859,431 A Targets zur Verwendung bei MALDI-TOF-Analysen offenbart. Die darin beschriebenen Targets weisen sowohl glatte als auch makroskopisch sichtbare raue Flächen auf. Durch die dadurch entstehenden Grenzflächen zwischen rauhen und glatten Bereichen wird einerseits die Probenflüssigkeit auf einen definierten Bereich beschränkt und andererseits wird eine bessere Sichtbarkeit der getrockneten Probe gewährt. Gemäß dieser Anmeldung besteht das Target aus einem geeigneten leitfähigen Material, vorzugsweise aus rostfreiem Stahl.

In der CA 2 371 738 A1 werden Targets offenbart, deren Substrat mit einem hydrophoben Material (beispielsweise einem Polymer) beschichtet ist, um die Probentropfen in den vorgesehenen hydrophilen Ausnehmungen festzusetzen. Das Substrat bzw. das Polymer muss entweder elektrisch leitfähig sein oder elektrisch leitfähig gemacht werden, um die Oberflächenladung des Targets zu reduzieren und die Auflösung der massenspektrometrischen Analyse zu verbessern.

In der US 2003/218130 A1 werden auf einem Substrat Monomere kovalent gebunden, an denen in einem weiteren Schritt ein Polysaccharid-basiertes Hydrogel gebunden wird. Durch eine anschließende Funktionalisierung des Hydrogels mit funktionellen Gruppen, die auch in der Chromatographie Anwendung finden, können Substanzen selektiv gebunden und analysiert werden. Daher werden solche Targets laut dieser US-Schrift vorzugsweise in der SELDI-MS angewendet. Die Nachteile dieser Technologie liegen in der geringen Sensitivität, in der mangelnden Reproduzierbarkeit und in der fehlenden Wiederverwendbarkeit der Targets bzw. Biochips.

Die DE 196 18 032 A1 offenbart einen Probenträger für den Einsatz in einer MALDI-MS-Vorrichtung. Um die Stabilität des Probenträgers bezüglich Versand und Lagerung zu verbessern, besteht die Oberfläche des Probenträgers aus einer Matrixsubstanz, die mindestens zwei Komponenten umfasst, wobei eine erste Komponente zur Ionisierung der Analytmoleküle und eine weitere Kompo-

nente zur dichten Umschließung der ersten Komponente dient, um dadurch eine Lackschicht, die einen ausreichenden Schutz vor Lagerung und Transport bietet, zu erzeugen. Um Aufladungen der auf dem Substrat befindlichen Lackschicht zu unterbinden, weist der hierfür verwendete Lack einen elektrischen Leiter in disperser Form auf, welcher Kohlenstoff sein kann.

In der DE 100 43 042 A1 wird ein Probenträger, der für MALDI-Messanalysen herangezogen werden kann, offenbart, der mittels Lack abgegrenzte hydrophile und hydrophobe Bereiche aufweist. Ein derartiger Probenträger ist mit einer lyophoben Schicht beschichtet, welche ringförmige Affinitätsbereiche an der Oberfläche verteilt aufweist, die wiederum so genannte hydrophile Ankerbereiche umgeben, an denen ein Probentropfen nach dem Auftragen auf den Träger an den Probenträger gebunden werden kann. Die Affinitätsbereiche weisen in einer bevorzugten Ausführungsform Kohlenwasserstoffe von einer Länge von 4-18 Kohlenstoffatomen auf, wobei diese Alkanketten beispielsweise über Schwefelbrücken direkt an die Metalloberfläche gebunden sein können. Diese Affinitätsbereiche dienen dazu unselektiv Peptide, Proteine oder Oligonukleotide hydrophob an den Probenträger zu binden.

Die DE 102 30 328 A1 betrifft einen MALDI-Probenträger, der an dessen Oberfläche eine Kunststoffauflage aufweist, an der sich gezielt chemisch funktionalisierte Gruppen befinden. Derartige Gruppen sind Affinitätssorbentien, C18 oder Ionentauscher.

Die US 4 992 661 A offenbart ein Verfahren zur Neutralisierung einer spannungsgeladenen Oberfläche eines Probenträgers, welcher in einem „scanning ion microprobe mass analyzer“ verwendet wird. Aufgrund der Tatsache, dass ein derartiges Massenspektrometer einen Probenträger mit einer elektrisch leitfähigen Oberfläche („beschossenen Oberfläche“) voraussetzt, wird dieser mit einem dünnen Film beschichtet, sofern der Probenträger selbst elektrisch isolierend ist. Der elektrisch leitende Film kann aus Aluminium, Kohlenstoff, Gold oder Indium bestehen.

Die US 5 958 345 A offenbart einen Probenhalter für eine flüssige Probe, welcher verschiedene hydrophobe und hydrophile Bereiche zum Aufnehmen der Probe aufweist. Diese Bereiche können mit organischen/anorganischen Polymeren und karbonisierten Filmen, bestehend aus einem Material wie Rayon, beschichtet sein.

In der US 6 624 409 B wird ein Substrat für MALDI-MS offen-

bart, welches eine Beschichtung von Nitrid-Verbindungen, insbesondere von Titanium-, Zirkonium- und Hafniumnitrid aufweist. Eine derartige Beschichtung weist bezüglich Probenoberflächen-Inertheit Vorteile auf und erlaubt dennoch, dass die an der Oberfläche auftretende elektrische Spannung abgeleitet werden kann.

Die EP 297 548 B1 beschreibt einen Probenhalter für Glimm-Entladungsmassenspektrometrie („glow discharge mass spectrometry“). Dieser Probenhalter kann eine i-Kohlenstoff- oder kristalline Diamantenbeschichtung aufweisen.

Die EP 1 274 116 A2 offenbart einen Probenhalter zur Analyse von Proben durch ein MALDI-MS bei dem ein Widerstand an der Oberfläche von weniger als 2000 Ω auftritt. Die elektrische Leitfähigkeit des Probenhalters wird dadurch erreicht, dass metallische Probenhalter verwendet werden oder nicht leitende Materialien (z.B. Kunststoff), die mittels Kohlenstoffpartikeln, Kohlenstofffasern, metallbeschichteten Glaskügelchen, Metallpartikeln und Kombinationen davon leitfähig gemacht werden können.

In der US 2002/187312 A1 ist ein „mehrschichtiges“ MALDI-Target beschrieben, welches aus einem Substrat mit einer Oberflächenbeschichtung besteht. Jede Schicht dieses Targets (inklusive des Substrats) erfüllt eine oder mehrere Aufgaben. Zum einen dienen diese Schichten zur Absorption von Licht (Absorptionsschicht) und zum anderen zur Aufnahme des Analyten (Immobilisierungsschicht). Sowohl die Absorptions- als auch die Immobilisierungsschicht können unter anderem Rußpartikeln aufweisen.

Die DE 197 54 978 A1 offenbart einen Probenträger für die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen durch das MALDI-Verfahren. Um die Oberfläche des Probenträgers, der gegebenenfalls eine elektrisch nicht-leitende Beschichtung aufweist, elektrisch leitend zu machen, kann Graphit eingelagert werden.

In der WO 03/046945 A1 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem Graphit-Partikeln, welche in einer Flüssigkeit (z.B. Wasser oder Methanol) suspendiert sind, auf ein Substrat eines MALDI-Targets aufgebracht werden. Die Graphit-Partikeln auf der Target-Oberfläche ermöglichen die Bildung von einheitlichen Matrix-Kristallen auf besagter Oberfläche.

Es ist Aufgabe dieser Erfindung Targets für die Verwendung in der Massenspektrometrie zu Verfügung zu stellen, die robust,

einfach herstellbar und anwendbar und hochgradig biokompatibel sind und deren Oberfläche sich einfach und gut funktionalisieren lässt.

Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung ein massenspektrometrisches Target für ein Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometer umfassend ein Substrat, welches zumindest teilweise mit einer kohlenstoffhaltigen Schicht, umfassend ein Material ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Diamant, amorphem Kohlenstoff, DLC (diamond-like-carbon), Graphit, Nanotubes, Nanowires, Fullerenen und Mischungen davon, überzogen ist, und die kohlenstoffhaltige Schicht chemisch-physikalisch modifiziert ist. Im Gegensatz zu den im Stand der Technik bekannten massenspektrometrischen Targets liegen die Vorteile der erfindungsgemäßen Targets in der hohen Reproduzierbarkeit, in der hohen Biokompatibilität, in der höheren Sensitivität und in der Regenerierbarkeit, die eine mehrmalige Wiederverwendbarkeit ermöglicht. Des Weiteren ermöglichen kohlenstoffhaltige Schichten, welche chemisch-physikalisch modifiziert sind und somit Vielzahl möglicher chemischer Modifikationen ermöglichen, können beispielsweise dazu dienen ein oder mehrere Analyten spezifisch an der kohlenstoffhaltigen Schicht eines Targets zu binden. Das Substrat kann erfindungsgemäß zur Gänze oder nur teilweise mit einer kohlenstoffhaltigen Schicht überzogen sein. Dadurch ist es möglich, Bereiche der kohlenstoffhaltigen Schicht mit verschiedenen Oberflächeneigenschaften herzustellen, um eine Vielzahl von chemischen Reaktionen auf nur einem einzigen Target zu ermöglichen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung besteht ein „Target“ aus einem Substrat und einer kohlenstoffhaltigen Schicht. Auf dem Target wird die zu analysierende Probe aufgebracht. Das Target dient als Ziel der ionisierenden Strahlen in einem Massenspektrometer, insbesondere in einem Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometer. Das Target kann selbst gänzlich jenes Material umfassen, aus dem die kohlenstoffhaltige Schicht besteht.

Das „Substrat“ dient als Trägermaterial für die kohlenstoffhaltige Schicht. Das Substrat kann aus jedem beliebigen Material bestehen, das sich als Träger für kohlenstoffhaltige Schichten eignet. Dabei können alle in der Massenspektrometrie verwendeten und im Stand der Technik bekannten Substrate verwendet werden. Weiters betreffen erfindungsgemäß Substrate sowohl elektrisch

leitfähige als auch elektrisch nicht leitfähige Substrate, die gegebenenfalls durch eine Nachbehandlung, wie z.B. Dotierung, leitfähig gemacht werden können. Bei der Verwendung von elektrisch nicht leitenden Substraten muss die zumindest die kohlenstoffhaltige Schicht Strom leiten.

Erfindungsgemäß können zur Herstellung von massenspektrometrischen Targets jegliche Art von Schichten umfassend ein Material ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Diamant, amorphem Kohlenstoff, DLC (diamond-like-carbon), Graphit, Nanotubes, Nanowires, Fullerenen und Mischungen davon verwendet werden. Auch Schichten, die Kohlenstoff in sp^2 - und/oder sp^3 -Hybridisierung enthalten, können eingesetzt werden.

Vorzugsweise umfasst die kohlenstoffhaltige Schicht des Targets nanokristalline, polykristalline, ultrananokristalline (Carlisle J.A. and Auciello O., Ultrananocrystalline diamond-Properties and Applications in Biomedical Devices, The Electrochemical Society Interface, 12 (1), 28-31 (2003)) und monokristalline Diamanten. Die Verwendung von Diamantoberflächen hat sich aufgrund der hohen Biokompatibilität zur Durchführung der vorliegenden Erfindung besonders gut geeignet. Das Substrat selbst kann Diamanten umfassen bzw. aus einem einzigen Diamanten („high-pressure high-temperature material“, HPHT) bestehen.

Der Begriff „Biokompatibilität“ bezieht sich erfindungsgemäß auf das Target und bedingt, dass das Target sowohl in reiner als auch in chemisch bzw. physikalisch modifizierter Form die Proben weder negativ beeinflusst noch zerstört.

In der Literatur ist bekannt, dass reiner Diamant biokompatible Eigenschaften aufweist. Dies wird beispielhaft im Artikel „DNA-Modified Nanocrystalline Diamond Thin-Films as stable, biologically active substrates“ (Nature Materials, November 24, 2002) beschrieben. Durch entsprechende Vorbehandlung der Diamantschicht können Eigenschaften erreicht werden, die die Biokompatibilität gegenüber einzelnen Substanzen drastisch und vor allem dauerhaft erhöht.

Eine allgemeine Möglichkeit zur Herstellung von Diamantschichten wird beispielsweise in der CA 2,061,302 offenbart. Gemäß diesem Dokument wird eine Diamantschicht auf einem Graphit-Substrat und einer sich darauf befindlichen Metallschicht aufgebracht, da das direkte Beschichten von Graphit in dem dortigen Fall keine einwandfreie Qualität der Diamantschicht ermöglicht.

Des Weiteren können kohlenstoffhaltige Schichten, insbesondere Diamantschichten, mittels Galvanisierung auf ein Substrat aufgebracht werden.

Weitere Herstellungsverfahren lassen sich in drei wesentliche Kategorien einteilen: „Hot-Filament-Verfahren“, „Plasmaverfahren“ und „Hybrid-Verfahren“. Weiters existieren noch Alternativtechnologien, die jedoch in der Anwendung derzeit wenig etabliert sind. Einen Überblick über verschiedene Technologien findet man in „Diamond Films Handbook“ (edited by Jes Asmussen and D.K. Reinhard, Marcel Dekker, 2002, ISBN 0-8247-9577-6) und in „Synthetic Diamond - Emerging CVD Science and Technology“ (edited by K.E. Spear and J.P. Dismukes, The Electrochemical Society Series, John Wiley & Sons, 1994, ISBN 0-471-53589-3).

Das Hot-Filament-Verfahren beruht auf der thermischen Anregung von kohlenstoffhaltigen Gasen im Niederdruck-Bereich. Dabei scheiden sich verschiedene Formen von kohlenstoffhaltigen Schichten auf einem Substrat ab. Durch die thermische Anregung eines zweiten Gases - meist Wasserstoff, der in atomaren Wasserstoff aufgespalten wird - werden anschließend die Komponenten weggeätzt, bei denen der Kohlenstoff in sp^1 - oder sp^2 -Hybridisierung vorliegt. Bei geeigneter Parameterwahl ist somit die Aufbringung von kohlenstoffhaltigen Schichten mit sehr hohem kristallinen sp^3 -Hybrid-Anteil möglich. Eine Ausführungsform dieser Technologie ist in „Diamond and Related Materials“ (P. K. Bachmann et al., 1991) und in der JP 2 092 895 beschrieben.

Bei dem Plasma-Verfahren findet die Anregung der Gase durch eine Plasmaanregung in verschiedensten Ausführungsformen statt. Die Technologie beruht wieder auf dem oben beschriebenen Prinzip der Ablagerung verschiedenster Kohlenstoffmodifikationen, die ihrerseits wieder durch den angeregten atomaren Wasserstoff oder andere Hilfsgase, wie zum Beispiel Argon, geätzt werden, sodass in der Nettobilanz ein hoher Anteil an sp^3 -hybridisierten kristallinen Diamanten entsteht. Beispiele dieser Technologie finden sich in der JP 1 157 498 und in der EP 0 376 694.

Die Hybrid-Verfahren verwenden eine Kombination der beiden oben beschriebenen Technologien, d.h. die thermische Anregung durch Filamente wird durch verschiedenartige Plasmaanregungen unterstützt. Eine Ausführungsform ist in der US 4,504,519 beschrieben.

Bei den Alternativtechnologien ist das arc-jet-Verfahren zu

erwähnen, bei dem sich durch die Zündung eines Lichtbogens in einem örtlich eng begrenzten Bereich Diamantschichten - allerdings mit meist hohem sp^2 -Anteil - in meist hoher Rate abscheiden lassen. Ein Beispiel für die Technologie findet sich in der EP 0 607 987.

Ein weiteres bevorzugtes Herstellungsverfahren ist in der AT 399 726 B beschrieben. Hierbei handelt es sich um ein abgewandeltes Hot-Filament-Verfahren, bei dem die Gasanregung mit sehr hoher Effizienz betrieben werden kann. Mit diesem Verfahren können nicht nur DLC-Schichten hergestellt werden, sondern auch nanokristalline Diamantschichten, die sich in der hier beschriebenen Target-Beschichtung als besonders vorteilhaft erwiesen haben.

Der Kristallitanteil in der Diamantschicht kann erfindungsgemäß variieren. Vorzugsweise hat die Diamantschicht einen Kristallitanteil von mindestens 10%, von mindestens 20%, von mindestens 30%, von mindestens 40%, von mindestens 50%, von mindestens 60%, von mindestens 70%, von mindestens 80%, von mindestens 90%, von mindestens 95%, von mindestens 99%, insbesondere von mindestens 99,5%. Bereits bei einem Kristallitanteil von 10% konnten die erfindungsgemäßen Eigenschaften nachgewiesen werden. Daher eignen sich zur Herstellung der Targets nicht nur Diamantschichten mit einem hohen, sondern auch mit einem geringen Kristallitanteil. Somit können auch diamant-ähnliche Kohlenstoffschichten (DLC, diamond like carbon) zur Beschichtung von Substraten verwendet werden.

Erfindungsgemäß ist es günstig, wenn die Diamantschicht eine Kristallitgröße von weniger als 500 nm, vorzugsweise von weniger als 300 nm, insbesondere von weniger als 100 nm, aufweist. Diese Kristallitgrößen sind besonders vorteilhaft bei der Herstellung von massenspektrometrischen Targets. Auch andere Kristallitgrößen sind erfindungsgemäß verwendbar.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die Diamantschicht eine Kristallitgröße von 0,1 nm bis 500 nm, vorzugsweise von 5 bis 100 nm, insbesondere von 8 bis 30 nm, auf.

Gemäß der vorliegenden Erfindung weist die Diamantschicht vorteilhafter Weise eine Schichtdicke von 0,1 nm bis 50 μ m, bevorzugt 100 nm bis 40 μ m, insbesondere von 1 bis 20 μ m, auf. Erfindungsgemäß kann die Diamantschicht unterschiedlich dick, geschlossen oder nicht geschlossen ausgeführt sein, um dennoch

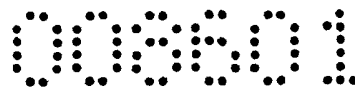
optimale Ergebnisse bei der Analyse zu erzielen. Daher sind auch geringe Schichtdicken, bei denen die Schicht noch nicht geschlossen ist, durchaus möglich, um die Kosten zu reduzieren.

Um eine gleichmäßige Verteilung des elektrischen Feldes zu erreichen ist es erforderlich, dass das Target insgesamt elektrisch leitfähig ist. Dies kann erfindungsgemäß durch ein elektrisch leitfähiges Substrat und/oder durch eine elektrisch leitfähige kohlenstoffhaltige Schicht verwirklicht werden. Diese Leitfähigkeit wird vorzugsweise durch die Verwendung eines elektrisch leitfähigen Substrats erreicht. Kohlenstoffhaltige Schichten weisen in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung eine relativ geringe elektrische Leitfähigkeit auf. Daher ist es im Zusammenhang mit der vorliegende Erfindung vorteilhaft, wenn zumindest das Substrat elektrischen Strom leiten kann. Eine Ausführungsform, in der die kohlenstoffhaltige Schicht durch Dotierung leitfähig gemacht wird (bulk sowie Oberfläche) und das Substrat nicht leitfähig ist, ist ebenso möglich.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die kohlenstoffhaltige Schicht aufgrund von Dotierung leitfähig. Dabei wird das Volumsmaterial oder die Oberfläche der kohlenstoffhaltigen Schicht mit den im Stand der Technik bekannten Elementen, wie beispielsweise Bor und Brom, und Methoden dotiert. Beispiele für solche dotierten Diamantschichten finden sich in „Thin Film Diamond“ (edited by A. Lettington and J.W. Steeds, III. Royal Society (GB), 1994, ISBN 0412496305).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die kohlenstoffhaltige Schicht auf dem Target aufgrund von adsorbierten Substanzen leitfähig. Durch die Adsorption von Wasserstoff wird beispielsweise die Oberfläche von Diamant leitfähig. (Oliver A Williams and Richard B Jackman, Surface conductivity on hydrogen terminated diamond, Semicond. Sci. Technol. 18, 34-40, (2003)).

Vorzugsweise umfasst das Substrat Graphit, Metall, Metalloxiden, mineralischen Oxiden, Halbleiter, Polymer, Kunststoff, Keramik, Glas, Quarzglas, Kieselgel, Stahl, Komposit-Materialien, Nanotubes, Nanowires Fullerenen und Mischungen davon. Die vorliegende Erfindung schließt nicht nur elektrisch leitfähige Substrate ein, sondern auch solche Substrate, die durch eine Behandlung, wie z.B. durch Dotierung, leitfähig gemacht werden können.



Vorzugsweise weist die kohlenstoffhaltige Schicht sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche auf. Dabei kann das Target beispielsweise so gestaltet sein, dass die hydrophilen Bereiche, auf denen die Probenlösung aufgetragen wird, von hydrophoben Bereichen begrenzt sind. Dadurch ist es möglich die Probenlösung gezielt auf das Target aufzutragen, ohne dass die Probe an der Targetoberfläche zerrinnt. Eine ähnliche Ausführungsform - wenn gleich für einen völlig anderen Zweck - ist in der CA 2 371 738 A1 beschrieben, in der die Oberfläche des Targets verschiedene Oberflächenspannungen aufweist. Die Herstellung von hydrophoben bzw. hydrophilen Bereichen auf der Diamantoberfläche erfolgt gemäß den im Stand der Technik offenbarten Methoden (US 2002/045270 A1).

Aufgrund der chemisch-physikalischen Modifikation kann die Oberfläche derart verändert werden, dass daran beispielsweise weitere Substanzen spezifisch oder selektiv binden können.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weist die chemisch-physikalisch modifizierte kohlenstoffhaltige Schicht mindestens eine Binefunktionalität ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus polaren, apolaren, ionischen, affinen, spezifischen, metallkomplexierenden Gruppen und Mischungen davon, auf. Hierbei können beispielsweise alle in der Chromatographie verwendeten und zur Bindung beitragenden funktionellen Gruppen verwendet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird mit „Binefunktionalität“ eine funktionelle Gruppe, die Moleküle (Analyten) entweder kovalent oder nicht kovalent binden kann, bezeichnet.

Erfindungsgemäß zählen zu „affinen“ Gruppen all jene funktionellen Gruppen, die gegenüber anderen chemischen Verbindungen und Gruppen eine Affinität aufweisen (z.B. gegenüber phosphorylierten Verbindungen).

„Spezifische“ funktionelle Gruppen umfassen alle chemischen Verbindungen, die andere chemische Verbindungen und Gruppen spezifisch zu binden vermögen. Beispielfhaft erwähnt seien in diesem Zusammenhang Antikörper-Antigen-, Enzym-Substrat-, Enzym-Inhibitor- und Protein-Ligand-Verbindungen.

Vorzugsweise ist die kohlenstoffhaltige Schicht kovalent mit Wasserstoff (-H) (Toshiki Tsubota, Osamu Hirabayashi, Shintaro Ida, Shoji Nagaoka, Masanori Nagata and Yasumichi Matsumoto, Reactivity of the hydrogen atoms on diamond surface with various

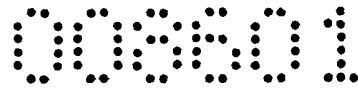


radical initiators in mild condition, Diamond and Related materials, 11 (7) 1360-1365 (2002)), Halogenen (-Cl, -Br, -I, -F), Hydroxylfunktion (-OH), Carbonylfunktion (=O), aromatischen Ringsystemen, Schwefel und Schwefelderivaten, Grignardverbindungen (-MgBr), Aminen (-NH₂), Epoxiden, Metallen (z.B. -Li) oder Kohlenstoffketten modifiziert. Die chemisch-physikalisch modifizierte kohlenstoffhaltige Schicht verfügt gegebenenfalls über Binefunktionalitäten.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weist die kohlenstoffhaltige Schicht mindestens eine Binefunktionalität ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Kohlenstoff-Bindungen, Epoxiden, Halogenen, Aminogruppen, Hydroxygruppen, Säuregruppen, Säurechloride, Cyanidgruppen, Aldehydgruppen, Sulfatgruppen, Sulfonatgruppen, Phosphatgruppen, Metall-komplexierende Gruppen, Thioethern, Biotin, Thiolen und Mischungen davon, auf. Durch das direkte Aufbringen von funktionellen Gruppen auf die kohlenstoffhaltige Schicht am Target ist es möglich Analyten, wie z.B. Peptide, Proteine, Nukleinsäuren und sonstige chemische Substanzen, kovalent oder nicht-kovalent an das Target zu binden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die kohlenstoffhaltige Schicht chemisch mit einem oder mehreren Linkern modifiziert. Der Linker wird dabei mit an sich im Stand der Technik bekannten Methoden (Fox and Whitesell, Organische Chemie, 1995, pages 255, 297-298, 335-338, 367-368, 406-408, 444-446, 493-496, 525-526, 550-551, 586-587, 879-884) an die chemisch-physikalisch modifizierte kohlenstoffhaltige Schicht gebunden (beispielsweise wird eine Verbindung, enthaltend eine Kohlenstoff-Doppelbindung, durch photochemische Reaktionen an die Diamantschicht gebunden (Todd Strother, Tanya Knickerbocker, John N. Russel, Jr. James E. Butler, Lloyd M. Smith, Robert J. Hamers, Photochemical Functionalisation of Diamond Films, Langmuir 18 (4): 968-971 (2002))). Diese Linker umfassen selbst funktionelle Gruppen, die direkt mit einer zu analysierenden Probe in Kontakt gebracht werden, oder sie umfassen chemisch funktionelle Gruppen an denen weitere chemische Verbindungen mit funktionellen Gruppen gebunden werden, die erneut mit einer zu analysierenden Probe in Kontakt gebracht werden.

Gemäß der vorliegenden Erfindung versteht man unter einem „Linker“ eine chemische Verbindung mit einer funktionellen



Gruppe, die entweder direkt an die kohlenstoffhaltige Schicht und/oder chemisch-physikalisch modifizierten kohlenstoffhaltige Schicht oder an die funktionelle Gruppe eines weiteren Linkers bindet.

Erfindungsgemäß versteht man unter einer „funktionellen Gruppe“ jenen Teil eines Moleküls, der für die Bindung eines weiteren Moleküls verantwortlich ist. Diese funktionellen Gruppen umfassen alle z.B. in der Affinitäts-, Reversed-Phase, Normal-Phase oder Ionentausch-Chromatographie angewandten Binde-funktionalitäten, um zum Beispiel Analyten wie Antikörper, Proteine, DNA, Rezeptoren und dergleichen spezifisch zu binden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform weist der Linker selbst mindestens eine Bindefunktionalität auf. Dadurch kann ein in dieser Weise funktionalisiertes Target ohne die chemische Bindung von weiteren Substanzen, die eine Bindefunktionalität aufweisen, verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen chemischen Modifikationen erlauben das Target zu funktionalisieren, so dass dieses Target schließlich Substanzen selektiv binden kann, vergleichbar mit Affinitäts-, Reversed-Phase-, Normal-Phase- oder Ionentausch-Säulen in der Chromatographie. Beim Funktionalisieren über einen Linker oder direkt an der kohlenstoffhaltigen Schicht von massenspektrome-trischen Targets werden erfindungsgemäß dieselben funktionellen Gruppen eingeführt wie bei den entsprechenden chromato-graphischen Methoden. Das in der Weise modifizierte Target kann dabei eine einzige oder mehrere solcher funktionellen Gruppen aufweisen, womit es möglich ist, die Selektivität des Targets zu steigern oder aber auch mehrere Substanzen an das Target zu binden. Diese funktionalisierten Targets gemäß der vorliegenden Erfindung eignen sich besonders gut zur Verwendung in der Laser Desorptions/Ionisations- Massenspektrometrie.

Vorzugsweise umfasst der Linker eine Epoxidgruppe und ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glycidyl Methacrylat, 3,4-Epoxybutyl Acrylat, 2-Methyl-2-Propenyl- Oxirancarbonsäure-Ester, 3-(2-Methyloxiranyl)-2-Propensäure-Methyl-Ester, Dihydro-4-(2-Propenyloxy)-2(3H)-Furanon, 2-Methyl-2-Propensäure-Oxira-nylmethyl-Ester, Tetrahydro-3-Furanyl-2-Propensäure-Ester, Oxi-ranylmethyl-2-Butensäure-Ester, 1-Methylethenyl-Oxiranessigsäu-re-Ester, Oxiranylmethyl-3-Butensäure-Ester, (3-Methyloxiranyl)-Methyl-2-Propensäure-Ester, 3-Oxiranyl-2-Propensäure-Ethyl-Es-



ter, 2-Methyl-2-Propenyl-Oxirancarbonsäure-Ester, 2-Oxiranylethyl-2-Propensäure-Ester, 3-(3-Butenyl)-Oxirancarbonsäure, 2,3-Epoxy-Buttersäure-Allyl-Ester, 2,3-Epoxypropyl-Crotonsäure-Ester, Tetrahydro-2-Furanyl-2-Propensäure-Ester, (2-Methyloxiranyl)-Methyl-2-Propensäure-Ester, 2-Methyl-2-Propensäure-3-Oxetanyl-Ester und Mischungen davon. Diese Moleküle können beispielsweise durch die vorhandenen Kohlenstoff-Doppelbindungen unter Einwirkung ultravioletter Strahlung an die Diamantschicht gebunden werden (Todd Strother, Tanya Knickerbocker, John N. Russel, Jr. James E. Butler, Lloyd M. Smith, Robert J. Hamers, Photochemical Functionalisation of Diamond Films, Langmuir 18 (4): 968-971 (2002)). Die freie Epoxidgruppe kann schließlich mit einem Molekül, das eine funktionelle Gruppe umfasst, weiterreagieren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der epoxidhaltige Linker mit einer Substanz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Iminodiessigsäure, Nitrilotriessigsäure, N-Carboxy-β-Alanin, Asparaginsäure, 2-Amino-2-Methyl-Propandi-Säure, 2-Furanessigsäure, 5-Ethyl-3-Hydroxy-4-Methyl-2(5H)-Furanon, Tetrahydro-4-Methylen-3-Furanessigsäure, Asparagin-Säure, 2-Butendi-Säure, Methylen-Propandi-Säure und Mischungen davon, modifiziert. Diese Moleküle binden bzw. komplexieren Metallionen und können daher, ähnlich wie in der Chromatographie, zur Analyse von Biomelekülen, verwendet werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist der Linker eine Aminogruppe auf und ist vorteilhafterweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 10-Undecen-1-amine, 1-Amino-5-Hexen, N-2-Propenyl-2,2,2-Trifluor Acetamid und Mischungen davon. Diese Moleküle können beispielsweise über eine Kohlenstoff-Doppelbindung direkt an die kohlenstoffhaltigen Schicht gebunden werden und werden vorzugsweise durch ihre positive Nettoladung als Anionentauscher eingesetzt.

Vorzugsweise weist der Linker eine Carbonsäuregruppe auf und ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 2-Butendisäure, Ethylendicarbonsäure und Mischungen davon. Da die erwähnten Säuren eine negative Nettoladung aufweisen, werden Targets mit solchen funktionellen Gruppen vorzugsweise als Kationentauscher verwendet.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Linker ein Halogen und ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe be-

stehend aus Propenylchlorid, Butenylchlorid, 1-Brom-Propen, 1-Chlor-Propen, 2-Brom-Propen, 2-Chlor-Propen, 4-Chlor-1-Buten, 4-Chlor-2-Buten, 3-Chlor-1-Buten, 2-Methyl-1-Chlor-1-Propen, 1-Chlor-2-Buten, 1-Chlor-1-Buten, 2-Chlor-3-Methyl-2-Buten, 3-Chlor-2-Methyl-2-Buten, 4-Chlor-2-Penten, 2-Chlor-2-Penten, 1-Chlor-1-Penten, 1-Chlor-3-Methyl-1-Buten, 1-Chlor-2-Methyl-1-Buten, 3-Chlor-2-Penten, 5-Chlor-2-Penten, 1,5-Dichlor-2-Penten, 4,4-Dichlor-2-Methyl-1-Buten, 2-Chlor-5-Methyl-3-Hexen, 3-Chlor-4-Methyl-1-Hexen, 2-Chlor-2-Methyl-3-Hexen und Mischungen davon.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform besteht das Substrat aus Graphit, das mit einer kohlenstoffhaltigen Schicht überzogen ist. Der Einsatz von Graphit als Substrat hat sich als besonders geeignet für den Einsatz in der Massenspektrometrie erwiesen.

Gemäß einer besonderen Variante des erfindungsgemäßen Targets besteht das gesamte Target aus der kohlenstoffhaltigen Schicht, so dass Substrat und kohlenstoffhaltige Schicht in einem vereint sind (als kohlenstoffhaltiger Materialkörper, z.B. als Diamant-Kristall (high-pressure high-temperature Material; HPHT) oder als Graphitblock).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Target austauschbar auf einer Halterung („Substrathalter“) aufgebracht. Durch diese erfindungsgemäße Ausführungsform ist es möglich, Targets flexibel auszutauschen, was zu einer Erleichterung bei der Handhabung von Targets führt. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass es nun möglich ist, verschieden funktionalisierte Targets beliebig zu kombinieren. Auch bei der Herstellung funktionalisierter Targets ergeben sich zahlreiche Vorteile, da aus großflächig funktionalisierten Targets kleine handliche und flexibel anwendbare Targets gefertigt werden können. Dies ist natürlich auch verkaufstechnisch vorteilhaft.

Vorzugsweise wird die Targethalterung mit den verschiedenen funktionalisierten Targets direkt in das Massenspektrometer eingesetzt. Dadurch kann eine Probe mittels Anwendung verschiedener chromatographischer Techniken durchgescreent werden.

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Target in der Matrix-unterstützten Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder in der oberflächenaktivierten Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (SELDI-MS) eingesetzt. Die Verwendung eines solchen Targets weist erhebliche Vorteile gegenüber dem Stand der Technik auf, vor allem bezüg-

lich der besseren Analysenergebnisse, der flexibleren Handhabung und der mit einer Vielzahl an möglichen chemischen Reaktionen (Fox and Whitesell, Organische Chemie, 1995, Seiten 255, 297-298, 335-338, 367-368, 406-408, 444-446, 493-496, 525-526, 550-551, 586-587, 879-884) verbundenen gestaltbaren Funktionalisierung der Targetoberfläche, der Biokompatibilität, Robustheit, Herstellbarkeit und Haltbarkeit.

Erfindungsgemäß wird nach einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Analyse einer Probe mittels oberflächenaktivierter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (SELDI-MS), umfassend:

- Aufbringen einer Probe auf ein erfindungsgemäßes Target,
- optionelles Entfernen der nicht am Target gebundenen Stoffe,
- Hinzufügen einer Matrix, Einbettung der Probe in die Matrix mittels Verdampfung eines Lösungsmittels und
- Analyse der Probe mittels Massenspektrometrie

zur Verfügung gestellt.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Analyse einer Probe mittels Matrix-unterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS), umfassend

- Aufbringen einer Probe auf ein erfindungsgemäßes Target,
- Hinzufügen einer Matrix, Einbettung der Probe in die Matrix mittels Verdampfung eines Lösungsmittels und
- Analyse der Probe mittels Massenspektrometrie.

Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung kohlenstoffhaltige Partikel umfassend oder bestehend aus einer erfindungsgemäßen kohlenstoffhaltigen Schicht, sowie die Verwendung dieser Partikel zum Binden von mindestens einem Analyten einer Probe und zur anschließenden Analyse der beladenen Partikel mittels matrixunterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie verwendet.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein kohlenstoffhaltiges Pulver umfassend oder bestehend aus der erfindungsgemäß genutzten kohlenstoffhaltigen Schichtmaterial, sowie die Verwendung dieses Pulvers zum Binden eines oder mehrerer Analyten einer Probe und zur anschließenden Analyse des beladenen Pulvers mittels matrixunterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie vor. Sowohl die koh-



lenstoffhaltigen Partikel als auch das kohlenstoffhaltige Pulver eignet sich besonders gut zur Verwendung in der Massenspektrometrie. Beide Formen können beispielsweise als chromatographisches Material verwendet werden, wobei die beladenen Partikel bzw. das beladene Pulver nach Aufbringen auf einem Träger in einem Massenspektrometer untersucht werden können.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung auch eine pastöse Masse umfassend oder bestehend aus dem erfindungsgemäß genutzten kohlenstoffhaltigen Schichtmaterial sowie die Verwendung dieser Paste zum Binden eines oder mehrerer Analyten einer Probe und zur anschließenden Analyse der beladenen Masse mittels matrixunterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie.

Die Erfindung wird weiters durch folgende Figuren und Beispiele erläutert, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt die Draufsicht A und den Querschnitt B eines Targets, bestehend aus einem Substrat 1 und einer Diamantschicht 2.

Fig. 2 zeigt beispielhaft eine Targethalterung 3, auf der austauschbare funktionalisierte Targets 4 aufgebracht sind.

Fig. 3 zeigt eine Illuminationskammer mit der ein Target 5 unter Zufuhr 6 von inertem Gas mittels UV-Strahlung (UV-Lampe 7) mit einem Linker (durch den Zulauf 8) funktionalisiert werden kann.

Fig. 4 zeigt die Herstellung eines funktionalisierten Targets mit Glycidyl Methacrylat als Linker und Iminodiessigsäure als funktionelle Gruppe. Die Bindung des Linkers (z.B. Glycidyl-Methacrylat) an eine mit Wasserstoff gesättigten Diamantschicht A wird durch UV-Strahlung katalysiert B. Die freie Epoxidgruppe des Linkers reagiert schließlich mit Iminodiessigsäure weiter und bildet somit eine metallkomplexierende Oberfläche aus C. Das funktionalisierte Target wird schließlich mit Metallionen beladen D.

Fig. 5 zeigt beispielhaft weitere funktionelle Gruppen, die über die Epoxidgruppe des Linkers an das Target gebunden werden können.

Fig. 6 zeigt eine massenspektrometrische Analyse von menschlichem Serum in einem Massenbereich von 2-10 kDa, wobei folgende Bedingungen angewendet wurden: Sinapinsäure 1:1 in 50 % Acetonitril und 50 % 0.1 % TFA in deionisiertem Wasser; gemessen im positiven linearen Modus.

Fig. 7 zeigt ein MS-Spektrum von Blutserum mit einem erfindungsmäßigen Targets vor (Fig. 7A) und nach (Fig. 7B) der Regeneration bzw. Behandlung mit EDTA, wobei folgende Bedingungen angewendet wurden: Sinapinsäure 1:1 in 50 % Acetonitril und 50 % 0.1 % TFA in deionisiertem Wasser; gemessen im positiven linearen Modus; Massenbereich von 2 - 10 kDa.

Fig. 8 zeigt die verschiedenen Bindemöglichkeiten eines Analyten an ein erfindungsmäßiges Target, bestehend aus einem Substrat 1 und einer kohlenstoffhaltigen Schicht 2. Der Analyt kann dabei direkt über ein chemisch modifiziertes Target (wobei Y beispielsweise H, Cl, Br, I, F, OH, O, S, NH₂, MgBr, Li, Benzen umfasst; Fig. 8A), über einen Linker L (z.B. Glycidyl-Methacrylat), der auch eine Bindefunktionalität aufweist (Fig. 8B), über eine Verbindung F (Fig. 8C), die an einem Linker L gebunden ist und eine Bindefunktionalität aufweist, über mehrere Verbindungen F und nF (Fig. 8D) oder über ein Metallion M (Fig. 8E) an das Target gebunden werden. Die Bindefunktionalität erlaubt eine kovalente und/oder nicht-kovalente Bindung des Analyten an das Target.

Beispiele:

Beispiel 1: Herstellung der Diamantschicht

Ein entsprechendes Graphitsubstrat wird in Isopropanol für 15 Minuten im Ultraschall gereinigt und danach mit trockenem Stickstoff abgeblasen. Das Teil wird mittels einer Aufnahme in eine Suspension aus Diamantpulver (Körnung 250 Mikrometer) und Isopropanol getaucht und für 60 Minuten mit Ultraschall belegt. Danach wird das Teil mit Isopropanol gewaschen und mit trockenem Stickstoff getrocknet.

Das getrocknete Teil wird auf einen Substrathalter der Diamantbeschichtungsanlage montiert und für 20 Stunden mit Diamant beschichtet. Bei einer Wachstumsrate von 0,2 µm pro Stunde ergibt sich daraus eine resultierende Schichtdicke von etwa 4 µm.

Beispiel 2: Derivatisierung der Diamantoberfläche für Metall-Affinitätschromatographie

Der diamantbeschichtete Graphit wird in eine Illuminationskammer (Fig. 3) gegeben, die mit Stickstoff durchströmt wird. Die Abdeckung (Deckel) der Illuminationskammer besteht aus Quarzglas. Auf die Diamantoberfläche wird die Linkersubstanz z.B. Glycidyl-Methacrylat aufgegeben und der diamantbeschichtete Graphit für 5 bis 15 Stunden mit UV-Licht illuminiert. Danach

wird der diamantbeschichtete Graphit mit deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wird der diamantbeschichtete Graphit für 5 bis 15 Stunden mit einer Iminodiessigsäurelösung bei optimalem pH-Wert behandelt. Nach Waschen des diamantbeschichteten Graphits mit deionisiertem Wasser, wird dieser mit Metallionen z.B. Kupfer, Eisen, Nickel, Gallium beladen. Darauf folgt ein weiterer Waschschrift mit deionisiertem Wasser (Fig. 4).

Beispiel 3: Probenpräparation am Target

40 µl menschliches Serum, 30 µl of 8 M Harnstoff, 1 % CHAPS ((3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat) in PBS (Phosphatpuffer salzhaltig) wird gemischt, mit PBS Puffer auf 1:5 verdünnt und für 10 Minuten bei ca. 4 °C geschüttelt. Das mit Iminodiessigsäure immobilisierte Diamanttarget wird mit Kupferionen beladen, aktiviert und mit PBS-Puffer equilibriert. Nach dem Equilibrationsschritt werden 40 µl Serum auf das Target gebracht. Nach der Inkubationszeit (2 Stunden bei 30 °C) werden die ungebundenen Proteine mehrmals mit PBS Puffer gewaschen (vorzugsweise 3x). Nach dem Waschschrift mit PBS wird noch 1x mit destilliertem Wasser nachgewaschen.

Beispiel 4: MALDI-TOF - Analyse (Fig. 6)

Nach dem Lufttrocknen der Probe am Target wird Matrix (vorzugsweise Sinapinsäure in 50 % Acetonitril und 50 % 0.1 % TFA in Wasser) zugegeben. Die Probe wird dann mittels MALDI-TOF-MS analysiert (Ultraflex MALDI-TOF-TOF, Bruker Daltonik, Bremen).

Beispiel 5: Entfernung der Probe und Regeneration des Targets (Fig. 7)

Das Target wird zunächst mit deionisiertem Wasser und anschließend mehrmals mit einer 100 mM EDTA Lösung gewaschen. Vor dem Trocknen (im Trockenschrank bei 30 °C) wird das Target erneut mit deionisiertem Wasser gereinigt.

Patentansprüche:

1. Massenspektrometrisches Target für ein Laser

Desorptions/Ionisations-Massenspektrometer umfassend ein Substrat, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat zumindest teilweise mit einer kohlenstoffhaltigen Schicht, umfassend ein Material ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Diamant, amorphem Kohlenstoff, DLC (diamond-like-carbon), Graphit, Nanotubes, Nanowires, Fullerenen und Mischungen davon, überzogen ist, und die kohlenstoffhaltige Schicht chemisch-physikalisch modifiziert ist.

2. Target nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht nanokristalline, polykristalline, ultrananokristalline oder monokristalline Diamanten umfasst.

3. Target nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht einen Diamantkristallitanteil von mindestens 10%, von mindestens 20%, von mindestens 30%, von mindestens 40%, von mindestens 50%, von mindestens 60%, von mindestens 70%, von mindestens 80%, von mindestens 90%, von mindestens 95%, von mindestens 99%, insbesondere von mindestens 99,5%, aufweist.

4. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Diamanten der kohlenstoffhaltigen Schicht eine Kristallitgröße von 0,1 bis 500 nm, vorzugsweise von 5 bis 100 nm, insbesondere von 8 bis 30 nm, aufweist.

5. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht eine Schichtdicke von 0,1 nm bis 50 µm, bevorzugt 100 nm bis 40 µm, insbesondere von 1 bis 20 µm, aufweist.

6. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht und/oder das Substrat elektrisch leitfähig ist.

7. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht aufgrund von Dotierung

leitfähig ist.

8. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht aufgrund von adsorbierten Substanzen leitfähig ist.

9. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat ein Material ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Graphit, Metall, Metalloxiden, mineralischen Oxiden, Halbleiter, Polymer, Kunststoff, Keramik, Glas, Quarzglas, Kieselgel, Stahl, Komposit-Materialien, Nanotubes, Nanowires, Fullerene und Mischungen davon, umfasst.

10. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht hydrophile und hydrophobe Bereiche aufweist.

11. Target nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die chemisch-physikalisch modifizierte kohlenstoffhaltige Schicht mindestens eine Binafunktionalität ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus polaren, apolaren, ionischen, affinen, spezifischen, metallkomplexierenden Gruppen und Mischungen davon, aufweist.

12. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht durch chemische Modifikation Wasserstoffatome, Halogene, Hydroxylgruppen, Carbonylgruppen, aromatische Ringsysteme, Schwefel, Schwefelderivate, Grignardverbindungen, Aminogruppen, Epoxide, Metalle oder Kohlenstoffketten aufweist.

13. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht mindestens eine Binafunktionalität ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Kohlenstoff-Doppelbindungen, Epoxiden, Halogenen, Aminogruppen, Hydroxygruppen, Säuregruppen, Säurechloride, Cyanidgruppen, Aldehydgruppen, Sulfatgruppen, Sulfonatgruppen, Phosphatgruppen, Metall-komplexierende Gruppen, Thioethern, Biotin, Thiolen und Mischungen davon, aufweist.

14. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die kohlenstoffhaltige Schicht mit mindestens einem Linker chemisch modifiziert ist.

15. Target nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker mindestens eine Bindefunktionalität umfasst.

16. Target nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Bindefunktionalität ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Kohlenstoff-Bindungen, Epoxiden, Halogenen, Aminogruppen, Hydroxygruppen, Säuregruppen, Säurechloride, Cyanidgruppen, Aldehydgruppen, Sulfatgruppen, Sulfonatgruppen, Phosphatgruppen, Metall-komplexierende Gruppen, Thioethern, Biotin, Thiolen und Mischungen davon, ist.

17. Target nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker eine Epoxidgruppe umfasst und vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycidyl Methacrylat, 3,4-Epoxybutyl Acrylat, 2-Methyl-2-Propenyl-Oxirancarbonsäure-Ester, 3-(2-Methyloxiranyl)-2-Propensäure-Methyl-Ester, Dihydro-4-(2-Propenyloxy)-2(3H)-Furanon, 2-Methyl-2-Propensäure-Oxiranylmethyl-Ester, Tetrahydro-3-Furanyl-2-Propensäure-Ester, Oxiranylmethyl-2-Butensäure-Ester, 1-Methylethenyl-Oxiranessigsäure-Ester, Oxiranylmethyl-3-Butensäure-Ester, (3-Methyloxiranyl)-Methyl-2-Propensäure-Ester, 3-Oxiranyl-2-Propensäure-Ethyl-Ester, 2-Methyl-2-Propenyl-Oxirancarbonsäure-Ester, 2-Oxiranylethyl-2-Propensäure-Ester, 3-(3-Butenyl)-Oxirancarbonsäure, 2,3-Epoxy-Buttersäure-Allyl-Ester, 2,3-Epoxypropyl-Crotonsäure-Ester, Tetrahydro-2-Furanyl-2-Propensäure-Ester, (2-Methyloxiranyl)-Methyl-2-Propensäure-Ester, 2-Methyl-2-Propensäure-3-Oxetanyl-Ester und Mischungen davon, ist.

18. Target nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker eine chemische Gruppe ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Iminodiessigsäure, Nitrilotriessigsäure, N-Carboxy- β -Alanin, Asparaginsäure, 2-Amino-2-Methyl-Propandi-Säure, 2-Furanessigsäure, 5-Ethyl-3-Hydroxy-4-Methyl-2(5H)-Furanon, Tetrahydro-4-Methylen-3-Furanessigsäure, Asparagin-Säure, 2-Butendi-Säure, Methylen-Propandi-Säure und Mischungen davon, umfasst.

19. Target nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker eine Aminogruppe enthält und vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 10-Undecen-1-amine, 1-Amino-5-Hexen, N-2-Propenyl-2,2,2-Trifluor Acetamid und Mischungen davon, ist.

20. Target nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker eine Carbonsäuregruppe enthält und vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 2-Butendisäure, Ethylendicarbonsäure und Mischungen davon, ist.

21. Target nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker ein Halogen enthält und vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Propenylchlorid, Butenylchlorid, 1-Brom-Propen, 1-Chlor-Propen, 2-Brom-Propen, 2-Chlor-Propen, 4-Chlor-1-Buten, 4-Chlor-2-Buten, 3-Chlor-1-Buten, 2-Methyl-1-Chlor-1-Propen, 1-Chlor-2-Buten, 1-Chlor-1-Buten, 2-Chlor-3-Methyl-2-Buten, 3-Chlor-2-Methyl-2-Buten, 4-Chlor-2-Penten, 2-Chlor-2-Penten, 1-Chlor-1-Penten, 1-Chlor-3-Methyl-1-Buten, 1-Chlor-2-Methyl-1-Buten, 3-Chlor-2-Penten, 5-Chlor-2-Penten 1,5-Dichlor-2-Penten, 4,4-Dichlor-2-Methyl-1-Buten, 2-Chlor-5-Methyl-3-Hexen, 3-Chlor-4-Methyl-1-Hexen, 2-Chlor-2-Methyl-3-Hexen und Mischungen davon, ist.

22. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat aus Graphit besteht und mit einer kohlenstoffhaltigen Schicht überzogen ist.

23. Target nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Target austauschbar auf einer Targethalterung aufgebracht ist.

24. Target nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Targethalterung direkt in das Massenspektrometer einsetzbar ist.

25. Verwendung eines Targets nach einem der Ansprüche 1 bis 24 zur Matrix-unterstützten Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrischen oder oberflächenaktivierten Laser Desorptions/Ionisations- Massenspektrometrischen Untersuchung

von zumindest einer Probe.

26. Verfahren zur Analyse einer Probe mittels oberflächen-aktivierter Laser Desorptions/Ionisations- Massenspektrometrie umfassend

- Aufbringen einer Probe auf ein Target nach einem der Ansprüche 1 bis 24,
- optionelles Entfernen der nicht am Target gebundenen Stoffe,
- Hinzufügen einer Matrix, Einbettung der Probe in die Matrix mittels Verdampfung eines Lösungsmittels und
- Analyse der Probe mittels Massenspektrometrie.

27. Verfahren zur Analyse einer Probe mittels matrixunterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie umfassend

- Aufbringen einer Probe auf ein Target nach einem der Ansprüche 1 bis 24,
- optionelles Entfernen der nicht am Target gebundenen Stoffe,
- Hinzufügen einer Matrix, Einbettung der Probe in die Matrix mittels Verdampfung eines Lösungsmittels und
- Analyse der Probe mittels Massenspektrometrie.

28. Kohlenstoffhaltige Partikel, umfassend eine kohlenstoffhaltige Schicht wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert.

29. Verwendung von kohlenstoffhaltigen Partikeln nach Anspruch 28 zum Binden von mindestens einem Analyten einer Probe und zur anschließenden Analyse der beladenen Partikel mittels matrixunterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie.

30. Kohlenstoffhaltiges Pulver, umfassend eine kohlenstoffhaltiges Schichtmaterial wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert.

31. Verwendung eines kohlenstoffhaltigen Pulvers nach Anspruch 30 zum Binden eines oder mehrerer Analyten einer Probe und zur anschließenden Analyse des beladenen Pulvers mittels matrixunterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrome-

trie.

32. Pastöse Masse, umfassend eine kohlenstoffhaltiges Material wie in einem der Ansprüche 1 bis 22 definiert.

33. Verwendung einer pastösen Masse nach Anspruch 32 zum Binden eines oder mehrerer Analyten einer Probe und zur anschließenden Analyse der beladenen Masse mittels matrixunterstützter Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie.

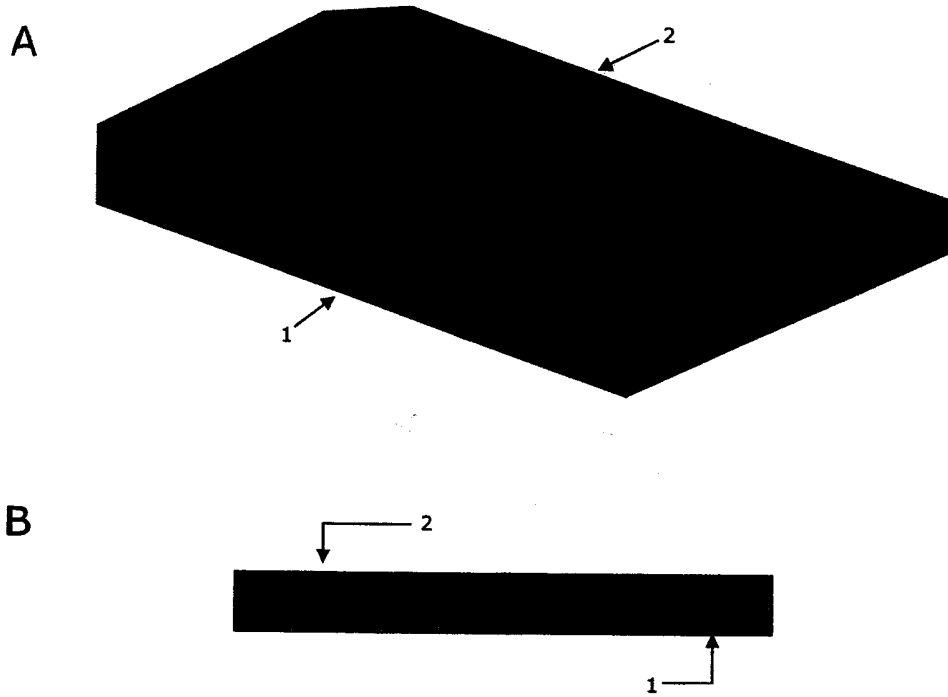


Fig. 1

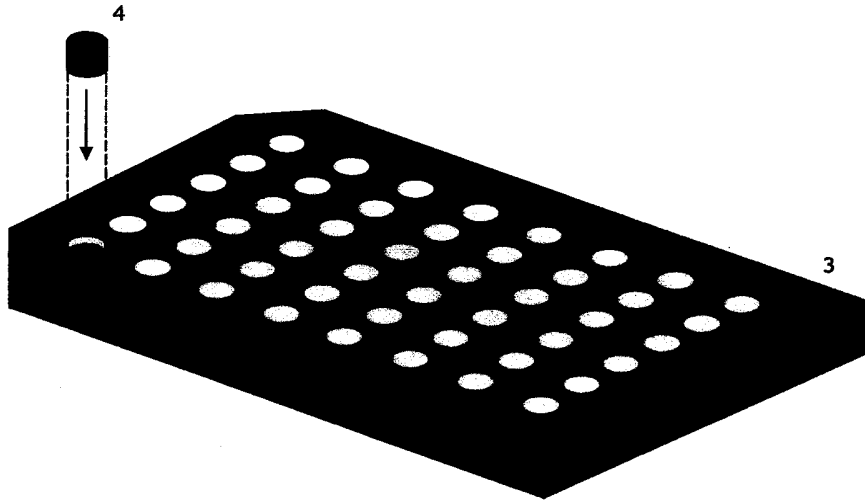


Fig. 2

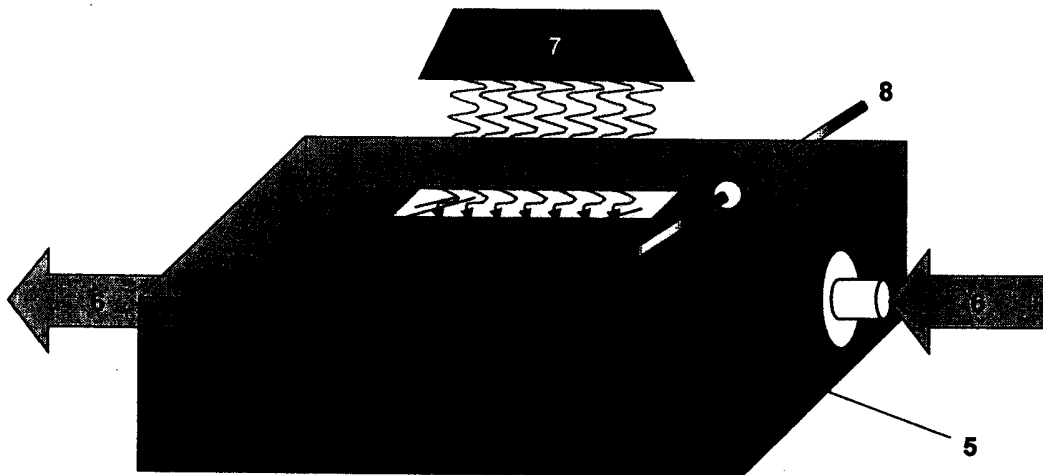


Fig. 3

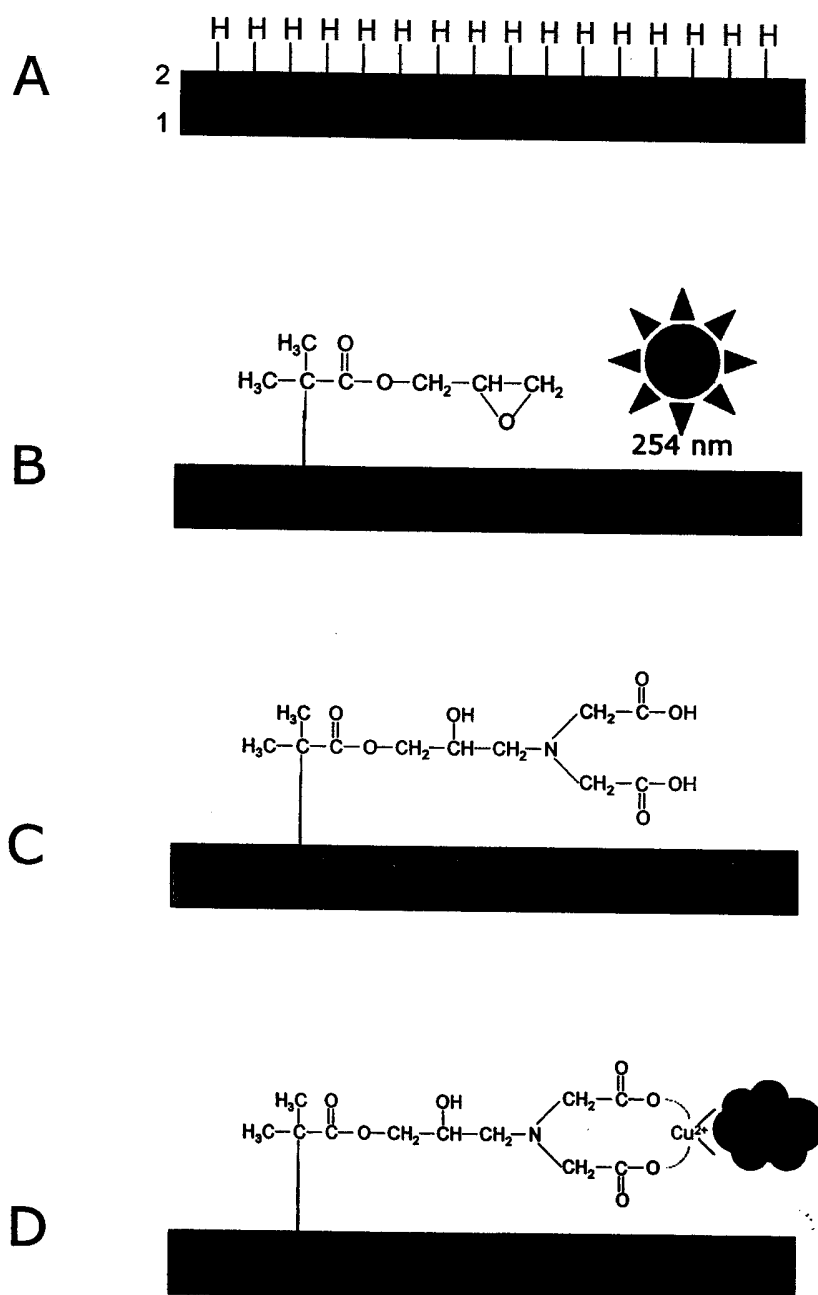


Fig. 4

5/8

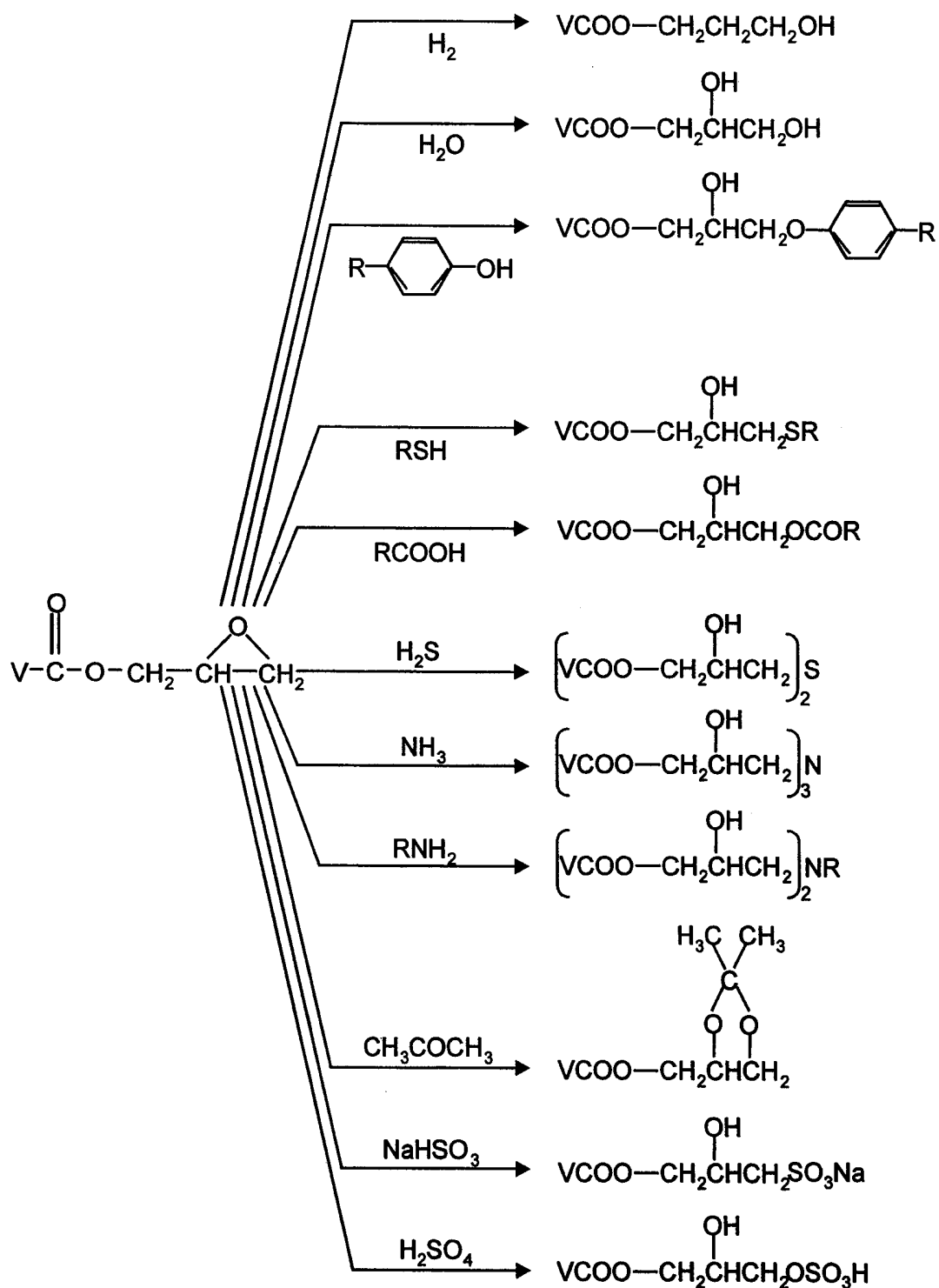


Fig. 5

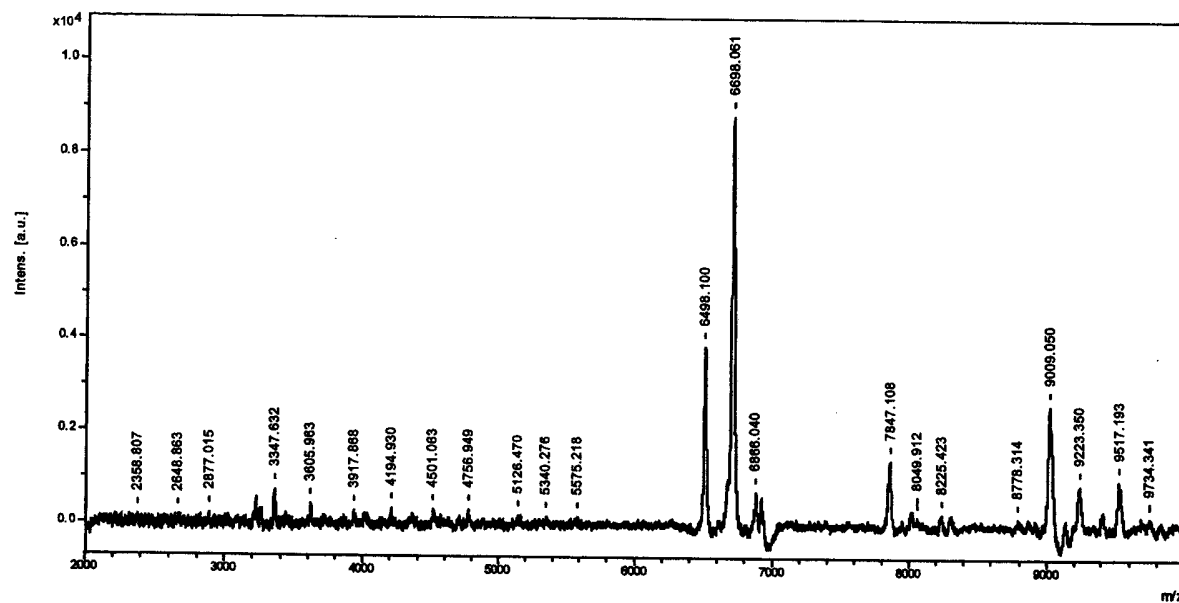


Fig. 6

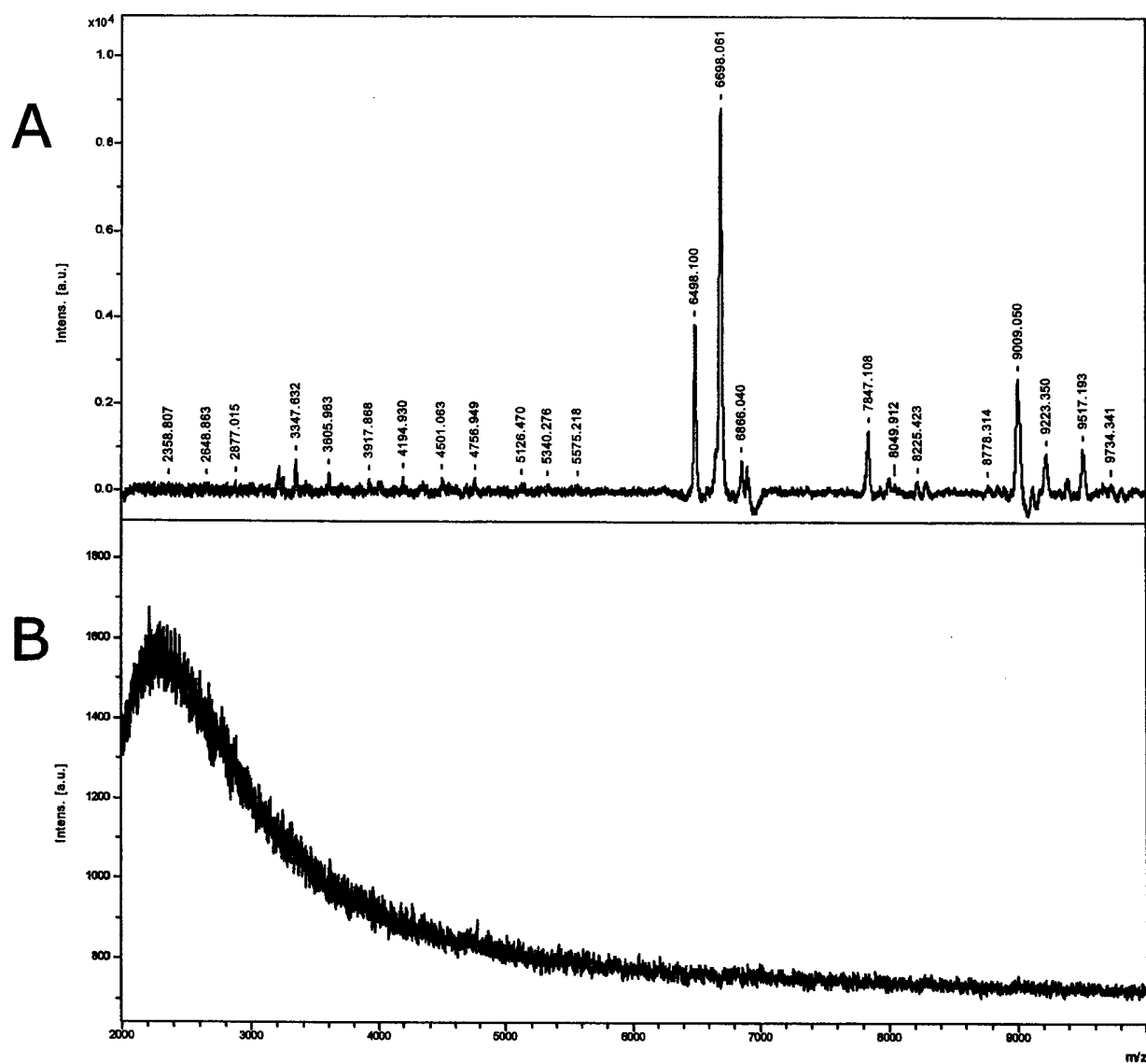


Fig. 7

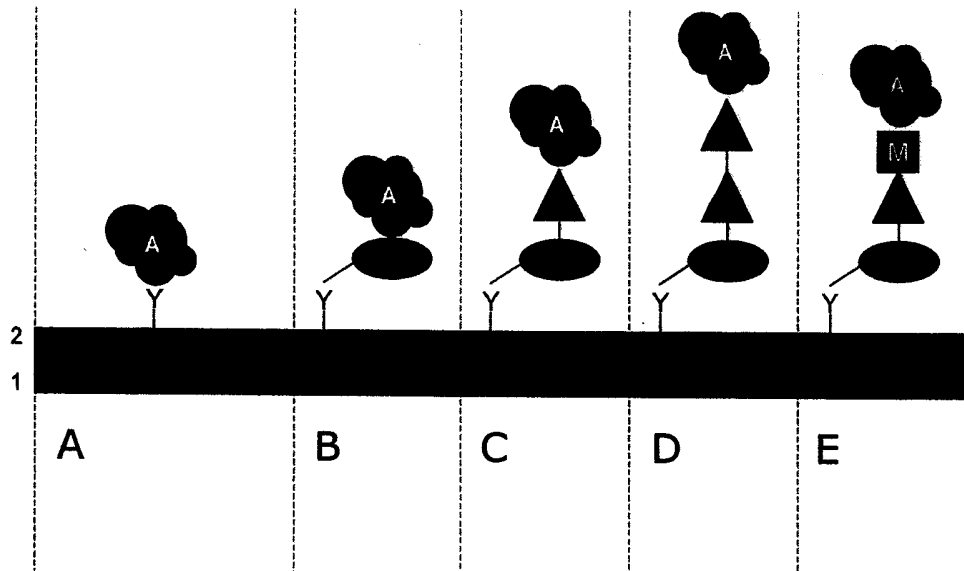


Fig. 8



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : H01J 49/04 (2006.01); G01N 1/28 (2006.01)
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: H01J49/04, G01N1/28
Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation): H01J, G01N
Konsultierte Online-Datenbank: EPODOC, WPI, PAJ, TXT, INSPEC, IEEE, XPAIP
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 18. Juli 2005 eingereichten Ansprüchen 1-33 erstellt.

Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	US 2002/0187312 A1 (FONASH) 12. Dezember 2002 (12.12.2002) <i>das gesamte Dokument</i> --	1-33
A	DALE, M. et al. "Graphite/Liquid Mixed Matrices for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry" Analytical Chemistry. Oktober 1996, Ausgabe 68, Nr. 19, Seiten 3321-3329 <i>das gesamte Dokument</i> --	1-33
A	HOFFMAN, A. et al. "Hydrogen content and density in nanocrystalline carbon films of a predominant diamond character" Journal of Applied Physics. Oktober 2003, Ausgabe 94, Nr. 7, Seiten 4589-4595 <i>das gesamte Dokument</i> --	1-33
A	KANO, S. et al. "Irradiation of CW-CO ₂ laser on a powder target. Formation of fullerene film from graphite powder" Chemical Physics Letters. August 2003, Ausgabe 378, Seiten 474-480 <i>das gesamte Dokument</i> ----	1-33

Datum der Beendigung der Recherche:
24. Oktober 2006

☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):
Dr. HARASEK

¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente:

- X Veröffentlichung von **besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y Veröffentlichung von **Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand 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 **Verbindung** für einen Fachmann **nahellegend** ist.

- A Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.
- P Dokument, das **von Bedeutung** ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem **Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie X), aus dem ein **älteres Recht** hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- & Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.