



Proteine in Nahaufnahme

Lebende Zellen bestehen aus unzählig vielen Molekülen. Die großen Moleküle, zu denen die Proteine gehören, wechselwirken miteinander und mit anderen Molekülen in einer niemals ruhenden mikroskopischen Maschinerie. Wie können wir verstehen, was in der Zelle vorgeht? Ein bedeutender Schritt war die Entwicklung von Werkzeugen, mit denen man „sehen“ kann; und eben das haben die diesjährigen Nobelpreisträger in Chemie getan.

Massenspektrometrie: Und sie fliegen doch!

Mit Massenspektrometrie kann man heutzutage schnell einen Stoff in einer Probe durch die exakte Bestimmung seiner molekularen Masse identifizieren. Sie ist eine weit verbreitete Methode für kleine und mittelgroße Moleküle. John B. Fenn und Koichi Tanaka zeigten auf unterschiedliche Weise, dass man auch Makromoleküle studieren kann. Es ging um die knifflige Aufgabe, die Proteine zum Fliegen zu bringen, oder wie John Fenn selbst es ausgedrückt hat, den „molekularen Elefanten Flügel zu geben“!

John B. Fenn

John B. Fenn ist der Chemiker, der die Elektrospray-Methode erfunden hat. Heute wird diese Methode überall in der Welt in Laboratorien angewendet. Fenn war Professor für Chemotechnik an der Yale University, USA, und der Virginia Commonwealth University.



Massenspektrometrie

MIT ELEKTROSPRAYTECHNIK

Die Proteinlösung wird mithilfe eines elektrischen Feldes auf eine negativ geladene Platte gesprüht.

Probe in Lösung

Kleine geladene Tropfen werden gebildet. Die Tropfen dunsten ab und werden immer kleiner.

3 000 V

Die freien Proteinionen erscheinen völlig „nackt“ und oft hoch geladen.

Die Proteinionen werden von einem elektrischen Feld beschleunigt ...

Ein Computer berechnet die exakte Masse der Proteine.

Ein Spektrum entsteht, in dem jeder Peak einem bestimmten Verhältnis von Masse zu Ladung entspricht.

MIT LASERTECHNIK

Die Probe befindet sich in fester Form in einer Matrix.

Die Probe wird in Stücke gesprengt, aber dank der Matrix brechen die Proteinmoleküle nicht auseinander.

Die Probe wird mit einem Laserstrahl beschossen.

Die schwebenden, schwach geladenen Proteinionen, oder zwei oder mehrere zusammengeballte, werden in einem elektrischen Feld beschleunigt, und die Flugzeit wird wie oben gemessen.

Koichi Tanaka

Koichi Tanaka arbeitete als Forschungsingenieur bei der Shimadzu Corp., Kyoto, als er von der Wissenschaftsakademie in Stockholm angerufen wurde: „Sie haben den Nobelpreis erhalten!“ Tanakas Idee war es, Laserlicht zu verwenden, dessen Energie in raffinierter Weise auf die Proteine übertragen wird und diese dazu bringt, sich gegenseitig loszulassen und frei zu schweben. Es funktioniert!

Die Höhe der Peaks im Spektrum gibt die Mengen der Proteine in den Proben wieder.



„Sanfte“ Massenspektrometrie

Ionisation von Makromolekülen durch Bestrahlung mit Laserlicht (Nobel-Vortrag)**

Koichi Tanaka*

Stichwörter:

Laserdesorption · Makromoleküle ·
Massenspektrometrie · Nobel-Vortrag

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3989
2. Massentrennung: Flugzeitmethode	3990
3. Reflektortechnik	3990
4. Verzögerte Ionenextraktion	3991
5. Detektion der Ionen	3991
6. Ionisationstechnik	3993
7. Vermarktung und Veröffentlichung	3996
8. Entwicklung der MALDI-Technik	3997
9. Zusammenfassung	3997

1. Einleitung

Ich studierte an der Universität im Hauptfach Elektrotechnik. Damit befasste ich mich natürlich nicht im Schwerpunkt mit der Chemie, und dementsprechend waren meine Kenntnisse auf diesem Gebiet nicht gerade gut. So vorbereitet trat ich in die Shimadzu Corporation ein und wandte mich dann schnell und mit ganzem Herzen der Chemie zu, um mich der Herausforderung zu stellen, Antworten auf eine zur damaligen Zeit als unlösbar geltende Frage der Analytischen Chemie zu finden. Ich freue mich natürlich sehr, dass mir der Nobel-Preis verliehen wird und überdies, dass der Preis meine Arbeiten und Ergebnisse auf dem Gebiet der Analytischen Chemie würdigt, einem Feld, das sich in der Öffentlichkeit weitgehend unauffällig präsentiert, aber doch sehr wichtig und nützlich ist.

Bei der Shimadzu Corporation, einem Hersteller von analytischen Instrumenten, wurde ich einer Arbeitsgruppe zugeteilt, die mit dem Design, der Entwicklung und dem Bau eines völlig neuen Massenspektrometers beauftragt war. Die „Entwicklung einer sanften Ionisationsmethode zur massenspektrometrischen Analyse von biologischen Makromolekü-

len“, für die mir letztlich dieser Preis verliehen wurde, war ein wichtiger Teil dieses Projektes. Zu jener Zeit in den achtziger Jahren waren mit mir vier weitere Kollegen, die ich im Folgenden kurz vorstellen werde, mit der Entwicklung von jeweils einem Bauelement des Massenspektrometers betraut. Mein Verantwortungsbereich umfasste die Probenpräparation und die Ionisationstechnik. Auch mit einer hervorragenden Ionisationsmethodik war der Erfolg des Instruments vom Funktionieren aller Bauteile abhängig. Zunächst möchte ich daher nicht auf die Ionisation eingehen, sondern kurz den damaligen Stand der Technik und den Fortschritt bezüglich der übrigen Komponenten nachzeichnen.

[*] K. Tanaka
Shimadzu Corporation
1 Nishinokyo-Kuwabaracho
Nakagyoku, Kyoto 604-8511 (Japan)
Fax: (+81) 75-823-3218
E-mail: koichi-t@shimadzu.co.jp

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2003. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

2. Massentrennung: Flugzeitmethode

In der Massenspektrometrie werden die Ionen gemäß ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses getrennt und anschließend detektiert. Unter anderem geeignet dafür ist die Flugzeit-Massenspektrometrie (TOF-MS, Time-of-Flight Mass Spectrometry). Hier werden, wie der Name schon andeutet, die Ionen aufgrund unterschiedlicher Flugzeiten separiert. Abbildung 1 zeigt das Funktionsprinzip eines TOF-Massenspektrometers in seiner einfachsten Form. Demnach werden die drei Ionen M_1 , M_2 und M_3 mit unterschiedlichen Massen, aber gleichem Ladungszustand zeitgleich in einer Startposition gebildet. M_1 sei das leichteste der Ionen. Die Ionen werden bei einem elektrischen Potential V_0 erzeugt und haben damit die kinetische Energie zV_0 , wobei z die Ladung und m die Masse der Ionen ist [Gl. (1)]. Unter der Annahme, dass die potentielle Energie vollständig in kinetische Energie umgewandelt wird, ist nach dem Energieerhaltungssatz die

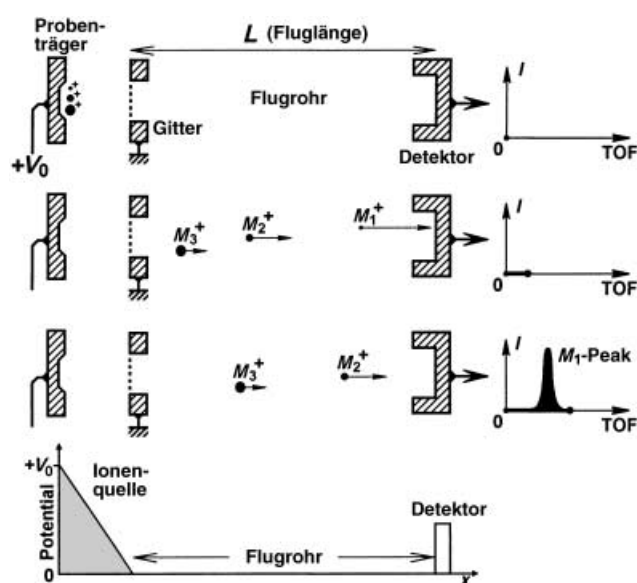


Abbildung 1. Funktionsprinzip eines Flugzeit-Massenspektrometers.

Geschwindigkeit v der Ionen durch Gleichung (2) gegeben. Mit anderen Worten bewegt sich ein leichtes Ion mit höherer Geschwindigkeit als ein schweres und wird den Detektor folglich eher erreichen [Gl. (3) und (4), L =Länge des Flugrohres, t =Flugzeit des Ions im Flugrohr, t' =Flugzeit eines Ions mit der kinetischen Anfangsenergie ϵ].

$$zV_0 = \frac{1}{2}mv^2 \quad (1)$$

$$v = \sqrt{\frac{2zV_0}{m}} \quad (2)$$

$$t = L/v = L \sqrt{\frac{m}{2zV_0}} \quad (3)$$

$$t' = L \sqrt{\frac{m}{2(zV_0 + \epsilon)}} \quad (4)$$

Dieses Verhalten gilt für ideale Bedingungen [Gl. (3)]. In Wirklichkeit weisen die Ionen, insbesondere solche gleicher Masse, eine Verteilung von Anfangsgeschwindigkeiten und damit auch eine Verteilung von kinetischen Anfangsenergien ϵ auf. Folglich muss auch ihre Ankunftszeit t' am Detektor eine entsprechende Verteilung zeigen [Gl. (4)]. Dieser Zusammenhang schränkt die Auflösung eines Flugzeit-Massenspektrometers ein.

3. Reflektrontechnik

Um eine verbesserte Auflösung zu erhalten wäre es ideal, wenn Ionen gleicher Masse und Ladung gleichzeitig am Detektor ankämen, auch wenn ihre Anfangsgeschwindigkeiten und kinetischen Anfangsenergien unterschiedlich sind. Als Erste beschrieben 1973 Mamyrin et al.^[1] einen „elektrostatistischen Ionenspiegel“, ein so genanntes Reflekttron, mit dem sie Ionen auf halber Strecke ihres Weges zum Detektor reflektieren konnten. Das Umkehren der Ionen hat den Effekt, dass die Flugzeit ihrer kinetischen Energie angepasst wird, sodass letztlich ein synchrones Eintreffen von Ionen gleicher Masse und Ladung am Detektor gewährleistet werden kann (Abbildung 2).

Koichi Tanaka, geboren 1959 in Toyama, Japan, studierte an der Universität Tohoku Elektrotechnik. Nach seinem Abschluss 1983 (BSc) erhielt er eine Anstellung am zentralen Forschungslabor der Shimadzu Corporation, wo er sich zunächst mit der Entwicklung einer Ionisationsmethode zur Anwendung in einem Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS) befasste. 1985 begann er mit Arbeiten zur sanften Laserdesorption zur Detektion von makromolekularen Ionen. Die Ergebnisse der Forschungsgruppe wurden auf japanischen und internationalen Konferenzen vorgestellt (1987) und 1989 in der Zeitschrift *Rapid Communications in Mass Spectrometry* veröffentlicht. Anschließend wechselte er zur Weiterentwicklung der TOF-MS-Technik zeitweilig zu Kratos Analytical und an das Shimadzu Research Laboratory in Großbritannien. 2002 erhielt er zusammen mit John B. Fenn und Kurt Wüthrich den Nobel-Preis für Chemie.

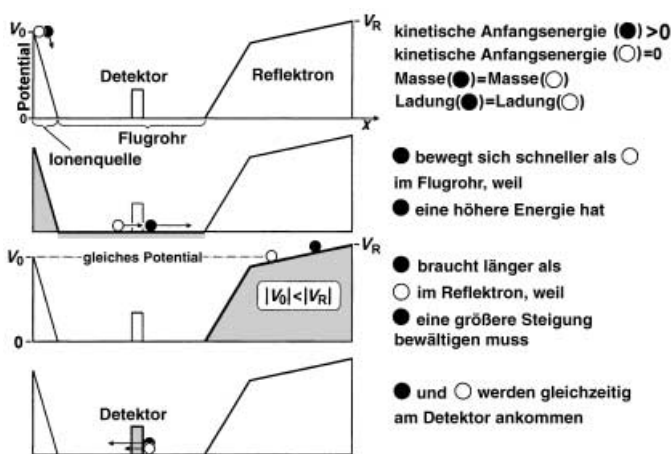


Abbildung 2. Verbesserung der Auflösung durch Reflektrontechnik.

Der Isochronismus eines Pendels ist ein wohl bekanntes Phänomen. Einfach ausgedrückt ist damit gemeint, dass bei konstanter Pendellänge und Gravitationskraft die Zykluszeit auch bei unterschiedlichen Amplituden die gleiche bleibt. Nach diesem Prinzip wurde ein ideales Reflekttron entwickelt. Hierbei entspricht die Länge des Pendels der Masse des reflektierten Ions, die Amplitude der kinetischen und potentiellen Anfangsenergie und die Zykluszeit der Flugzeit. Eine Anwendung dieser Reflektrontechnik wurde damals von meinem Kollegen Yoshikazu Yoshida entwickelt (Patentnummer US4625112, ausgegeben 1986) (Abbildung 3).

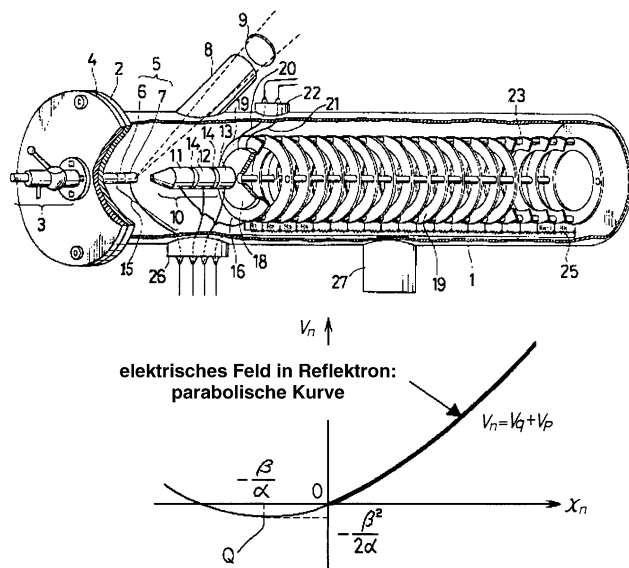


Abbildung 3. Verbesserung der Auflösung durch ein ideales Reflekttron (Patent: US4625112).

4. Verzögerte Ionenextraktion

Das Prinzip der TOF-MS beruht auf der Annahme, dass die Ionen „instantan“, d.h. innerhalb einer infinitesimal kurzen Zeitspanne erzeugt werden. Die Pulslänge eines N_2 -Lasers liegt in der Größenordnung von einigen Nanosekunden und ist somit extrem kurz. Übersteigt die Intensität des Lasers den Schwellenwert der Ionenbildung allerdings sehr stark, wie in Abbildung 4 zu sehen, dann können Ionen auch nach Ende des Laserpulses noch gebildet werden. Im TOF-Modell hat dies zur Folge, dass die Massenaufklärung durch das größere Zeitfenster der Ionenerzeugung verschlechtert wird.

Einem meiner damaligen Kollegen, Dr. Tamio Yoshida, gelang es, durch Verlängerung der Zeitspanne zwischen der Ionenbildung und Extraktion die Auflösung zu verbessern (siehe Abbildung 5). Dies wird durch das Anlegen äquivalenter Spannungen am Probensträger und am Beschleunigungsgitter erreicht, wodurch eine Extraktion der Ionen vor der vollständig abgeschlossenen Ionenbildung verhindert wird; die gleichzeitige Extraktion aller Ionen wird dann nach einer Zeitspanne t_D durch Anlegen einer Potentialdifferenz ausgelöst (Japan Patent Office S60035097, 1985). Im

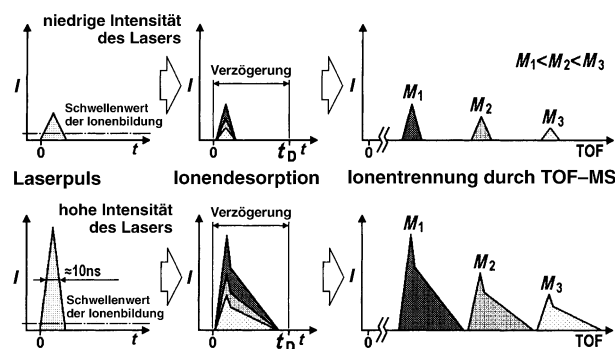


Abbildung 4. TOF-Massenspektren mit geringer und hoher Laserintensität.

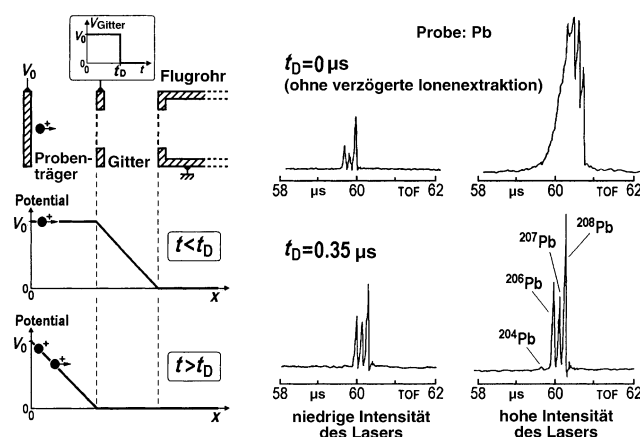


Abbildung 5. Verbesserung der Auflösung durch verzögerte Extraktion der Ionen.

Prinzip entspricht dieses Verfahren der Time-Lag-Focusing-Methode nach Wiley und McLaren,^[2] die entwickelt worden war, um die Effekte der Verteilung der räumlichen und kinetischen Anfangsenergien zu verringern. Bei Yoshidas Methode wird die verzögerte Ionenextraktion angewendet, um speziell die Auswirkungen der verlängerten laserinduzierten Ionenbildung zu minimieren.

Zudem ergibt sich eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass geladene Partikel wie Protonen oder Kationen mit neutralen Molekülen der Probe kollidieren und reagieren. Diese zuerst von Munson und Field^[3] beschriebenen Prozesse werden im Allgemeinen als „chemische Ionisation“ bezeichnet. Bei verzögerter Extraktion kann somit eine begünstigte Bildung von Molekülionen wie $[M+Na]^+$ erwartet werden (Abbildung 6).

5. Detektion der Ionen

Der Begriff Detektor bezieht sich hier auf die Umwandlung von massenselektierten Ionen in ein elektronisches Signal, genauer einen Fluss von Elektronen. Die maximale Massenzahl der Ionen, die in den frühen achtziger Jahren detektiert werden konnten, lag im Bereich von einigen

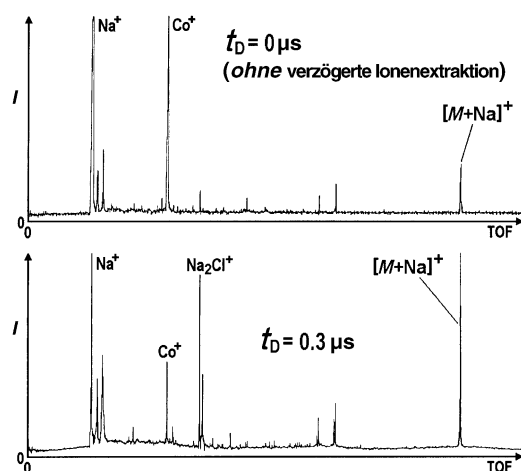


Abbildung 6. Steigerung der Intensität von Molekülionen durch verzögerte Ionenextraktion.

Tausend. Im Prinzip gilt, dass mit steigender Molekülmasse die Geschwindigkeit des zu detektierenden Ions und damit auch die Effizienz, mit der ein Ion in Elektronen gewandelt wird, abnimmt und sogar gegen null gehen kann.

Die einfachste Methode zur Verbesserung der Empfindlichkeit besteht darin, die Ionen nach der Separation weiter zu beschleunigen („post acceleration“). Wie in Abbildung 7

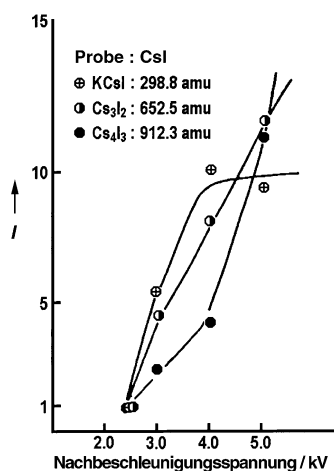


Abbildung 7. Ionendetektion mit hoher Empfindlichkeit durch „Nachbeschleunigung“ der Ionen; amu = atomare Masseneinheit.

dargestellt, steigt die Intensität der Ionen mit der angelegten Nachbeschleunigungsspannung, ein Effekt, der sich mit steigender Massenzahl verstärkt auswirkt. Eine weitere Methode ist die Ion-Elektron-Wandlung. Wie anhand von Abbildung 8 zu erkennen ist, kann auch damit die Intensität der detektierten Ionen gesteigert werden.

Mein damaliger Kollege Yutaka Ido entwickelte unter diesen Vorgaben einen Detektor (Abbildung 9) mit einer hinreichend hohen Empfindlichkeit, der insbesondere zur Detektion von Ionen hoher Molekülmasse geeignet war.

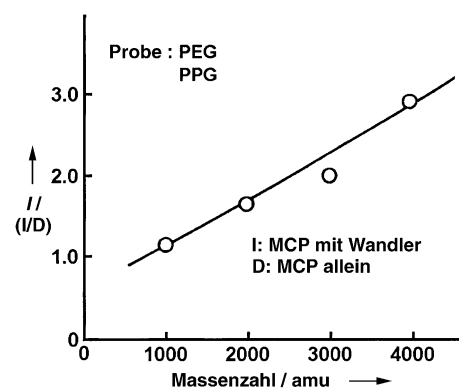


Abbildung 8. Ionendetektion mit hoher Empfindlichkeit durch Ion-Elektron-Wandlung. PEG = Polyethylenglycol, PPG = Polypropylenglycol.

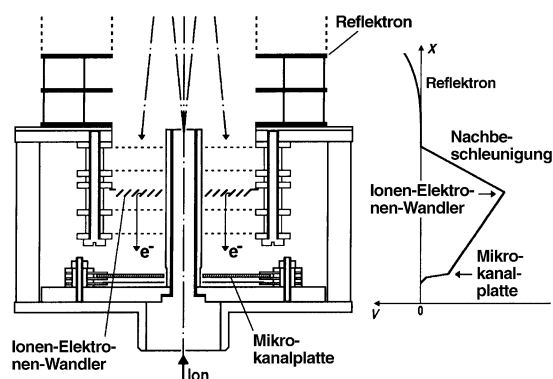


Abbildung 9. Detektion von makromolekularen Ionen durch Nachbeschleunigung der Ionen und Ion-Elektron-Wandlung.

5.1. Messtechnik

5.1.1. Analog-Digital-Wandlung

Auch bei einer verbesserten Detektorempfindlichkeit kann davon ausgegangen werden, dass die Intensität von makromolekularen Ionen schwach ist. Insbesondere bei Einzelexperimenten mit jeweils einem Laserschuss und minimalen Analytmengen kann eine quantitative Analyse aufgrund eines unzureichenden Signal-Rausch-Verhältnisses unmöglich sein. In diesem Fall ist ein Verfahren zur Spektrenakkumulation unverzichtbar, und um die Nachfrage nach einem Instrument zur Hochgeschwindigkeitsaufnahme von TOF-Massenspektren zu befriedigen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein entsprechender Algorithmus entwickelt.

Satoshi Akita, einer meiner damaligen Kollegen, entwickelte einen Analog-Digital-Wandler (ADC) auf der Grundlage der Pipeline-Technik, um die angestrebte schnelle Abwicklung der Messungen zu erreichen. Die neu entwickelten ADC-Schaltungen ermöglichten eine Verarbeitungsgeschwindigkeit von 1 kHz bei der Echtzeitakkumulation von Spektren bei einer maximalen Zeitauflösung von 10 ns und einer Intensitätsauflösung von 24 Bit (Abbildung 10). Zudem wurde ein Verstärker entwickelt und eingebaut, der die Detektorspannung innerhalb einer Mikrosekunde schalten konnte und so die simultane Detektion von Ionen mit hoher

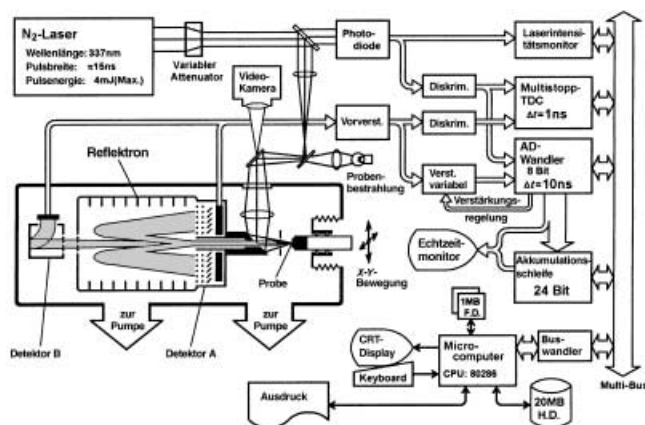


Abbildung 10. Schema des TOF-Massenspektrometers von Shimadzu.

Intensität und niedriger Masse sowie von niedriger Intensität und hoher Masse ermöglichte. Damit wurde ein wesentlich größerer dynamischer Bereich abgedeckt.

5.1.2. Zeit-Digital-Wandlung

Die damaligen Analog-Digital-Wandler arbeiteten mit einer zeitlichen Auflösung von 10 ns, die unserer Auffassung nach aber nicht ausreichend war. Vor diesem Hintergrund entwickelte Yoshikazu Yoshida einen Zeit-Digital-Wandler (TDC), der bis zu 255 Ereignisse nach einem einzigen Startsignal registrieren konnte, sodass die Flugzeiten von Ionen nun mit größter Genauigkeit messbar waren (Multi-stop-TDC). Als Folge hiervon mussten allerdings verringerte Signalintensität in Kauf genommen werden. Mit dem Zeit-Digital-Wandler waren wir nun in der Lage, die Flugzeit mit einer maximalen Zeitauflösung von 1 ns zu messen.

Alle Teilentwicklungen waren essenziell, und somit war jeder Beitrag eines jeden einzelnen Mitgliedes unserer Arbeitsgruppe entscheidend und unverzichtbar für das Erreichen unseres Entwicklungsziels, nämlich makromolekulare Ionen zu erzeugen und nachzuweisen. Ich bin wirklich froh zu sehen, dass die Technik, die wir in den achtziger Jahren entwickelt haben, durch die Verwendung in unterschiedlichen Instrumenten ihren Teil beigetragen hat, die TOF-Technologie ins Zentrum der Massenspektrometrie der neunziger Jahre zu befördern.

6. Ionisationstechnik

Schon lange vor den achtziger Jahren wurde versucht, mithilfe optischer Energie (nicht nur in Form von Laserlicht) organische Verbindungen zu ionisieren.^[4] In den meisten Fällen beruhte diese Art von Ionisation auf der Ablösung von Elektronen von gasförmigen Verbindungen.^[5] Dies schränkte allerdings die Anwendung der Methode auf solche Verbindungen ein, die unzersetzt verdampft werden können. Wenn eine organische Substanz in festem Aggregatzustand durch einen Laser bestrahlt wird, absorbiert sie das Laserlicht, wodurch genügend Energie für die Desorption bereitgestellt wird. Sofern sich die positiven und negativen Ladungen der

Partikel nicht gegenseitig aufheben, können diese in Form von Ionen detektiert werden. Da das Laserlicht direkt vom Analyten absorbiert wird, werden die bestrahlten Moleküle angeregt, ihr Gehalt an innerer Energie steigt und Bindungen können gebrochen werden. Mit anderen Worten besteht die Gefahr, dass die Messung nur Bruchstücke der untersuchten Verbindung zeigt (Abbildung 11). Da wir aber intakte, unfragmentierte Moleküle erzeugen und messen wollten, war diese Technik ungeeignet.

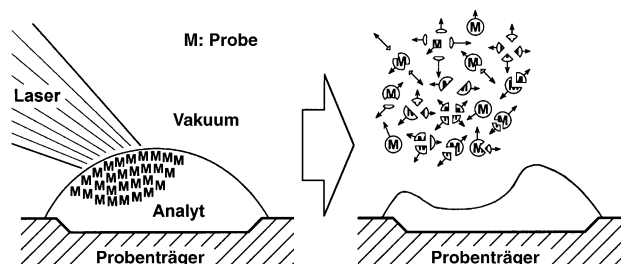


Abbildung 11. Laser-Desorption/ionisation (LDI) von fester und flüssiger Phase.

Zu dieser Zeit konnten Verbindungen mit Molekülmassen von etwa maximal 1000 Dalton (Da) durch Laserbestrahlung ionisiert werden. Die Ionisation von Verbindungen mit einer Molekülmasse von über 10 000 Da wurde dagegen in der Fachwelt als generell unmöglich erachtet. Da ich kein Chemiker bin, kannte ich diese weit verbreitete Auffassung nicht.

6.1. Schnellheiztechniken

In den achtziger Jahren hatten verschiedene Forschungsteams ermutigende Resultate zur „Desorption in die Gasphase durch schnelles Heizen“ geliefert, darunter die Arbeitsgruppen um Franz Röllgen^[6,7] in Deutschland, Mamoru Ohashi^[8] in Japan sowie Louis Friedman,^[9] Don Hunt,^[10] Burnaby Munson^[11] und Robert Cotter^[12] in den USA. Eine einfache Beschreibung des Prinzips ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Es wird angenommen, dass beim Erwärmen einer Verbindung AB sowohl intakte AB-Moleküle als auch Fragmente A und B in die Gasphase freigesetzt werden [Gl. (5a,b)]. Mit der Arrhenius-Beziehung [Gl. (6), k = Geschwindigkeitskonstante, f = Frequenzfaktor, E = Akti-

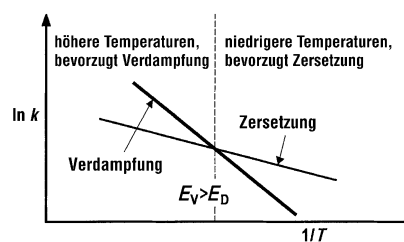


Abbildung 12. Temperaturabhängiges Verhältnis von Verdampfung und Zersetzung.^[9]

vierungsenergie, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur] ergeben sich die entsprechenden logarithmischen Ausdrücke (7a) und (7b).

$$\text{Verdampfung: } AB \xrightarrow{k_v} AB \quad (5a)$$

$$\text{Zersetzung: } AB \xrightarrow{k_D} A + B \quad (5b)$$

$$k = f \exp(-E/RT) \quad (6)$$

$$\ln k_v = \ln f_v - E_v/RT \quad (7a)$$

$$\ln k_D = \ln f_D - E_D/RT \quad (7b)$$

Für thermisch labile und somit leicht zersetzliche Verbindungen ist die Geschwindigkeitskonstante der Zersetzung, k_D , bei niedrigen Temperaturen größer als die der Verdampfung, k_v . Da die Aktivierungsenergie der Verdampfung, E_v , höher ist als die der Zersetzung, E_D , ist die Gerade $\ln k$ gegen $1/T$ für die Verdampfung steiler als die entsprechende Gerade der Zersetzungsreaktion (siehe Abbildung 12). Daraus folgt, dass bei hoher Temperatur, d.h. bei kleinem $1/T$, die Verdampfung begünstigt ist. Mit anderen Worten sollte durch das schnelle Einstellen einer möglichst hohen Temperatur ein hohes Maß an Verdampfung gegenüber der Zersetzung erreichbar sein.

6.1.1. Anwendung von ultrafeinem Metallpulver

Zur schnellen Probenaufheizung wurde eine Reihe von Methoden entwickelt,^[9] die allerdings nicht geeignet waren, um die für eine intakte Verdampfung von Makromolekülen wie Proteinen erforderlichen Temperaturen hinreichend schnell zu erreichen. Da die Pulslänge eines Lasers zwischen einer Nanosekunde und einigen Mikrosekunden beträgt, erschien der Versuch sinnvoll, einen fokussierten Laserstrahl zur Übertragung hoher Energiedichte in kurzer Zeit zu nutzen. Dieses Konzept erfordert allerdings ein Medium, das eingestrahlte Photonen in thermische Energie umwandelt.

Ein in den achtziger Jahren in Japan intensiv erforschtes Material war das „ultrafeine Metallpulver“ (UFMP, auch als „Japanisches Pulver“ bezeichnet), das sehr effektiv zur Herstellung von Legierungen genutzt werden konnte. Dabei handelt es sich, wie der Name schon sagt, um ein extrem fein gemahlenes metallisches Pulver mit Partikeldurchmessern von einigen zehn Nanometern. Die Abmessungen liegen somit in der Größenordnung der Wellenlängen des zu absorbierenden Lichts, wodurch sich gegenüber dem Bulkmaterial die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Energie von gestreutem Licht aufgenommen werden kann (Abbildung 13). Anders gesagt kann das UFMP Lichtenergie sehr effektiv absorbieren, was nebenbei seine schwarze Farbe erklärt. Zudem unterbinden die Zwischenräume zwischen den Partikeln ein effektives Abfließen und somit den Verlust der gespeicherten thermischen Energie.

Im Gemisch mit organischen Verbindungen sollte eine effektive Absorption von Laserlicht durch UFMP sichergestellt sein, was sehr schnell und bei minimalem Hitzeverlust zu einer sehr hohen Temperatur des UFMP und damit der Mischung führt. Yoshikazu Yoshida war es, der die Verwen-

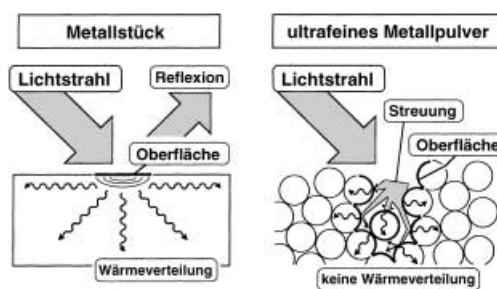


Abbildung 13. Unterschiedliche Lichtabsorption durch ein Metallstück und durch ultrafeines Metallpulver.

dung von UFMP als Matrix (d.h. eine Substanz, die die Ionisation unterstützt) vorgeschlagen hatte (Abbildung 14) (Patentnummer: JP01731501, eingetragen 1985, aufgelegt 1993).

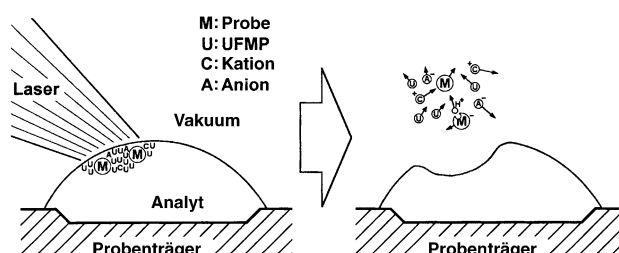


Abbildung 14. Desorption von Molekülen unter Verwendung der UFMP-Matrix.

Zu der Zeit gab es ein starkes Interesse an der Analyse von Polymeren durch Laserdesorption, wie etwa aus den Arbeiten von Charles Wilkins et al.^[13] hervorgeht. Im oberen Teil der Abbildung 15 ist ein Massenspektrum gezeigt, das durch Laserbestrahlung einer Polyethylenglycol(PEG)-Probe erhalten wurde. Das untere Spektrum in Abbildung 15 wurde von einer PEG-UFMP-Mischung aufgenommen. Das Spektrum von PEG allein wird von Signalen von PEG-Fragmenten dominiert; Signale der Molekülen von PEG2000 können nicht detektiert werden. Im Unterschied dazu treten im Spektrum der PEG-UFMP-Mischung fast keine Fragment-

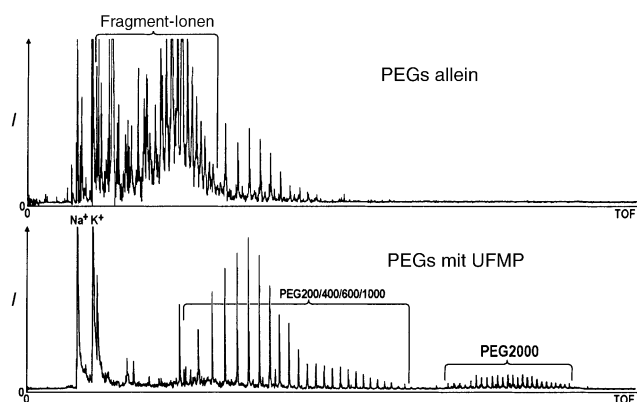


Abbildung 15. Spektren von Polyethylenglycol-Proben mit und ohne UFMP-Matrix.

Ionen, dafür aber sehr deutlich die Molekülionen von PEG2000 auf. Mit dieser Matrixmischung konnten somit Molekülionen organischer Verbindungen erzeugt und detektiert werden, die mit den bis dato bekannten massenspektrometrischen Methoden nicht zugänglich waren. Nach unseren experimentellen Erfahrungen ließ sich die Technik allerdings nicht auf Substanzen mit einer Molekülmasse von mehreren zehntausend Dalton übertragen.

6.1.2. Glycerinmatrices

In den achziger Jahren war die Fast Atom Bombardment(FAB)-MS eine weit verbreitete Methode, um thermisch labile Substanzen in die Gasphase zu überführen und zu ionisieren. FAB wurde von Michael Barber et al.^[14] sowie David Surman und John Vickerman^[15] entwickelt. Bei FAB treffen beschleunigte neutrale Partikel, z. B. Xenon-Atome, mit hoher Geschwindigkeit auf die Probe, wodurch letztlich Ionen erzeugt werden. Die feste Probe befindet sich dabei in einer flüssigen Matrix aus Glycerin (Abbildung 16). Der

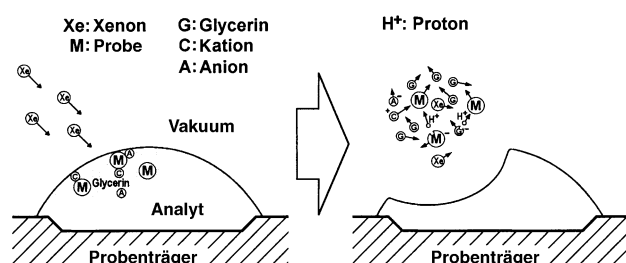


Abbildung 16. Desorption/ionisation von Molekülionen durch Fast Atom Bombardment mit Glycerin als Matrix.

Effekt beruht darauf, dass durch Lösen der Probe in dem bei Raumtemperatur flüssigen Glycerin die kristalline Struktur des Analyten aufgebrochen und so die Ionisation erleichtert wird. Wir setzten Glycerin – völlig analog wie bei FAB-MS – als Matrix in unseren Laserdesorptionsexperimenten ein; da Glycerin aber bei der Wellenlänge des verwendeten N₂-Lasers (337 nm) nur schwach absorbiert, war keine signifikante Verbesserung bei der Erzeugung von Molekülionen organischer Verbindungen zu erkennen. Trotzdem erwies sich die Verwendung von Glycerin als Matrix als nützlich, da auf diese Weise einheitliche und reproduzierbare Mischungen hergestellt werden konnten.

6.1.3. UFMP-Glycerin-Mischungen

In einem gewissen Stadium hatte die Methodenentwicklung allmählich zu stagnieren begonnen. Während langer Testreihen aus unzähligen empirischen Experimenten mit unterschiedlichen UFMP-Suspensionen, in denen diverse organische Lösungsmittel und Konzentrationen immer wieder variiert wurden – damit mir nur ja keine noch so winzige Verbesserung der Datensätze entgehen würde –, unterlief mir jedoch ein monumentales Missgeschick, das einige glückliche und zufällige Entschlüsse zur Folge hatte:

Ich benutzte gewöhnlich Aceton für die UFMP-Suspensionen, griff aber eines Tages versehentlich zum Glycerin („Zufall“ 1). Da ich es für verschwenderisch hielt, das teure UFMP zu verwerfen, entschloss ich mich, das „ruinierte“ Matrixpräparat dennoch zu verwenden (2). Da Glycerin im Vakuum allmählich verdampft, war zu erwarten, dass es schließlich verschwinden würde, und um die Glycerinverdampfung zu beschleunigen, bestrahlte ich das UFMP-Gemisch mit dem Laser (3). Da ich überdies das Resultat so schnell wie möglich sehen wollte, überwachte ich die so erzeugten TOF-Spektren (4). Infolge des Zusammentreffens mindestens dieser vier Zufälle entdeckte ich ein bis dato noch nie beobachtetes Phänomen.

Soweit ich mich erinnere, enthielt die erste gemessene Probe Vitamin B₁₂. Ein Versuch, das Originalspektrum wiederzufinden, verlief kürzlich leider erfolglos. Da Vitamin B₁₂ das verwendete Laserlicht sehr effektiv absorbiert, waren bis dato ausschließlich Fragment-Ionen detektiert worden. Mit Hilfe der UFMP-Glycerin-Matrix konnten in dem für die intakten Molekülionen des Vitamin B₁₂ relevanten Massenbereich zunächst für Rauschen gehaltene Signale detektiert werden. Da diese bei jeder Wiederholung des Experiments und mit jedem neuen Probenpräparat reproduzierbar nachgewiesen wurden, musste es sich um die Molekülionen von Vitamin B₁₂ handeln.

Nach der Optimierung der Konzentration, der Laser-Intensität und anderer experimenteller Parameter gelang 1985 die Detektion von Ionen mit Molekülmassen von über 35 000 Da (Abbildung 17) und 1987 sogar von Ionen-Clustern mit mehr 100 000 Da (Abbildung 18). Die Patentanmeldung für die Ionisationsmethode wurde in Japan 1985 eingereicht und 1993 offengelegt (Patentnummer: JP01769145).

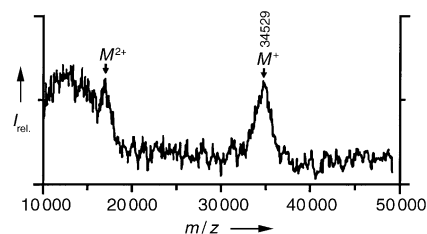


Abbildung 17. Molekülionen der Carboxypeptidase A (Molekülmasse ca. 35 kDa).

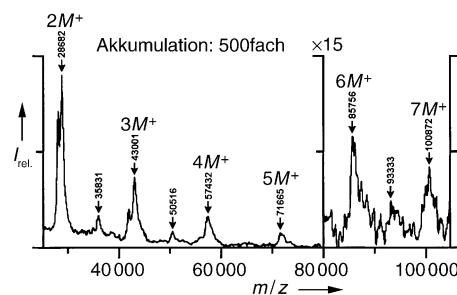


Abbildung 18. Molekülionen-Cluster von Lysozym (Molekülmasse 14 306 Da).

6.2. Ursache der fragmentierungsfreien Ionisation der Makromoleküle

Durch Verwendung von UFMP lassen sich innerhalb kürzester Zeit hohe Temperaturen erreichen. Allerdings ist die Herstellung einer ausreichend homogene Mischung von UFMP mit einer typischen organischen Substanz schwierig. Durch ein Elektronenmikroskop betrachtet, tritt die unzureichende Uniformität der Mischung deutlich zutage (Abbildung 19, oben). Nach Zugabe von Glycerin zu UFMP und Analyt wird eine deutlich gleichmäßigere Vermengung beob-

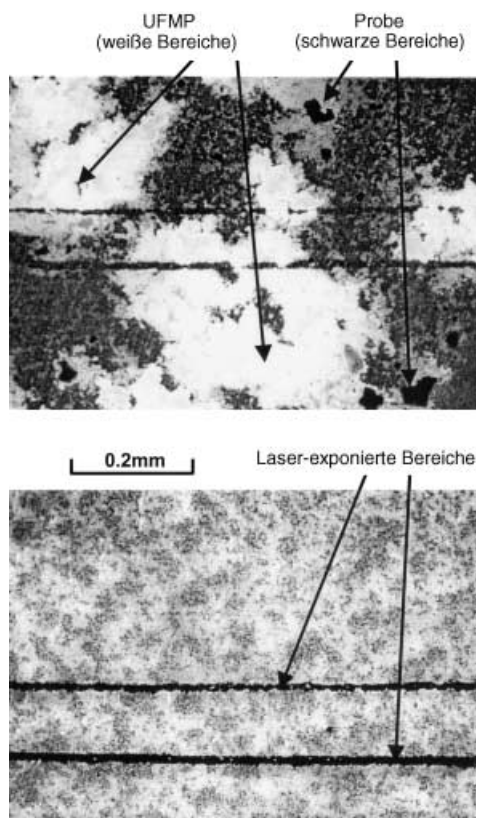


Abbildung 19. Elektronenmikroskopische Aufnahmen: a) Mischung von Probe und UFMP ohne Glycerin; b) Mischung von Probe und UFMP mit Glycerin als Matrix.

achtet (Abbildung 19, unten). Überdies wird die kristalline Struktur des Analyten möglicherweise durch das Lösen im Glycerin aufgebrochen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Möglichkeit, Molekülonen organischer Substanzen mit Molekülmassen oberhalb von 10000 Da zu erzeugen, in direktem Zusammenhang mit diesen Effekten steht (Abbildung 20).

Als Erklärung für die Bildung von Molekülonen von hoher Molekülmasse durch Bestrahlung mit Laserlicht, schlage ich die oben aufgezählten Prinzipien vor. Allerdings müssen diese nicht unbedingt zutreffen, da sie nicht vollständig wissenschaftlich belegt sind. Trotz der weitreichenden Kenntnisse aus der Matrix-unterstützten Laserdesorption und Ionisation (MALDI), die meinen Entdeckungen folgten, kann ich für mich nicht behaupten, die theoretischen Prinzipien hinter sämtlichen Phänomenen erkannt zu haben. Wie

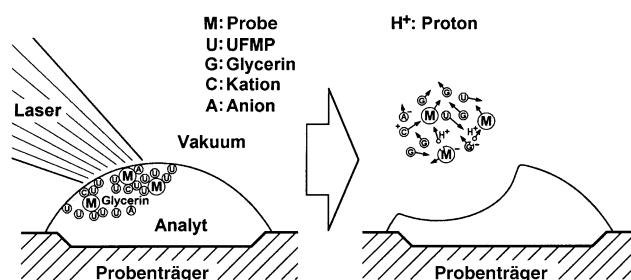


Abbildung 20. Desorption/ionisation von Makromolekülen durch Verwendung einer UFMP-Glycerin-Matrix.

auch immer: Ich bin Ingenieur und Angestellter eines wirtschaftlich denkenden Unternehmens! Deswegen genießen Nutzen und praktische Anwendbarkeit Priorität, auch wenn einzelne Funktionsweisen nicht vollständig verstanden sind.

7. Vermarktung und Veröffentlichung

In eine Technik, die ein Unternehmen nicht als absatzfähig einstuft, wird vermutlich keine weitere Entwicklungsarbeit investiert werden, und die Öffentlichkeit wird von ihr keine Kenntnis erhalten. Wäre unsere Methode nicht zu einem Produkt entwickelt worden, man hätte sie wahrscheinlich im Hause begraben und vergessen. Techniken ähnlich der unseren mögen in den achtziger Jahren auch woanders auf der Welt entwickelt worden sein, jedoch hätten sie nur dann eine Chance auf Weiterentwicklung gehabt, wenn sie der internationalen wissenschaftlichen Community vorgestellt worden wären.

Als die Methodik, die wir im Zentralen Forschungslabor der Szimadzu Corporation entwickelt hatten, in ein Produkt umgewandelt werden sollte, wurde ich in die Marketing-Abteilung versetzt. Die Technologie wurde erst der Öffentlichkeit vorgestellt, nachdem entschieden war, ein Produkt auf den Markt zu bringen. An der ersten Veröffentlichung, auf der Jahrestagung der japanischen Gesellschaft für Massenspektrometrie in Kyoto im Mai 1987, waren alle fünf Mitglieder unserer Forschungsgruppe beteiligt (Vortrag und Poster-Präsentation^[16–20] auf Japanisch). Die Veröffentlichung fand ein gewisses Echo, fast niemand aber glaubte daran, dass die Technik je derart nützlich werden könnte. In der Tat waren wir zunächst einmal froh und zufrieden, den wissenschaftlichen Fortschritt, den wir erzielt hatten, der Öffentlichkeit präsentiert zu haben.

7.1. Technologietransfer nach Europa und in die USA

Im September 1987 nahm ich am zweiten japanisch-chinesischen Symposium für Massenspektrometrie in Takarakura, Japan, teil und trug dort unsere Ergebnisse erstmals auf Englisch vor.^[21] In den achtziger Jahren war die Plasmadesorptions-Massenspektrometrie (PDMS) die Methode der Wahl zur Untersuchung von makromolekularen Verbindungen wie Proteinen.^[22] In seiner Präsentation auf diesem Symposium befand Robert Cotter: „PDMS can measure

higher masses than Laser Desorption/Ionization (LDI) MS“. Professor Cotter war zur damaligen Zeit eine Autorität auf dem Gebiet der TOF-MS, jedoch konnte ich ihm aufgrund meiner jüngsten Ergebnisse, die ich am darauffolgenden Tag präsentierte, nicht zustimmen. Ich deutete Professor Cotter gegenüber an, dass er meiner Auffassung nach falsch lag und machte ihn auf meine Daten aufmerksam. Er sagte mir, er sei von meinen Ergebnissen beeindruckt und sah sich später auch meine Posterpräsentation an. Zusammen mit Dr. Catherine Fenselau leitete er Details unserer Ionisationsmethode und Kopien der Spektren an andere Forscher in Europa und den USA weiter.

Dr. Takekiyo Matsuo, zu der Zeit Assistant Professor an der Universität Osaka, empfahl mir am Rande der Tagung, ein Manuskript auf Englisch zu schreiben. Ich stimmte mit Zögern zu, und 1988 wurde unser Beitrag in der Zeitschrift *Rapid Communications of Mass Spectrometry*^[23] veröffentlicht. Dieser Artikel gilt mittlerweile als einer der Ausgangspunkte der MALDI-Technik.

7.2. Produktion des Geräts und jähres Ende der Verkäufe

Die analytische Technologie und das Instrument wurden in ein kommerzielles Produkt umgesetzt. Um dieses zu verkaufen, reiste ich zu vielen Kunden durch Japan und analysierte mehr als zweihundert Proben. Die Reaktion war fast immer die gleiche: „Kaum ein praktischer Nutzen“. Schließlich blieb nur ein Kunde übrig, auf den wir hoffen konnten, nämlich Dr. Terry D. Lee vom City of Hope's Beckman Research Institute in den USA. Dorthin verkauften wir unser erstes und einziges Instrument. Schon bald darauf wurden weitere Entwicklungsarbeiten an dem Gerät und die Verkäufe eingestellt. Obwohl die Leistungsdaten unseres Instruments mit keinem anderen Gerät vergleichbar waren, erschien sein praktischer Nutzen gering. Dazu muss allerdings gesagt werden, dass für einen Einsatz in der Pharmazie und medizinischen Diagnostik weitere Verbesserungen der Empfindlichkeit, der Massengenauigkeit und der Auflösung notwendig gewesen wären.

8. Entwicklung der MALDI-Technik

Meine Forschungs- und Entwicklungsarbeiten auf dem Gebiet der MALDI-Technik hatte ich bis zu meinem zeitweiligen Wechsel zu Kratos Analytical in Manchester (seit 1989 eine Tochtergesellschaft von Szimadzu) im Jahr 1992 unterbrochen. Während dieser Zeit wurde unsere in die USA und nach Europa transferierte Technik durch die Arbeiten von Professor Cotter, Professor Fenselau und vielen anderen Forschern fortwährend verbessert und verfeinert. Spezielle Anerkennung gebührt den Beiträgen von Professor Michael Karas und Professor Franz Hillenkamp^[24–26] in Deutschland. Ohne deren gewaltige Forschungsleistungen und den Arbeiten von Tausenden von weiteren Forschern wäre die Entwicklung und Ausbreitung dieser Technik, von der so viele Menschen weltweit profitiert haben, sicher nicht möglich gewesen.

9. Zusammenfassung

Die Entwicklung dieser Methode zur Ionisierung von Makromolekülen ist nicht der Einzelleistung eines Genies zu verdanken. Es ist ein Triumph der Teamarbeit und das Ergebnis der redlichen Arbeit vieler Menschen, die nach einer guten und brauchbaren Technik geforscht haben.

Die Geschichte der Chemie ist lang, und es ist nur allzu natürlich, dass dieses Gebiet weitläufig und tiefgehend ist. Deswegen wird gerne angenommen, dass die in der Chemie angewendeten Methoden und Techniken ausnahmslos gut entwickelt sind. Ich bin fest davon überzeugt, dass zur Entwicklung neuer Theorien und deren Umsetzung in praktische Anwendungen das gesamte Wissen eines Fachgebiets mobilisiert werden muss. Ich denke aber auch, dass die von mir entdeckte Technik und die nachfolgenden weltweiten Entwicklungen allgemeine Denkmuster der Chemie durchbrochen haben. Unter „chemischer“ Befangenheit stehend wäre ich bestimmt nicht in der Lage gewesen, diese einzigartige Entdeckung zu machen. Auch wenn ich mir keine überdurchschnittlichen intellektuellen Fähigkeiten zuspreche und meine akademische Ausbildung abseits der Chemie lag, so denke ich doch, dass sich mein Beitrag zur Entwicklung einer chemierelevanten Technik hinreichend nachzeichnen lässt. Es wäre mir damit eine große Freude, wenn viele Menschen weltweit – und speziell Ingenieure in Unternehmen – ihren Mut mobilisierten und an ihren Träumen festhielten, um wissenschaftliche Innovation zum Nutzen Aller zu entwickeln.

Ich danke Ralph Nesson für seine großartige Hilfe bei der Vorbereitung der Präsentation des Nobel-Vortrags und für seine Geduld, mit der er mich bei der Formulierung des im Original englischsprachigen Aufsatzes unterstützt hat. Zudem möchte ich mich bei Prof. Robert Cotter, Prof. Catherine Fenselau, Dr. Chris Sutton und Dr. Andrew Bowdler für viele anregende Diskussionen bedanken.

Eingegangen am 17. Februar 2003 [A585]

Übersetzt von Dr. Mathias Schäfer

Institut für Organische Chemie, Universität zu Köln

- [1] „The Mass-Reflectron, a New Nonmagnetic Time-of-Flight Mass Spectrometer with High Resolution“: B. A. Mamyryn, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin, *Sov. Phys. JETP* **1973**, 37, 45–48.
- [2] „Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution“: W. C. Wiley, I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, 26, 1150–1157.
- [3] „Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction“: M. S. B. Munson, F. H. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 2621–2630.
- [4] „Photodissociation of Salt Molecules into Ions“: A. Terrenin, B. Popov, *Phys. Z. Sowjetunion* **1932**, 2, 299–318.
- [5] „Mass Spectrometry of Aromatic Molecules with Resonance-Enhanced Multiphoton Ionization“: D. M. Lubman, M. N. Kronick, *Anal. Chem.* **1982**, 54, 660–665.
- [6] „Ion Formation by [Li]⁺ Ion Attachment in High Electric Fields“: U. Giessmann, F. W. Röllgen, *Org. Mass Spectrom.* **1976**, 11, 1094–1100.

- [7] „Field Ion Emitters for Field Desorption of Salts“: F. W. Röllgen, U. Giessmann, H. J. Heinen, S. J. Reddy, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1977**, *24*, 235–238.
- [8] „In-beam Electron Impact Mass Spectrometry of Amino Sugars“: M. Ohashi, S. Yamada, H. Kudo, N. Nakayama, *Biomed. Mass Spectrom.* **1978**, *5*, 578–581.
- [9] „Proton Transfer Mass Spectrometry of Peptides. A Rapid Heating Technique for Underivatized Peptides Containing Arginine“: R. J. Beuhler, E. Flanigan, L. J. Greene, L. Friedman, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3990–3999.
- [10] „Chemical Ionization Mass Spectrometry of Salts and Thermally Labile Organics with Field Desorption Emitters as Solids Probes“: D. F. Hunt, J. Shabanowitz, F. K. Botz, D. A. Brent, *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 1160–1163.
- [11] „Surface Chemical Ionization Mass Spectrometry“: G. Hansen, B. Munson, *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1130–1134.
- [12] „The Effects of Heating Rate and Sample Size on the Direct Exposure/Chemical Ionization Mass Spectra of Some Biological Conjugates“: R. J. Cotter, C. Fenselau, *Biomed. Mass Spectrom.* **1979**, *6*, 287–293.
- [13] „High Mass Analysis by Laser Desorption Fourier Transform Mass Spectrometry“: C. L. Wilkins, D. A. Weil, C. L. C. Yang, C. F. Ijames, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 520–524.
- [14] „Fast Atom Bombardment of Solids (F.A.B.): A New Ion Source for Mass Spectrometry“: M. Barber, R. S. Bordori, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 325–327.
- [15] „Fast Atom Bombardment Quadrupole Mass Spectrometry“: D. J. Surman, J. C. Vickerman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 324–325.
- [16] „Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer I – Curved Electric Field Ion Reflector“: Y. Yoshida, K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, T. Yoshida, *Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai Yoshishu*, **1987**, *35*, 12–13 (in Japanese).
- [17] „Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer II – High-speed, High-accuracy Measuring Circuit for TOF Spectrum“: S. Akita, K. Tanaka, Y. Ido, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai Yoshishu* **1987**, *35*, 14–15 (in Japanese).
- [18] „Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer III – Sensitive Ion Detection in High Mass Range“: Y. Ido, K. Tanaka, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai Yoshishu*, **1987**, *35*, 20–21 (in Japanese).
- [19] „Development of Laser Ionization Time of Flight Mass Spectrometer IV – Generation of Quasi-Molecular Ions from High Mass Organic Compound“: K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai Yoshishu*, **1987**, *35*, 22–23 (in Japanese).
- [20] „High Molecular Ion Detection using Laser Ionization TOF Mass Spectrometer“: T. Yoshida, K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, *Shitsuryo Bunseki Rengo Toronkai Yoshishu*, **1987**, *35*, 30–31 (in Japanese).
- [21] „Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry“: K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Proceedings of the Second Japan–China Joint Symposium on Mass Spectrometry* **1987**, 185–188.
- [22] „Plasma Desorption Mass Spectrometry: Coming of Age“: R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 781A–793A.
- [23] „Protein and Polymer Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry“: K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151–153.
- [24] „Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules“: M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935–2939.
- [25] „Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons“: M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.
- [26] „Ultraviolet-Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Femtomolar Amounts of Large Proteins“: M. Karas, A. Ingen-doh, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1989**, *18*, 841–843.